

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6646100号  
(P6646100)

(45) 発行日 令和2年2月14日(2020.2.14)

(24) 登録日 令和2年1月14日(2020.1.14)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	ZNA
<b>C12N 15/13 (2006.01)</b>	C12N 15/13	
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395	N
<b>A61P 3/10 (2006.01)</b>	A61P 3/10	
請求項の数 21 (全 84 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-89004 (P2018-89004)	(73) 特許権者	500034653 ジェンザイム・コーポレーション アメリカ合衆国02142 マサチューセツ州 ケンブリッジ、ピニー・ストリート 50番
(22) 出願日	平成30年5月7日(2018.5.7)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(62) 分割の表示	特願2014-553482 (P2014-553482) の分割	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
原出願日	平成25年1月18日(2013.1.18)	(72) 発明者	ミシェル・ユード アメリカ合衆国マサチューセツ州02421. レキシントン. センターストリート 10
(65) 公開番号	特開2018-166506 (P2018-166506A)		
(43) 公開日	平成30年11月1日(2018.11.1)		
審査請求日	平成30年5月23日(2018.5.23)		
(31) 優先権主張番号	61/588,936		
(32) 優先日	平成24年1月20日(2012.1.20)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗CXCR3抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CXCR3に結合することができる抗体または抗原結合フラグメントにおいて、  
該抗体または抗原結合フラグメントは、  
6つの相補性決定領域(CDR)：重鎖可変ドメイン(VH)CDR1、VH CDR2、  
VH CDR3、軽鎖可変ドメイン(VL)CDR1、VL CDR2、およびVL  
CDR3を含み：

VH CDR1は、GFTFSNYA(配列番号228)であり、  
VH CDR2は、ISNGGSYT(配列番号230)であり、  
VH CDR3は、SRPERSHYATSQFAY(配列番号232)であり、  
VL CDR1は、SSVSY(配列番号235)であり、  
VL CDR2は、DTS(配列番号237)であり、

および

VL CDR3は、QQWSSSPLT(配列番号239)である、前記抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項2】

キメラであり、CDRグラフト化され、突然変異し、1つまたはそれ以上の脱アミド部位が除去されるように突然変異し、ヒト化され、ヒト化され復帰突然変異し、合成であり、または組換えである、請求項1に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項3】

- a) 配列番号 1 の残基 1 ~ 58 を含むペプチド；
- b) 配列番号 1 の残基 1 ~ 16 を含むペプチド；および
- c) 配列番号 1 の残基 1 ~ 37 を含むペプチド

からなる群から選択されるペプチドを含むポリペプチドに結合することができる、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 4】

- a) アミノ酸配列 SDHQVLNDAE (配列番号 71) を含むペプチド；
- b) アミノ酸配列 SDHQVLND (配列番号 72) を含むペプチド；
- c) アミノ酸配列 DHQVLND (配列番号 73) を含むペプチド；
- d) アミノ酸配列 VLNDAE (配列番号 74) を含むペプチド；
- e) アミノ酸配列 VLND (配列番号 75) を含むペプチド；
- f) アミノ酸配列 XDXXVXNDXX (配列番号 76) を含むペプチド；
- g) アミノ酸配列 XDXXVXND (配列番号 77) を含むペプチド；
- h) アミノ酸配列 DX XVXND (配列番号 78) を含むペプチド；
- i) アミノ酸配列 VXNDXX (配列番号 79) を含むペプチド；

および

- j) アミノ酸配列 VXND (配列番号 80) を含むペプチド

(ここで X は、任意のアミノ酸を示す)

からなる群から選択されるペプチドを含むポリペプチドに結合することができる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 5】

重鎖可変領域を含み、

該重鎖可変領域は、配列番号 18 に少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 6】

重鎖可変領域は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 7】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、

該重鎖可変領域は、配列番号 18、20、22、24、26、および 27 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含み、

該軽鎖可変領域は、配列番号 19、21、23、25 および 34 ~ 37 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含み、

VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、および VL CDR3 が、請求項 1 に記載のものと 100% 同一である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 8】

重鎖可変領域は、配列番号 18、20、22、24、26 および 27 なる群から選択されるアミノ酸配列を含み；

かつ

軽鎖可変領域は、配列番号 19、21、23、25、および 34 ~ 37 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 9】

重鎖可変領域は、配列番号 18 に少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含み、そして軽鎖可変領域は、配列番号 19 に少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 10】

重鎖可変領域は、配列番号 18 に少なくとも 98% 同一なアミノ酸配列を含み、そして軽鎖可変領域は、配列番号 19 に少なくとも 98% 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の抗体またはフラグメント。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 1】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメントのアミノ酸配列をコードする単離された核酸。

**【請求項 1 2】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメントを産生する方法において、該抗体またはフラグメントを産生するのに適した条件下で、培地中で請求項 1 1 に記載の核酸を含む宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

**【請求項 1 3】**

初発の 1 型糖尿病 ( T 1 D ) を防止し、処置し、またはその進行を低減するための医薬を製造するための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメントの使用。 10

**【請求項 1 4】**

抗体またはそのフラグメントは、 $0.03 \sim 3.7 \text{ mg / kg / 用量}$ の用量で投与される、請求項 1 3 に記載の使用。

**【請求項 1 5】**

抗体またはそのフラグメントは、全ての投与に対する用量の合計が  $0.16 \sim 1.8 \text{ mg / kg}$  で投与される、請求項 1 3 または 1 4 に記載の使用。

**【請求項 1 6】**

抗体またはそのフラグメントは、初発の T 1 D を有し、 $0.2 \text{ nmol / L}$  より高いかまたはそれに等しい基底の血清 C - ペプチドレベルを有し、かつ / または C - ペプチド刺激の間、 $0.033 \sim 1.0 \text{ nmol / L} \times$  分の合計の空腹時血清 C - ペプチドレベルを有するヒト対象に投与される、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の使用。 20

**【請求項 1 7】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメントと、少なくとも 1 種の追加の作用剤を含むコンジュゲートであって、ここで前記追加の作用剤は、治療剤、可溶化剤、安定剤、免疫抑制剤、受容体、または抗原結合ペプチドである、上記コンジュゲート。

**【請求項 1 8】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメント、または請求項 1 1 に記載の核酸、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。 30

**【請求項 1 9】**

少なくとも 1 種の追加の治療剤をさらに含む、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 0】**

少なくとも 1 種の追加の治療剤が、細胞刺激因子、インスリン、およびインスリン産生細胞からなる群から選択される、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 1】**

試験サンプル中の C X C R 3 の存在または濃度を検出する *in vitro* の方法において、該試験サンプルを、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメントおよび検出可能な標識と接触させることからなり、C X C R 3 の存在または濃度は、検出可能な標識によって生成したシグナルと直接的または間接的に相関する、前記方法。 40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、合衆国法典第 3 5 巻 1 1 9 条に基づき、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2012年1月20日付けで出願された米国仮出願第 6 1 / 5 8 8 , 9 3 6 号の優先権の利益を主張する。

**【0002】**

本発明は、抗体および抗体を使用して 1 型糖尿病 ( I 型糖尿病 ; T 1 D ) のような C X C R 3 シグナル伝達に関連する障害を処置する方法に関する。

**【背景技術】**

## 【 0 0 0 3 】

糖尿病は、様々な特徴的な代謝異常と共にインスリン作用の欠如の結果生じる慢性的な高血糖症を特徴とする。糖尿病は、大きくI型とII型に分けることができる。T1Dは、ランゲルハンス島の膵細胞の損失を特徴とするが、II型糖尿病は、インスリン分泌とインスリン感受性（インスリン耐性）の両方の減少を特徴とする。米国では、糖尿病の罹患率は人口の約2～4パーセントであり、そのうちI型糖尿病（またインスリン-依存性またはIDDMとしても知られている）が全ケースの約7～10パーセントを占めている。

## 【 0 0 0 4 】

I型糖尿病は、グルコースホメオスタシスを維持するのに十分なインスリンを産生できないことを特徴とする。この障害は、自己免疫が介在する膵細胞の破壊によって引き起こされると考えられている。I型糖尿病に関連する自己免疫は、自己反応性BおよびTリンパ球の両方の関与を伴う。実際に、I型糖尿病患者のうち98%までが、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）、インスリンノーマ抗原-2およびインスリンノーマ抗原-2b（IA-2およびIA-2）、ならびに異種の膵島細胞の細胞質内抗原（ICA）などの、それら自身の細胞抗原のうち1つまたはそれ以上に対する抗体を有する。必ずしも決定的とは限らないが、一般的に、1つまたはそれ以上の自己抗体のレベルは、膵細胞の破壊の状態と互いに関係がある。非特許文献1；非特許文献2。したがって、自己抗体は、自己免疫性糖尿病発症の指標として役立つ可能性があり、さらに代謝の変化と共に、T1D患者の親類における糖尿病を発症するリスクを予測することができる。

## 【 0 0 0 5 】

T1D診断の時期の近くで得られた、活性化T細胞が浸潤した膵島を示す組織生検によって証明されたように、I型糖尿病の発症は、自己反応性T細胞が介在する可能性がある。非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6。

## 【 0 0 0 6 】

またケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体3（CXCR3）は、Gタンパク質共役受容体9（GPR9）、CD183、IP-10受容体、およびMig受容体としても知られており、これらは、広範な生理学的プロセスおよびT1Dのような関連障害に関与する、自己反応性T細胞で発現されるケモカイン受容体である。CXCR3は、ナイーブT細胞には存在しないが、抗原で活性化されると上方制御されて、その主要なリガンド：CXCL9、CXCL10、およびCXCL11にตอบสนองして組織の炎症部位に活性化細胞を動員する。細胞は、T1Dのマウスモデル（非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9）；およびインスリン炎を有するT1D患者からの膵島（非特許文献10；非特許文献11；非特許文献9）において、主としてCXCL10を発現し、CXCL9はそれより低いレベルであることが示されている。加えて、T1Dマウスモデルおよび1型糖尿病患者の膵臓サンプルにおいて、膵臓に浸潤したT細胞は、CXCR3を発現することが示されている（非特許文献7；非特許文献12；非特許文献10；非特許文献11；非特許文献9）。さらに、CXCR3欠損ノックアウトマウスは、発病の有意な遅延およびT1D発病率の減少を実証しているが（非特許文献13）、トランスジェニックマウスの膵島におけるCXCL10の過剰発現は、T細胞の浸潤を促進し、T1D発病を早める（非特許文献14）。抗体処置によるCXCL10の中和は、保護的であることが示されている（非特許文献7）。

## 【 0 0 0 7 】

CXCR3には、ヒトで同定されたA、B、およびAltと表示される3種のアイソフォームがあり（非特許文献15；非特許文献16）、CXCR3-Aは、CXCKケモカインCXCL9（MIG）、CXCL10（IP-10）、およびCXCL11（ITAC）に結合し；CXCR3-Bは、これらの標的にも結合するが、CXCL4にも結合し；CXCR3-A1tは、CXCL11と相互作用するようである。選択的スプライシングによりCXCR3の数種のタンパク質アイソフォームの生成が起こるが、CXCR3

- BおよびCXCR3 - Altは、タンパク質レベルにおいてかなり低いレベルで発現されるため、in vivoではCXCR3 - Aが優勢の形態である。非特許文献15；非特許文献16。

【0008】

CXCR3の低分子阻害剤を使用してCXCR3経路を破壊する試みは、十分な有効性がないことが証明されている。非特許文献17。したがって、糖尿病発病前に主としてCXCL10を破壊する抗体および他の方法に調査の焦点が当てられている。非特許文献8；非特許文献18。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0009】

【非特許文献1】Irvineら、Diabetes、26：138～47（1997）

【非特許文献2】Rileyら、N. Engl. J. Med.、323：1167～72（1990）

【非特許文献3】Bottazzoら、N. Engl. J. Med.、313：353～60（1985）

【非特許文献4】Hanninenら、J. Clin. Invest.、90：1901～10（1992）

【非特許文献5】Itohら、J. Clin. Invest.、92：2313～22（1993）

20

【非特許文献6】Imagawaら、Diabetes、50：1269～73（2001）

【非特許文献7】Christenら、The Journal of Immunology、2003、171：6838～6845

【非特許文献8】Morimotoら、J Immunol 2004；173；7017～7024

【非特許文献9】Sarkarら、Diabetes. 2012年2月；61（2）：436～46

【非特許文献10】Unoら、Endocrine J. 57：991～996（2010）

30

【非特許文献11】Roepら、Clinical and Experimental Immunology、2003、159：338～343

【非特許文献12】Van Halterenら、Diabetologia 48：75～82（2005）

【非特許文献13】Frigerioら、Nature Medicine 8：1414～1420（2002）

【非特許文献14】Rhodeら、J. Immunol. 175（6）：3516～24（2005）

【非特許文献15】Lasagniら、J. Exp. Med. 2003 197：1537

40

【非特許文献16】Ehlertrら、J. Immunol. 2004；173；6234～6240

【非特許文献17】Christenら、Clin Exp. Immunol. 165：318～328（2011）

【非特許文献18】Oikawaら、Rev. Diabet. Stud. 7：209～224（2010）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

T1DおよびCXCR3が関連する他の障害の蔓延を考えると、CXCR3シグナル伝 50

達を標的とする、例えば、患者における例えば T 1 D などの障害を処置しまたはその進行を低減する追加の方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

C X C R 3 に結合することができる抗体および抗体の使用方法が、本明細書において開示される。いくつかの実施形態において、本抗体を使用して、C X C R 3 経路を標的とすることにより、対象における T 1 D を防止し、処置しまたはその初期の進行を低減することができる。本抗体および方法は、C X C R 3 に対する中和抗体は、N O D マウスにおいて、疾患の発病前に投与されると T 1 D の発病を防止することができる、または N O D マウスにおいて、T 1 D の初発段階で投与されると疾患の経過を元に戻すことができるという驚くべき結果に少なくとも部分的に基づいている。さらに、C X C R 3 活性の中和は、患者の免疫系の正常な動作への深刻な悪影響を伴わないため、抗体療法の望ましくない副作用が少なくなる。

【0012】

したがって、一態様において、C X C R 3 活性を中和することができる抗体および抗原結合フラグメントが、本明細書において開示される。ある特定の実施形態において、C X C R 3 中和抗体は、配列番号 1 の残基 1 ~ 5 8、1 ~ 1 6、または 1 ~ 3 7 から選択されるペプチドに結合する能力を特徴としていてもよい。いくつかの実施形態において、本抗体は、C 1 1 2、C 1 1 3 5、C 1 8 2、C 1 5 3、および/または C 1 4 と表示される抗体クローン (C 1) の全部または一部を含む。ある特定の実施形態において、開示された抗体の C D R - グラフト化変異体、ヒト化変異体、復帰突然変異した変異体、および完全ヒト変異体などの、抗体 C 1 1 2、C 1 1 3 5、C 1 8 2、C 1 5 3、および/または C 1 4 の変異体が提供される。特定の実施形態において、本抗体は、本明細書で開示されたクローン C 1 1 2、C 1 1 3 5、C 1 8 2、C 1 5 3、および/もしくは C 1 4、またはクローン 4、1 2、5 3、8 2、および 1 3 5 の変異体のいずれかからの、1 つまたはそれ以上の相補性決定領域 (C D R)、例えば、1 つまたはそれ以上の重鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3、ならびに/もしくは 1 つまたはそれ以上の軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、C 1 1 2、C 1 1 3 5、C 1 8 2、C 1 5 3、および/もしくは C 1 4 からの抗体、またはそれらのキメラおよびヒト化バージョンは、抗 C X C R 3 クローン 5 H 7、7 H 5、V 4 4 D 7、1 C 6、および/または 4 9 8 0 1 と比較してある特定の有益な特性を示す。例えば、本明細書で開示された抗体は、抗 h C X C R 3 クローン 5 H 7、7 H 5、V 4 4 D 7、1 C 6、および 4 9 8 0 1 と比較して高い結合親和性を示す可能性がある。例えば、本抗体は、例えば表面プラズモン共鳴 (例えば、B I A C O R E (商標) アッセイを使用) によって測定した場合、1 C 6 のような抗 C X C R 3 抗体よりも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、またはそれより高い倍率 (またはその間のあらゆる値) で優れた親和性を示す可能性がある。また本明細書で開示されたヒト化抗体は、マウス抗 h C X C R 3 クローン 5 H 7、7 H 5、V 4 4 D 7、1 C 6、および 4 9 8 0 1 と比較して、予測された免疫原性の低下も示す。加えて、本明細書で開示された重鎖クローン 4 . 7 ~ 4 . 1 1 は、5 8 位および 5 9 位 (I M G T による番号付けを使用して) における脱アミド部位が除去されるように最適化されており、それによって、最初のマウス抗 h C X C R 3 重鎖可変ドメイン (V H) C D R 2 配列よりも安定性が強化される。

【0013】

別の態様において、本開示は、有効量の C X C R 3 中和抗体を投与することによる、対象における T 1 D 発病前の予防方法、加えて初発の T 1 D を処置しまたはその進行を低減する方法を提供する。特定の実施形態において、対象は、ヒトのような哺乳動物である。

【0014】

ある特定の実施形態において、初発の T 1 D を有する対象は、臨床診断の 6 ヶ月以内に、本明細書で開示された方法によって処置される。他の実施形態において、対象は、臨床

診断から6ヶ月よりも後に処置され、ここで対象は、少なくとも約0.2 nmol/Lの残留した合計の空腹時血清C-ペプチドレベル(fasting integrated serum C-peptide level)を保持する。

【0015】

いくつかの実施形態において、対象は、外因性インスリンの非存在下における、120 mg/dLを超える上昇した空腹時血液グルコースレベル、またはC-ペプチド刺激の間、約0.033~1.0 nmol/L x 分の異常に低い合計の空腹時血清C-ペプチドレベルを特徴としていてもよい。特定の実施形態において、CXCR3中和抗体は、約0.03~3.7 mg/kg/用量の用量で投与される。いくつかの実施形態において、対象に、少なくとも1回分の用量の抗体が投与される。ある特定の実施形態において、対象に、複数回用量の抗体(例えば、少なくとも年1回、年4回、2か月に1回、月1回、2週に1回、週1回、または1日1回)が投与される。さらなる実施形態において、上述した方法は、CXCR3中和抗体の投与と同時に、またはそれと連続して(その前または後に)、免疫抑制剤および/または細胞刺激因子(-cell stimulating agent)を投与する工程をさらに含んでいてもよい。

【0016】

様々な実施形態において、異常なCXCR3発現を特徴とする状態を処置するために、本明細書において開示される抗CXCR3抗体が投与される。いくつかの実施形態において、CXCR3活性の下方制御および/または中和によって利益を得る可能性があるあらゆる状態を処置するために、抗CXCR3抗体が投与される。いくつかの実施形態において、T1Dを処置するために、本明細書において開示される抗CXCR3抗体が投与される。

【0017】

本発明の追加の実施形態および利点は、一部は下記の説明に記載されるが、一部はその説明から明白であると予想され、または本発明の実施により学ぶことができる。本発明の実施形態および利点は、特に添付の特許請求の範囲で指摘された要素および組み合わせによって理解され達成される。

【0018】

前述の一般的な説明および以下の詳細な説明はいずれも、単に典型的かつ説明的なものであり、特許請求された発明を限定しないと理解されるものとする。

【0019】

添付の図面は、本明細書に組み込まれてその一部を構成しており、本発明の1つの(数種の)実施形態(複数可)を例示し、説明と共に、本発明の原理を明確にするのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】6週齢の雌NODマウス(第1の列)、10週齢の雌NODマウス(第2の列)、および初発の糖尿病雌NODマウス(第3の列)からの膵臓の切片における、インスリン(左のパネル)、CXCL10(中心のパネル)、およびCD3(右のパネル)の発現を示す図である。

【図2】初発の糖尿病を有する雌NODマウスの膵臓からのT細胞におけるCXCR3発現のフローサイトメトリー分析のグラフである。下の2つのグラフにおいて実線で示されたように、CD4+およびCD8+T細胞を同定し、CXCR3発現に関して染色した。同じ2つのグラフにおいて、アイソタイプ対照の染色は、影付きの曲線によって示される。

【図3】経時的な非糖尿病雌NODマウスのパーセンテージを示す図であり、PBS、抗CXCR3、および対照IgGでの動物の処置は、糖尿病発病前、10週齢で開始した。図3Aおよび3Bに2つの独立した研究からの結果を示す。

【図4】抗CXCR3抗体で予防的に処置した26週齢の非糖尿病雌NODマウスからの膵臓の切片を示す図であり、上記処置は、10週齢で開始し、染色は、インスリン(左の

10

20

30

40

50

パネル)またはCD3/Foxp3(中心および右のパネル)に関してなされた。右のパネルは、中心のパネルで示される切片の倍率を高めた画像である。

【図5】PBS、抗CXCR3抗体、対照IgG、およびマウス抗胸腺細胞グロブリン(マウスサイモグロブリン、mATG)抗体で処置した雌NODマウスの1日の早朝血液グルコース値を示す図であり、上記処置は、マウスが糖尿病とみなされてから3~4日以内に開始された。各ラインは、個々のマウスを表す。矢印は、処置がなされた日を表示する。

【図6】Aは、PBS、抗CXCR3抗体、対照IgG、ならびにCD4+(左のグラフ)およびCD8+(右のグラフ)であるmATG抗体で処置した雌NODマウスからのT細胞のパーセンテージを示す棒グラフである。処置の経過中に、5回目の被験物質注入後のマウスから、加えて年齢を適合させたmATG処置マウスから、膵臓を回収した。Bは、PBS、対照抗体、または抗CXCR3抗体で処置したマウスの膵臓からのCD4+T細胞における、CD44発現(縦軸)とCD62L発現(横軸)とのプロットである。G1およびG2は、それぞれ、ゲーティングした高CD44/低CD62Lおよび低CD44/低CD62LのT細胞を指す。Cは、アイソタイプ対照抗体で染色してリンパ球でゲーティングした細胞におけるCXCR3発現と比較した、G1およびG2でのCD4+T細胞におけるCXCR3の発現を示す。

【図7】対照IgG(左のパネル)、抗CXCR3抗体(中心のパネル)、およびmATG(右のパネル)で処置し、インスリン(上の列)またはCD3/Foxp3(下の列)に関して染色した、雌NODマウスからの膵臓の切片を示す図である。

【図8】年齢を適合させた非糖尿病雌NODマウス(図8A)、PBSで処置した糖尿病NODマウス(図8B)、抗CXCR3抗体処置後に疾患が寛解しているNODマウス(図8C)、および対照IgG抗体で処置した糖尿病NODマウス(図8D)におけるグルコース刺激後の血液グルコースレベルのプロットである。グルコース刺激は、最初の糖尿病の診断および研究への登録の100日後におけるマウスに行われた。各ラインは、個々の動物からのデータを表す。

【図9】PBS、抗CXCR3、対照IgG、またはmATG抗体で処置した雌NODマウスから単離したプールしたドナーCD4+およびCD8+T細胞を受け入れたNOD.Scidレシピエントに関する、経時的な非糖尿病マウスのパーセンテージを示す図である。PBSもしくは対照IgGでの処置から約80~90日後に糖尿病雌NODマウスから、または抗CXCR3もしくはmATG抗体での処置から約80~90日間後に疾患が寛解している雌NODマウスから、T細胞を単離した。図9Aおよび9Bに2つの独立した研究からの結果を示す。

【図10】Aは、図9で説明されているように、PBS、抗CXCR3、対照IgG、またはmATG抗体で処置した雌NODマウスから単離したCD4+およびCD8+ドナーT細胞のパーセンテージを示すグラフである(左のパネル)。図10Aの右のパネルに、各処置群に関するCD4+およびCD8+T細胞ドナープールにおけるエフェクターおよびセントラルメモリー細胞(central memory cell)のパーセンテージを示す。Bは、CD4およびCD25の発現またはCD4、CD25、およびFoxp3の発現によって同定された、ドナーT細胞プールにおける制御性T細胞のパーセンテージを示すグラフである。Cは、CXCR3も発現するドナーT細胞プールにおけるCD8+(左のパネル)およびCD4+(右のパネル)のパーセンテージを示すグラフである。

【図11】未処置のままの、または抗CXCR3抗体もしくは対照IgGで処置したRIP-OVAレシピエントマウスへの、ドナーOVA特異的TCRトランスジェニックマウスからのT細胞の養子免疫伝達(adoptive transfer)後の、経時的な非糖尿病マウスのパーセンテージを示すグラフである。図11Aおよび11Bに2つの研究からの結果を示す。

【図12】Aは、RIP-OVAレシピエントマウスへの養子免疫伝達前の、フローサイトメトリーによって分析したドナーT細胞におけるCXCR3発現(実線の曲線)を示す

グラフである。アイソタイプ対照抗体での染色を影付きの曲線で示す。Bは、養子免疫伝達後2、4、7、9、および15日目の、抗CXCR3または対照IgG抗体で処置したレシピエントマウスの血液、脾臓、および腓リンパ節におけるドナー細胞のパーセンテージを示すグラフである。Cは、養子免疫伝達後、抗CXCR3または対照IgG抗体で処置したレシピエントマウスの血液、脾臓、および腓リンパ節におけるドナー増殖性細胞のパーセンテージを示すグラフである。Dは、養子免疫伝達後、抗CXCR3または対照IgG抗体で処置したレシピエントマウスの血液、脾臓、および腓リンパ節におけるCXCR3+ドナー細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図13】処置せずに、インスリン（左上）もしくはCD3（右上）に関して染色した、または抗CXCR3抗体で処置し、インスリン（左下）もしくはCD3（右下）に関して染色したRIP-OVAレシピエントマウスからの腓臓の切片を示す写真である。腓臓を、ドナーT細胞の養子免疫伝達から60日後に回収した。

【図14】A~Cは、クローンC14、12、53、82、および135が介在する、CXCL11に対するCXCR3介在走化性の障害のレベルを示すグラフである。データは、走化性アッセイで移動する細胞の平均相対的な蛍光単位(RFU)として示される。Dは、抗体クローンC14、12、53、および135についてカルシウム動員を50%阻害するのに必要な抗体の濃度を示すグラフである。

【図15】クローンC14、12、53、82、および135が介在する、CXCL9（図15A）、CXCL10（図15B）、およびCXCL11（図15C）に対するCXCR3介在走化性の障害のレベルを示すグラフである。データは、走化性アッセイで移動する細胞の平均相対的な蛍光単位(RFU)として示される。

【図16】様々な異なるケモカイン受容体を発現する細胞への抗体結合のヒストグラムプロットを示すグラフである。各ヒストグラムプロットについて、結合した抗体の濃度は、横軸に沿って増加する。

【図17A】クローン4.0（「親」と標識）ならびにある特定のヒト化変異体（VH1-3および7-11およびVK1-3と標識）に関する重鎖（VH）および軽鎖（VK）可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Aは、配列番号18、20、22、24、29~33、および659で示される重鎖配列、ならびに配列番号19、25、21、23、および660で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。

【図17B】クローン12.0（「親」と標識）ならびにある特定のヒト化変異体（VH1-3およびVK1-3と標識）に関する重鎖（VH）および軽鎖（VK）可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Bは、配列番号2、4、6、8、および661で示される重鎖配列、ならびに配列番号3、5、7、9、および662で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。

【図17C】クローン53.0（「親」と標識）ならびにある特定のヒト化変異体（VH1-6およびVK1-9と標識）に関する重鎖（VH）および軽鎖（VK）可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Cは、配列番号38、40、42、44、46~48、および663で示される重鎖配列、ならびに配列番号39、41、43、45、49~54、および664で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。

【図17D】クローン82.0（「親」と標識）ならびにある特定のヒト化変異体（VH1-3およびVK1-3と標識）に関する重鎖（VH）および軽鎖（VK）可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Dは、配列番号55、57、59、61、および665で示される重鎖配列、ならびに配列番号56、58、60、62、および666で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。

【図17E】クローン135.0（「親」と標識）ならびにある特定のヒト化変異体（VH1-3およびVK1-3と標識）に関する重鎖（VH）および軽鎖（VK）可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Eは、配列番号10、12、14、16、お

よび667で示される重鎖配列、ならびに配列番号11、13、15、17、および668で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。

【図17F】クローン4.0(「親」と標識)ならびにある特定の4Dヒト化変異体(VH4-6およびVK4-7と標識)に関する重鎖(VH)および軽鎖(VK)可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Fは、配列番号19、34~37、および669で示される軽鎖配列、ならびに配列番号18、27、28、および26で示される重鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。

【図17G】クローン53.0(「親」と標識)ならびにある特定の4Dヒト化変異体(VH7-10およびVK10-13と標識)に関する重鎖(VH)および軽鎖(VK)可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Gは、配列番号38、63~66、および663で示される重鎖配列、ならびに配列番号39、67~70、および664で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。図17A~Gにおける各アラインメントの下の配列は、最も近いヒト生殖細胞系の配列を表す。黒い囲みは、CDRドメインを表示し、影付きの残基は、それに対応する生殖細胞系の残基(図17A~E)またはそれに対応する親の残基(図17F~G)と配列が異なっており、ここではIMGTによる番号付けとCDRの境界が使用される。

【図17H】クローン4.0、12.0、82.0、および135、加えて抗体クローン5H7および7H5に関する重鎖(VH)および軽鎖(VK)可変ドメインのアラインメントを示す図である。図17Hは、配列番号18、2、38、55、10、および670~671で示される重鎖配列、ならびに配列番号19、3、39、56、11、および672~673で示される軽鎖配列を開示するものであり、これらはそれぞれ、アラインメントに記載された順である。黒枠は、CDRドメインを表示し、影付きの残基は、アラインメント中の前の配列と配列が異なっており、IMGTによる番号付けが使用されている。

【図18】抗体クローン4、12、53、82、および135に関する最小限のエピトープ残基の境界を示す図である。結合活性に重要な残基は、Xで表示される。図18は配列番号81を開示するものである。

【図19】キメラクローン4、12、53、82、および135、加えてヒト化変異体Hu1、Hu2、Hu3に関する、ヒトCXCR3でトランスフェクションした300.19細胞における抗体結合を示すヒストグラムプロットである。抗体を5 $\mu$ g/ml(黒のライン)、0.5 $\mu$ g/ml(暗い灰色のライン)、もしくは0.1 $\mu$ g/ml(黒の点線)で投与し、または5 $\mu$ g/mlの二次抗体を単独(塗り潰された灰色のヒストグラム)で投与し、データを、蛍光の最大パーセンテージに対する細胞数(横軸)としてプロットする。

【図20】クローン4、12、53、82、および135、または市販のクローン1C6の10 $\mu$ g/mlのキメラ(Chim)またはヒト化(Hu1、Hu2またはHu3)抗体変異体の存在下または非存在下で、CXCL9(図20A)、CXCL10(図20B)、およびCXCL11(図20C)へのヒトCXCR3でトランスフェクションした細胞の移動(縦軸)の阻害パーセンテージを示すグラフである。

【図21】クローン4、12、53、82、および135および市販のクローン1C6のキメラ(Chim)およびヒト化(Hu1、Hu2またはHu3)抗体変異体の、ヒトCXCR3-Gqi4qi4でトランスフェクションしたCHO細胞におけるカルシウム動員を阻害する能力を示すプロットである。抗体濃度(横軸)は、最大の阻害のパーセント(縦軸)に対してプロットされる。

【図22】NOD-scid IL2r<sup>nu11</sup>(NSG)マウスにおける、CD3+/CD4+T細胞(図22A)、CD3+/CD8+T細胞(図22B)、CXCR3+/CD3+/CD4+T細胞(図22C)、およびCXCR3+/CD3+/CD8+T細胞(図22D)のパーセンテージに対する抗CXCR3抗体処置の作用を示すグラフで

ある。HuIgG1は、ヒトIgG1(ハーセプチン)を表示し、クローン4、12、53、82、および135は、キメラ抗体クローンを指す。

【図23A】重鎖および軽鎖クローン12.0に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図23B】重鎖および軽鎖クローン12.1に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図23C】重鎖および軽鎖クローン12.2に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図23D】重鎖および軽鎖クローン12.3に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図24A】重鎖および軽鎖クローン135.0に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図24B】重鎖および軽鎖クローン135.1に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図24C】重鎖および軽鎖クローン135.2に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図24D】重鎖および軽鎖クローン135.3に関するアミノ酸配列を表す図である。

10

【図25A】重鎖および軽鎖クローン4.0に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25B】重鎖および軽鎖クローン4.1に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25C】重鎖および軽鎖クローン4.2に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25D】重鎖および軽鎖クローン4.3に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25E】重鎖クローン4.4に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25F】重鎖クローン4.5に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25G】重鎖クローン4.6に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25H】重鎖クローン4.7に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25I】重鎖クローン4.8に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25J】重鎖クローン4.9に関するアミノ酸配列を表す図である。

20

【図25K】重鎖クローン4.10に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25L】重鎖クローン4.11に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25M】軽鎖クローン4.4に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25N】軽鎖クローン4.5に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25O】軽鎖クローン4.6に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図25P】軽鎖クローン4.7に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26A】重鎖および軽鎖クローン53.0に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26B】重鎖および軽鎖クローン53.1に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26C】重鎖および軽鎖クローン53.2に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26D】重鎖および軽鎖クローン53.3に関するアミノ酸配列を表す図である。

30

【図26E】重鎖クローン53.4に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26F】重鎖クローン53.5に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26G】重鎖クローン53.6に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26H】軽鎖クローン53.4に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26I】軽鎖クローン53.5に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26J】軽鎖クローン53.6に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26K】軽鎖クローン53.7に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26L】軽鎖クローン53.8に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26M】軽鎖クローン53.9に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26N】重鎖クローン53.7に関するアミノ酸配列を表す図である。

40

【図26O】重鎖クローン53.8に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26P】重鎖クローン53.9に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26Q】重鎖クローン53.10に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26R】軽鎖クローン53.10に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26S】軽鎖クローン53.11に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26T】軽鎖クローン53.12に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図26U】軽鎖クローン53.13に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図27A】重鎖および軽鎖クローン82.0に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図27B】重鎖および軽鎖クローン82.1に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図27C】重鎖および軽鎖クローン82.2に関するアミノ酸配列を表す図である。

50

【図27D】重鎖および軽鎖クローン82.3に関するアミノ酸配列を表す図である。

【図28A】図28A～Pは、重鎖クローン12.0～12.3および軽鎖クローン12.0～12.3、重鎖クローン135.0～135.3および軽鎖クローン135.0～135.3、重鎖クローン4.0～4.11および軽鎖クローン4.0～4.7、重鎖クローン53.0～53.6および軽鎖クローン53.0～53.9、ならびに重鎖クローン82.0～82.3および軽鎖クローン82.0～82.3に関する核酸配列を示す。

【図28B】図28Aの続き。

【図28C】図28Bの続き。

【図28D】図28Cの続き。

【図28E】図28Dの続き。

【図28F】図28Eの続き。

【図28G】図28Fの続き。

【図28H】図28Gの続き。

【図28I】図28Hの続き。

【図28J】図28Iの続き。

【図28K】図28Jの続き。

【図28L】図28Kの続き。

【図28M】図28Lの続き。

【図28N】図28Mの続き。

【図28O】図28Nの続き。

【図28P】図28Oの続き。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下で本開示に係る特定の代表的な実施形態について詳細に述べるが、そのうちいくつかの実施例が添付の図面で例示される。

【0022】

CXCR3

CXCR3 (MIM: 300574、ヒト遺伝子番号: 2833、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体3; また、CD182、CD183、CKR-L2、CMKAR3、GPR9、IP10-R、Mig-R、MigR、Gタンパク質共役受容体9、IP-10受容体、IP10受容体、Mig受容体、ケモカイン(C-X-C)受容体3、インターフェロン誘導性タンパク質10受容体としても知られている)は、大部分がナイーブT細胞には存在しないが、抗原で活性化されると上方制御されて、その一次リガンド: CXCL9 (ヒト遺伝子番号: 4283)、CXCL10 (ヒト遺伝子番号: 3627)、およびCXCL11 (ヒト遺伝子番号: 6373) に応答して組織の炎症部位にこれらの細胞を動員するケモカイン受容体である。ランゲルハンス島の細胞は、CXCL9およびCXCL10を発現し (Frigerioら、Nature Medicine 8: 1414~1420 (2002)、膵臓に浸潤したT細胞は、CXCR3を発現する (Christenら、The Journal of Immunology、2003、171: 6838~6845; Van Halterenら、Diabetologia 48: 75~82 (2005); Unoら、Endocrine J. 57: 991~996 (2010); Roepら、Clinical and Experimental Immunology、2003、159: 338~343; Tanakaら、Diabetes 58: 2285~2291 (2009); Sarkarら、Diabetes. 2012年2月; 61(2): 436~46)。

【0023】

CXCR3は、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、チンパンジー、マカク、イヌ、カエル、カモノハシ、ブタ、およびゼブラフィッシュなどの様々な生物で発現される。表1に、様々な生物からのCXCR3に関する米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の遺伝子番号およびタンパク質参照配列を列挙する。配列番号1は、全長ヒトC

10

20

30

40

50

XCR3配列(スプライス変異体A)である。スプライス変異体Bのペプチド配列は、参照配列NP\_001136269.1により入手できる。ヒトXCR3スプライス変異体Aの予測された細胞外ドメインは、Colvinら、Mol. Cell. Bio., 26:5838~49(2006)で説明されており、以下に示すような配列番号1の残基1~58、1~16、111~126、190~223、278~301を包含する。

## 【0024】

配列番号1 NP\_001495 ヒトXCR3アイソフォームA

```

1  m v l e v s d h q v   l n d a e v a a l l   e n f s s s y d y g   e n e s
d s c c t s   p p c p q d f s l n   f d r a f l p a l y
61  s l l f l l g l l g   n g a v a a v l l s   r r t a l s s t d t   f l l
h l a v a d t   l l v l t l p l w a   v d a a v q w v f g
121 s g l c k v a g a l   f n i n f y a g a l   l l a c i s f d r y   l n
i v h a t q l y   r r g p p a r v t l   t c l a v w g l c l
181 l f a l p d f i f l   s a h h d e r l n a   t h c q y n f p q v   g r
t a l r y l q l   v a g f f l p l l v   m a y c y a h i l a
241 v l l v s r g q r r   l r a m r l v v v v   v v a f a l c w t p   y h
l v v i v d i l   m d l g a l a r n c   g r e s r v d v a k
301 s v t s g l g y m h   c c l n p l l y a f   v g v k f r e r m w   m l
l l r l g c p n   q r g l q r q p s s   s r r d s s w s e t
361 s e a s y s g l

```

10

20

## 【0025】

## 【表1】

表1

種	遺伝子番号	タンパク質配列
ヒト( <i>Homo sapiens</i> )	2833	NP_001495.1 (A) NP_001136269.1 (B)
ハツカネズミ( <i>Mus musculus</i> )	12766	NP_034040.1
ドブネズミ( <i>Rattus norvegicus</i> )	84475	NP_445867.1
ウシ( <i>Bos taurus</i> )	497018	NP_001011673.1
アカゲザル( <i>Macaca mulatta</i> )	699438	NP_001138512.1
ゼノパス・トロピカリス( <i>Xenopus tropicalis</i> )	496477	NP_001011067.1
アフリカツメガエル( <i>Xenopus laevis</i> )	443669	AAH73571.1
イヌ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	491952	NP_001011887.1
チンパンジー( <i>Pan troglodytes</i> )	465704	XP_521125.2 XP_001137964.1 XP_001137867.1
イノシシ( <i>Sus scrofa</i> )	492278	CAH64842.1
ゼブラフィッシュ( <i>Danio rerio</i> )	791973 654692	NP_001007315.1, XP_001330996.1 NP_001082899.2 XP_001923160.1
タイセイヨウサケ( <i>Salmo salar</i> )	100195464	NP_001133965.1
カモノハシ( <i>Ornithorhynchus anatinus</i> )	100085584	XP_001515888.1

## 【0026】

XCR3およびCXCL10は、ヒトT1D患者で発現される。Unoら、Endocrine J. 57:991~996(2010); Roepら、Clin. and

50

Exp. Immun. 159: 338~343 (2009); Tanakaら、Diabetes 58: 2285~2291 (2009)。これらの患者において、CXCL10は、膵島中の残存するインスリン産生ベータ細胞で発現される。CXCR3は、膵島周囲の浸潤性T細胞で発現される。糖尿病マウスモデルである非肥満糖尿病(NOD)マウスで、類似の発現パターンが再現されている。Morimotoら、J Immunol 2004; 173: 7017~7024; Liら、World J Gastroenterol. 11(30): 4750~4752 (2005); Sarkarら、Diabetes. 2012年2月; 61(2): 436~46)。

【0027】

またCXCR3は、ある特定のタイプの炎症組織に存在するT細胞でも発現されるが、CXCL9、CXCL10、およびCXCL11は、炎症性病変の局所的な細胞によって産生されることが多い。したがって、いくつかの実施形態において、T1Dを処置するためにCXCR3を破壊する療法が開示されている。

【0028】

抗体

用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、源、起源の種、産生方法、および/または特徴に関係なく、抗原-結合部位を含むあらゆるポリペプチドを指し、免疫グロブリンまたはそれらの抗原結合部分もしくはフラグメントを包含する。非限定的な例として、用語「抗体」は、ヒト、オランウータン、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、およびニワトリの抗体を包含する。この用語は、これらに限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異的、多特異的、非特異的、ヒト化、完全ヒト、ラクダ化、一本鎖、キメラ、合成、組換え、ハイブリッド、突然変異、復帰突然変異、およびCDR-グラフト化抗体を包含する。またこの用語は、本発明の目的のために、特に他の指定がない限り、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、dAb、VHH(またナノボディとも称される)のような抗体フラグメント、および二重特異性または多重特異性抗体などの抗原結合機能を保持する他の抗体フラグメントも包含する。用語「抗体」はまた、免疫グロブリンをベースとしない抗原結合分子も指す。例えば、当技術分野で公知の非免疫グロブリン足場は、小モジュール免疫薬(small modular immunopharmaceutical)(例えば、それぞれ2008年7月31日および2008年9月18日に公開された米国特許出願公開第20080181892号および20080227958号を参照)、テトラネクチン、フィブロンネクチンドメイン(例えば、アドネクチン(AdNectin)、2007年4月12日に公開された米国特許出願公開第2007/0082365号を参照)、タンパク質A、リポカリン(例えば、米国特許第7,118,915号を参照)、アンキリン反復、およびチオレドキシンを包含する。

【0029】

用語「抗原-結合ドメイン」は、抗原の一部または全部に特異的に結合するか、またはそれらに相補的な領域を含む抗体分子の一部を指す。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の一部にしか結合しない可能性がある。ある特定の実施形態において、CXCR3抗体または抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの抗原-結合ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本抗体またはフラグメントが、同一または異なるエピトープで2つまたはそれ以上のCXCR3分子と結合することができるように、または高親和性でCXCR3および少なくとも1つの他の抗原に結合することができるように、本抗体またはフラグメントは多重特異性であり、2つまたはそれ以上の(例えば、2、3、4、5、またはそれより多くの)抗原-結合ドメインを含む。抗体の抗原結合部位は、抗原に特異的に結合する能力を保持する1つまたはそれ以上の抗体のフラグメントを含んでいてもよい。これらのフラグメントは、親抗体からの、または親抗体の変異体からの重鎖および/または軽鎖可変領域を含んでいてもよい。

【0030】

「エピトープ」または「抗原決定基」は、抗体の抗原-結合ドメインとの特異的な相互作用に参与する抗原分子の部分である。抗原-結合ドメインは、1つまたはそれ以上の抗

体可変ドメインによって提供される可能性がある。抗原 - 結合ドメインは、少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域 (V L) および少なくとも1つの抗体重鎖可変領域 (V H) を含む可能性がある。抗原 - 結合ドメインはまた、V H 領域のみ、またはV L 領域のみを含む場合もある。例えば、ラクダおよびラマ (ラクダ科 (C a m e l i d a e)、ラクダ科 (c a m e l i d s)) からの抗体は、重鎖のみで形成され軽鎖がない独特な種類の抗体を包含する。このような抗体の抗原 - 結合部位は、V H H と称される1つの単一ドメインである。これらは、「ラクダ化抗体」または「ナノボディ」と呼ばれる。例えば、参照により組み入れられる米国特許第5,800,988号および6,005,079号、ならびに国際出願公報W O 9 4 / 0 4 6 7 8 号およびW O 9 4 / 2 5 5 9 1 号を参照されたい。

#### 【0031】

本明細書で開示された抗C X C R 3 抗体は、当技術分野で公知のあらゆる好適な方法によって生成することができる。例えば、本抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を含んでいてもよい。ポリクローナル抗体の製造方法は、当業者に公知である (H a r l o w ら、A n t i b o d i e s : a L a b o r a t o r y M a n u a l、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、第2版 (1988))。C X C R 3 のポリペプチド、それらのフラグメント (例えば、1つまたはそれ以上の細胞外ドメイン、もしくはN末端の58アミノ酸、もしくはN末端の37アミノ酸、もしくはN末端の20アミノ酸、もしくはN末端の16アミノ酸など)、融合タンパク質、またはそれらの変異体を含む免疫原が、抗C X C R 3 抗体の生成に使用することができる。

#### 【0032】

免疫原は、C X C R 3 を産生する、または過剰産生する細胞によって産生してもよく、このような細胞は、天然に存在する細胞、天然に存在する突然変異細胞または遺伝子操作された細胞であってもよい。ポリペプチドの性質 (例えば、パーセント疎水性、パーセント親水性、安定性、正味の電荷、等電点など) に応じて、免疫原を改変またはコンジュゲートして、その免疫原性を変更してもよい。例えば、C X C R 3 またはそれらの部分を担体にコンジュゲートすることができる。コンジュゲートとしては、活性な化学官能基での誘導体化による化学的なコンジュゲート、もしくは融合タンパク質に基づく方法論を介した化学的なコンジュゲート、または他の当業者に公知の方法のいずれかが挙げられる。タンパク質を変更する担体および/または他の免疫原性の例としては、これらに限定されないが、K L H、オボアルブミン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、ダイズトリプシンインヒビター、およびプロミスカスTヘルパーペプチド (p r o m i s c u o u s T h e l p e r p e p t i d e) などが挙げられる。

#### 【0033】

免疫応答を高めるために、様々なアジュバントもC X C R 3 免疫原と共に使用することができる。アジュバントの例としては、これらに限定されないが、フロインドアジュバント (完全および不完全)、ミネラルオイル、ゲル、アラム (水酸化アルミニウム)、表面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシニアン (K L H)、ジニトロフェノール、およびヒトアジュバント、例えばB C G (カルメット - ゲラン桿菌 (B a c i l l e C a l m e t t e - G u e r i n)) ならびにコリネバクテリウム・パルヴム (C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m) などが挙げられる。採用される可能性があるアジュバントのさらなる例としては、M P L - T D M アジュバント (モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート) が挙げられる。免疫化プロトコールは当技術分野で周知であり、選ばれた動物宿主において免疫反応を惹起するあらゆる方法により行うことができる。したがって、設計上の選択に従って、様々な投与経路を様々な期間で使用することができる。

#### 【0034】

例えば、免疫原は、本明細書で例示されたように、これらに限定されないが、ウサギ、マウス、ラクダ科の動物、ラットなどの様々な宿主動物に投与して、C X C R 3 に特異的

10

20

30

40

50

なポリクローナル抗体を含有する血清の産生を誘導することができる。免疫原の投与は、免疫剤および場合によりアジュバントの1回またはそれ以上の注入を伴っていてもよい。いくつかの実施形態において、哺乳動物への免疫原（アジュバント有り、または無し）の注入は、複数回で皮下もしくは腹腔内に注入されるか、または筋肉内または静脈内に注入される。いくつかの実施形態において、好適なポリクローナル調製物が得られたら、個々の抗体種が得られるように、例えばアフィニティークロマトグラフィー、パニング、吸着などの公知の分離技術によって特定の抗体を単離することができる。いくつかの実施形態において、個々の抗体種は、例えば、1つまたはそれ以上のCDRのアミノ酸配列を得るために、配列決定などのさらなる研究に用いられる。

#### 【0035】

いくつかの実施形態において、CXCR3抗体は、モノクローナルである。モノクローナル抗体は、本抗体を発現する単一種の真核生物、ファージまたは原核生物クローンから誘導されたあらゆる抗体を包含する。モノクローナル抗体は、例えば、従来のハイブリドーマ技術（参照により本明細書に組み入れられるKohlerおよびMilstein、Nature 256:495~499(1975)）ならびに米国特許第4,376,110号）、組換えDNA法（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,816,567号）、または抗体ライブラリーを使用したファージディスプレイ技術（Clacksonら、Nature 352:624~628(1991)；Marksら、J. Mol. Biol. 222:581~597(1991)）により製造することができる。様々な他の抗体産生技術については、Antibodies: A Laboratory Manual、Harlowら編、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照されたい。モノクローナル抗体を産生するのに採用される可能性がある方法の他の例としては、これらに限定されないが、ヒト細胞ハイブリドーマ技術（Kosborら、Immunology Today 4:72(1983)；およびColeら、Proc Natl Acad Sci USA 80:2026(1983)）、ならびにEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、77~96頁、Alan R. Liss(1985)）などが挙げられる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、およびIgDなどのあらゆる免疫グロブリンクラス、ならびにそれらのあらゆるサブクラスまたは変異体に属するものでもよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroで培養してもよいし、またはin vivoで培養してもよい。

#### 【0036】

いくつかの実施形態において、CXCR3のポリペプチド、それらのフラグメント（例えば、1つまたはそれ以上の細胞外ドメイン、またはN末端の58アミノ酸、またはN末端の37アミノ酸、またはN末端の20アミノ酸、またはN末端の16アミノ酸など）、融合タンパク質、またはそれらの変異体を含む免疫原を使用して、宿主動物（例えばウサギ、マウス、ラクダ科の動物、ラットなど）を免疫化してモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成することができる。CXCR3に特異的に結合する抗体を産生する、または産生することができるリンパ球を免疫化された宿主から回収し、ポリエチレングリコールのような好適な融合剤（fusing agent）を使用して骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成することができる（Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、Academic Press、59~103頁(1986)）。

#### 【0037】

モノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを生成することができ、さらに、例えば、CXCR3リガンドのその受容体への結合を防止することにより有益な特性を示すか、または治療上の可能性を示唆するものを選択することができる。選択された抗体をさらに改変して、例えばin vivoで強化された安定性を有することなどの有益な特性を獲得したりまたは強化したりすることができる。例えば、望ましい特異性、親和性、

10

20

30

40

50

および/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈法を使用してクローンをサブクローニングして、標準的な培養法で増殖させてもよい (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 59~103頁 (1986))。好適な培養培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM) または RPMI-1640 培地などが挙げられる。加えて、*in vivo* で、ハイブリドーマ細胞を、動物において腫瘍として増殖させてもよい。サブクローンは、特異性、親和性、および/または活性に関してアッセイすることができ、加えてさらなる特徴付けのために最も有益な特性を示すサブクローンを選択することができる。

#### 【0038】

当技術分野にはモノクローナル抗体産生のための様々な代替方法があり、それらのうちのいずれかが、本明細書で開示された抗 CXCR3 抗体を産生するのに使用することができる。例えば、モノクローナル抗体は、その全体が参照により組み入れられる米国特許第 4,816,567 号で説明されている方法のような組換え DNA 法によって製造してもよい。

#### 【0039】

モノクローナル抗体をコードする DNA を、従来の手法を使用して (例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖、またはヒト、ヒト化もしくは他の抗体からの鎖をコードする遺伝子に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって) 単離して配列決定することができる (Innisら、*PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic (1990)、および Sangerら、*Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463 (1977))。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の源として役立つ可能性がある。単離したら、DNA を発現ベクターに入れることができ、これを、他の状況では免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌 (*E. coli*) 細胞、NSO 細胞、COS 細胞、チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髄腫細胞のような宿主細胞にトランスフェクションして、組換え宿主細胞でモノクローナル抗体の合成を達成することができる。また、例えば、相同マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによって DNA を改変することもできるし (米国特許第 4,816,567 号; および Morrisonら、*Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851 (1984))、または非免疫グロブリンポリペプチドからのコード配列の全部もしくは一部を免疫グロブリンのコード配列に共有結合で合体させることによって改変することができる。いくつかの実施形態において、非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインと置換してもよいし、または抗体の 1 つの CXCR3 結合部位の可変ドメインと置換して、キメラ 2 価抗体を作製してもよい。

#### 【0040】

いくつかの実施形態において、本明細書において説明される抗体を改変して、CDR グラフト化された、および/または別の方法でヒト化された抗体を生成することができる。CDR グラフティングは、ヒト化の一形態であるが、他の当技術分野で公知のヒト化技術を使用することもできる。CDR グラフティングの手法は当業者に公知であり、IMGT (the international Immunogenetics information system (登録商標)、Montpellier, France)、Kabati、Chothia、および改変された Chothia の番号付けスキームなどの CDR 番号付けによる指示に基づくものであってもよい。例えば、imgt.org (IMGT の連続番号付けシステムの使用をまとめており、それによれば、このシステムは、フレームワークおよび相補性決定領域の定義、X 線回折研究からの構造データ、および高度可変ループの特徴付けを考慮しこれらを組み合わせることにより、全ての種からの全ての IG および TRV - 領域に対して独自の番号付けを提供している); Abhinandan および Martin、*Mol Immunol*、45:3832~9 (2008) を参照されたい; さらに、Abhinandan および Martin、*J. Mol. Bi*

10

20

30

40

50

ol.、369(3):852~62(2007)(キメラ抗体の「ヒト化の程度」を査定する方法を説明している); Retterら、Nucleic Acids Res. 33(Database issue):D671~4(2005)(可変ドメイン遺伝子のVBASE2データベースを説明している); およびJohnsonおよびWu、Int. Immunol. 10(12):1801~5(1998)(CDRH3の長さの分布を説明している)も参照されたい。

#### 【0041】

例えば、IMGT番号付けシステムを使用する場合、保存されたアミノ酸は常に同じ位置を有する。さらにフレームワーク領域の疎水性アミノ酸も保存された位置で番号付けされるため、配列アラインメントを必要とせずとも、異なる配列で同じ位置に位置するフレームワークのアミノ酸(およびコドン)の比較が可能になる。別の例において、Kabattの番号付けシステムは、以下の通りであり、CDR-H1は、およそアミノ酸31(すなわち、第1のシステイン残基からおよそ9残基)から始まり、およそ5~7アミノ酸を包含し、次のチロシン残基で終わる。CDR-H2は、CDR-H1が終わったあとの15番目の残基から始まり、およそ16~19アミノ酸を包含し、次のアルギニンまたはリシン残基で終わる。CDR-H3は、CDR-H2が終わった後のおよそ33番目のアミノ酸残基から始まり; 3~25アミノ酸を包含し; 配列W-G-X-Gで終わり、ここでXは、任意のアミノ酸である。CDR-L1は、およそ残基24(すなわち、システイン残基の後)から始まり; およそ10~17残基を包含し; 次のチロシン残基で終わる。CDR-L2は、CDR-L1が終わったあとのおよそ16番目の残基から始まり、およそ7残基を包含する。CDR-L3は、CDR-L2が終わったあとのおよそ33番目の残基から始まり; およそ7~11残基を包含し、配列F-G-X-Gで終わり、ここでXは、任意のアミノ酸である。これらのCDRのうち少なくとも1つを含有する抗体は、本開示の方法で使用することができる。

#### 【0042】

CDR-グラフト化抗体は、ヒト抗体からの重鎖および軽鎖可変領域配列を含んでいてもよく、ここでVHおよび/またはVLの1つまたはそれ以上のCDR領域は、ドナー抗体からの、例えば、以下で説明されるCXCR3と結合するマウス抗体からのCDR配列で置き換えられている。あらゆるヒト抗体からのフレームワーク配列が、CDRグラフトイングのためのテンプレートとして役立つ可能性がある。しかしながら、このようなフレームワークへの直鎖状のCDR鎖の置き換えにより、抗原への結合親和性がいくらか失われる可能性がある。ヒト抗体の、元の抗体、例えばマウス抗体への相同が高ければ高いほど、ドナーCDRとヒトフレームワークとの組み合わせにより、親和性を低下させる可能性があるCDR中の歪みが導入される可能性はより低くなる。それゆえに、いくつかの実施形態において、本開示のCDR-グラフト化CXCR3抗体は、ドナーのマウスCXCR3中和抗体の可変領域フレームワークと少なくとも65%の配列同一性を有するヒト可変フレームワークを含む。このような抗体を産生する方法は、当技術分野で公知であり(EP239,400; PCT公報WO91/09967号; および米国特許第5,225,539号; 5,530,101号; および5,585,089号を参照)、例えば、ベニアリング(veneering)またはリサーフェシング(resurfacing)(EP592,106; EP519,596; Padlan(1991)Mol. Immunol. 28(4/5):489~498; Studnickaら(1994)Proc. Engineer. 7(6):805~814; およびRoguskaら(1994)Proc. Acad. Sci. USA 91:969~973)、チェーンシャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,352号)、および抗イディオタイプ抗体が挙げられる。

#### 【0043】

いくつかの実施形態において、本明細書において説明される抗体は、ヒト化されてもよい。「ヒト化抗体」は、望ましい抗原と結合し、非ヒト種からの1つまたはそれ以上のCDRを有し、かつヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域および/または定常

10

20

30

40

50

ドメインを有する抗体分子である。公知のヒトIg配列は、例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; および Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、U.S. Dept. Health (1983)に開示されている。移入したヒト配列を使用して、免疫原性を低減したり、または結合、親和性、結合速度(on-rate)、解離速度(off-rate)、結合活性、特異性、半減期、もしくは当技術分野で公知の他のあらゆる好適な特徴を低減、強化もしくは変更したりできる。抗体は、これらに限定されないが、参照によりその全体を本明細書に組み入れられる Jonesら(1986) Nature 321:522; Verhoeyenら(1988) Science 239:1534; Simsら(1993) J. Immunol. 151:2296; Chothiaおよび Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901; Carterら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Prestaら(1993) J. Immunol. 151:2623; 米国特許第5,589,205号; 565,332号; 6,180,370号; 6,632,927号; 7,241; 877号; 7,244,615号; 7,244,832号; 7,262,0505号; および米国特許出願公開第2004/0236078号(2004年4月30日付けで出願)で説明されている技術のような、当技術分野で公知の様々な技術を使用してヒト化されてもよい。

#### 【0044】

ある特定の実施形態において、ヒト化またはCDR-グラフト化抗体におけるフレームワークの残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換されていてもよく、例えば、抗原との結合を変更する、例えば改善するために、抗マウスCXCR3中和抗体からのフレームワークの残基で置換されていてもよい。Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029~33(1989年12月)を参照されたい。これらのフレームワークの置換は、当技術分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原との結合に重要なフレームワークの残基を同定するためのCDRとフレームワークの残基との相互作用のモデリング、および特定の位置における異常なフレームワークの残基を同定するための配列比較によって同定される。例えば、参照によりその全体を本明細書に組み入れられる米国特許第5,585,089号; および Riechmannら(1988) Nature 332:323を参照されたい。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補の免疫グロブリン配列の可能性のある三次元立体配座構造を例示し、表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示を精査することにより、候補の免疫グロブリン配列の機能化において可能性のある残基の役割の分析、すなわち、候補の免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析が可能になる。この方式で、高いCXCR3への親和性のような望ましい抗体の特徴が達成されるように、コンセンサスおよび移入配列からフレームワークの残基を選択して連結させることができる。

#### 【0045】

これらに限定されないが、Jonesら(1986) Nature 321:522; Verhoeyenら(1988) Science 239:1534; Simsら(1993) J. Immunol. 151:2296; Chothiaおよび Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901; Carterら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Prestaら(1993) J. Immunol. 151:2623; および米国特許第5,565,332号; 5,723,323号; 5,976,862号; 5,824,514号; 5,817,483号; 5,814,476号; 5,763,192号; 5,723,323号; 5,766,886号; 5,714,352号; 6,204,023号; 6,180,370号; 5,

693, 762号; 5, 530, 101号; 5, 585, 089号; 5, 225, 539号; および4, 816, 567号で説明されている技術のような当技術分野で公知の様々な技術を使用して、抗体をヒト化またはCDR-グラフト化してもよいし、さらに抗原との結合を改善するのに有用なCDR-ドナーからのフレームワークの残基を同定してもよい。いくつかの実施形態において、4Dヒト化を使用して、本開示の抗体変異体を製造することができる(例えば、重鎖4.4~4.6のいずれか1つおよび軽鎖4.4~4.7のいずれか1つを含むクローン4の4Dヒト化変異体を製造する)。WO2009/032661(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)の例えば4Dヒト化で使用される方法に関する段落[0037]~[0044]を参照されたい。簡単に言えば、4Dヒト化は: a) ヒト化しようとする可変ドメインの3-Dモデルを構築すること; b) 可変ドメインの3-Dモデルの分子動力学シミュレーションを使用して、そのドメイン中のフレキシブルな残基を同定すること; c) 3-Dモデルの分子動力学の軌道を、49種のヒト生殖細胞系の分子動力学軌道と比較することにより、最も近いヒト生殖細胞系を同定すること; およびd) CDRの一部ではないフレキシブルな残基を、(工程cで同定されたような)それらのヒト生殖細胞系の対応物に突然変異させること、を含んでいてもよい。

#### 【0046】

いくつかの実施形態において、CDRグラフト化された、および/または別の方法でヒト化された抗体は、クローン4、12、53、82、および135のCDRグラフト化および/またはヒト化変異体を含んでいてもよい。例えば、クローン4、12、53、82、および135のいずれか1つからの対応する重鎖および軽鎖領域(例えば、クローン4の重鎖およびクローン4の軽鎖)をヒト定常ドメインに合体させて、キメラ抗体を形成することができる。キメラ抗体はさらに、1つまたはそれ以上のフレームワークまたはCDRのアミノ酸をそれに対応するヒト残基に変化させることにより、ヒト化することができる。同様に、いくつかの実施形態において、クローン4、12、53、82、および135のいずれか1つからの6つの重鎖および軽鎖CDR領域(例えば、クローン4の重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにクローン4の軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3)、またはクローン4、12、53、82、および135の変異体のいずれかからの6つの重鎖および軽鎖CDR領域をヒトフレームワークおよび/または定常ドメインにサブクローニングして、ヒト化抗体を形成することができる。ヒト化は、ヒト可変ドメインを使用して、CDRのアミノ酸および/またはあらゆるバーニヤ位置(Vernier position)の残基を排除することを包含し得る。ヒト化抗体はさらに、CDRの4つのアミノ酸内に位置する残基に、および/または例えばIMGTベースのモデリングを使用して、元の抗体配列とヒト配列との間で「まったく異なっている」と同定された位置に、さらなる復帰突然変異による変化を包含し得る。フレームワークまたはCDR領域中にさらなる突然変異を導入することにより、例えば、クローン4のVHのCDR2の58位および59位(IMGTによる番号付け)における脱アミド部位が除去されるように突然変異を導入することにより、抗体の安定性または治療有効性を強化することができる。

#### 【0047】

例えば、本明細書で開示された抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体は、クローン4、12、53、82、および135ならびにそれらのキメラまたはヒト化変異体のいずれかからの、6つのCDRおよび/または重鎖および軽鎖可変ドメインを含んでいてもよい。例えば、CXCR3と結合することができる抗体またはフラグメントは、重鎖4.0~4.11、重鎖12.0~12.3、重鎖53.0~53.10、重鎖82.0~82.3、および重鎖135.0~135.3のいずれか1つからの3つのCDRを含んでいてもよい。同様に、本抗体またはフラグメントは、軽鎖4.0~4.7、軽鎖12.0~12.3、軽鎖53.0~53.13、軽鎖82.0~82.3、および軽鎖135.0~135.3のいずれか1つからの3つのCDRを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖CDRは、同じクローンからのものであるが、そのクローンの異

なる変異体からのもの（例えば、軽鎖 4 . 2 からの 3 つの C D R と対になっている重鎖 4 . 1 からの 3 つの C D R ）であってもよい。重鎖および軽鎖 4 . 0 、 1 2 . 0 、 8 2 . 0 、 および 1 3 5 . 0 は、マウス抗体クローンおよびキメラ抗体中の可変ドメインを指す（この場合、この抗体は、マウス可変ドメインとヒトフレームワーク領域とを含む）。残りの重鎖および軽鎖は、表 1 1 で示されるようなヒト化された鎖を指す。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態において、C X C R 3 と結合することができる抗体またはフラグメントは、重鎖 4 . 0 ~ 4 . 1 1 、重鎖 1 2 . 0 ~ 1 2 . 3 、重鎖 5 3 . 0 ~ 5 3 . 1 0 、重鎖 8 2 . 0 ~ 8 2 . 3 、および重鎖 1 3 5 . 0 ~ 1 3 5 . 3 のいずれか 1 つを含んでいてもよい。同様に、本抗体またはフラグメントは、軽鎖 4 . 0 ~ 4 . 7 、軽鎖 1 2 . 0 ~ 1 2 . 3 、軽鎖 5 3 . 0 ~ 5 3 . 1 3 、軽鎖 8 2 . 0 ~ 8 2 . 3 、および軽鎖 1 3 5 . 0 ~ 1 3 5 . 3 のいずれか 1 つを含んでいてもよい。

10

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖は、特定のクローンの重鎖からの 3 つの C D R （例えば、クローン 4 の重鎖からの C D R ）が、そのクローンの軽鎖のいずれかからの 3 つの C D R （例えば、クローン 4 の軽鎖からの C D R ）と対になるように選択される。いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖は、特定のクローンからの重鎖（例えば、クローン 4 の重鎖）が、そのクローンの軽鎖のいずれか（例えば、クローン 4 の軽鎖）と対になるように選択される。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態において、重鎖可変ドメイン 4 . 0 ~ 4 . 1 1 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R は、軽鎖可変ドメイン 4 . 0 ~ 4 . 7 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R と対になっていてもよく；重鎖可変ドメイン 1 2 . 0 ~ 1 2 . 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R は、軽鎖可変ドメイン 1 2 . 0 ~ 1 2 . 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R と対になっていてもよく；重鎖可変ドメイン 5 3 . 0 ~ 5 3 . 1 0 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R は、軽鎖可変ドメイン 5 3 . 0 ~ 5 3 . 1 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R と対になっていてもよく；重鎖可変ドメイン 8 2 . 0 ~ 8 2 . 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R は、軽鎖可変ドメイン 8 2 . 0 ~ 8 2 . 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R と対になっていてもよく；または重鎖可変ドメイン 1 3 5 . 0 ~ 1 3 5 . 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R は、軽鎖可変ドメイン 1 3 5 . 0 ~ 1 3 5 . 3 のいずれか 1 つからの 3 つの C D R と対になっていてもよい。

20

30

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態において、重鎖可変ドメイン 4 . 0 ~ 4 . 1 1 のいずれか 1 つは、軽鎖可変ドメイン 4 . 0 ~ 4 . 7 のいずれか 1 つと対になっていてもよく、重鎖可変ドメイン 1 2 . 0 ~ 1 2 . 3 のいずれか 1 つは、軽鎖可変ドメイン 1 2 . 0 ~ 1 2 . 3 のいずれか 1 つと対になっていてもよく、重鎖可変ドメイン 5 3 . 0 ~ 5 3 . 1 0 のいずれか 1 つは、軽鎖可変ドメイン 5 3 . 0 ~ 5 3 . 1 3 のいずれか 1 つと対になっていてもよく、重鎖可変ドメイン 8 2 . 0 ~ 8 2 . 3 のいずれか 1 つは、軽鎖可変ドメイン 8 2 . 0 ~ 8 2 . 3 のいずれか 1 つと対になっていてもよく、または重鎖可変ドメイン 1 3 5 . 0 ~ 1 3 5 . 3 のいずれか 1 つは、軽鎖可変ドメイン 1 3 5 . 0 ~ 1 3 5 . 3 のいずれか 1 つと対になっていてもよい。

40

【 0 0 5 2 】

図 1 7 にある特定の重鎖および軽鎖可変ドメインのアラインメントを示す。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されたような抗体は、表 2 で示されるような対になった重鎖および軽鎖可変ドメインを含んでいてもよい（C h = キメラ、H u = ヒト化、V H = 重鎖、V K = 軽鎖）。例えば、表 2 における第 1 の項目は、重鎖 4 . 0 および軽鎖 4 . 0 を含むクローン 4 変異体を表示する。第 2 の項目は、重鎖 4 . 1 および軽鎖 4 . 1 を含むクローン 4 変異体を表示する。各抗体は、表示された重鎖および軽鎖配列を含み、さらに表 2 の第 2 列に抗体の識別名も割り当てられた。例えば、表中の第 1 の項目（重鎖 4 . 0 および軽鎖 4 . 0 を含む）にはその抗体の識別名である 4 C h が割り当てられ、表中の

50

第2の抗体（重鎖4.1および軽鎖4.1を含む）には識別名4Hu1が割り当てられた。

【0053】

【表2】

クローン	抗体	重鎖	VH 配列番号	軽鎖	VK 配列番号
クローン 4	4Ch	VH	18	VK	19
クローン 4	4Hu1	VH1	20	VK1	21
クローン 4	4Hu2	VH2	22	VK2	23
クローン 4	4Hu3	VH3	24	VK3	25
クローン 4	4Hu4	VH2	22	VK3	25
クローン 4	4Hu5	VH3	24	VK2	23
クローン 4	4Hu6	VH4	26	VK4	34
クローン 4	4Hu7	VH4	26	VK7	37
クローン 4	4Hu8	VH5	27	VK5	35
クローン 4	4Hu9	VH5	27	VK6	36
クローン 4	4Hu10	VH6	28	VK4	34
クローン 4	4Hu11	VH2	22	VK1	21
クローン 4	4Hu12	VH1	20	VK2	23
クローン 4	4Hu13	VH3	24	VK1	21
クローン 4	4Hu14	VH1	20	VK3	25
クローン 4	4Hu15	VH7	29	VK2	23
クローン 4	4Hu16	VH8	30	VK2	23
クローン 4	4Hu17	VH9	31	VK2	23
クローン 4	4Hu18	VH10	32	VK2	23
クローン 4	4Hu19	VH11	33	VK2	23
クローン 12	12Ch	VH	2	VK	3
クローン 12	12Hu1	VH1	4	VK1	5
クローン 12	12Hu2	VH2	6	VK2	7
クローン 12	12Hu3	VH3	8	VK3	9
クローン 82	82Ch	VH	55	VK	56
クローン 82	82Hu1	VH1	57	VK1	58
クローン 82	82Hu2	VH2	59	VK2	60
クローン 82	82Hu3	VH3	61	VK3	62
クローン 135	135Ch	VH	10	VK	11
クローン 135	135Hu1	VH1	12	VK1	13
クローン 135	135Hu2	VH2	14	VK2	15
クローン 135	135Hu3	VH3	16	VK3	17
クローン 53	53Ch	VH	38	VK	39

【0054】

【表 3】

クローン 53	53Hu1	VH1	40	VK1	41
クローン 53	53Hu2	VH2	42	VK2	43
クローン 53	53Hu3	VH3	44	VK3	45
クローン 53	53Hu4	VH1	40	VK2	43
クローン 53	53Hu5	VH2	42	VK1	41
クローン 53	53Hu6	VH2	42	VK4	49
クローン 53	53Hu7	VH2	42	VK5	50
クローン 53	53Hu8	VH2	42	VK6	51
クローン 53	53Hu9	VH2	42	VK7	52
クローン 53	53Hu10	VH2	42	VK8	53
クローン 53	53Hu11	VH2	42	VK9	54
クローン 53	53Hu12	VH4	46	VK2	43
クローン 53	53Hu13	VH5	47	VK2	43
クローン 53	53Hu14	VH6	48	VK2	43
クローン 53	53Hu15	VH1	40	VK4	49
クローン 53	53Hu16	VH1	40	VK6	51
クローン 53	53Hu17	VH6	48	VK4	49
クローン 53	53Hu18	VH6	48	VK6	51
クローン 53	53Hu19	VH7	63	VK10	67
クローン 53	53Hu20	VH7	63	VK11	68

表 2

## 【 0 0 5 5 】

用語「特異的な相互作用」、または「特異的に結合する」などは、2つの分子が、生理学的な状態で比較的安定な複合体を形成することを意味する。特異的な結合は、高い親和性と、低から中程度の結合能とを特徴とする。非特異的な結合は通常、中程度から高い結合能で低い親和性を有する。典型的には、結合は、親和定数  $K_a$  が、 $10^6 M^{-1}$  よりも高い、または好ましくは  $10^8 M^{-1}$  よりも高い場合に特異的であるとみなされる。いくつかの実施形態において、抗体、変異体、およびそれらのフラグメントは、少なくとも  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、またはそれより高い結合定数でそれらの抗原（複数可）と結合する。いくつかの実施形態において、本抗体、変異体、およびそれらのフラグメントは、少なくとも表 7 A ~ B、8 ~ 10、および / または 12 のいずれか 1 つで示された結合動態で CXCR3 と結合する。必要に応じて、実質的に特異的な結合に影響を及ぼさずに、結合条件を変更することにより非特異的な結合を低減してもよい。このような条件は当技術分野で公知であり、当業者であれば、慣例的な技術を使用して、適切な条件を選択することができる。条件は、通常、抗体濃度、溶液のイオン強度、温度、結合させる時間、血清アルブミンおよびミルクカゼインのようなブロック分子の濃度に関して規定される。

## 【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態において、CXCR3 を中和することができる抗 CXCR3 抗体が、本明細書において開示される。「CXCR3 中和抗体」は、CXCR3 に結合して、C

X C R 3 リガンドの C X C R 3 への結合の結果生じる典型的な生理学および遺伝学的な応答のような受容体の活性をブロックする。活性の中和は、完全な中和（100%の中和）であってもよいし、または部分的な、例えば、およそ10、20、30、40、50、60、70、80、90、95%またはそれより多く（またはこれらの間のあらゆるパーセンテージ）の中和であってもよく、抗体濃度、親和性、およびエピトープ、加えて活性の中和を評価するのに使用される特定のアッセイのような当業者に公知の様々な要素に依存すると予想される。C X C R 3 中和抗体の活性の中和は、例えば、リガンド結合、G T P 結合、カルシウム動員、細胞走化性、および/または受容体の内在化の阻害を測定するアッセイにより示すことができる。中和抗体、特にC X C R 3 中和抗体の活性を決定する多数のアッセイが当業者に公知であり、特定の抗体が中和していることを確認できるように容易に適合が可能である。 10

#### 【0057】

例えば、いくつかの実施形態において、本発明の方法で使用するための抗体の活性の中和は、実質的にクローン49801によって産生され、R & D Systems（登録商標）によって販売されている抗体（カタログ番号M A B 160）の添付文書に記載されているように、走化性アッセイによって査定することができる。中和量 - 50（N D<sub>50</sub>）は、特定のr h l - T A C濃度での、反応性細胞株において細胞表面C X C R 3が介在するr h l - T A C応答の最大阻害の2分の1を達成するのに必要な抗体濃度と定義される。r h l - T A Cにより誘導された、h C X C R 3でトランスフェクションされたB a F / 3細胞の走化性をブロックする抗体の能力を測定するために、96 - ウェルの走化性チャンパー（NeuroProbe、Cabin John、MD）の下の区画にr h l - T A Cを7 ng / mLで添加する。次いでP V P非含有ポリカーボネートフィルター（孔径5 μ）を使用して走化性チャンパーを組み立てる。チャンパーの上のウェルに、抗体の連続希釈液（例えば、0.001 ~ 10000 μg / mL）を0.25 × 10<sup>6</sup>細胞 / ウェルで添加する。5% C O<sub>2</sub>の加湿したインキュベーター中で37 °Cで3時間インキュベートした後、チャンパーを解体し、下のチャンパーまで移動した細胞を作業用プレートに移し、例えば、リザズリン蛍光を使用して定量する。 20

#### 【0058】

Colvinら、Mol. Cell. Bio., 26: 5838 ~ 49 (2006)は、ある特定の実施形態において、本発明で使用するための中和C X C R 3抗体の中和活性を決定するために使用することができる追加のアッセイを説明している。簡単に言えば、機能的にC X C R 4を発現するマウスB細胞前白血病細胞株である300 - 19細胞を使用することができる。トランスフェクション後、この株は、他のケモカイン受容体、例えば、ヒトC X C R 3を機能的発現することが可能になる（例えば、参照により組み入れられる米国特許出願公開第2010 / 0061983号の段落201 ~ 209を参照）。ヒトC X C R 3を発現する300 - 19細胞を、10%ウシ胎児血清（F B S）を含有する完全R P M I培地で増殖させてもよい。候補の中和C X C R 3抗体の存在下におけるC X C R 3リガンドのC X C R 3への結合を評価するために、96 - ウェルの組織培養プレートに、総体積150 μLの結合緩衝液（0.5% B S A、5 mMのM g C l 2、1 mMのC a C l 2、50 mMのH E P E S、p H 7.4）中で、400,000個のC X C R 3 / 300 - 19細胞を入れる。この細胞に合計0.04 nMの<sup>125</sup>I - 標識C X C L 10（New England Nuclear、Boston、MA）またはC X C L 11（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）、および5 × 10<sup>6</sup> nM ~ 500 nMの非標識C X C L 10またはC X C L 11（Peprotech、Rocky Hill、NJ）を添加して、振盪しながら室温で90分インキュベートしてもよい。0.3%ポリエチレンイミンに予め浸して0.5 MのN a C lが補充された結合緩衝液200 μlで3回洗浄した96 - ウェルのフィルタープレート（Millipore、Billerica、MA）の上に細胞を移す。プレートを乾燥させ、Wallac Microbetaシンチレーションカウンター（Perkin-Elmer Life Sciences、Boston、MA）で、シンチレーション液を添加 40 50

した後に放射活性を測定する。CXCL9の結合は、CXCL10および11と同じように評価することができる。

【0059】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示された抗体は、CXCR3を発現する細胞へのカルシウム流出を防止または低減することができる。いくつかの実施形態において、カルシウム流出は、CXCR3/300-19細胞のような細胞で検出することができる。およそ $5 \times 10^6$ 個の細胞を1%BSAを含むRPMI培地2mlに懸濁する。Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR) 15マイクログラムを添加し、細胞を37℃で20分インキュベートする。細胞をPBSで2回洗浄し、カルシウム流出緩衝液(145mMのNaCl、4mMのKCl、1mMのNaHPO<sub>4</sub>、1.8mMのCaCl<sub>2</sub>、25mMのHEPES、0.8mMのMgCl<sub>2</sub>、および22mMのグルコース)2mlに再懸濁する。蛍光の測定値は、37℃でDeltaRAM蛍光分光計(Photon Technology International, Lawrenceville, NJ)で測定される。ケモカイン(例えば、CXCL9、10、または11)の添加の前および後に、細胞内カルシウム濃度を、340nmおよび380nmでの連続的な励起にตอบสนองして510nmで放出された励起蛍光強度として記録し、380nmにおける蛍光に対する340nmにおける蛍光の相対比率として示す。

【0060】

ある特定の実施形態において、CXCR3の中和は、受容体の内在化の低減を測定することによって評価することができる。いくつかの実施形態において、受容体の内在化のアッセイは、1%BSAを含むRPMI培地中で、約 $2.5 \times 10^5$ 個の、CXCR3/300-19細胞のような細胞を、様々な濃度のCXCL10、CXCL11、またはCXCL9と共に37℃で30分インキュベートすることによって行ってもよい。次いで細胞を氷冷した蛍光活性化セルソーター用緩衝液で洗浄し、その後、PEコンジュゲートCXCR3抗体を使用して表面におけるCXCR3の発現について分析してもよい。

【0061】

活性の中和を査定するための追加のアッセイは、例えば、参照により組み入れられる米国特許第7,405,275号の実施例2~4に開示されている。

【0062】

上記のアッセイのいずれかで査定されたように、ある特定の実施形態において、CXCR3抗体の中和は、およそ0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、40、50、または100μg/mLのND<sub>50</sub>を有する可能性がある。特定の実施形態において、ND<sub>50</sub>は、0.5~12μg/mL、より特定の実施形態において、1~6μg/mLであってもよい。

【0063】

本明細書で開示された単離されたCXCR3抗体は、CXCR3の特異的なエピトープと結合するものを包含し得る。例えば、本発明で使用するための抗体は、配列番号1の残基1~58、1~16、または1~37から選択される配列の全部または一部(例えば、少なくとも5、6、8、10、12、14、15、16、18、または20残基のフラグメント)を含むペプチドと結合してもよい。いくつかの実施形態において、本明細書で開示された抗体は、図18で同定されたエピトープのうち1つまたはそれ以上と結合するものを包含する。いくつかの実施形態において、抗CXCR3抗体は、SDHQVLNDAE(配列番号71)を含むCXCR3エピトープに結合する抗体を含んでもよい。いくつかの実施形態において、エピトープは、SDHQVLND(配列番号72)、DHQVLND(配列番号73)、および/またはVLNDAE(配列番号74)を含む。ある特定の実施形態において、エピトープは、配列VLND(配列番号75)を含む。いくつかの実施形態において、エピトープは、XDXXVXNDXX(配列番号76)を含み、ここでXは、任意のアミノ酸を示す。いくつかの実施形態において、エピトープは、XDXXVXND(配列番号77)、DXXVXND(配列番号78)、および/またはVXNDXX(配列番号79)を含み、ここでXは、任意のアミノ酸を示す。ある特定の実施

形態において、エピトープは、配列 V X N D (配列番号 80) を含み、ここで X は、任意のアミノ酸を示す。

#### 【0064】

抗 C X C R 3 抗体は、異なる種からの C X C R 3 配列に汎特異的であってもよいし、または C X C R 3 の特定の種または特定のアイソタイプからの C X C R 3 配列に対して選択的であってもよい。特定の実施形態において、C X C R 3 抗体は、それが投与される対象の種に特異的である。したがって、いくつかの実施形態において、C X C R 3 抗体は、ヒト C X C R 3 配列に特異的であってもよい(例えば、上記で列挙した配列番号 1 の部分配列のいずれかに相同な配列を含むペプチドと結合することができる)。相同配列は、当技術分野における通常の技術を有するものであれば、タンパク質配列アラインメントのような手段(例えば、BLASTp、ClustalW など)により容易に同定されると予想される。特定の実施形態において、本発明で使用するための抗体は、配列の全長または少なくとも 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、もしくは 70 残基(またはその間のあらゆる値)の枠にわたり、配列番号 1 と少なくとも 90、95、もしくは 99% (またはその間のあらゆるパーセンテージ)類似しているかまたは同一な配列を含むペプチドに結合する。いくつかの実施形態において、本抗体は、上述したエピトープのうち 1 つに、少なくとも 80、85、90、95、または 99% (またはその間のあらゆるパーセンテージ)類似しているかまたは同一なエピトープに結合することができる(図 18 も参照)。

#### 【0065】

本明細書で開示された特定の抗体としては、例えば、抗体クローン(C1)12、C1135、C182、C153、ならびに C14、加えてそれらのキメラおよびヒト化変異体などが挙げられる。

#### 【0066】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示された抗体は、抗体 5H7 および 7H5 (例えば、米国特許第 7,405,275 号で開示されたものであり; これらの抗体の CDR は、表 1 および 2 ならびに参照配列リストに開示されており、これらは参照により組み入れられる); V44D7 (国際公開 WO 2008/094942 で説明されているもの)、1C6 (米国特許第 7,407,655 号で説明されており; エピトープマッピングは、実施例 8 および 9 で説明されており、これらは参照により組み入れられる)、および R & D Systems によりカタログ番号 MAB160 として販売されている 49801 などの当技術分野で公知の抗体に勝るある特定の改良された特性を示す。

#### 【0067】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示された抗体クローン(クローン 4、12、53、82、および 135 ならびにそれらのキメラおよびヒト化された対応物)は、公知の抗体 5H7、7H5、V44D7、1C6、および 49801 に勝るある特定の驚くべき利点を示す。例えば、本明細書で開示されたクローンは、抗 h C X C R 3 クローン 5H7、7H5、V44D7、1C6、および 49801 と比較して高い結合親和性を示す。また本明細書で開示されたヒト化クローンも、マウス抗 h C X C R 3 クローン 5H7、7H5、V44D7、1C6、および 49801 と比較して減少した免疫原性を有する可能性がある。加えて、本明細書で開示された抗体、例えば重鎖クローン 4.7~4.11 を含む抗体は、脱アミド部位を除去して安定性を強化するための 58 位および 59 位(IMG T による番号付けを使用して)における改変によって最適化されている。いくつかの実施形態において、本明細書で開示された抗体は、C X C R 3 中和活性を保持する。

#### 【0068】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示された抗体またはフラグメントは、抗体 C112、C1135、C182、C153、および C14 のいずれか 1 つにおける、またはこれらのクローンのキメラまたはヒト化変異体における V H および / または V L の CDR 配列と約 80% ~ 約 100% (例えば、約 80%、85%、90%、95%、96%

、97%、98%、99%、または100%)同一な(例えば、C112中の6つのCDR、またはC112.1中の6つのCDRなどと80~100%同一な)VHおよび/またはVLのCDR配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、本抗体またはフラグメントは、抗体C112、C1135、C182、C153、およびC14のいずれか1つにおけるVHおよび/またはVLのCDR配列と比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸置換(付加、欠失、および保存的置換のような置換を包含する)を含有するVHおよびVLのCDR配列を含んでいてもよい。

#### 【0069】

用語「パーセント(%)配列同一性」または「相同性」は、本明細書で使用される場合、配列をアラインして、必要に応じて、最大パーセントの配列同一性を達成するためにギャップを導入し、保存的な核酸置換を排除した後の、参照配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一な候補配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージと定義される。比較するのに最適な配列のアラインメントは、手作業の他にも、当技術分野で公知の局所的な相同性アルゴリズムによって、またはこれらのアルゴリズム(例えば、BLASTP)を使用するコンピュータープログラムによって作製することができる。

#### 【0070】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されたような単離されたCXCR3抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖4.0~4.11、重鎖12.0~12.3、重鎖53.0~53.10、重鎖82.0~82.3、および重鎖135.0~135.3のいずれか1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%(またはその間のあらゆるパーセンテージ)の同一性を含むVHのアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、本抗体またはフラグメントは、重鎖4.0~4.11、重鎖12.0~12.3、重鎖53.0~53.10、重鎖82.0~82.3、および重鎖135.0~135.3のいずれか1つのアミノ酸配列に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の突然変異(付加、欠失、および保存的置換のような置換を包含する)を有するVHのアミノ酸配列を含む。「保存的置換」は、本明細書で使用される場合、抗体またはフラグメントの化学的、物理的および/または機能特性を実質的に変更しない、第1のアミノ酸の第2のアミノ酸での置き換えを指す(例えば、本抗体またはフラグメントは、同じ電荷、構造、極性、疎水性/親水性を保持し、および/またはCXCR3を認識する、CXCR3に結合する、および/またはCXCR3活性を中和する能力のような機能を保存する)。

#### 【0071】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示されたような単離されたCXCR3抗体または抗原結合フラグメントは、軽鎖4.0~4.7、軽鎖12.0~12.3、軽鎖53.0~53.13、軽鎖82.0~82.3、および軽鎖135.0~135.3のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%(またはその間のあらゆるパーセンテージ)の同一性を含むVLのアミノ酸配列を含む。様々な実施形態において、本抗体またはフラグメントは、軽鎖4.0~4.7、軽鎖12.0~12.3、軽鎖53.0~53.13、軽鎖82.0~82.3、および軽鎖135.0~135.3のいずれか1つのアミノ酸配列に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の突然変異(付加、欠失、および保存的置換のような置換を包含する)を有するVLのアミノ酸配列を含む。

#### 【0072】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示されたような単離されたCXCR3抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖4.0~4.11、重鎖12.0~12.3、重鎖53.0~53.10、重鎖82.0~82.3、および重鎖135.0~135.3のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を含む重鎖可変ドメインを含み、さらに軽鎖4.0~4.7、軽鎖12.0~12.3、軽鎖53.0~53.13、軽鎖82.0~82.3、および軽鎖135.0~135.3のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの

実施形態において、重鎖および軽鎖は、特定のクローンからの重鎖（例えば、クローン 4 の重鎖）が、そのクローンの軽鎖（例えば、クローン 4 の軽鎖）のいずれかと対になるように選択される。いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖は、表 2 で示されるように対になっている。さらなる実施形態において、開示された V H および / または V L 配列を含む抗体またはフラグメントは、C X C R 3 活性を中和する能力を保持する。

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示される抗体は、C 1 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および / または 4 のヒト化変異体である。他の実施形態において、本抗体は、完全ヒトである。ある特定の実施形態において、本抗体は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 から選択される抗体のヒト化または完全ヒト誘導体である。いくつかの実施形態において、本抗体は、少なくとも  $10^8 M^{-1}$ （例えば、少なくとも  $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも  $10^{10} M^{-1}$  もしくは少なくとも  $10^{11} M^{-1}$ 、またはその間のあらゆる値）の親和定数を有する。いくつかの実施形態において、本抗体は、全ての C X C R 3 アイソフォームに結合することができる。ある特定の実施形態において、本抗体は、C X C R 3 の A および B アイソフォームの両方に結合することができる。いくつかの実施形態において、本抗体は、C X C R 3 の B - アイソフォームに結合しない。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態において、単離された C X C R 3 抗体または抗原結合フラグメントは、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体からの V H および V L の C D R 配列と約 9 0 % ~ 約 1 0 0 %（例えば、約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %）同一なアミノ酸配列を含む、V H の C D R 1、V H の C D R 2、V H の C D R 3、V L の C D R 1、V L の C D R 2、および / または V L の C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、単離された C X C R 3 抗体または抗原結合フラグメントは、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体からの V H および V L の C D R 配列と同一なアミノ酸配列、または該 C D R 配列と比べて、1、2、3、4、または 5 のアミノ酸残基の突然変異（付加、欠失、および保存的置換のような置換を包含する）を含むアミノ酸配列を含む、V H の C D R 1、V H の C D R 2、V H の C D R 3、V L の C D R 1、V L の C D R 2、および / または V L の C D R 3 を含む。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態において、抗 C X C R 3 抗体またはフラグメントは、3 つの C D R（重鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3）を有する重鎖と、3 つの C D R（軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3）を有する軽鎖とを含む。いくつかの実施形態において、V H の C D R 1 は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の V H の C D R 1 配列と比べて、1、2、または 3 のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、V H の C D R 2 は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の V H の C D R 2 配列と比べて、1、2、または 3 のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、V H の C D R 3 は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の V H の C D R 3 配列と比べて、1、2、または 3 のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、V L の C D R 1 は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の V L の C D R 1 配列と比べて、1、2、または 3 のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、V L の C D R 2 は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の V L の C D R 2 配列と比べて、1 または 2 のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、V L の C D R 3 は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の V L の C

D R 3 配列と比べて、1、2、または3のアミノ酸突然変異を有する。ある特定の実施形態において、重鎖および軽鎖CDR1、CD2、およびCDR3は、クローン12、135、82、53、および4のいずれか1つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体からのCDRであるか、または上記抗体クローンのいずれか1つまたはそれらのキメラ/ヒト化変異体から選択されたものに存在するCDRと比べて、1~3のアミノ酸突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異は、図17A~Hのアラインメントにおいて示された強調表示された位置に存在する。いくつかの実施形態において、突然変異は、クローン4.0~4.11のいずれか1つからのVHのCDR2中の58位および59位のうち一方またはそれ以上に存在する。

#### 【0076】

いくつかの実施形態において、抗CXCR3抗体またはフラグメントは、重鎖および軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、重鎖は、重鎖4.0~4.11、重鎖12.0~12.3、重鎖53.0~53.10、重鎖82.0~82.3、および重鎖135.0~135.3のいずれか1つと比べて、少なくとも約90%同一であり(例えば、少なくとも約90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%同一であるか、またはその間のあらゆるパーセンテージで同一であり)、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、軽鎖は、軽鎖4.0~4.7、軽鎖12.0~12.3、軽鎖53.0~53.13、軽鎖82.0~82.3、および軽鎖135.0~135.3のいずれか1つと比べて、少なくとも約90%同一であり(例えば、少なくとも約90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%同一であるか、またはその間のあらゆるパーセンテージで同一であり)、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、重鎖は、重鎖4.0~4.11、重鎖12.0~12.3、重鎖53.0~53.10、重鎖82.0~82.3、および重鎖135.0~135.3のいずれか1つと比べて、少なくとも約90%同一であり(例えば、少なくとも約90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%同一であるか、またはその間のあらゆるパーセンテージで同一であり)、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10のアミノ酸突然変異を有し、ならびに/または軽鎖は、軽鎖4.0~4.7、軽鎖12.0~12.3、軽鎖53.0~53.13、軽鎖82.0~82.3、および軽鎖135.0~135.3のいずれか1つと比べて、少なくとも約90%同一であり(例えば、少なくとも約90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%同一であるか、またはその間のあらゆるパーセンテージで同一であり)、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10のアミノ酸突然変異を有する。いくつかの実施形態において、突然変異は、図17A~Hのアラインメントにおいて示される位置に存在する。

#### 【0077】

ある特定の実施形態において、上記で開示されたVHおよび/またはVLのCDR配列を含む単離されたCXCR3抗体または抗原結合フラグメントは、CXCR3中和活性を保持する。

#### 【0078】

様々な実施形態において、CXCR3抗体またはフラグメントの重鎖および軽鎖可変ドメインは、少なくとも1つのフレームワーク領域(例えば、FR1、FR2、FR3、およびFR4のうち少なくとも1つ)を含んでいてもよい。重鎖のフレームワーク領域はVH FRと表示され、軽鎖のフレームワーク領域はここではVL FRと表示される。ある特定の実施形態において、フレームワーク領域は、置換、挿入、またはその他の変更を含有していてもよい。ある特定の実施形態において、これらの変更により、本抗体の結合親和性における改善または最適化が起こる。改変が可能なフレームワーク領域の残基の非限定的な例としては、非共有結合によって直接的にCXCR3と結合する、CDRと相互作用するかまたはCDRのコンフォメーションに作用する、および/またはVL-VHの境界に關与する残基が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 9 】

ある特定の実施形態において、C X C R 3 抗体またはフラグメントの重鎖 ( V H ) は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V H フレームワーク領域に、約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % ( 例えば、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 %、またはその間のあらゆるパーセンテージ ) 同一であるアミノ酸配列を有する F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 を含んでいてもよい。ある特定の実施形態において、C X C R 3 抗体またはフラグメントは、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V H F R 領域と同一な、または該領域と比べて 1、2、3、4、または 5 のアミノ酸突然変異 ( 付加、欠失、および保存的置換のような置換を包含する ) を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも 1 つの V H F R ( F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 ) を含んでいてもよい。

## 【 0 0 8 0 】

ある特定の実施形態において、C X C R 3 抗体またはフラグメントの軽鎖 ( V L ) は、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V L フレームワーク領域と約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % ( 例えば、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 %、またはその間のあらゆるパーセンテージ ) 同一であるアミノ酸配列を有する F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 を含んでいてもよい。ある特定の実施形態において、C X C R 3 抗体またはフラグメントは、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V L F R 領域と同一な、または該領域と比べて 1、2、3、4、または 5 のアミノ酸突然変異 ( 付加、欠失、および保存的置換のような置換を包含する ) を有するアミノ酸配列を有する、少なくとも 1 つの V L F R ( F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 ) を含んでいてもよい。

## 【 0 0 8 1 】

ある特定の実施形態において、C X C R 3 抗体またはフラグメントは、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V H F R 領域と同一な、または該領域と比べて 1、2、3、4、または 5 のアミノ酸突然変異を含むアミノ酸配列を有する V H F R 領域 ( F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 ) を含み、さらに、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V L F R 領域と同一な、または該領域と比べて 1、2、3、4、または 5 のアミノ酸突然変異を含むアミノ酸配列を有する V L F R 領域 ( F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 ) を含む。ある特定の実施形態において、C X C R 3 抗体またはフラグメントは、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V H F R 領域と約 8 0 ~ 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を有する V H F R 領域 ( F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 ) を含み、さらに、クローン 1 2、1 3 5、8 2、5 3、および 4 のいずれか 1 つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体内の対応する V L F R と約 8 0 ~ 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を有する V L F R 領域 ( F R 1、F R 2、F R 3、および / または F R 4 ) を含む。

## 【 0 0 8 2 】

C D R および F R 領域のそれぞれを独立して選択し、所与の抗体に関する他のあらゆる C D R または F R 領域と組み合わせることができるため、本明細書で開示された C D R および F R 領域は、様々な組み合わせで連結が可能である。ある特定の実施形態において、V H および / または V L の C D R ならびに F R 配列は、C X C R 3 活性を中和する能力を保持する抗体またはフラグメント中で、あらゆる組み合わせで存在していてもよい。

## 【 0 0 8 3 】

本明細書で開示されたような抗体およびフラグメントは、本明細書において説明される

アミノ酸配列を実質的に変更しない1つまたはそれ以上のアミノ酸配列を含んでいてもよい。実質的に同じアミノ酸配列としては、保存的アミノ酸置換、同様に抗体またはフラグメントのC X C R 3活性を中和する能力を損なわないアミノ酸欠失および/または挿入を含む配列が挙げられる。

#### 【0084】

本明細書で開示された抗体およびフラグメントはさらに、1つまたはそれ以上の追加の分子にコンジュゲートされてもよい。例えば、コンジュゲートは、治療剤、可溶化剤、安定剤、免疫抑制剤、受容体、およびそれらのフラグメント、抗原と結合するペプチド、ならびに/または他のリガンド標的部分のうち1つまたはそれ以上に、直接的に、またはリンカーを介して合体した抗体を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、治療剤は、T1Dおよび/またはC X C R 3に関連する他の障害を処置するのに有用な作用剤である。いくつかの実施形態において、本抗体またはフラグメントは、細胞刺激因子またはインスリンにコンジュゲートされている。

#### 【0085】

##### ヌクレオチド配列

上述したアミノ酸配列に加えて、ある特定の実施形態において、それらのアミノ酸配列に相当するヌクレオチド配列が本明細書において開示される。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、C X C R 3活性を中和することができる抗体またはフラグメントをコードする。ある特定の実施形態において、ヌクレオチド配列を使用して、細胞中での抗C X C R 3抗体の発現（例えば、哺乳動物細胞での発現）のための発現ベクターを製造することができる。

#### 【0086】

また、ある特定の実施形態において、本明細書で開示されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと実質的に同一なポリヌクレオチドも本明細書において開示される。実質的に同一な配列は、多型配列、すなわち集団における代替配列または対立遺伝子であってもよい。また実質的に同一な配列は、サイレント突然変異を含む配列などの、突然変異が誘発された配列を含んでいてもよい。突然変異は、1つまたはそれ以上のヌクレオチド残基の変化、1つまたはそれ以上のヌクレオチド残基の欠失、または1つまたはそれ以上の追加のヌクレオチド残基の挿入を含んでいてもよい。また実質的に同一な配列は、核酸コードの縮重のために、本明細書で開示されたアミノ酸配列中のいずれかある特定のアミノ酸位置における同じアミノ酸をコードする様々なヌクレオチド配列を含んでいてもよい。また、実質的に同一な配列には、C X C R 3を中和する能力を保持する抗体の1つの鎖または複数の鎖をコードする配列も包含される。

#### 【0087】

また、ある特定の実施形態において、高度にストリンジェントな、またはそれより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で、C X C R 3中和抗体またはフラグメントをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドも本明細書において開示される。用語「ストリンジェンシー」は、本明細書で使用される場合、2つの核酸間の相同性の程度を評価するために行われるハイブリダイゼーション実験の実験条件（例えば、温度および塩濃度）を指し；ストリンジェンシーが高ければ、2つの核酸間のパーセント相同性はより高くなる。成句「ハイブリダイズすること」、またはそれらの文法上の変化形は、本明細書で使用される場合、低い、中程度もしくは高いストリンジェンシー条件下で、または核酸合成条件下で、第1の核酸分子が第2の核酸分子に結合することを指す。ハイブリダイゼーションには、第1の核酸分子が第2の核酸分子に結合するような例と、第1の核酸分子と第2の核酸分子とが相補的である例とがあり得る。

#### 【0088】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、これらに限定されないが、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中での、約45セルシウス度でのフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーション、それに続いて0.2×SSC/0.1%SDS中での、約50~65セルシウス度での1回またはそれ以上の洗浄を包含する。

他のストリンジェントな条件は、 $6 \times S S C$ 中での、約45セルシウス度での、フィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーション、それに続いて $0.1 \times S S C / 0.2\% S D S$ での、約65セルシウス度での1回またはそれ以上の洗浄を包含する。公知のストリンジェンシーの他のハイブリダイゼーション条件は当業者によく知られており、本明細書に含められる。

【0089】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示された核酸は、 $C X C R 3$ 活性を中和することができる抗体またはフラグメント中の1つの鎖または複数の鎖のアミノ酸配列をコードしていてもよく、または核酸は、本抗体またはフラグメント中の1つの鎖または複数の鎖のアミノ酸配列をコードする核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものでもよい。

10

【0090】

ある特定の実施形態において、 $C X C R 3$ 中和抗体またはフラグメントのVHドメインのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み、さらに、クローン12、135、82、53、および4のいずれか1つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の重鎖をコードするヌクレオチド配列に少なくとも約80~100%（例えば、約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）（またはその間のあらゆるパーセンテージ）同一なポリヌクレオチド配列が、本明細書において開示される。ある特定の実施形態において、上記ポリヌクレオチド配列は、クローン12、135、82、53、および4のいずれか1つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の重鎖をコードするヌクレオチド配列と比べて、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の突然変異（付加、欠失、および保守的置換のような置換を包含する）を有するヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

20

【0091】

ある特定の実施形態において、 $C X C R 3$ 中和抗体またはフラグメントのVLドメインのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み、さらに、クローン12、135、82、53、および4のいずれか1つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列に少なくとも約80~100%（例えば、約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）（またはその間のあらゆるパーセンテージ）同一なポリヌクレオチド配列が、本明細書において開示される。ある特定の実施形態において、上記ポリヌクレオチド配列は、クローン12、135、82、53、および4のいずれか1つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列と比べて、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の突然変異（付加、欠失、および保守的置換のような置換を包含する）を有するヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

30

【0092】

特定の実施形態において、VHのアミノ酸配列と少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはその間のあらゆるパーセンテージ）同一であり、さらに、VLのアミノ酸配列と少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはその間のあらゆるパーセンテージ）同一であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列が、本明細書において開示され、ここで上記ヌクレオチド配列は、クローン12、135、82、53、および4のいずれか1つならびにそれらのキメラおよびヒト化変異体からの重鎖および軽鎖のアミノ酸配列をコードする。

40

【0093】

開示されたポリヌクレオチドは、当技術分野で公知のあらゆる方法により得てもよい。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知の場合、本抗体をコードするポリヌクレオチドを化学合成されたオリゴヌクレオチドから構築してもよい。これは、例えば、本抗体をコードする配列の一部を含有するオーバーラップするオリゴヌクレオチドを合成し、これらの

50

オリゴヌクレオチドをアニールおよびライゲートし、次いでライゲートしたオリゴヌクレオチドをPCRで増幅することを含むと予想される。開示されたポリヌクレオチドは、抗体cDNAライブラリー、または抗体を発現するあらゆる組織もしくは細胞（例えば、抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞）から単離されたcDNAライブラリーのようなその他のあらゆる好適な核酸源から生成することもできる。

#### 【0094】

いくつかの実施形態において、開示されたポリヌクレオチドのいずれかが、発現ベクターに取り入れられてもよい。様々なヒトおよび動物の細胞型で発現させるのに好適なベクターは、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、ベクターを含む宿主細胞が提供される。好適な宿主細胞としては、例えば、CHO、COS、SF9、および/またはその他のヒトもしくは非ヒト細胞株が挙げられる。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、培地中で培養されると一時的にまたは安定してベクター上の核酸を発現し、それによって本明細書で開示された抗体またはフラグメントを産生するための方法が提供される。

10

#### 【0095】

##### 医薬組成物

医薬組成物は、本明細書で開示された抗体、またはそれらのフラグメントのいずれかを含んでいてもよい。また、例えば、遺伝子治療用途で使用するため、および/またはタンパク質またはそれらのフラグメントを産生するための宿主細胞（例えば、CHO、COS、SF9、および/またはその他のヒトもしくは非ヒト細胞株）での一時的または安定な発現のための、本抗体またはそれらのフラグメントをコードする核酸を含む医薬組成物も開示される。

20

#### 【0096】

本明細書で開示された医薬組成物は、溶媒、充填剤、増量剤、崩壊剤、緩衝液、もしくは安定剤のような、薬学的に許容される担体および/または少なくとも1種の添加剤を含んでいてもよい。標準的な医薬製剤技術は当業者に周知である（例えば、2005 Physicians' Desk Reference（登録商標）、Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版、Gennadoら編、Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000を参照）。好適な製薬用添加剤としては、例えば、マンニトール、スターチ、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。ある特定の実施形態において、医薬組成物はまた、pHを緩衝化する試薬および湿潤剤または乳化剤（例えば、リン酸緩衝生理食塩水、注射用の滅菌生理食塩水など）を含有していてもよい。さらなる実施形態において、本組成物は、保存剤またはその他の安定剤を含有していてもよい。

30

#### 【0097】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示された抗体、またはそれらのフラグメント、または本抗体もしくはフラグメントをコードする核酸のいずれかを含む医薬組成物はさらに、以下のもの：マンニトール、ポリソルベート80、二塩基性リン酸ナトリウム七水和物、および一塩基性リン酸ナトリウム一水和物のうち1種またはそれ以上を含んでいてもよい。別の実施形態において、医薬組成物は、pH6.5の10mMヒスチジン、最大2%のグリシン、最大2%のマンニトール、および最大0.01%のポリソルベート80を含有していてもよい。

40

#### 【0098】

医薬組成物の配合は、意図した投与経路および他のパラメーターに応じて変更することができる（例えば、Roweら、Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第4版、Apha Publications, 2003を

50

参照)。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、凍結乾燥したケーキまたは粉末であってもよい。凍結乾燥組成物は、静脈注入による投与のために、例えばUSPの滅菌注射用水で再溶解させてもよい。他の実施形態において、本組成物は、滅菌された非発熱性溶液であってもよい。

#### 【0099】

本明細書において説明される医薬組成物は、単独で活性な化合物として、本明細書で開示されたような抗体、またはそれらのフラグメント、または本抗体またはフラグメントをコードする核酸を含んでいてもよいし、または医薬組成物は、他の化合物、組成物、または生物学的材料との組み合わせを含んでいてもよい。例えば、医薬組成物はまた、T1DのようなCXCR3に関連する疾患または障害の処置に有用な1種またはそれ以上の低分子または他の作用剤を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、

細胞刺激因子、インスリン、および/またはインスリン産生細胞を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、医薬組成物はまた、1種またはそれ以上の免疫抑制剤、mTOR阻害剤またはオートファジー阻害剤を含んでいてもよい。免疫抑制剤の例としては、ラパマイシンおよびベルケードが挙げられる。ラパマイシンは、mTOR阻害剤でもある。

#### 【0100】

##### 投与および投与方法

いくつかの実施形態において、患者に、1種またはそれ以上の本明細書で開示された抗CXCR3抗体、および/またはそれらのフラグメントを投与することを含む、CXCR3に関連する疾患または障害に罹った患者を処置する方法が提供される。いくつかの実施形態において、本抗体またはフラグメントは、CXCR3を中和することができる。いくつかの実施形態において、疾患または障害は、炎症性疾患である。いくつかの実施形態において、障害は、T1Dである。いくつかの実施形態において、本抗体またはフラグメントを含む組成物（例えば、医薬組成物）を投与することにより、CXCR3に関連する疾患または障害の症状が防止され、処置され、その重症度が低減され、かつ/または別の方法で改善される。いくつかの実施形態において、本抗体またはフラグメントは、CXCR3に関連する疾患または障害の症状を防止し、処置し、その重症度を低減し、かつ/または別の方法で改善するのに十分な用量および頻度で投与される。

#### 【0101】

ある特定の実施形態において、疾患または障害を処置するための医薬品の製造で使用するための組成物が提供され、ここで医薬品は、本明細書で開示された抗体、またはそれらのフラグメントのいずれかを含む。例えば、本抗体またはフラグメントは、軽鎖可変ドメイン4.0~4.7のいずれか1つからの3つのCDRと対になっている重鎖可変ドメイン4.0~4.11のいずれか1つからの3つのCDR；軽鎖可変ドメイン12.0~12.3のいずれか1つからの3つのCDRと対になっている重鎖可変ドメイン12.0~12.3のいずれか1つからの3つのCDR；軽鎖可変ドメイン53.0~53.13のいずれか1つからの3つのCDRと対になっている重鎖可変ドメイン53.0~53.10のいずれか1つからの3つのCDR；軽鎖可変ドメイン82.0~82.3のいずれか1つからの3つのCDRと対になっている重鎖可変ドメイン82.0~82.3のいずれか1つからの3つのCDR；または軽鎖可変ドメイン135.0~135.3のいずれか1つからの3つのCDRと対になっている重鎖可変ドメイン135.0~135.3のいずれか1つからの3つのCDRを含んでいてもよい。

#### 【0102】

いくつかの実施形態において、医薬品中の本抗体またはフラグメントは、軽鎖可変ドメイン4.0~4.7のいずれか1つと対になっている重鎖可変ドメイン4.0~4.11のいずれか1つ、軽鎖可変ドメイン12.0~12.3のいずれか1つと対になっている重鎖可変ドメイン12.0~12.3のいずれか1つ、軽鎖可変ドメイン53.0~53.13のいずれか1つと対になっている重鎖可変ドメイン53.0~53.10のいずれか1つ、軽鎖可変ドメイン82.0~82.3のいずれか1つと対になっている重鎖可変

ドメイン 82.0 ~ 82.3 のいずれか 1 つ、または軽鎖可変ドメイン 135.0 ~ 135.3 のいずれか 1 つと対になっている重鎖可変ドメイン 135.0 ~ 135.3 のいずれか 1 つを含んでいてもよい。

【0103】

本明細書で開示された方法で使用するための CXCR3 抗体の用量は、患者の生理学的状態（大きさまたは表面積、体重、年齢、および代謝）ならびに病状のような当業者によく知られている多数のパラメーター、加えて送達メカニズム、配合、およびあらゆる併用療法または継続療法のような薬理学的パラメーターに基づき変更されると予想される。「有効量」の CXCR3 抗体は、例えば HA1bc（ヘモグロビン A1c）レベルの維持または低下（約 7% 未満、例えば、7.5、7.4、7.3、7.2、7.1、7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、または 6.5% 未満、またはその間のあらゆるパーセンテージ未満）、内因性インスリン産生および/または血中インスリンレベルの増加、空腹時 C-ペプチドレベルの維持または増加、耐糖能の改良、外因性インスリンの非存在下における空腹時血液グルコースレベルの低減、外因性インスリンの使用の低減、細胞の炎症の低減、ならびに/または細胞群の増加および/もしくは増殖の 1 つまたはそれ以上などの望ましい *in vivo* での作用をもたらすことができる。例えば血中での CXCR3 + 細胞（例えば、これらに限定されないが、T 細胞など）の減少、CXCR3 リガンド結合の阻害、GTP 結合、カルシウム流入および/もしくは動員、細胞走化性、ならびに/または受容体の内在化などの、CXCR3 阻害に関する直接的な細胞アッセイを使用することもできる。

【0104】

ある特定の実施形態において、有効量の CXCR3 抗体は、*in vivo* において、上記のパラメーターのいずれかにおいて、対照と比べて約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは 100%（もしくはその間のあらゆるパーセンテージ）の改善、または 1、2、4、5、10、15、20、30、40、50、もしくは 100 倍（もしくはその間のあらゆる倍率）の改善、またはそれを超える改善をもたらす。ある特定の実施形態において、改善は、外因性インスリンの非存在下における空腹時血液グルコースレベルが、100、110、120、130、140、150、160、180、200、220、240、250、300、または 350 mg/dL（またはその間のあらゆる値）未満に低減していることを特徴としていてもよい。ある特定の実施形態において、改善は、基底の血清 C-ペプチドレベルが、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、または 1.0 nmol/L（またはその間のあらゆる値）よりも高いことを特徴としていてもよい。いくつかの実施形態において、改善は、（経口グルコース負荷試験後の）C-ペプチド刺激間の合計の空腹時血清 C-ペプチドレベルが、約 0.03、0.033、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、または 1.0 nmol/L × 分（またはその間のあらゆる値）よりも高いことを特徴としていてもよい。ある特定の実施形態において、有効量の CXCR3 抗体はさらに、膵臓中の CD4+ および/または CD8+ 細胞の濃度を、対照の対象と比べて、少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90%（またはその間のあらゆるパーセンテージ）減少させるか、または少なくとも 1、2、3、4、または 5 倍（またはその間のあらゆる値）減少させることを特徴としていてもよい。

【0105】

様々な実施形態において、有効量の抗体は、ヒト対象への投与に関して安全な用量になるようにも選択される。ある特定の実施形態において、抗 CXCR3 抗体の安全な用量は、対象における（CXCR3 活性以外の）T 細胞または T 細胞活性の総計の実質的な喪失（例えば、対象の血液中の T 細胞濃度または活性によって測定した場合）が起こらない用量と特徴付けることができる。特定の実施形態において、「T 細胞または T 細胞活性の総計の実質的な喪失」は、CXCR3 中和抗体で処置した対象における（CXCR3 活性以外の）CD4+ および/または CD8+ 細胞の濃度および/または活性が、プラセボで処

10

20

30

40

50

置した対照の対象と比べて、および/または処置前の処置対象と比べて、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%（またはその間のあらゆるパーセンテージ）またはそれ未満で低減されることを意味する。いくつかの実施形態において、安全な用量は、調節性T細胞、B細胞、骨髄細胞、樹状細胞、および/または顆粒球から選択される1つまたはそれ以上の細胞型の濃度が、対照の対象と比べて40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%（またはその間のあらゆるパーセンテージ）またはそれ未満で減少することとさらに特徴付けることができる。

【0106】

ヒトのような対象に関する典型的な非限定的な用量は、*in vitro*での走化性アッセイにおいて約1~6 μg/mLのND<sub>50</sub>を有する抗体の場合、約0.03、0.06、0.12、0.24、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、または3.7 mg/kg/用量（またはその間のあらゆる値）を包含する。ある特定の

10

実施形態において、本抗体は、約0.03~3.7 mg/kg/用量、0.15~0.7 mg/kg/用量、または0.25~0.5 mg/kg/用量の範囲で投与されてもよい。

【0107】

抗CXCR3抗体は、1回の投与で投与されてもよいし、または例えば1日1回、週1回、2週に1回、月1回、2か月に1回、年4回、もしくは年1回のように様々な期間にわたり繰り返しの投与で投与されてもよい。したがって、患者は、非限定的な例において、上記で論じられた用量範囲に基づいて、処置レジメンの経過にわたり、総用量がおよそ

20

0.16~18 mg/kgのCXCR3抗体を取り込んでよい。

【0108】

抗CXCR3抗体は、例えば、静脈内、腹腔内、経鼻的、経眼、経口的、非経口的、皮下、または経皮などの当業者に公知のあらゆる好適な手段によって投与されてもよい。特定の実施形態において、本抗体は、対象の膵臓に直接、または膵臓の近傍に、または膵臓の膵島細胞のような膵臓の特定の領域に投与されてもよい。

【0109】

ある動物で達成された有効な投与量は、ヒトなどの別の動物で使用するために当技術分野で公知の換算係数を使用して換算することができる。例えば、Reagan-Shawら、*FASEB J.* 22:659~61(2008); Scheinら、*Clin. Pharmacol. Ther.* 11:3~40(1970); およびFreireichら、*Cancer Chemother. Reports* 50(4):219~244(1966)を参照されたい。例えば、mg/kgで示される動物への用量に基づくヒト相当用量(HED)は以下の方程式:  $HED(mg/kg) = 動物用量(mg/kg) \times (Km^{animal} / Km^{human})$ で示すことができ、式中、 $Km = 重量 / 表面積(kg/m^2)$ である。

30

【0110】

上記の方程式に基づく典型的な換算係数を以下の表に示す。上記でヒトに関して述べられた典型的な用量は、これらの係数または当業者に公知の他の手段に基づいて他の種または他のヒト患者ごとに調節することができる。

【0111】

40

## 【表 4】

表3

元の種: 他の種:	マウス (20 g)	ラット (150 g)	サル (3.5 kg)	イヌ (8 kg)	ヒト (60 kg)
マウス	1	0.5	0.25	0.17	0.08
ラット	2	1	0.5	0.25	0.14
サル	4	2	1	0.6	0.33
イヌ	6	4	1.7	1	0.5
ヒト	12	7	3	2	1

## 【0112】

## 対象

本発明によって提供される方法で処置しようとする対象としては、ヒト、または家畜、飼育動物、および野生動物のような動物が挙げられる。いくつかの実施形態において、動物は、鳥類、ウシ属、イヌ類、クジラ目、ウマ科、ネコ科、ヒツジ、魚類/魚、ブタ、霊長類、げっ歯類、または有蹄類である。対象は、成体、幼年期、胎児、または胚などのあらゆる発生段階のものであってもよい。特定の実施形態において、患者は、哺乳動物であり、より特定の実施形態において、ヒトである。

20

## 【0113】

様々な実施形態において、異常なC X C R 3活性に関連する何らかの状態、もしくはC X C R 3シグナル伝達の破壊が治療上有益な可能性がある何らかの状態について予防的に、またはその発病後に対象を処置することができる。いくつかの実施形態において、T 1 Dについて予防的に、またはT 1 Dの発病後に対象を処置することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で示された方法を使用して、T 1 Dの発病前に対象を予防的に処置することができ、または本明細書で示された方法を使用して、初発のT 1 Dを有する対象を処置することができる。

## 【0114】

「初発のT 1 Dを有する対象」は、糖尿病が臨床的に診断されたときの対象の年齢に関係なく（例えば、成体、幼年期、胎児、または胚の対象を含む）、減少しているものなお検出可能な、膵臓の細胞からのインスリン産生能力を有するあらゆる対象である。ある特定の実施形態において、初発のT 1 Dを有する対象は、好ましくはT 1 Dの最も初期の臨床診断から約6ヶ月以内（例えば、約1日以内、1週間以内、2週間以内、3週間以内、4週間以内、5週間以内、1ヶ月以内、2ヶ月以内、3ヶ月以内、4ヶ月以内、5ヶ月以内、6ヶ月以内、またはその間のあらゆる期間以内）に処置を受けると予想される。他の実施形態において、対象は、T 1 Dの最も初期の臨床診断から6ヶ月よりも後に処置を受けてもよく、その場合、対象は、約0.2 nmol/L（例えば、少なくとも約0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、または1.0 nmol/L）以上の、ごくわずかながら測定可能な基底の血清C - ペプチドレベルを保持する。いくつかの実施形態において、処置は、1種またはそれ以上の本明細書で開示された抗体を含む1回またはそれ以上の用量の投与を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、C X C R 3中和抗体である。

30

40

## 【0115】

いくつかの実施形態において、初発のT 1 Dを有する対象は、C - ペプチド刺激の間、少なくとも約0.03、0.033、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8または1.0 nmol/L x 分、例えば、約0.03 ~ 1.0または0.033 ~ 1.0 nmol/L x 分の合計の空腹時血清C - ペプチドレベルを保持する。特定の実施形態において、対象は、C - ペプチド刺激の間、0.033 ~ 1.0 nmol/L x 分の合計の空腹時血清C - ペプチ

50

ドレベルを有する。ある特定の実施形態において、C-ペプチド刺激は、経口グルコース試験後になされ、10.0~13.9 mmol/Lのグルコースを投与してから60~150分、合計血清C-ペプチドレベルを測定することを含んでいてもよい。Keymeulenら、Diabetologia 53:614~623(2010)を参照されたい。より特定の実施形態において、対象の測定可能な経口グルコース負荷試験後の合計血清C-ペプチドレベルの増加は、0.8、0.7、0.6、0.54、0.5、0.4、0.3、0.2、または0.1 nmol/L x 分未満である。よりさらなる特定の実施形態において、対象の経口グルコース負荷試験後の合計血清C-ペプチドレベルは、0.54 nmol/L x 分またはそれ未満の増加を示す。C-ペプチドは、インスリン前駆体ペプチド(ヒト参照配列NP\_000198)の残基57~87に相当し、残基90~110および25~54は、それぞれインスリンのAおよびB鎖に相当する。

#### 【0116】

いくつかの実施形態において、初発のT1Dを有する対象は、約100、110、120、130、140、150、160、180、200、220、240、250、300、350 mg/dL(またはその間のあらゆる値)を超える、またはそれより高い値を超える外因性インスリンの非存在下における上昇した空腹時血液グルコースレベルを有する。ある特定の実施形態において、対象は、上述したような上昇した空腹時血液グルコースレベルと、それに加えて上述したような減少した合計の空腹時血清C-ペプチドレベルとの両方を有する場合もある。

#### 【0117】

ある特定の実施形態において、対象は、初発のT1Dと診断された直後に本明細書で開示された方法によって処置される。より特定の実施形態において、対象は、初発のT1Dの臨床診断から、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日以内、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間以内、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月以内(もしくはその間のあらゆる期間)に、まず本発明の方法によって処置される。より具体的な実施形態において、対象は、初発のT1Dの臨床診断の6ヶ月以内に、まず本発明の方法によって処置される。他の実施形態において、T1Dを有する対象は、臨床診断からの時間に関係なくあらゆる時期に本明細書で開示された方法によって処置され、ここで対象は、少なくとも約0.2 nmol/Lの残留した血清C-ペプチドレベルを保持する。

#### 【0118】

##### 追加の方法

本明細書で示された方法は、ある特定の実施形態において、本明細書で開示された抗CXCR3抗体の投与と同時または連続的に(その前または後に)投与され得る追加の処置を含んでいてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、対象に、抗CXCR3抗体に加えて免疫抑制剤を投与するさらなる工程を含む方法が開示される。免疫抑制剤としては、これらに限定されないが、アザチオプリン(イムラン)、インターフェロン1a、インターフェロン1b、バシリキシマブ、コルチコステロイド、サイクロスポリン(サンディミュン)、シクロホスファミド、クロラムブシル、ダクリズマブ、デオキシスベルグアリン、エタネルセプト、グラチラマー酢酸塩、インフリキシマブ、レフルノミド、メルカプトプリン(6-MP)、メトトレキサート、ミトキサントロン、ムロモナブ-CD3、ミコフェノール酸塩(MFMまたはセルセプト)、ナタリズマブ、アナキンラ、カナキヌマブ、リツキシマブ、ベリムマブ、アバタセプト、アルデスロイキン、プレドニゾン、ラパマイシン、シロリムス、タクロリムス、およびウステキヌマブなどのうち1種またはそれ以上が挙げられる。

#### 【0119】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示された方法は、抗CXCR3抗体を投与することに加えて、対象に細胞刺激因子を投与する工程を含んでいてもよい。細胞刺激因子を投与する工程は、抗CXCR3抗体の投与と並行していてもよいし、またはそれと連続していてもよい(その前または後に)。典型的な細胞刺激因子としては、これら

に限定されないが、移植した細胞（自己、同種異系、または同系）、移植したインスリン産生細胞（同種異系または同系）、DDP4（ヒトタンパク質参照配列NP\_001926.2）阻害剤、TM4SF20ペプチド（ヒトタンパク質参照配列NP\_079071）、MEM27ペプチド（ヒトタンパク質参照配列NP\_065716）、エキセジン1またはGLP-1（ヒトタンパク質参照配列NP\_002045）類似体、gp130およびEGF受容体リガンド、ならびに米国特許出願公開第20100130476号の段落8~11で開示されたものなどのうち1種またはそれ以上が挙げられる。本発明の方法において、細胞刺激因子は、免疫抑制剤と同時に、または（その前もしくは後に）連続的にいずれかで投与されてもよい。ある特定の実施形態において、細胞刺激因子、インスリン産生細胞、および/または免疫抑制剤は、細胞刺激因子、インスリン産生細胞、および/または免疫抑制剤を標的組織または臓器に送達することができる装置を移植することによって投与されてもよい。

#### 【0120】

また、CXCR3および/またはCXCR3を発現する細胞（例えば、CXCR3+T細胞）を検出および/または定量する方法も、本明細書において開示される。いくつかの実施形態において、本方法は、1つまたはそれ以上の本明細書で開示された抗CXCR3抗体を使用して、CXCR3および/またはCXCR3を発現する細胞を検出および/または定量することを含む。例えば、1つまたはそれ以上の抗体を患者のサンプル（例えば、血液サンプル）に添加して、検出可能なシグナルにコンジュゲートした二次抗体のような検出可能な標識（例えば、蛍光性の二次検出抗体）を使用して検出することができる。例えば、FACSソーティングを使用して、一次抗体および蛍光性の二次抗体を結合させた後、サンプル中のCXCR3を発現する細胞のレベルを定量することができる。

#### 【0121】

いくつかの実施形態において、CXCR3障害またはCXCR3関連障害（例えば、糖尿病、T1D）を診断するための診断方法を使用することができる。例えば、障害は、患者サンプル中のCXCR3の存在または非存在を検出することによって診断することができ、またはサンプル中のCXCR3の濃度を、1つまたはそれ以上の参照標準におけるレベルと比較することによって診断することができ、この場合、標準におけるレベルからの偏差が、障害の存在の指標になる。

#### 【0122】

様々な実施形態において、少なくとも1種の抗CXCR3抗体またはフラグメントを含むキットも提供される。本キットは、様々な調査、診断、および治療目的にとって有用である。例えば、対象にキット内に含有される抗CXCR3抗体またはフラグメントを投与することによって、CXCR3+T細胞を検出するため、またはI型糖尿病を処置するために、本キットを使用することができる。単離および精製目的で、本キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合させた抗体またはフラグメントを含有していてもよい。ある特定の実施形態において、本キットはまた、望ましい調査、診断、および/または治療目的のために抗CXCR3抗体またはフラグメントを使用するための説明書も含む。

#### 【0123】

本出願において、単数形の使用は、特に他の規定がない限り、複数形を包含する。また本出願において、「または」の使用は、特に他の指定がない限り、「および/または」も意味する。さらに用語「包含」の使用、加えて「~を包含する」および「包含される」のようなその他の形態の使用は、限定的ではない。本明細書において説明されるあらゆる範囲は、両端の値とその両端の値の間の全ての値とを包含すると理解されるものとする。

#### 【0124】

本明細書において使用される章の表題は、単に構成上の目的で記載されたものであり、説明されている主題を制限すると解釈されないものとする。これらに限定されないが、特許、特許出願、論文、本、および専門書などの本出願において引用された全ての文書、または文書の一部は、あらゆる目的に関して、参照により明確にそれら全体が開示に組み入

れられる。参照により組み入れられた公報および特許または特許出願が本明細書に記載された発明と矛盾しない程度に、本明細書は、矛盾しないあらゆる材料を包含する。

【0125】

例えば、ゲノム遺伝子座、ゲノム配列、機能的な注釈、対立遺伝子変異体、および参考 mRNA（例えば、エキソンの境界などを含む）、およびタンパク質配列（例えば保存されたドメイン構造）を包含する遺伝子番号または受託番号のような本出願において開示された参照遺伝子配列に関連する全ての情報は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0126】

以下の実施例は、本開示を例示するのに役立つが、本開示を限定することはまったくない。

【0127】

〔実施例1〕

材料および方法

免疫原の生成。CHO細胞を全長ヒトCXCR3をコードするDNAで形質転換して、CXCR3を細胞表面上に発現させた（「r-CXCR3-CHO細胞」）。細胞を形質転換するのに使用されるCXCR3配列を得て、CXCR3のオープンリーディングフレームを発現ベクターpcDNA3.1neo DESTに入れ、次いで300-19細胞（免疫原）にトランスフェクションした。アミノ酸配列、MVLEVS DHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENESDSC（配列番号81）を有するCXCR3細胞外ドメイン（ECDドメイン）のN末端ペプチドフラグメントをC末端のシステインを介してKLHにコンジュゲートし、これを免疫原として使用した。CXCR3を発現する細胞を、37°Cで、5%CO<sub>2</sub>下で、10%の透析したウシ胎児血清（FBS）（Invitrogen）が補充されたRPMI（Invitrogen、Carlsbad、California）中で維持した。上記の培地を5mMのEDTAが補充されたリン酸緩衝（Ca/Mg非含有）塩類溶液（CMF-PBS）で交換して、その緩衝液中で細胞を回収することにより注入用の細胞を調製した。回収した細胞を500×gで約5分の遠心分離によってペレット化し、ペレットをCMF-PBS中に再懸濁して前と同様にして遠心分離することにより1回洗浄し、細胞ペレットをCMF-PBSに再懸濁することにより、注入に適切な体積（例えば0.2ml中に5×10<sup>6</sup>細胞）に計数して調節した。

【0128】

抗体の調製。ヒトCXCR3のN末端の37アミノ酸を使用して、抗ヒトCXCR3に関するマウスモノクローナルハイブリドーマを生成し、さらなる特徴付けのために5種の抗体クローン（4、12、53、82、および135）を選択した。ヒトCXCR3の37アミノ酸のN末端は、マウスCXCR3中のアラインされた領域に65%相同であり、CXCL9、CXCL10、およびCXCL11結合にとって重要な残基を含有する。BALB/cマウス、約6~8週齢（Charles River Laboratories、Wilmington、MA）を、CXCR3を発現する細胞またはCXCR3の細胞外ペプチドで免疫化した。0日目に、あるグループのマウスの皮下（SC）にアジュバント（TiterMax Gold、Sigma Aldrich、番号T2685-1ML）と混合されたKLHコンジュゲートペプチドの1:1のエマルジョンを投与し、2~3週のインターバルでペプチドとアジュバントとの1:1エマルジョンでSCに3~5回ブーストするか、またはアジュバント非含有のPBS中の細胞で腹腔内（IP）にブーストし、屠殺する前に連続して2日間、全てアジュバント非含有のPBS中のペプチドおよび/または細胞のいずれかでIPにブーストした。別のグループのマウスに、PBS中の細胞を用いて、2~3週のインターバルで3~5回IP投与し、続いて屠殺する前に連続して2日、IPにブーストした。両方のグループのマウスにおいて、各注入には、およそ100μlの体積中におよそ2×10<sup>6</sup>個の細胞が含有されていた。

## 【0129】

最後の注入の次の日に、マウスを屠殺し、脾臓を取り出し、それをペトリ皿中の無血清DMEM (Gibco) およそ10ml中に置いた。KohlerおよびMilstein (Nature, 256: 495~7 (1975)) の方法に基づいて、Sp2\Oマウス骨髄腫細胞 (ATCC CRL-1581) と免疫化マウスからの脾臓細胞とを50% (w/w) PEGを使用して融合させた。この手順の最後に、細胞をClonaCell-Hyハイブリドーマ回収培地 (StemCell Technologies) 50ml中に再懸濁し、T75cm<sup>2</sup>のフラスコに移し、37℃で16~24時間インキュベートした。このインキュベート後に、細胞を回収し、ClonaCell-HYメチルセルロース選択培地 (StemCell Technologies) 100mlを添加した。次いでこの混合物を10個の100mm<sup>2</sup>組織培養皿に分けて、10~14日インキュベートした。クローンのハイブリドーマをメチルセルロースから液状培地に移し、CXCR3に特異的なモノクローナル抗体を同定するアッセイ用の96マルチウェルプレート中で増殖させた。

10

## 【0130】

特に他の指定がない限り、これらの実施例に記載のHu4.1のような抗体変異体に対する参照番号は、同じ番号の重鎖変異体および軽鎖変異体を含有する抗体を指す (例えば、Hu4.1は、重鎖4.1および軽鎖4.1を含有すると予想される)。全ての抗体に対する参照番号は、表2に示される抗体の番号付けおよびVH/NK鎖の対と一致する。

## 【0131】

20

動物。雌NOD/LtJマウスをJackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入し、病原体がない状態で維持した。ACCU-CHEK (登録商標) Compact Plus Blood Glucose Meter (Roche, Indianapolis, IN) を使用して、10週齢から開始して週2回の尾静脈穿刺により、マウスを糖尿病に関してスクリーニングした。血中グルコースが連続3日間250mg/dLを超えると測定された場合、マウスは糖尿病とみなされた。処置開始後、最低でも100日間マウスを観察した。全ての動物実験は、社内のIACUCにより承認された。

## 【0132】

抗体注入。予防の研究のために、前糖尿病性NODマウスに、10週齢から開始して6週間、週1回で、抗体100µgを腹腔内 (i.p.) 注入した。回復の研究のために、マウスが糖尿病とみなされてから1週間以内に、動物をランダムに処置群に登録し、血中グルコースを、1日2回、読み取りの間を少なくとも6時間として測定し、研究の継続期間中に250mg/dLを超える血中グルコースを有するマウスにインスリンを腹腔内注入により投与した。連続30日間インスリン非依存性を維持した処置群のマウスが、回復したとみなされた。5回目の処置と6回目の処置との間に各グループから5匹のマウスを回収し、細胞分析のためにリンパ系の臓器、血液、骨髄、および脾臓を回収した。研究の最後に、脾臓を回収し、組織学的および免疫組織化学的な分析用に処理した。抗マウスCXCR3抗体、クローンCXCR3-173 (Uppaluriら、2008)、およびハムスターIgG対照抗体を、BioLegend (San Diego, CA) から購入した。

30

40

## 【0133】

FACS分析。脾臓、鼠径リンパ節、腭リンパ節、および骨髄の単一細胞懸濁液を作製した。脾臓を小片に細断し、2mg/mlコラゲナーゼD (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 中で37℃で30分インキュベートし、70ミクロンの細胞濾過器 (BD Biosciences, San Jose, CA) を通過させて濾過し、密度勾配遠心分離を使用してリンパ球を脾臓組織から分離した。細胞を、調節性T細胞 (Treg) に関して、APC標識抗マウスCD25、FITC標識抗マウスCD4、およびPE標識抗マウスFoxp3 (eBiosciences, San Diego, CA) で、活性化/メモリーT細胞に関して、PerCP標識抗マウスC

50

D8、PE標識抗マウスCD44、APC標識抗マウスCD62L、およびPeCy7標識抗マウスCXCR3で、ならびにB細胞、骨髄細胞、樹状細胞、NK細胞、およびNK細胞に関して、FITC標識抗マウスCD94、PerCP標識抗マウスCD4、APC標識抗マウスB220、PeCy7標識抗マウスCD11c、パシフィックブルー標識抗マウスCD11b、およびPE標識抗マウスNKp46で染色した。抗マウスCD16/32で氷上で20分ブロッキングした後に、細胞を4で30分インキュベートした。調節性T細胞の染色の場合、表面染色を行い、細胞を洗浄し、固定し、Cytotfix/Perm緩衝液(eBiosciences)中で透過処理し、抗マウスFoxp3抗体で氷上で30分染色した。染色後、細胞を2回洗浄し、パラホルムアルデヒド中で固定し、LSRII血球計算器で捕捉し、データをFlow Joソフトウェア(TreeStar, Ashland, OR)を使用して分析した。特に他の指定がない限り、全ての抗体をBD Biosciencesから購入した。

#### 【0134】

走化性アッセイ。走化性のアッセイを、5µmの膜を有するトランスウェル・パーミアブル・サポートを備えた24-ウェルプレート(Costar)で行った。CXCR3でトランスフェクションした300.19細胞を、RPM1640(総体積0.2ml)中の2.5%熱不活化ウシ胎児血清中に $1 \times 10^6$ 個の細胞で、トランスウェルインサート中に置いた。培地単独、または組換えケモカインの300ng/mlのCXCL9(MIG)、100ng/mlのCXCL10(IP-10)もしくは100ng/mlのCXCL11(I-TAC)が補充された培地を下の区画(0.6ml)に入れ、細胞を含有するトランスウェルインサートを下の区画に装填した。プレートを、5%CO<sub>2</sub>の加湿したインキュベーター中で、37で4~5時間インキュベートした。インキュベーション期間に続いて、トランスウェルインサートを取り出し、下の区画の全ての培地をプールし、1200RPMで5分の遠心分離によって細胞をペレット化した。培地を吸引し、細胞をカルセインAM(最終濃度10µg/ml)で37で30分染色した。細胞をペレット化し、洗浄し、培地(0.1ml)を添加し、懸濁液を96ウェルの黒いウェルを有するクリアボトムプレートに移した。プレートに1200RPMでパルスを与えて細胞を定着させ、FlexStationで490/520nmで蛍光を測定した。全ての条件を3連で試験した。得られたデータを、移動した細胞の平均相対的な蛍光単位(RFU)で示した。図14A~Cおよび図15A~Cを参照されたい。

#### 【0135】

CXCR3でブロックした場合の走化性に関して、CXCR3でトランスフェクションした300.19細胞を、走化性アッセイで使用する前に、様々な量のブロッキング抗体または対照IgGで37で20~30分前処置した。抗体を洗浄せず、アッセイのインキュベーション中に供給した。

#### 【0136】

FLIPRを使用したカルシウム動員アッセイ。hCXCR3を発現するヒト胎児腎臓293(HEK)細胞を、PBSおよび2mMのEDTAで処置することにより、80%の密集度で回収した。細胞を $1 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で無血清HEK-SFM培地に懸濁した。懸濁液15µL(15,000個の細胞)を384ウェルプレートの各ウェルに分配した。再溶解したFLIPRカルシウム4色素15µLを添加することによって、室温で30分、細胞に色素を入れた。抗ヒトCXCR3抗体クローンおよびアイソタイプ対照を、HBSS+20mMのHEPES+1%BSAで連続希釈し(3倍)、1クローンあたり10種の試験濃度を作製した。各試験濃度を同じプレート上で二連で(n=2)試験した。各ウェル中の細胞に試験濃度液15µLを添加し、プレートを室温で1時間インキュベートした。細胞内カルシウム動員を惹起するためのEC80を示す固定濃度のCXCL11(R&D Systems)をFLIPRの各ウェルに添加し、蛍光の変化を経時的にモニターした。各ウェルの最大応答をベースラインに対して正規化し、データを平均した後にGraphPad Prismを使用して4つのパラメーター方程式にフィッティングし、各クローンのIC50を決定した。図14Dおよび図21を参照された

い。

【0137】

親和性に関するBiacore分析。Biacore表面の調製。Biacore T100カインेटィクス/アフィニティーアッセイを使用して、マウス - ヒトCXCR3ハイブリドーマ抗体クローン4、12、53、82、および135のヒトCXCR3ペプチドに対する結合親和性を計算した。標準的なアミンカップリングプログラムを使用して、Biacore CM5シリーズセンサーチップ(GE番号BR-1006-68)にウサギ-抗マウス-Fc(RAM-Fc)捕捉抗体(GE番号BR-1008-38)を固定した。チップのカルボキシメチルデキストラン表面を、0.1MのN-ヒドロキスクシンイミド(NHS)と0.4MのN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)との1:1混合物を使用して活性化し、そのまま表面に捕捉抗体の反応性アミン基を結合させた。抗体固定に続き、pH8.5の1Mエタノールアミン塩酸塩/NaOHを使用して反応性センサーチップ表面の反応を止めた。固定により、1つのフローセルで8,000RUのRAM-Fc捕捉抗体が得られた。別のブランクフローセルを、データ分析中の参照差分のための表面として使用した。

【0138】

Biacoreアッセイ条件。Biacore T100機器のサンプルチャンバーおよびアッセイの温度をそれぞれ4 および25 に設定した。マウス抗hCXCR3抗体を、HBS-EPおよびランニング緩衝液(10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.05%P20界面活性剤、3mMのEDTA、pH7.4)で500nMに希釈し、10μl/分で32回の注入を使用して捕捉した。これらの条件により、試験された各マウス抗hCXCR3クローンの約1,200RUの安定な捕捉が達成された。hCXCR3ペプチドを、HBS-EP+で200、100、50、25、12.5、および0nM濃度に希釈した。各アッセイサイクルで、50μl/分の流速で5分ペプチドを注入し、結合を測定し、次いでHBS-EP+で10分、50μl/分の流速で洗浄し、解離を測定した。アッセイサイクル間で捕捉表面(RAM-Fc)を、10mMのグリシン-HCl、pH1.7を50μl/分で3分使用して、再生した。Biacore T100カインेटィクス・エバリュエーション・ソフトウェアv2.0(GE Healthcare)で分析を行った。センサーグラムを、1:1の結合モデルと参照フローセルおよび0nM濃度の差分(二重参照差分)とにフィッティングした。

【0139】

Biacoreの全受容体アッセイ。C末端に6xHis(配列番号82)とHPC4タグとを有する全長ヒトCXCR3受容体タンパク質をバキュロウイルスベクターを有する昆虫Sf9細胞で発現させた。次いで受容体タンパク質をNi-NTAおよびHPC4親和性精製により精製した。最終産物の緩衝液を、10mMのHEPES、300mMのNaCl、0.5%n-ドデシル-D-マルトピラノシド、および5%グリセロールに交換した。受容体タンパク質をNi-キレート化によりNTAチップに捕捉し、0.1MのN-ヒドロキスクシンイミド(NHS)および0.4MのN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)の1:1混合物の1:10の希釈混合物を使用したアミンカップリングによってさらに安定化した。20nMのhCXCL10およびhCXCL11リガンドを注入することにより、安定化した受容体表面をリガンド結合活性に関して試験した。動態分析のために、ヒトCXCR3リガンド(hCXCL9、hCXCL10、およびhCXCL11)を、HBS-EP+で20、10、5、2.5、1.25、0.6125、0.3125、および0nMの濃度に希釈した。抗CXCR3抗体を、HBS-EP+で80、40、20、10、5、2.5、1.25、および0nMの濃度に希釈した。分析物を50μl/分の流速で5分注入し、結合を測定し、次いでHBS-EP+で50μl/分の流速で10分洗浄し、解離を測定した。アッセイサイクル間で10mMのグリシン-HCl、pH1.7を50μl/分で1分使用して、受容体表面を再生した。Biacore T100カインेटィクス・エバリュエーション・ソフトウェアv2.0(GE Healthcare)で分析を行った。センサ

ーグラムを、1 : 1の結合モデルと参照フローセルおよび0 n M濃度の差分(二重参照差分)とにフィッティングした。

#### 【0140】

グルコース負荷試験。グルコース刺激の前の晩に、非空腹時血液グルコースをモニターし、糖尿病の動物のインスリン処置を中断した。マウスを12時間絶食させ、その後、腹腔に2 mg / g体重のD - グルコース(20% ; S i g m a)を注入した。注入前に、ならびに注入の15、30、60、および120分後に血中グルコースを測定した。

#### 【0141】

##### 〔実施例2〕

NODマウスの特徴付け

パラフィン包埋された6 ~ 10週齢の前糖尿病性雌NODマウスおよび初発の糖尿病を有する雌NODマウスからの代表的な膵臓の切片をインスリン、CXCL10、およびT細胞マーカーCD3に関して染色した(図1)。浸潤細胞で取り囲まれた膵島内のNODマウス膵臓においてCXCL10発現を検出した(図1の中央の列中の矢印)。それより高齢の前糖尿病性および初発の糖尿病マウスは、膵島のT細胞浸潤の著しい増加(図1、右の列)と、膵島内におけるインスリン産生の減少(図1、左の列)を示した。

#### 【0142】

CXCR3 + T細胞がNODマウスの膵臓に存在するかどうかをさらに評価するために、フローサイトメトリー分析を、初発の糖尿病を有する雌NODマウスから回収した膵臓組織で行った(図2)。CD4 + / TCR + およびCD8 + / TCR + T細胞でCXCR3発現を評価した。アイソタイプ対照抗体での染色を影付きの曲線で表す。数匹のマウスから回収されたプールした膵臓組織の単一細胞懸濁液でフローサイトメトリーを行った。データは、NODマウスの膵臓にCXCR3 + 細胞毒性およびヘルパーT細胞が存在することを示す。

#### 【0143】

##### 〔実施例3〕

抗CXCR3抗体でのNODマウスの予防的処置

ハムスター抗マウスCXCR3抗体(クローンCXCR3 - 173、BioLegend、San Diego、CAから購入)、または対照ハムスターIgGもしくはPBS 100 μgで、6週間にわたり週1回、前糖尿病性雌NODマウスを10週齢から開始して処置した。血中グルコースを週2回モニターし、3回連続して250 mg / dLを超える血中グルコース測定値を示した後に、動物を糖尿病とみなして安楽死させた。図3は、各処置群における経時的な糖尿病を発症したマウスのパーセンテージを示す。各ラインは、1グループあたり10匹のマウスからの結果を合わせたものを表す。2つの独立した研究からの結果を示す(図3Aおよび3B)。プロットから、前糖尿病性雌NODマウスにおいて、抗CXCR3抗体での予防的処置により糖尿病の発症が防止されたことが示される。

#### 【0144】

予防的な抗CXCR3抗体投与の作用をさらに評価するために、抗CXCR3抗体で処置した雌NODマウスからの代表的な膵臓の切片を、インスリン(図4、左のパネル)、CD3、およびFoxp3(図4、中心および右のパネル)に関して染色した。図4の右側のパネルは、中心のパネルで示される切片の倍率を高めた画像である。研究期間の最後に(26週齢)マウスから膵臓組織を回収した。図4から、抗CXCR3抗体で処置したNODマウスにはインスリン陽性の膵島が存在するが、T細胞の大半は、膵島の周辺に存在し、膵島に浸潤しなかったことが実証される。

#### 【0145】

##### 〔実施例4〕

NODマウスにおける初発の糖尿病の回復

3回連続して250 mg / dLを超える血中グルコース測定値を示した雌マウスを糖尿

10

20

30

40

50

病とみなし、処置群にランダムに登録した。登録の1週間以内に処置を開始した。マウスを、6週間にわたり週1回、PBS、抗マウスCXCR3抗体（クローンCXCR3-173の100 $\mu$ gを腹腔内投与）または対照IgG（100 $\mu$ gを腹腔内投与）で処置するか、または0および4日目にマウス抗胸腺細胞グロブリン（mATG；500 $\mu$ gを腹腔内投与）で処置した。登録したら、午前と午後に（その間を少なくとも6時間とした）血中グルコースを測定し、血中グルコースが250mg/dLを超えるマウスにのみインスリンを腹腔内注入により投与した。個々のマウスの1日の早朝血液グルコース値を示す（図5）。1回の研究で1グループあたり8~10匹のマウスを用いた4回の独立した回復研究からのデータをプールした。データから、抗CXCR3抗体で処置した後、NODマウスにおいて初発の糖尿病が回復したことが実証される。

10

## 【0146】

抗CXCR3抗体で処置したマウスの膵臓におけるT細胞の部分集合の変化を評価するために、処置群1つあたり（PBS、抗マウスCXCR3、対照IgGまたはmATG処置マウス）4匹のマウスからの膵臓の単細胞懸濁液をプールし、T細胞に関して染色し、フローサイトメトリーによって分析した。PBS、抗マウスCXCR3、または対照IgGの5回目の処置投与から2~3日後に、年齢を適合させたmATG処置マウスから膵臓組織を回収した。図6Aに懸濁液中のCD4+およびCD8+T細胞のパーセンテージを示す。図6Bは、PBS（左）、対照IgG（中央）、および抗マウスCXCR3抗体（右）で処置したマウスからの膵臓中のCD4+T細胞におけるCD44およびCD62Lの発現を示す。ゲート1（G1；CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>）における細胞のパーセンテージは、各処置群（PBSでは67.3%、対照IgGでは67.1%、および抗CXCR3処置では30.4%）ごとに表示される。図6Cは、アイソタイプ対照抗体で染色してリンパ球でゲーティングした細胞と比較した、図6Bで定義したようなゲート1（G1）またはゲート2（G2）におけるCD4+T細胞中のCXCR3発現のプロットである。

20

## 【0147】

抗CXCR3処置で回復したNODマウスにインスリン陽性膵島が存在するかどうかを評価するために、膵臓のパラフィン包埋切片を、対照IgG（左のパネル）、抗マウスCXCR3抗体（中央のパネル）またはマウスATG（右のパネル）で処置した雌NODマウスから調製し、インスリン（上の列）に関して染色するか、またはCD3およびFoxp3（下の列）に関して同時に染色した。図7を参照されたい。研究の終了時に（登録後約100日）マウスから膵臓組織を回収した。染色した切片から、抗CXCR3処置で回復したNODマウスにインスリン陽性膵島が存在すること、さらに、T細胞が膵島の周辺に存在していたが、ほとんど膵島に浸潤しなかったことが実証される。

30

## 【0148】

グルコース刺激への応答を評価するために、グルコース負荷試験を行った（図8）。年齢を適合させた雌非糖尿病NODマウス（図8A）、PBSで処置した糖尿病NODマウス（図8B）、抗マウスCXCR3処置で回復した糖尿病NODマウス（図8C）、およびIgGで処置した糖尿病NODマウス（図8D）を一晩絶食させ、グルコースを腹腔内注入することにより刺激した。刺激前（0時間）に、さらに刺激後に指示された時間で血中グルコースを測定した。処置群1つあたり4~5匹のマウスからの代表的なデータを示す。データから、抗CXCR3抗体処置により、登録後100日で空腹時の耐糖能が改良されたことが図示される。

40

## 【0149】

## 〔実施例5〕

## T細胞の養子免疫伝達

抗CXCR3抗体（クローンCXCR3-173）で処置した疾患の寛解を示すNODマウスからのT細胞の、レシピエント動物において糖尿病を誘導する能力を評価するために、単離したCD4+およびCD8+T細胞を、レシピエントNOD.scid（非肥満糖尿病-重症複合免疫不全）マウスに静脈注入により養子免疫伝達した。図9は、PBS

50

もしくは対照 I g G で処置した糖尿病マウス、またはマウス A T G もしくは抗マウス C X C R 3 抗体での処置後に疾患が寛解しているマウスから単離した C D 4 + および C D 8 + T 細胞を養子免疫伝達した後の、経時的な非糖尿病マウスのパーセンテージを示す。異なる処置群の雌 N O D マウスから登録から 8 0 ~ 9 0 日後に回収した脾臓、脾リンパ節、および鼠径リンパ節から、C D 4 + および C D 8 + T 細胞を単離した。C D 4 + および C D 8 + T 細胞をプールし、合計で 8 0 0 万個の細胞を N O D . S c i d レシピエントに養子免疫伝達し、糖尿病発症を週 2 回の血中グルコース測定によりモニターした。図 9 中の各ラインは、1 グループあたり 5 匹のマウスからのデータを合わせたものを表す。2 つの代表的な研究を示す ( 図 9 A および 9 B ) 。抗 C X C R 3 抗体で処置したマウスから単離した T 細胞は、疾患の伝達の遅延を示す。

10

## 【 0 1 5 0 】

単離したドナー T 細胞をさらに特徴付けた。図 1 0 A は、以前の段落で説明したような P B S 、抗マウス C X C R 3 抗体、対照 I g G 、またはマウス A T G で処置したマウスから単離したドナー T 細胞における C D 4 + および C D 8 + T 細胞 ( 左のパネル ) の総計のパーセンテージを示す。図 1 0 A の右のパネルは、C D 4 4 および C D 6 2 L の発現で定義されるような、各ドナー細胞懸濁液ごとに C D 4 + ( 上のパネル ) および C D 8 + ( 下のパネル ) にあたる T 細胞の部分集合におけるエフェクターおよびセントラルメモリー T 細胞のパーセンテージを示す。単離した C D 4 + および C D 8 + T 細胞のプールを、伝達前に C D 4 4 および C D 6 2 L 発現に関して染色し、フローサイトメーターに捕捉し、分析した。また単離したドナー T 細胞のプールにおける制御性 T 細胞のパーセンテージも評価した。図 1 0 B は、C D 4 および C D 2 5 発現で、または C D 4 、 C D 2 5 、 および細胞内 F o x p 3 発現で定義される、各処置群における制御性 T 細胞のパーセンテージを示す。図 1 0 C は、C X C R 3 も発現するドナー細胞における C D 8 + ( 左のパネル ) および C D 4 + ( 右のパネル ) T 細胞のパーセンテージを示す。データから、抗 C X C R 3 抗体処置で回復したマウスからのドナー細胞における C X C R 3 + T 細胞のパーセンテージが減少したことが実証される。

20

## 【 0 1 5 1 】

1 型糖尿病の R I P - O V A モデルを使用して、O T - 1 C D 8 + ドナー T 細胞を養子免疫伝達した後の C X C R 3 処置の有効性を評価した。R I P - O V A マウスは、ラットインスリンプロモーター ( R I P ) によって稼働するオボアルブミンタンパク質 ( O V A ) をコードする導入遺伝子がマウスゲノムに導入され、その結果、脾臓細胞においてオボアルブミンの膜形態の発現が起こるトランスジェニックマウスである。マウスのバックグラウンド株は、C 5 7 B L / 6 であり、R I P - O V A マウスは自発的に糖尿病を発症しない。R I P - O V A マウス、またいわゆる C 5 7 B L / 6 - T g ( I n s 2 - T F R C / O V A ) 2 9 6 W e h i / W e h i J を J a c k s o n L a b o r a t o r y から購入した。J a c k s o n L a b o r a t o r y から購入した O T - 1 T C R ( T 細胞受容体 ) トランスジェニックマウスからのオボアルブミン特異的 C D 8 + T 細胞を養子免疫伝達させた後のマウスにおいて、糖尿病が発症した ( K u r t s ら、J E x p M e d 1 8 4 : 9 2 3 ~ 9 3 0 ) 。O T - 1 マウスは、マウス T C R a - V 2 および T C R b - V 5 遺伝子に関するトランスジェニックインサートを含有する ( H o g q u i s t ら、C e l l 7 6 : 1 7 ~ 2 7 ) 。トランスジェニック T C R は、M H C I H 2 K <sup>b</sup> タンパク質と関連してオボアルブミン残基を認識する。O T - 1 マウスにおいて 9 5 % より多くの C D 8 + T 細胞は、トランスジェニック T C R を発現し、オボアルブミンペプチドを認識し、それにより活性化される。

30

40

## 【 0 1 5 2 】

図 1 1 は、O T - 1 C D 8 + T 細胞を R I P - O V A レシピエントマウスに養子免疫伝達し、次いで、未処置のままの、抗マウス C X C R 3 抗体で処置した、または対照 I g G で処置した非糖尿病マウスの、経時的なパーセンテージを示す。養子免疫伝達後、処置 ( 腹腔内に 1 0 0 μ g ) を 1 日 ( 研究 1 および研究 2 ) または 7 日 ( 研究 2 ) 続け、さらに処置を 3 週間にわたり週 2 回行った。各ラインは、1 グループあたり 5 匹のマウスから

50

のデータを合わせたものを表す。図 1 1 A および 1 1 B に 2 つの研究からの結果を示す。データから、R I P - O V A モデルにおいて、抗 C X C R 3 抗体処置は、マウスの糖尿病発症を防いだことが実証される。

#### 【 0 1 5 3 】

図 1 2 は、R I P - O V A レシピエントマウスに O T - 1 T 細胞を養子免疫伝達した後の様々な処置の有効性を特徴付けるさらなるデータを示す。図 1 2 A は、R I P - O V A レシピエントへの養子免疫伝達前の、フローサイトメトリーによって分析したドナー T 細胞における C X C R 3 発現を示す。アイソタイプ対照抗体での染色を影付きの曲線で表す。図 1 2 B は、指示された時間における、O T - 1 T 細胞を抗マウス C X C R 3 抗体または対照 I g G で処置した R I P - O V A レシピエントマウスに養子免疫伝達した後の、血液、脾臓、および腓リンパ節 ( p L N ) 中のドナー細胞のパーセンテージを示す。抗体処置 ( 腹腔内に 1 0 0 μ g ) を T 細胞の移入後 1 日目に開始し、処置を 2 週間にわたり週 2 回行った。各ドットは、1 匹の別個のマウスからのデータを表す。図 1 2 C は、養子免疫伝達後の指定された時間における、抗マウス C X C R 3 抗体または対照 I g G で処置した R I P - O V A レシピエントマウスにおける自己抗原 ( O V A ) 刺激に应答して増殖する血液、脾臓、および腓リンパ節 ( p L N ) 中のドナー細胞の数を表示する。O T - 1 T 細胞の移入後 1 日目に抗体処置 ( 腹腔内に 1 0 0 μ g ) を開始し、処置を 2 週間にわたり週 2 回行った。各ドットは、1 匹の別個のマウスからのデータを表す。図 1 2 D は、O T - 1 T 細胞を抗マウス C X C R 3 抗体または対照 I g G で処置した R I P - O V A レシピエントマウスに養子免疫伝達した後の指定された時間における、血液、脾臓、および腓リンパ節 ( p L N ) 中の C X C R 3 を発現するドナー細胞のパーセンテージを示す。O T - 1 T 細胞の移入後に抗体処置 ( 腹腔内に 1 0 0 μ g ) を 1 日続け、処置を 2 週間にわたり週 2 回行った。各ドットは、1 匹の別個のマウスからのデータを表す。抗 C X C R 3 抗体での処置により、R I P - O V A マウスにおける C X C R 3 + T 細胞のパーセンテージが減少した。

#### 【 0 1 5 4 】

図 1 3 は、処置せずに、インスリン ( 図 1 3 A ) もしくは C D 3 ( 図 1 3 B ) に関して染色した、または抗マウス C X C R 3 抗体で処置し、インスリン ( 図 1 3 C ) もしくは C D 3 ( 図 1 3 D ) に関して染色した R I P - O V A レシピエントマウスからの代表的なパラフィン包埋腓臓切片を示す。O T - 1 T 細胞の移入後 1 日目に抗 C X C R 3 処置 ( 腹腔内に 1 0 0 μ g ) を開始し、処置を 3 週間にわたり週 2 回行った。研究の終了時に ( T 細胞移入後約 6 0 日 ) 腓臓組織を回収した。切片は、抗マウス C X C R 3 抗体で処置した R I P - O V A マウスにおいて T 細胞の浸潤がないことを示す。

#### 【 0 1 5 5 】

##### 〔 実施例 6 〕

#### 抗ヒト C X C R 3 抗体クローンの評価

上記の材料および方法の章 ( 実施例 1 ) で述べた方法を使用して、抗ヒト C X C R 3 抗体クローン C 1 4、1 2、5 3、8 2、および 1 3 5 を、C X C R 3 走化性、およびカルシウム動員に対するそれらの作用に関して評価した。走化性アッセイに関して、ヒト C X C R 3 でトランスフェクションした 3 0 0 . 1 9 細胞を、走化性アッセイに添加する前に、培地単独で、または図 1 4 A ~ C での表示通りの様々な濃度の抗体を含む培地で前もってインキュベートした。図 1 4 A ~ C は、C X C L 1 1 への C X C R 3 介在走化性は、クローン C 1 4、1 2、5 3、8 2、および 1 3 5 によって阻害されることを示す。図 1 4 におけるクローン 2 は、クローン 4 と同一である。

#### 【 0 1 5 6 】

カルシウム流出アッセイに関して、上記の材料および方法の章 ( 実施例 1 ) で述べた方法に従って、ヒト C X C R 3 でトランスフェクションした H E K 細胞を、F L I P R に添加する前に、様々な抗体の濃度で前もってインキュベートした。図 1 4 0 に、各抗体についてカルシウム動員を 5 0 % 阻害するのに必要な抗体の濃度を示す。図 1 4 D は、C X C L 1 1 への C X C R 3 介在カルシウム動員は、クローン C 1 4、1 2、5 3、および 1 3

5によって阻害されることを示す。

【0157】

走化性に対するクローン4、12、53、82、および135の作用をさらに査定するために、hCXCR3でトランスフェクションした300.19細胞を培地単独で、または50 μg/ml抗体を含む培地で前もってインキュベートし、その後走化性アッセイに加えて、CXCL9(図15A)、CXCL10(図15B)、およびCXCL11(図15C)の移動を査定した。データから、クローン4、12、53、82、および135は、CXCL10およびCXCL11への移動を阻害し、部分的にCXCL9への移動を阻害することが実証される。

【0158】

クローン4、12、53、82、および135の特異性を評価するために、他のケモカイン受容体への結合に関して抗体をアッセイした。300.19細胞をヒトCXCR1、CXCR5、CXCR2、CXCR4またはCCR5でトランスフェクションし、抗ヒトCXCR3抗体クローンとインキュベートし、続いて二次抗体で染色し、フローサイトメトリーで処理することによって抗体結合を分析した。二次抗体単独の投与を陰性対照として利用した。ヒトCXCR3でトランスフェクションした300.19細胞を、クローンによる染色のための陽性対照として利用した。図16は、異なるケモカイン受容体を発現する細胞に対する抗体結合のヒストグラムプロットを示し、これから、クローン4、12、53、82、および135は他のケモカイン受容体と結合せず、CXCR3に特異的であることが実証される。

【0159】

ケモカイン受容体結合アッセイには、標準的なフローサイトメトリーの手法を採用した。簡単に言えば、細胞株をバーセン処置により回収し、各細胞株を7つのサンプルに分けた。各サンプルを氷上で1種の一次抗体(5 μg/ml)と共にインキュベートし、続いてFITCコンジュゲート二次抗体で染色して、結合した一次抗体を検出した。陰性対照として、細胞を(一次抗体とのインキュベートを行わずに)二次抗体単独で染色した。一次抗体は、抗ヒトCXCR3抗体クローンまたは抗ヒトCXCR3対照抗体クローン1C6であった。染色後、細胞をフローサイトメーターに捕捉し、Flow Joソフトウェアを使用してデータを分析した。図16中の各ラインは、1種の一次抗体と二次抗体とで染色した、または二次抗体単独で染色した細胞の個々のサンプルを表す。

【0160】

上述した方法(実施例1)に従ってBiacoreアッセイを使用して、クローン4、12、53、82、および135の親和性(Ka)および解離速度(Kd)を分析した。以下の表4に結果を要約する。

【0161】

【表5】

クローン番号	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
4	108539.245	0.000348	3.2076E-09
53	79557.574	0.000581	7.3085E-09
12	183854.704	0.001473	8.01056E-09
82	195114.396	0.001828	9.36793E-09
135	88939.340	0.001214	1.36548E-08

表4

【0162】

〔実施例7〕

エピトープマッピング

CXCR3のN末端細胞外ドメインからの、トランケーションされた、ビオチン化したヒトCXCR3ペプチド(16アミノ酸のN末端フラグメント)を使用して、クローン4

10

20

30

50

、12、53、82、および135に関するエピトープを決定した。一連のアラニン置換フラグメントを作製し（以下の表5の、太字で示したアラニン置換を参照）、ビオチン化した。エピトープマッピングをOctet（登録商標）（ForteBio、Menlo Park, CA）およびBiacore（商標）（GE Healthcare）分析で評価した。

【0163】

Octet分析のために、ペプチドを80% DMSOに再懸濁し、PBSで10 μg/mlに希釈した。抗体クローン4、12、53、82、135、および市販のクローン1C6（BD Biosciences）を、PBSで120 nMに希釈した。Octet QKシステム（ForteBio）で300 μl/ウェルを備えた96-ウェルプレートのフォーマットにおいて動態アッセイを行った。各アッセイプレートには、陽性対照としてN末端がビオチン化された全長WT hCXCR3 ECDペプチド（Abgent）、加えて参照差分のためにPBS緩衝液ブランクが含まれていた。Octetのストレプトアビジンバイオセンサー（ForteBio）を、アッセイを行う前に少なくとも5分、PBSに前もって浸漬した。まずベースラインを得るためにバイオセンサーを振盪しないでPBSに5分浸した。全ての残りの工程では、振盪速度は1000 rpmであった。ペプチド溶液にバイオセンサーを5分漬けて、ペプチドを負荷した。PBS中で5分の別のベースライン工程を行った。次いで抗体溶液にバイオセンサーを10分漬けて、結合を測定した。最後に、解離させるためにバイオセンサーを15分かけてPBSに移した。Octetデータアナリシスv7.0を使用してセンサーグラムを分析した。結合活性を、WT全長hCXCR3ペプチドと比較した、各抗体の最大応答レベルのパーセンテージとして示した。

【0164】

エピトープヒートマップに相対的な応答レベルを記録した。野生型hCXCR3 ECDペプチドに対する最大のセンサーグラム応答は、4~8 nmの範囲であった。スクリーニングされた各クローンは、独特なエピトープを有していた。試験された突然変異体のうち、クローン1C6の結合が完全に破壊されたものはなかった。10位のバリン残基および13位のアスパラギン酸は、スクリーニングされた全ての抗体の結合において役割を果たしていた。抗体12および1C6は、最もN末端側にエピトープを有しており、5位のバリン突然変異は両方の活性に影響を与えた。抗体82は、最もC末端側にエピトープを有しており、結合活性の低下は9位のグルタミンから始まっていた。これらのデータに基づいて、CXCR3配列におけるアミノ酸のエピトープの境界は、各抗体で以下の通りである；C14：アミノ酸7~13；C112：アミノ酸5~13；C153：アミノ酸7~13；C182：アミノ酸9~15；C1135：アミノ酸7~13；およびクローン1C6：アミノ酸5~13。

【0165】

Biacore分析のために、ペプチドを、HBS-EP+ランニング緩衝液（10 mMのHEPES、150 mMのNaCl、3 mMのEDTA、0.005%ポリソルベート20）で10 ng/mlに希釈した。Biacore T100（商標）を使用して、フローセルごとに20反応単位（RU）の安定な捕捉が達成されるまで、CM5-SA（GE番号BR-1005-31）チップの上にペプチドを5 μl/分の速度で注入した。各チップにおいて、フローセル1は参照差分のためにブランクのままにした。陽性対照として、各チップの1つのフローセルに野生型37AA hCXCR3ペプチドを入れた。マウス抗hCXCR3抗体4、12、53、82、および135を、HBS-EP+で50、25、12.5、6.25、および3.125 nMに希釈した。各サイクルで、抗体を50 μl/分の流速で3分注入し、結合を測定し、続いて緩衝液を50 μl/分で3分注入し、解離を測定した。サイクル間で、10 mMのグリシン-HCl、pH 2.0を50 μl/分で60秒使用してペプチド表面を再生した。センサーグラムを、1:1の結合モデルにフィッティングし、BiaEvaluation v2.0.1で二重参照差分を使用して分析し、ストレプトアビジンバイオセンサーに捕捉した。典型的な応答レベル

は、0～500RUの範囲であり、「強い」、「中程度の」、および「弱い」結合応答のカットオフを決定した。相対的な応答レベルを記録して、エピトープマップを作製した。解離速度を分類して、迅速なKd値(0.001s<sup>-1</sup>より高い)を示したペプチドも記録した。

【0166】

【表6】

表5

配列番号	配列	配列番号	配列
83	AVLEVSDHQVLNDAEV	91	MVLEVSDHAVLNDAEV
84	MALEVSDHQVLNDAEV	92	MVLEVSDHQALNDAEV
85	MVAEVSDHQVLNDAEV	93	MVLEVSDHQVANDAEV
86	MVLAVSDHQVLNDAEV	94	MVLEVSDHQVLADAEV
87	MVLEASDHQVLNDAEV	95	MVLEVSDHQVLNAAEV
88	MVLEVADHQVLNDAEV	96	MVLEVSDHQVLNDAEV (野生型)
89	MVLEVSAHQVLNDAEV	97	MVLEVSDHQVLNDAEV
90	MVLEVSDAQVLNDAEV	98	MVLEVSDHQVLNDAEA

【0167】

全ての抗体が、野生型hCXCR3に結合し、hCXCR3配列の最初の16AA内であった。表6にクローン4、12、53、82、および135に関する結合データを示し、図18に各抗体クローンに関する結合活性に必要な最小限のエピトープの境界を示す対応するマップを示し、重要な残基はXでマークした。全ての抗体エピトープがヒトCXCR3配列の残基6～15内にマッピングされ、この領域は、CXCL10およびCXCL11結合に関与していた。CXCR3ペプチドフラグメント中の所与の位置でのアラニン置換後の結合応答の低下を検出することによって、エピトープ内のアミノ酸を決定した。クローン53および135が、最も類似したエピトープを有していた。クローン4および12が、最もN末端側にエピトープを有していた(結合強度への影響は、5位のバリンから始まっていた)。クローン82は、最もC末端側にエピトープを有しており、結合活性の低下は、9位のグルタミンから始まっていた。82を除く全てのクローンにとってCXCR3中の7位のアスパラギン酸が必要である。CXCR3中の10位のバリンおよび13位のアスパラギン酸はいずれも、全てのクローンの結合において役割を果たす。5つのクローンのマウス、キメラ、およびヒト化バージョンの間でエピトープの差はなかった。

【0168】

## 【表 7】

表 6 (配列番号 99~114、それぞれ記載順)

配列	α-hCXCR3 mAb クローン				
	4	12	53	82	135
ビオチン-AVLEVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
ビオチン-MALEVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
ビオチン-MVAEVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
ビオチン-MVLAVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
ビオチン-MVLEASDHQVLNDAEV	+++ *	+++ *	+++	+++	+++
ビオチン-MVLEVADHQVLNDAEV	+++	+	+++	+++	+++
ビオチン-MVLEVSAHQVLNDAEV	-	+	+	+++	+
ビオチン-MVLEVSDAQVLNDAEV	+++ *	+	+++	+++	+++ *
ビオチン-MVLEVSDHAVLNDAEV	+++	+++	+++	+++ *	+++
ビオチン-MVLEVSDHQALNDAEV	-	++ *	+ *	++ *	+ *
ビオチン-MVLEVSDHQVANDAEV	+ *	+++	+++	+++	++
ビオチン-MVLEVSDHQVLADAEV	+ *	+++	+++	-	++ *
ビオチン-MVLEVSDHQVLNAAEV	-	++	-	-	-
ビオチン-MVLEVSDHQVLNDAEV	+++	+++	+++	+++	+++
ビオチン-MVLEVSDHQVLNDAEV	+++ *	+++	+++	++ *	+++ *
ビオチン-MVLEVSDHQVLNDAEA	+++	+++	+++	+++	+++

## 【 0 1 6 9 】

符号

+++ 強い結合応答 (300RU超)

++ 中程度の結合応答 (150~300RU)

+ 弱い結合応答 (10~150RU)

- 結合なし (10RU未満)

\* 比較的強い結合応答 (10RU超) にもかかわらず迅速な解離速度 ( $K_d > 0.001$ )。

## 【 0 1 7 0 】

〔実施例 8〕

抗ヒトCXCR3クローンのヒト化

4つの変異体(キメラ、ヒト化1(Hu1)、Hu2、およびHu3)を、5つの抗CXCR3クローン(クローン4、12、53、82、および135)のそれぞれについて作製した。20. *in vivo*での動物モデル研究のために、全てのキメラ変異体を「プール発現」によって産生した。懸濁培養に適合させたCHO-DXB11細胞(Ur1aubおよびChasin, Proc. Natl. Acad. Sci., 77:4216~20(1980))を、キメラCXCR3抗体クローン4、12、53、82、および135からの重鎖および軽鎖を含有する発現ベクターでエレクトロポレーションした。またこれらの発現ベクターは、安定なCHO形質転換体を選択するためのジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子も含有する。100nMメトトレキサートで選択した後、安定してトランスフェクションされたCHOプールを使用して、OptiCHO培地を含む振盪フラスコ中で行われた生物学的産生を完了させた。組換えキメラ抗体を、標準的なプロテインAクロマトグラフィーを使用して調整培地から精製した。Hu1クローンをヒトフレームワーク領域にCDRグラフト化し、完全にヒト化し、マウスCDRのアミノ酸とあらゆるバーニヤ位置残基を排除した。Hu2クローンは、マウスCDRの4つのアミノ酸内に位置する残基においてHu1配列からの復帰突然変異による変化を含む「拡張されたCDR」クローンであった。Hu3クローンは、IMGTベースのモデリングを使用してマウスとヒトとで「まったく異なっている」と同定された位置にHu2配列からのさらなる復帰突然変異を包含していた。合計20種の変異体をCHO-NRC細胞で一時的に発現させ、i

30

40

50

*in vitro*でのアッセイのために精製した。

【0171】

クローン4および53に追加のヒト化を行った。包含された重鎖4.7~4.11はさらに、CDRの外側にヒト化された復帰突然変異を包含し、加えてクローンの安定性を改善する目的で、VHのCDR2における58位および59位（IMGTによる番号付け）における脱アミド部位が除去されるような改変を包含していた。特に、VH4.2における脱アミド部位を多数の代替残基で置き換えた。クローンVH53.4~53.6およびVL53.4~53.9はさらに、特に鎖をVH4.1およびVL4.1により類似させる目的で、CDRの外側にヒト化された復帰突然変異を包含していた。

【0172】

〔実施例9〕

全体の受容体結合の動態

無傷のCXCR3ペプチドと共にOctet（登録商標）およびBiacore（商標）を使用して20種の抗CXCR3変異体の結合動態を評価した。Octet分析を上述したようにして行った。Biacore分析のために、3つのカラム工程で精製したヒト野生型CXCR3ペプチドのC末端をHisおよびHPC4でタグ付けし、ニッケルキレート化およびアミンカップリングを介してNTAチップ上に捕捉した。より優れたデータ品質のために、さらに2価の結合の作用を最小化するために、中程度のRU（およそ1200RU）のチップを使用した。0~80nMの抗体サンプルを受容体の上に注入した。より優れたカーブフィッティングのための局所的なRmaxフィットを利用したセンサーグラムプロットを使用して標準的なBiacore（商標）評価分析を行った。5種のクローン（4、12、53、82、および135）ごとに4つの変異体（キメラ（Ch）およびヒト化（Hu）1~3）の結合曲線を評価した。比較目的で、ヒトCXCR3リガンドCXCL9、CXCL10、およびCXCL11、ならびにマウスCXCL11（mCXCL11）の結合動態も評価した。以下の表7A（KDで分類）および7B（Kdで分類）に結果を示す。表ではKDおよびKdで上位4つの変異体が強調表示される。ヒト化抗hCXCR3mAb変異体が解離速度（Kd）で分類した場合、変異体の多くが、最も効力のあるヒトCXCR3リガンドのhCXCL11よりも少なくとも1桁遅い解離速度を示した。

【0173】

10

20

30

【表 8】

表 7A

サンプル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
4Hu2	1.59E+05	8.18E-05	5.16E-10
4Ch	2.09E+05	1.15E-04	5.42E-10
4Hu3	1.54E+05	8.62E-05	4.50E-10
4Hu1(低いRU)	2.24E+05	1.40E-04	6.34E-10
mCXCL11	3.69E+06	4.26E-03	1.17E-09
82Hu3	3.40E+05	4.82E-04	1.42E-09
53Ch	4.44E+04	7.07E-05	1.65E-09
CXCL11	2.58E+06	4.41E-03	1.72E-09
53Hu3	6.88E+04	1.13E-04	1.72E-09
82Hu2	8.67E+04	2.62E-04	3.02E-09
12Ch	9.66E+04	4.52E-04	5.00E-09
135Hu3	6.68E+04	3.35E-04	5.01E-09
82Ch	1.61E+05	8.92E-04	5.54E-09
53Hu2	3.05E+04	2.04E-04	5.70E-09
135Ch	5.52E+04	3.82E-04	6.93E-08
CXCL10	1.36E+05	1.27E-03	6.76E-08
12Hu3	6.60E+04	1.02E-03	1.56E-08
12Hu2	6.39E+04	1.02E-03	1.60E-08
CXCL9	低いデータ品質		
135Hu2	結合なし		
12Hu1			
53Hu1			
82Hu1			
135Hu1			

【 0 1 7 4 】

【表 9】

サンプル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
53Ch	4.44E+04	7.07E-05	1.60E-09
4Hu2	1.59E+05	8.18E-05	5.15E-10
4Hu3	1.54E+05	8.62E-05	5.60E-10
53Hu3	6.88E+04	1.19E-04	1.72E-09
4Ch	2.09E+05	1.15E-04	5.48E-10
4Hu1(低いRU)	2.24E+05	1.49E-04	6.34E-10
53Hu2	3.05E+04	2.04E-04	6.70E-09
82Hu2	8.67E+04	2.62E-04	3.02E-09
135Hu3	6.68E+04	3.35E-04	5.01E-09
135Ch	5.52E+04	3.62E-04	6.93E-09
12Ch	9.66E+04	4.52E-04	5.00E-09
82Hu3	3.40E+05	4.82E-04	1.42E-09
82Ch	1.61E+05	8.92E-04	5.54E-09
12Hu2	6.39E+04	1.02E-03	1.60E-08
12Hu3	6.60E+04	1.02E-03	1.56E-08
CXCL10	1.36E+05	1.27E-03	9.76E-09
mCXCL11	3.69E+06	4.26E-03	1.17E-09
CXCL11	2.58E+06	4.41E-03	1.72E-09
CXCL9	低いデータ品質		
135Hu2	結合なし		
12Hu1			
53Hu1			
82Hu1			
135Hu1			

表 7B

## 【0175】

表 7 A で示されたように、KD で上位 4 つの変異体は、キメラクローン 4 (速い結合速度、遅い解離速度)、Hu 3 クローン 4 (速い結合速度、遅い解離速度)、Hu 3 クローン 8 2 (速い結合速度、平均の解離速度)、およびキメラクローン 5 3 (平均の結合速度、遅い解離速度) である。

30

## 【0176】

CXCR 3 を発現する細胞で抗体結合をさらに評価した。ヒト CXCR 3 でトランスフェクションした 300.19 細胞を、精製したヒト化抗 hCXCR 3 抗体変異体 Hu 1、Hu 2、Hu 3、およびキメラ抗体と接触させた。図 19 において、クローン 4、12、53、82、および 135 のそれぞれに関して、5 µg/ml (黒のライン)、0.5 µg/ml (暗い灰色のライン)、または 0.1 µg/ml (黒の点線) または 5 µg/ml の二次抗体単独 (塗り潰された灰色のヒストグラム) で示した。細胞を非標識抗体クローンで氷上で 30 分染色し、続いて PBS - 1% FBS で 2 回洗浄し、FITC コンジュゲート抗ヒト IgG 1 特異的二次抗体を使用して、暗所で氷上で 30 分インキュベートすることにより結合した抗体を検出した。サンプルを 2 回洗浄し、2% パラホルムアルデヒド PBS 溶液中で固定し、暗所で 4 日で保存し、フローサイトメーターに捕捉させた。図 19 に生存可能な細胞にゲーティングした CXCR 3 のヒストグラムの陽性を示す。

40

## 【0177】

## 〔実施例 10〕

## 抗体 1C6 との比較

抗 hCXCR 3 mAb クローン 1C6 (Becton, Dickinson、カタログ番号 557183、同じクローンが米国特許第 6,184,358 号で報告されている) を、Biacore の全受容体アッセイ方法を使用してマウス抗 hCXCR 3 mAb クロ

50

ーン4、ならびにそのヒト化変異体Hu2およびHu3と比較した。クローン4は、約2倍より優れた親和性(KD)を示した。ヒト化変異体は、さらに改善された親和性(Hu2およびHu3変異体の両方でおよそ4倍より優れた親和性)を示した。表8に、クローン1C6およびクローン4、ならびにそのヒト化変異体Hu2およびHu3に関する結合動態および親和性を列挙した。

【0178】

【表10】

サンプル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1C6-ハイブリドマ	4.11E+04	1.42E-04	3.51E-09
4-ハイブリドマ	1.18E+05	2.22E-04	1.88E-09
4Hu3	1.54E+05	8.62E-05	5.60E-10
4Hu2	1.59E+05	8.18E-05	5.15E-10

表8

【0179】

〔実施例11〕

機能性アッセイ

20種の変異体抗体の機能的な作用を評価した。これらの抗体を、CXCL9、CXCL10、およびCXCL11に応答する細胞走化性、およびカルシウム動員の阻害に対するそれらの作用に関して、FLIPR(登録商標)カルシウムアッセイにより評価した。

【0180】

ヒトCXCR3でトランスフェクションした300,199細胞の、CXCR3リガンドのCXCL9、CXCL10、およびCXCL11に対する走化性を、10μg/mlの、クローン4、12、53、82、および135のヒト化抗ヒトCXCR3抗体変異体の存在または非存在下で評価した。トランスフェクションされた細胞を、10μg/mlのヒト化抗ヒトCXCR3抗体変異体または市販の抗体1C6で37°Cで20分前処置した。抗体を含む細胞を5マイクロンのトランスウェルに移し、それぞれ100または300ng/mlの組換えマウスのCXCL10およびCXCL11またはCXCL9を含有する受け取りウェルにインサートを入れた。走化性プレートを、37°Cで、5%CO<sub>2</sub>で4時間インキュベートした。トランスウェルインサートを除去し、受け取りウェルに移動した細胞をU字型底の96ウェルプレートに移し、ペレット化し、カルセインAM色素に再懸濁した。細胞を37°Cで30分、5%CO<sub>2</sub>中でインキュベートし、1回洗浄し、黒色のクリアプレートに移し、即座にFlexStationで490/520nmで読み取った。データは、走化性のパーセント阻害として示される。図20は、5つのクローンそれぞれに関する異なる変異体の、CXCL9、CXCL10、およびCXCL11に対する走化性を阻害する能力を示す代表的なデータを示す。

【0181】

細胞内カルシウム動員の阻害を評価するために、様々な濃度の抗CXCR3抗体変異体または陽性対照抗体1C6の存在または非存在下で、CXCL10に反応する、ヒトCXCR3-Gqi4qi4でトランスフェクションしたCHO細胞におけるカルシウムフローを測定した。384-ブラックプレート中に細胞を播き(12,000/ウェル)、そのまま一晩附着させた。次の日、細胞に、カルシウム感受性色素のFluo-4NW色素を40分で投入し、その後、抗体を添加し37°Cでインキュベートした。抗体を添加し、20分インキュベートし、その後、CXCR3リガンドの組換えヒトCXCL10を、以前に決定されたCXCL10のEC<sub>50</sub>濃度で添加した。色素の添加は手作業で電動マルチチャンネルピペットを使用して行ったが、抗体およびアゴニスト添加はFLIPR Tetra(登録商標)で自動的になされ、CXCL10添加後すぐに、プレートを470~495nmで読取った。サンプルを二連で処理し、各抗体濃度における平均パーセント

阻害（±標準偏差）をグラフ化した。クローン4Hu1は、カルシウム動員を阻害しなかったことから、これらの実験で陰性対照として使用した。図21は、5つのクローンそれぞれの異なる変異体のカルシウム動員を阻害する能力を示しており、それらを市販のクローン1C6と比較している。以下の表9に、カルシウム動員アッセイにおけるCXCRL10に対する抗体の代表的なIC50値（M）を示す。

【0182】

【表11】

	クローン4	クローン12	クローン53	クローン82	クローン135	1C6
Hu1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-
Hu2	N/A	1.038E-06	1.675E-06	1.772E-06	N/A	-
Hu3	1.146E-06	8.636E-07	1.261E-06	1.169E-06	1.499E-06	-
キメラ	9.352E-07	1.204E-06	1.87E-06	6.778E-07	1.891E-06	3.135E-06*

表9

【0183】

表9中の（\*）は、1C6抗体はキメラ抗体ではないが、ヒトCXCRL3に対する完全マウスIgG1抗体であることを示す。

【0184】

表10で示されるように、結合反応動態のデータ（実施例9を参照）は、機能性アッセイの結果とよく関連している。結合反応動態データおよび機能性アッセイの結果に基づいて、さらなる評価および4Dヒト化のためにクローン4および53を選択した。

【0185】

【表 1 2】

表 1 0

陰影のコード	最良のエピトープのグループ	平均	不十分	Octet のペプチド結合				Biacore の全受容体結合				in Vitro アッセイ				
				応答	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	プロロー	ケモカイン CXCL11	ケモカイン CXCL9	主要な CXCL10	FLIPR			
														KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
4 キメラ	2	7.1859	6.57E-11	2.09E+05	1.15E-04	5.48E-10										
4 Hu1	2	3.5309	1.52E-08	2.24E+05	1.40E-04	6.34E-10										
4 Hu2	2	6.7746	3.78E-11	1.59E+05	1.70E-03	1.07E-08										
4 Hu3	2	6.8723	4.08E-11	2.28E+05	1.47E-04	6.49E-10										
12 キメラ	1	6.4400	<1.0E-12	9.68E+04	4.52E-04	5.00E-09										
12 Hu1	1	4.6044	9.54E-09	結合なし	結合なし											
12 Hu2	1	6.9715	3.44E-10	6.39E+04	1.02E-03	1.60E-08										
12 Hu3	1	7.0274	<1.0E-12	6.60E+04	1.02E-03	1.58E-08										
53 キメラ	3	6.1886	<1.0E-12	4.44E+04	7.07E-05	1.60E-09										
53 Hu1	3	2.0452	5.27E-08	結合なし	結合なし											
53 Hu2	3	6.0166	2.99E-11	3.05E+04	2.04E-04	6.70E-09										
53 Hu3	3	6.920	1.43E-11	6.88E+04	1.13E-04	1.72E-09										
82 キメラ	4	6.6554	<1.0E-12	1.61E+05	8.92E-04	5.54E-09										
82 Hu1	4	2.2013	3.81E-09	結合なし	結合なし											
82 Hu2	4	6.225	4.89E-12	8.67E+04	2.62E-04	3.02E-09										
82 Hu3	4	8.1277	5.07E-12	3.40E+05	4.82E-04	1.42E-09										
135 キメラ	3	7.0143	<1.0E-12	5.52E+04	3.82E-04	6.93E-09										
135 Hu1	3	0.0289	5.74E-05	結合なし	結合なし											
135 Hu2	3	0.9256	4.00E-08	結合なし	結合なし											
135 Hu3	3	7.1572	2.42E-11	6.68E+04	3.35E-04	5.01E-09										

【 0 1 8 6 】

〔 実施例 1 2 〕

4 D ヒト化

抗 hCXCR3 抗体クローンの 4 D ヒト化は、WO 2 0 0 9 / 0 3 2 6 6 1 ( 例 えば、段落 [ 0 0 3 7 ] ~ [ 0 0 4 4 ] ) で説明されているようになされる。簡単に言えば、4

Dヒト化は：a) ヒト化しようとする可変ドメインの3-Dモデルを構築すること；b) 可変ドメインの3-Dモデルの分子動力学シミュレーションを使用して、そのドメイン中のフレキシブルな残基を同定すること；c) 3-Dモデルの分子動力学の軌道を、49種のヒト生殖細胞系の分子動力学軌道と比較することにより、最も近いヒト生殖細胞系を同定すること（従来のヒト化で行われるような抗体配列の比較ではなく）；およびd) CDRの一部ではないフレキシブルな残基を、（工程cで同定された）それらのヒト生殖細胞系の対応物に突然変異させることを含む。この方法を使用して重鎖4.4~4.6および軽鎖4.4~4.7を設計した。特に、最初の4Dヒト化コンストラクト（VH4.4およびVL4.4）を設計し、次いで重鎖および軽鎖へのさらなる改変を設計して（VH4.5~4.6およびVL4.5~4.7）、安定化および抗凝集性突然変異を導入し、他の不要なモチーフを除去した。また類似の方法を使用して、4Dヒト化コンストラクトVH53.7~53.10およびVL53.10~53.13も設計した。

10

## 【0187】

表11に、ヒト化および4Dヒト化鎖（VH = 重鎖；VK = 軽鎖）を包含するクローン4、12、53、82、および135の重鎖および軽鎖変異体を調製するのに使用されるヒト化法（さらに適用される場合は、追加の改変）を表示する。

## 【0188】

クローン4（4Hu6、4Hu7、4Hu8、4Hu9、4Hu10）の数種の4D変異体を、結合動態およびCXCR3親和性を評価するためにBiacoreの全受容体アッセイによって評価して、クローン4キメラ抗体と比較した。表2で示したように、クローン4Hu6は、重鎖4.4および軽鎖4.4を含有していた。クローン4Hu7は、重鎖4.4および軽鎖4.7を含有していた。クローン4Hu8は、重鎖4.5および軽鎖4.5を含有していた。クローン4Hu9は、重鎖4.5および軽鎖4.6を含有していた。さらにクローン4Hu10は、重鎖4.6および軽鎖4.4を含有していた。

20

## 【0189】

表12で示されるように、クローン4の4Dでモデリングした変異体をキメラ変異体（4Ch）と比較したところ、5つの変異体のうち4つが改良された親和性（KD）を示した。しかしながら、4D変異体の4Hu10は、ほぼ1桁レベルの親和性の減少を示した。

## 【0190】

30

【表 1 3】

加-ン	重鎖/軽鎖変異体	戦略
4	VH1	CDRグラフィティング
4	VH2	CDRグラフィティング
4	VH3	CDRグラフィティング
4	VH4	4Dモデリング
4	VH5	4Dモデリング、突然変異の安定化を包含する
4	VH6	4Dモデリング、不要なモチーフを除去するための突然変異を包含する
4	VH7	CDRグラフィティング、CDR2脱アミド部位を除去するためのVH4.2の残基NG>QGの改変
4	VH8	CDRグラフィティング、CDR2脱アミド部位を除去するためのVH4.2の残基NG>NLの改変
4	VH9	CDR2脱アミド部位を除去するためのVH4.2の残基NG>NSの改変
4	VH10	CDR2脱アミド部位を除去するためのVH4.2の残基NG>DGの改変
4	VH11	CDR2脱アミド部位を除去するためのVH4.2の残基NG>NVの改変
4	VK1	CDRグラフィティング
4	VK2	CDRグラフィティング
4	VK3	CDRグラフィティング
4	VK4	4Dモデリング
4	VK5	4Dモデリング、突然変異の安定化を包含する
4	VK6	4Dモデリング、他の突然変異の安定化を包含する
4	VK7	4Dモデリング、抗凝集性突然変異を包含する
53	VH1	CDRグラフィティング
53	VH2	CDRグラフィティング
53	VH3	CDRグラフィティング
53	VH4	VH4.2の残基T50>Vの改変-VH4.1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VH5	VH4.2の残基P61>Aの改変-VH4.1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VH6	VH4.2の残基M93>Vの改変-VH4.1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VH7	4Dモデリング
53	VH8	4Dモデリング
53	VH9	4Dモデリング
53	VH10	4Dモデリング

【 0 1 9 1 】

【表 1 4】

53	VK1	CDRグラフティング
53	VK2	CDRグラフティング
53	VK3	CDRグラフティング
53	VK4	VK4.2の残基I32>Lの改変-VK1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VK5	VK4.2の残基Y33>Aの改変-VK1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VK6	VK4.2の残基N52>Tの改変-VK1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VK7	VK4.2の残基A54>Qの改変-VK1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VK8	VK4.2の残基P55>Sの改変-VK1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VK9	VK4.2の残基G99>Qの改変-VK1残基を取り入れるための復帰突然変異
53	VK10	4Dモデリング
53	VK11	4Dモデリング
53	VK12	4Dモデリング
53	VK13	4Dモデリング
12	VH1	CDRグラフティング
12	VH2	CDRグラフティング
12	VH3	CDRグラフティング
12	VK1	CDRグラフティング
12	VK2	CDRグラフティング
12	VK3	CDRグラフティング
82	VH1	CDRグラフティング
82	VH2	CDRグラフティング
82	VH3	CDRグラフティング
82	VK1	CDRグラフティング
82	VK2	CDRグラフティング
82	VK3	CDRグラフティング
135	VH1	CDRグラフティング
135	VH2	CDRグラフティング
135	VH3	CDRグラフティング
135	VK1	CDRグラフティング
135	VK2	CDRグラフティング
135	VK3	CDRグラフティング

表11

【 0 1 9 2 】

【表 1 5】

曲線	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
4Ch	1.71E+05	8.57E-05	5.09E-10
4Hu6	4.76E+05	1.55E-04	3.27E-10
4Hu7	4.12E+05	1.33E-04	3.26E-10
4Hu8	3.27E+05	1.13E-04	3.49E-10
4Hu9	3.48E+05	1.34E-04	3.87E-10
4Hu10	3.55E+05	1.05E-03	2.96E-09

表12

【 0 1 9 3 】

〔実施例 1 3〕

NSG - PBLマウスモデル

0日目に、NOD - scid IL2r<sup>nu11</sup> (NSG)マウスに、フィコールにより単離した新鮮な2E7一次ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を注入した。動物(n = 8 / グループ)を、5 mg / kg 抗ヒトCXCR3キメラ抗体または対照ヒトIgG1 (ハーセプチン)で週2回処置し、ここで全ての研究を細胞の移動から3日目に開始した。開始から14日目に採取した血液をフローサイトメトリー用に処理し、標準的手法を使用して、ヒトCD45 (hCD45)、ヒトCD3 (hCD3)、ヒトCD4 (hCD4)、ヒトCD8 (hCD8)、およびヒトCXCR3に対する抗体で染色した。リンパ球のゲート中の細胞を、hCD45 + 細胞でゲーティングし、続いてhCD3 + 細胞でゲーティングした。hCD45 + hCD3 + T細胞におけるhCD4およびhCD8発現を評価し、ヒトCD4 + CD45 + CD3 + T細胞とヒトCD8 + CD45 + CD3 + T細胞とのパーセンテージを決定した。CXCR3を発現するヒトCD4 + T細胞とCD8 + T細胞とのパーセンテージを決定した。図22中の各ドットは、単一のマウスを表し、3つの実験のうち代表的なデータを示す。データから、異種GvHD (移植片対宿主病)のNSG - PBLマウスモデルにおける抗CXCR3抗体処置により、CXCR3を発現するT細胞が調節されたことが示されるが、5つのクローン間の機能的な差が明らかになった。

【 0 1 9 4 】

表12は、キメラ抗ヒトCXCR3候補抗体で処置した後の異種GvHDを有するNSG - PBLマウスの生存期間中央値を示す。

【 0 1 9 5 】

【表 1 6】

処置	生存期間中央値(日)
PBS	31
hulgG1	33.5
クローン4 キメラ	43**
クローン12 キメラ	41
クローン53 キメラ	44*
クローン82 キメラ	36.5
クローン135 キメラ	45***

表13

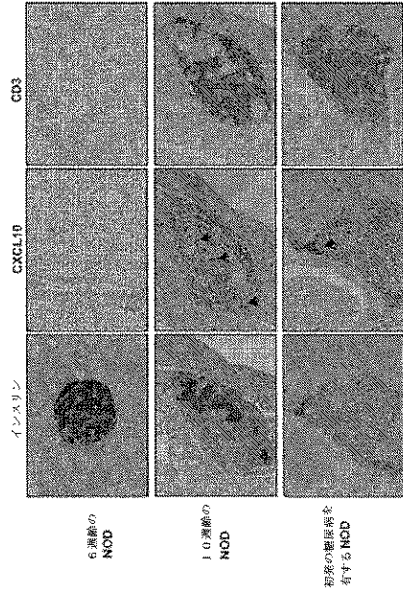
【0196】

ログランク検定を使用した、h u I g G 1 処置に対する、\* p = 0 . 0 4 3 ; \*\* p = 0 . 0 1 6 ; \*\*\* p = 0 . 0 1 0 の抗 C X C R 3 抗体処置である。

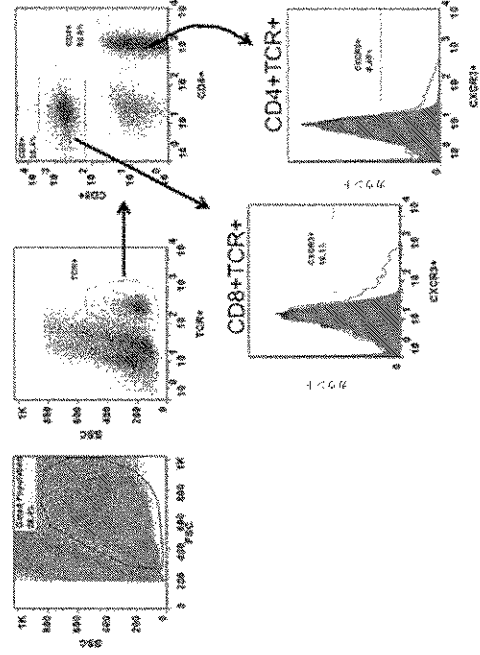
【0197】

前記の実施例は、説明を意図しており、本開示を限定する意図はまったくない。開示された装置および方法の他の実施形態は、明細書の考察や本明細書で開示された装置および方法の実施から当業者には明らかである。

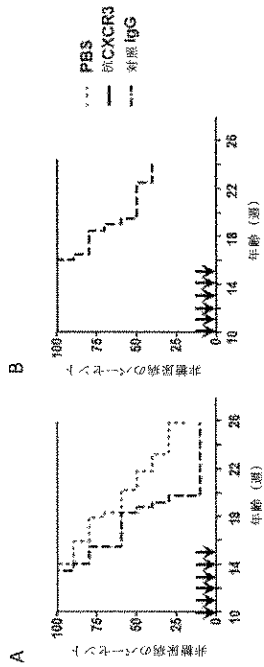
【図 1】



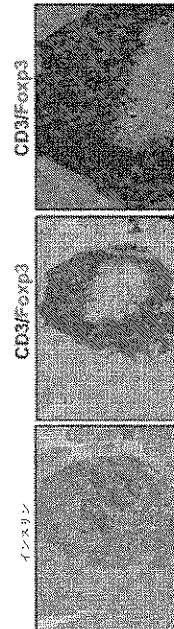
【図 2】



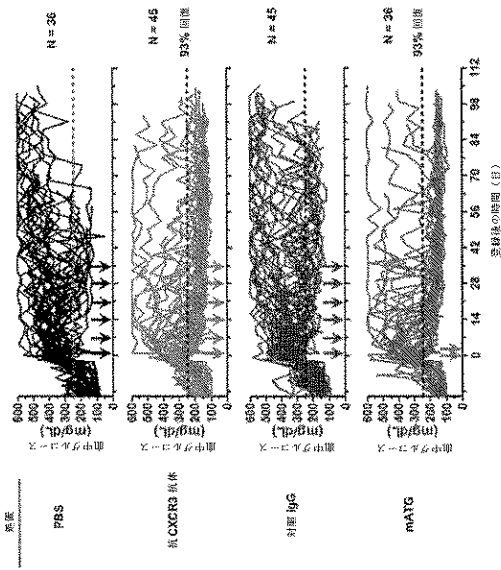
【図 3】



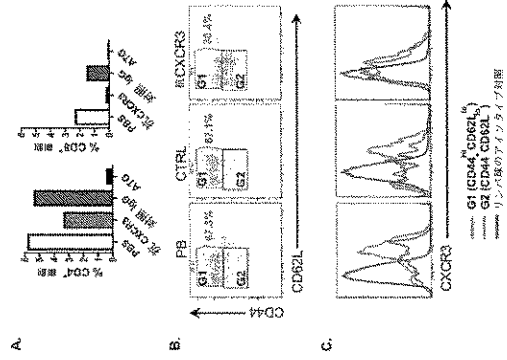
【図 4】



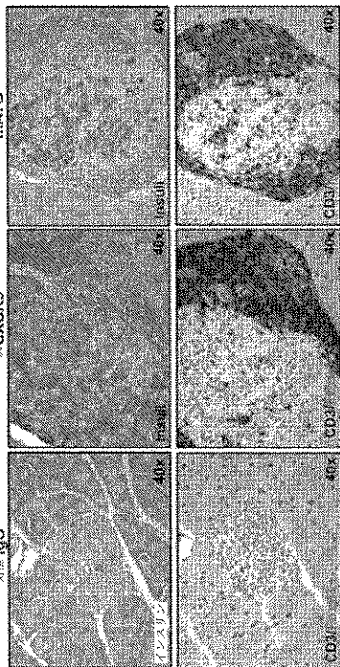
【 図 5 】



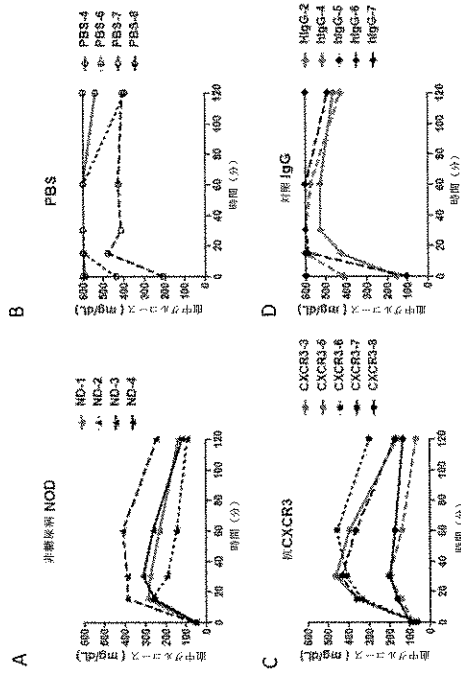
【 図 6 】



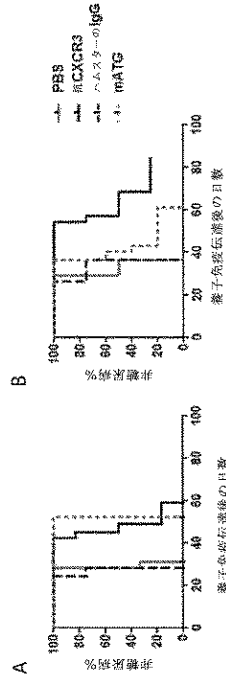
【 図 7 】



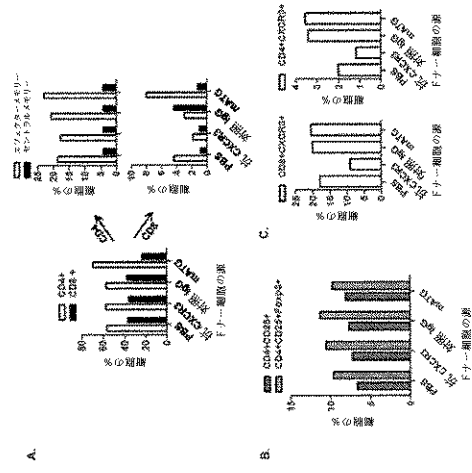
【 図 8 】



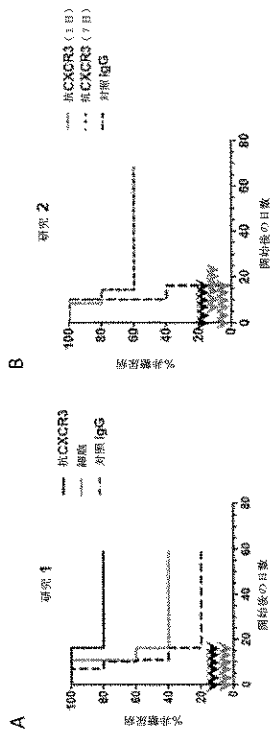
【 図 9 】



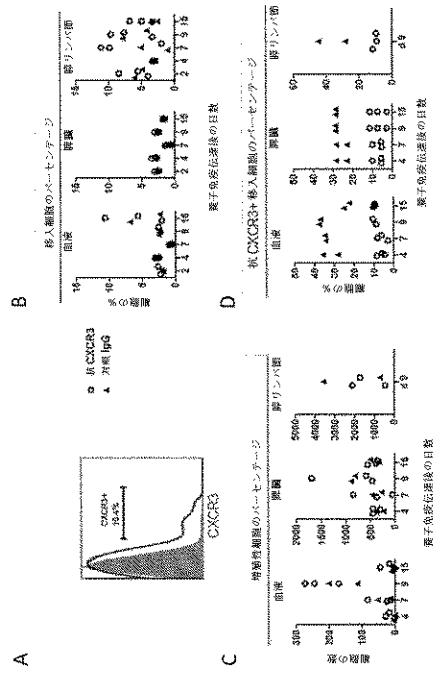
【 図 10 】



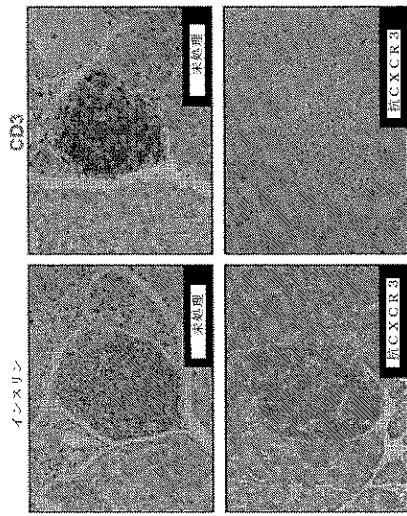
【 図 11 】



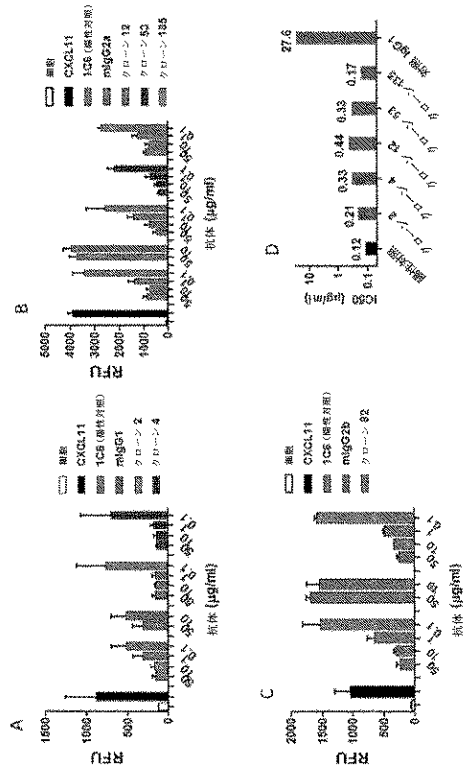
【 図 12 】



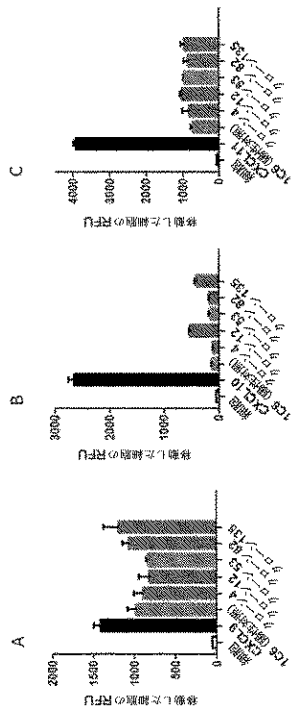
【図 13】



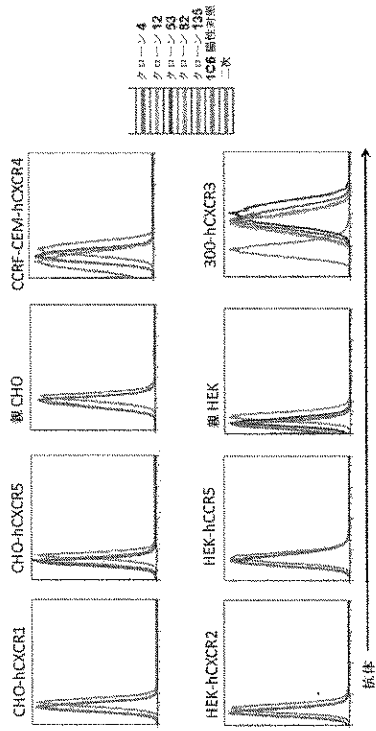
【図 14】



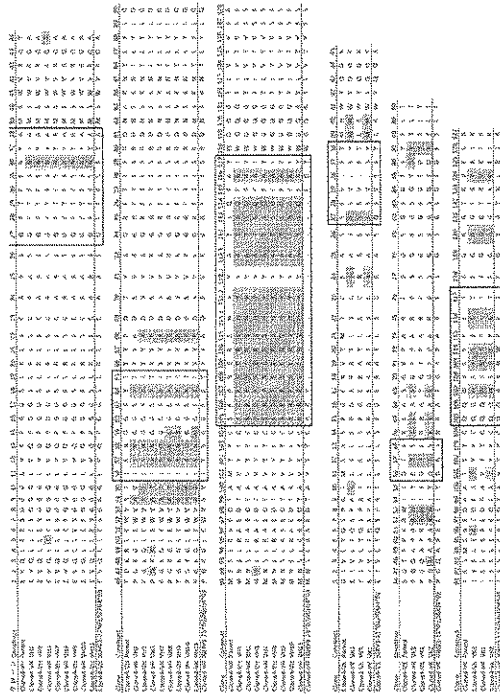
【図 15】



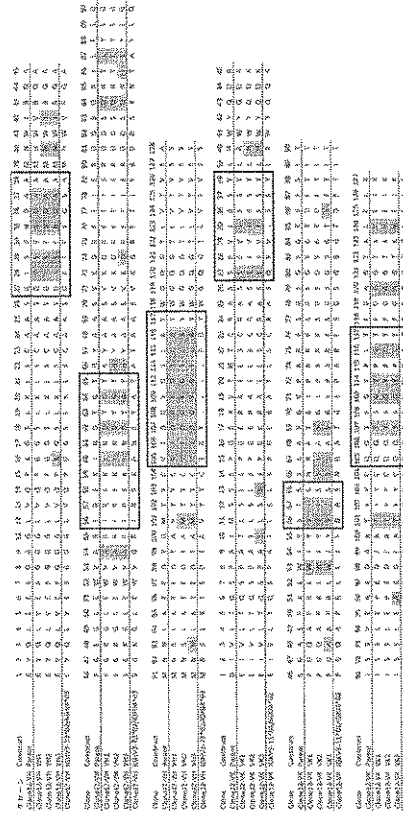
【図 16】



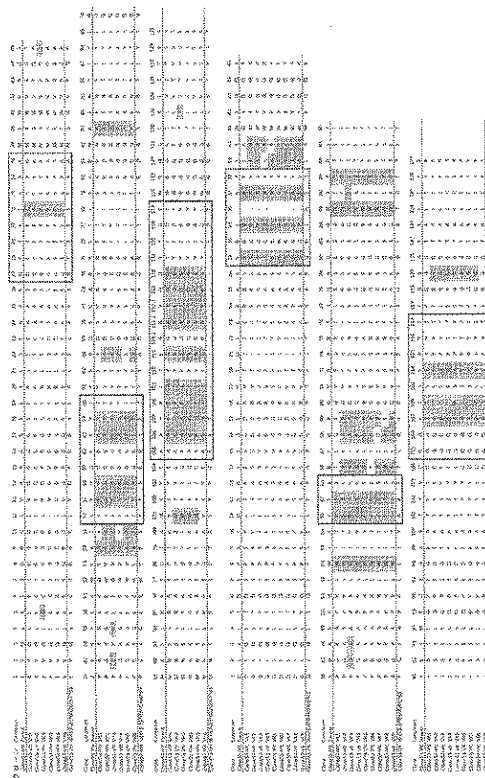
【図 17 A】



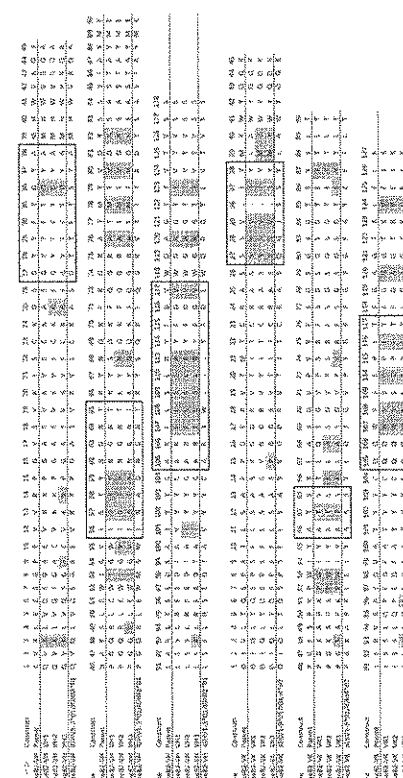
【図 17 B】



【図 17 C】



【図 17 D】

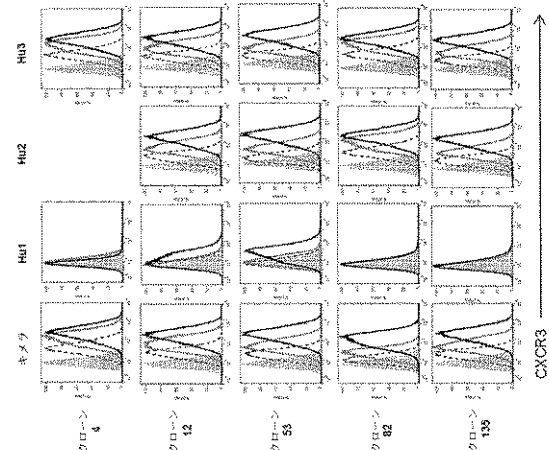




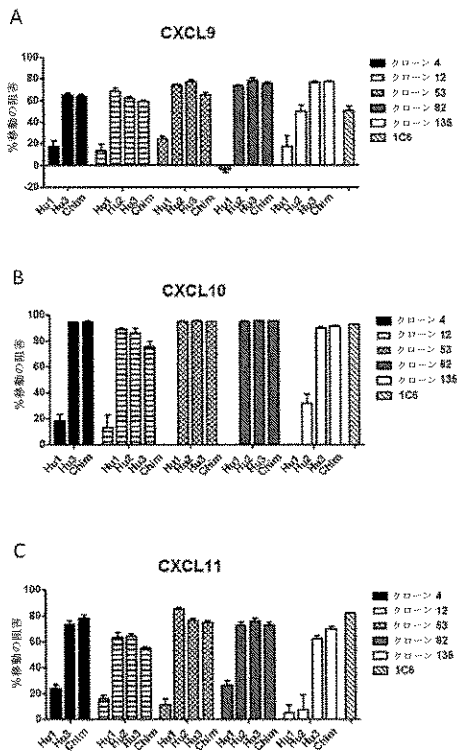
【 図 1 8 】



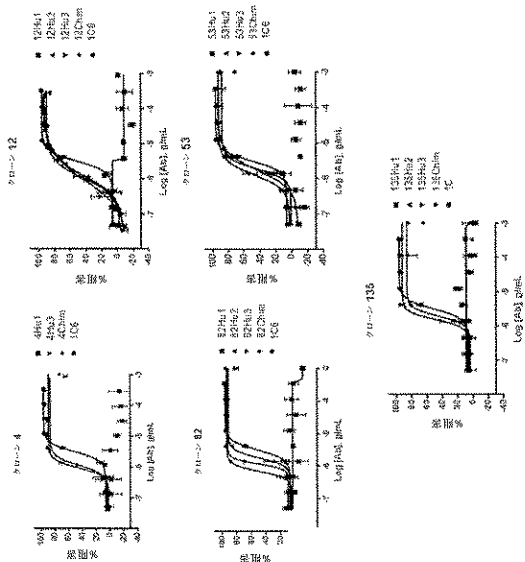
【 図 1 9 】



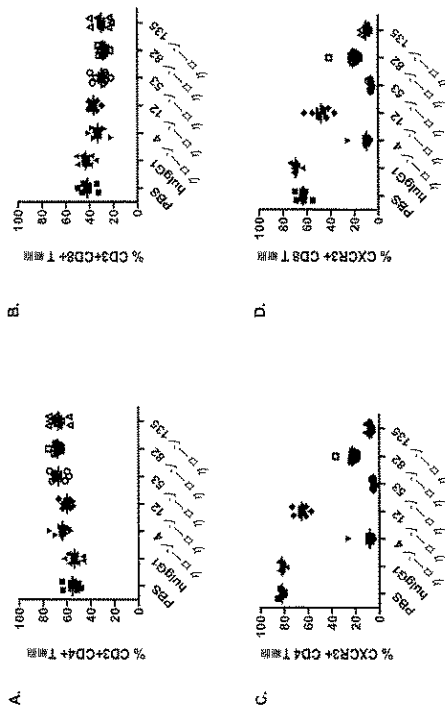
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【図 2 2】



【図 2 3 A】

クローン12.0 - VHのアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

```

1      10      20      30      40      50
EVQLEESGGGLVQPKGSLKLSCAASGISFNDAAMMNWIRQAPGEGLEWVAR
60      70      80      90      100
IRSKINDYGTHYAASVKDRFTISRDDSQNILFLQMNMLKTEDTGMYYCVI
110
DGYGSLAYWGQGLTVTSA (配列番号 2)
    
```

クローン12.0 - VLのアミノ酸配列 - CDR を太字および下線で示す

```

1      10      20      30      40      50
DIVLTQSPAIMSSSPGKVTMTCRASSSVISSSYLHWYQQRSGASPRLWIY
60      70      80      90      100
STSSLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFG
AGTKLELK (配列番号 3)
    
```

配列番号	領域	配列
重鎖		
115	FR1	EVQLEESGGGLVQPKGSLKLSCAAS
116	CDR1	GISFNDAAM
117	FR2	MNWIRQAPGEGLEWVAR
118	CDR2	IRSKINDYGT
119	FR3	HYAASVKDRFTISRDDSQNILFLQMNMLKTEDTGMYYC
120	CDR3	VIDGYGSLAY
121	FR4	WGQGLTVTSA
軽鎖		
122	FR1	DIVLTQSPAIMSSSPGKVTMTCRAS
123	CDR1	SSVISSY
124	FR2	LHWYQQRSGASPRLWIY
125	CDR2	STS
126	FR3	SLASGVPARFSGSGSGTDFTLT <b>ISSVEAEDAATYYC</b>
127	CDR3	<b>QQYSGYPLT</b>
128	FR4	FGAGTKLELK

【図 2 3 B】

クローン12.1 - VHのアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

```

1      10      20      30      40      50
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGISFNDAAMMHWVRQASGKLEWVAR
60      70      80      90      100
IRSKINDYGTHYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNMLKTEDTAVYYCVI
110
DGYGSLAYWGQGLTVTSS (配列番号 4)
    
```

クローン12.1 - VLのアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

```

1      10      20      30      40      50
EIVLTQSPAPLSLSPGERATLSCRASSSVISSSYLHWYQQRSGAPRLWIY
60      70      80      90      100
STSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQYSGYPLTFG
GGTKVEIK (配列番号 5)
    
```

配列番号	領域	配列
重鎖		
129	FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
130	CDR1	GISFNDAAM
131	FR2	MHWVRQASGKLEWVAR
132	CDR2	IRSKINDYGT
133	FR3	HYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNMLKTEDTAVYYC
134	CDR3	VIDGYGSLAY
135	FR4	WGQGLTVTSS
軽鎖		
136	FR1	EIVLTQSPAPLSLSPGERATLSCRAS
137	CDR1	SSVISSY
138	FR2	LHWYQQRSGAPRLWIY
139	CDR2	STS
140	FR3	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLT <b>ISSLEPEDFATYYC</b>
141	CDR3	<b>QQYSGYPLT</b>
142	FR4	FGGTRAVEIK

【図 2 3 C】

クローン 12.2 - VHのアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

```

1      10      20      30      40      50
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGISFNDAAMMNWIRQASGKLEWVAR
60      70      80      90      100
IRSKINDYGTHYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNMLKTEDTAMYYCVI
110
DGYGSLAYWGQGLTVTSS (配列番号 6)
    
```

クローン 12.2 - VLのアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

```

1      10      20      30      40      50
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVISSYLHWYQQRSGAPRLWIY
60      70      80      90      100
STSSLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQYSGYPLTFG
AGTKVEIK (配列番号 7)
    
```

配列番号	領域	配列
重鎖		
143	FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
144	CDR1	GISFNDAAM
145	FR2	MNWIRQASGKLEWVAR
146	CDR2	IRSKINDYGT
147	FR3	HYAASVKGRFTISRDDSQNTLYLQMNMLKTEDTAMYYC
148	CDR3	VIDGYGSLAY
149	FR4	WGQGLTVTSS
軽鎖		
150	FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS
151	CDR1	SSVISSY
152	FR2	LHWYQQRSGAPRLWIY
153	CDR2	STS
154	FR3	SLASGIPARFSGSGSGTDFTLT <b>ISSLEPEDFATYYC</b>
155	CDR3	<b>QQYSGYPLT</b>
156	FR4	FGAGTKVEIK

【図 2 3 D】

クローン 12.3 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCAASGISFNDAAMNWI...
IRSKINDYGT...
DYGSLAYWGGTLTVSS (配列番号 8)

クローン 12.3 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EIVLTQSPAILSSSPGERATLSCRASSSVISSYLHWYQK...
STSSLASGIPARFSGSGSFTLTITSSLEAEDFATYYC...
AGTKVEIK (配列番号 9)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains heavy chain (157-163) and light chain (164-170) sequences.

【図 2 4 A】

クローン 135.0 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVKLEESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYALS...
ISHGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLNLMQSSLR...
FYSGNYQGYFDYWGGTLTVSS (配列番号 10)

クローン 135.0 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPAIMSASLGEKVTMNCRANSGVNYMYWY...
SNLAPGVFARFSGSGSNYSLTITSSMEGEDAATYYC...
TKLEIK (配列番号 11)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains heavy chain (171-177) and light chain (178-184) sequences.

【図 2 4 B】

クローン 135.1 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYALMS...
ISHGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL...
FYSGNYQGYFDYWGGTLTVSS (配列番号 12)

クローン 135.1 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCRANSGVNYLAWY...
STLQSGVPSRFSGSGSNEYTLTITSSLQFEDFATYYC...
TKLEIK (配列番号 13)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains heavy chain (185-191) and light chain (192-198) sequences.

【図 2 4 C】

クローン 135.2 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYALS...
ISHGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL...
FYSGNYQGYFDYWGGTLTVSS (配列番号 14)

クローン 135.2 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCRANSGVNYMYWY...
SNLAPGVPSRFSGSGSNEYTLTITSSLQFEDFATYYC...
TKLEIK (配列番号 15)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains heavy chain (199-205) and light chain (206-212) sequences.

【図 2 4 D】

クローン 135.3 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYALSWVRQTPDKRLEWVAT
60 70 80 90 100
ISHGGGSYFYYPDSVKGRFTISRDNKNTLNLQMSLRAEDTAVYYCARBP
110 120
FYSGNYQGYFDYWGQGLVTVSS (配列番号 16)

クローン 135.3 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRANSGVNYMYWYQKPDAAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLAPGVPSRFSGSGSGNSYTLTISLQFEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 17)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains amino acid sequences for CDR1-4 and FR1-4 of clone 135.3.

【図 2 5 A】

クローン 4.0 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPDKRLEWVAT
60 70 80 90 100
ISNGGSYFYYPDVKGRFTISRDNKNTLSLQMSLRSSEDTAMYYCSRPS
110 120
ERSHYATSQFAYWGQGLVTVSA (配列番号 18)

クローン 4.0 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPGIMSASPGKVTMTCSASSVSYMHVYQKQSGTSPKRWIYDT
60 70 80 90 100
SKLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISSEAEADAATYYCQQWSSSPLTFGAG
TKVELK (配列番号 19)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains amino acid sequences for CDR1-4 and FR1-4 of clone 4.0.

【図 2 5 B】

クローン 4.1 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKLEWVAV
60 70 80 90 100
ISNGGSYFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCSRPS
110 120
ERSHYATSQFAYWGQGLVTVSS (配列番号 20)

クローン 4.1 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASASSVSYLAWYQKPGQAPRRWIYDT
60 70 80 90 100
SNRATGIPARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDFAVYYCQQWSSSPLTFGGG
TKVEIK (配列番号 21)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains amino acid sequences for CDR1-4 and FR1-4 of clone 4.1.

【図 2 5 C】

クローン 4.2 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKLEWVAT
60 70 80 90 100
ISNGGSYFYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCSRPS
110 120
ERSHYATSQFAYWGQGLVTVSS (配列番号 22)

クローン 4.2 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASASSVSYMHVYQKQPGTAPRRWIYDT
60 70 80 90 100
SKLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDFAVYYCQQWSSSPLTFGAG
TKVEIK (配列番号 23)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains amino acid sequences for CDR1-4 and FR1-4 of clone 4.2.

【図 25 D】

クローン 4.3 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQTPDKRLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISNGGSYTY**YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSS (配列番号 24)

クローン 4.3 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EIVLTQSPAILLSLSPGERATLSCAS**SSVSY**MHWYQKPGQAPRRWIYDT
60 70 80 90 100
**SKLASGIPARFSGSGS**GYTLTISLSEAEAFATYYC**QQWSSSPLT**FGAG
TKVEIK (配列番号 25)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 25 E】

クローン 4.4 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLVESGGGVKPKGGSLKLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQTPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISNGGSYTY**YPDSFQGRFTISRDNKSTLSLQMSLKSSEDATAMYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSA (配列番号 26)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 25 F】

クローン 4.5 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLVESGGGVKPKGGSLKLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQTPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISNGGSYTY**YPDSFQGRFTISRDNKSTLSLQMSLKAEDTAMYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSS (配列番号 27)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 25 G】

クローン 4.6 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLVESGGGVKPKGGSLKLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQTPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISQGGSYTY**YPDSFQGRFTISRDAQSTLSLQMSLKSSEDATAMYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSA (配列番号: 28)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 25 I】

クローン 4.8 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISNLGSYTY**YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSS (配列番号 30)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 25 H】

クローン 4.7 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISQGGSYTY**YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSS (配列番号 29)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 25 J】

クローン 4.9 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISNGGSYTY**YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYC**SRPS**
110 120
**ERSHYATSQFAY**WGQGLTVTVSS (配列番号 31)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence data for CDR1-4 and framework regions.

【図 2 5 K】

クローン 4.10 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS...
60 70 80 90 100
ISDGGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPS
110 120
ERSHYATSQFAYWGQGLTVTVSS (配列番号 32)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【図 2 5 M】

クローン 4.4 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPGSLASVGDVMTCSASSSVSYMH...
60 70 80 90 100
SKLASGVPARFSGSGSTYSYSLTISLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG
TKVELK (配列番号 34)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【図 2 5 L】

クローン 4.11 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA...
60 70 80 90 100
ISNVGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPS
110 120
ERSHYATSQFAYWGQGLTVTVSS (配列番号 33)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【図 2 5 N】

クローン 4.5 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPSSLSASVGDVMTCSASSSVSYMH...
60 70 80 90 100
SKLASGVPARFSGSGSTYSYSLTISLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG
TKVEIK (配列番号 35)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【図 2 5 O】

クローン 4.6 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPSSLSASVGDVMTCSASSSVSYMH...
60 70 80 90 100
SKLASGVPARFSGSGSTYSYSLTISLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG
TKVEIK (配列番号 36)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【図 2 6 A】

クローン 53.0 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFTSYA...
60 70 80 90 100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDAMYYCARHP
110 120
IYSGNYQGYFDYWGQGTTLTVSS (配列番号 38)

クローン 53.0 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSGVNYI...
60 70 80 90 100
SNLAPGVPARFSGSGSNGSYSLTISMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 39)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【図 2 5 P】

クローン 4.7 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPGSLASVGDVMTCSASSSVSYMH...
60 70 80 90 100
SKLASGVPARFSGSGSTYSYSLTISLQPEDAATYYCQQWSSSPLTFGAG
TKVELK (配列番号 37)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4.

【 図 2 6 B 】

クローン 53.1 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQAPGKLEWVAV

60 70 80 90 100  
**ISHGGTYT**YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYC**CARHP**

110 120  
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTLLTVSS (配列番号 40)

クローン 53.1 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS**SGVNY**LAWYQQKPGKAPKLIWY**FT**

60 70 80 90 100  
**STLQSGVPSRFSGSGSGNEYTLTISLQPEDFATYYC**QQFTSSPYT**FGQG**

TKLEIK (配列番号 41)

配列番号	領域	配列
重鎖		
381	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
382	CDR1	GFTFTSYA
383	FR2	MSWVRQAPGKLEWVAV
384	CDR2	ISHGGTYT
385	FR3	YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYC
386	CDR3	ARHPIYSGNYQGYFDY
387	FR4	WGQGTLLTVSS
軽鎖		
388	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS
389	CDR1	SGVNY
390	FR2	LAWYQQKPGKAPKLIWY
391	CDR2	FTS
392	FR3	TLQSGVPSRFSGSGSGNEYTLTISLQPEDFATYYC
393	CDR3	QQFTSSPYT
394	FR4	FGGGTKLEIK

【 図 2 6 C 】

クローン 53.2 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQAPGKLEWVAT

60 70 80 90 100  
**ISHGGTYT**YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC**CARHP**

110 120  
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTLLTVSS (配列番号 42)

クローン 53.2 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS**SGVNY**IYWYQQKPGKAPKLIWY**FT**

60 70 80 90 100  
**SNLAPGVPSRFSGSGSGNEYTLTISLQPEDFATYYC**QQFTSSPYT**FGGG**

TKLEIK (配列番号 43)

配列番号	領域	配列
重鎖		
395	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
396	CDR1	GFTFTSYA
397	FR2	MSWVRQAPGKLEWVAT
398	CDR2	ISHGGTYT
399	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC
400	CDR3	ARHPIYSGNYQGYFDY
401	FR4	WGQGTLLTVSS
軽鎖		
402	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS
403	CDR1	SGVNY
404	FR2	IYWYQQKPGKAPKLIWY
405	CDR2	FTS
406	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNEYTLTISLQPEDFATYYC
407	CDR3	QQFTSSPYT
408	FR4	FGGGTKLEIK

【 図 2 6 D 】

クローン 53.3 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQTPKRLWVAV

60 70 80 90 100  
**ISHGGTYT**YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC**CARHP**

110 120  
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTLLTVSS (配列番号 44)

クローン 53.3 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS**SGVNY**IYWYQQKPDAAKLIWY**FT**

60 70 80 90 100  
**SNLAPGVPSRFSGSGSGNSYTLTISLQPEDFATYYC**QQFTSSPYT**FGGG**

TKLEIK (配列番号 45)

配列番号	領域	配列
重鎖		
409	FR1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
410	CDR1	GFTFTSYA
411	FR2	MSWVRQTPKRLWVAV
412	CDR2	ISHGGTYT
413	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC
414	CDR3	ARHPIYSGNYQGYFDY
415	FR4	WGQGTLLTVSS
軽鎖		
416	FR1	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS
417	CDR1	SGVNY
418	FR2	IYWYQQKPDAAKLIWY
419	CDR2	FTS
420	FR3	NLAPGVPSRFSGSGSGNSYTLTISLQPEDFATYYC
421	CDR3	QQFTSSPYT
422	FR4	FGGGTKLEIK

【 図 2 6 E 】

クローン 53.4 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQAPGKLEWVAV

60 70 80 90 100  
**ISHGGTYT**YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC**CARHP**

110 120  
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTLLTVSS (配列番号 46)

配列番号	領域	配列
重鎖		
423	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
424	CDR1	GFTFTSYA
425	FR2	MSWVRQAPGKLEWVAV
426	CDR2	ISHGGTYT
427	FR3	YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC
428	CDR3	ARHPIYSGNYQGYFDY
429	FR4	WGQGTLLTVSS

【 図 2 6 F 】

クローン 53.5 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQAPGKLEWVAT

60 70 80 90 100  
**ISHGGTYT**YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC**CARHP**

110 120  
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTLLTVSS (配列番号 47)

配列番号	領域	配列
重鎖		
430	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
431	CDR1	GFTFTSYA
432	FR2	MSWVRQAPGKLEWVAT
433	CDR2	ISHGGTYT
434	FR3	YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYC
435	CDR3	ARHPIYSGNYQGYFDY
436	FR4	WGQGTLLTVSS

【図 2 6 G】

クローン 53.6 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAAMSVWRQAPGKGLEWVAT
60 70 80 90 100
ISHGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHP
110 120
IYSGNYQGDFYWGQGLTVTVSS (配列番号 48)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 2 6 H】

クローン 53.4 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNLYWYQQKPKGKAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLAPGVPSRFRSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 49)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 2 6 I】

クローン 53.5 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNIIAWYQQKPKGKAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLAPGVPSRFRSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 50)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 2 6 J】

クローン 53.6 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNIIYWYQQKPKGKAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLAPGVPSRFRSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 51)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 2 6 L】

クローン 53.8 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNIIYWYQQKPKGKAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLASGVPSRFRSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 53)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 2 6 K】

クローン 53.7 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNIIYWYQQKPKGKAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLQPGVPSRFRSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 52)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 2 6 M】

クローン 53.9 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASSGVNIIYWYQQKPKGKAPKLWIYFT
60 70 80 90 100
SNLAPGVPSRFRSGSGSNEYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSSPYTFGGG
TKLEIK (配列番号 54)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Rows include FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

【図 26 N】

クローン 53.7 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQTPGKRLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISHGGTYT**YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDAMYYC**ARHP**
110 120
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTTLTVSS (配列番号 63)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26N.

【図 26 P】

クローン 53.9 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQTPGKRLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISHGGTYT**YYPESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDAMYYC**ARHP**
110 120
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTTLTVSS (配列番号 65)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26P.

【図 26 O】

クローン 53.8 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQAPGKLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISHGGTYT**YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRAEDAMYYC**ARHP**
110 120
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTTLTVSS (配列番号 64)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26O.

【図 26 Q】

クローン 53.10 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFTSYA**MSWVRQAPGKLEWVAT
60 70 80 90 100
**ISHGGTYT**YYPESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRAEDAMYYC**ARHP**
110 120
**IYSGNYQGYFDY**WGQGTTLTVSS (配列番号 66)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26Q.

【図 26 R】

クローン 53.10 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPAILSASVGDRTVMSCRAS**SGVNY**IYWYQKPGASPKLWIY**FT**
60 70 80 90 100
**SNLAPGV**PARFSGSGSGNSYSLSLTISMQGEDAATYYC**QQFTSSPYT**FGGG
TKLEIK (配列番号 67)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26R.

【図 26 T】

クローン 53.12 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPAILSASVGDRTVMSCRAS**SGVNY**IYWYQKPGASPKLWIY**FT**
60 70 80 90 100
**SNLAPGV**PARFSGSGSGNSYSLSLTISMQGEDAATYYC**QQFTSSPYT**FGGG
TKLEIK (配列番号 69)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26T.

【図 26 S】

クローン 53.11 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPAILSASVGDRTVMSCRAS**SGVNY**IYWYQKPGASPKLWIY**FT**
60 70 80 90 100
**SNLAPGV**PARFSGSGSGNSYSLSLTISMQGEDAATYYC**QQFTSSPYT**FGGG
TKLEIK (配列番号 68)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26S.

【図 26 U】

クローン 53.13 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPAILSASVGDRTVMSCRAS**SGVNY**IYWYQKPGASPKLWIY**FT**
60 70 80 90 100
**SNLAPGV**PARFSGSGSGNSYSLSLTISMQGEDAATYYC**QQFTSSPYT**FGGG
TKLEIK (配列番号 70)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for Figure 26U.

【図 27A】

クローン 82.0 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
EVKLEESGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWWKQSHAKSLEWIGV
60 70 80 90 100
ISTYNGNTKYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSSEDSAIYYCARFL
110
SLRYFDVWGAGTTVTVSS (配列番号 55)

クローン 82.0 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIVLTQSPAILSAPPGEKVTMTCRASSSVIYMYWYQQKPGSSPKPWIYAT
60 70 80 90 100
SKLASGVPVRFSGSGSGTYSYSLTISRVEAEDVATYYCQQWSSEPLTFGAG
TKLELK (配列番号 56)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4 and framework regions FR1-4.

【図 27B】

クローン 82.1 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
QVKLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYAMHWWVRAQPGQRLWEWIGW
60 70 80 90 100
ISTYNGNTKYSQKFGGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFL
110
SLRYFDVWGKGTTVTVSS (配列番号 57)

クローン 82.1 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCRASSSVIYLAWYQQKPGKAPKPIWIYAT
60 70 80 90 100
STLQSGVPSRFRSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSEPLTFGGG
TKVEIK (配列番号 58)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4 and framework regions FR1-4.

【図 27C】

クローン 82.2 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
QVKLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSGYTFDYAMHWWVRAQPGQRLWEWIGW
60 70 80 90 100
ISTYNGNTKYNQKFGGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFL
110
SLRYFDVWGAGTTVTVSS (配列番号 59)

クローン 82.2 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCRASSSVIYMYWYQQKPGKAPKPIWIYAT
60 70 80 90 100
SKLASGVPVRFSGSGSGTYSYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSEPLTFGAG
TKVEIK (配列番号 60)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4 and framework regions FR1-4.

【図 27D】

クローン 82.3 - VH のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
QVKLVQSGPEVKVPGASVKVSCKSGYTFDYAMHWWVRAQPGQRLWEWIGW
60 70 80 90 100
ISTYNGNTKYNQKFGGRATMTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFL
110
SLRYFDVWGAGTTVTVSS (配列番号 61)

クローン 82.3 - VL のアミノ酸配列- CDR を太字および下線で示す

1 10 20 30 40 50
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCRASSSVIYMYWYQQKPGSAKPIWIYAT
60 70 80 90 100
SKLASGVPVRFSGSGSGTYSYTLTISRILQAEDFATYYCQQWSSEPLTFGAG
TKVEIK (配列番号 62)

Table with 3 columns: 配列番号, 領域, 配列. Contains sequence details for CDR1-4 and framework regions FR1-4.

【図 28 A】

配列番号	抗体	配列
598	12.0 VH	5' GAGGTGCAGCTGGAGAGTCCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCAAAG GGCAGCTTGAAGCTTGGCTTGGCCGCGAGGGGATCACTTCAACGA CCCGCCCTGAAGACTGGATCCGGCAGGCCCCCTGGGAGGGCTTGAAT GGTGGCCCGGATCAGBAGCAGATCAACGACTACGGCACCCACTACGGC GCCCGCAGCGTGAAGGACCGGTTCACTACTCAGCCGGGACGACGCCA GAAATATCTTGTTCCTGCAGATGAACACCTGAAATCCGAGGACCG GCAATGACTCTGGTGTGATCGACGGTACGGGAGCCTGGCCTACTGG GGCCAGGGAACCTTGGTGGAGTGTCCGCC3'
599	12.0 VL	5' GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCCAGCAGCCTGGCCAGGGGCTGCCAGCCAGA TTTTCGGCAGCGCCAGCGGCACTCCTTCAAGCTGACCATCAGCAG CGTGAAGCCGAGGACCGCCGACCTACTACTGCCAGAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTGGGAGCCGGCAAGCTGGAATCAAG3'
600	12.1 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGAAGCGGGGGAGGACTGGTGCAGCTTGGC GGCAGCTTGAAGCTGTCTTGTGCGCCAGCGGATCAGCTTCAACGA CCCGCCATGCATGGTGGCCAGCGCTTGGCAGGGCTTGGAAAT GGTGGCCCGGATCAGAAGCAGATCAGCAGTACGGCACCCGCTAC GCGCCAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACGACGCCA GAACCCCTGTACTGCAGATGAACAGCTGAAACCCGAGGACACCCG CCGTGTACTAGCGTGTATGACGGCTACGGCAGCCTGGCTACTGCG GGCCAGGGAACCTTGGTGAAGTGTCCAG3'
601	12.1 VL	5' GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCCAGCAGCCTGGCCAGGGGCTGCCAGCCAGA TTTTCGGCAGCGCCAGCGGCACTCCTTCAAGCTGACCATCAGCAG CGTGAAGCCGAGGACCGCCGACCTACTACTGCCAGAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTGGGAGCGGGCACAGGTTGGAATCAAG3'

【図 28 B】

配列番号	抗体	配列
602	12.2 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGAAGCGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAAGCTGTCTTGTGCCCGCAGCGGATCAGCTTCAACGAGC CCGCCATGAAGTGGTCCGGCAGCGGCGGAGGGCTTGAATGGG TGGCCCGGATCAGAAGCAGATCAACGACTACGGCACCCACTACGGC CCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAGCAGCCAGAAC CCTGTACTGCAGATGAACAGCTGAAACCCGAGGACCCGCGATGT ACTACTGCTGATCCAGGGCTACGGCAGCTGGCCTACTGGGGCCAG GACCTTGGTGCAGTGTCCAG3'
603	12.2 VL	5' GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCCAGCAGCCTGGCCAGGGGCTGCCAGCCAGA TTTTCGGCAGCGCCAGCGGCACTCCTTCAAGCTGACCATCAGCAG CGTGAAGCCGAGGACCGCCGACCTACTACTGCCAGAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTGGGAGCCGGCAAGCTGGAATCAAG3'
604	12.3 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGAAGCGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GCAGCCTGAAGCTGTCTTGTGCCCGCAGCGGATCAGCTTCAACGAGC CCGCCATGAAGTGGTCCGGCAGCGGCGGAGGGCTTGAATGGG TGGCCCGGATCAGAAGCAGATCAACGACTACGGCACCCACTACGGC CCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAGCAGCCAGAAC TCTGTACTGCAGATGAACAGCTGAAACCCGAGGACCCGCGATGT ACTACTGCTGATCCAGGGCTACGGCAGCTGGCCTACTGGGGCCAG GACCTTGGTGCAGTGTCCAG3'
605	12.3 VL	5' GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCCAGCAGCCTGGCCAGGGGCTGCCAGCCAGA TTTTCGGCAGCGCCAGCGGCACTCCTTCAAGCTGACCATCAGCAG CGTGAAGCCGAGGACCGCCGACCTACTACTGCCAGAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTGGGAGCGGGCACAGGTTGGAATCAAG3'

【図 28 C】

配列番号	抗体	配列
606	135.0 VH	5' GAGGTGAAGCTGGAAGATCCGGCGGAGGCTGGTGAACCTTGGC GGCAGCTTGAAGCTTGGCTTGGCCGCGAGGGGATCACTTCAACGA CCCGCCCTGAAGACTGGATCCGGCAGGCCCCCTGGGAGGGCTTGAAT GGTGGCCCGGATCAGBAGCAGATCAACGACTACGGCACCCACTACGGC GCCCGCAGCGTGAAGGACCGGTTCACTACTCAGCCGGGACGACGCCA GAAATATCTTGTTCCTGCAGATGAACACCTGAAATCCGAGGACCG GCAATGACTCTGGTGTGATCGACGGTACGGGAGCCTGGCCTACTGG GGCCAGGGAACCTTGGTGAAGTGTCCAG3'
607	135.0 VL	5' GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TCTACTTCAACAGCACTGGCCCTGGCCGTGCCCGCAGATTTTCT GGCAGCGGAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCATGGA AGGGAGGAGCGGCCCTCCTACTACTGCGAGCAGTTCACAGCAGCC CTACACCTTGGGAGGCAAGCTGGAATCAAG3'
608	135.1 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGAAGCGGGGGAGGACTGGTGCAGCCTTGGC GGCAGCTTGAAGCTGTCTTGTGCGCCAGCGGATCAGCTTCAACGA CCCGCCATGCATGGTGGCCAGCGCTTGGCAGGGCTTGGAAAT GGTGGCCCGGATCAGAAGCAGATCAGCAGTACGGCACCCGCTAC AGCCTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACGCCAGAACAC CCTGTACTGCAGATGAACAGCTGCGGGCCAGGACACCGCCGCTGT ACTACTGGCCAGACACCCCTTCTACAGCGGCACTACAGGGCTAC TTGCACTACTGGGCCAGGCAACCTTGGTGCAGTGTCCAG3'
609	135.1 VL	5' GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TCTACTTCAACAGCACTGGCCCTGGCCGTGCCCGCAGATTTTCT GGCAGCGGAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCA FTTGGAGGACTTGGCCAGCTACTACTGCGAGCAGTTCACAGCAGCC CTACACCTTGGGAGGCAAGCTGGAATCAAG3'

【図 28 D】

配列番号	抗体	配列
610	135.2 VH	5' GAGGTGCAGCTGGAGAGTCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCTTGAAGCTGTCTTGTGCCCGCAGCGGATCAGCTTCAACGAGC CCGCCATGAAGTGGTCCGGCAGCGGCGGAGGGCTTGAATGGG TGGCCCGGATCAGAAGCAGATCAACGACTACGGCACCCACTACGGC CCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAGCAGCCAGAAC CCTGTACTGCAGATGAACAGCTGAAACCCGAGGACCCGCGATGT ACTACTGCTGATCCAGGGCTACGGCAGCTGGCCTACTGGGGCCAG TTCGACTACTGGGGCCAGGCAACCTTGGTGCAGTGTCCAG3'
611	135.2 VL	5' GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCCAGCAGCCTGGCCAGGGGCTGCCAGCCAGA TTTTCGGCAGCGCCAGCGGCACTCCTTCAAGCTGACCATCAGCAG CGTGAAGCCGAGGACCGCCGACCTACTACTGCCAGAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTGGGAGCGGGCACAGGTTGGAATCAAG3'
612	135.3 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGAAGCGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCCTGAAGCTGTCTTGTGCCCGCAGCGGATCAGCTTCAACGAGC CCGCCATGAAGTGGTCCGGCAGCGGCGGAGGGCTTGAATGGG TGGCCCGGATCAGAAGCAGATCAACGACTACGGCACCCACTACGGC CCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAGCAGCCAGAAC TCTGTACTGCAGATGAACAGCTGAAACCCGAGGACCCGCGATGT ACTACTGCTGATCCAGGGCTACGGCAGCTGGCCTACTGGGGCCAG GACCTTGGTGCAGTGTCCAG3'
613	135.3 VL	5' GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCCATCATGAGCAGCAGCCCT GGGAGAAAGTGAACATGACCTGCGGGCCAGCAGCAGCGTGTATCAG CAGCTACTGCATGTTATCAGCAGCGGAGCGGGCCAGCCCAAGC TGTGGATCTACAGCACCCAGCAGCCTGGCCAGGGGCTGCCAGCCAGA TTTTCGGCAGCGCCAGCGGCACTCCTTCAAGCTGACCATCAGCAG CGTGAAGCCGAGGACCGCCGACCTACTACTGCCAGAGTACAGCG GCTACCCCTGACCTTGGGAGCGGGCACAGGTTGGAATCAAG3'

【 図 2 8 E 】

配列番号	抗体	配列
614	4.0 VH	5' GAGGTGCAGCTGGAGGAGTCAAGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGG GTCCCTAAATCTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTGACCTTTCAGTAATTAT GCCATGTCTTGGTTCGCCAGACTCCGGTAAGCGGCTGGAGTGGGTCG CAACCATTAGTAATGGTGGTATGATACCTACTATCCAGCACTGTGAA GGTCCGTTCACCATCTCCAGAGACATGCCAGAACCTGTCTCTG CAANTGAGCAGTCTGAGGCTGAGGACALGGCCATGATTTACTGTTCAA GACCCCTCAGAGATCCCATTTACTACGCTACTAGCCAGTTTGTCTACTG GGCCAAAGGACCTGTGGTCACTGTCTCTGCA3'
615	4.0 VL	5' GACATTTGCTGACCCAGTCTCCAGGAATCATGTCTGCATCTCCAGG GGAGAAATCCACATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAATTTACATG CATTTGGTACAGCAGAAATCAAGCACCCTCCCCCAAAAGATGGATTTATG ACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTCTCACTGGCAGTGG SFTTGGACCTCTTACTGCTCTCAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAT GCTGSCACTTATTTACTGCAAGATGTGAGTGTAGTCCGCTCACGTTGG GTCTGGACCAAGSTGGAGCTGAAA3'
616	4.1 VH	5' GAGGTGCAGCTGGAGGAGCCTGGAGGACCTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGSCCAGCGGCTTCACTTCAGCAACTAC GCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCTTGGCAAGGAGCTGGAATGGTGGG CCGTGATGACAGACCGCGCAGCTTACAGCTACTACGCCAGCAGCTGAA GGCCGGTTCACCATCAGCCGGACACAGCCAGAACACCCCTGTACTCTG CAGATGAACAGCCTTGGCGGCGAGGACACCGCCGTACTACTGACGCC GGCCAGGCGAGCGGACCTACTACGCCACCCAGCTTGGCTACTG GGCCAGGSCACCTTGTGACAGTGTCCAGC3'
617	4.1 VL	5' GAGATGCTGCTGACCCAGAGCCCGCCACCCCTGTCTCTGAGCCCTGG CGAGAGGCCACCTCGAGCTGCGAGCGCCAGCAGCAGCCTGCTCTACTCT GCCTGTATCAGCAGAGCCCGGCCAGGCCCCAGCAGCGTGGATCTACG ACACAGCAACCGGGCCACCGGCATCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCG CAGCGCACCGACTTACCTGACCATCAGCAGCTTGGAAACCGAGGAC TTCCGCTGTACTACTGCAAGTGTCCAGCAGCCCTGACCTTCCG SCGAGGSCACCAAGSTGGAAATCAAG3'

【 図 2 8 F 】

配列番号	抗体	配列
618	4.2 VH	5' GAGGTGCAGCTGCTGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAAGCAACT ACGCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCCCTGGCAGGGACTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAAGCGGCGGCACTACACTTACTACCCGACAGGG TGAAGCGCCGCTTGCATCAGCGGCGGACAGCGTGAACACCCCTGT ACCTGCAGATGACAGGCTTGGCGGCGGAGGACCCGCTGTACTACT GCTACCGCGCCGACGCGGAGCCACTACTACGCCACAGCAGCTTGG CCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACAGTGTCCAGC3'
619	4.2 VL	5' GAGATGCTGCTGACCCAGAGCCCGCCACCCCTGTCTTGAAGCCTGG GCGAGAGGCCACCTCGAGCTGTAGCGCCAGCAGCAGCTGCTTACATA TGCACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCCAGCCCGCCAGAGCGTGGATCT ACGATACAGCAGCTGGCCAGCGGCTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GCGGCGAGCGGACCGACTACTGCCAGCACTCAGCAGCTGGAAAGCG AGGACTTCCGCACTACTACTGCGCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCGCTGA CCTTCGGAGCCGCGCACCAGSTGGAAATCAAG3'
620	4.3 VH	5' GAGGTGCAGCTGGAAGAGTCCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAAGCAACT AGGCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCCGACAGCGGCTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAAGCGGCGGCACTACACTTACTACCCGACAGGS TGAAGCGCCGCTTGCATCAGCGGCGGACAGCGTGAACACCCCTGT ACCTGCAGATGACAGGCTTGGCGGCGGAGGACCCGCTGTACTACT GCTACCGCGCCGACGCGGAGCCACTACTACGCCACAGCAGCTTGG CCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACAGTGTCCAGC3'
621	4.3 VL	5' GAGATGCTGCTGACCCAGAGCCCGCCACCCCTGTCTTGAAGCCTGG GCGAGAGGCCACCTCGAGCTGTAGCGCCAGCAGCAGCCTGCTTACATA TGCACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCCAGCCCGCCAGAGCGTGGATCT ACGATACAGCAGCTGGCCAGCGGCTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GCGGCGAGCGGACCGACTACTGCCAGCACTCAGCAGCTGGAAAGCG AGGACTTCCGCACTACTACTGCGCAGCAGTGGTCCAGCAGCCCGCTGA CCTTCGGAGCCGCGCACCAGSTGGAAATCAAG3'

【 図 2 8 G 】

配列番号	抗体	配列
622	4.4 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCG GCAGCCTGAGCTGAGCTGTGCGCGCACCGGCTTCACTTCAAGCAACT ACGCCATGAGCTGGTCCGACAGACCCCGCCAGGGGCTTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT TCCAGGCGCGGTTACACCTCAGCCGCGGACACGCCAAGAGACCCCTGA GCCGTGCAGATGTCCAGCCTGAAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACT GCAGCCGGCCAGCGGAGGCCACTACTACGCCACCCAGCAGTGTCCG CCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACCCGTTGCTCT3'
623	4.5 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCG GCAGCCTGAAAGTGAAGTGTGCGCGCACCGGCTTCACTTCAAGCAACT ACGCCATGAGCTGGTCCGACAGACCCCGCCAGGGGCTTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT TCCAGGCGCGGTTACACCTCAGCCGCGGACACGCCAAGAGACCCCTGA GCCGTGCAGATGTCCAGCCTGAAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACT GCAGCCGGCCAGCGGAGGCCACTACTACGCCACCCAGCAGTGTCCG CCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACCCGTTGCTCT3'
624	4.6 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCG GCAGCCTGAAAGTGAAGTGTGCGCGCACCGGCTTCACTTCAAGCAACT ACGCCATGAGCTGGTCCGACAGACCCCGCCAGGGGCTTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT TCCAGGCGCGGTTACACCTCAGCCGCGGACACGCCAAGAGACCCCTGA GCCGTGCAGATGTCCAGCCTGAAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACT GCAGCCGGCCAGCGGAGGCCACTACTACGCCACCCAGCAGTGTCCG CCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACCCGTTGCTCT3'
625	4.7 VH	5' GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGGAGGCGTGAAGAAGCCTGGCG GCAGCCTGAAAGTGAAGTGTGCGCGCACCGGCTTCACTTCAAGCAACT ACGCCATGAGCTGGTCCGACAGACCCCGCCAGGGGCTTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT TCCAGGCGCGGTTACACCTCAGCCGCGGACACGCCAAGAGACCCCTGA GCCGTGCAGATGTCCAGCCTGAAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACT GCAGCCGGCCAGCGGAGGCCACTACTACGCCACCCAGCAGTGTCCG CCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACCCGTTGCTCT3'

【 図 2 8 H 】

配列番号	抗体	配列
626	4.8 VH	5' GAGGTGCAGCTGCTGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GGCAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAAGCAACT CTACGCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCCCTGGCAGGGACTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT AGCCTGAAAGGCGGTTCACTCAGCAGCGGACACAGCAGCAGCAGCAGC CCTGTACTCTGCAAGTGAACAGCTTGGCGGCGGAGGACCCGCGCTGT ACTACTGCAGCCGGCCAGCGGAGCCAGCTACTACGCCACCCAGC CAGTTCGCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACAGTGTCCAGC3'
627	4.9 VH	5' GAGGTGCAGCTGCTGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GGCAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAAGCAACT CTACGCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCCCTGGCAGGGACTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT AGCCTGAAAGGCGGTTCACTCAGCAGCGGACACAGCAGCAGCAGCAGC CCTGTACTCTGCAAGTGAACAGCTTGGCGGCGGAGGACCCGCGCTGT ACTACTGCAGCCGGCCAGCGGAGCCAGCTACTACGCCACCCAGC CAGTTCGCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACAGTGTCCAGC3'
628	4.10 VH	5' GAGGTGCAGCTGCTGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GGCAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAAGCAACT CTACGCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCCCTGGCAGGGACTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT AGCCTGAAAGGCGGTTCACTCAGCAGCGGACACAGCAGCAGCAGCAGC CCTGTACTCTGCAAGTGAACAGCTTGGCGGCGGAGGACCCGCGCTGT ACTACTGCAGCCGGCCAGCGGAGCCAGCTACTACGCCACCCAGC CAGTTCGCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACAGTGTCCAGC3'
629	4.11 VH	5' GAGGTGCAGCTGCTGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GSCAGCCTGAGACTGTCTTGGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAAGCAACT CTACGCCATGAGCTGGTGGCCAGGCCCCCTGGCAGGGACTGGAAATGGG TGGCCACCATCAGCAACCGCGCGCAGCTTACACTACTACCCGACAGCT AGCCTGAAAGGCGGTTCACTCAGCAGCGGACACAGCAGCAGCAGCAGC CCTGTACTCTGCAAGTGAACAGCTTGGCGGCGGAGGACCCGCGCTGT ACTACTGCAGCCGGCCAGCGGAGCCAGCTACTACGCCACCCAGC CAGTTCGCTACTGGGGCCAGGSCACCTTGGTACAGTGTCCAGC3'

【 図 2 8 I 】

配列番号	抗体	配列
630	4.4 VL	5'GACATCGTCTGACCCASAGGCCCGGACGCTGTCTGCCAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGCGAGCCGACGAGCGCTTCTCTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACAGCTGAGCCATCAGCAGCGCTGCAGCCGG AGGAGCGCCGCGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'
631	4.5 VL	5'GACATCGTCTGAGCCAGAGCCCTGAGCGCTGAGCGCGAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGAGCGCCGACGAGCGCTGTCTTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACAGCTGAGCCATCAGCAGCGCTGCAGCCGG AGGAGCGCCGCGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'
632	4.6 VL	5'GACATCGTCTGACCCAGAGCCCGGACGCTGAGCGCGAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGAGCGCCGACGAGCGCTGTCTTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'
633	4.7 VL	5'GACATCGTCTGACCCAGAGCCCGGACGCTGAGCGCGAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGAGCGCCGACGAGCGCTGTCTTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'

【 図 2 8 J 】

配列番号	抗体	配列
634	53.0 VH	5'GAGGTTGACGTGGAGGAGTCAAGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAG GGTCCCTGAAACTCTCTGTGCGAGCCTCTGGATTCACTTTCACTAGCT ATGCCATGCTTTGGGTTCCGAGCCTCCGGAGAGAGGCTGGATGGG TCGCAACCATTAGTCACTGTGGTATACACCTACTATCCAGACAGTG TGAAGGGACGATTCACCATCCAGCAATGCCAAGAACCCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTAGGTTCTGAGGACAGGCCCATGTATTACT GTGCAAGCATCCTTACTACTGTGTAACCTACAGGGGATACTTTGACT ACTGG GGCCAGGGACCACTCTGACAGTCTCTCA3'
635	53.0 VL	5'GACATTTGCTCACCAGTCTCCAGGCAATCAITGTCATCTCTG GGGAGAGGTTACCATGAGCTGAGCGCCGACCTCAGGTGTAATTA TATACTGTTACAGCAGAGAGTCAAGTCCCTCCCCCAACTATGGATTT ATTTACATCCAACTGGCTCTGAGGTTCCAGCTCCCTCAGTGGCA CTGGGTTTGGAGACTTATTTCTCTCAGATCAGCAGATGGAGGGTG AAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTTTACTAGTTCCCGCTACA CCTTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAG3'
636	53.1 VH	5'GAGGTGACGCTGCTGGAAGCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGCCTGCTTGGCGCCGACGCGCTTCACTTCAACAGCT ACGCCATGAGCTGGGTGGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATCAGCAGCGCGGACCTACACTACTACCGCCGACGCG TGAAGGGCCGCTTCACTCAGCCGCGGACACGACAGCAGCAGCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTGGCGCGGAGCAGCCCTGCTACTACT GGCCAGACACCCCTTACAGCGGCACTACCGGGCTACTTGGACT ACTGGGCGCAGGGCACCTGGTGAACAGTTCAG3'
637	53.1 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGGACCTTCTGAGCGCCAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGAGCGCCGACGAGCGCTGTCTTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'

【 図 2 8 K 】

配列番号	抗体	配列
638	53.2 VH	5'GAGGTGACGCTGCTGGAAGCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTTCACTTCAACAGCT ACGCCATGAGCTGGGTGGCCAGGCCCTGGCAGGAGACTGGAATGGG TGGCCCAATCAGCCAGCGCGGACCTACACTACTACCCGACAGCG TGAAGGGCCGCTTCACTCAGCCGCGGACACGCCAAAGAACCCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTGGCGCGGAGCAGCCCTGCTACTACT GGCCAGACACCCCTTACAGCGGCACTACAGGGCTACTTGGACT ACTGGGCGCAGGGCACCTGGTGAACAGTTCAG3'
639	53.2 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGGACCTTCTGAGCGCCAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGAGCGCCGACGAGCGCTGTCTTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'
640	53.3 VH	5'GAGGTGACGCTGGAAGAGTCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTTCACTTCAACAGCT ACGCCATGAGCTGGGTGGCCAGGCCCTGGCAGGAGACTGGAATGGG TGGCCCAATCAGCCAGCGCGGACCTACACTACTACTACCCGACAGCG TGAAGGGCCGCTTCACTCAGCCGCGGACACGCCAAAGAACCCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTGGCGCGGAGCAGCCCTGCTACTACT GGCCAGCAGCCCTTACAGCGGCACTACAGGGCTACTTGGACT ACTGGGCGCAGGGCACCTGGTGAACAGTTCAG3'
641	53.3 VL	5'GACATTCAGCTGACCCAGAGCCCGGACCTTCTGAGCGCCAGCGTGG GGCAGAGGTGACCATGACCTGAGCGCCGACGAGCGCTGTCTTACA TGCACTGCTATCAGCAGAAGCCCGGACACGAGCCCAAGCGGTGGATCT ACGAGCAGCAGAGTGGCCAGCGGCGTCCCGCCAGATTTTCTGGCA GGCCAGCGCCAGCAGCTACTACTGCGAGCAGTGGTCCAGCAGCGCCCTGGA CCTTTGGAGCCCGGACCAAGGTGGAACTCAAG3'

【 図 2 8 L 】

配列番号	抗体	配列
642	53.4 VH	5'GAGGTGACGCTGCTGGAAGCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTTCACTTCAACAGCT ACGCCATGAGCTGGGTGGCCAGGCCCTGGCAGGAGACTGGAATGGG TGGCCCAATCAGCCAGCGCGGACCTACACTACTACCGCCGACAGCG TGAAGGGCCGCTTACACTCAGCCGCGGACACCCCAAGAACCCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTGGCGCGGAGCAGCCCTGCTACTACT GGCCAGACACCCCTTACAGCGGCACTACAGGGCTACTTGGACT ACTGGGCGCAGGGCACCTGGTGAACAGTTCAG3'
643	53.5 VH	5'GAGGTGACGCTGCTGGAAGCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTTCACTTCAACAGCT ACGCCATGAGCTGGGTGGCCAGGCCCTGGCAGGAGACTGGAATGGG TGGCCCAATCAGCCAGCGCGGACCTACACTACTACCGCCGACAGCG TGAAGGGCCGCTTACACTCAGCCGCGGACACCCCAAGAACCCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTGGCGCGGAGCAGCCCTGCTACTACT GGCCAGACACCCCTTACAGCGGCACTACAGGGCTACTTGGACT ACTGGGCGCAGGGCACCTGGTGAACAGTTCAG3'
644	53.6 VH	5'GAGGTGACGCTGCTGGAAGCGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGGCGCCGACGCGGCTTCACTTCAACAGCT ACGCCATGAGCTGGGTGGCCAGGCCCTGGCAGGAGACTGGAATGGG TGGCCCAATCAGCCAGCGCGGACCTACACTACTACCGCCGACAGCG TGAAGGGCCGCTTACACTCAGCCGCGGACACCCCAAGAACCCCTGT ACCTGCAATGAGGAGCTGTGGCGCGGAGCAGCCCTGCTACTACT GGCCAGACACCCCTTACAGCGGCACTACAGGGCTACTTGGACT ACTGGGCGCAGGGCACCTGGTGAACAGTTCAG3'

【 図 2 8 M 】

配列番号	抗体	配列
645	53.4 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GGCAGCAGGTGACCATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCC TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'
646	53.5 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCGCTCGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'
647	53.6 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'
648	53.7 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'

【 図 2 8 O 】

配列番号	抗体	配列
651	82.0 VH	5'GAGTGAAGTGGAGAGTCCGGCCCTGAGGTGCTGGCCCTGGC GTTCCTGTGAGATTCAGTGCAGGGCCAGCCCTACACCTTCCCGA CTACGCCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCAGCCAGATCGAAT GGATCGCCCTGTATCCACCTCAAGCCGCAACCCAGTACACCCG AAGTTCAGGGGCAAGCCACATGACCTGGACAGAGCAGCAGCAGC CCCTACATGGAACCTGGCCGGCTGACCAGGAGGACAGGCGCATCT ACTACTGCGCCCGTTCCTGAGCCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGA GCCGGCACCACCTGACCCGTCTTAGC3'
652	82.0 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'
653	82.1 VH	5'GAGTGAAGTGGAGAGTCCGGCCCTGAGGTGCTGGCCCTGGC GTCAGCTGAGAGGTGTCTGTCAGGGCCAGCGGCTACACCTTCCCGA CTACGCCATGCACTGGGTGAGCAGCCCGCTGACCCAGGACTGGGAT GGATCGCCCTGTATCCACCTCAAGCCGCAACCCAGTACACCCG AAGTTCAGGGGCAAGCCACATGACCTGGACAGAGCAGCAGCAGC CCCTACATGGAACCTGGCCGGCTGACCAGGAGGACAGGCGCATCT ACTACTGCGCCCGTTCCTGAGCCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGA GCCGGCACCACCTGACCCGTCTTAGC3'
654	82.1 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'

【 図 2 8 N 】

配列番号	抗体	配列
649	53.8 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'
650	53.9 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'

【 図 2 8 P 】

配列番号	抗体	配列
655	82.2 VH	5'GAGTGAAGTGGAGAGTCCGGCCCTGAGGTGCTGGCCCTGGC GTCAGCTGAGAGGTGTCTGCAAGGGCCAGCGGCTACACCTTCCCGA ACGCCATGCACTGGTTCGGCCAGCCCTGCGCAGAGNCTGGAATGGA TCGGCTGTATCAGCAGCCTCAAGCCGCAACCCAGTACACCCAGAGT TCAGGGCAGAGCCACATGACCTGGGCAAGAGCCCGCAGCAGCCCT ACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGGAGGACCCGCCATCTACTACT GCGCCCGGTTCCTGAGCCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGAGCCGGCA CCACCCTGACCCGTCTTAGC3'
656	82.2 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'
657	82.3 VH	5'GAGTGAAGTGGAGAGTCCGGCCCTGAGGTGCTGGCCCTGGC GTCAGCTGAGAGGTGTCTGCAAGGGCCAGCGGCTACACCTTCCCGA ACGCCATGCACTGGTTCGGCCAGCCCTGCGCAGAGNCTGGAATGGA TCGGCTGTATCAGCAGCCTCAAGCCGCAACCCAGTACACCCAGAGT TCAGGGCAGAGCCACATGACCTGGGCAAGAGCCCGCAGCAGCCCT ACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGGAGGACCCGCCATCTACTACT GCGCCCGGTTCCTGAGCCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGAGCCGGCA CCACCCTGACCCGTCTTAGC3'
658	82.3 VL	5'GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCTTCCTGAGGCCACGCTGG GCGCAGAGTGAACATCACTGTGCGGGCCAGCAGCGGGCTGAACATCA TCTACTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCT ACTTCACCAGCAACCTGGCCCTGGGGTGCDDAGCAGATTTCCTGGCA CGGGCAGCGCAACAGTACACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCACCCTACTACTGCCAGCAGTTCACCAGCAGCCCTACA CCTTCGGCGAGGACCAAGCTGGAATCAAG3'

【配列表】

0006646100000001.app

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
- (72)発明者 ジェニファー・テッドストーン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01748・ホプキントン・プレザントストリート45ビー
- (72)発明者 トレイシー・ロディー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01534・ノースブリッジ・リンカーンサークル317
- (72)発明者 カレン・ビー・カーター  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01518・フィスクデール・サミットアヴェニュー4
- (72)発明者 ティモシー・ディー・コナーズ  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01545・シュルーズベリー・ロビンロード3
- (72)発明者 ジェイソン・ロバート・ピンクニー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01752・マルボロ・ブロードメドーストリートナンバー7  
87ビー
- (72)発明者 エリザベス・マスタージョン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01749・ハドソン・ブリガムストリート6シー 113
- (72)発明者 ルイイン・チュウ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州08502・ベルミード・ボイスレーン29

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特表2002-513388(JP,A)  
特表2010-517531(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
UniProt / GeneSeq  
CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS /  
WPIDS (STN)  
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)  
PubMed

专利名称(译)	抗cxcr3抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP6646100B2</a>	公开(公告)日	2020-02-14
申请号	JP2018089004	申请日	2018-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	建新公司		
申请(专利权)人(译)	Genzyme公司		
当前申请(专利权)人(译)	Genzyme公司		
[标]发明人	ミシェルユード ジェニファーテッドストーン トレイシーロディー カレンビーカーター テイモシーディーコナーズ ジェysonロバートピンクニー エリザベスマスタージョン ルイインチュウ		
发明人	ミシェル・ユード ジェニファー・テッドストーン トレイシー・ロディー カレン・ビー・カーター テイモシー・ディー・コナーズ ジェyson・ロバート・ピンクニー エリザベス・マスタージョン ルイイン・チュウ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12P21/08 A61K39/395 A61P3/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P3/10 C07K16/2866 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K45/06		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/13 C12P21/08 A61K39/395.N A61P3/10 G01N33/53.D A61K35/12 A61K38 /28 A61K39/395.U A61K45/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/13.ZNA C12N15 /63.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC06 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/BC03 4B065/BD14 4B065/CA25 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA44 4C084/DB34 4C084/MA52 4C084 /MA55 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/ZB082 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085 /CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB64 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/MA56 4C087/MA58 4C087 /MA59 4C087/MA63 4C087/MA65 4C087/NA05 4C087/ZC35 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	61/588936 2012-01-20 US		
其他公开文献	JP2018166506A5 JP2018166506A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本公开提供了抗CXCR3抗体和使用该抗体来诊断和/或治疗与CXCR3相关的疾病例如1型糖尿病 ( T1D ) ，特别是新发T1D的方法。在某些实施方案中，本文公开了CXCR3中和抗体。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号
		特許第6646100号 (P6646100)
(45) 発行日	令和2年2月14日 (2020. 2. 14)	(24) 登録日 令和2年1月14日 (2020. 1. 14)
(5) Int. Cl.	F I	
C O 7 K	16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 P	21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K	39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	3/10 (2006. 01)	A 6 1 P 3/10
		請求項の数 21 (全 84 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-89004 (P2018-89004)	(73) 特許権者 500034653
(22) 出願日	平成30年5月7日 (2018. 5. 7)	ジェンザイム・コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2014-553482 (P2014-553482) の分割	アメリカ合衆国 O 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート 5 0 番
原出願日	平成25年1月18日 (2013. 1. 18)	(74) 代理人 100127926
(65) 公開番号	特願2018-166506 (P2018-166506A)	弁理士 結田 純次
(43) 公開日	平成30年11月1日 (2018. 11. 1)	(74) 代理人 100140132
審査請求日	平成30年5月23日 (2018. 5. 23)	弁理士 竹林 則幸
(31) 優先権主張番号	61/588, 936	(72) 発明者 ミシェル・ユード
(32) 優先日	平成24年1月20日 (2012. 1. 20)	アメリカ合衆国マサチューセッツ州 O 2 4 2 1, レキシントン、センターストリート 1 0
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 抗 C X C R 3 抗体		