

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-533423

(P2019-533423A)

(43) 公表日 令和1年11月21日(2019.11.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-562628 (P2018-562628)
 (86) (22) 出願日 平成29年7月5日 (2017.7.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月26日 (2018.11.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/091839
 (87) 国際公開番号 WO2018/006824
 (87) 国際公開日 平成30年1月11日 (2018.1.11)
 (31) 優先権主張番号 201610527996.0
 (32) 優先日 平成28年7月6日 (2016.7.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)

(71) 出願人 518419208
 シャンハイ ファーマエクスプローラー
 カンパニー, リミティド
 中華人民共和国, シャンハイ 201210,
 チャイナ (シャンハイ) パイロット
 フリー トレード ゾーン, リーピン
 ロード 576, ファーラーティール
 ロード 56, ナンバー 4 ビルディング, ル
 ーム 202
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B L y S 抗体及びその製造方法と応用

(57) 【要約】

本発明は、B L y S 抗体及びその製造方法と応用を開示する。前記B L y S 抗体は、B L y S 抗体の重鎖可変領域重鎖C D R 1、重鎖C D R 2、重鎖C D R 3中の一種又は多種、及び/又は、B L y S 抗体の軽鎖可変領域軽鎖C D R 1、軽鎖C D R 2、軽鎖C D R 3中の一種又は多種を含み、そのアミノ酸配列は、それぞれ本発明に記載の通りである。前記B L y S は、高い親和力を有し、明らかにタンパク質レベル及び細胞レベルで効果的にB L y S タンパク質をブロックし、B L y S タンパク質と受容体との結合を妨げることができる。前記のB L y S 抗体は、ヒトA P R I L など同類タンパク質抗原との交差反応が欠乏し、良好な生物学的活性を有し、それはB L y S 誘導のマウスB細胞の増殖を抑制することができる。したがって、B L y S 発現又は機能異常に関連する疾患を予防又は治療するための薬物の製造に応用される。

【選択図】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B L y S 抗体の相補性決定領域 (C D R) である重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2、重鎖 C D R 3 中の一種又は多種、及び / 又は、B L y S 抗体の軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2 と軽鎖 C D R 3 中の一種又は多種を含み、

前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸 (a m i n o a c i d) 配列は、配列表の配列番号 2、配列番号 10、配列番号 18、配列番号 26、配列番号 34、配列番号 42、配列番号 50、配列番号 58、配列番号 66、配列番号 74、配列番号 82、配列番号 90 又は配列番号 98 に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3、配列番号 11、配列番号 19、配列番号 27、配列番号 35、配列番号 43、配列番号 51、配列番号 59、配列番号 67、配列番号 75、配列番号 83、配列番号 91 又は配列番号 99 に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4、配列番号 12、配列番号 20、配列番号 28、配列番号 36、配列番号 44、配列番号 52、配列番号 60、配列番号 68、配列番号 76、配列番号 84、配列番号 92 又は配列番号 100 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 38、配列番号 46、配列番号 54、配列番号 62、配列番号 70、配列番号 78、配列番号 86、配列番号 94 又は配列番号 102 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7、配列番号 15、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 39、配列番号 47、配列番号 55、配列番号 63、配列番号 71、配列番号 79、配列番号 87、配列番号 95 又は配列番号 103 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8、配列番号 16、配列番号 24、配列番号 32、配列番号 40、配列番号 48、配列番号 56、配列番号 64、配列番号 72、配列番号 80、配列番号 88、配列番号 96 又は配列番号 104 に示されたようであり、

又は、前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 2、配列番号 10、配列番号 18、配列番号 26、配列番号 34、配列番号 42、配列番号 50、配列番号 58、配列番号 66、配列番号 74、配列番号 82、配列番号 90 又は配列番号 98 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3、配列番号 11、配列番号 19、配列番号 27、配列番号 35、配列番号 43、配列番号 51、配列番号 59、配列番号 67、配列番号 75、配列番号 83、配列番号 91 又は配列番号 99 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4、配列番号 12、配列番号 20、配列番号 28、配列番号 36、配列番号 44、配列番号 52、配列番号 60、配列番号 68、配列番号 76、配列番号 84、配列番号 92 又は配列番号 100 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 38、配列番号 46、配列番号 54、配列番号 62、配列番号 70、配列番号 78、配列番号 86、配列番号 94 又は配列番号 102 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7、配列番号 15、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 39、配列番号 47、配列番号 55、配列番号 63、配列番号 71、配列番号 79、配列番号 87、配列番号 95 又は配列番号 103 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

10

20

30

40

50

記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 6 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 2 2 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 2 3 に示され、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 2 4 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3 0 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3 1 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3 2 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3 8 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3 9 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4 0 に示されたようであり、

10

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4 6 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4 7 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4 8 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 5 4 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 5 5 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 5 6 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 2 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 3 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 4 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 0 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 1 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 2 に示されたようであり、

20

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 8 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 9 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 0 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 6 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 7 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 8 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 4 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 5 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 6 に示されたようであり、

30

又は、前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 2 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 3 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 4 に示されたようであることを特徴とする請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

B L y S 抗体の重鎖フレームワーク領域 (F r a m e w o r k a r e a) 及び / 又は軽鎖フレームワーク領域を含むフレームワーク領域をさらに含み、

好ましくは、前記重鎖フレームワーク領域は、ヒト又はマウス抗体重鎖フレームワーク領域であり、及び / 又は、前記軽鎖フレームワーク領域は、ヒト又はマウス抗体軽鎖フレームワーク領域であり、

40

さらに好ましくは、前記重鎖フレームワーク領域は、ヒト由来抗体重鎖フレームワーク領域であり、好ましくは、ヒト生殖細胞系抗体重鎖 V_H エキソン (E x o n) の V_H 1 - 1 8、V_H エキシンの V_H 3 - 7 又は J_H エキシンの J_H - 6、また前記軽鎖フレームワーク領域はヒト由来抗体軽鎖フレームワーク領域であり、好ましくは、人類抗体軽鎖 V_K エキシンの B 3、J_K エキシンの J_K - 4 又は V_K エキシンの A 1 0 であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記 C D R とフレームワーク領域からなる B L y S 抗体の重鎖可変領域及び / 又は B L y S 抗体の軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号

50

1、配列番号9、配列番号17、配列番号25、配列番号33、配列番号41、配列番号49、配列番号57、配列番号65、配列番号73、配列番号81、配列番号89、配列番号97、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号149、配列番号150、配列番号151又は配列番号152に示されたようであり、

前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号5、配列番号13、配列番号21、配列番号29、配列番号37、配列番号45、配列番号53、配列番号61、配列番号69、配列番号77、配列番号85、配列番号93、配列番号101、配列番号147、配列番号148、配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、又は配列番号157に示されたようであることを特徴とする請求項3に記載のタンパク質。

10

【請求項5】

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号5に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号9に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号13に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号17に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号21に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号25に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号29に示されたようであり、

20

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号33に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号37に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号41に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号45に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号49に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号53に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号57に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号61に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号65に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号69に示されたようであり、

30

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号73に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号77に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号81に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号85に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号89に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号93に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号97に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号101に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号140に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号147に示されたようであり

40

、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号140に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号148に示されたようであり、

、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号141に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号147に示されたようであり、

、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号141に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号148に示されたようであり、

50

、
前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 1 に示されたようであり、
また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 6 に示されたようであり、

、
前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 1 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 7 に示されたようであり、
前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 2 に示されたようであり、
また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 5 に示されたようであり、

、
前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 2 に示されたようであり、
また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 6 に示されたようであり、

、
又は前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 2 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 7 に示されたようであることを特徴とする請求項 4 に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記タンパク質は、抗体重鎖定常領域及び / 又は抗体軽鎖定常領域をさらに含むことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト由来又はマウス由来抗体重鎖定常領域であり、
前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト由来又はマウス由来抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする請求項 6 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト由来抗体重鎖定常領域であり、
前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト由来抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする請求項 7 に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記タンパク質は、B L y S 抗体のモノクローナル抗体、抗体全長タンパク質、抗原 - 抗体結合ドメイン (d o m a i n) タンパク質断片、二重特異性抗体、多重特異性抗体、単一鎖抗体、単一ドメイン抗体又は単一ゾーン抗体であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 10】

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質をコード (c o d e) する核酸。

【請求項 11】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 5 、配列番号 1 0 7 、配列番号 1 0 9 、配列番号 1 1 1 、配列番号 1 1 3 、配列番号 1 1 5 、配列番号 1 1 7 、配列番号 1 1 9 、配列番号 1 2 1 、配列番号 1 2 3 、配列番号 1 2 5 、配列番号 1 2 7 、配列番号 1 2 9 、配列番号 1 5 8 、配列番号 1 5 9 、配列番号 1 6 0 、配列番号 1 6 1 、配列番号 1 6 2 、配列番号 1 6 3 、配列番号 1 6 4 、配列番号 1 6 7 、配列番号 1 6 8 、配列番号 1 6 9 又は配列番号 1 7 0 に示されたようであり、

及び / 又は、前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド (n u c l e o t i d e) 配列は、配列表の配列番号 1 0 6 、配列番号 1 0 8 、配列番号 1 1 0 、配列番号 1 1 2 、配列番号 1 1 4 、配列番号 1 1 6 、配列番号 1 1 8 、配列番号 1 2 0 、配列番号 1 2 2 、配列番号 1 2 4 、配列番号 1 2 6 、配列番号 1 2 8 、配列番号 1 3 0 、配列番号 1 6 5 、配列番号 1 6 6 、配列番号 1 7 1 、配列番号 1 7 2 、配列番号 1 7 3 、配列番号 1 7 4 又は配列番号 1 7 5 に示されたようであることを特徴とする請求項 10 に記載の核酸。

【請求項 12】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 5 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 6 に示されたようであり、

10

20

30

40

50

示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 174 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 169 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 175 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 170 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 173 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 170 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 174 に示されたようであり、

又は前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 170 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 175 に示されたようであることをとする請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 13】

請求項 10 乃至 12 のいずれか一項に記載の核酸を含む組換え発現担体。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の組換え発現担体を含む組換え発現形質転換体。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の組換え発現形質転換体を培養し、培養物から B L y S 抗体を獲得する段階を含むことを特徴とする B L y S 抗体の製造方法。

【請求項 16】

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質をインビトロ (in vitro) で被験試料と接触させて、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質と前記被験試料の結合を検出する段階を含むことを特徴とする B L y S タンパク質を過剰発現する細胞の検出方法。

【請求項 17】

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質を活性成分として含むことを特徴とする B L y S タンパク質を過剰発現する細胞を検出するための組成物。

【請求項 18】

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質を活性成分と薬学的に許容される担体として含むことを特徴とする薬物組成物。

【請求項 19】

前記薬物組成物は、0.01～99.99%の請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の前記タンパク質と 0.01～99.99%の薬用担体を含み、前記パーセンテージは、前記薬物組成物の質量パーセンテージであることを特徴とする請求項 18 に記載の薬物組成物。

【請求項 20】

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 18 又は 19 に記載の薬物組成物が B L y S 発現又は機能異常に関連する疾患を予防又は治療するための薬物の製造に应用であって、

好ましくは、前記 B L y S 発現又は機能異常に関連する疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患又は増殖性疾患である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016年7月6日に出願された、出願番号が CN 20161052799 6.0 の中国特許出願に対して優先権を主張する。本出願は、当該中国特許出願の全文を引用する。

【0002】

10

20

30

40

50

本発明は、抗体分野に属し、具体的にはB L y S抗体及びその製造方法と応用に関する。

【背景技術】

【0003】

自己免疫疾患 (Autoimmune disease) は、人体自身の免疫系が自身の正常な器官、組織、細胞を攻撃する疾患である。それは慢性疾患に属し、一旦病気にかかると、人体は弱くなり、完治にならず、制御することしかできない。これは、患者が高い医療費を負担しなければならず、また生活品質が急激に低下されることで患者と彼らの家族、さらには社会に重大な負担を造成する。一般人によく知られている自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus erythematosus, SLE) 又は関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) など様々な疾患がある。SLEは、各種の器官に影響を与えることができ、現在はいつ発症するかを予測することができなく、その自然な病気の経過は、病状の悪化と緩和との交替で多く表現される。SLEの全世界平均有病率は、10万人あたり12 - 39人であり、中国におけるSLEの罹患率は、10万人あたり30 - 70人であり、黒人 (100 / 10万人) に次ぐ世界第二位である。SLEは、通常若い女性に発生され、90%以上の患者は女性である。RAは、主に関節に影響を及ぼす長期の持続性疾患であり、それは、通常関節の発熱、腫脹、痛みを引き起こし、深刻なときには、関節表面の侵襲と破壊を引き起こすことができ、さらには、四肢奇形を引き起こす。統計学によると、関節リウマチの発病率は約0.3%ぐらいである。近年には、中国乃至世界の自己免疫疾患は、徐々に上昇する傾向を示す。中国は国土面積が広く、人口が多いので、この発症率に基づいて算出した患者の数は巨大である。しかし、現在はまだ非常に有効であり、副作用が少なく、特異性が強い介入治療手段を利用して早期にターゲット器官の損傷をブロックして、患者の予後を改善することが欠乏である。

10

20

【0004】

研究によると、自己免疫疾患とB細胞腫瘍の患者において、Bリンパ球刺激因子 (B Lymphocyte stimulator, B L y S) の発現レベルの向上が検出される。例えば、血清中のB L y Sの発現は、全身性エリテマトーデス (SLE) の患者の複数群の患者から、すべて血清中のB L y Sの発現レベルが増加することを見出し、これは自己免疫抗体の生成及び疾患活動性指標に関する。[Stohe et al. 2008 2003, Arthritis Rheum, 48 (12) : 3475; Petii et al. 2008, Arthritis Rheum, 58 (8) : 2453を参照する]。関節リウマチ (RA) の患者の関節液 (Synovial fluid) 中でも高レベルのB L y Sが発見された [Tan et al 2003, Arthritis Rheum, 48 (4) : 982を参照する]。B L y S過剰発現とこれらの自己免疫疾患の臨床表現との相関性は、B L y Sの発現レベルを調節することが、これらの疾患の治療に対する新しい方法になり得ることが示されている。

30

【0005】

B L y Sは、BAFF、THANK、TALL - 1、TNFSF13B又はzTNF4とも言われるが、腫瘍壊死因子 (TNF) リガンドスーパーファミリーのメンバーである [Baker et al. 2003, Arthritis Rheum, 48 (11) : 3253を参照する]。B L y Sは、285個のアミノ酸からなるI型膜貫通タンパク質 (Protein) であり、膜結合型と、切断後に152個のアミノ酸を有する可溶性との二種類の形態が存在する。B L y Sは、単球、マクロファージと樹状細胞で全部発現があり、インターフェロン (Interferon) とインターロイキン10 (Interleukin 10) 刺激により発現レベルが向上される。インビトロで、組換えヒトB L y Sは、B細胞の表面上の主要な受容体と結合することによって、B細胞増殖と抗体分泌を増加することができる。インビボで、組換えヒトB L y Sは、マウスにおいて脾臓増殖を生じることができ、これは主に成熟B細胞の数の増加に起因する。B L y Sのマウスの体内への注射も血清中の抗体濃度の増加ならびにT細胞依存と非依存抗原に対

40

50

する体液性免疫の増加をもたらすことができる。B L y Sの過剰発現は、発現レベルが異常に高い抗体を生成して、S L E、R A及び他の自己免疫疾患をもたらすことができる。

【0006】

近年、モノクローナル抗体薬物は、強い特異性、良好な治癒効果及び小さな副作用の利点のため、腫瘍、自己免疫疾患などの治療にますます広く応用されている。モノクローナル抗体薬物品の全世界年間売上高は、1997年の3億ドルから2012年には663億ドルに増加され、もうバイオ医薬業界で発展速度が一番速く、収益性が一番強い分野の一つになって、広い発展空間を持つ。現在、B L y Sに対するモノクローナル抗体であるB e l i m u m a bは、半世紀以来に最初にF D A承認を受けたS L Eを治療するためのモノクローナル抗体であり、非常に重要な意味を持っている。

10

【0007】

S L Eを治療するためのモノクローナル抗体であるB e l i m u m a bには、まだいくつかの問題があるが、モノクローナル抗体は、シクロホスファミド(C y c l o p h o s p h a m i d e)やホルモン(h O o R r m O o n e)などの免疫抑制剤に比べて、標的化特性を持ち、副作用が明らかに少ない。2022年までにS L Eを治療する薬物の売上高は、39億ドルに達すると予測され、市場の潜在力は巨大である。したがって、新しく、より安全で、より効果的なB L y S抗体に対する抗体を獲得して、S L Eなどの自己免疫疾患を治療することが期待される。

【発明の概要】

【0008】

本発明が解決しようとする技術的課題は、現在、有効で安全なB L y S抗体の欠乏の不足を克服するために、親和力が高く、特異性が強いヒト由来又は全ヒト由来抗体及びその製造方法と応用を提供することである。本発明に記載されたB L y S抗体は、B L y Sとの親和力が高く、B L y Sとその受容体との結合を抑制することができ、ヒトB L y Sに誘導されたマウスB細胞の増殖を抑制することができ、ヒトA P R I LなどのB L y S同族タンパク質抗原との交差反応が欠乏し、したがって、自己免疫疾患又は腫瘍などのB L y S発現又は機能異常に関連する疾患の治療又は予防のための薬物の製造に使用することができる。

20

【0009】

本発明者は、ファージディスプレイ及びハイブリドーマ(H y b r i d o m a)技術を利用して、B L y S抗体のリード抗体を獲得した。またリード抗体の予備生成、精製と同等により、抗体の親和力が高く(親和力 $KD < 5 \times 10^{-9} M$)、B L y Sと受容体の結合を効果的にブロックすることができ、ヒトA R R I Lなど同種のタンパク質抗原と交差反応が欠乏するなど、優れた生物活性のB L y S抗体を獲得した。その後、分子生物学的方法により配列を検出して、B L y S抗体の重鎖可変領域とB L y S抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸(a m i n o a c i d)配列を知ることができた。

30

【0010】

本発明は、単離されたタンパク質を提供し、前記タンパク質は、B L y S抗体の相補性決定領域(C D R又はC D R s)である重鎖C D R 1、重鎖C D R 2、重鎖C D R 3中の一種又は多種、及び/又は、B L y S抗体の軽鎖C D R 1、軽鎖C D R 2、軽鎖C D R 3中の一種又は多種を含み、前記重鎖C D R 1のアミノ酸配列は、配列表の配列番号2、配列番号10、配列番号18、配列番号26、配列番号34、配列番号42、配列番号50、配列番号58、配列番号66、配列番号74、配列番号82、配列番号90又は配列番号98に示されたようであり、前記重鎖C D R 2のアミノ酸配列は、配列表の配列番号3、配列番号11、配列番号19、配列番号27、配列番号35、配列番号43、配列番号51、配列番号59、配列番号67、配列番号75、配列番号83、配列番号91に示されたようであり、又は配列番号99に示されたようであり、前記重鎖C D R 3のアミノ酸配列は、配列表の配列番号4、配列番号12、配列番号20、配列番号28、配列番号36、配列番号44、配列番号52、配列番号60、配列番号68、配列番号76、配列番号84、配列番号92又は配列番号100に示されたようであり、前記軽鎖C D R 1のア

40

50

R3のアミノ酸配列は、配列表の配列番号80に示されたようであり、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列は、配列表の配列番号86に示されたようであり、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列は、配列表の配列番号87に示されたようであり、また前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列は、配列表の配列番号88に示されたようであり、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列は、配列表の配列番号94に示されたようであり、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列は、配列表の配列番号95に示されたようであり、また前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列は、配列表の配列番号96に示されたようであり、又は前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列は、配列表の配列番号102に示されたようであり、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列は、配列表の配列番号103に示されたようであり、また前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列は、配列表の配列番号104に示されたようである。好ましくは、前記タンパク質は、前記CDRとフレームワーク領域(Framework area)からなるBLYS抗体の重鎖可変領域及び/又はBLYS抗体の軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1、配列番号9、配列番号17、配列番号25、配列番号33、配列番号41、配列番号49、配列番号57、配列番号65、配列番号73、配列番号81、配列番号89又は配列番号97に示されたようであり、前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号5、配列番号13、配列番号21、配列番号29、配列番号37、配列番号45、配列番号53、配列番号61、配列番号69、配列番号77、配列番号85、配列番号93又は配列番号101に示されたようである。

10

【0012】

本発明は、単離されたタンパク質を提供し、前記タンパク質は、BLYS抗体の重鎖可変領域及び/又はBLYS抗体の軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1、配列番号9、配列番号17、配列番号25、配列番号33、配列番号41、配列番号49、配列番号57、配列番号65、配列番号73、配列番号81、配列番号89又は配列番号97に示されたようであり、前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号5、配列番号13、配列番号21、配列番号29、配列番号37、配列番号45、配列番号53、配列番号61、配列番号69、配列番号77、配列番号85、配列番号93又は配列番号101に示されたようである。

20

【0013】

好ましくは、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号5に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号9に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号13に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号17に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号21に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号25に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号29に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号33に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号37に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号41に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号45に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号49に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号53に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号57に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号61に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号65に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号69に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号73に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号77に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号81に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号85に示されたようであり、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配

30

40

50

列表の配列番号 89 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 93 に示されたようであり、又は前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 97 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 101 に示されたようである。

【0014】

本領域において、抗体と抗原との結合は、すべて 1 本の軽鎖可変領域及び 1 本の重鎖可変領域を含み、一つごとの可変領域は、すべて CDR1 と、CDR2 と、CDR3 との三つのドメイン (domain) を含む。

【0015】

前述の内容を要約すると、前記アミノ酸配列の番号は表に示されたようである。

10

【表 1】

表 1 B L y S 抗体アミノ酸配列番号

クローン(clone) 番号	重鎖タンパク質				軽鎖タンパク質			
	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3
2-1G11	1	2	3	4	5	6	7	8
L9G7	9	10	11	12	13	14	15	16
L1D12	17	18	19	20	21	22	23	24
35E6F7C3	25	26	27	28	29	30	31	32
8E7D9C7F5	33	34	35	36	37	38	39	40
20D1B6E9E5	41	42	43	44	45	46	47	48
78C11D2D12	49	50	51	52	53	54	55	56
89A2G5E7	57	58	59	60	61	62	63	64
97E7B3F2	65	66	67	68	69	70	71	72
97A3C2H4	73	74	75	76	77	78	79	80
67A2E1D10	81	82	83	84	85	86	87	88
111D10D6G3	89	90	91	92	93	94	95	96
93C6F10D3	97	98	99	100	101	102	103	104

20

【0016】

ここで、表 1 中の数字は配列表の配列番号であり、2-1G11 の重鎖タンパク質可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 であり、2-1G11 の重鎖タンパク質可変領域において、CDR1 のアミノ酸配列を配列は、配列番号 2 に示されたようである。

30

【0017】

本発明の単離されたタンパク質は、さらに B L y S 抗体のフレームワーク領域を (又はフレーム領域又は骨格領域と称する) を含んでもよく、前記フレームワーク領域は、重鎖フレームワーク領域及び / 又は軽鎖フレームワーク領域を含み、好ましくは、前記重鎖フレームワーク領域は、ヒト又はマウス抗体の重鎖フレームワーク領域であり、及び / 又は、前記軽鎖フレームワーク領域は、ヒト又はマウス抗体の軽鎖フレームワーク領域である。

40

【0018】

さらに好ましくは、本発明の単離されたタンパク質がヒト由来抗体又は全ヒト由来抗体である時、前記重鎖フレームワーク領域はヒト由来抗体の重鎖フレームワーク領域であり、ヒト由来抗体の重鎖フレームワーク領域残基は、生殖細胞系の DP4、DP7、DP8、DP9、DP10、DP14 (V_H1-18)、DP31、DP33、DP35 (V_H3-11)、DP45、DP46、DP47、DP48、DP49 (V_H3-30)、DP50、DP51 (V_H3-48)、DP53、DP54 (V_H3-7)、DP65、DP66、DP67、DP68 と DP69、特にこれらの生殖細胞系の FR1、FR2、FR3、及び JH 断片 J_H-1、J_H-2、J_H-3、J_H-4、J_H-4b、J_H-5 と J_H-6、特にこれらの生殖細胞系の FR4 配列によってコード (code) される、又

50

は重鎖フレームワーク領域の共有配列を含むことができる。前記軽鎖フレームワーク領域は、ヒト由来抗体軽鎖フレームワーク領域であり、ヒト由来抗体軽鎖フレームワーク領域残基は、生殖細胞系のO2、O12、DPK1(O18)、DPK2、DPK3、DPK4、DPK5、DPK6、DPK7、DPK8、DPK9、DPK10、DPK12(A2)、DPK13、DPK15、DPK16、DPKI8、DPK19、DPK20、DPK21、DPK22、DPK23、DPK24(B3)、DPK25、DPK26(A10)とDPK28、特に、これらの生殖細胞系のFR1、FR2、FR3、及びJK断片JK1、JK2、JK3、JK4とJK5、特にこれらの生殖細胞系のFR4配列によってコードされる配列を含むことができる。そのようなフレームワーク領域配列は、生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベース又は公開されたDNAデータベースから得ることができる。たとえば、ヒト重鎖と軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系DNA配列及びは、「VBase」ヒト生殖細胞系配列データベース(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>)から獲得することができ、及びKabata(EAなどの諸人、1991 Sequences of Immunological Interest、第5版)で見つけることができる。本発明のヒト化抗体のある好ましい実施例において、重鎖フレームワーク領域残基は、ヒト生殖細胞系抗体重鎖V_HエクソンのV_H1-18、V_HエクソンのV_H3-7又はJ_Hエキソン(Exon)のJ_H-6であることが好ましく、軽鎖フレームワーク領域残基は、ヒト生殖細胞系抗体軽鎖のV_KエクソンのB3、J_KエクソンのJ_K-4又は外側V_KエクソンのA10であることが好ましい。

10

20

【0019】

好ましくは、タンパク質は、抗体重鎖定常領域及び/又は抗体軽鎖定常領域を含み、前記抗体重鎖定常領域は当該技術分野の通常のものであり、好ましくは、マウス由来抗体重鎖定常領域又はヒト由来抗体重鎖定常領域であり、さらに好ましくは、ヒト由来抗体重鎖定常領域である。前記抗体軽鎖定常領域は当該技術分野の通常のものであり、好ましくは、マウス由来抗体軽鎖定常領域又はヒト由来抗体軽鎖定常領域であり、さらに好ましくは、ヒト由来抗体軽鎖定常領域である。

【0020】

ここで、アミノ酸配列は、配列番号25、33、41、49、57、65、73、81、89又は97に示された重鎖可変領域及び配列は、配列番号29、37、45、53、61、69、77、85、93又は101に示されるようである可変領域は、マウス由来重鎖定常領域及びマウス由来軽鎖定常領域とマウス化BlyS抗体を構成することができ、ヒト由来重鎖定常領域及びマウス由来軽鎖定常領域とBlySキメラ抗体(Chimeric antibody)を構成することができる。

30

【0021】

さらに、前記キメラ抗体において、アミノ酸配列は、配列番号25、33、41、49、57、65、73、81、89又は97に示された重鎖可変領域において、Kabata定義に従って決定された配列は、配列番号26-28、34-36、42-44、50-52、58-60、66-68、74-76、82-84、90-92又は98-100に示されたようである重鎖CDR及び前記配列は、配列番号29、37、45、53、61、69、77、85、93又は101の軽鎖可変領域において、Kabata定義に従って決定された配列は、配列番号30-3238-40、46-48、54-56、62-64、70-72、78-80、86-88、94-96又は101に示されたようである軽鎖CDRをそれぞれ選択されたヒト生殖細胞系鋳型に移植して、ヒト生殖細胞系鋳型のCDR領域を置き換えて、ヒト化抗体を得て、前記生殖細胞系鋳型の中の軽鎖フレームワーク領域と重鎖フレームワーク領域は前記のようであり、好ましくは、それぞれヒト生殖細胞系抗体の重鎖V_HエキソンのV_H1-18、V_HエキソンのV_H3-7、J_HエキソンのJ_H-6及び生殖細胞系抗体の軽鎖V_KエクソンのB3、J_KエクソンのJ_K-4とV_KエクソンのA10から選ばれる。選択的に、抗体活性を保証するために、マウス由来の抗体の三次元構造に基づいて、埋め込まれた残基、CDR領域と直接に相互作用する

40

50

残基及びV_HとV_L構想について重要な影響を与えるフレームワーク領域の残基に対して復帰変異を行う。

【0022】

好ましくて、前記CDR領域が選択されたヒト生殖細胞系の鋳型に移植され、またフレームワーク領域の残基が復帰変異を経過した後の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号149、配列番号150、配列番号151又は配列番号152に示されたようであるのが好ましく、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号147、配列番号148、配列番号153、配列番号154、配列番号155、N156、又は配列番号157に示されたようであるのが好ましい。

10

【0023】

配列は、配列番号1、9又は17に示されたようである重鎖可変領域及び配列は、配列番号5、13又は21に示されたようである軽鎖可変領域は、ヒト由来抗体の重鎖定常領域及びヒト由来抗体の軽鎖定常領域と完全ヒト由来B_Ly_S抗体を構成することができる。

【0024】

前記タンパク質は、抗体タンパク質を指し、好ましくは、それは抗体全長タンパク質、抗原-抗体結合ドメインのタンパク質断片、二重特異性抗体、多重特異性抗体、単鎖抗体(Single chain antibody fragment, scFv)、シングルドメイン抗体(Single domain antibody, sdAb)、シングル領域抗体(Single domain antibody)の中の一つ又は多種であり、及び前記抗体から製造されたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。前記モノクローナル抗体は、複数の経路とハイブリドーマ技術、ファージディスプレイ技術、単一リンパ球遺伝子クローニング技術などを含む技術によって開発されるが、主流としては、ハイブリドーマ技術によって、野生型又は遺伝子導入マウスからモノクローナル抗体を製造することである。

20

【0025】

前記抗体全長タンパク質は、当該技術分野における通常の抗体全長タンパク質であり、それは、重鎖可変領域と、軽鎖可変領域と、重鎖定常領域と、軽鎖定常領域とを含む。前記タンパク質の重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、ヒト由来重鎖定常領域とヒト軽鎖定常領域は完全ヒト由来の抗体全長タンパク質を構成する。好ましくは、抗体全長タンパク質は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4である。

30

【0026】

前記一本鎖抗体は、当該技術分野における通常の本鎖抗体であり、それは、重鎖可変領域と、軽鎖可変領域と、15~20個アミノ酸の短いペプチドとを含む。

【0027】

前記タンパク質断片の抗原-抗体結合ドメインのタンパク質断片は、当該技術分野における通常の抗原-抗体結合ドメインのタンパク質断片であり、それは、軽鎖可変領域と、軽鎖定常領域と、重鎖定常領域のFd断片とをふくむ。好ましくは、前記抗原-抗体結合ドメインのタンパク質断片はFabとF(ab')₂である。

40

【0028】

前記単ドメイン抗体は、当該技術分野における通常の単ドメイン抗体であり、それは、重鎖可変領域と重鎖定常領域とを含む。

【0029】

前記単一領域抗体は、当該技術分野における通常の単一領域抗体あり、それは、重鎖可変領域のみを含む。

【0030】

ここで、タンパク質の製造方法は、当該技術分野における通常の製造方法である。前記製造方法は、好ましくは、タンパク質を組換え発現する発現形質転換体から単離して獲得するか、又は人工的にタンパク質を合成することによって獲得される。前記タンパク質を

50

組換え発現する発現形質転換体から単離して獲得する方法は、前記タンパク質をコードし、点突然変異を有する核酸分子を組換え担体中にクローンして、得られた組換え担体を形質転換体に形質転換させて、組換え発現の形質転換体を得られ、得られた組換え発現の形質転換体を培養することにより、前記当タンパク質を単離精製して、獲得することができる。

【0031】

本発明は、前記タンパク質をコードする核酸をさらに提供する。

【0032】

好ましくは、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド (nucleotide) 配列は、配列表の配列番号105、配列番号107、配列番号109、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127又は配列番号129に示されたようであり、及び/又は、前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号106、配列番号108、配列番号110、配列番号112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128又は配列番号130に示されたようである。

10

【0033】

さらに好ましくは、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号105に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は配列番号106に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号107に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号108に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号109に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号110に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号111に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号112に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号113に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号114に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号115に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸の塩基配列は、配列表の配列番号116に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号117に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸の塩基配列は、配列表の配列番号118に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号119に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号120に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号121に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号122に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号123に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号124に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126に示されたようであり、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号128に示されたようであり、又は前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の配列表に示されたようである。

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

前述の内容を要約すると、前記ヌクレオチド配列の番号は表 2 に示されたようである。

【 表 2 】

表 2 B L y S 抗体遺伝子のヌクレオチド配列番号

クローン番号	重鎖タンパク質可変領域	軽鎖タンパク質可変領域
2-1G11	105	106
L9G7	107	108
L1D12	109	110
35E6F7C3	111	112
8E7D9C7F5	113	114
20D1B6E9E5	115	116
78C11D2D12	117	118
89A2G5E7	119	120
97E7B3F2	121	122
97A3C2H4	123	124
67A2E1D10	125	126
111D10D6G3	127	128
93C6F10D3	129	130

10

20

【 0 0 3 5 】

ここで、表 2 中の数字は、配列表の配列番号であり、例えば 2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 0 5 であり、2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質のアミノ酸配列のヌクレオチド配列は、配列番号 1 0 6 である。

【 0 0 3 6 】

2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 5 の 7 6 位乃至 1 0 5 位であり、

30

2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 5 の 1 4 8 位乃至 1 9 8 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 5 の 2 9 5 位乃至 3 4 2 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 6 の 7 0 位乃至 1 0 2 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 6 の 1 4 8 位乃至 1 6 8 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 6 の 2 6 5 位乃至 2 9 1 位であり、

40

L 9 G 7 をコードする重鎖可変領域の C D R 1 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 7 の 7 6 位乃至 1 0 5 位であり、

L 9 G 7 をコードする重鎖可変領域の C D R 2 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 7 の 1 4 8 位乃至 1 9 8 位であり、

L 9 G 7 をコードする重鎖可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 7 の 2 9 5 位乃至 3 4 2 位であり、

L 9 G 7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 8 の 7 0 位乃至 1 0 2 位であり、

L 9 G 7 の軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 8 の 1 4 8 位乃至 1 6 8 位であり、

50

L 9 G 7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 8 の 2 6 5 位乃至 2 9 1 位であり、

L 1 D 1 2 をコードする重鎖可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 9 の 7 6 位乃至 1 0 5 位であり、

L 1 D 1 2 をコードする重鎖可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 9 の 1 4 8 位乃至 1 9 5 位であり、

L 1 D 1 2 をコードする重鎖可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 0 9 の 2 9 2 位乃至 3 3 0 であり、

L 1 D 1 2 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 0 の 6 7 位乃至 9 9 位であり、

L 1 D 1 2 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 0 の 1 4 5 位乃至 1 6 5 位であり、

L 1 D 1 2 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 0 の 2 6 2 位乃至 2 9 7 位であり、

3 5 E 6 F 7 C 3 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 1 の 7 6 位乃至 1 0 5 位であり、

3 5 E 6 F 7 C 3 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 1 の 1 4 8 位乃至 1 9 8 位であり、

3 5 E 6 F 7 C 3 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 1 の 2 9 5 位乃至 3 2 1 位にあり、

3 5 E 6 F 7 C 3 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 2 の 7 0 位乃至 9 9 位であり、

3 5 E 6 F 7 C 3 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 2 の 1 4 5 位乃至 1 6 5 位であり、

3 5 E 6 F 7 C 3 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 2 の 2 6 2 位乃至 2 8 8 位までであり、

8 E 7 D 9 C 7 F 5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 3 の 7 6 位乃至 1 0 5 位であり、

8 E 7 D 9 C 7 F 5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 3 の 1 4 8 位乃至 1 9 8 位であり、

8 E 7 D 9 C 7 F 5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 3 の 2 9 5 位乃至 3 4 2 位であり、

8 E 7 D 9 C 7 F 5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 4 の 7 0 位乃至 1 1 4 位であり、

8 E 7 D 9 C 7 F 5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 4 の 1 6 0 位乃至 1 8 0 位であり、

8 E 7 D 9 C 7 F 5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 4 の 2 7 7 位乃至 3 0 3 位までである。

2 0 D 1 B 6 E 9 E 5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 5 の 7 6 位乃至 1 0 5 位であり、

2 0 D 1 B 6 E 9 E 5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 5 の 1 4 8 位乃至 1 9 8 位であり、

2 0 D 1 B 6 E 9 E 5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 5 の 2 9 5 位乃至 3 3 9 位であり、

2 0 D 1 B 6 E 9 E 5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 6 の 7 0 位乃至 1 1 7 位であり、

2 0 D 1 B 6 E 9 E 5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 1 1 6 の 1 6 3 位乃至 1 8 3 位であり、

2 0 D 1 B 6 E 9 E 5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 6 の 2 8 0 位乃至 3 0 6 位であり、

10

20

30

40

50

78C11D2D12をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号117の76位乃至105位であり、

78C11D2D12をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列番号117の配列表の148位乃至198位であり、

78C11D2D12をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号117の295位乃至315に由来する、

78C11D2D12をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号118の70位乃至99位であり、

78C11D2D12をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号118の145位乃至165位であり、

78C11D2D12をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号118の262位乃至288位であり、

89A2G5E7をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号119の76位乃至105位であり、

89A2G5E7をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号119の148位乃至195位であり、

89A2G5E7をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号119の292位乃至327位であり、

89A2G5E7をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号120の70位乃至105位であり、

89A2G5E7をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号120の151位乃至第171位であり、

89A2G5E7をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号120の268位乃至294位であり、

97E7B3F2をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号121の76位乃至105位であり、

97E7B3F2をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号121の148位乃至198位であり、

97E7B3F2をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号121の295位乃至321位であり、

97E7B3F2をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号122の70位乃至117位であり、

97E7B3F2をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号122の163位乃至183位であり、

97E7B3F2をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号122の280位乃至306位であり、

97A3C2H4をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号123の76位乃至105位であり、

97A3C2H4をコードする重鎖可変領域のCDR2ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号123の148位乃至198位であり、

97A3C2H4をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号123の295位乃至327位であり、

97A3C2H4をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号124の70位乃至102位であり、

97A3C2H4をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号124の148位乃至168位であり、

97A3C2H4をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号124の265位乃至291位までである。

67A2E1D10をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125の76位乃至105位であり、

10

20

30

40

50

67A2E1D10をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125の148位乃至198位であり、

67A2E1D10をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125の位置295位乃至333位であり、

67A2E1D10をコードするタンパク質軽鎖タンパク可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126の70位乃至102位であり、

67A2E1D10をコードするタンパク質軽鎖タンパク可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126の148位乃至168位であり、

67A2E1D10をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126の265位乃至291位であり、

111D10D6G3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127の76位乃至105位であり、

111D10D6G3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127の148位乃至198位であり、

111D10D6G3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127の295位乃至309位であり、

111D10D6G3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号128の102位乃至70であり、

111D10D6G3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号128の148位乃至168位であり、

111D10D6G3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列番号128の265位乃至291であり、

93C6F10D3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129の76位乃至105であり、

93C6F10D3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129の148位乃至198位であり、

93C6F10D3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129の295位乃至336位であり、

93C6F10D3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の70位乃至102位であり、

93C6F10D3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の148位乃至168であり、

93C6F10D3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の265位乃至291である。

【0037】

本発明の好ましい実施例においては、前記ヒトによりフレームワーク領域が改造された本発明のヒト由来抗体の重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号158、配列番号160、161、配列番号：配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号167、配列番号168、N169又は配列番号170に示されたようであり、及び/又は前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号165、配列番号166、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、又は配列番号175に示されたようである。

【0038】

前記核酸の製造方法は、当該技術分野における通常の製造方法であり、好ましくは、遺伝子クローニング技術によって前記タンパク質をコードする核酸分子を獲得する段階と、又は人工的に完全配列を合成する方法により、前記タンパク質をコードする核酸分子を得る段階とを含む。

【0039】

当業者は、前記タンパク質のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、適切な置換、欠失、変更、挿入又は付加により、一つのポリヌクレオチドのホモログを提供するこ

10

20

30

40

50

とができることを認識する。本発明において、ポリヌクレオチドのホモログは、タンパク質配列をコードする遺伝子の1つ又は複数の塩基に対して、抗体の活性を維持する範囲内で置換、欠失又は付加することによって製造することができる。

【0040】

ここで、組換え発現担体は、当該技術分野における通常の方法により得ることができ、すなわち、本発明の核酸分子は、様々な発現担体に連結されて構築された。前記発現担体は、当該技術分野の通常のような担体であり、前記核酸分子を収容することができればよい。前記担体は、種々のプラスミド(plasmids)、コスミド(cosmids)、バクテリオファージ(bacteriophages)又はウイルス担体(viral vectors)などを含むのが好ましい。

10

【0041】

本発明は、前記組換え発現担体を含む組換え発現形質転換体をさらに提供する。

【0042】

ここで、前記組換え発現形質転換体の製造方法は、当該分野で通常の方法であり、前記組換え発現担体を宿主細胞に形質転換させて製造することが好ましい。前記宿主細胞は、当該分野で常用される種々の宿主細胞であり、組換え発現担体を安定的に自己複製させることができ、また細胞内にキャリアされた前記核酸を効率的に発現することができればよい。好ましくは、前記宿主細胞は、E.coli TG1又はE.coli BL21細胞(一本鎖抗体又はFab抗体を発現する)又はHEK293又はCHO-K1細胞(全長IgG抗体を発現する)である。前記組換え発現プラスミドを宿主細胞に形質転換し、本発明の好ましい組換え発現形質転換体を得ることができる。ここで、前記形質転換法は、当該分野で通常の方法であり、好ましくは化学的形質転換法、熱ショック法又は電氣的形質転換法である。

20

【0043】

本発明は、前記組換え発現形質転換体を培養し、当該培養物からBlyS抗体を獲得する段階を含む、BlyS抗体の製造方法をさらに提供する。

【0044】

本発明は、前記タンパク質をインビトロ(in vitro)で被験試料と接触させ、前記タンパク質と前記被験試料の結合を検出する段階を含むBlySタンパク質を過剰発現する細胞を検出する方法をさらに提供する。

30

【0045】

前記過剰発現の意味は、当該技術分野の通常的な意味であり、BlySタンパク質が被験試料中のRNA又はタンパク質の過剰発現を意味する(転写の増加、転写後プロセッシング、翻訳、翻訳後プロセッシング、及びタンパク質分解の変化のため)及びタンパク質の輸送モードの変化(核局在の増加)のため局所的過剰発現の増加と機能活性の向上(例えば、基質の酵素加水分解の作用が増加した場合)が起こる。

【0046】

本発明において、前記結合の検出方法は、当該技術分野の通常的な検出方法であり、好ましくは、蛍光励起細胞ソーティング(FACS、Fluorescence excited cell sorting)検出である。

40

【0047】

本発明は、前記タンパク質を活性成分として含むBlySタンパク質を過剰発現する細胞を検出するための組成物を提供する。好ましくは、前記タンパク質の機能的断片を活性成分とする化合物をさらに含む。

【0048】

本発明は、医薬品の製造における前記タンパク質の応用を提供する。

【0049】

好ましくは、前記薬物は、BlySの発現又は機能異常に関連する疾患を予防又は治療するための医薬である。

【0050】

50

本発明において、前記 B L y S の発現又は機能異常に関連する疾患は、当該技術分野の通常的な B L y S の発現又は機能異常に関連する疾患である。好ましくは、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患又は増殖性疾患である。本発明において、前記自己免疫疾患は、当該技術分野の通常的な自己免疫疾患であり、好ましくは、全身性紅斑性狼瘡 (S L E)、関節リウマチ (R A)、シェーグレン症候群 (S S)、多発性硬化症 (M S)、重症筋無力症 (M G)、慢性甲状腺炎又は免疫不全症候群である。本発明において、前記炎症性疾患は、当該技術分野の通常的な炎症性疾患である、好ましくは、喘息又は過敏症である。本発明において、前記感染性疾患は、当該技術分野の通常的な感染性疾患であり、好ましくは、後天性免疫不全症候群 (A I D S) を得るものである。本発明において、前記増殖性疾患は、当該技術分野の通常的な増殖性疾患であり、好ましくは、白血病、腫瘍又はリンパ腫である。

10

【 0 0 5 1 】

本発明は、前記タンパク質を活性成分として含む薬物組成物を提供する。

【 0 0 5 2 】

好ましくは、前記薬物組成物は、B L y S 発現又は機能異常に関連する疾患を予防又は治療するための薬物組成物である。

【 0 0 5 3 】

本発明による薬物組成物の投与経路は、好ましくは、注射によって投与されたり、又は経口投与される。前記注射投与は、好ましくは、静脈注射、筋肉注射、腹腔注射、皮内注射又は皮下注射などの経路を含む。前記薬物組成物は、当該分野の通常的な種々の製剤であり、好ましくは固体、半固体又は液体の形式であり、水溶液、非水溶液又は懸濁液であってもよいし、より好ましくは、錠剤、カプセル、顆粒剤、注射剤又は注入剤である。

20

【 0 0 5 4 】

本発明において、好ましくは、本発明の薬物組成物は、1種又は多種の薬用担体をさらに含む。前記薬用担体は、当該技術分野の通常的な薬用担体であり、前記薬用担体は、任意の適切な生理学的又は薬学的に許容される薬物補助剤であってもよい。前記薬物補助剤は、当該技術分野の通常的な薬物補助剤であり、好ましくは、薬学的に許容される薬物賦形剤、充填剤、希釈剤などを含む。より好ましくは、薬物組成物は、0.01~99.99%の前記タンパク質と0.01~99.99%の薬用担体を含み、前記パーセンテージは、前記薬物組成物の質量パーセンテージである。

30

【 0 0 5 5 】

本発明において、好ましくは、前記薬物組成物の使用量は、有効量であり、前記有効量は、疾患を緩和又は遅延させることができ、変性又は外傷性疾患の発展の量である。前記有効量は、個々に基づいて決定することができ、治療症状及び求められる結果の検討に部分的に基づいている。当業者は、個体の基礎などの前記の因子を使用することと、通常的な実験を超えない実験を使用することによって、有効量を決定することができる。

【 0 0 5 6 】

本発明は、B L y S 発現又は機能不全に関連する疾患を予防又は治療するための薬物の製造における前記タンパク質の応用を提供する。好ましくは、前記 B L y S 発現又は機能不全に関連する疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患又は増殖性疾患である。

40

【 0 0 5 7 】

本発明は、B L y S 発現又は機能不全に関連する疾患の予防又は治療のための薬物の製造における前記薬物組成物の応用を提供する。好ましくは、前記 B L y S 発現又は機能不全に関連する疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患又は増殖性疾患である。

【 0 0 5 8 】

当該分野における常識に合致する基礎に、前記の好ましい条件を任意に組み合わせて、本発明のそれぞれ好ましい実施例を得ることができる。

【 0 0 5 9 】

本発明で使用される試薬と原料は全部市販されている。

【 0 0 6 0 】

50

本発明の進歩的な効果は、本発明の前記タンパク質は、ヒト化又は完全ヒト B L y S 抗体であり、B L y S タンパク質と高親和性（親和性 $KD(5 \times 10^{-9} M)$ ）を有し、タンパク質と細胞レベルで B L y S タンパク質を効果的にブロックすることができ、B L y S タンパク質と受容体の結合を阻止する。前記 B L y S 抗体は、ヒト A P R I L など同類タンパク質抗原との交差反応が欠乏する。B 細胞増殖実験は、前記 B L y S 抗体は良好な生物学的活性を有するし、B L y S 誘導の小鼠 B 細胞の増殖を抑制することができることを証明した。マウスにおけるインビボ (i n v i v o) 試験は、前記 B L y S 抗体が、B L y S タンパク質により引き起こされるマウス脾細胞における B 細胞の割合の増加を減少させることができることを証明した。したがって、前記 B L y S 抗体は、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患、又は増殖性疾患などの B L y S 発現又は機能不全に関連する疾患を検出、診断、治療又はスクリーニングするために単独又は他の薬物と組み合わせて使用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0061】

以下に、本発明の特徴及び利点を、添付した図面を参照して説明される。

【0062】

【図1】精製された h B L y S - E C D の生物活性を検出した結果図であり、ここで、R L U は相対光単位を表す。

【図2 A - B】C H O - K 1 組換え細胞株 B L y S タンパク質の発現レベルを蛍光励起細胞ソーティング分析方法によって検出した結果を示す。ここで、2 C 4 はクローン番号を表し、4 C 4 はクローン番号を表し、抗体は、B L y S 抗体 (e B i o s c i e n c e から購入) を指し、陰性対照はアイソタイプ (I s o t y p e) 抗体対照を指す。

20

【図3】免疫原免疫後の B A L B / c と S J L マウスの血清抗体力価を E L I S A によって検出した結果図である。

【図4】h B L y S - E C D 活性を酵素結合免疫吸着アッセイ (A s s a y) によって検出した結果図である。

【図5 A - B】酵素結合免疫吸着アッセイにおける B L y S 精製抗体とビオチン (B i o t i n) 化された h B L y S - E C D との反応性活性の結果図である。

【図6 A - B】B L y S 精製抗体と B L y S 同じ家族 A P R I L タンパク質との反応を酵素結合免疫吸着アッセイによって検出した結果図である。

30

【図7】B L y S 精製抗体とヒト B L y S 組み換え細胞の反応性活性を蛍光励起細胞ソーティング分析実験によって検出した結果図である。

【図8】B L y S 精製抗体とサル B L y S 組み換え細胞の反応性活性を蛍光励起細胞ソーティング分析実験によって検出した結果図である。

【図9 A - B】B L y S 精製抗体が B L y S 受容体 B A F F R とビオチン化の h B L y S - E C D の結合活性をブロックする結果図である。

【図10】B L y S 精製抗体が h B L y S - E C D で刺激したマウス B 細胞の増殖の阻害作用に対する結果図である。

【図11】B L y S 精製抗体がマウス B L y S で刺激したマウス B 細胞の増殖の阻害作用に対する結果図である。

40

【図12】酵素結合免疫吸着アッセイにおける B L y S キメラ抗体とビオチン化された h B L y S - E C D との反応性活性の結果図である。

【図13】B L y S キメラ抗体が B L y S 受容体 B A F F R とビオチン化の h B L y S - E C D の結合活性をブロックする結果図である。

【図14】B L y S キメラ抗体が h B L y S - E C D で刺激したマウス B 細胞の増殖の阻害作用に対する結果図である。

【図15 A - C】B L y S キメラ抗体及び完全ヒト由来抗体が h B L y S - E C D 刺激後の脾細胞におけるマウス B 細胞の割合に対する影響の結果図である。

【図16】酵素結合免疫吸着アッセイにおける、B L y S ヒト化抗体とビオチン化の h B L y S - E C D との反応性活性の結果図である。

50

【図17】BLySヒト化抗体がBLyS受容体BAFFRとビオチン化のhBLyS-ECDの結合活性をブロックする結果図である。

【図18】BLySヒト化抗体がhBLyS-ECDで刺激したマウスB細胞の増殖の阻害作用に対する結果図である。

【図19A-B】BLySヒト化抗体がhBLyS-ECD刺激後の脾細胞におけるマウスB細胞の割合血清中のIgAレベルに対する影響の結果図である。

【発明を実施するための形態】

【0063】

以下は、本発明を実施例によってさらに詳しく説明するが、これによって、本発明が記載された実施例の範囲に限定されることを意図するものではない。以下の実施例において、具体的な条件が指定されていない実験方法は、通常の方法及び条件に従って、又は製品マニュアルに従って選択される。

10

【0064】

実施例に記載されている「室温」とは、試験を行う操作の間の温度を指し、一般に15~30である。

【0065】

実施例1ハイブリドーマ技術によるBLyS抗体の製造

一、免疫原の製造

ヒト由来BLySタンパク質の細胞外領域(BLyS-ECD)のAla134-Leu285をコードするアミノ酸配列を含むヌクレオチド配列(配列表の配列番号131に示されたようであり)を、Hisタグ付きのpCPC担体(Invitrogen、V044-50から購入)にクローニングし、もう確立された標準的分子生物学的方法に従ってプラスミドを製造した。具体的な方法は、[Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)]を参照する。HEK293細胞に対して、一時的にトランスフェクションし(Transfection)(PEI, Polysciences)、FreeStyleTM 293(Invitrogenから購入)を用いて37で拡大培養した。7日後、細胞培養液を回収し、細胞成分を遠心分離により除去して、ヒト由来BLySタンパク質の細胞外領域を含む培養上清液を得た。UV紫外線吸収値(A_{280nm})の変化を紫外線(UV)検出器でモニタリングしながら、培養上清液をNiアフィニティークロマトグラフィーカラム(Ni affinity chromatography column)(GE Healthcareから購入)に充填した。ローディング(loading)した後、UV吸光度がベースラインに戻るまで5%(v/v)スクロース(sucrose)と0.01%(v/v)Tween-80を含むリン酸緩衝液(phosphate buffer)(pH7.4)でNiアフィニティークロマトグラフィーカラムを洗浄した後、0-500mMイミダゾール(Imidazole)でグラジエント(Gradient)溶出をした。Niアフィニティークロマトグラフィーカラムから溶出したHisタグ付きヒト由来BLySタンパク質の細胞外領域を回収し、5%(v/v)スクロースと0.01%(v/v)Tween-80を含むリン酸緩衝液(pH7.4)を用いて、限外濾過チューブで4で透析沈殿し、タンパク質の濃縮をした。透析したタンパク質を0.22µmで滅菌濾過し、-80で保存して、免疫原としてのヒトBLySタンパク質の精製された細胞外ドメイン(すなわち、hBLyS-ECD)を得た。前記免疫原は、使用前にタンパク質濃度、純度、分子量、生物学的活性などの検出のような一連の品質管理検出を行う。

20

30

40

【0066】

ここで、免疫原の生物学的活性は、B細胞増殖アッセイによって検出される(方法については実施例5を参照)。結果は、図1及び表3に示されたようであり、前記免疫原は、マウスB細胞の増殖を刺激することができる。

50

【 0 0 6 7 】

【 表 3 】

表3 免疫原の生物活性検出

生物発光 強度 (RLU)	タンパク質濃度 (ng/mL)									
	0	0.000256	0.00128	0.00640	0.0320	0.160	0.800	4.00	20.0	100
	63.64	92.57	56.70	118.02	173.56	497.54	1032.11	1365.34	1402.37	1147.81

10

【 0 0 6 8 】

二、ヒト又はサルのB L y Sを発現する安定にトランスフェクションされた細胞株の構築

ヒト又はサルのB L y S (すなわち、h B L y S又はc y n o B L y S)のアミノ酸配列(N C B I中の遺伝子受託番号は、それぞれQ 9 Y 2 7 5、E H H 5 8 7 0 4 . 1である)の1 3 2位をアルギニン(Arginine)からヒスチジン(Histidine)に突然変異させて、構築された安定にトランスフェクションされた細胞株が完備したヒト又はサルのB L y Sを発現するようにし、切断されない。突然変異した後のヒト又はサルの全長B L y Sアミノ酸配列のヌクレオチド配列を(配列表の配列番号1 3 2と配列番号1 3 3に示されたようである) p L V X担体(Clontechから購入)にクローニングし、上海吉馬製薬有限公司によってレンチウイルスパッケージング(Lentivirus packaging)をした後に、C H O - K 1細胞株に感染させて、トランスフェクトされた後の細胞を得た(Invitrogenから購入)。72時間後、既知のB L y S抗体(e Bioscienceから購入)を用いて、蛍光励起細胞ソーティングにより検出を行った(Manetta Jet al., 2014, J Inflamm Res, 20(7): 121-131を参照)。トランスフェクトされた細胞がヒト又はサルB L y Sを発現すると確定された場合、制限希釈によって96ウェルプレート(Well plate)にサブクローニング(Subcloning)し、5%(v/v)CO₂の条件下で、37℃でインキュベート(Incubate)する。約2週間後、部分的なモノクローナルウェル(Monoclonal Well)を選択して、6ウェルプレートに拡大した。拡大したクローンを、公知のB L y S抗体(e Bioscienceから購入)を用いて蛍光励起細胞ソーティングにより、さらにスクリーニングした。成長がより良く、蛍光強度がより高いモノクローナル細胞株を選択して、続けて拡大培養をし、液体窒素に凍結保存する。すなわち、ヒト又はサルのB L y S安定にトランスフェクションされた細胞株を得る。具体的な選択結果は、表4と図2A~図2Bに示されたようであり、表4の陽性細胞(%)は、全細胞数における陽性細胞が占めるパーセンテージを示す。表4は、B L y S陽性に発現された一連のC H O - K 1細胞株が製造されたことを説明する。

20

30

【 0 0 6 9 】

【表 4】

表4 ヒト又はサルBLySタンパク質を発現したCHO-K1細胞の
FACSスクリーニング検出結果

シリアル ナンバー	トランスフェクションされた 細胞のクローン番号	BLyS抗体		IgGサブタイプ対照	
		陽性細胞 (%)	平均蛍光 強度	陽性細胞 (%)	平均蛍光 強度
1	CHO-K1 HBLyS 1B3	89.15	365	0.83	31
2	CHO-K1 HBLyS 1B4	84.87	239	0.36	23
3	CHO-K1 HBLyS 2A3	77.50	198	0.18	19
4	CHO-K1 HBLyS 2C4	91.65	295	0.84	39
5	CHO-K1 HBLyS 2B3	72.46	189	1.07	23
6	CHO-K1 HBLyS 3B2	87.47	295	0.24	29
7	CHO-K1 HBLyS 4B3	86.85	262	0.21	27
8	CHO-K1 HBLyS 4C2	90.78	299	0.79	31
9	CHO-K1 CynoBLyS 1A4	82.04	412	0.22	31
10	CHO-K1 CynoBLyS 1B2	87.49	412	0.10	19
11	CHO-K1 CynoBLyS 2B3	94.66	442	0.20	16
12	CHO-K1 CynoBLyS 3B2	89.91	422	0.17	19
13	CHO-K1 CynoBLyS 4B1	92.28	742	0.71	26
14	CHO-K1 CynoBLyS 4C2	95.00	676	0.28	24
15	CHO-K1 CynoBLyS 4C4	94.25	705	0.20	27

10

20

【0070】

三、ハイブリドーマ細胞の製造と抗体のスクリーニング

A、6～8週齢の雌のBALB/cとSJLマウス（上海SLAC実験動物有限会社から購入）を使用し、マウスをSPF条件下で飼育した。初回免疫をする時、段階（一）で得られた免疫原（すなわち、hBLyS-ECD）をフロイントの完全アジュバント（Freund's complete adjuvant）で乳化させた後、0.2mLを腹腔に注射し、すなわち、各マウスに免疫原100μgを注射した。追加免疫をする時、免疫原は、フロイントの不完全アジュバント（Freund's incomplete adjuvant）で乳化させた後0.2mLを腹腔に注射した。すなわち、各マウスに50μgの免疫原を注射した。初回免疫と最初の追加免疫との間隔は2週間であり、後に各追加免疫間の間隔は3週間後である。各追加免疫の1週間後に血液を採取し、血清中の免疫原の抗体力価と特異性をELISAにより検出した。結果は、図3と表5に示されたようである。表5は、免疫原により免疫化されたマウスの血清は、免疫原に対して種々の程度の結合を有し、抗原抗体反応を示し、ここで、最も高い希釈度は約100万であることを示している。ここで、ブランク対照は1%（w/w）BSAであり、ここで、ロットは、2回目の追加免疫後の7日目のマウスの血清を指し、表中のデータはOD_{450nm}値である。

30

40

【0071】

【表5】

表5 免疫原免疫後のBALB/cとSJLマウス血清抗体力価のELISA検出

OD _{450nm}	血清希釈度						ブランク対照
	1:100	1:103	1:104	1:105	1:106	1:107	
ロット							
9711 (BALB/C, TB2)	2.8110	2.8547	2.0439	0.3713	0.0994	0.0561	0.0879
9715 (BALB/C, TB2)	2.8624	2.8593	2.3021	0.4848	0.0968	0.0526	0.0488
9717 (SJL, TB2)	2.8312	2.8201	2.4538	0.5821	0.1084	0.0553	0.0501
9722 (SJL, TB2)	2.7962	2.7751	1.8081	0.3297	0.0822	0.0516	0.0468

10

【0072】

B、6～8週齢の雌のBALB/cとSJLマウス（上海SLAC実験動物有限会社から購入）を使用し、マウスをSPF条件下で飼育した。初回免疫をする時、免疫原（hBlyS-ECD）、オリゴヌクレオチド（Oligonucleotide）（CpG）とGERBUアジュバントを混合した後、マウスの足関節に25μLを注射した。すなわち、各マウス免疫原10μgを注射した。追加免疫をする時、免疫原とGERBUアジュバントを混合した後、足関節に25μLを注射した。すなわち、各マウスに免疫原を5μg注射した。初回免疫と追加免疫の間隔は3～4日である。2回目の追加免疫の1週間後に採血し、血清中の抗体力価及び免疫原の特異性をELISAにより検出した。2回目の追加免疫の後、ELISAにより検出された血清抗体力価は、1:10000以上に達した。

20

【0073】

段階AとBが完成する前に、5μgまたは50μgの免疫原を、各選択された最後に免疫されたマウスの腹腔に又は足関節に注射し、マウスを5日後に屠殺して、脾臓細胞を収集した。NH₄OHを最終濃度1%（w/w）になるように加えて、脾臓細胞中にこぼれた赤血球を溶解させて脾臓細胞懸濁液を得た。細胞をDMEM基礎培地（invitrogenから購入）で1000rpm/分間で3回遠心分離した後、高効率電気融合法（METHODS IN ENZYMOLOGY、VOL. 220を参照）を用いて5:1の生存細胞数でマウス骨髄腫細胞SP2/0（ATCCから購入）と混合した。融合後、細胞を20%（w/w）ウシ胎仔血清と1%のHATを含むDMEM培地に希釈した。次いで、96ウェル細胞培養プレートに1ウェルあたり1×10⁵個/200μLに加え、5%（v/v）のCO₂、37℃でインキュベーター中に置いた。14日後、細胞融合プレートの上清を間接ELISAによりスクリーニング（screening）し、ELISAでOD_{450nm}>1.0を有する陽性クローンを24ウェルプレートに拡大し、10%（w/w）HTウシ胎仔血清の含有するDMEMを37℃、5%（V/V）CO₂で拡大培養した。3日間培養した後、24ウェルプレートで培養液を遠心分離し、上清を回収し、上清液に対して抗体サブタイプ（Subtype）分析をした。ここで、hBlyS-ECDに対する（結合活性の方法については、それぞれ実施例3Aと実施例3Bを参照）をELISAにより決定し、抗体サンプルがBlyS受容体に対するブロック活性（Blocking activity）は、リガンド受容体（Ligand receptor）結合アッセイにより決定した（ブロック活性検出方法は、それぞれ実施例4を参照）。

30

40

【0074】

24ウェルプレートスクリーニングの結果によると、ELISA実験でOD_{450nm}>1.0とリガンド受容体結合実験においてハイブリドーマ細胞培養上清のブロック速度が60%であるハイブリドーマ細胞が、BlyS受容体のブロック阻害率が60%に達するハイブリドーマ細胞を要件を満たす陽性クローンとして選択され、選択されたハイブリドーマ細胞を、限界希釈することによって966ウェルプレートにサブクローニングし、10%（w/w）FBSを含むDMEM培地で37℃、5%（v/v）CO₂条

50

件で培養した。サブクローンをした後10日にELISAにより最初のスクリーニングをし、単一の陽性モノクローナルを選択して、24ウェルプレートに拡大し、継続して培養する。3日後に受容体リガンドアッセイを用いて結合活性を評価した。ここで、評価基準は、ELISA実験の $OD_{450nm} > 1.0$ 、またリガンド受容体結合実験においてハイブリドーマ細胞培養上清がBlyS受容体ブロックング阻害率が60%に達するものである。

【0075】

24ウェルプレートサンプルの検出結果に基づいて、最優秀のクローンを選択し、37、5% (v/v) で10% (w/w) FBS (Invitrogenから購入) を含むDMEM培地中で、前記最優秀のクローンに対して拡大培養をし、液体窒素中で最適なハイブリドーマ細胞を凍結保存して得た後、繋がる抗体の生成及び精製に用いることができる。

10

【0076】

四、リード抗体の生産と精製

ハイブリドーマ細胞はより生成された抗体の濃度が低いので、約1~10 μ g/mLだけに、得られる抗体濃度は大きく変化する。培地中の細胞培養によって生成される様々なタンパク質と培地中に含まれるウシ胎児血清は、多くの生物活性の分析方法に種々の程度の干渉がありため、小規模(1~5mG)の抗体生産、精製を実施する必要がある。

【0077】

段階三から得られたハイブリドーマ細胞を、T-75細胞培養フラスコに接種し、生産培地(Invitrogen社から購入したHybridoma serum medium)を用いて3回継代培養した。成長状態がよければ、接種細胞培養スピナーボトル(spinner bottle)をした。各2リットルの培養フラスコに500mLの生産培地を加え、接種細胞密度は、 1.0×10^5 個/mLである。ボトルキャップを閉め、スピナーフラスコを37インキュベーターボトルシェーカーに入れ、3rpm/分間の速度である。14日間の連続回転培養の後、細胞培養物を収集し、細胞を濾過により除去し、0.45 μ mのフィルターで濾過して培養上清を清澄化した。清澄化された培養上清は、直ちに精製するか、又は-30で冷凍保存することができる。

20

【0078】

ハイブリドーマ細胞を300mLの清澄化された培養上清中のモノクローナル抗体を、2mLプロテインGカラム(Protein G column)(GE Healthcareから購入)を用いて精製した。プロテインGカラムを平衡化緩衝液(PBSリン酸緩衝液、pH7.2)で平衡化し、次いで清澄化された培養上清をプロテインGカラムにローディングし、3mL/分の流速でコントロールした。ローディング完了した後、プロテインGカラムを平衡緩衝液で洗浄した。平衡緩衝液の容量は、プロテインGカラムを充填したカラムの容量の4倍である。プロテインGカラムに結合したモノクローナル抗体を溶出液(0.1Mグリシン塩酸(Glycine hydrochloride)緩衝液、pH2.5)で溶出し、溶出状況を紫外線検出器(A280紫外線吸収ピーク)でモニターした。溶出されたモノクローナル抗体を回収し、10%(v/v)の1.0MのTris-HCl緩衝液を添加することによりpHを中和した。次に直ちに透析をPBSリン酸緩衝液中で一晩行った。翌日、液を一度交換し、透析を3時間続けた。透析されたモノクローナル抗体を回収し、0.22 μ mのフィルターを用いて滅菌濾過し、滅菌して保存して、精製されたBlyS抗体をリード抗体として得る。

30

40

【0079】

精製されたBlyS抗体は、タンパク質濃度(A280/1.4)、純度、エンドトキシン(Endotoxin)(Lonzaキット)等の検出分析をした。結果は、表6に示されたようである。結果、リード抗体のエンドトキシン濃度は1.0EU/mg以内であることを見つけた。

【0080】

【表6】

表6 精製されたB L y S抗体の検出分析

クローン番号	抗体純度	タンパク質濃度 (mg/mL)	エンドトキシン (EU/mg)
35E6F7C3	>90%	0.86	0.16
8E7D9C7F5	>90%	1.5	0.05
20D1B6E9E5	>90%	0.73	0.13
78C11D2D12	>90%	0.956	0.26
89A2G5E7	>90%	0.734	0.23
97E7B3F2	>90%	0.583	0.93
97A3C2H4	>90%	0.504	0.30
67A2E1D10	>90%	0.5	0.16
111D10D6G3	>90%	0.25	0.50
93C6F10D3	>90%	0.485	0.66

10

【0081】

実施例2: B L y S抗体のファージディスプレイ (Ph a g e d i s p l a y) 技術
による製造

20

一、B L y Sタンパクのビオチン化

B i o t i n - X X - N H S (S i g m a A l d r i c h から購入) と実施例1で製造した免疫原 (h B L y S - E C D) を7 : 1のモル比で混合し、室温で30分間放置した後、最終濃度50mMの1MのNH₄Clを加えて反応を停止させた。PBSリン酸緩衝液中で一晩透析して得て、遊離されたビオチンを除去して、ビオチン化された免疫原 (すなわち、ビオチン化されたh B L y S - E C D) を得た。BCAタンパク質濃度測定キットを用いて、ビオチン化h B L y S - E C Dの濃度を測定した。

【0082】

ビオチン化されたh B L y S - E C Dの活性はE L I S A方法により測定した。B L y S抗体 (G S Kから購入) をPBSで1μg/mLまでに希釈し、50μL/ウェルでE L I S Aマイクロプレート (M i c r o p l a t e) に加え、4 で一晩インキュベートし、細胞をE L I S Aブロッキング溶液 [1 % (W / v) B S AとT w e e n - 2 0のP B Sリン酸緩衝液、pH7.4] で37 で2時間ブロッキングした後、また勾配希釈をしたビオチン化されたh B L y S - E C Dを加え、37 で1時間インキュベートする。ストレプトアビジン (s t r e p t a v i d i n) 標識されたホースラディッシュペルオキシダーゼ (H o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e) (S i g m aから購入、製品番号S5512)を加え、室温で30分間インキュベートした。100μL/ウェルのTMB発色現像液を加え、室温で15分間インキュベートした後、1N塩酸5μLを加えて呈色反応を停止させ、E L I S AプレートリーダーでOD_{450nm}の値を読み取る。結果は、図4と表7に示されたようであり、結果は、ビオチン化されたh B L y S - E C DがB L y S抗体に結合することができることを説明する。

30

40

【0083】

【表 7】

表 7 ビオチン化された免疫原及び B L y S 抗体と B L y S 抗体との結合の
E L I S A による検出

O D _{450nm}	ビオチン化された免疫原の濃度 (n g / m L)							
	0.000006	0.000032	0.00016	0.0008	0.004	0.02	0.1	0.5
	0.08	0.19	0.54	2.01	3.14	3.24	3.36	3.39

【 0 0 8 4 】

10

二、ファージディスプレイ技術スクリーニング B L y S 抗体

リード抗体は、天然ヒトモノクローナル抗体 (S c F v) ファージディスプレイライブラリー (上海睿智化学研究有限公司が構築) を用いてスクリーニングした。4 回のバイオパニング (B i o p a n n i n g) によって、B L y S に結合する抗体が得られた。具体的なプロセスは次のとおりであり：

ストレプトアビジン用 P B S を 1 2 . 5 μ g / m L までに希釈し、ウェルごとに 1 m L を免疫チューブに加え、4 で一晩インキュベートした。免疫チューブを P B S で 3 回洗浄した後、免疫チューブの半分に、段階一で製造したビオチン化された h B L y S - E C D を各チューブに 5 0 μ g 加え、室温で 1 時間振動した。免疫チューブ用 2 % (w / v) のブロッキング溶液 [2 % (w / v) スキムミルク (s k i m m i l k) を含む P B S 緩衝液] 1 0 m L を室温で 2 時間ブロックした。一方、免疫チューブの他の半分には、1 m L のファージ S c F v 抗体ライブラリー (L i b r a r y) とブロッキング溶液を加え、室温で 2 時間振動した。そして対照チューブをセットし、同じ溶液量のブロッキング溶液を添加する。ビオチン化された h B L y S - E C D を加えた免疫チューブと対照チューブのブロッキング溶液を排出し、既にブロッキングされたファージ S c F v 抗体ライブラリーを加え、室温で 2 時間振盪した。免疫化チューブと対照チューブを、最初に P B S T [0 . 1 % (v / v) T w e e n - 2 0 を含む P B S 緩衝液] で 5 回洗浄し、次いで P B S 緩衝液で 5 回洗浄した。ここで、洗濯回数は 1 回につき 5 回増加した。洗浄後、1 0 μ g / m L パンクレアチン (p a n c r e a t i n) 1 m L を各チューブに加え、ビオチン化された h B L y S - E C D に結合するファージを 3 7 で 3 0 分間インキュベートすることによって溶出した。対数増殖期の大腸菌 T G 1 (L U C I G E N から購入) 4 m L に 1 m L パンクレアチン溶液を加え、3 7 で 3 0 分間インキュベートして、T G 1 の培養液を得る。T G 1 の培養液を勾配希釈し、プレートにコーティングし、3 7 一晩培養する。ビオチン化された h B L y S - E C D に結合した免疫チューブと対照チューブから得られたクローンの数を計算し、2 0 ~ 3 0 クローンを選択し、シーケンシングする。

20

30

【 0 0 8 5 】

一方、プレート上のクローン用 2 Y T 培地 (2 Y T 培地の調製方法としては、1 0 g 酵母エキス (Y e a s t e x t r a c t) 、1 6 g トリプトンペプトン (T r y p t o n e p e p t o n e) 、5 g の N A C L を 1 L の水に加え、N a O H で p H 7 . 0 に調整し、オートクレーブする) を洗浄、回収し、新鮮な培地に接種し、3 7 で対数期まで培養した。ヘルパーファージ (H e l p e r p h a g e) M 1 3 K O 7 (N E B から購入、品番 N 0 3 1 5 S) を加え、混合し、3 7 で 3 0 分間放置する。その後、3 7 で 3 0 分間振盪しながら培養し、4 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した後、細胞を回収し、新鮮な培地を加え、3 0 で 4 時間振盪培養した。4 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離した後、上清を回収し、上清の容量の 1 / 4 容量の 5 × P E G を含む 2 . 5 M の N A C L 溶液を加え、氷上に一晩置いた。4 、4 0 0 0 r p m 、3 0 分間遠心分離をし、沈殿したファージを回収し、P B S 緩衝液に溶解した。1 0 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して残留細胞残渣を除去し、上清を回収して次のラウンドのバイオパニングに用いた。

40

【 0 0 8 6 】

E L I S A によりスクリーニングした s c F v 抗体は、B L y S タンパクに対する結

50

合活性を有することが確認された。OD_{450nm} > 1.0のクローンを選択してシーケンシング (Sequencing) して、異なるHCDR3配列のクローンを獲得した。次に、またFACSとリガンド受容体結合実験により、FACS実験においてMFI値 > 30、またリガンド受容体結合実験においての細胞溶解上清がBlyS受容体に対するブロッキング率が60%に達するクローンを選択して、条件に満たず陽性クローンとした。

【0087】

三、抗体の生産と精製

陽性クローンのシーケンシング結果に従って(詳細は、下記の実施例7を参照)、プライマーを設計し(詳細なプライマー配列は、表8に示されたようである)陽性クローンのシーケンシング結果に従って設計し(詳細は、下記の実施例7を参照)、それぞれPCR法により、軽鎖と重鎖可変領域を増幅した。トランスフェクションされた陽性クローン大腸菌TG1で抽出したプラスミド0.5 μL、大腸菌TG1、各プライマー10 pmol、DNAポリメラーゼ0.5 μL及び緩衝系を含む50 μLの反応系を構成した。95で2分間初期変性、95で15秒間変性、55で30秒間アニーリング(annealing)し、68で45秒間伸長させ、30サイクル後に68で10分間伸長させるPCRプログラムを設定して、PCR産物を得る。ここで、PCRに用いたDNAポリメラーゼ(Polymerase)は、Invitrogen、Cat12344から購入し、緩衝体系は、前記DNAポリメラーゼとセットに購入して用いる緩衝体系である。5 μLのPCR産物を取り、アガロースゲル電気泳動(Agarose gel electrophoresis)検出し、陽性サンプルをカラム回収キット(Column recovery kit)で精製し、ここで、回収キットは、NucleoSpin(登録商標)Gel & PCR Clean-upであり、MACHEREY-NAGELから購入し、品番はCat740609である。以下のようなライゲーション反応(Ligation reaction)を行い、即ち、断片3 μLを挿入し、酵素消化した担体0.5 μL、リコンビナーゼ(Recombinase)Exnase0.5 μL、緩衝液2 μL、反応系10 μLを37で30分間反応させて連結物、即ち、構築済みの組換え担体を獲得した。ここで、組み換え酵素は、Vazymeから購入し、品番はC112-01/02であり、緩衝液は、前記組み換え酵素とセットに購入して用いる組み換え酵素であり、重鎖可変領域を、シグナルペプチドとヒト由来抗体の重鎖IgG1定常領域を含む発現担体に指向的にクローニングし(ここで、発現担体は、Invitrogenから購入し、組換え段階は、上海睿智化学研究有限公司から完成した)、軽鎖可変領域を、シグナルペプチド(Signal peptides)とヒト由来抗体の軽鎖kappa又はlambda(以下に記載するL1D12抗体の軽鎖についてのみ)定常領域を含む発現担体に指向的にクローニングした(ここで、発現担体は、Invitrogenから購入し、組換え段階は、上海睿智化学研究有限公司から完成された)。ライゲーション産物10 μLをコンピテント細胞(Competent cells)(Ecos 101 competent cells、Yeasternから購入、品番:FYE607)50 μLに加え、30分間氷冷した。また、42水浴で1分間熱ショックした後、氷上で2分間放置した後、500 μLの抗生物質を含まない2YT培地を加え、振盪器上で200 RPM、37で45分間蘇生させ、200 μLを取り出して、100 μg/mLのアンピシリンを含有する固体培地にコーティングして、インキュベータで37で一晩培養する。翌日、発現担体上のプライマー(Primer)pTT-EF1A-FとpSV40(ここで、ヌクレオチド配列はそれぞれ配列表の配列番号134~135に示されたようであり)、を用いて、30 μLの反応系を構成し、コロニー(colony)PCRを行った。コロニーPCRシステムは:プライマー各1 μLずつ、PCRプレミックス(Premix)(Novoproteinから購入)であり、水で20 μLになるように補充した。ピペットチップを用いてコロニーをつけてPCR反応系に吹き吸って、0.5 μLを吸い出して、100 μg/mLのアンピシリン(Ampicillin)を含有する別のLB固体プレート上にクリックして、コロニーを保存する。PCR反応終了後、溶液5 μLを取り出して、アガロースゲル電気泳動検出を行い陽性サンプルをシーケンシングし、分

10

20

30

40

50

析した[Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Md. (1991)を参照]。

【0088】

【表8】

表8 陽性クローンのプライマー配列番号

クローン番号		フォワードプライマー (Forward primer)	リバースプライマー (Reverse primer)
2-1G11	V _H	176	177
	V _L	178	179
L9G7	V _H	180	181
	V _L	182	183
L1D12	V _H	184	185
	V _L	186	187

10

【0089】

コロニーPCR検証後、前記配列の組み換え抗体をFreeStyleTM293-F細胞(Invitrogenから購入)を一過性にトランスフェクトして抗体を生成した。トランスフェクションの際、293-F細胞の密度は1~1.5×10⁶細胞/mLでなければならず、100mLの細胞は100μLの前記構築済みのDNA(ここで、重鎖担体と組換え軽鎖担体との質量比は3:2である)とトランスフェクション試薬ポリエチレンイミン(PEI, Polyethyleneimine)200μgを必要とする。担体DNAとPEIをそれぞれ培地に加え、室温で5分間放置し、0.22μmメンブレンフィルター(Membrane filter)でろ過した後、担体DNAとPEIとの混合物を混合し、室温で15分間放置した。次いで、前記混合物を細胞にゆっくりに加え、37℃、8%(v/v)CO₂インキュベーターで、120rpmで培養した。トランスフェクションした後、翌日に0.5%(v/v)のタンタルペプトン(Tantalum peptone)を細胞の培養液に加えた。6~7日後、細胞を3500gで30分間遠心分離し、上清を回収し、0.22μmフィルターで濾過した。

20

30

【0090】

200mLの清澄化された上清中の免疫グロブリン抗体を、1mLのプロテインAカラム(GE Healthcareから購入)を用いて精製した。プロテインAカラムをまず平衡緩衝液(PBSリン酸緩衝液、pH7.2)で平衡化し、上清を3mL/分の流速にコントロールして、Aカラムにロードした。ロード完了後、プロテインAカラムを平衡化緩衝液で洗浄し、平衡化緩衝液の容量はプロテインAカラムのカラム容量の5倍である。プロテインGカラムに結合したBlyS抗体を溶出液(0.1Mグリシン塩酸緩衝液、pH2.5)で溶出し、溶出状況を紫外線検出器(A280紫外線吸収ピーク)でモニターした。溶出された抗体を回収し、10%(v/v)の1.0MのTris-HCl緩衝液を添加することによりpHを中和し、次に直ちに透析をPBSリン酸緩衝液中で一晩行い、翌日、液を一度交換して、透析を3時間続けた。透析されたBlyS抗体を回収し、0.22μmのフィルターを用いて滅菌濾過し、滅菌して保存し、即ち精製されたBlyS抗体をリード抗体として得る。

40

【0091】

リード抗体は、タンパク質濃度(A280/1.4)、純度、エンドトキシン(Lonzaキット)等の検出分析をした。結果は、表9に示されたようである。結果、リード抗体のエンドトキシン濃度は1.0EU/mg以内であることを示した。

【0092】

【表 9】

表 9 精製された B L y S 抗体の検出分析

クローン番号	抗体純度	タンパク質濃度 (mg/mL)	エンドトキシン (EU/mg)
2-1G11	>90%	1.65	0.16
L9G7	>90%	2.36	0.26
L1D12	>90%	2.73	0.34

10

【0093】

実施例 3：リード抗体 (Pilot antibody) の検定

A. 抗体と B L y S タンパク質の結合の酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) による検出

実施例 1 と 2 で得られたリード抗体を、ヒト B L y S タンパク質と B L y S タンパク質ファミリーのヒト A P R I L タンパク質とそれぞれ交差反応させた。

【0094】

ストレプトアビジン (Streptavidin) 用 P B S を最終濃度が $1.0 \mu\text{g/mL}$ になるまで希釈し、各ウェルに $50 \mu\text{L}$ ずつで 96 ウェル E L I S A プレートに加え、プラスチックラップでよく密閉し、4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートをプレート洗浄液で $[0.05\% (v/v) \text{ Tween } 20 \text{ の P B S 緩衝液を含有する}]$ 4 回洗浄し、ブロッキング溶液 $[0.05\% (v/v) \text{ Tween } 20 \text{ と } 1\% (w/w) \text{ B S A の P B S 緩衝液とを含有する}]$ を加え、37 で 2 時間ブロックした。ブロッキング溶液を排液し、実施例 2 で得られたビオチン化された h B L y S - E C D を P B S で 50 ng/mL の最終濃度に希釈し、各ウェルに $50 \mu\text{L}$ ずつ 96 ウェル E L I S A プレートに加え、37 で 2 時間インキュベートした。プレートをプレート洗浄液で $[0.05\% (v/v) \text{ Tween } 20 \text{ の P B S 緩衝液を含有する}]$ 4 回洗浄し、実施例 1 と 2 で得られた精製リード抗体 $100 \mu\text{l}$ を各ウェルに加えた。37 で 1 時間インキュベートした後、プレートをプレート洗浄液で $[0.05\% (v/v) \text{ Tween } 20 \text{ の P B S 緩衝液を含有する}]$ 4 回洗浄した。H R P (ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horse radish peroxidase)) で標識された二次抗体 (Sigma から購入) を加え、37 で 1 時間インキュベートした。プレートをプレート洗浄液で $[0.05\% (v/v) \text{ Tween } 20 \text{ の P B S 緩衝液を含有する}]$ 4 回洗浄した。T M B 基質 $100 \mu\text{L}$ を各ウェルに加え、室温で 5 分間インキュベートした後、 $100 \mu\text{L}$ の停止溶液 (1.0 N の H C l) を各ウェルに加えた。A_{450nm} の値を E L I S A プレートリーダー (SpectraMax M5e、Molecular Devices から購入) で読み取り、その結果は、図 5 A ~ 図 5 B と表 10 に示されたようである。表 10 は、精製された後の抗体が E L I S A レベルで B L y S 組換えタンパク質に結合することを説明する。ここで、表中のデータは O D_{450nm} 値である。

20

30

【0095】

40

【表 10】

表 10 B L y S 精製された抗体とビオチン化された h B L y S - E C D の結合反応の E L I S A による検出

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
L 9 G 7	1.8062	1.6016	1.7138	1.3508	0.5280	0.1814	0.0853	0.0710
L 1 D 1 2	1.7492	1.6062	1.6476	1.4971	0.6781	0.2618	0.1349	0.1099
ヒト I g G 対照	0.1483	0.1016	0.0956	0.0916	0.0905	0.1106	0.1082	0.1027
8 E 7 D 9 C 7 F 5	2.7224	2.5619	2.5304	2.0564	0.9458	0.2909	0.1151	0.0564
9 7 A 3 C 2 H 4	2.9812	2.8238	2.7511	2.1167	0.8988	0.2826	0.1053	0.0603
1 1 1 D 1 0 D 6 G 3	1.9376	1.7802	1.7823	1.4143	0.6127	0.1935	0.0820	0.0617
ヒト I g G 対照	0.0708	0.0627	0.0659	0.0594	0.0562	0.0595	0.0695	0.0574

10

【0096】

B L y S 抗体がヒト A P R I L タンパク質と交差反応するかどうかを調べるために、A P R I L タンパク質 (R & D S y s t e m s から購入) を P B S で 1 . 0 μ g / m L の最終濃度になるように希釈し、次に各ウェルに 5 0 μ L ずつ 9 6 ウェル E L I S A プレートに加え、プラスチックラップでよく密閉し、4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液とを含有する] 4 回洗浄し、ブロッキング溶液 [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 と 1 % (w / w) B S A の P B S 緩衝液とを含有する] を加え、3 7 で 2 時間ブロックした。ブロッキング溶液を排液し、実施例 1 と 2 で得られたリード抗体をウェルごとに 1 0 0 μ L 加え、3 7 で 2 時間インキュベートした後、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄した。HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) で標識された二次抗体 (S i g m a から購入) を加え、3 7 で 1 時間インキュベートした。プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄した。TMB 基質 1 0 0 μ L を各ウェルに加え、室温で 5 分間インキュベートした後、1 0 0 μ L の停止溶液 (1 . 0 N H C l) を各ウェルに加えた。A_{450nm} の値を E L I S A プレートリーダー (S p e c t r a M a x M 5 e 、 M o l e c u l a r D e v i c e s から購入) で読み取り、その結果は、図 6 A ~ 図 6 B と表 1 1 に示されたようである。表 1 1 は、精製された後の抗体が E L I S A レベルで B L y S 組換えタンパク質に結合しないことを説明する。ここで、ヒト I g G 対照はヒト I g G であり、表の中のデータは O D_{450nm} 値である。

20

30

【0097】

【表 11 - 1】

表 11-1 B L y S 抗体と A P R I L タンパク質の結合反応の E L I S A による検出

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
2-1G11	0.2964	0.1374	0.09015	0.0668	0.0699	0.07335	0.1070	0.0847
L 9 G 7	0.2755	0.1072	0.0751	0.07405	0.0861	0.0777	0.1606	0.0638
L 1 D 1 2	0.1334	0.1240	0.1019	0.0757	0.06785	0.0854	0.1215	0.0625
ヒト I g G 対照	0.4768	0.2263	0.1284	0.0793	0.0722	0.0804	0.0693	0.0711

40

【0098】

【表 1 1 - 2】

表 1 1 - 2 B L y S 抗体と A P R I L タンパク質の結合反応の E L I S A による検出

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
クローン番号								
3 5 E 6 F 7 C 3	0.07025	0.0567	0.05605	0.05435	0.05365	0.05315	0.0553	0.05425
8 E 7 D 9 C 7 F 5	0.46405	0.1156	0.07025	0.0599	0.05575	0.0565	0.05715	0.05515
2 0 D 1 B 6 E 9 E 5	0.942	0.25655	0.07755	0.0611	0.0543	0.05465	0.0535	0.055
6 7 A 2 E 1 D 1 0	0.26415	0.0898	0.0673	0.05805	0.0588	0.05625	0.0553	0.05305
7 8 C 1 1 D 2 D 1 2	0.13785	0.0703	0.0613	0.05525	0.05485	0.05345	0.0564	0.05645
8 9 A 2 G 5 E 7	0.19595	0.0973	0.0614	0.0565	0.0548	0.0547	0.0578	0.06555
9 3 C 6 F 1 0 D 3	0.56985	0.1712	0.07455	0.0584	0.05505	0.0568	0.0546	0.0568
9 7 E 7 B 3 F 2	0.6204	0.182	0.0707	0.0556	0.0705	0.05375	0.0535	0.0533
1 1 1 D 1 0 D 6 G 3	0.0681	0.05725	0.05835	0.0525	0.05355	0.05485	0.0538	0.0547
9 7 A 3 C 2 H 4	0.17275	0.0848	0.06165	0.05895	0.05615	0.0559	0.0625	0.0566
マウス I g G 対照	0.102	0.06245	0.05575	0.0536	0.0533	0.05365	0.05865	0.0716

10

【 0 0 9 9 】

20

B、抗体と B L y S 発現細胞の結合の蛍光励起細胞ソーティング (F A C S) による検出

実施例 1 の段階二で得られた C H O - K 1 h B L y S 安定細胞株と C H O - K 1 c y n o B L y S 安定細胞株を、T - 1 7 5 細胞培養ボトルで 9 0 % のコンフルエントまで増殖させた。培地を吸引し、P B S 緩衝液 (I n v i t r o g e n から購入) で 1 回洗浄し、次いで細胞溶解物 (T r y p L E ^{T M} E x p r e s s E n z y m e 、 L i f e t e c h n o l o g y から購入) で細胞を処理し、また収集した。具体的な段階は、細胞を P B S 緩衝液で 1 回洗浄し、細胞計数をした後、細胞を P B S 緩衝液で 2×10^6 個細胞 / m l に希釈し、2 % (w / w) のウシ胎仔血清ブロッキング溶液を加え、氷上で 3 0 分インキュベートした。ウェル当たり 2 0 0 μ L を 9 6 ウェル F A C S 反応プレートに加え、4 で 2 0 0 0 r p m で遠心分離した後、各ウェルに実施例 1 と 2 で得られたリード抗体 1 0 0 μ L を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。F A C S 緩衝液 [2 % (w / w) F B S を含有する P B S 緩衝液] で 3 回遠心洗浄し、各ウェルに蛍光 (A l e x a 4 8 8) 標識された二次抗体 (I n v i t r o g e n から購入) 1 0 0 μ L を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。F A C S 緩衝液で 3 回遠心洗浄する。細胞を F A C S 緩衝液 2 0 0 μ L で懸濁させ、F A C S (F A C S C A L i B u r 、 B D 会社から購入) を用いて検出し、結果を分析した。結果は図 7 ~ 8 と表 1 2 ~ 1 3 に示されたようであり、表 1 2 ~ 1 3 は、リード抗体がヒト細胞表面 B L Y S タンパク質に結合することができ、リード抗体とサル B L y S は交差反応が存在することを説明する。表中のデータは、M F I により測定された細胞集団の平均蛍光強度値である。

30

40

【 0 1 0 0 】

【表 1 2】

表 1 2 B L y S 抗体とヒト B L y S 組換え細胞 (C H O - K 1 H B L y S) 結合反応の
蛍光励起細胞ソーティング分析による検出

MFI	抗体濃度 (nM)							
クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
2-1G11	645.0	632.9	627.1	590.6	402.7	180.5	106.8	185.5
L9G7	697.0	629.6	590.7	469.3	226.4	93.0	51.6	101.3
L1D12	549.9	522.4	503.3	413.1	205.1	89.5	54.4	101.2
ヒト IgG 対照	52.0	35.1	33.1	33.4	32.9	33.6	32.3	27.2
35E6F7C3	608.6	528.3	437.4	247.3	110.4	54.9	39.2	52.4
8E7D9C7F5	596.2	569.5	532.1	504.5	282.3	122.0	67.4	151.6
20D1B6E9E5	534.7	498.0	473.9	401.5	193.5	83.6	46.8	31.8
78C11D2D12	355.5	336.0	299.5	248.9	132.0	61.3	39.5	31.2
89A2G5E7	431.1	405.8	373.9	192.4	92.1	48.1	37.0	31.0
97E7B3F2	406.0	349.2	332.0	318.2	174.0	78.7	48.2	32.4
97A3C2H4	525.0	460.1	448.0	340.3	158.0	69.8	44.0	31.2
67A2E1D10	432.4	371.2	279.0	128.6	60.0	37.1	33.2	31.2
111D10D6G3	295.5	276.0	264.9	246.6	150.3	65.5	41.2	32.4
93C6F10D3	391.6	327.0	316.7	306.0	174.6	76.6	44.9	31.6
マウス IgG 対照	33.6	31.7	31.0	30.7	31.6	32.7	30.9	30.3

10

20

【0101】

【表 1 3】

表 1 3 B L y S 抗体とサル B L y S 組換え細胞 (C H O - K 1 C y n o B L y S)
結合反応の蛍光励起細胞ソーティング分析による検出

MFI	抗体濃度 (nM)							
クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	
2-1G11	1456.4	1449.6	1480.8	1400.5	816.2	331.8	175.6	
L9G7	1342.8	1282.4	1276.1	1009.5	386.8	143.3	63.5	
L1D12	1175.8	1133.8	1166.9	900.2	363.7	134.7	66.7	
ヒト IgG 対照	44.2	26.7	22.7	22.6	22.8	22.4	22.0	
35E6F7C3	1131.2	1080.3	953.1	501.0	176.9	66.3	32.6	
8E7D9C7F5	1173.8	1167.6	1128.8	1051.3	476.6	164.9	74.4	
20D1B6E9E5	1034.3	978.3	933.0	808.3	349.1	118.1	50.4	
78C11D2D12	664.0	635.8	594.2	480.3	234.8	106.0	37.7	
89A2G5E7	884.0	828.6	725.8	355.2	124.6	53.6	32.1	
97E7B3F2	770.2	709.9	704.6	687.6	288.3	112.0	53.0	
97A3C2H4	987.3	943.1	955.6	681.8	242.7	120.4	44.3	
67A2E1D10	842.1	738.2	517.7	213.4	76.6	35.3	24.7	
111D10D6G3	539.0	524.1	510.4	477.9	221.7	108.0	38.8	
93C6F10D3	784.9	714.2	729.4	705.8	308.3	112.4	46.9	
マウス IgG 対照	21.6	20.7	21.2	20.0	19.7	19.8	20.4	

30

40

【0102】

50

C、B L y S 抗体の親和定数の測定

B i A C o r e X 1 0 0 装置 (G E H e a l t h c a r e から購入) を用いて、親和定数の測定を行う。具体的な操作及び方法は、機器マニュアル及び製造業者が提供した詳細な方法に基づく。具体的には、C M 5 チップ (S E n s o r C h i p C M 5、G E H e a l t h c a r e から購入) で親和力測定を行った。まず、C M 5 チップを 5 0 m M N a O H と 1 : 1 の体積比で混合された 5 0 m M の N H S 及び 2 0 0 m M の E D C で順次的に活性化した。次いで、抗ヒト F c 断片抗体 (G e n w a y から購入) を、1 0 m M 酢酸ナトリウム (S o d i u m a c e t a t e) 緩衝液 (0 . 1 m L) で 1 6 . 4 μ g / m l までに希釈し、C M 5 チップとカップリング反応を行った。次いで、1 M エタノールアミン (E t h a n o l a m i n e) を注入して残りの活性化部位に対してブロックをした。被験抗体 (すなわち、実施例 2 から製造された B L y S 抗体) をチップに捕捉された後、7 種類の異なる濃度勾配で希釈された実施例 1 で製造した免疫原 (すなわち、h B L y S - E C D) 注入し、B i a c o r e 機器により、抗体と抗原との結合と解離が検出される。次いで、B i a c o r e X 1 0 0 E v a l u a t i o n S o f t w a r e 2 . 0 ソフトウェアを使用して適合させ、結合定数と解離定数が得られ、親和力定数は解離定数対結合定数の比である。結果は、表 1 4 に示されたようであり、B L y S 抗体が h B L y S - E C D に対して高い親和力を有することを説明する。

【 0 1 0 3 】

【 表 1 4 】

表 1 4 B L y S 抗体の h B L y S - E C D に対する親和定数

クローン番号	親和定数 K_D (nM)	結合定数 k_a (1/Ms)	解離定数 k_d (1/)
2-1G11	0. 637	$1. 485 \times 10^6$	$9. 464 \times 10^{-4}$
L9G7	0. 525	$4. 647 \times 10^5$	$2. 439 \times 10^{-4}$
L1D12	2. 420	$5. 610 \times 10^5$	$1. 358 \times 10^{-3}$

【 0 1 0 4 】

実施例 4 : B L y S 精製抗体が B L y S タンパク質とその受容体 B A F F R の結合をブロックすることに関する検出

B L y S タンパク質の受容体リガンド結合アッセイにより、B L y S 抗体が B L y S タンパク質とその受容体 B A F F R の結合をブロックすることを検出した。

【 0 1 0 5 】

B A F F R (R & D S y s t e m s から購入) を各ウェルに 5 0 n g ずつ 9 6 ウェル E L I S A プレートに加え、プラスチックラップでよく密閉し、4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液とを含有する] 4 回洗浄し、ブロッキング溶液 [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 と 2 % (w / w) B S A の P B S 緩衝液とを含有する] を加え、室温で 2 時間ブロックした。ブロッキング溶液を排液し、まず、各ウェルに実施例 1 と 2 で得られたリード抗体 5 0 μ L を加え、次いで各ウェルに実施例 2 で製造したビオチン化された h B L y S - E C D 5 0 μ L / ウェルを加え、混合後 3 7 で 2 時間インキュベートした。プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄する。ウェル当たり H R P (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) で標識されたアビジン (S i g m a から購入) 1 0 0 μ L を加え、3 7 で 1 時間インキュベートした。プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄した。T M B 基質 1 0 0 μ L を各ウェルに加え、室温で 5 分間インキュベートした後、1 0 0 μ L の停止溶液 (1 . 0 N の H C l) を各ウェルに加えた。A _{450nm} の値を E L I S A プレートリーダー (S p e c t r a M a x M 5 e、M o l e

cular Devices から購入) で読み取り、その結果は、図 9 A ~ 図 9 B と表 15 に示されたようである。表 15 は、B L y S 抗体が B L y S タンパク質とその受容体 B A F F R の結合をブロックすることができることを説明している。

【 0 1 0 6 】

【表 15 - 1】

表 15-1 B L y S 抗体のタンパク質とその受容体 B A F F R の結合の遮断

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)								
	クローン番号	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128
L 9 G 7	0.07055	0.13375	0.32685	0.54205	0.8991	1.0243	1.0739	1.0749	
L 1 D 1 2	0.0755	0.14205	0.35175	0.70175	0.97195	1.08705	1.08145	1.0776	
ヒト I g G 対照	1.22145	1.06255	1.08975	1.1444	1.08315	1.11255	1.1394	1.13265	

10

【 0 1 0 7 】

【表 15 - 2】

表 15-2 B L y S 抗体のタンパク質とその受容体 B A F F R の結合の遮断

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)								
	クローン番号	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128
8 E 7 D 9 C 7 F 5	0.1098	0.1334	0.1733	0.2944	0.6103	1.0464	1.3822	1.6167	
9 7 A 3 C 2 H 4	0.1073	0.1246	0.2077	0.4236	0.8155	1.1209	1.2067	1.3356	
1 1 1 D 1 0 D 6 G 3	0.6047	0.6158	0.6699	0.7171	0.9112	1.1410	1.2852	1.2729	
マウス I g G 対照	1.2984	1.3641	1.4120	1.3967	1.4740	1.4478	1.4018	1.4197	

20

【 0 1 0 8 】

実施例 5 : B L y S 精製抗体のヒト又はマウスヒト B L y S タンパク質が B 細胞増殖に対する作用のマウス B 細胞増殖アッセイによる検出

30

一、マウス脾臓で B 細胞単離

新しく採取したマウス脾臓を粉砕した後、10% (w/w) ウシ胎児血清を含有する R P M I 1 6 4 0 培地 (I n v i t r o g e n から購入、品番 : A 1 0 4 9 1) に再懸濁させ、70 μm 細胞ストレーナー (B D から購入) でろ過した。4 で 1 5 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈殿を 1 5 秒間ボルテックスシェイキング (V o r t e x s h a k i n g) した。赤血球溶解緩衝液 (S i g m a から購入) を加え、室温で 5 分間放置した。10% (w/w) のウシ胎児血清を含有する R P M I 1 6 4 0 培地で 1 5 m L までに補足し、4 で 1 5 0 0 r p m で 5 分間遠心分離して上清を得る。上清を 4 0 μm 細胞ストレーナー (B D から購入) でろ過し、ろ過した上清を得て、次いで細胞計数をした。マウス B 細胞をキット (M i l t e n y i B i o t e c から購入) を用いて単離した。実験操作は、キットの指示書に厳密に従って行った。具体的な実験は以下のように要約される : 過した後の上清を 3 0 0 g の回転数で 4 で 1 0 分間遠心分離した後、上清を捨てた。4 0 μ l の緩衝液 [0 . 5 % (w / v) B S A と E D T A 2 m M を含有する P B S 緩衝液] とキット中の結合した非 B 細胞のビオチン化された抗体混合物 1 0 μ l を細胞あたり 1 0 ⁷ 個加え、混合した後 4 で 5 分間インキュベートした。1 0 ⁷ 細胞あたり 3 0 μ L の緩衝液 [0 . 5 % (w / v) B S A と 2 m M の E D T A を含有する P B S 緩衝液] 及び 2 0 μ L の抗アビジン標識された磁気ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c から購入) を次いで加え、混合した後 4 で 1 0 分間インキュベートして、細胞懸濁液を得る。緩衝液で容量を 5 0 0 μ L までに補足した。L S カラム (M i l t e n y i B i o t e c から購入) を磁気スタンドに置き、3 m L の緩衝液ですすぎ、次いで細

40

50

胞懸濁液を加えて、フロースルーを回収し、すなわち標識されない富化されたB細胞懸濁液を回収した。さらに3 mLの緩衝液を加え、フロースルーを回収し、前の段階のフロースルーと合わせて、即ちマウス脾臓から単離したB細胞を得た。

【0109】

二、マウスB細胞増殖実験

実施例5の段階一から得られたB細胞を96穴細胞培養プレート上に1ウェルあたり 5×10^4 個細胞で播種し、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ のF(ab')断片化ヤギ抗マウスIgM二次抗体、 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ の実施例1で製造された免疫原(hBlyS-ECD)又はマウスBlySタンパク質抗体(R&D Systemsから購入)と異なる濃度の実施例1又は2で製造されたリード抗体の溶液を加え、1ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ の容量を保証する。反応プレートを37、5%(v/v)CO₂インキュベーター中で72時間インキュベートした後、生細胞の数を計数した。生細胞の数は、Cell Titer-Glo(登録商標) Luminescent Cell Viability Assayキット(Promegaから購入)を用いて測定する。実験操作は、キットの指示書に厳密に従って行った。具体的な実験は以下のように要約される: 96ウェルプレートを測定の前に室温で30分間平衡化し、細胞培養培地等容量のCell Titer-Glo(登録商標)試薬を細胞培養培地に加え、シェーカーに2分間入れて細胞溶解を誘導し、またウェルプレートを室温で10分間放置して発光シグナルを安定化させ、最終的にプレートリーダー(SpectraMax 384pLus, Molecular Device)で値を読み取る。

10

20

【0110】

BlyS抗体の実施例5の段階二に記載の実験におけるマウスB細胞の増殖に対するBlyS抗体の効果を検出した。その結果は、図10~図11と表16~17に示されたようである。図11は、被験抗体L9G7がマウスBlyS誘導B細胞増殖を阻害することができることを除いて、マウスBlySと交差反応がないことを説明する。

【0111】

【表16】

表16 BlyS抗体のhBlyS-ECDに刺激されたマウスB細胞増殖に対する阻害

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)									
	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	0.000256	0
クローン番号										
89A2G5E7	413.95	433.49	431.19	530.08	3267.88	3363.31	3697.92	3704.82	3123.00	3440.35
97E7B3F2	377.15	382.91	364.46	438.27	2992.95	2937.59	3773.77	3758.77	3380.47	2956.04
93C6F10D3	416.18	466.03	513.55	798.73	3528.81	4364.64	4049.32	3546.19	3418.68	3028.00
マウスIgG対照	3395.07	2590.61	3103.90	3945.19	4015.39	4014.24	3696.60	3878.43	3134.97	2733.32

30

【0112】

40

【表 17】

表 17 B L y S 抗体の h B L y S - E C D に刺激されたマウス B 細胞増殖に対する阻害

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)									
	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	0.000256	0
クローン番号										
2-1G11	2491.49	2681.59	2461.12	2824.44	2747.95	2473.49	2610.72	2556.73	2453.25	2318.27
L9G7	220.90	243.44	307.69	640.17	2263.13	2342.03	2461.50	2475.02	2429.94	2104.22
L1D12	2454.73	2463.75	2557.30	2409.65	2515.59	2461.50	2504.32	2609.14	2446.84	2343.15
ヒトIgG対照	2666.96	2601.72	2584.85	2511.74	2437.50	2501.61	2464.49	2244.03	2224.91	2224.91
35E6F7C3	2485.27	2563.79	2522.83	2525.10	2406.76	2431.79	2520.55	2339.62	2163.23	2157.54
8E7D9C7F5	2359.58	2347.02	2444.10	2301.34	2352.73	2316.18	2245.37	2244.23	2222.53	2100.33
20D1B6E9E5	1919.32	2239.20	2199.22	2483.69	2116.96	2378.58	2183.22	2174.09	2090.69	2259.77
67A2E1D10	2067.84	2240.35	2407.15	2489.40	2331.74	2263.20	2111.25	2195.79	2392.29	2121.53
78C11D2D12	2479.25	2468.98	2338.85	2507.78	2409.62	2389.07	2244.11	2384.51	2205.30	1991.85
89A2G5E7	2478.80	2636.99	2481.07	2644.96	2368.40	2393.44	2166.96	2272.80	2166.96	2087.29
93C6F10D3	2742.84	2617.65	2638.13	2527.74	2542.53	2544.81	2509.53	2293.29	2313.77	2311.50
97E7B3F2	2307.96	2289.69	2413.03	2307.96	2360.50	2575.19	2311.39	2152.65	2197.19	2129.81
111D10D6G3	2355.34	2538.19	2714.19	2518.77	2290.20	2318.77	2130.21	2151.92	2303.92	2115.35
97A3C2H4	2322.00	2396.38	2434.15	2414.69	2299.11	2367.77	2251.04	2199.55	2206.41	2162.93
マウスIgG対照	2354.26	2361.11	2437.57	2520.88	2326.87	2320.03	2415.89	2272.10	2112.33	2192.21

10

20

【0113】

実施例 6 : B L y S 抗体結合の抗原エピトープ (E p i t o p e) の同定

精製された B L y S 抗体とハイブリドーマの抗体を競争酵素結合免疫吸着アッセイ行って、異なる抗体に結合された抗原エピトープを分析した。

【0114】

まず、精製された B L y S 抗体用 P B S を最終濃度 1 . 0 μ g / m L までに希釈し、各ウェルに 5 0 μ L ずつ 9 6 ウェル E L I S A プレートに加え、プラスチックラップでよく密閉し、4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄し、ブロッキング溶液 [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 と 1 % (w / w) B S A の P B S 緩衝液とを含有する] を加え、3 7 で 1 時間ブロックした。ブロッキング溶液を排液し、競争的抗体及びヒト I g G 対照群用 P B S を 4 0 μ g / m L の最終濃度に希釈し、次いで各ウェルに 5 0 μ L ずつ 9 6 ウェル E L I S A プレートに加えた。次いで、ビオチン化された h B L y S - E C D を P B S で 2 n g / m L の最終濃度まで希釈し、次いで各ウェルに 5 0 μ L ずつ 9 6 ウェル E L I S A プレートに加えた。競合抗体及び h B L y S - E C D の最終濃度は、それぞれ 2 0 μ g / m L 及び 1 n g / m L に保証した。3 7 で 2 時間インキュベートした後、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄し、実施例 1 と 2 で得られた精製リード抗体 1 0 0 μ l を各ウェルに加えた。3 7 で 1 時間インキュベートした後、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄した。H R P (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) で標識されたストレプトアビジン (S i g m a から購入) を加え、ウェルごとに 1 0 0 μ L を添加する。3 7 で 1 時間インキュベートした後、プレートをプレート洗浄液で [0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 の P B S 緩衝液を含有する] 4 回洗浄した。各ウェルに T M B 基質 1 0 0 μ L を加え、室温で 5 分間インキュベートした後、各ウェルに 1 0 0 μ L の停止溶液 (1 . 0 N H C l) を加えた。A_{450nm} の読み取り値を E L I S A プレートリーダー (S p e c t r a M a x M 5 e 、 M o l e c u l a r D e v i c e s から購入) で読み取る。その結果は、表

30

40

50

18A～表18Bに示されたようであり、BLyS抗体との間に程度が異なる競争性があり、すなわち異なるエピトープに結合することを説明する。ここで、表中のデータは、競争的抗体を加えた後、hBLyS-ECDの結合のレベルに対する阻害率(%)である。

【0115】

【表18A】

表18A BLyS全ヒト由来抗体競争とhBLyS-ECDの結合

クローン番号	2-1G11	L1D12	L9G7
2-1G11	82	91	79
L1D12	94	94	90
L9G7	96	97	95

10

【0116】

【表18B】

表18B BLyS精製抗体競争体hBLyS-ECDの結合

クローン番号	8E7D9C7F5	93C6F10D3	97A3C2H4	67A2E1D10	78C11D2D12	111D10D6G3	35E6F7C3
8E7D9C7F5	92	85	89	96	94	96	40
93C6F10D3	94	79	90	97	92	95	42
97A3C2H4	93	93	89	96	96	93	55
67A2E1D10	63	44	75	93	80	86	18
78C11D2D12	37	58	46	95	88	95	29
111D10D6G3	27	41	26	96	86	95	22
35E6F7C3	27	33	26	33	36	38	91

20

【0117】

実施例7：軽鎖可変領域アミノ酸配列の測定及びマウス-ヒトキメラ抗体の製造

全RNAの単離：実施例1で選択されたリード抗体に対応するサブクローン培養物から得られた上清液を抗原結合について試験し(すなわち、実施例3～5の検定と活性検定後)、 5×10^7 個ハイブリドーマ細胞を遠心分離により収集し、1mLのTrizolを加えて混合し、1.5mL遠心管に移し、室温で5分間放置して、クロロホルム0.2mLを加え、15秒振動し、2分間静置した後、4℃、12000gで5分間遠心分離し、上清を取って新しい1.5mL遠心管に移し、イソプロパノール0.5mLを加え、チューブの中の液体を穏やかに混合し、室温で10分間静置した後、4℃、12000gで5分間遠心分離し、上清を捨てた。75%(v/v)エタノール(ethanol)1mLを加え、静かに沈殿を洗浄し、4℃、12000gで5分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿を乾燥させ、4℃、12000gで5分間遠心分離し、上清を捨て、ペレットを乾燥させ、DEPC処理したH₂Oを加えて溶解して(55℃の水浴で10分間溶媒を促進する)全RNAを得る。

30

40

【0118】

逆転写とPCR：1μg全RNAをとり、20μL系を構成し、逆転写酵素を加えた後、42℃で60分間反応させ、85℃で10分間反応させた後反応を停止させる。PCRシステムは、cDNA1μL、各プライマー25pmol、DNAポリメラーゼ1μL、及び相応する緩衝系を含む50μLのPCR系を構成し、95℃で3分間初期変性、95℃で15秒間変性、55℃で30秒間アニーリングし、72℃で35秒間伸長し、35サイクル後に72℃で5分間伸長するPCRプログラムを設定して、PCR産物を得る。ここで、逆転写に用いたキットは、PrimeScript RT Master Mixであり、Takaraから購入し、品番はRR036であり、PCRに使用したキットには、

50

NEBから購入した品番はM0492であるQ5スーパーフィデリティ酵素が含まれている。

【0119】

クローニングとシーケンシング：5 μ LのPCR産物を取って、アガロースゲル電気泳動で行い、陽性サンプルを、検出する陽性サンプルは、カラム回収キットを用いて精製し、ここで、回収キットは、NucleoSpin (登録商標) Gel & PCR Clean-upであり、MACHEREY-NAGELから購入し、品番は740609である。ライゲーション反応：サンプル50 ng、T-担体0.5 μ L、リガーゼ (Ligase) 0.5 μ L、緩衝液1 μ L、反応系を10 μ Lとし、16 で30分間反応させてライゲーション産物を得た。ここで、ライゲーションされたキットは、T4 DNAリガーゼであり、NEBから購入し、品番はM0402であり、ライゲーション産物5 μ Lをコンピテント細胞 (Ecos 101 competent cells、Yeasterenから購入、品番FYE607) 100 μ Lに加え、5分間氷浴した。また42 氷浴で1分間熱ショックした後、氷上で1分間放置した後、650 μ Lの抗生物質を含まないSOC培地を加え、振盪器上で200 RPM、37 で30分間蘇生させ、200 μ Lを取り出して、抗生物質を含有する固体培地にコーティングして、インキュベータで37 で一晩培養する。翌日、T-担体上のプライマーM13FとM13Rを用いて、30 μ Lの反応系を構成し、コロニーPCRを行い、ピペットチップを用いてコロニーをつけてPCR反応系に吹いて入れ、0.5 μ Lを吸い出して、100 μ g/mLのアンプシリンを含有する別のLB固体プレート上にクリックして、コロニーを保存し、PCR反応終了後、溶液5 μ Lを取り出して、アガロースゲル電気泳動検出を行い、陽性サンプルをシーケンシングし、分析した[Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Md. (1991)を参照]。

10

20

【0120】

本発明におけるファージにより製造された完全ヒトBLyS抗体のクローニングとシーケンシングについては、実施例2の第三部分を参照し、このシーケンシングの結果も表19、20にもこの部分のシーケンス結果が含まれる。

【0121】

【表19】

30

表19 BLyS抗体アミノ酸配列番号

クローン番号	重鎖タンパク質				軽鎖タンパク質			
	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3
2-1G11	1	2	3	4	5	6	7	8
L9G7	9	10	11	12	13	14	15	16
L1D12	17	18	19	20	21	22	23	24
35E6F7C3	25	26	27	28	29	30	31	32
8E7D9C7F5	33	34	35	36	37	38	39	40
20D1B6E9E5	41	42	43	44	45	46	47	48
78C11D2D12	49	50	51	52	53	54	55	56
89A2G5E7	57	58	59	60	61	62	63	64
97E7B3F2	65	66	67	68	69	70	71	72
97A3C2H4	73	74	75	76	77	78	79	80
67A2E1D10	81	82	83	84	85	86	87	88
111D10D6G3	89	90	91	92	93	94	95	96
93C6F10D3	97	98	99	100	101	102	103	104

40

【0122】

50

ここで、表 19 中の数字は、配列表の配列番号であり、例えば、2 - 1 G 1 1 の重鎖タンパク質可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 であり、2 - 1 G 1 1 の重鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のアミノ酸配列は、配列番号 2 である。

【 0 1 2 3 】

【 表 2 0 】

表 20 B L y S 抗体遺伝子のヌクレオチド配列番号

クローン番号	重鎖タンパク質可変領域	軽鎖タンパク質可変領域
2-1G11	105	106
L9G7	107	108
L1D12	109	110
35E6F7C3	111	112
8E7D9C7F5	113	114
20D1B6E9E5	115	116
78C11D2D12	117	118
89A2G5E7	119	120
97E7B3F2	121	122
97A3C2H4	123	124
67A2E1D10	125	126
111D10D6G3	127	128
93C6F10D3	129	130

10

20

【 0 1 2 4 】

ここで、表 20 中の数字は、配列表の配列番号である。例えば、2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖可変領域のアミノ酸配列の塩基配列は、配列番号 105 であり、2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域のアミノ酸配列の塩基配列は、配列番号 106 である。

30

【 0 1 2 5 】

2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 105 の 76 位乃至 105 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 105 の 148 位乃至 198 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする重鎖可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 105 の 295 位乃至 342 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 106 の 70 位乃至 102 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 106 の 148 位乃至 168 位であり、

2 - 1 G 1 1 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 106 の 265 位乃至 291 位であり、

L 9 G 7 をコードする重鎖可変領域の C D R 1 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 107 の 76 位乃至 105 位であり、

L 9 G 7 をコードする重鎖可変領域の C D R 2 ヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 107 の 148 位乃至 198 位であり、

L 9 G 7 をコードする重鎖可変領域の C D R 3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 107 の 295 位乃至 342 位であり、

L 9 G 7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の C D R 1 ヌクレオチド配列は、配列表

50

の配列番号 108 の 70 位乃至 102 位であり、

L9G7 の軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 108 の 148 位乃至 168 位であり、

L9G7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 108 の 265 位乃至 291 位であり、

L1D12 をコードする重鎖可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 109 の 76 位乃至 105 位であり、

L1D12 をコードする重鎖可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 109 の 148 位乃至 195 位であり、

L1D12 をコードする重鎖可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 109 の 292 位乃至 330 位であり、

L1D12 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 110 の 67 位乃至 99 位であり、

L1D12 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 110 の 145 位乃至 165 位であり、

L1D12 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 110 の 262 位乃至 297 位であり、

35E6F7C3 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 111 の 76 位乃至 105 位であり、

35E6F7C3 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 111 の 148 位乃至 198 位であり、

35E6F7C3 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 111 の 295 位乃至 321 位にあり、

35E6F7C3 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 112 の 70 位乃至 99 位であり、

35E6F7C3 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 112 の 145 位乃至 165 位であり、

35E6F7C3 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 112 の 262 位乃至 288 位までである。

8E7D9C7F5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 113 の 76 位乃至 105 位であり、

8E7D9C7F5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 113 の 148 位乃至 198 位であり、

8E7D9C7F5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 113 の 295 位乃至 342 位であり、

8E7D9C7F5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 114 の 70 位乃至 114 位であり、

8E7D9C7F5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 114 の 160 位乃至 180 位であり、

8E7D9C7F5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 114 の 277 位乃至 303 位までである。

20D1B6E9E5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 115 の 76 位乃至 105 位であり、

20D1B6E9E5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 115 の 148 位乃至 198 位であり、

20D1B6E9E5 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 115 の 295 位乃至 339 位であり、

20D1B6E9E5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 116 の 70 位乃至 117 位であり、

20D1B6E9E5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

は、配列表の配列番号 116 の 163 位乃至 183 位であり、

20D1B6E9E5 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列番号 116 の 280 位乃至 306 位であり、

78C11D2D12 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 117 の 76 位乃至 105 位であり、

78C11D2D12 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列番号 117 の配列表の 148 位乃至 198 位であり、

78C11D2D12 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 117 の 295 位乃至 315 に由来する、

78C11D2D12 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 118 の 70 位乃至 99 位であり、

78C11D2D12 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 118 の 145 位乃至 165 位であり、

78C11D2D12 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 118 の 262 位乃至 288 位であり、

89A2G5E7 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 119 の 76 位乃至 105 位であり、

89A2G5E7 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 119 の 148 位乃至 195 位であり、

89A2G5E7 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 119 の 292 位乃至 327 位であり、

89A2G5E7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 120 の 70 位乃至 105 位であり、

89A2G5E7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 120 の 151 位乃至第 171 位であり、

89A2G5E7 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 120 の 268 位乃至 294 位であり、

97E7B3F2 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 121 の 76 位乃至 105 位であり、

97E7B3F2 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 121 の 148 位乃至 198 位であり、

97E7B3F2 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 121 の 295 位乃至 321 位であり、

97E7B3F2 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 122 の 70 位乃至 117 位であり、

97E7B3F2 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 122 の 163 位乃至 183 位であり、

97E7B3F2 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 122 の 280 位乃至 306 位であり、

97A3C2H4 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 123 の 76 位乃至 105 位であり、

97A3C2H4 をコードする重鎖可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 123 の 148 位乃至 198 位であり、

97A3C2H4 をコードする重鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 123 の 295 位乃至 327 位であり、

97A3C2H4 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR1 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 124 の 70 位乃至 102 位であり、

97A3C2H4 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR2 のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 124 の 148 位乃至 168 位であり、

97A3C2H4 をコードする軽鎖タンパク質可変領域の CDR3 のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

は、配列表の配列番号124の265位乃至291位までである。

67A2E1D10をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125の76位乃至105位であり、

67A2E1D10をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125の148位乃至198位であり、

67A2E1D10をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号125の位置295位乃至333位であり、

67A2E1D10をコードするタンパク質軽鎖タンパク可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126の70位乃至102位であり、

67A2E1D10をコードするタンパク質軽鎖タンパク可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126の148位乃至168位であり、

67A2E1D10をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号126の265位乃至291位であり、

111D10D6G3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127の76位乃至105位であり、

111D10D6G3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127の148位乃至198位であり、

111D10D6G3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号127の295位乃至309位であり、

111D10D6G3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号128の102位乃至70であり、

111D10D6G3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号128の148位乃至168位であり、

111D10D6G3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列番号128の265位乃至291であり、

93C6F10D3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129の76位乃至105であり、

93C6F10D3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129の148位乃至198位であり、

93C6F10D3をコードする重鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号129の295位乃至336位であり、

93C6F10D3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR1のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の70位乃至102位であり、

93C6F10D3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の148位乃至168であり、

93C6F10D3をコードする軽鎖タンパク質可変領域のCDR3のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号130の265位乃至291である。

【0126】

マウス-ヒトキメラBlyS抗体の製造：抗体の重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列を、前記の段階のシーケンシング結果に従って得た。マウス-ヒトキメラBlyS抗体の生産と製造は実施例2での段階三を参照し、即ち、1、組換え担体の製造として、重鎖可変領域を、シグナルペプチドとヒト由来抗体の重鎖IgG1定常領域を含む発現担体に指向的にクローニングし（ここで、発現担体は、Invitrogen社から購入し、組換え段階は、上海睿智化学研究有限公司から完成した）、軽鎖可変領域を、シグナルペプチドとヒト由来抗体の軽鎖kappa定常領域を含む発現担体に指向的にクローニングした（ここで、発現担体は、Invitrogen社から購入し、組換え段階は、上海睿智化学研究有限公司から完成した）、2、細胞トランスフェクション、3、抗体精製。また得られたBlySキメラ抗体に対して特徴付けをした（実施例3～5を参照）。得られたキメラ抗体を、対応するリード抗体クローン番号の前に最初の「c」を付して命名した。例えば、キメラ抗体c8E7D9C7F5に対応するリード抗体クローン番号は8E7D9

10

20

30

40

50

C7F5である。

【0127】

結果は、図12と表21に示めされたようであり、表21は、キメラ抗体がELISAレベルでBLyS組換えタンパク質に結合することを説明する。ここで、表中のデータは、 OD_{450nm} 値である。

【0128】

【表21】

表21 BLySキメラ抗体とビオチン化されたhBLyS-ECDの結合反応のELISAによる検出

10

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
	クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427
c8E7D9C7F5	3.3060	3.3214	3.2359	3.0718	1.6993	0.5743	0.1761	0.0918
c97A3C2H4	3.3024	3.3311	3.3218	3.2608	2.3489	0.9358	0.2502	0.1218
c67A2E1D10	3.1888	3.2390	2.9446	2.7309	1.5835	0.5226	0.1428	0.0848
c111D10D6G3	3.4282	3.3866	3.4048	3.1580	2.1245	0.7471	0.2222	0.1048
ヒトIgG対照	0.1436	0.0720	0.0652	0.0620	0.0662	0.0699	0.0798	0.0731

【0129】

20

Biacore機器により、抗体と抗原との結合と解離が検出される。結果は表22に示されたようであり、BLySキメラ抗体がhBLyS-ECDに対して高い親和性を有することを説明する。

【0130】

【表22】

表22 hBLyS-ECDに対するBLySキメラ抗体の親和定数

クローン番号	親和定数 K _D (nM)	結合定数 k _a (1/Ms)	解離定数 k _d (1/s)
c35E6F7C3	1.454	1.905 × 10 ⁵	2.770 × 10 ⁻⁴
c8E7D9C7F5	2.383	4.565 × 10 ⁵	1.088 × 10 ⁻³
c20D1B6E9E5	0.642	3.294 × 10 ⁵	2.113 × 10 ⁻⁴
c89A2G5E7	0.0857	2.128 × 10 ⁵	1.823 × 10 ⁻⁵
c97E7B3F2	0.147	3.335 × 10 ⁵	4.892 × 10 ⁻⁵
c97A3C2H4	0.446	1.647 × 10 ⁵	7.340 × 10 ⁻⁵
c67A2E1D10	4.990	3.195 × 10 ⁴	1.594 × 10 ⁻⁴
c111D10D6G3	0.297	1.004 × 10 ⁵	2.984 × 10 ⁻⁵
c93C6F10D3	0.386	5.489 × 10 ⁵	2.118 × 10 ⁻⁴

30

40

【0131】

結果は、図13と表23に示されたようである。表23は、BLySキメラ抗体がBLySタンパク質とその受容体BAFFRの結合をブロックすることができることを説明する。ここで、表中のデータは、 OD_{450nm} 値である。

【0132】

【表 2 3】

表 2 3 B L y Sキメラ抗体のB L y Sタンパク質とその受容体B A F F Rの結合の遮断

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
c8E7D9C7F5	3.3060	3.3214	3.2359	3.0718	1.6993	0.5743	0.1761	0.0918
c97A3C2H4	3.3024	3.3311	3.3218	3.2608	2.3489	0.9358	0.2502	0.1218
c67A2E1D10	3.1888	3.2390	2.9446	2.7309	1.5835	0.5226	0.1428	0.0848
c111D10D6G3	3.4282	3.3866	3.4048	3.1580	2.1245	0.7471	0.2222	0.1048
ヒトIgG対照	0.1436	0.0720	0.0652	0.0620	0.0662	0.0699	0.0798	0.0731

10

【0133】

結果は、図 1 4 と表 2 4 に示めされたようであり、表 2 4 は、B L y Sキメラ抗体が、h B L y S - E C D 刺激により引き起こされたマウス B 細胞増殖を阻害することができることを説明する。

【0134】

【表 2 4】

20

表 2 4 B L y Sキメラ抗体のh B L y S - E C Dに刺激されたマウスB細胞増殖に対する阻害

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)									
	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	0.000256	0
クローン番号	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	0.000256	0
c8E7D9C7F5	345.07	367.38	488.27	2069.27	4109.20	4616.25	5282.92	5154.99	4971.89	4754.75
c97A3C2H4	443.52	423.67	577.74	1464.77	3739.53	4450.32	5280.16	4874.00	5015.22	4443.32
c67A2E1D10	1103.30	2611.53	3496.52	3974.22	3896.76	4338.08	5169.07	4805.22	4720.71	4055.21
c93C6F10D3	389.24	433.52	526.75	1091.97	4304.93	4521.70	4922.59	4515.87	4602.11	4315.42
ヒトIgG対照	4884.43	4925.19	5096.35	5036.96	5366.47	5117.30	5066.07	4691.15	4943.82	4394.25

30

【0135】

実施例 8 : マウスのインビボでの B L y S 抗体中の中和活性の検出

雌の B A L B / c マウス (8 ~ 9 週齢、Lingchang Biotech Co., Ltd. から購入) を收容した後、S P F レベルで飼育し、1 週間の順化後に実験を開始した。マウスに実施例 2 と 6 で製造したヒト化又はヒトマウスキメラ B L Y S モノクローナル抗体 (免疫原注射の 1 時間前) を 1 日目及び 3 日目にマウスに静脈注射し、クローン番号は、それぞれ 2 - 1 G 1 1、L 1 D 1 2、C 8 E 7 D 9 C 7 F 5、C 2 0 D 1 B 6 E 9 E 5、C 3 5 E 6 F 7 C 3、C 9 7 A 3 C 2 H 4、C 9 3 C 6 F 1 0 D 3、C 1 1 1 D 1 0 D 6 G 3 であり、用量は 3 m g / k g である。1 日目から 4 日目に、毎日実施例 1 で製造した免疫原 (h B L y S - E C D) を 0 . 3 m g / k g の用量で皮下注射することにより刺激誘導を行った。5 日目に全ての動物を屠殺し、マウスの脾臓重量、脾臓細胞における B 細胞が占める割合と血清中の I g A の濃度を測定した。

40

【0136】

部分的な実験結果は図 1 5 A ~ 図 1 5 C と表 2 5 を参照する。ヒト I g G 対照はヒト I G G である。実験結果は、B L y S 抗体が h B L y S - E C D 刺激により引き起こされたマウス脾細胞における B 細胞の割合の増加を減少させることができることを示している。

【0137】

【表 25 - 1】

表 25-1 B L y S 抗体の脾臓細胞における h B L y S - E C D により
刺激された後のマウス B 細胞が占める割合に対する影響

クローン番号	脾臓細胞における B 細胞が占める割合 (%)
c 8 E 7 D 9 C 7 F 5	34.80
c 2 0 D 1 B 6 E 9 E 5	35.36
ヒト I g G 対照	51.05

10

【0138】

【表 25 - 2】

表 25-2 B L y S 抗体の脾臓細胞における h B L y S - E C D により
刺激された後のマウス B 細胞が占める割合に対する影響

クローン番号	脾臓細胞における B 細胞が占める割合 (%)
2-1G11	25.64
c 3 5 E 6 F 7 C 3	30.51
c 9 7 A 3 C 2 H 4	24.10
ヒト I g G 対照	39.36

20

【0139】

【表 25 - 3】

表 25-3 B L y S 抗体の脾臓細胞における h B L y S - E C D により
刺激された後のマウス B 細胞が占める割合に対する影響

クローン番号	脾臓細胞における B 細胞が占める割合 (%)
L 1 D 1 2	26.75
c 9 3 C 6 F 1 0 D 3	27.11
c 1 1 1 D 1 0 D 6 G 3	33.24
c 9 7 A 3 C 2 H 4	28.19
ヒト I g G 対照	38.29

30

【0140】

実施例 9 : ヒト化 B L y S 抗体の製造及び同定

前記キメラ抗体 c 8 E 7 D 9 C 7 F 5 又は c 9 7 A 3 C 2 H 4 の非 C D R 領域に最適のヒト生殖系列抗体重鎖及び軽鎖可変領域鑄型を生殖系列データベースで選択した。ヒト化 B L y S 抗体の配列は、ヒト生殖系列エクソンの V_H、J_H、V_K 及び J_K 配列から選択される。ここで、c 8 E 7 D 9 C 7 F 5 抗体重鎖可変領域の鑄型は、ヒト生殖系列抗体重鎖 V_H エキシソンの V_H 1 - 18、J_H エキシソンの J_H - 6 であり、軽鎖可変領域の鑄型は、ヒト生殖系列抗体重鎖 V_K エキシソンの B 3、J_K エキシソンの J_K - 4 である。ここで、c 9 7 A 3 C 2 H 4 抗体重鎖可変領域の鑄型は、ヒト生殖系列抗体重鎖 V_H エキシソンの V_H 3 - 7、J_H エキシソンの J_H - 6 であり、軽鎖可変領域の鑄型は、ヒト生殖系列抗体重鎖 V_K エキシソンの A 1 0、J_K エキシソンの J_K - 4 である。

40

【0141】

K a b a t の定義に従って決定されたキメラ抗体 c 8 E 7 D 9 C 7 F 5 又は c 9 7 A 3

50

C2H4の重鎖と軽鎖CDRは、それぞれ選択されたヒト生殖系列鋳型のCDR領域に移植されて、生殖系列鋳型を置換し、ヒト化された抗体が得られる。マウス由来の抗体の三次元構造を基にし、埋め込まれた残基、CDR領域と直接相互作用する残基及びV_HとV_L構想について重要な影響を与えるフレームワーク領域の残基にたいして復帰変異を行って、ヒト化された抗体が得られる。

【0142】

ヒト化B_Ly_S抗体変異体の重鎖と軽鎖可変領域とキメラ抗体の重鎖と軽鎖可変領域とのアミノ酸配列アラインメントは、表26に示されたようである。ここで、ヒト化B_Ly_S抗体h8E7D9C7F5変異体の重鎖可変領域の配列は、それぞれ配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146であり、軽鎖可変領域の配列は、それぞれ配列番号147、配列番号148である。ヒト化B_Ly_S抗体h97A3C2H4の変異体の重鎖可変領域の配列は、それぞれ配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号152であり、軽鎖可変領域の配列は、それぞれ配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157である。

10

【0143】

ヒト生殖系列重鎖可変領域鋳型V_H1-18/J_H6(配列番号136)

V_H1-18:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQ
APGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTA
YME LRS LRSDDTAVYYCAR、

20

J_H6:WGQGT VTVSS。

【0144】

ヒト生殖系列軽鎖可変領域鋳型B3/J_K4(配列番号137)

B3:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL
AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGSDFTL
TISSLQAEDVAVYYC、

J_K4:FGGGTKVEIK。

30

【0145】

ヒト生殖系列重鎖可変領域鋳型V_H3-7/J_H6(配列番号138)

V_H3-7:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYWMSWVRQ
APGKGLEWVANIKQDGSSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLRAEDTAVYYCAR、

J_H6:WGQGT VTVSS。

【0146】

ヒト生殖系列軽鎖可変領域鋳型A10/J_K4(配列番号139)

A10:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQK
PDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGSDFTLTLINSLE
AEDAATYYC、

40

J_K4:FGGGTKVEIK。

【0147】

【表 26 - 1】

表 26-1 ヒト化BLyS抗体h8E7D9C7F5とキメラ抗体c8E7D9C7F5可変領域との配列アライメント

抗体名	重鎖名	人類抗体重鎖可変領域鋳型V _H	ドナー (Donor) フレームワーク残基及び復帰変異	配列番号	軽鎖名	人類抗体軽鎖可変領域鋳型V _K	ドナーフレームワーク残基及び復帰変異	配列番号
c8E7D9C7F5	V _H	無	CDR	33	V _K	無	CDR	37
h8E7D9C7F5-1	V _H . 1	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E	140	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-2	V _H . 1	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E	140	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148
h8E7D9C7F5-3	V _H . 1a	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A	141	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-4	V _H . 1a	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A	141	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148
h8E7D9C7F5-5	V _H . 1b	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L	142	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-6	V _H . 1b	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L	142	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148
h8E7D9C7F5-7	V _H . 1c	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I	143	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-8	V _H . 1c	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I	143	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148
h8E7D9C7F5-9	V _H . 1d	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I, R38K	144	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-10	V _H . 1d	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I, R38K	144	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148
h8E7D9C7F5-11	V _H . 1e	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I, R38K, R66K, V67A	145	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-12	V _H . 1e	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I, R38K, R66K, V67A	145	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148
h8E7D9C7F5-13	V _H . 1f	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I, R38K, R66K, V67A, G44A, T73K, Y91F	146	V _K . 1	B3/J _K 4	CDR-Grafted, Y49K	147
h8E7D9C7F5-14	V _H . 1f	V _H 1-18/J _H 6	CDR-Grafted, Q1E, T71A, M69L, M48I, R38K, R66K, V67A, G44A, T73K, Y91F	146	V _K . 1a	B3/J _K 4	CDR-Grafted, M4L, Y49K	148

【 0 1 4 8 】

10

20

30

40

【表 2 6 - 2】

表 2 6 - 2 ヒト化 B L y S 抗体 h 9 7 A 3 C 2 H 4 とキメラ抗体 c 9 7 A 3 C 2 H 4 可変領域との配列アライメント

抗体名	重鎖名	人類抗体重鎖可変領域鋳型 V _H	ドナーフレームワーク残基及び復帰変異	配列番号	軽鎖名	人類抗体軽鎖可変領域鋳型 V _K	ドナーフレームワーク残基及び復帰変異	配列番号
c97A3C2H4	V _H	無	CDR	73	V _K	無	CDR	77
h97A3C2H4-1	V _{H.1}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted	149	V _{K.1}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted	153
h97A3C2H4-2	V _{H.1}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted	149	V _{K.1a}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T	154
h97A3C2H4-3	V _{H.1a}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T	150	V _{K.1}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted	153
h97A3C2H4-4	V _{H.1a}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T	150	V _{K.1a}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T	154
h97A3C2H4-5	V _{H.1b}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R	151	V _{K.1}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted	153
h97A3C2H4-6	V _{H.1b}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R	151	V _{K.1a}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T	154
h97A3C2H4-7	V _{H.1b}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R	151	V _{K.1b}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T, E1D, V3L	155
h97A3C2H4-8	V _{H.1b}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R	151	V _{K.1c}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T, P40T	156
h97A3C2H4-9	V _{H.1b}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R	151	V _{K.1d}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T, E1D, V3L, P40T	157
h97A3C2H4-10	V _{H.1c}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R, G42E	152	V _{K.1b}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T, E1D, V3L	155
h97A3C2H4-11	V _{H.1c}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R, G42E	152	V _{K.1c}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T, P40T	156
h97A3C2H4-12	V _{H.1c}	V _{H3-7/J_{H6}}	CDR-Grafted, A93T, G44R, G42E	152	V _{K.1d}	A10/J _{K4}	CDR-Grafted, V58T, E1D, V3L, P40T	157

【 0 1 4 9 】

ヒト化 B L y S 抗体バリエーションの重鎖及び軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は、表 2 7 に示に示されたようである。ここで、ヒト化 B L y S 抗体 h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 バリエーションの重鎖可変領域のヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 1 5 8、配列番号 1 5 9、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 1、配列番号 1 6 2、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4 であり、軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は配列番号 1 6 5、配列番号 1 6 6 である。ヒト化 B L y S 抗体 h 9 7 A 3 C 2 H 4 バリエーションの重鎖可変領域のヌクレオチド配列は、配列番号 1 6 7、配列番号 1 6 8、配列番号 1 6 9、配列番号 1 7 0 であり、軽鎖可変領域のヌクレオチドは、それぞれに配列番号 1 7 1、配列番号 1 7 2、配列番号 1 7 3、配列番号 1 7 4、配列番号 1 7 5 である。

【 0 1 5 0 】

10

20

30

40

【表 27 - 1】

表 27-1 ヒト化 B L y S 抗体 h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 可変領域のヌクレオチドの配列番号

抗体名	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1	1 5 8	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 2	1 5 8	1 6 6
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 3	1 5 9	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 4	1 5 9	1 6 6
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 5	1 6 0	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 6	1 6 0	1 6 6
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 7	1 6 1	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 8	1 6 1	1 6 6
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 9	1 6 2	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1 0	1 6 2	1 6 6
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1 1	1 6 3	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1 2	1 6 3	1 6 6
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1 3	1 6 4	1 6 5
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1 4	1 6 4	1 6 6

10

20

【 0 1 5 1 】

【表 27 - 2】

表 27-2 ヒト化 B L y S 抗体 h 9 7 A 3 C 2 H 4 可変領域ヌクレオチドの配列番号

抗体名	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 1	1 6 7	1 7 1
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 2	1 6 7	1 7 2
H 9 7 A 3 C 2 H 4 - 3	1 6 8	1 7 1
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 4	1 6 8	1 7 2
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 5	1 6 9	1 7 1
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 6	1 6 9	1 7 2
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 7	1 6 9	1 7 3
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 8	1 6 9	1 7 4
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 9	1 6 9	1 7 5
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 1 0	1 7 0	1 7 3
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 1 1	1 7 0	1 7 4
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 1 2	1 7 0	1 7 5

30

40

【 0 1 5 2 】

ヒト化 V_H 又は V_L ドメインから合成された重複オリゴヌクレオチドを配列に基づいて、PCR オーバーラップ伸長を用いて各ドメインを組み立てた。PCR 産物に組み込まれた制限部位を用いて、V_H ドメインを、シグナルペプチドとヒト由来抗体の重鎖 I g G 1 定常領域を含む発現担体に指向的にクローニングし（ここで、発現担体は、Invitrogen 社から購入し、組換え段階は、上海睿智化学研究有限公司から完成した）、V_L ドメインを、シグナルペプチドとヒト由来抗体の軽鎖 k a p p a 定常領域を含む発現担体

50

に指向的にクローニングして（ここで、発現担体は、Invitrogen社から購入し、組換え段階は、上海睿智化学研究有限公司から完成した）、得られた組換えプラスミドは、シーケンシング検証を通じて、高純度の組換えプラスミドを抽出し、 $0.22\mu\text{m}$ フィルターメンブレンの濾過を通じて、トランスフェクションの使用に提供される。ヒト化BLyS抗体の生産と製造は、実施例2中の第三段階を参考し、得られたBLyS抗体について特徴づけを行った（実施例3～5、7参照）。

【0153】

結果は、図16と表28に示されたようであり、表28は、ヒト化BLyS抗体とBLyS組み換えタンパク質がELISAレベルで結合していることを説明する。ここで、表の中のデータは OD_{450nm} 値である。

【0154】

【表28】

表28 ヒト化抗体とビオチン化されたhBLyS-ECDの結合反応のELISAによる検出

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)								
	クローン番号	66.7	13.3	2.67	0.534	0.107	0.0213	0.00427	0
h8E7D9C7F5-1	2.2986	2.2019	2.1808	1.8797	1.3505	0.4991	0.1950	0.1285	
c8E7D9C7F5	2.3233	2.3700	2.2093	1.9660	1.2801	0.5083	0.1978	0.3222	
h97A3C2H4-9	2.3711	2.2738	2.2379	1.8774	1.0192	0.3716	0.1794	0.1978	
c97A3C2H4	2.4051	2.3430	2.2493	1.9071	1.1888	0.3745	0.1937	0.1653	
ヒトIgG対照	0.1401	0.1035	0.2374	0.1414	0.1171	0.0887	0.1212	0.1194	

【0155】

Biacore機器により、抗体と抗原との結合と解離が検出される。結果は、表29に示されたようであり、BLySヒト化抗体がhBLyS-ECDに対して高い親和性を有することを説明する。

【0156】

【表29】

表29 ヒト化抗体のhBLyS-ECDに対する親和定数

クローン番号	親和定数 K _D (nM)	結合定数 k _a (1/Ms)	解離定数 k _d (1/s)
c8E7D9C7F5	2.941	2.427×10^5	7.138×10^{-4}
h8E7D9C7F5-1	4.329	2.177×10^5	9.423×10^{-4}
c97A3C2H4	1.488	1.206×10^5	1.794×10^{-4}
h97A3C2H4-9	1.878	1.150×10^5	2.160×10^{-4}

【0157】

結果は、図17と表30に示されたようであり、表30は、BLySヒト化抗体がBLySタンパク質とその受容体BAFFRの結合をブロックすることができることを説明する。ここで、表中のデータは、 OD_{450nm} 値である。

【0158】

10

20

30

40

【表 3 0】

表 3 0 B L y S ヒト化抗体の B L y S タンパク質とその受容体 B A F F R の結合の阻害

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)								
	クローン番号	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0
h8E7D9C7F5-1	0.4501	0.7213	1.1150	1.5421	1.7835	1.8727	1.9808	2.0499	
c8E7D9C7F5	0.5296	0.6604	1.0354	1.5597	1.8533	1.9748	2.0080	1.9519	
h97A3C2H4-9	0.5060	0.7477	1.1276	1.5564	1.8094	1.9797	1.9601	1.9430	
c97A3C2H4	0.4740	0.7166	1.0687	1.4683	1.7871	1.8425	1.9609	1.9144	
ヒトIgG対照	1.8655	1.9140	1.8696	1.8512	1.7914	1.8435	1.9850	1.9992	

10

【0159】

結果は、図 1 8 と表 3 1 に示めされたようであり、表 3 1 は、B L y S ヒト化抗体が、h B L y S - E C D 刺激により引き起こされたマウス B 細胞増殖を阻害することができることを説明する。

【0160】

【表 3 1】

20

表 3 1 B L y S ヒト化抗体の h B L y S - E C D に刺激されたマウス B 細胞増殖に対する阻害

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)									
	クローン番号	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	0.000256
h8E7D9C7F5-1	131.23	151.51	208.78	950.84	2726.07	2973.03	3199.70	3120.96	2995.69	3481.26
c8E7D9C7F5	116.00	187.02	187.02	408.36	3195.83	2949.63	3021.83	3357.99	3305.91	3639.69
h97A3C2H4-9	126.73	137.39	216.75	1108.61	2772.70	2964.58	2965.76	3541.38	3084.20	3591.13
c97A3C2H4	169.37	158.71	222.67	428.76	2892.33	2964.58	3053.41	2900.62	3107.89	3451.37
ヒトIgG対照	3721.21	4701.60	4430.12	4291.42	4201.33	3921.55	3733.06	3861.09	3967.79	3573.02

30

【0161】

一方、マウスの体内で B L y S ヒト化抗体の中和活性が検出された。実験結果は、図 1 9 A ~ 1 9 B と表 3 2 に示されたようである。実験結果は、B L y S ヒト化抗体が h B L y S - E C D 刺激により引き起こされたマウス脾細胞における B 細胞の割合の増加を低下させ、一方血清中の I g A レベルを効果的に阻害できることを表明した。

【0162】

【表 3 2 - 1】

40

表 3 2 - 1 B L y S ヒト化抗体の脾臓細胞における h B L y S - E C D により刺激された後のマウス B 細胞が占める割合に対する影響

クローン番号	脾臓細胞における B 細胞が占める割合 (%)
h8E7D9C7F5-1	28.29
h97A3C2H4-9	28.98
ヒトIgG対照	39.74

【0163】

【表 3 2 - 2】

表 3 2 - 2 B L y S ヒト化抗体のマウス血清中の I g A の濃度
に対する濃度の影響

クローン番号	I g A 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
h 8 E 7 D 9 C 7 F 5 - 1	8 0 . 8 9
h 9 7 A 3 C 2 H 4 - 9	1 2 1 . 3 3
ヒト I g G 対照	3 8 7 . 0 2

10

【 0 1 6 4 】

本出願において言及される全ての参考文献は、全部本発明で参考として引用され、各文献が個別に引用されることを参照とするようである。さらに、本発明の前記の内容を読んだ後、当業者は本発明に様々な変更を加えることができ、そのような同等の形態も添付の特許請求の範囲に記載された請求項の範囲内に入ることが理解されるべきである。

【 図 1 】

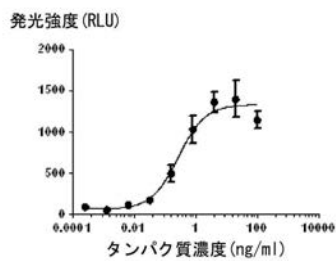


図1

【 図 2 A - B 】

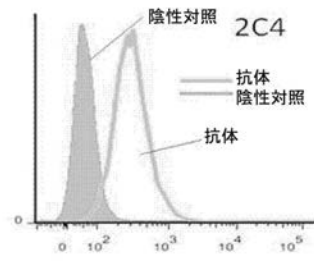


図2A

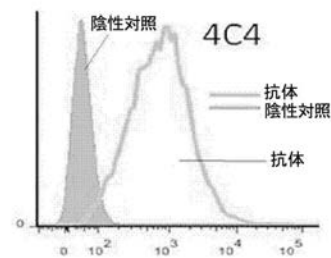


図2B

【 図 3 】

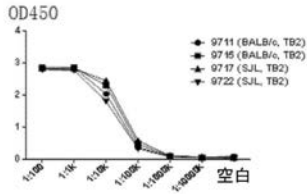


図3

【 図 5 A - B 】

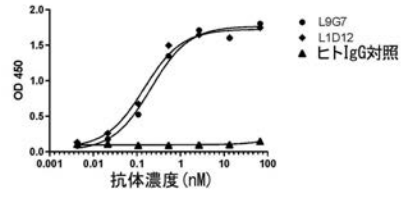


図5A

【 図 4 】

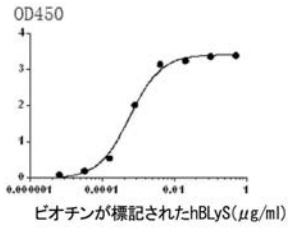


図4

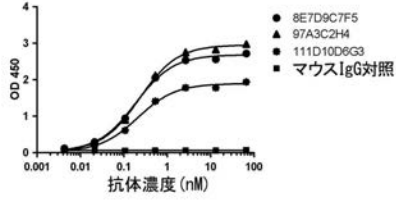


図5B

【 図 6 A - B 】

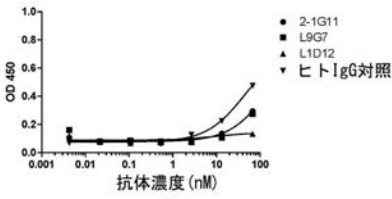


図6A

【 図 7 】

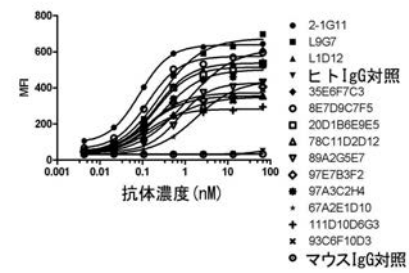


図7

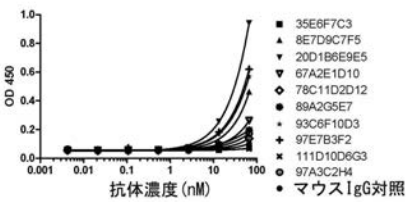


図6B

【 図 8 】

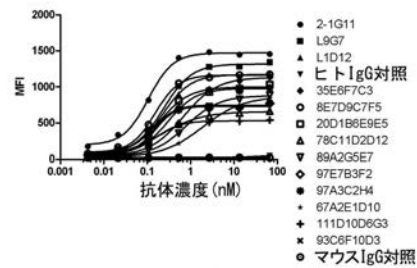


図8

【 図 9 A - B 】

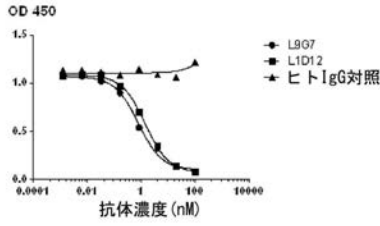


図9A

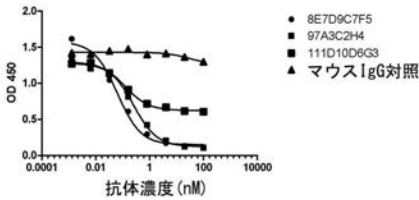


図9B

【 図 1 0 】

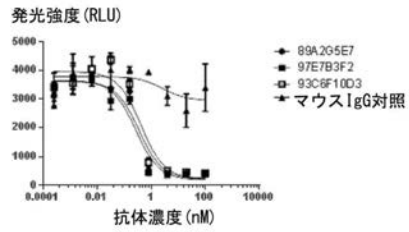


図10

【 図 1 1 】

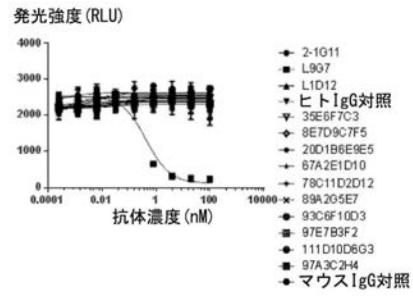


図11

【 図 1 2 】

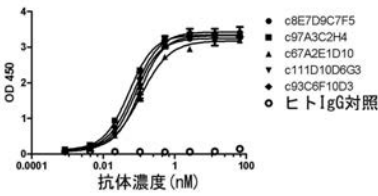


図12

【 図 1 3 】

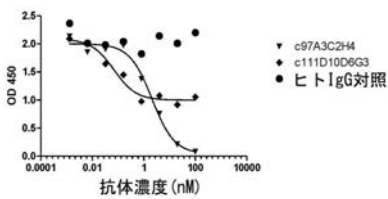


図13

【 図 1 4 】

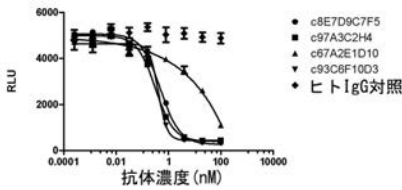


図14

【 図 1 5 A - C 】

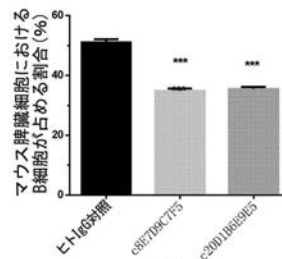


図15A

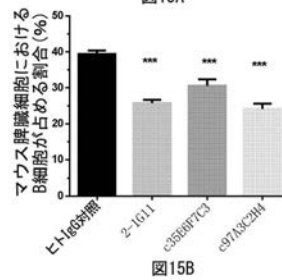


図15B

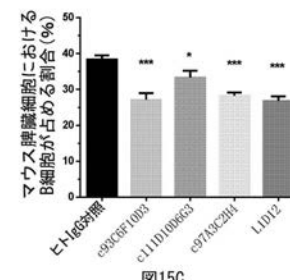


図15C

【 図 1 6 】

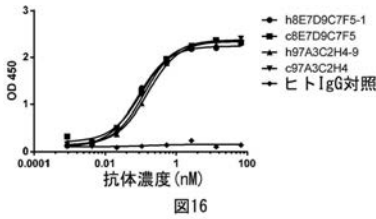


図16

【 図 1 7 】

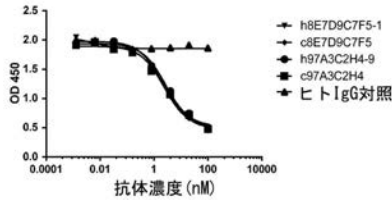


図17

【 図 1 8 】

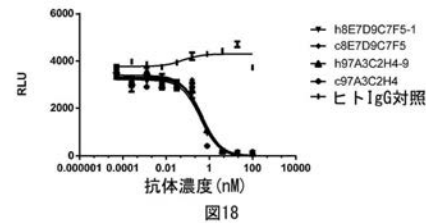


図18

【 図 1 9 A - B 】

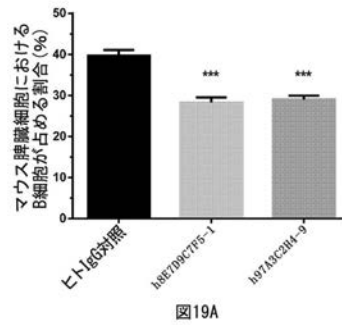


図19A

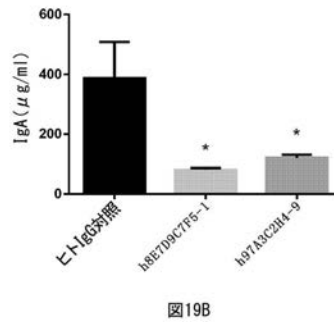


図19B

【 配 列 表 】

2019533423000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 31 年 1 月 31 日 (2019.1.31)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

B L y S 抗 体 の 相 補 性 決 定 領 域 (C D R) で 有 る 重 鎖 C D R 1 、 重 鎖 C D R 2 、 重 鎖 C D R 3 中 の 一 種 又 は 多 種 、 及 び / 又 は 、 B L y S 抗 体 の 軽 鎖 C D R 1 、 軽 鎖 C D R 2 と 軽 鎖 C D R 3 中 の 一 種 又 は 多 種 を 含 み 、

前 記 重 鎖 C D R 1 の ア ミ ノ 酸 (a m i n o a c i d) 配 列 は 、 配 列 表 の 配 列 番 号 2 、 配 列 番 号 1 0 、 配 列 番 号 1 8 、 配 列 番 号 2 6 、 配 列 番 号 3 4 、 配 列 番 号 4 2 、 配 列 番 号 5 0 、 配 列 番 号 5 8 、 配 列 番 号 6 6 、 配 列 番 号 7 4 、 配 列 番 号 8 2 、 配 列 番 号 9 0 又 は 配 列 番 号 9 8 に 示 さ れ た よ う で 有 り 、

前 記 重 鎖 C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列 は 、 配 列 表 の 配 列 番 号 3 、 配 列 番 号 1 1 、 配 列 番 号 1 9 、 配 列 番 号 2 7 、 配 列 番 号 3 5 、 配 列 番 号 4 3 、 配 列 番 号 5 1 、 配 列 番 号 5 9 、 配 列 番 号 6 7 、 配 列 番 号 7 5 、 配 列 番 号 8 3 、 配 列 番 号 9 1 又 は 配 列 番 号 9 9 に 示 さ れ た よ う で 有 り 、

前 記 重 鎖 C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列 は 、 配 列 表 の 配 列 番 号 4 、 配 列 番 号 1 2 、 配 列 番 号 2 0 、 配 列 番 号 2 8 、 配 列 番 号 3 6 、 配 列 番 号 4 4 、 配 列 番 号 5 2 、 配 列 番 号 6 0 、 配 列 番 号 6 8 、 配 列 番 号 7 6 、 配 列 番 号 8 4 、 配 列 番 号 9 2 又 は 配 列 番 号 1 0 0 に 示 さ れ た よ う

であり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 38、配列番号 46、配列番号 54、配列番号 62、配列番号 70、配列番号 78、配列番号 86、配列番号 94 又は配列番号 102 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7、配列番号 15、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 39、配列番号 47、配列番号 55、配列番号 63、配列番号 71、配列番号 79、配列番号 87、配列番号 95 又は配列番号 103 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8、配列番号 16、配列番号 24、配列番号 32、配列番号 40、配列番号 48、配列番号 56、配列番号 64、配列番号 72、配列番号 80、配列番号 88、配列番号 96 又は配列番号 104 に示されたようであり、

又は、前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 2、配列番号 10、配列番号 18、配列番号 26、配列番号 34、配列番号 42、配列番号 50、配列番号 58、配列番号 66、配列番号 74、配列番号 82、配列番号 90 又は配列番号 98 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3、配列番号 11、配列番号 19、配列番号 27、配列番号 35、配列番号 43、配列番号 51、配列番号 59、配列番号 67、配列番号 75、配列番号 83、配列番号 91 又は配列番号 99 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4、配列番号 12、配列番号 20、配列番号 28、配列番号 36、配列番号 44、配列番号 52、配列番号 60、配列番号 68、配列番号 76、配列番号 84、配列番号 92 又は配列番号 100 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 38、配列番号 46、配列番号 54、配列番号 62、配列番号 70、配列番号 78、配列番号 86、配列番号 94 又は配列番号 102 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7、配列番号 15、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 39、配列番号 47、配列番号 55、配列番号 63、配列番号 71、配列番号 79、配列番号 87、配列番号 95 又は配列番号 103 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8、配列番号 16、配列番号 24、配列番号 32、配列番号 40、配列番号 48、配列番号 56、配列番号 64、配列番号 72、配列番号 80、配列番号 88、配列番号 96 又は配列番号 104 に示されたアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列に示されることを特徴とする単離されたタンパク質 (p r o t e i n) 。

【請求項 2】

前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 2 に示されたようであり、前記重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 3 に示されたようであり、また前記重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 4 に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 10 に示されたようであり、前記重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 11 に示されたようであり、また前記重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 12 に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 18 に示されたようであり、前記重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 19 に示されたようであり、また前記重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 20 に示されたようであり、

前記重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 26 に示されたようであり、前

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 2 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 3 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 4 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 0 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 1 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 2 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 8 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 7 9 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 0 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 6 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 7 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 8 に示されたようであり、

前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 4 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 5 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 6 に示されたようであり、

又は、前記軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 2 に示されたようであり、前記軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 3 に示されたようであり、また前記軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 4 に示されたようであることを特徴とする請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

B L y S 抗体の重鎖フレームワーク領域 (F r a m e w o r k a r e a) 及び / 又は軽鎖フレームワーク領域を含むフレームワーク領域をさらに含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記重鎖フレームワーク領域は、ヒト又はマウス抗体重鎖フレームワーク領域であり、及び / 又は、前記軽鎖フレームワーク領域は、ヒト又はマウス抗体軽鎖フレームワーク領域であることを特徴とする請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

前記重鎖フレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系抗体重鎖 V_H エキソン (E x o n) の V_H 1 - 1 8、V_H エキシソンの V_H 3 - 7 又は J_H エキシソンの J_H - 6、また前記軽鎖フレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系抗体軽鎖 V_K エキシソンの B 3、J_K エキシソンの J_K - 4 又は V_K エキシソンの A 1 0 であることを特徴とする請求項 4 に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記 C D R とフレームワーク領域からなる B L y S 抗体の重鎖可変領域及び / 又は B L y S 抗体の軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1、配列番号 9、配列番号 1 7、配列番号 2 5、配列番号 3 3、配列番号 4 1、配列番号 4 9、配列番号 5 7、配列番号 6 5、配列番号 7 3、配列番号 8 1、配列番号 8 9、配列番号 9 7、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 9、配列番号 1 5 0、配列番号 1 5 1 又は配列番号 1 5 2 に示されたようであり、

前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 5、配列番号 1 3、配列番号 2 1、配列番号 2 9、配列番号 3 7、配列番号 4 5、配列番号 5 3、配列番号 6 1、配列番号 6 9、配列番号 7 7、配列番号 8 5、配列番号 9 3、配列番号 1 0 1、配列番号 1 4 7、配列番号 1 4 8、配列番号 1 5 3、配列番号 1 5 4、配列番号 1 5 5、配列番号 1 5 6、又は配列番号 1 5 7 に示されたようであることを特徴とする請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 5 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 9 に示されたようであり、また

【請求項 8】

前記タンパク質は、抗体重鎖定常領域及び / 又は抗体軽鎖定常領域をさらに含むことを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト由来又はマウス由来抗体重鎖定常領域であり、

前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト由来又はマウス由来抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする請求項 8 に記載のタンパク質。

【請求項 10】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト由来抗体重鎖定常領域であり、

前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト由来抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする請求項 9 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記タンパク質は、B L y S 抗体のモノクローナル抗体、抗体全長タンパク質、抗原 - 抗体結合ドメイン (d o m a i n) タンパク質断片、二重特異性抗体、多重特異性抗体、単一鎖抗体、単一ドメイン抗体又は単一ゾーン抗体であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 12】

請求項 1 乃至 11 のいずれか一項に記載のタンパク質をコード (c o d e) する核酸。

【請求項 13】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 105、配列番号 107、配列番号 109、配列番号 111、配列番号 113、配列番号 115、配列番号 117、配列番号 119、配列番号 121、配列番号 123、配列番号 125、配列番号 127、配列番号 129、配列番号 158、配列番号 159、配列番号 160、配列番号 161、配列番号 162、配列番号 163、配列番号 164、配列番号 167、配列番号 168、配列番号 169 又は配列番号 170 に示されたようであり、

及び / 又は、前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド (n u c l e o t i d e) 配列は、配列表の配列番号 106、配列番号 108、配列番号 110、配列番号 112、配列番号 114、配列番号 116、配列番号 118、配列番号 120、配列番号 122、配列番号 124、配列番号 126、配列番号 128、配列番号 130、配列番号 165、配列番号 166、配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、配列番号 174 又は配列番号 175 に示されたようであることを特徴とする請求項 12 に記載の核酸。

【請求項 14】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 105 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 106 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 107 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 108 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 109 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 110 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 111 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 112 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 113 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 114 に示されたようであり、

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 115 に示されたようであり、また前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号 116 に示されたようであり、

請求項 1 2 乃至 1 4 のいずれか一項に記載の核酸を含む組換え発現担体。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の組換え発現担体を含む組換え発現形質転換体。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の組換え発現形質転換体を培養し、培養物から B L y S 抗体を獲得する段階を含むことを特徴とする B L y S 抗体の製造方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質をインビトロ (i n v i t r o) で被験試料と接触させて、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載のタンパク質と前記被験試料の結合を検出する段階を含むことを特徴とする B L y S タンパク質を過剰発現する細胞の検出方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質を活性成分として含むことを特徴とする B L y S タンパク質を過剰発現する細胞を検出するための組成物。

【請求項 2 0】

請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質を活性成分と薬学的に許容される担体として含むことを特徴とする薬物組成物。

【請求項 2 1】

前記薬物組成物は、0 . 0 1 ~ 9 9 . 9 9 % の請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載の前記タンパク質と 0 . 0 1 ~ 9 9 . 9 9 % の薬用担体を含み、前記パーセンテージは、前記薬物組成物の質量パーセンテージであることを特徴とする請求項 2 0 に記載の薬物組成物。

【請求項 2 2】

B L y S 発現又は機能異常に関連する疾患を予防又は治療するための請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 2 0 又は 2 1 に記載の薬物組成物。

【請求項 2 3】

自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患又は増殖性疾患を予防又は治療するための請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 2 0 又は 2 1 に記載の薬物組成物。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/091839
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28 (2006.01) i; C07K 16/24 (2006.01) i; A61K 39/00 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; C12N 15/12 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, CNABS, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, GENBANK, PUBMED, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, CNKI: SHANGHAI PIONEER BIOMEDICINE CO., LTD.; CAO, Xiaodan; LIU, Liyue; GONG, Jing; SHAO, Xiaohui; GU, Hongzhuan; HU, Yingying; LV, Qiang; SHI, Beilei; LV, Xiaofen; REN, Fang; GONG, Shiyong; LIANG, Shaoqin; monoclonal, ECD, extracellular domain, antigen, immunogen, antibody, monoclonal antibody, 134, 285, Blys, BAFF, Kay, TNFSF13B, TALL-1, THANK, zTNF4, B lymphocyte stimulator, B cells-activating fact, SEQ ID NOs: 1-130		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015218267 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL G. M. B. H.), 06 August 2015 (06.08.2015), description, paragraphs 8, 9, 17-21, 209-211, 214 and 218, and claims 1, 9 and 14-21	1-20
X	CN 101678106 A (ZYMOGENETICS, INC. et al.), 24 March 2010 (24.03.2010), description, page 12, paragraph 1, page 23, last paragraph 1, page 24, paragraph 2 and page 37, paragraphs 3-6	1-20
X	CN 105061596 A (JIANGSU MAI PO BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.), 18 November 2015 (18.11.2015), description, paragraphs 2, 5, 6, 31 and 41	1-20
X	US 2003148445 A1 (NATIONAL JEWISH MEDICAL AND RESEARCH CENTER), 07 August 2003 (07.08.2003), description, column 3, penultimate paragraph to column 4, paragraph 1	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>	
Date of the actual completion of the international search 03 September 2017 (03.09.2017)	Date of mailing of the international search report 29 September 2017 (29.09.2017)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LIU, Miao Telephone No.: (86-10) 010-62414338	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/091839

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO, H.G. et al., "sBAFF mutants induce neutralizing antibodies against BAFF", FEBS LETTERS, vol. 581, no. 4, 17 January 2007 (17.01.2007), ISSN: 0014-5793, abstract, and page 581, right-hand column, last paragraph to page 582, right-hand column, paragraph 4	1-20
A	MOORE, P.A. et al., "BLyS: Member of the Tumour Necrosis Factor Family and Lymphocyte Stimulator", SCIENCE, vol. 285, no. 5425, 09 July 1999 (09.07.1999), ISSN: 0036-8075, page 260, left-hand column, paragraph 1 to page 263, left-hand column, paragraph 1	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/091839**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/091839

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2015218267 A1	06 August 2015	AU 2015315834 A1	23 June 2016
		WO 2016039801 A1	17 March 2016
		CA 2934965 A1	17 March 2016
		EP 3099715 A1	07 December 2016
		CN 105873949 A	17 August 2016
		MX 2016009877 A	14 October 2016
		PH 12016501366 A1	15 August 2016
		KR 20160113715 A	30 September 2016
		JP 2017505622 A	23 February 2017
CN 101678106 A	24 March 2010	EA 200901213 A1	30 April 2010
		AU 2008230777 A8	03 July 2014
		PT 2139517 E	11 July 2013
		ES 2422479 T3	11 September 2013
		ZA 200906808 B	26 October 2011
		MX 2009010125 A	17 February 2010
		US 8852591 B2	07 October 2014
		AU 2008230777 B2	27 February 2014
		DK 2139517 T3	26 August 2013
		SI 2139517 T1	30 September 2013
		EP 2139517 A2	06 January 2010
		HR P20130725 T1	11 October 2013
		CA 2681728 C	22 December 2015
		US 2008260737 A1	23 October 2008
		JP 5426531 B2	26 February 2014
		CA 2681728 A1	02 October 2008
		AU 2008230777 A1	02 October 2008
		JP 2010522767 A	08 July 2010
		CN 101678106 B	05 June 2013
		WO 2008119042 A2	02 October 2008
		RS 52888 B	28 February 2014
		AU 2008230777 B8	03 July 2014
		HK 1138502 A1	22 November 2013
		WO 2008119042 A3	30 April 2009
		US 2015017164 A1	15 January 2015
		EP 2139517 B1	29 May 2013
		IL 201114 A	30 January 2014
CN 105061596 A	18 November 2015	None	
US 2003148445 A1	07 August 2003	US 6475987 B1	05 November 2002
		WO 0068378 A1	16 November 2000
		AU 4986700 A	21 November 2000

国际检索报告		国际申请号
		PCT/CN2017/091839
A. 主题的分类		
C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/24(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; A61K; C12N		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNTXT, CNABS, YEN, WOXT, EPTXT, USTXT, GENBANK, PUBMED, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, CNKI; 上海开拓者生物医药有限公司, 曹晓丹, 刘礼乐, 公静, 邵小慧, 顾红专, 胡颖莹, 吕强, 施蓓蕾, 吕晓芬, 任芳, 宫世勇, 梁绍勋, monoclonal, 胞外区, 胞外段, 胞外结构域, ECD, extracellular domain, 抗原, 免疫原, antigen, immunogen, antibody, 单抗, 单克隆抗体, 抗体, 134, 285, Blys, BAFF, Kay, TNFSF13B, TALL-1, THANK, zTNF4, B lymphocyte stimulator, B淋巴细胞刺激因子, B cells-activating fact, SEQ ID NOs:1-130		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2015218267 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL G.M.B.H.) 2015年 8月 6日 (2015-08-06) 说明书第8-9, 17-21, 209-211, 214, 218段, 权利要求1, 9, 14-21	1-20
X	CN 101678106 A (津莫吉尼蒂克斯公司等) 2010年 3月 24日 (2010-03-24) 说明书第12页第1段, 第23页倒数第1段, 第24页第2段, 第37页第3-6段	1-20
X	CN 105061596 A (江苏诺迈博生物医药科技有限公司) 2015年 11月 18日 (2015-11-18) 说明书第2, 5-6, 31, 41段	1-20
X	US 2003148445 A1 (NATIONAL JEWISH MEDICAL AND RESEARCH CENTER) 2003年 8月 7日 (2003-08-07) 说明书第3栏倒数第2段至第4栏第1段	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2017年 9月 3日		2017年 9月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		刘苗
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)010-62414338

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/091839

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	GAO, H.G. 等. "sBAFF mutants induce neutralizing antibodies against BAFF" FEBS Letters, 第581卷, 第4期, 2007年 1月 17日 (2007 - 01 - 17), ISSN: 0014-5793, 摘要, 第581页右栏倒数第1段至第582页右栏第4段	1-20
A	MOORE, P.A. 等. "BLyS: Member of the Tumor Necrosis Factor Family and B Lymphocyte Stimulator" SCIENCE, 第285卷, 第5425期, 1999年 7月 9日 (1999 - 07 - 09), ISSN: 0036-8075, 第260页左栏第1段至第263页左栏第1段	1-20

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/091839

第1栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)
<p>1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：</p> <p>a. (提交提供)</p> <p><input type="checkbox"/> 纸件形式</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 电子形式</p> <p>b. (提交时间)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 含在申请提交时的国际申请中</p> <p><input type="checkbox"/> 以电子形式与国际申请一起提交</p> <p><input type="checkbox"/> 为检索之用随后提交本单位</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。</p> <p>3. 补充意见：</p>	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/091839

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2015218267	A1	2015年 8月 6日	AU	2015315834	A1	2016年 6月 23日
				WO	2016039801	A1	2016年 3月 17日
				CA	2934965	A1	2016年 3月 17日
				EP	3099715	A1	2016年 12月 7日
				CN	105873949	A	2016年 8月 17日
				MX	2016009877	A	2016年 10月 14日
				PH	12016501366	A1	2016年 8月 15日
				KR	20160113715	A	2016年 9月 30日
				JP	2017506622	A	2017年 2月 23日
CN	101678106	A	2010年 3月 24日	EA	200901213	A1	2010年 4月 30日
				AU	2008230777	A8	2014年 7月 3日
				PT	2139517	E	2013年 7月 11日
				ES	2422479	T3	2013年 9月 11日
				ZA	200906808	B	2011年 10月 26日
				MX	2009010125	A	2010年 2月 17日
				US	8852591	B2	2014年 10月 7日
				AU	2008230777	B2	2014年 2月 27日
				DK	2139517	T3	2013年 8月 26日
				SI	2139517	T1	2013年 9月 30日
				EP	2139517	A2	2010年 1月 6日
				HR	P20130725	T1	2013年 10月 11日
				CA	2681728	C	2015年 12月 22日
				US	2008260737	A1	2008年 10月 23日
				JP	5426531	B2	2014年 2月 26日
				CA	2681728	A1	2008年 10月 2日
				AU	2008230777	A1	2008年 10月 2日
				JP	2010522767	A	2010年 7月 8日
				CN	101678106	B	2013年 6月 5日
				WO	2008119042	A2	2008年 10月 2日
				RS	52888	B	2014年 2月 28日
				AU	2008230777	B8	2014年 7月 3日
				HK	1138502	A1	2013年 11月 22日
				WO	2008119042	A3	2009年 4月 30日
				US	2015017164	A1	2015年 1月 15日
				EP	2139517	B1	2013年 5月 29日
				IL	201114	A	2014年 1月 30日
CN	105061596	A	2015年 11月 18日	无			
US	2003148445	A1	2003年 8月 7日	US	6475987	B1	2002年 11月 5日
				WO	0068378	A1	2000年 11月 16日
				AU	4986700	A	2000年 11月 21日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 ツァオ シアオタン

中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビルディング, ルーム 202

(72)発明者 フー インイン

中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビルディング, ルーム 202

(72)発明者 レン ファン

中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビルディング, ルーム 202

(72)発明者 コン シーヨン

中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビルディング, ルーム 202

(72)発明者 コン チン

中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビルディング, ルーム 202

- (72)発明者 リョ チアン
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- (72)発明者 クー ホンチョアン
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- (72)発明者 シー ペイレイ
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- (72)発明者 シャオ シアオホイ
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- (72)発明者 リョ シアオフエン
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- (72)発明者 スチュワート レアング
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- (72)発明者 リーロー リウ
中華人民共和国, シャンハイ 201210, チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレ
ード ゾーン, リーピン ロード 576, ファーラーティールード 56, ナンバー 4 ビ
ルディング, ルーム 202
- F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91X AB05 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 CC02 DD62 DD63 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	blys抗体及其生产方法和应用		
公开(公告)号	JP2019533423A	公开(公告)日	2019-11-21
申请号	JP2018562628	申请日	2017-07-05
发明人	ツアオ シアオタン フー インイン レン ファン コン シーヨン コン チン リョ チアン クー ホンチョアン シー ベイレイ シャオ シアオホイ リョ シアオフエン スチュワート レアング リーロー リウ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12N15/63 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61K39/00 A61K39/395 C07K16/2875 C07K2317/24 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K16/24 C07K16/28		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/28.ZNA C12N15/63.Z C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395.N A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	201610527996.0 2016-07-06 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了BLYS抗体，其产生方法和应用。BLYS抗体是BLYS抗体的重链可变区重链CDR1，重链CDR2，重链CDR3和/或BLYS抗体的轻链可变区轻链CDR1，轻链CDR2，轻链中的一个或多个。包括一个或多个CDR3，其氨基酸序列如本发明中所述。BLYS具有高亲和力，并且可以在蛋白质水平和细胞水平上有效地阻断BLYS蛋白，并防止BLYS蛋白与受体之间的结合。上述BLYS抗体与人APRIL等类似蛋白质抗原缺乏交叉反应性，具有良好的生物学活性，可以抑制BLYS诱导的小鼠B细胞增殖。因此，其被用于制造用于预防或治疗与BLYS表达或功能障碍有关的疾病的药物。[选择图]

