

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5102028号
(P5102028)

(45) 発行日 平成24年12月19日(2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日(2012.10.5)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
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	

請求項の数 26 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-523693 (P2007-523693)	(73) 特許権者	592221528
(86) (22) 出願日	平成17年7月26日(2005.7.26)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2008-511290 (P2008-511290A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 14
(43) 公表日	平成20年4月17日(2008.4.17)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/026320		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02006/033702	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成18年3月30日(2006.3.30)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成19年5月10日(2007.5.10)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	60/591,337		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成16年7月26日(2004.7.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD154抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該抗体は、

配列番号1のアミノ酸配列を含む軽鎖ペプチド、または、配列番号1のアミノ酸配列において、以下：

- 26位のアミノ酸がA s pで置換される、
- 27位のアミノ酸がG l uで置換される、そして
- 33位のアミノ酸がT r pで置換される、

からなる群より選択されるアミノ酸置換のうち少なくとも1つまたは組み合わせを含むアミノ酸配列を含む軽鎖ペプチド；と

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖ペプチド、または、配列番号4のアミノ酸配列において、以下：

- 30位のアミノ酸がH i sで置換される、
- 33位のアミノ酸がT r pで置換される、そして
- 54位のアミノ酸がA s nで置換される、

からなる群より選択されるアミノ酸置換のうち少なくとも1つまたは組み合わせを含むアミノ酸配列を含む重鎖ペプチド；

を含み、該抗体またはその抗原結合フラグメントは、該軽鎖が配列番号1を含む場合には該重鎖ペプチド内に少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、かつ、該抗体またはその抗原結合フラグメントは、該重鎖が配列番号4を含む場合には該軽鎖内に少なくとも1つのア

ミノ酸置換を含み、そして、

該抗体またはその抗原結合フラグメントは、野生型 5 c 8 抗体を上回る、C D 1 5 4 に対する増大した結合親和性を有する、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

単鎖抗体 (s c F v)、F (a b ') 2 フラグメント、F a b フラグメントおよび F d フラグメントから選択される、請求項 1 に記載の抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

検出可能なマーカーで標識された、請求項 1 ~ 2 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

前記検出可能なマーカーは、放射性同位体、酵素、蛍光色素、コロイド状金、染料およびビオチンから選択される、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

治療剤またはビーズに結合体化された、請求項 1 ~ 4 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記治療剤は、放射性同位体、毒素、トキシイドおよび化学療法剤から選択される、請求項 5 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの高分子量ポリマーを含む、請求項 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記ポリマーは、ポリエチレンイミンまたはポリリジンである、請求項 7 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

少なくとも 1 つのアミノ酸が、P E G 化またはグリコシル化されている、請求項 1 ~ 8 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、キット。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする、核酸分子。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の核酸分子または請求項 14 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 16】

C D 1 5 4 に関連するヒトの疾患または障害の処置のための組成物であって、請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、組成物。

【請求項 17】

前記ヒトの疾患または障害が、関節炎に関連する炎症、接触性皮膚炎に関連する炎症、高 I g E 症候群に関連する炎症、炎症性腸疾患に関連する炎症、アレルギー性喘息に関連す

10

20

30

40

50

る炎症、および特発性炎症疾患に関連する炎症から選択される、炎症である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記関節炎は、慢性関節リウマチ、非リウマチ性炎症性関節炎、ライム病に関連する関節炎および炎症性変形性関節症から選択され、前記特発性炎症疾患は、乾癬または全身エリテマトーデスである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記疾患または障害は、重症筋無力症、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、真性糖尿病、クローン病、多発性硬化症および薬物誘発性自己免疫疾患から選択される、請求項 16 に記載の組成物。

10

【請求項 20】

前記障害は、被験体による移植された器官の拒絶であり、該移植された器官は、移植された心臓、移植された腎臓、移植された肝臓、移植された皮膚、移植された膵島細胞、および移植された骨髄から選択される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記障害は、被験体における移植片対宿主病、アレルギー性応答、自己免疫応答、および線維症から選択される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記線維症は、肺線維症または線維性疾患であり、前記自己免疫応答は、ライター症候群、脊椎関節炎、ライム病、HIV 感染、梅毒および結核から選択されるものから誘導される、請求項 21 に記載の組成物。

20

【請求項 23】

前記肺線維症は、成人呼吸促進症候群に続発性の肺線維症、薬物誘発性肺線維症、特発性肺線維症または過敏性肺炎から選択され、前記線維性疾患は、C 型肝炎、B 型肝炎、肝硬変、毒性傷害に続発性の肝硬変、薬物に続発性の肝硬変、ウイルス感染に続発性の肝硬変、および自己免疫疾患に続発性の肝硬変から選択される、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記疾患または障害は、胃腸疾患または脈管疾患である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記胃腸疾患は、食道運動障害、炎症性腸疾患および強皮症から選択され；そして前記脈管疾患は、アテローム性動脈硬化症または再灌流傷害である、請求項 24 に記載の組成物。

30

【請求項 26】

前記疾患または障害は、T 細胞腫瘍癌であり、該 T 細胞腫瘍癌は、T 細胞白血病および T 細胞リンパ腫から選択される、請求項 16 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本出願は参考として全体が本明細書中で援用される 2004 年 7 月 26 日出願の米国暫定出願 60/591,337 の優先権を主張する。

40

【0002】

(技術分野)

本発明は部分的に軽鎖および重鎖のいずれかまたは両方の可変領域において置換されたアミノ酸少なくとも 1 つを含む抗 CD154 抗体およびそのフラグメント、および、そのような抗体またはそのフラグメントを含む組成物、および、抗体またはそのフラグメントを用いる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

50

体液性および細胞媒介性の免疫の発生は抗原提示細胞（APC）およびエフェクターT細胞との活性化ヘルパーT細胞の相互作用により調節される。ヘルパーT細胞の活性化は抗原特異的T細胞レセプター（TCR）のその同種ペプチドMHCリガンドとの相互作用に依存するのみならず、多くの細胞接着分子および共起刺激分子による協調的結合および活性化を必要とする（非特許文献1）。

【0004】

重要な共起刺激分子はCD154（CD40リガンド、CD40L、gp39、T-BAM、T細胞活性化分子、TRAPとしても知られている）、すなわち、CD4+T細胞表面上に活性化依存性の一過的に制限された態様で発現されるII型膜貫通タンパク質である。CD154はまた活性化の後CD8+T細胞のサブセット、好塩基球、肥満細胞、好酸球、ナチュラルキラー細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞および血小板上でも発現される。CD154の反対レセプター、CD40はAPCを含む多くの細胞型の表面上で構成的および広範に発現されるI型膜タンパク質である（非特許文献2）。

10

【0005】

CD154によるCD40を介したシグナリングはCD40レセプター担持細胞の活性化および至適CD4+T細胞プライミングをもたらす事象のカスケードを開始させる。より詳細には、CD154とCD40との間の同種相互作用はB細胞から抗体分泌細胞およびメモリーB細胞への分化を促進する（非特許文献3、D.M.Monroe, U.Hedner, M.R.Hoffman, C.Negrier, G.F.Savidge and G.C.I.White, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p.135）。さらにまた、CD154-CD40相互作用はマクロファージおよび樹状細胞の活性化を介した細胞媒介免疫性およびナチュラルキラー細胞および細胞毒性Tリンパ球の発生を促進する（非特許文献3、上述）。

20

【0006】

CD154-CD40相互作用はコラーゲン誘導関節炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、卵巣炎、結腸炎、薬物誘発性ルーブス腎炎のような数種の実験的に誘導された自己免疫疾患において重要であることがわかっている。特に、これ等のモデルの全てにおける疾患の誘導は抗原投与時にCD154アンタゴニストを用いてブロックできることが解っている（非特許文献3、上述）。

30

【0007】

抗CD154アンタゴニストを用いた疾患のブロックはまたインスリン依存性糖尿病およびルーブス腎炎を含む自発的自己免疫疾患の動物モデルにおいて、並びに、移植片対宿主病、移植、肺線維症およびアテローム性動脈硬化症疾患のモデルにおいても観察されている（非特許文献3、上述）。

【0008】

グリコシル化抗CD154抗体は数種の免疫応答関連の疾患の防止および処置のために有用であることがわかっているが、一部の被験体においては、これ等を用いた処置は場合により血栓塞栓活性による合併症を伴う。この副作用の機序は不明であるが、不適切な血小板活性化をもたらす血小板上のFcγRIIaおよびCD154の抗CD154抗体またはその凝集物による結合が関与している可能性がある。他のFcレセプターおよび補体への結合もまたこの作用を強化する可能性がある。すなわち、エフェクターレセプターに結合しない抗CD154抗体の型は処置用途のためにより安全および/またはより効果的であると考えられる。

40

【0009】

抗CD154抗体が免疫機能を抑制する機序はCD40との相互作用をブロックするためのCD154への単純な結合よりも複雑であり、そして実際にはエフェクター経路による寄与が含まれる場合がある。例えば、抗体抗原結合はFcレセプターまたは補体成分へのFcドメインの結合を介した活性化T細胞の欠失を誘導する場合がある。あるいは、CD154への抗体の結合はFcレセプター担持細胞上の抗体の細胞表面スカホールド

50

の形成により増強される場合がある。さらにまた、抗体のその作用部位への接近はFcレセプター結合相互作用により促進される場合がある。

【0010】

体液性および細胞媒介性の免疫応答の両方の機能を調節する場合のCD154の基軸的役割は処置上の免疫調節のためのこの経路の抑制剤の使用への多大な関心を惹起した(特許文献1)。それ自体、抗CD154抗体は他の処置用のタンパク質または遺伝子療法、アレルギーへの免疫応答、自己免疫および移植のモデルの広範な種類において有利であることがわかっている。

【0011】

従って、強力な免疫応答を惹起しないがその抗原に強力に結合する抗体、および、このような抗体、特に向上したCD154抗体を発見するための方法がなお必要とされている。

10

【特許文献1】米国特許第5,474,771号明細書

【非特許文献1】Salazar-Fontana et al., Curr. Opin. Hemat., 2001, 8, 5

【非特許文献2】Foy et al., Ann. Rev. Immunol., 1996, 14, 591

【非特許文献3】Burkly, Adv. Exp. Med. Bio., Vol. 489

【発明の開示】

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、配列番号3と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むペプチドまたはそのフラグメントを提供し、24位、26位、27位、28位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、38位、54位、57位、58位、59位、60位、93位、95位、96位、97位、98位、100位および101位の各々におけるアミノ酸は、独立して、任意の天然に存在するアミノ酸または任意の天然に存在しないアミノ酸であり、該ペプチドは、配列番号1からなるものではなく、該フラグメントは、24位、26位、27位、28位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、38位、54位、57位、58位、59位、60位、93位、95位、96位、97位、98位、100位および101位のうちの少なくとも1つを含み、野生型5c8重鎖と複合体化した場合、該ペプチドまたはそのフラグメントは、CD154に結合し得る。

30

【0013】

一部の実施形態においては、24位のアミノ酸は、Arg、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、GluおよびLysからなる群より選択され；26位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、AspおよびGluからなる群より選択され；27位のアミノ酸は、Gln、Asn、Cys、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、ArgおよびLysからなる群より選択され；28位のアミノ酸は、Arg、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；30位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、ArgおよびLysからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、ArgおよびLysからなる群より選択され；32位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Arg、Ala、Ile、Le

40

50

uおよびLysからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Thr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Asp、Glu、Arg、Ala、ValおよびLysからなる群より選択され；34位のアミノ酸は、Tyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、Glu、ArgおよびLysからなる群より選択され；35位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、TrpおよびTyrからなる群より選択され；36位のアミノ酸は、Tyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Asp、Ala、LeuおよびGluからなる群より選択され；38位のアミノ酸は、His、Asn、Cys、Gln、Gly、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、Glu、ArgおよびLysからなる群より選択され；54位のアミノ酸は、Tyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、AspおよびGluからなる群より選択され；57位のアミノ酸は、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluからなる群より選択され；58位のアミノ酸は、Leu、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、AspおよびGluからなる群より選択され；59位のアミノ酸は、Glu、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrおよびAspからなる群より選択され；60位のアミノ酸は、Ser、AspおよびGluからなる群より選択され；93位のアミノ酸は、Gln、Asn、Cys、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、Glu、ArgおよびLysからなる群より選択され；95位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluからなる群より選択され；96位のアミノ酸は、Trp、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Tyr、Asp、Glu、ArgおよびLysからなる群より選択され；97位のアミノ酸は、GluおよびAspからなる群より選択され；98位のアミノ酸は、Ile、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Ala、Leu、Pro、ValおよびGluからなる群より選択され；100位のアミノ酸は、Pro、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluからなる群より選択され；そして101位のアミノ酸は、Thr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、AspおよびGluからなる群より選択される。

【0014】

一部の実施形態においては、26位のアミノ酸は、SerおよびAspからなる群より選択され；27位のアミノ酸は、GlnおよびGluからなる群より選択され；28位のアミノ酸は、ArgおよびGluからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、Ser、Ala、His、Asn、Thr、ValおよびTrpからなる群より選択され；32位のアミノ酸は、Ser、Ala、Phe、Ile、Leu、MetおよびTrpからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Thr、Ala、Phe、Met、Val、Trp、Asp、Arg、TyrおよびGlnからなる群より選択され；34位のアミノ酸は、Tyr、Ala、Asp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Arg、ValおよびTrpからなる群より選択され；36位のアミノ酸は、Tyr、Ala、Phe、LeuおよびTrpからなる群より選択され；54位のアミノ酸は、TyrおよびGluからなる群より選択され；96位のアミノ酸は、Trp、Asp、Glu、His、Arg、SerおよびThrからなる群より選択され；そして98位のアミノ酸は、Ile、Ala、Phe、His、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrからなる群より選択される。

10

20

30

40

50

【0015】

一部の実施形態においては、26位のアミノ酸は、Ser、AspおよびGluからなる群より選択され；27位のアミノ酸は、Gln、AspおよびGluからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、ThrおよびTyrからなる群より選択され；32位のアミノ酸は、Ser、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、ValおよびTrpからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Thr、Asn、Cys、Gln、Gly、SerおよびTyrからなる群より選択され；98位のアミノ酸は、Ile、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyrからなる群より選択され；24位のアミノ酸および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

10

【0016】

一部の実施形態においては、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；28位のアミノ酸は、Gluであり；31位のアミノ酸は、Valであり；33位のアミノ酸は、AspおよびArgからなる群より選択され；そして54位のアミノ酸は、Gluである。

20

【0017】

一部の実施形態においては、31位のアミノ酸は、HisおよびAsnからなる群より選択され；32位のアミノ酸は、TrpおよびPheからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Trp、TyrおよびGlnからなる群より選択され；36位のアミノ酸は、LeuおよびTrpからなる群より選択され；96位のアミノ酸は、Hisであり；そして98位のアミノ酸は、PheおよびGlnからなる群より選択される。

【0018】

一部の実施形態においては、26位のアミノ酸は、SerおよびAspからなる群より選択され；27位のアミノ酸は、GlnおよびGluからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、SerおよびAsnからなる群より選択され；32位のアミノ酸は、SerおよびPheからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Thr、GlnおよびTyrからなる群より選択され；98位のアミノ酸は、IleおよびGlnからなる群より選択され；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

30

【0019】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Glnであり；31位および32位のアミノ酸は、Serであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

40

【0020】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位、31位および

50

32位のアミノ酸は、Serであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

【0021】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位および32位のアミノ酸は、Serであり；27位のアミノ酸は、Glnであり；31位のアミノ酸は、Asnであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

10

【0022】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位および31位のアミノ酸は、Serであり；27位のアミノ酸は、Glnであり；32位のアミノ酸は、Pheであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

20

【0023】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位、31位および32位のアミノ酸は、Serであり；27位および33位のアミノ酸は、Glnであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

30

【0024】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位、31位および32位のアミノ酸は、Serであり；27位のアミノ酸は、Glnであり；33位のアミノ酸は、Tyrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

40

【0025】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位、31位および

50

32位のアミノ酸は、Serであり；27位および98位のアミノ酸は、Glnであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

【0026】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；31位および32位のアミノ酸は、Serであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

10

【0027】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；31位のアミノ酸は、Asnであり；32位のアミノ酸は、Serであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

20

【0028】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；31位のアミノ酸は、Serであり；32位のアミノ酸は、Pheであり；33位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

30

【0029】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；31位および32位のアミノ酸は、Serであり；33位のアミノ酸は、Glnであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

40

【0030】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、

50

A s pであり；27位のアミノ酸は、G l uであり；31位および32位のアミノ酸は、S e rであり；33位のアミノ酸は、T y rであり；98位のアミノ酸は、I l eであり；24位および28位のアミノ酸は、A r gであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、S e rであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、T y rであり；38位のアミノ酸は、H i sであり；57位のアミノ酸は、A s nであり；58位のアミノ酸は、L e uであり；59位および97位のアミノ酸は、G l uであり；93位のアミノ酸は、G l nであり；96位のアミノ酸は、T r pであり；100位のアミノ酸は、P r oであり；そして101位のアミノ酸は、T h rである。

【0031】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、A s pであり；27位のアミノ酸は、G l uであり；31位および32位のアミノ酸は、S e rであり；33位のアミノ酸は、T h rであり；98位のアミノ酸は、G l nであり；24位および28位のアミノ酸は、A r gであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、S e rであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、T y rであり；38位のアミノ酸は、H i sであり；57位のアミノ酸は、A s nであり；58位のアミノ酸は、L e uであり；59位および97位のアミノ酸は、G l uであり；93位のアミノ酸は、G l nであり；96位のアミノ酸は、T r pであり；100位のアミノ酸は、P r oであり；そして101位のアミノ酸は、T h rである。

10

【0032】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸は、G l nであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、S e rであり；33位および101位のアミノ酸は、T h rであり；98位のアミノ酸は、I l eであり；24位および28位のアミノ酸は、A r gであり；34位および54位のアミノ酸は、T y rであり；38位のアミノ酸は、H i sであり；57位のアミノ酸は、A s nであり；58位のアミノ酸は、L e uであり；59位および97位のアミノ酸は、G l uであり；96位および36位のアミノ酸は、T r pであり；そして100位のアミノ酸は、P r oである。

20

【0033】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸は、G l nであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、S e rであり；101位のアミノ酸は、T h rであり；98位のアミノ酸は、I l eであり；24位および28位のアミノ酸は、A r gであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、T y rであり；38位のアミノ酸は、H i sであり；57位のアミノ酸は、A s nであり；58位のアミノ酸は、L e uであり；59位および97位のアミノ酸は、G l uであり；96位および33位のアミノ酸は、T r pであり；そして100位のアミノ酸は、P r oである。

30

【0034】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸は、G l nであり；26位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、S e rであり；33位および101位のアミノ酸は、T h rであり；98位のアミノ酸は、I l eであり；24位および28位のアミノ酸は、A r gであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、T y rであり；38位のアミノ酸は、H i sであり；57位のアミノ酸は、A s nであり；58位のアミノ酸は、L e uであり；59位および97位のアミノ酸は、G l uであり；96位のアミノ酸は、T r pであり；31位のアミノ酸は、V a lであり；そして100位のアミノ酸は、P r oである。

40

【0035】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸は、G l nであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、S e rであり；101位のアミノ酸は、T h rであり；98位のアミノ酸は、I l eであり；24位および28位のアミノ酸は、A r gであり；34位、36

50

位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；33位のアミノ酸は、Aspであり；そして100位のアミノ酸は、Proである。

【0036】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸は、Glnであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；33位および101位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；34位および36位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；54位、59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；そして100位のアミノ酸は、Proである。

10

【0037】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸は、Glnであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；33位および101位のアミノ酸は、Thrであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；96位のアミノ酸は、Trpであり；そして100位のアミノ酸は、Proである。

20

【0038】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号3を含み、26位のアミノ酸は、Aspであり；27位のアミノ酸は、Gluであり；31位および32位のアミノ酸は、Serであり；98位のアミノ酸は、Ileであり；24位および28位のアミノ酸は、Argであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸は、Serであり；34位、36位および54位のアミノ酸は、Tyrであり；38位のアミノ酸は、Hisであり；57位のアミノ酸は、Asnであり；58位のアミノ酸は、Leuであり；59位および97位のアミノ酸は、Gluであり；93位のアミノ酸は、Glnであり；33位および96位のアミノ酸は、Trpであり；100位のアミノ酸は、Proであり；そして101位のアミノ酸は、Thrである。

30

【0039】

本発明はまた、配列番号6と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むペプチドまたはそのフラグメントを提供し、28位、30位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、54位、55位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位および107位の各々におけるアミノ酸は、独立して、任意の天然に存在するアミノ酸または任意の天然に存在しないアミノ酸であり、該ペプチドは、配列番号4からなるものではなく、該フラグメントは、28位、30位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、54位、55位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位および107位のうちの少なくとも1つを含み、そして野生型5c8軽鎖と複合体化された場合、該ペプチドまたはそのフラグメントは、CD154に結合し得る。

40

【0040】

一部の実施形態においては、28位のアミノ酸は、Ile、Asp、Glu、Arg、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、TrpおよびTrpからなる群より選択され；30位のアミノ酸は、Thr、Asp、Glu、Arg、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、S

50

er、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、Ser、Arg、His、Lys、GlnおよびTrpからなる群より選択され；32位のアミノ酸は、Tyr、Asp、Glu、Arg、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Tyr、Asp、Glu、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；35位のアミノ酸は、Tyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、AspおよびGluからなる群より選択され；50位のアミノ酸は、GluおよびAspからなる群より選択され；52位のアミノ酸は、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Arg、Ala、Leu、ValおよびLysからなる群より選択され；53位のアミノ酸は、Pro、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluからなる群より選択され；54位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Arg、LysおよびGluからなる群より選択され；55位のアミノ酸は、Asn、Glu、Lys、Gln、Ser、Thr、MetおよびValからなる群より選択され；57位のアミノ酸は、Asp、Glu、PheおよびLeuからなる群より選択され；58位のアミノ酸は、Thr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；59位のアミノ酸は、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、およびGluからなる群より選択され；60位のアミノ酸は、Phe、Asp、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr、Glu、Arg、Lys、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；61位のアミノ酸は、Asn、AspおよびGluからなる群より選択され；62位のアミノ酸は、GluおよびAspからなる群より選択され；63位のアミノ酸は、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Arg、Glu、Asp、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；64位のアミノ酸は、Phe、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；65位のアミノ酸は、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Arg、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択され；66位のアミノ酸は、Ser、AspおよびGluからなる群より選択され；99位のアミノ酸は、Ser、Asp、GluおよびAlaからなる群より選択され；100位のアミノ酸は、AspおよびGluからなる群より選択され；101位のアミノ酸は、Gly、PheおよびLeuからなる群より選択され；102位のアミノ酸は、Arg、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrおよびLysからなる群より選択され；103位のアミノ酸は、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Lys、ArgおよびValからなる群より選択され；104位のアミノ酸は、AspおよびGluからなる群より選択され；105位のアミノ酸は、Met、Asp、Glu、Arg、His、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、Phe、Ser、Thr、TrpおよびTyrからなる群より選択され；106位のアミノ酸は、AspおよびGluからなる群より選択され；そして107位のアミノ酸は、Ser、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValからなる群より選択される。

【0041】

10

20

30

40

50

一部の実施形態においては、28位のアミノ酸は、Ile、His、Asn、Gln、Ser、ThrおよびGluからなる群より選択され；30位のアミノ酸は、Thr、His、Asn、Gln、Ser、TyrおよびArgからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、Ser、GlnおよびTrpからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Tyr、Ala、Pro、Ser、Thr、ValおよびTrpからなる群より選択され；52位のアミノ酸は、Asn、Ala、Phe、His、Leu、Met、Ser、Thr、ValおよびTrpからなる群より選択され；54位のアミノ酸は、Ser、Glu、His、Lys、Asn、Gln、Arg、Thr、Trp、TyrおよびPheからなる群より選択され；55位のアミノ酸は、Asn、Glu、Lys、Gln、Ser、Thr、MetおよびValからなる群より選択され；57位のアミノ酸は、Asp、PheおよびLeuからなる群より選択され；59位のアミノ酸は、Asn、Ala、Phe、Leu、Met、Pro、Val、Trp、AspおよびTyrからなる群より選択され；99位のアミノ酸は、SerおよびAlaからなる群より選択され；101位のアミノ酸は、Gly、PheおよびLeuからなる群より選択され；そして103位のアミノ酸は、Asn、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Arg、Ser、Thr、ValおよびTyrからなる群より選択される。

【0042】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、31位および54位のアミノ酸は、独立して、Ser、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val、Trp、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyrからなる群より選択され；57位のアミノ酸は、Asp、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、ValおよびTrpからなる群より選択され；101位のアミノ酸は、Gly、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、ValおよびTrpからなる群より選択され；103位のアミノ酸は、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyrからなる群より選択され；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0043】

一部の実施形態においては、31位のアミノ酸は、Ser、TrpおよびGlnからなる群より選択され；54位のアミノ酸は、Ser、PheおよびGlnからなる群より選択され；57位のアミノ酸は、Asp、LeuおよびPheからなる群より選択され；101位のアミノ酸は、Gly、LeuおよびPheからなる群より選択され；103位のアミノ酸は、AsnおよびTyrからなる群より選択され；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0044】

一部の実施形態においては、28位のアミノ酸は、Gluであり；33位のアミノ酸は、Pheであり；54位のアミノ酸は、Thrであり；59位のアミノ酸は、AspおよびLeuからなる群より選択される。

【0045】

10

20

30

40

50

一部の実施形態においては、30位のアミノ酸は、HisおよびArgからなる群より選択され；31位のアミノ酸は、GlnおよびTrpからなる群より選択され；33位のアミノ酸は、Trp、ValおよびProからなる群より選択され；52位のアミノ酸は、MetおよびTrpからなる群より選択され；54位のアミノ酸は、Asn、PheおよびGlnからなる群より選択され；55位のアミノ酸は、Met、LysおよびValからなる群より選択され；57位のアミノ酸は、PheおよびLeuからなる群より選択され；59位のアミノ酸は、PheおよびTyrからなる群より選択され；101位のアミノ酸は、PheおよびLeuからなる群より選択され；そして103位のアミノ酸は、HisおよびTyrからなる群より選択される。

【0046】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位のアミノ酸は、Trpであり；54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0047】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位のアミノ酸は、Glnであり；54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0048】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位のアミノ酸は、Serであり；54位のアミノ酸は、Pheであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0049】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位のアミノ酸は、Serであり；54位のアミノ酸は、Glnであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63

10

20

30

40

50

位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0050】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Pheであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

10

【0051】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Leuであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

20

【0052】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Pheであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

30

【0053】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Leuであり；103位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸は、Asnであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

40

【0054】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸は、Serであり；57位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は

50

、G l yであり；1 0 3位のアミノ酸は、T y rであり；2 8位のアミノ酸は、I l eであり；3 0位および5 8位のアミノ酸は、T h rであり；3 2位、3 3位および3 5位のアミノ酸は、T y rであり；5 0位および6 2位のアミノ酸は、G l uであり；5 2位、5 5位、5 9位および6 1位のアミノ酸は、A s nであり；5 3位のアミノ酸は、P r oであり；6 0位および6 4位のアミノ酸は、P h eであり；6 3位および6 5位のアミノ酸は、L y sであり；6 6位、9 9位および1 0 7位のアミノ酸は、S e rであり；1 0 0位、1 0 4位および1 0 6位のアミノ酸は、A s pであり；1 0 2位のアミノ酸は、A r gであり；そして1 0 5位のアミノ酸は、M e tである。

【0 0 5 5】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、3 1位、5 4位、6 6位、9 9位および1 0 7位のアミノ酸は、S e rであり；5 7位、1 0 0位、1 0 4位および1 0 6位のアミノ酸は、A s pであり；1 0 1位のアミノ酸は、G l yであり；1 0 3位、5 2位、5 5位、5 9位および6 1位のアミノ酸は、A s nであり；2 8位のアミノ酸は、I l eであり；5 8位のアミノ酸は、T h rであり；3 2位、3 3位および3 5位のアミノ酸は、T y rであり；5 0位および6 2位のアミノ酸は、G l uであり；5 3位のアミノ酸は、P r oであり；6 0位および6 4位のアミノ酸は、P h eであり；6 3位および6 5位のアミノ酸は、L y sであり；1 0 2位のアミノ酸は、A r gであり；3 0位のアミノ酸は、H i sであり；そして1 0 5位のアミノ酸は、M e tである。

10

【0 0 5 6】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、3 1位、5 4位、6 6位、9 9位および1 0 7位のアミノ酸は、S e rであり；5 7位、1 0 0位、1 0 4位および1 0 6位のアミノ酸は、A s pであり；1 0 1位のアミノ酸は、G l yであり；1 0 3位、5 2位、5 5位、5 9位および6 1位のアミノ酸は、A s nであり；2 8位のアミノ酸は、I l eであり；3 0位および5 8位のアミノ酸は、T h rであり；3 2位および3 5位のアミノ酸は、T y rであり；5 0位および6 2位のアミノ酸は、G l uであり；5 3位のアミノ酸は、P r oであり；6 0位および6 4位のアミノ酸は、P h eであり；6 3位および6 5位のアミノ酸は、L y sであり；1 0 2位のアミノ酸は、A r gであり；3 3位のアミノ酸は、T r pであり；そして1 0 5位のアミノ酸は、M e tである。

20

【0 0 5 7】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、3 1位、6 6位、9 9位および1 0 7位のアミノ酸は、S e rであり；5 7位、1 0 0位、1 0 4位および1 0 6位のアミノ酸は、A s pであり；1 0 1位のアミノ酸は、G l yであり；1 0 3位、5 2位、5 4位、5 5位、5 9位および6 1位のアミノ酸は、A s nであり；2 8位のアミノ酸は、I l eであり；3 0位および5 8位のアミノ酸は、T h rであり；3 2位、3 3位および3 5位のアミノ酸は、T y rであり；5 0位および6 2位のアミノ酸は、G l uであり；5 3位のアミノ酸は、P r oであり；6 0位および6 4位のアミノ酸は、P h eであり；6 3位および6 5位のアミノ酸は、L y sであり；1 0 2位のアミノ酸は、A r gであり；そして1 0 5位のアミノ酸は、M e tである。

30

【0 0 5 8】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、3 1位、5 4位、6 6位、9 9位および1 0 7位のアミノ酸は、S e rであり；5 7位、1 0 0位、1 0 4位および1 0 6位のアミノ酸は、A s pであり；1 0 1位のアミノ酸は、G l yであり；1 0 3位、5 2位、5 5位、5 9位および6 1位のアミノ酸は、A s nであり；2 8位のアミノ酸は、I l eであり；3 0位および5 8位のアミノ酸は、T h rであり；3 2位および3 5位のアミノ酸は、T y rであり；5 0位および6 2位のアミノ酸は、G l uであり；5 3位のアミノ酸は、P r oであり；3 3位、6 0位および6 4位のアミノ酸は、P h eであり；6 3位および6 5位のアミノ酸は、L y sであり；1 0 2位のアミノ酸は、A r gであり；そして1 0 5位のアミノ酸は、M e tである。

40

【0 0 5 9】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、3 1位、5 4位、6 6

50

位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；57位、59位、100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位、52位、55位および61位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；102位のアミノ酸は、Argであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

【0060】

一部の実施形態においては、該ペプチドは、配列番号6を含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸は、Serであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸は、Aspであり；101位のアミノ酸は、Glyであり；103位、52位、55位および61位のアミノ酸は、Asnであり；28位のアミノ酸は、Ileであり；30位および58位のアミノ酸は、Thrであり；32位、33位および35位のアミノ酸は、Tyrであり；50位および62位のアミノ酸は、Gluであり；53位のアミノ酸は、Proであり；60位および64位のアミノ酸は、Pheであり；63位および65位のアミノ酸は、Lysであり；102位のアミノ酸は、Argであり；59位のアミノ酸は、Leuであり；そして105位のアミノ酸は、Metである。

10

【0061】

本発明はまた、本明細書に開示したペプチドのいずれかを含む組成物を提供する。

20

【0062】

本発明はまた、本明細書に開示したペプチドのいずれかをコードする核酸分子を提供する。

【0063】

本発明はまた、本明細書に開示した核酸分子のいずれかを含むベクターを提供する。

【0064】

本発明はまた、本明細書に開示した核酸分子またはベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0065】

本発明はまた、本明細書に開示した核酸分子またはベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。

30

【0066】

本発明はまた、本明細書に開示したペプチドのいずれかを含む抗体またはそのフラグメントを提供し、その抗体またはそのフラグメントは、ヒトCD154に結合することができる。

【0067】

一部の実施形態においては、抗体フラグメントは、単鎖抗体(scFv)、F(ab')₂フラグメント、FabフラグメントおよびFdフラグメントからなる群より選択される。

【0068】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、検出可能なマーカー（例えば、放射性同位体、酵素、蛍光色素、コロイド状金、染料およびビオチンからなる群より選択されるマーカー）により標識される。

40

【0069】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、治療剤（例えば、放射性同位体、毒素、トキシイドおよび化学療法剤からなる群より選択されるもの）に結合体化されるか；あるいはビーズに結合体化される。

【0070】

一部の実施形態においては、抗体またはフラグメントは高分子量ポリマー、例えばポリエチレンイミンおよびポリリジンからなる群より選択されるもの少なくとも1つを含む。

50

【 0 0 7 1 】

一部の実施形態においては、抗体またはフラグメントは P E G 化およびグリコシル化からなる群より選択されるアミノ酸少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 7 2 】

本発明はまた本明細書に開示した抗体またはそのフラグメントのいずれかを含む組成物を提供する。

【 0 0 7 3 】

本発明はまた本明細書に開示した抗体またはそのフラグメントのいずれかを含むキットを提供する。

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、C D 1 5 4 関連のヒトの疾患または障害を処置または防止するための方法を提供し、この方法は、該 C D 1 5 4 関連のヒトの疾患または障害が軽減または防止されるように、請求項 5 5 ~ 7 7 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、あるいは請求項 5 3 に記載の組成物の治療有効量または予防有効量をヒトに投与する工程；を包含する。

10

【 0 0 7 5 】

一部の実施形態においては、ヒトの疾患または障害は、炎症、例えば、関節炎に関する炎症、接触性皮膚炎に関する炎症、高 I g E 症候群に関係する炎症、炎症性腸疾患に関係する炎症、アレルギー性喘息に関係する炎症、および特発性炎症疾患に関係する炎症からなる群より選択される。

20

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態においては、関節炎は、慢性関節リウマチ、非リウマチ性炎症性関節炎 (n o n - r h e u m a t o i d i n f l a m m a t o r y a r t h r i t i s) 、ライム病関連関節炎および炎症性変形性関節症からなる群より選択される。

【 0 0 7 7 】

一部の実施形態においては、特発性炎症疾患は、乾癬および全身エリテマトーデスからなる群より選択される。

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態においては、疾患または障害は、重症筋無力症、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、真性糖尿病、クローン病、多発性硬化症および薬物誘発性自己免疫疾患からなる群より選択される。

30

【 0 0 7 9 】

一部の実施形態においては、障害は、移植された器官（例えば、移植された心臓、移植された腎臓、移植された肝臓、移植された皮膚、移植された膵島細胞、および移植された骨髄からなる群より選択されるもの）の、被験体による拒絶である。

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態においては、障害は、被験体における移植片対宿主病、アレルギー性応答、自己免疫応答および線維症、例えば肺線維症および線維性疾患からなる群より選択される。

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態においては、肺線維症は、成人呼吸促進症候群に続発性の肺線維症、薬物誘発性肺線維症、特発性肺線維症または過敏性肺炎からなる群より選択され；そして、線維性疾患は、C 型肝炎、B 型肝炎、肝硬変、毒性傷害に続発性の肝硬変、薬物に続発性の肝硬変、ウイルス感染に続発性の肝硬変および自己免疫疾患に続発性の肝硬変からなる群より選択される。

40

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態においては、自己免疫応答は、ライター症候群、脊椎関節炎、ライム病、H I V 感染、梅毒および結核から誘導されるものからなる群より選択される。

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態においては、疾患または障害は、胃腸疾患、例えば食道運動障害 (e s

50

ophagical dysmotility)、炎症性腸疾患および強皮症から選択されるものであり;または、脈管疾患であり、脈管疾患は、アテローム性動脈硬化症および再灌流傷害からなる群より選択される。

【0084】

一部の実施形態においては、疾患または障害は、T細胞腫瘍癌、例えば、T細胞白血病およびリンパ腫からなる群より選択されるものである。

【0085】

本発明はまたCD154に関連するヒトの疾患または障害の処置において、および、CD154に関連するヒトの疾患または障害の処置のための医薬の製造において使用するためのペプチドまたはそのフラグメントを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0086】

本発明はペプチド、特に軽鎖および重鎖の変領域をおよびそのフラグメント、およびそれらを含む抗体およびそのフラグメントを提供し、ペプチドは野生型5c8抗体と比較してアミノ酸置換少なくとも1つを含む。

【0087】

「抗体」という用語は本明細書においては、モノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を包含する)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異的抗体)、キメラ抗体、CDR移植抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等およびそのフラグメントを包含する。

【0088】

「抗体フラグメント」等の表現は本明細書においては、例えば抗体軽鎖(V_L)、抗体重鎖(V_H)、単鎖抗体(scFv)、 $F(ab')_2$ フラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメントおよび単ドメイン抗体フラグメント(DAb)を包含する。

【0089】

「CDR」という用語は本明細書においては、例えばKabata, ChothiaまたはMacCallum等により記載された相補性決定領域を包含する(例えばKabata et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, 1983; Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987, 196, 901-917; およびMacCallum et al., Mol. Biol., 1996, 262, 732-745参照)。

【0090】

上記引用文献の各々により記載されているCDRを典型的に包含するアミノ酸残基部分を比較のために以下に記載する。

【0091】

10

20

30

【化1】

CDRの定義

	Kabat	Chothia	MacCallum	5c8
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	53-55	47-58	50-66
VH CDR3	95-102	96-101	93-101	99-107
VL CDR1	24-34	26-32	30-36	24-38
VL CDR2	50-56	50-52	46-55	54-60
VL CDR3	89-97	91-96	89-96	93-101

10

「フレームワーク領域」という表現は本明細書においては、CDRの間においてこれ等を分離している抗体配列を包含する。従って、可変領域フレームワークは約100～120アミノ酸長であるが、CDR外のアミノ酸のみを指すことを意図している。重鎖可変領域の特定の例に関して、および、Kabat等により定義されたCDRに関しては、フレームワーク領域1はアミノ酸1～30を包含する可変領域のドメインに相当し；領域2はアミノ酸36～49を包含する可変領域のドメインに相当し；領域3はアミノ酸66～94を包含する可変領域のドメインに相当し；そして領域4はアミノ酸103から可変領域の最後まで可変領域のドメインに相当する。軽鎖のフレームワーク領域も同様に軽鎖可変領域のCDRの各々により分離される。同様に、Chothia等またはMacCallum等の定義を用いれば、フレームワーク領域の境界は上記した通りそれぞれのCDR末端により分離される。

20

【0092】

「可変領域」という表現は本明細書においては、分子上への抗原結合を可能とし、そして定常領域ではない抗体のアミノ末端部分を包含する。用語は全体の可変領域の結合機能の一部または全てを保持している機能的フラグメント、例えば抗原結合フラグメントを包含することを意図している。

30

【0093】

「5c8抗体」という表現はCD154に結合し、そして米国特許第5,474,771号に記載されている抗体を指す。hu5c8mAbハイブリドーマはATCC(HB10916)から入手可能である。5c8抗体の軽鎖および重鎖の可変領域に関する野生型アミノ酸配列はそれぞれ配列番号1および配列番号4に示す。

【0094】

1つの態様において、本発明は軽鎖の可変領域においてアミノ酸置換少なくとも1つを含む5c8抗体誘導体を提供する。野生型5c8軽鎖可変領域は配列番号1(アミノ酸配列)に示す。本発明はアミノ酸置換少なくとも1つが起こっている野生型5c8軽鎖可変領域を含むペプチドを提供する(すなわち、配列番号1を含まないペプチド)。軽鎖ペプチドは定常領域および可変領域の両方を含む全軽鎖を含むことができ、または、可変領域のみを含んでもよい。軽鎖ペプチドはまた全可変領域、および、全定常領域マイナス1アミノ酸から定常領域の僅か1アミノ酸までの範囲またはその内部のいずれかの範囲であることができる定常領域の一部を含むこともできる。あるいは、軽鎖ペプチドは任意の無関係なペプチド配列に融合して融合タンパク質を形成している可変領域を含むこともできる。

40

【0095】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドは野生型5c8抗体軽鎖可変領域(配列番号

50

1 参照)の以下の位置:すなわち、24位、26位、27位、28位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、38位、54位、57位、58位、59位、60位、93位、95位、96位、97位、98位、100位および101位またはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される位置のいずれかにおいてアミノ酸置換少なくとも1つを含む。アミノ酸置換を含有してよいこれ等の位置を含むこのようなペプチドは配列番号3(アミノ酸配列)に示す。これ等の軽鎖ペプチドはまた少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22または少なくとも23アミノ酸の置換、または24アミノ酸の各々における置換を含むこともできる。

10

【0096】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドは26、27、31、32、33および98位のいずれかまたはそのサブセットのいずれかにおいてアミノ酸置換少なくとも1つを含む。アミノ酸置換を含有してよいこれ等の位置を含むこのようなペプチドは配列番号3(アミノ酸配列)に記載されており、24位、28位、30位、34位、35位、36位、38位、54位、57位、58位、59位、60位、93位、95位、96位、97位、100位および101位は野生型アミノ酸である。これ等のペプチドはまた少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4または少なくとも5アミノ酸の置換、または6位置の各々における置換を含むこともできる。

20

【0097】

上記した位置(すなわち、24位、26位、27位、28位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、38位、54位、57位、58位、59位、60位、93位、95位、96位、97位、98位、100位および101位)の各々における置換されたアミノ酸はそれぞれ相互に独立して任意の天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸であることができる。すなわち、特定の軽鎖ペプチドは天然に存在するアミノ酸であるアミノ酸置換1つ以上および/または天然に存在しないアミノ酸であるアミノ酸置換1つ以上を含んでよい。

【0098】

個々のアミノ酸置換は以下、すなわち、:1)非極性側鎖を有するアミノ酸のセット、例えばAla、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val;2)負荷電側鎖を有するアミノ酸のセット、例えばAsp、Glu;3)正荷電側鎖を有するアミノ酸のセット、例えばArg、His、Lys;および4)非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸のセット、例えばAsn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrにCys、Gly、MetおよびPheが付加されたもの、のいずれか1つから選択される。

30

【0099】

天然に存在するアミノ酸には例えばアラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、アスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、システイン(Cys)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、リジン(Lys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、プロリン(Pro)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)およびバリン(Val)が含まれる。

40

【0100】

天然に存在しないアミノ酸には例えばノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリンおよび他のアミノ酸残基類縁体、例えばEllman et al., Meth. Enzym., 1991, 202, 301-336に記載のものが含まれる。このような天然に存在しないアミノ酸残基を生成させるためにはNoren et al., Science, 1989, 244, 182およびEllman et al., supraの

50

操作法を使用できる。概すれば、これ等の操作法では天然に存在しないアミノ酸残基を用いてサブレッサー tRNA を化学的に活性化し、その後 RNA のインビトロの転写および翻訳を行う。

【0101】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドは配列番号3の相当する領域に少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一である。すなわち、例えば、26位および27位にアミノ酸置換2つを含む軽鎖ペプチドは、ペプチドが少なくとも同一であることの上記パーセンテージ内に有る限り、なお別の置換をペプチド内の何処かに有することができる(すなわち、配列番号3において「Xaa」と記載したものの以外の位置)。すなわち、別のアミノ酸置換またはアミノ酸挿入または欠失を有するペプチドも本明細書において意図される。軽鎖の定常領域の部分を含むペプチドのパーセント同一性を決定する際には、可変領域のみをパーセント同一性の目的のためには考慮するものとする(すなわち、定常領域の部分はパーセント同一性に含まれない)。

10

【0102】

フラグメントは少なくとも8、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100または少なくとも105アミノ酸、最大で110アミノ酸を含むことができる。一部の実施形態においては、フラグメントは配列番号3を参照すれば、24位、26位、27位、28位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、38位、54位、57位、58位、59位、60位、93位、95位、96位、97位、98位、100位および101位またはそのサブセットのいずれかの少なくとも1つを含む。一部の実施形態においては、フラグメントは上記した軽鎖アミノ酸置換のいずれかの1つ以上を含む。

20

【0103】

本明細書に記載した軽鎖ペプチドおよびそのフラグメントはCD154に結合するその能力を保持している。すなわち、5c8抗体の相当する野生型アミノ酸を本明細書に記載したペプチドまたはフラグメントで置き換えてもなお、得られる抗体はヒトCD154に結合できるのである。例えば、野生型5c8軽鎖可変領域のアミノ酸の全てまたは一部を本明細書に記載したペプチドまたはフラグメントの相当するアミノ酸で置き換えれば、ヒトCD154に結合する能力を保持した抗体が得られる。

30

【0104】

一部の実施形態においては、軽鎖は記載した位置において以下の型のアミノ酸、すなわち、: R24(負、正、極性、非極性); S26(負、極性、非極性); Q27(正、負、極性); R28(負、極性、非極性); S30(正、負、極性); S31(正、極性、非極性); S32(正、極性、非極性); T33(正、負、極性、非極性); Y34(正、負、極性、非極性); S35(極性); Y36(極性、非極性、負); H38(正、負、極性、非極性); Y54(負、極性、非極性); N57(負、極性); L58(負、極性); E59(負、極性); S60(負); Q93(正、負、極性、非極性); S95(負、極性); W96(負、正、極性); E97(負); I98(負、極性、非極性); P100(負、極性); およびT101(負、極性、非極性)により置換されてよい。

40

【0105】

一部の実施形態においては軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの24位(配列番号3参照)のアミノ酸はArg、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、GluおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。24位のアミノ酸は好ましくはArgであることができる。

【0106】

50

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの26位(配列番号3参照)のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、26位のアミノ酸は好ましくはSerまたはAspであることができる。26位のアミノ酸はまた好ましくはSer、AspまたはGlu;または好ましくはSerまたはAspであることもできる。

【0107】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの27位(配列番号3参照)のアミノ酸はGln、Asn、Cys、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、27位のアミノ酸は好ましくはGlnまたはGluであることができる。27位のアミノ酸はまた好ましくはGln、AspまたはGlu;または好ましくはGlnまたはGluであることもできる。

10

【0108】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの28位(配列番号3参照)のアミノ酸はArg、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、28位のアミノ酸は好ましくはArgまたはGluであることができる。28位のアミノ酸はまた好ましくはArgであることもできる。

20

【0109】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの30位(配列番号3参照)のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。30位のアミノ酸は好ましくはSerであることができる。

【0110】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの31位(配列番号3参照)のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、31位のアミノ酸はSer、Ala、His、Asn、Thr、ValおよびTrpからなる群より選択される。31位のアミノ酸はまたSer、Asn、Cys、Gln、Gly、ThrおよびTyrからなる群より選択され;または好ましくはSerまたはAsnである。

30

【0111】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの32位(配列番号3参照)のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Arg、Ala、Ile、LeuおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、32位のアミノ酸はSer、Ala、Phe、Ile、Leu、MetおよびTrpからなる群より選択される。32位のアミノ酸はまたSer、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、ValおよびTrpからなる群より選択され;または好ましくはSerまたはPheである。

40

【0112】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの33位(配列番号3参照)のアミノ酸はThr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Asp、Glu、Arg、Ala、ValおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、33位のアミノ酸はThr、Ala、Phe、Met、Val、Trp、Asp、Arg、TyrおよびGlnからなる群より選択される。33位のアミノ酸はまたThr、Asn、Cys、Gl

50

n、Gly、SerおよびTyrからなる群より選択され；または好ましくはThr、GlnまたはTyrである。

【0113】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの34位（配列番号3参照）のアミノ酸はTyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、Glu、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、34位のアミノ酸はTyr、Ala、Asp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Arg、ValおよびTrpからなる群より選択される。34位のアミノ酸はまた好ましくはTyrである。

10

【0114】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの35位（配列番号3参照）のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、TrpおよびTyrまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。35位のアミノ酸はまた好ましくはSerである。

【0115】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの36位（配列番号3参照）のアミノ酸はTyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Asp、Ala、LeuおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、36位のアミノ酸はTyr、Ala、Phe、LeuおよびTrpからなる群より選択される。36位のアミノ酸はまた好ましくはTyrである。

20

【0116】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの38位（配列番号3参照）のアミノ酸はHis、Asn、Cys、Gln、Gly、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、Glu、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。38位のアミノ酸はまた好ましくはHisである。

【0117】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの54位（配列番号3参照）のアミノ酸はTyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、54位のアミノ酸は好ましくはTyrまたはGluである。54位のアミノ酸はまた好ましくはTyrである。

30

【0118】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの57位（配列番号3参照）のアミノ酸はAsn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。57位のアミノ酸はまた好ましくはAsnである。

40

【0119】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの58位（配列番号3参照）のアミノ酸はLeu、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。58位のアミノ酸はまた好ましくはLeuである。

【0120】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの59位（配列番号3参照）のアミノ酸はGlu、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrおよびAspまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。59位のアミノ酸はまた好ましくはGluである。

50

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの60位(配列番号3参照)のアミノ酸はSer、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。60位のアミノ酸はまた好ましくはSerである。

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの93位(配列番号3参照)のアミノ酸はGln、Asn、Cys、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、Glu、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。93位のアミノ酸はまた好ましくはGlnである。

10

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの95位(配列番号3参照)のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。95位のアミノ酸はまた好ましくはSerである。

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの96位(配列番号3参照)のアミノ酸はTrp、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Tyr、Asp、Glu、ArgおよびLysまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、96位のアミノ酸はTrp、Asp、Glu、His、Arg、SerおよびThrからなる群より選択される。96位のアミノ酸はまた好ましくはTrpである。

20

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの97位(配列番号3参照)のアミノ酸はGluまたはAspまたはいずれかのそのサブセットである。97位のアミノ酸はまた好ましくはGluである。

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの98位(配列番号3参照)のアミノ酸はIle、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Ala、Leu、Pro、ValおよびGluまたはいずれかのそのサブセットからなる群より選択される。あるいは、98位のアミノ酸はIle、Ala、Phe、His、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrからなる群より選択される。98位のアミノ酸はまたIle、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyrからなる群より選択され;または好ましくはIleまたはGlnである。

30

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの100位(配列番号3参照)のアミノ酸はPro、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットである。100位のアミノ酸はまた好ましくはProである。

40

【 0 1 2 8 】

一部の実施形態においては、軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントの101位(配列番号3参照)のアミノ酸はThr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、AspおよびGluまたはいずれかのそのサブセットである。101位のアミノ酸はまた好ましくはThrである。

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態においては26位のアミノ酸は、Aspであり;27位のアミノ酸は、Gluであり;28位のアミノ酸は、Gluであり;31位のアミノ酸は、Valであり;33位のアミノ酸は、AspまたはArgであり;そして54位のアミノ酸は、Glu

50

である。

【0130】

一部の実施形態においては、31位のアミノ酸は、HisまたはAsnであり；32位のアミノ酸は、TrpまたはPheであり；33位のアミノ酸は、Trp、TyrまたはGlnであり；36位のアミノ酸は、LeuまたはTrpであり；96位のアミノ酸は、Hisであり；そして98位のアミノ酸は、PheまたはGlnである。

【0131】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGlnであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。この変異体は本明細書においては変異体#6と称する。

【0132】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位、31位および32位のアミノ酸はSerであり；27位のアミノ酸はGluであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。この変異体は本明細書においては変異体#7と称する。

【0133】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。この変異体は本明細書においては変異体#14と称する。

【0134】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸はGlnであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；33位および101位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；34位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；96位および36位のアミノ酸はTrpであり；そして100位のアミノ酸はProである。この変異体は本明細書においては変異体#3と称する。

【0135】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸はGlnであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；101位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；34位、36位および54位

10

20

30

40

50

のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；96位および33位のアミノ酸はTrpであり；そして100位のアミノ酸はProである。この変異体は本明細書においては変異体#5と称する。

【0136】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸はGlnであり；26位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；33位および101位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；96位のアミノ酸はTrpであり；31位のアミノ酸はValであり；そして100位のアミノ酸はProである。この変異体は本明細書においては変異体#8と称する。

10

【0137】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸はGlnであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；101位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；96位のアミノ酸はTrpであり；33位のアミノ酸はAspであり；そして100位のアミノ酸はProである。この変異体は本明細書においては変異体#9と称する。

20

【0138】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、27位および93位のアミノ酸はGlnであり；26位、31位、32位、30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；33位および101位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；34位および36位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；54位、59位および97位のアミノ酸はGluであり；96位のアミノ酸はTrpであり；そして100位のアミノ酸はProである。この変異体は本明細書においては変異体#10と称する。

30

【0139】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；33位および96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。この変異体は本明細書においては変異体#15と称する。

40

【0140】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGlnであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96

50

位のアミノ酸はT r pであり；1 0 0位のアミノ酸はP r oであり；そして1 0 1位のアミノ酸はT h rである。

【 0 1 4 1 】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、2 6位、3 1位および3 2位のアミノ酸はS e rであり；2 7位のアミノ酸はG l uであり；3 3位のアミノ酸はT h rであり；9 8位のアミノ酸はI l eであり；2 4位および2 8位のアミノ酸はA r gであり；3 0位、3 5位、6 0位および9 5位のアミノ酸はS e rであり；3 4位、3 6位および5 4位のアミノ酸はT y rであり；3 8位のアミノ酸はH i sであり；5 7位のアミノ酸はA s nであり；5 8位のアミノ酸はL e uであり；5 9位および9 7位のアミノ酸はG l uであり；9 3位のアミノ酸はG l nであり；9 6位のアミノ酸はT r pであり；1 0 0位のアミノ酸はP r oであり；そして1 0 1位のアミノ酸はT h rである。

10

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、2 6位および3 2位のアミノ酸はS e rであり；2 7位のアミノ酸はG l nであり；3 1位のアミノ酸はA s nであり；3 3位のアミノ酸はT h rであり；9 8位のアミノ酸はI l eであり；2 4位および2 8位のアミノ酸はA r gであり；3 0位、3 5位、6 0位および9 5位のアミノ酸はS e rであり；3 4位、3 6位および5 4位のアミノ酸はT y rであり；3 8位のアミノ酸はH i sであり；5 7位のアミノ酸はA s nであり；5 8位のアミノ酸はL e uであり；5 9位および9 7位のアミノ酸はG l uであり；9 3位のアミノ酸はG l nであり；9 6位のアミノ酸はT r pであり；1 0 0位のアミノ酸はP r oであり；そして1 0 1位のアミノ酸はT h rである。

20

【 0 1 4 3 】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、2 6位および3 1位のアミノ酸はS e rであり；2 7位のアミノ酸はG l nであり；3 2位のアミノ酸はP h eであり；3 3位のアミノ酸はT h rであり；9 8位のアミノ酸はI l eであり；2 4位および2 8位のアミノ酸はA r gであり；3 0位、3 5位、6 0位および9 5位のアミノ酸はS e rであり；3 4位、3 6位および5 4位のアミノ酸はT y rであり；3 8位のアミノ酸はH i sであり；5 7位のアミノ酸はA s nであり；5 8位のアミノ酸はL e uであり；5 9位および9 7位のアミノ酸はG l uであり；9 3位のアミノ酸はG l nであり；9 6位のアミノ酸はT r pであり；1 0 0位のアミノ酸はP r oであり；そして1 0 1位のアミノ酸はT h rである。

30

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、2 6位、3 1位および3 2位のアミノ酸はS e rであり；2 7位および3 3位のアミノ酸はG l nであり；9 8位のアミノ酸はI l eであり；2 4位および2 8位のアミノ酸はA r gであり；3 0位、3 5位、6 0位および9 5位のアミノ酸はS e rであり；3 4位、3 6位および5 4位のアミノ酸はT y rであり；3 8位のアミノ酸はH i sであり；5 7位のアミノ酸はA s nであり；5 8位のアミノ酸はL e uであり；5 9位および9 7位のアミノ酸はG l uであり；9 3位のアミノ酸はG l nであり；9 6位のアミノ酸はT r pであり；1 0 0位のアミノ酸はP r oであり；そして1 0 1位のアミノ酸はT h rである。

40

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、2 6位、3 1位および3 2位のアミノ酸はS e rであり；2 7位のアミノ酸はG l nであり；3 3位のアミノ酸はT y rであり；9 8位のアミノ酸はI l eであり；2 4位および2 8位のアミノ酸はA r gであり；3 0位、3 5位、6 0位および9 5位のアミノ酸はS e rであり；3 4位、3 6位および5 4位のアミノ酸はT y rであり；3 8位のアミノ酸はH i sであり；5 7位のアミノ酸はA s nであり；5 8位のアミノ酸はL e uであり；5 9位および9 7位のアミノ酸はG l uであり；9 3位のアミノ酸はG l nであり；9 6位のアミノ酸はT r pであり；1 0 0位のアミノ酸はP r oであり；そして1 0 1位のアミノ酸はT h rである。

【 0 1 4 6 】

50

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位、31位および32位のアミノ酸はSerであり；27位および98位のアミノ酸はGlnであり；33位のアミノ酸はThrであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。

【0147】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位のアミノ酸はAspであり；32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。このペプチドはまた本明細書においては「S26D/Q27E/S31N」ペプチドと称する。

【0148】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位のアミノ酸はSerであり；32位のアミノ酸はPheであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。このペプチドはまた本明細書においては「S26D/Q27E/S32F」ペプチドと称する。

【0149】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はGlnであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。このペプチドはまた本明細書においては「S26D/Q27E/T33Q」ペプチドと称する。

【0150】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はTyrであり；98位のアミノ酸はIleであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のア

10

20

30

40

50

ミノ酸はThrである。このペプチドはまた本明細書においては「S26D/Q27E/T33Y」ペプチドと称する。

【0151】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号3を含み、26位のアミノ酸はAspであり；27位のアミノ酸はGluであり；31位および32位のアミノ酸はSerであり；33位のアミノ酸はThrであり；98位のアミノ酸はGlnであり；24位および28位のアミノ酸はArgであり；30位、35位、60位および95位のアミノ酸はSerであり；34位、36位および54位のアミノ酸はTyrであり；38位のアミノ酸はHisであり；57位のアミノ酸はAsnであり；58位のアミノ酸はLeuであり；59位および97位のアミノ酸はGluであり；93位のアミノ酸はGlnであり；96位のアミノ酸はTrpであり；100位のアミノ酸はProであり；そして101位のアミノ酸はThrである。このペプチドはまた本明細書においては「S26D/Q27E/I98Q」ペプチドと称する。

10

【0152】

別の態様において、本発明は重鎖の可変領域においてアミノ酸置換少なくとも1つを含む5c8抗体誘導体を提供する。野生型5c8重鎖可変領域は配列番号4（アミノ酸配列）に示す。本発明はアミノ酸置換少なくとも1つが起こっている野生型5c8重鎖可変領域を含むペプチドを提供する（すなわち、配列番号4を含まないペプチド）。重鎖ペプチドは定常領域（CH1および/またはCH2および/またはCH3）および可変領域の両方を含む全重鎖を含むことができ、または、可変領域のみを含んでもよい。重鎖ペプチドはまた全可変領域、および、全定常領域マイナス1アミノ酸から定常領域の僅か1アミノ酸までの範囲またはその内部のいずれかの範囲であることができる定常領域の一部を含むこともできる。あるいは、重鎖ペプチドは任意の無関係なペプチド配列に融合して融合タンパク質を形成している可変領域を含むこともできる。

20

【0153】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドは野生型5c8抗体重鎖可変領域（配列番号4参照）の以下の位置：すなわち、28位、30位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、54位、55位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位および107位またはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される位置のいずれかにおいてアミノ酸置換少なくとも1つを含む。アミノ酸置換を含有してよいこれ等の位置を含むこのようなペプチドは配列番号6（アミノ酸配列）に示す。これ等の重鎖ペプチドはまた少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28または少なくとも29アミノ酸の置換、または30アミノ酸の各々における置換を含むこともできる。

30

【0154】

一部の実施形態においては重鎖ペプチドは31、54、57、101および103位のいずれかまたはそのサブセットのいずれかにおいてアミノ酸置換少なくとも1つを含む。アミノ酸置換を含有してよいこれ等の位置を含むこのようなペプチドは配列番号6（アミノ酸配列）に記載されており、28位、30位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、55位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、99位、100位、102位、104位、105位、106位および107位は野生型アミノ酸である。これ等のペプチドはまた少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少

40

50

なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23または少なくとも24アミノ酸の置換、または25位の各々におけるアミノ酸の置換を含むこともできる。

【0155】

上記した位置(すなわち、28位、30位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、54位、55位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位および107位)の各々における置換されたアミノ酸はそれぞれ相互に独立して任意の天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸であることができる。すなわち、特定の重鎖ペプチドは天然に存在するアミノ酸であるアミノ酸置換1つ以上および/または天然に存在しないアミノ酸であるアミノ酸置換1つ以上を含んでよい。

10

【0156】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドは配列番号6に少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一である。すなわち、例えば、31位にアミノ酸置換を含む重鎖ペプチドは、ペプチドが少なくとも同一であることの上記パーセンテージ内に有る限り、なお別の置換をペプチド内の何処かに有することができる(すなわち、配列番号6において「Xaa」と記載したものの以外の位置)。すなわち、別のアミノ酸置換またはアミノ酸挿入または欠失を有するペプチドも本明細書において意図される。重鎖の定常領域の部分を含むペプチドのパーセント同一性を決定する際には、可変領域のみをパーセント同一性の目的のためには考慮するものとする(すなわち、定常領域の部分はパーセント同一性に包含されない)。

20

【0157】

一部の実施形態においては、配列番号6の相当する領域に少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドのフラグメントが提供される。

【0158】

フラグメントは少なくとも8、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100、少なくとも105、少なくとも110または少なくとも115アミノ酸、最大で117アミノ酸を含むことができる。一部の実施形態においては、フラグメントは配列番号6を参照すれば、28位、30位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、54位、55位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位および107位またはそのサブセットのいずれかの少なくとも1つを含む。一部の実施形態においては、フラグメントは上記した重鎖アミノ酸置換のいずれかの1つ以上を含む。

30

【0159】

本明細書に記載した重鎖ペプチドおよびそのフラグメントはCD154に結合するその能力を保持している。すなわち、5c8抗体の相当する野生型アミノ酸を本明細書に記載したペプチドまたはフラグメントで置き換えてもなお、得られる抗体はヒトCD154に結合できるのである。例えば、野生型5c8重鎖可変領域のアミノ酸の全てまたは一部を本明細書に記載したペプチドまたはフラグメントの相当するアミノ酸で置き換えれば、ヒトCD154に結合する能力を保持した抗体が得られる。一部の実施形態においては、本明細書に記載した抗体は、野生型5c8抗体よりも1残基以上少なく、CD154と接触してよい。

40

【0160】

一部の実施形態においては、重鎖は記載した位置において以下の型のアミノ酸、すなわち、：I28(正、負、極性)；T30(正、負、極性、非極性)；S31(正、極性)

50

; Y 3 2 (正、負、極性、非極性); Y 3 3 (正、負、極性、非極性); Y 3 5 (極性)
 ; E 5 0 (負); N 5 2 (極性、非極性); P 5 3 (負、極性); S 5 4 (正、負、極性)
); N 5 5 (負、極性、非極性); D 5 7 (負、非極性); T 5 8 (極性、非極性); N
 5 9 (負、極性、非極性); F 6 0 (負、正、極性、非極性); N 6 1 (負); E 6 2 (負);
 K 6 3 (負、正、極性、非極性); F 6 4 (負、極性、非極性); K 6 5 (負、正、
 極性、非極性); S 6 6 (負); S 9 9 (負、非極性); D 1 0 0 (負); G 1 0 1 (非極性);
 R 1 0 2 (正、極性); N 1 0 3 (負、正、極性、非極性); D 1 0 4 (負);
 M 1 0 5 (負、極性、正); D 1 0 6 (負); および S 1 0 7 (負、極性、非極性) に
 より置換されてよい。

【 0 1 6 1 】

10

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの28位(配列番号6参照)のアミノ酸はIle、Asp、Glu、Arg、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、ThrおよびTrpまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、28位のアミノ酸はIle、His、Asn、Gln、Ser、ThrおよびGluからなる群より選択される。28位のアミノ酸はまた好ましくはIleである。

【 0 1 6 2 】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの30位(配列番号6参照)のアミノ酸はThr、Asp、Glu、Arg、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、30位のアミノ酸はThr、His、Asn、Glu、Ser、TyrおよびArgからなる群より選択される。30位のアミノ酸はまた好ましくはThrである。

20

【 0 1 6 3 】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの31位(配列番号6参照)のアミノ酸はSer、Arg、His、Lys、GlnおよびTrpまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは31位のアミノ酸は好ましくはSer、GlnまたはTrpである、31位のアミノ酸はSer、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val、Trp、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyrからなる群より選択され; または好ましくはSer、TrpまたはGlnである。

30

【 0 1 6 4 】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの32位(配列番号6参照)のアミノ酸はTyr、Asp、Glu、Arg、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。32位のアミノ酸は好ましくはTyrである。

【 0 1 6 5 】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの33位(配列番号6参照)のアミノ酸はTyr、Asp、Glu、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、33位のアミノ酸はTyr、Ala、Pro、Ser、Thr、ValおよびTrpからなる群より選択される。33位のアミノ酸はまた好ましくはTyrである。

40

【 0 1 6 6 】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの35位(配列番号6参照)のアミノ酸はTyr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、AspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。35位のアミノ酸はまた好ましくはTyrである。

【 0 1 6 7 】

50

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの50位(配列番号6参照)のアミノ酸はGluおよびAspまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。50位のアミノ酸はまた好ましくはGluである。

【0168】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの52位(配列番号6参照)のアミノ酸はAsn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Arg、Ala、Leu、ValおよびLysまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、52位のアミノ酸はAsn、Ala、Phe、His、Leu、Met、Ser、Thr、ValおよびTrpからなる群より選択される。52位のアミノ酸はまた好ましくはAsnである。

10

【0169】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの53位(配列番号6参照)のアミノ酸はPro、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、AspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。53位のアミノ酸はまた好ましくはProである。

【0170】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの54位(配列番号6参照)のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Arg、LysおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、54位のアミノ酸はSer、Glu、His、Lys、Asn、Gln、Arg、Thr、Trp、TyrおよびPheからなる群より選択される。54位のアミノ酸はまたSer、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val、Trp、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyrからなる群より選択され；または好ましくはSer、PheまたはGlnである。

20

【0171】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの55位(配列番号6参照)のアミノ酸はAsn、Glu、Lys、Gln、Ser、Thr、MetおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、55位のアミノ酸はAsn、Glu、Lys、Gln、Ser、Thr、MetおよびValからなる群より選択される。55位のアミノ酸はまた好ましくはAsnである。

30

【0172】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの57位(配列番号6参照)のアミノ酸はAsp、Glu、PheおよびLeuまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、57位のアミノ酸は好ましくはAsp、PheまたはLeuである。57位のアミノ酸はAsp、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、ValおよびTrpからなる群より選択され；または好ましくはAsp、LeuまたはPheである。

【0173】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの58位(配列番号6参照)のアミノ酸はThr、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。58位のアミノ酸はまた好ましくはThrである。

40

【0174】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの59位(配列番号6参照)のアミノ酸はAsn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Ala、Ile、Leu、Pro、Val、Asp、およびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、59位のアミノ酸はAsn、Ala、Phe、Leu、Met、Pro、Val、Trp、AspおよびTyrからなる群より選択される。59位のアミノ酸はまた好ましくはAsnで

50

ある。

【0175】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの60位(配列番号6参照)のアミノ酸はPhe、Asp、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Arg、Lys、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。60位のアミノ酸はまた好ましくはPheである。

【0176】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの61位(配列番号6参照)のアミノ酸はAsn、AspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。61位のアミノ酸はまた好ましくはAsnである。

10

【0177】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの62位(配列番号6参照)のアミノ酸はGlnおよびAspまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。62位のアミノ酸はまた好ましくはGluである。

【0178】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの63位(配列番号6参照)のアミノ酸はLys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Arg、Glu、Asp、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。63位のアミノ酸はまた好ましくはLysである。

20

【0179】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの64位(配列番号6参照)のアミノ酸はPhe、Asn、Cys、Glu、Gly、His、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。64位のアミノ酸はまた好ましくはPheである。

【0180】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの65位(配列番号6参照)のアミノ酸はLys、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Arg、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。65位のアミノ酸はまた好ましくはLysである。

30

【0181】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの66位(配列番号6参照)のアミノ酸はSer、AspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。66位のアミノ酸はまた好ましくはSerである。

【0182】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの99位(配列番号6参照)のアミノ酸はSer、Asp、GluおよびAlaまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、99位のアミノ酸は好ましくはSerまたはAlaである。99位のアミノ酸はまた好ましくはSerである。

40

【0183】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの100位(配列番号6参照)のアミノ酸はAspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。100位のアミノ酸はまた好ましくはAspである。

【0184】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの101位(配列番号6参照)のアミノ酸はGly、PheおよびLeuまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは101位のアミノ酸は好ましくはGly、Pheまた

50

はLeuである。101位のアミノ酸はGly、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、ValおよびTrpからなる群より選択され；または好ましくはGly、LeuまたはPheである。

【0185】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの102位（配列番号6参照）のアミノ酸はArg、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrおよびLysまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。102位のアミノ酸はまた好ましくはArgである。

【0186】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの103位（配列番号6参照）のアミノ酸はAsn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Lys、ArgおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。あるいは、103位のアミノ酸はAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Arg、Ser、Thr、ValおよびTyrからなる群より選択される。103位のアミノ酸はまたAsn、Cys、Gln、Gly、Ser、ThrおよびTyr、または好ましくは、AsnもしくはTyrからなる群より選択される。

10

【0187】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの104位（配列番号6参照）のアミノ酸はAspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。104位のアミノ酸はまた好ましくはAspである。

20

【0188】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの105位（配列番号6参照）のアミノ酸はMet、Asp、Glu、Arg、His、Lys、Asn、Cys、Gln、Gly、Phe、Ser、Thr、TrpおよびTyrまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。105位のアミノ酸はまた好ましくはMetである。

【0189】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの106位（配列番号6参照）のアミノ酸はAspおよびGluまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。106位のアミノ酸はまた好ましくはAspである。

30

【0190】

一部の実施形態においては、重鎖ペプチドまたはそのフラグメントの107位（配列番号6参照）のアミノ酸はSer、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、ProおよびValまたはそのいずれかのサブセットからなる群より選択される。107位のアミノ酸はまた好ましくはSerである。

【0191】

一部の実施形態においては、28位のアミノ酸はGluであり；33位のアミノ酸はPheであり；54位のアミノ酸はThrであり；そして59位のアミノ酸はAspまたはLeuである。

40

【0192】

一部の実施形態においては、30位のアミノ酸はHisまたはArgであり；31位のアミノ酸はGlnまたはTrpであり；33位のアミノ酸はTrp、ValまたはProであり；52位のアミノ酸はMetまたはTrpであり；54位のアミノ酸はAsn、PheまたはGlnであり；55位のアミノ酸はMet、LysまたはValであり；57位のアミノ酸はPheまたはLeuであり；59位のアミノ酸はPheまたはTyrであり；101位のアミノ酸はPheまたはLeuであり；そして、103位のアミノ酸はHisまたはTyrである。

【0193】

50

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；30位のアミノ酸はHisであり；そして105位のアミノ酸はMetである。この変異体は本明細書においては変異体#1と称する。

10

【0194】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；33位のアミノ酸はTrpであり；そして105位のアミノ酸はMetである。この変異体は本明細書においては変異体#2と称する。

20

【0195】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、54位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。この変異体は本明細書においては変異体#4と称する。

30

【0196】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；33位、60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。この変異体は本明細書においては変異体#11と称する。

40

【0197】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、59位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、55位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のア

50

ミノ酸はMetである。この変異体は本明細書においては変異体#12と称する。

【0198】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、55位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；59位のアミノ酸はLeuであり；そして105位のアミノ酸はMetである。この変異体は本明細書においては変異体#13と称する。

10

【0199】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位のアミノ酸はTrpであり；54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

20

【0200】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位のアミノ酸はGlnであり；54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

30

【0201】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位のアミノ酸はSerであり；54位のアミノ酸はPheであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

40

【0202】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位のアミノ酸はSerであり；54位のアミノ酸はGlnであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35

50

位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

【0203】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はPheであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

10

【0204】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はLeuであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

20

【0205】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はPheであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

30

【0206】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はLeuであり；103位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

40

50

【0207】

一部の実施形態においては、ペプチドは配列番号6を含み、31位および54位のアミノ酸はSerであり；57位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位のアミノ酸はTyrであり；28位のアミノ酸はIleであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位、33位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；52位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；102位のアミノ酸はArgであり；そして105位のアミノ酸はMetである。

10

【0208】

この配列に関する同一性または類似性は本明細書においては、配列をアラインし、そして必要に応じてギャップを導入して最大パーセント配列同一性を達成した後の野生型5c8抗体残基と同一である修飾された配列におけるアミノ酸残基（すなわち、同じ残基）のパーセントとして定義する。典型的には、N末端、C末端または内部エクステンション、欠失または可変ドメイン外の抗体配列への挿入は配列の同一性または類似性に影響するものとは解釈しない。抗体はその超可変領域1つ以上の中またはこれに隣接してアミノ酸の改変1つ以上を含むことができる。パーセント配列同一性は例えばSmith and Watermanのアルゴリズムを使用するデフォルト設定を用いたギャッププログラム

20

【0209】

本発明はまた本明細書に記載したペプチドまたはそのフラグメントのいずれかをコードする核酸分子を提供する。配列番号3のペプチドをコードする核酸分子は配列番号2に示す。配列番号6のペプチドをコードする核酸分子は配列番号5に記載する。本明細書に開示したペプチドのアミノ酸配列を有する当業者はペプチドをコードする核酸分子を設計して製造することができる。

30

【0210】

本発明はまた本明細書に記載したペプチドまたはそのフラグメントのいずれかをコードするいずれかの核酸分子を含むベクターを提供する。当業者は多くのベクターを容易に熟知することができ、それらの大部分は市販されている。

【0211】

本発明はまた本明細書に開示した核酸分子またはベクターのいずれかを含有する宿主細胞を提供する。宿主細胞は例えばペプチドおよび抗体またはそれらのフラグメントを発現するために使用できる。ペプチドおよび抗体またはそれらのフラグメントはまたインビボにおいて細胞内で発現することができる。ペプチドおよび抗体またはそれらのフラグメントを製造するように形質転換（例えばトランスフェクト）された宿主細胞またはそのフラグメントは不朽化哺乳類細胞系統、例えばリンパ様起源のもの（例えばミエローマ、ハイブリドーマ、トリオーマまたはクアドローマ細胞系統）であることができる。宿主細胞はまた正常なリンパ様細胞、例えばウイルス（例えばエプスタイン・バーウイルス）による形質転換により不朽化されているB細胞を包含する。

40

【0212】

一部の不朽化リンパ様細胞系統、例えばミエローマ細胞系統はその正常な状態において、単離されたIg軽鎖または重鎖を分泌する。そのような細胞系統を本発明の方法の間に製造される変異抗体またはそのフラグメントを発現するベクターで形質転換する場合、正常に分泌された鎖が前に製造したベクターによりコードされるIg鎖の可変ドメインに相

50

補的であれば、方法の残余の工程を実施する必要はない。しかしながら、不朽化細胞系統が相補鎖を分泌しない場合は、適切な相補鎖またはそのフラグメントをコードするベクターを細胞内に導入することが必要になる。

【0213】

不朽化細胞系統が相補の軽鎖または重鎖を分泌する場合は、形質転換された細胞系統は例えば適当な細菌細胞をベクターで形質転換し、そして次に不朽化細胞系統に細菌細胞を融合（例えばスフェロプラスト融合による）させることにより製造してよい。あるいは、エレクトロポレーションによりDNAを不朽化細胞に直接導入してよい。

【0214】

本発明の一部の実施形態においては、宿主細胞は例えば、細菌細胞、例えば*E. coli*、カウロバクター・クレセントス、ストレプトマイセス種、およびサルモネラ・チフィウムリウム；酵母細胞、例えばサッカロマイセス・セレビシアエ、スキゾサッカロマイセス・ポンベ、ピチア・パストリス、ピチア・メタノリカ；昆虫細胞系統、例えばスポドブレテラ・フルギペルダ（例えばSf9およびSf21細胞系統、およびexpressSF^TM細胞（Protein Sciences Corp., Meriden, CT, USA）、ショウジョウバエS2細胞およびHigh Five（登録商標）細胞中のトリコプルシア（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）；および哺乳類細胞、例えばCOS1およびCOS7細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NS0ミエローマ細胞、NIH3T3細胞、293細胞、HEPG2細胞、HeLa細胞、L細胞、HeLa、MDCK、HEK293、WI38、ネズミES細胞系統（例えば系統129/SV、C57/BL6、DBA-1、129/SVJ）、K562、Jurkat細胞およびBW5147を包含する。他の有用な哺乳類細胞系統はよく知られており、American Type Culture Collection（ATCC）（Manassas, VA, USA）およびNational Institute of General Medical Sciences（NIGMS）、Coriell Cell Repositories（Camden, NJ, USA）のHuman Genetic Cell Repositoryより容易に入手できる。これ等の細胞型は代表例にすぎず、そして網羅的リストではない。

【0215】

ペプチドまたは抗体およびそれらのフラグメントは原核細胞および真核細胞中で製造できる。すなわち、本発明はまた、ハイブリドーマ細胞、B細胞、プラズマ細胞並びに本発明の抗体を発現するように組み換え修飾された宿主細胞を含む本発明の抗体を発現する細胞を提供する。

【0216】

一部上記した検討事項のうち、宿主細胞系統は所望の様式で発現されたペプチドまたは抗体またはそのフラグメントをプロセッシングするその能力に基づいて選択してよい。ポリペプチドの翻訳後の修飾は、例えば、グリコシル化、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化を包含し、そしてこれらの翻訳後修飾の1つ以上を有する抗体またはそのフラグメントを提供することは本発明の特徴である。

【0217】

本発明はまた本明細書に記載したいずれかのペプチドを含む抗体またはそのフラグメントを提供し、抗体またはそのフラグメントはヒトCD154に結合することができる。一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは本明細書に記載した軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントを含む。他の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは本明細書に記載した重鎖ペプチドまたはそのフラグメントを含む。さらに別の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載した重鎖ペプチドまたはそのフラグメントのいずれか、および、本明細書に記載した軽鎖ペプチドまたはそのフラグメントのいずれかを含む。

【0218】

一部の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、変異体#14のペプチドで

10

20

30

40

50

ある第1のペプチド、および、変異体#1のペプチドである第2のペプチドを含む。このような複合変異体は本明細書においては変異体#16と称する。

【0219】

一部の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、変異体#15のペプチドである第1のペプチド、および、変異体#2のペプチドである第2のペプチドを含む。このような複合変異体は本明細書においては変異体#17と称する。

【0220】

一部の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、変異体#15のペプチドである第1のペプチド、および、変異体#1のペプチドである第2のペプチドを含む。このような複合変異体は本明細書においては変異体#18と称する。

10

【0221】

一部の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、変異体#14のペプチドである第1のペプチド、および、変異体#4のペプチドである第2のペプチドを含む。このような複合変異体は本明細書においては変異体#19と称する。

【0222】

一部の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、変異体#15のペプチドである第1のペプチド、および、変異体#4のペプチドである第2のペプチドを含む。このような複合変異体は本明細書においては変異体#20と称する。

【0223】

一部の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、変異体#14のペプチドである第1のペプチド、および、変異体#2のペプチドである第2のペプチドを含む。このような複合変異体は本明細書においては変異体#23と称する。

20

【0224】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体#14である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、54位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；58位のアミノ酸はThrであり；32位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；30位のアミノ酸はHisであり；33位のアミノ酸はTrpであり；そして105位のアミノ酸はMetである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体#21と称する。

30

【0225】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体#15である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はAspであり；101位のアミノ酸はGlyであり；103位、52位、54位、55位、59位および61位のアミノ酸はAsnであり；28位のアミノ酸はIleであり；58位のアミノ酸はThrであり；32位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；30位のアミノ酸はHisであり；33位のアミノ酸はTrpであり；そして105位のアミノ酸はMetである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体#22と称する。

40

【0226】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体#14である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はSerであり；57位、100位、104位および

50

106位のアミノ酸はA s pであり；101位のアミノ酸はG l yであり；103位、52位、55位、59位および61位のアミノ酸はA s nであり；28位のアミノ酸はI l eであり；58位のアミノ酸はT h rであり；32位および35位のアミノ酸はT y rであり；50位および62位のアミノ酸はG l uであり；53位のアミノ酸はP r oであり；60位および64位のアミノ酸はP h eであり；63位および65位のアミノ酸はL y sであり；102位のアミノ酸はA r gであり；30位のアミノ酸はH i sであり；33位のアミノ酸はT r pであり；そして105位のアミノ酸はM e tである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体# 24と称する。

【0227】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体# 15である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、54位、66位、99位および107位のアミノ酸はS e rであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はA s pであり；101位のアミノ酸はG l yであり；103位、52位、55位、59位および61位のアミノ酸はA s nであり；28位のアミノ酸はI l eであり；58位のアミノ酸はT h rであり；32位および35位のアミノ酸はT y rであり；50位および62位のアミノ酸はG l uであり；53位のアミノ酸はP r oであり；60位および64位のアミノ酸はP h eであり；63位および65位のアミノ酸はL y sであり；102位のアミノ酸はA r gであり；30位のアミノ酸はH i sであり；33位のアミノ酸はT r pであり；そして105位のアミノ酸はM e tである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体# 25と称する。

【0228】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体# 15である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、66位、99位および107位のアミノ酸はS e rであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はA s pであり；101位のアミノ酸はG l yであり；103位、52位、54位、55位、59位および61位のアミノ酸はA s nであり；28位のアミノ酸はI l eであり；58位のアミノ酸はT h rであり；32位、33位および35位のアミノ酸はT y rであり；50位および62位のアミノ酸はG l uであり；53位のアミノ酸はP r oであり；60位および64位のアミノ酸はP h eであり；63位および65位のアミノ酸はL y sであり；102位のアミノ酸はA r gであり；30位のアミノ酸はH i sであり；そして105位のアミノ酸はM e tである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体# 26と称する。

【0229】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体# 15である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、66位、99位および107位のアミノ酸はS e rであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はA s pであり；101位のアミノ酸はG l yであり；103位、52位、54位、55位、59位および61位のアミノ酸はA s nであり；28位のアミノ酸はI l eであり；30位および58位のアミノ酸はT h rであり；32位および35位のアミノ酸はT y rであり；50位および62位のアミノ酸はG l uであり；53位のアミノ酸はP r oであり；60位および64位のアミノ酸はP h eであり；63位および65位のアミノ酸はL y sであり；102位のアミノ酸はA r gであり；33位のアミノ酸はT r pであり；そして105位のアミノ酸はM e tである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体# 27と称する。

【0230】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、変異体# 14である第1のペプチド、および、配列番号6を含む第2のペプチドを含み、31位、66位、99位および107位のアミノ酸はS e rであり；57位、100位、104位および106位のアミノ酸はA s pであり；101位のアミノ酸はG l yであり；103位、52位、54位、55位、59位および61位のアミノ酸はA s nであり；28位のアミノ酸はI l

10

20

30

40

50

eであり；30位および58位のアミノ酸はThrであり；32位および35位のアミノ酸はTyrであり；50位および62位のアミノ酸はGluであり；53位のアミノ酸はProであり；60位および64位のアミノ酸はPheであり；63位および65位のアミノ酸はLysであり；102位のアミノ酸はArgであり；33位のアミノ酸はTrpであり；そして105位のアミノ酸はMetである。このような複合変異体は本明細書においては、変異体#28と称する。

【0231】

抗体は体内の外来性分子の存在に応答した脊椎動物の免疫系の体液性のアームによりもたらされる概ね分子量150kDの糖タンパク質である。機能的抗体または抗体誘導体はインビトロまたはインビボでその特定の抗原を認識して結合することが可能であり、そして、抗体結合に関連するその後の作用、例えば直接の細胞毒性、補体依存性の細胞毒性(CDC)、抗体依存性の細胞毒性(ADCC)および抗体の生産を開始する場合がある。

10

【0232】

抗原への結合により、抗体は感染性の微生物または他の抗原含有物体、例えば癌細胞の中和、破壊および排除に寄与する免疫系の多くのエフェクター系の1つ以上を活性化する。

【0233】

本明細書に開示した抗体およびそのフラグメントは野生型5c8抗体と比較して増強または低減された親和性、結合力および/または特異性を有する。一部の実施形態においては、本明細書に開示した抗体およびそのフラグメントは野生型5c8抗体と比較して増強した親和性、結合力および/または特異性を有する。親和性、結合力および/または特異性は種々の方法で測定できる。一般的に、そして親和性を定義または測定する厳密な態様に関わらず、本発明の方法は、原料となる抗体よりもその臨床的適用のいずれかの態様において優れている抗体をそれらが生成する場合に抗体の親和性を向上させる(例えば修飾された抗体を低用量または低頻度で、または、原料となる抗体よりも簡便な投与経路で投与することができる場合に、本発明の用法は有効または成功であると見なされる)。

20

【0234】

当業者の知る通り親和性の測定は単一の最終結果の数字を見るほど常時単純ではない。抗体は2つのアームを有しているため、その見かけの親和性は可変領域と抗原の間の内因性の親和性よりも通常は遥かに高値である。内因性親和性はscFvおよびFabフラグメントを用いて測定できる。

30

【0235】

一部の実施形態においては、抗体フラグメントは単鎖抗体(scFv)、F(ab')₂フラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメントまたはFdフラグメントまたはその抗原結合フラグメントである。単鎖抗体は1本のタンパク質鎖内のタンパク質スパーサーにより連結された可変領域より構成される。他の実施形態においては、抗体フラグメントはヘテロマーの抗体複合体および抗体融合物、例えば2重特異性抗体、ヘミダイマー抗体および多価抗体(例えば4価抗体)を包含する。ヘミダイマー抗体はFc部分および1つのFab部分から構成される。

40

【0236】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントはまた免疫グロブリンの軽鎖および/または重鎖の1つ以上を含有するタンパク質、例えばこれ等の鎖の単量体およびホモまたはヘテロ多量体(例えば2量体または3量体)を包含することができ、その場合、その鎖は場合によりジスルフィド結合または他の態様で交差結合している。これ等の抗体またはそのフラグメントは抗原1つ以上に結合できる。

【0237】

本明細書に開示した抗体のフラグメントはCD154に結合するその能力を保持している。例えばCD154に結合できる5c8のフラグメントに関しては、本明細書に開示したいずれかの変異を含む相当するフラグメントもまたCD154に結合できる。5c8に

50

より接触されるCD154上に存在するアミノ酸はV126、I127、S128、E129、A130、S131、S132、K133、T134、Q139、W140、A141、E142、K143、G144、Y145、Y146、T147、M148、S149、N150、N151、V153、T154、L155、E156、N157、G158、K159、T176、F177、C178、S179、N180、E182、A183、S184、R200、F201、E202、R203、I204、L205、A209、A215、K216、P217、C218、G219、Q220、Q221、D243、P244、S245、Q246、V247、S248、H249、G250、T251、G252、F253およびT254を包含する。一部の実施形態においてはCD154上のこれ等の残基の一部または全てが本明細書に記載した変異体と相互作用する。一部の実施形態においては、本明細書に記載した変異体は野生型抗体よりも1つ以上少ないCD154残基と接触する場合がある。

10

【0238】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは検出可能なマーカーで標識される。検出可能なマーカーは例えば放射性同位体（例えば P^{32} および S^{35} ）、酵素（例えばセイヨウワサビパーオキシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -gal）等）、蛍光色素、発色団、コロイド状金、染料およびビオチンを包含する。標識された抗体またはそのフラグメントは種々の細胞または組織型において診断操作法を実施するために使用できる（多くの診断試験はタンパク質抗原（例えばPSA）の検出に依存している）。インビトロまたはインビボの画像化の操作法については、本明細書に記載した方法により製造された改変された抗体を別の薬剤、例えばNMR造影剤、X線造影剤または量子ドットにより標識することができる。ポリペプチド、例えば抗体またはそのフラグメントに検出可能な薬剤を結合するための方法は、当該分野で知られている。抗体はまた不溶性支持体（例えばビーズ、ガラスまたはプラスチックのスライド等）に結合することもできる。

20

【0239】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは放射性同位体（例えば ^{111}In または ^{90}Y ）、毒素（例えば破傷風毒素またはリシン）、トキシイドおよび化学療法剤を包含する治療剤に結合体化される（米国特許第6,307,026号参照）。

【0240】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは画像化剤に結合体化されることにより修飾される。画像化剤は、単離または検出を容易にするための、例えば標識部分（例えばビオチン、蛍光部分、放射性部分、ヒスチジンタグまたは他のペプチドタグ）を包含する。

30

【0241】

投与されると、抗体はしばしば急速に循環から浄化され、そして従って比較的短い寿命の薬理的活性を示す場合がある。その結果、抗体投与の処置効果を持続させるためには抗体の比較的大用量の頻繁な注射が必要となる場合がある。

【0242】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントはインビボの抗体の一体性と持続性を増大させるために修飾（他の部分への結合による等）することができる。例えば、抗体またはそのフラグメントは安定化を増強することにより抗体の血清中半減期を延長する部分を含むように修飾することができる。

40

【0243】

一部の実施形態においては抗体またはそのフラグメントは少なくとも1つの高分子量ポリマー、例えばポリエチレンイミンおよびポリリシンを含む。一部の実施形態においては抗体またはそのフラグメントは水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共ポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンまたはポリプロリンの共有結合により修飾され、これ等はすべて相当する未修飾タンパク質よりも静脈内注射後

50

の血中の実質的により長い半減期を示すことがわかっている (Abuchowski et al., "Enzymes as Drugs", 1981; Holcenberg et al., Ed., 1981, Wiley-Interscience, New York, NY, 367-383; Anderson, Human Gene Therapy, Science, 1992, 256, 808-813; Newmark et al., J. Appl. Biochem., 1982, 4, 185-189; および Katre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 1478-1491)。

【0244】

一部の実施形態においては抗体またはそのフラグメントは少なくとも1つのアミノ酸位置においてPEG化またはグリコシル化されるか、または、他の適当な水溶性ポリマー、例えばPEG、エチレングリコール/プロピレングリコールの共ポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ1,3ジオキソラン、ポリ1,3,6トリオキソラン、エチレン/無水マレイン酸共ポリマー、ポリアミノ酸(単独ポリマーまたはランダム共ポリマー)およびデキストランまたはポリ(nビニルピロリドン)PEG、プロピレングリコール単独ポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共ポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコールおよびこれ等の混合物で修飾される。

10

【0245】

ポリマーはいずれかの適当な分子量のものであってよく、そして分枝鎖または未分枝鎖であってよい。

20

【0246】

PEGについては、適当な平均分子量は約2kDa~約100kDaである。これにより取り扱いと製造が容易になる。当業者の知る通り、PEGの製造においては、記載した分子量よりも一部の分子は高分子量であり、一部は低分子量となる。すなわち、分子量は典型的には「平均分子量」として特定される。他の分子量(サイズ)も所望の処置特性に応じて使用してよい(例えば所望の持続放出の持続時間; 該当する場合は生物学的活性に対する作用; 取り扱いの容易さ; 抗原性の程度または非存在および処置タンパク質に対するPEGの他の知られた作用)。種々の実施形態において、分子量は約2kDa、約5kDa、約10kDa、約15kDa、約20kDa、約25kDa、約30kDa、約40kDaまたは約100kDaである。一部の実施形態においては、各PEG鎖の平均分子量は約20kDaである。別の実施形態においては、平均分子量は約10kDaである。

30

【0247】

このようにして結合したポリマー分子の数は変動してよく、そして機能に対する作用は当業者であれば確認することができる。モノ誘導体化を行ってよく、または、ジ誘導体化、トリ誘導体化、テトラ誘導体化または数種の誘導体化の組み合わせを同一もしくは異なる化学部分(例えば異なる分子量のPEGのようなポリマー)に提供してもよい。タンパク質(またはポリペプチド)に対するポリマー分子の比率は、反応混合物中のその濃度と同様に変動する。一般的に、至適比(過剰な未反応のタンパク質またはポリマーが存在しないという点における反応効率に関する)は所望の誘導体化度(例えば、モノ、ジ、トリ等)、選択されたポリマーの分子量、ポリマーが分枝鎖であるかまたは未分枝鎖であるか、および、反応条件のような要因により決定される。

40

【0248】

PEG分子(または他の化学部分)はタンパク質の機能的または抗原性のドメインに対する作用を考慮しながらタンパク質に結合させなければならない。当業者の使用できる結合方法は多数存在する。例えばEP0401384(PEGのGCSFへのカップリング); Malik et al., Exp. Hematol., 1992, 20, 1028-1035(トレシルクロリドを使用したGM-CSFのPEG化を報告)を参照できる。

【0249】

50

例えば、PEGは遊離のアミノまたはカルボキシル基のような反応性の基を介してアミノ酸残基に共有結合（PEG化）してよい。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基はリジン残基およびアミノ末端アミノ酸残基を包含する。遊離のカルボキシル基を有するものはアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基を包含する。スルヒドリル基もまた、PEG分子の結合のための反応性の基として使用してよい。処置目的のためには、結合は例えばN末端のアミノ基またはリジン基に有ることができる。アミノ末端の化学修飾されたタンパク質が特に望まれる場合もある。

【0250】

本発明の組成物の説明として、PEGを用いる場合、種々のPEG分子（分子量、分枝等による）、反応混合物中のタンパク質（またはペプチド）分子に対するPEG分子の比率、実施すべきPEG化反応の型および選択されたアミノ末端PEG化タンパク質を得る方法から選択してよい。アミノ末端PEG化製造物を得るための方法（すなわちこの部分を他のモノPEG化物質から必要に応じて分離すること）はPEG化タンパク質分子からのアミノ末端PEG化物質の精製により行ってよい。選択的アミノ末端化学修飾は、特定のタンパク質における誘導体化のために使用できる第1アミノ基の異なる型（リジンvsアミノ末端）の示差的な反応性を利用する還元的アルキル化により達成してよい。適切な反応条件下において、カルボニル基含有ポリマーによるアミノ末端におけるタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。例えば、リジン残基のイプシロン（ ϵ ）アミノ基とタンパク質のアミノ末端のアルファ（ α ）アミノ基との間の pK_a の差を利用できるpHにおいて反応を実施することによりタンパク質のアミノ末端を選択的にPEG化してよい。このような選択的誘導体化により、タンパク質への水溶性ポリマーの結合が制御され、ポリマーとの結合体形成がタンパク質のアミノ末端において優先的に起こり、そして他の反応性の基、例えばリジン側鎖アミノ基の修飾はそれほど起こらない。

【0251】

還元的アルキル化を用いる場合、水溶性ポリマーは上記した型のものであってよく、そして、タンパク質へのカップリングのための単一の反応性のアルデヒドを有さなければならない。単一の反応性のアルデヒドを有するPEGプロピオンアルデヒドを使用してよい。

【0252】

抗体の修飾はまた水溶液中のタンパク質の溶解度を上昇させ、凝集を排除し、タンパク質の物理的および化学的安定性を増強し、そしてタンパク質の免疫原性および抗原性を大きく低減することができる。その結果、未修飾タンパク質の場合よりも低頻度または低用量におけるこれ等のポリマータンパク質付加物の投与により、所望のインビボの生物学的活性を達成できる。

【0253】

「キメラ抗体」という用語は異種タンパク質またはそのペプチドに、例えばペプチド結合またはペプチドリinkerにより結合された免疫グロブリン分子の少なくとも抗原結合部分を含むタンパク質を説明するために使用する。「異種」タンパク質とは非免疫グロブリンまたは異なる種、クラスまたはサブクラスの免疫グロブリンの部分であることができる。

【0254】

このような抗体を作成できる多くの方法が存在する。例えば少なくともVHまたはVLをコードするDNA配列および異種タンパク質（またはそのペプチド（ペプチドは非免疫グロブリン分子としてそれが認識され得る十分な長さのもの（例えば免疫グロブリンに対して実質的な配列同一性を有さないペプチド））をコードする配列に作動可能に連結したプロモーターを含む発現ベクターを製造することができる。必要に応じて、または所望の場合は、相補可変ドメインをコードするDNA配列に作動可能に連結したプロモーターを含む第2の発現ベクターを製造することができる（例えば親発現ベクターがVHをコードする場合は、第2の発現ベクターはVLをコードし、または、その逆も可能である）。次に細胞系統（例えば不朽化哺乳類細胞系統）を発現ベクターの一方または両方で形質転

10

20

30

40

50

換し、キメラ可変ドメインまたはキメラ抗体の発現を可能にする条件下で培養することができる（例えば国際特許出願 P C T / G B 8 5 / 0 0 3 9 2 参照）。この方法は本発明の修飾された抗体、完全長の重鎖および軽鎖を含有する抗体またはそのフラグメント（例えば本明細書に記載した F a b、F (a b ')₂ または s c F v フラグメント）を発現するために使用できる。方法はキメラ抗体の発現に限定されない。

【 0 2 5 5 】

天然に存在する抗体は単一の種から誘導されるが、操作された抗体および抗体フラグメントは1つ以上の種の動物から誘導される、例えばキメラ抗体であってよい。今日まで、マウス（ネズミ）/ヒトキメラおよびネズミ/非ヒト霊長類抗体が作成されているが、他の種の組み合わせも可能である。

10

【 0 2 5 6 】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントはキメラ抗体である。典型的にはキメラ抗体は別の種（典型的にはヒト）の定常領域に融合した1つの種（典型的にはマウス）の相補性決定領域（C D R）およびフレームワーク残基の両方を含む、重鎖および/または軽鎖の可変領域を包含する。これ等のキメラマウス/ヒト抗体は約75%のヒトおよび25%のマウスのアミノ酸配列をそれぞれ含有する。ヒト配列は抗体の定常領域を示し、マウス配列は抗体の可変領域（すなわち、抗原結合部位を含有）を示す。

【 0 2 5 7 】

このようなキメラを使用する根拠は、マウス抗体の抗原特異性を保持するがマウス抗体の免疫原性（マウス抗体はマウス以外の種においてそれに対する免疫応答を誘発する場合がある）を低減し、これにより、ヒトの処置においてキメラを使用できるようにすることである。

20

【 0 2 5 8 】

別の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは1つの抗体のフレームワーク領域および別の抗体のC D R領域を含むキメラ抗体を包含する。他の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは異なるヒト抗体由来のC D R領域を含むキメラ抗体を包含する。別の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは少なくとも2つの異なるヒト抗体由来のC D R領域を含むキメラ抗体を包含する。

【 0 2 5 9 】

上記したキメラ抗体の全てを作成する方法は当業者のよく知る通りである（米国特許第5,807,715号；Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 6851-5；Sharon et al., Nature, 1984, 309, 364-7；およびTakeda et al., Nature, 1985, 314, 452-4）。

30

【 0 2 6 0 】

別の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントはまた霊長類化、ヒト化および完全ヒト抗体を包含する。霊長類化およびヒト化抗体は典型的には、ヒト定常領域を通常はさらに含む非ヒト霊長類またはヒトの抗体V領域のフレームワークに移植されたネズミ抗体由来の重鎖および/または軽鎖C D Rを含む（Riechmann et al., Nature, 1988, 332, 323-7；Co et al., Nature, 1991, 351, 501-2；および米国特許第6,054,297号、米国特許第5,821,337号、米国特許第5,770,196号、米国特許第5,766,886号、米国特許第5,821,123号、米国特許第5,869,619号、米国特許第6,180,377号、米国特許第6,013,256号、米国特許第5,693,761号、米国特許第6,180,370号）。

40

【 0 2 6 1 】

ヒト化抗体は、抗原結合のために必要でないヒト免疫グロブリン軽鎖または重鎖のアミノ酸の一部または全て（例えば定常領域および可変ドメインのフレームワーク領域）が同種の非ヒト抗体の軽鎖または重鎖由来の相当するアミノ酸を置換するために使用された組み換えDNA技術により作成された抗体である。例示すれば、ある抗原に対するネズミ抗

50

体のヒト化バージョンはその重鎖および軽鎖の両方の上に、1) ヒト抗体の定常領域; 2) ヒト抗体の可変ドメイン由来のフレームワーク領域; および3) ネズミ抗体由来のCDRを有する。必要な場合は、ヒトフレームワーク領域内の1つ以上残基をネズミ抗体における相当する位置の残基に変更することにより抗原に対するヒト化抗体の結合親和性を温存することができる。この変更は場合により「復帰変異」と称される。ヒト化抗体は一般的にキメラヒト抗体と比較して前者はかなり少数の非ヒト成分しか含有しないため、ヒトにおける免疫応答を惹起する可能性は低い。ヒト化抗体を作成するための方法は抗体の当該分野でよく知られている(欧州特許第239400号; Jones et al., Nature, 1986, 321, 522-525; Riechmann et al., Nature, 1988, 332, 323-327; Verhoeyen et al., Science, 1988, 239, 1534-1536; Queen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 10029; Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 3833; および米国特許第6,180,370号)。

10

【0262】

一部の実施形態においては、ヒト化抗体はヒト抗体内へのネズミ(または他の非ヒト)CDRの移植により作成する。より詳細には、これは以下の通り、すなわち、1) 重鎖および軽鎖可変ドメインをコードするcDNAをハイブリドーマから単離し; 2) CDRを含む可変ドメインのDNA配列を配列決定により調べ; 3) CDRをコードするDNAを部位指向性変異誘発によりヒト抗体の重鎖または軽鎖可変ドメインコーディング配列の相当する領域に転移させ; そして4) 所望のアイソタイプのヒト定常領域遺伝子セグメント(例えばCHは1、そしてCLはk)を付加することにより達成できる。最後に、ヒト化重鎖および軽鎖の遺伝子を哺乳類宿主細胞(例えばCHOまたはNS0細胞)中で同時発現することにより可溶性ヒト化抗体を製造する。

20

【0263】

場合によりヒトフレームワークへのCDRの直接の転移は得られる抗体の抗原結合親和性の損失をもたらす。その理由は、一部の同種の抗体においては、フレームワーク領域内の特定のアミノ酸は、CDRと相互作用し、これにより抗体の全体的な抗原結合親和性に影響するためである。このような場合、同種の抗体の抗原結合活性を保持するためにはアクセプター抗体のフレームワーク領域内に「復帰変異」を導入することが重要である。復帰変異を行う一般的な方法は当業者のよく知る通りである(Queen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 10029; およびCo et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 2869-2873; PCT特許出願WO90/07861; およびTempest, Biotechnology, 1991, 9, 266-271)。

30

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは完全ヒト抗CD154抗体である。完全ヒト抗体はインビトロでプライミングされたヒト脾細胞(Boerner et al., J. Immunol., 1991, 147, 86-95)またはファージディスプレイ抗体ライブラリ(米国特許第6,300,064号)を用いて製造できる。あるいは、完全ヒト抗体はレパートリークローニングにより製造できる(Persson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 2432-2436; およびHuang et al., J. Immunol. Methods, 1991, 141, 227-236)。さらにまた、米国特許第5,798,230号はヒトB細胞由来のヒトモノクローナル抗体の製造を記載しており、そこでは、ヒト抗体産生B細胞を免疫化に必要なタンパク質であるエプスタイン・バーウイルス核抗原2(EBNA2)を発現するエプスタイン・バーウイルスまたはその誘導體による感染により不朽化する。EBNA2の機能は後にシャットオフされ、抗体生産の増大がもたらされる。

40

【0264】

完全ヒト抗体の製造のための他の方法では、不活性化された内因性Ig遺伝子座を有し

50

、再配列されていないヒト抗体重鎖および軽鎖の遺伝子に関してトランスジェニックである非ヒト動物を使用する。このようなトランスジェニック動物は活性化T細胞またはD1・1タンパク質により免疫化（米国特許第5,474,771号；米国特許第6,331,433号；および米国特許第6,455,044号）することができ、そしてそれより誘導されたB細胞からハイブリドーマを作成することができる。これ等の方法の詳細は当該分野で知られている。例えばヒトIgミニ遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスに関する種々のGenPharm/Medarex (Palo Alto, CA)の公開物/特許、例えば米国特許第5,789,650号；XENOMOUSE（登録商標）マウスに関する種々のAbgenix (Fremont, CA)の公開物/特許、例えば米国特許第6,075,181号、米国特許第6,150,584号および米国特許第6,162,963号；Green et al., Nature Genetics, 1994, 7, 13-21；Mendez et al., Nature Genetics, 1997, 15, 146-56；および「トランソミック」マウスに関する種々のKirin (Japan)の公開物/特許、例えば欧州特許第843961号およびTomizuka et al., Nature Genetics, 1997, June; 16(2): 133-43を参照できる。

10

【0265】

抗体の配列（例えばCDRグラフトまたは他の修飾されたまたは「ヒト化」抗体）を決定した後、その抗体は分子生物学の分野でよく知られた手法により作成できる。より詳細には、核酸配列（例えば所望のタンパク質をコードするDNA配列（例えば修飾された重鎖または軽鎖；その可変ドメイン、または他のその抗原結合フラグメント））で宿主細胞を形質転換することにより、広範なポリペプチドを組み換えDNA手法を用いて製造できる。

20

【0266】

より詳細には、製造方法はキメラ抗体に関して上記したとおり実施できる。例えば改変された可変ドメインをコードするDNA配列はオリゴヌクレオチド合成により製造できる。可変ドメインはヒトアクセプター分子のFRおよびドナー、例えばネズミのCDRを、残基1つ以上（例えばCDR内の残基）を修飾して抗原結合を促進するより前またはその後に含ませることができる。これはアクセプター抗体のフレームワーク領域の配列およびドナー抗体の少なくともCDR配列を決定することにより容易になる。あるいは、改変された可変ドメインをコードするDNA配列はプライマー指向オリゴヌクレオチド部位指向性変異誘発により製造してよい。この手法は変異点を含有するDNAの1本鎖に所望の変異をコードしたオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすること、および、変異を含有する鎖を作成するために1本鎖をオリゴヌクレオチドの伸長のための鋳型として使用することにより変異を含有する鎖を作成することを包含する。この手法は種々の形態において、例えばZoller and Smith (Nuc. Acids Res., 1982, 10, 6487-6500), Norris et al. (Nuc. Acids Res., 1983, 11, 5103-5112), Zoller and Smith (DNA, 1984, 3, 479-488)およびKramer et al., (Nuc. Acids Res., 1982, 10, 6475-6485)に記載されている。

30

40

【0267】

配列内に変異を導入する他の方法も同様に知られており、そして本明細書に記載した改変抗体を作成するために使用できる（例えばCarter et al., Nuc. Acids Res., 1985, 13, 4431-4443参照）。部位指向性変異誘発に使用するオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成により製造するか、または、適当な制限酵素を使用することによりドナー抗体の可変ドメインをコードするDNAから単離することができる。

【0268】

別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは無細胞翻訳によって製造することができる。あるいは抗体またはそのフラグメントは大規模生産を容易にするために抗体

50

発現細胞を含有するバイオリアクター中で製造することができる。

【0269】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは抗体の大規模生産を容易にするために乳汁中に抗体を発現するヤギ、ウシまたはヒツジのようなトランスジェニック哺乳類中で生産できる（米国特許第5,827,690号；およびPollack et al., J. Immunol. Meth., 1999, 231, 147-57）。

【0270】

本発明はまた本明細書に記載したペプチドまたはそのフラグメントいずれかの1つ以上、核酸分子またはベクターのいずれかの1つ以上、または、抗体またはそのフラグメントのいずれかの1つ以上を含む組成物を提供する。組成物は例えば医薬組成物を包含する。

10

【0271】

予防的な用途において、医薬組成物または医薬は、障害の生化学的、組織学的および/または挙動上の症状、その合併症および障害の発症中に存在する中間的な病理学的表現型を含む障害の危険性を排除または低減するため、重症度を低下させるため、または、開始を遅延させるために十分な量で障害に罹患した被験体に投与される。処置用途においては、医薬組成物または医薬は、障害の症状（生化学的、組織学的および/または挙動上）、例えばその合併症および障害の発症における中間的な病理学的表現型を、治癒、または少なくとも部分的に停止するのに十分な量でそのような障害を疑われる、または既に罹患した被験体に投与される。

【0272】

20

本発明の医薬組成物は薬学的に受容可能なキャリア中に本明細書に開示した抗体またはそのフラグメント少なくとも1つを含むことができる。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、活性成分の投与のために通常使用される医薬品調製物の少なくとも1つの成分を指す。それ自体キャリアは当該分野で使用される薬学的賦形剤のいずれかおよびいずれかの形態の投与用ベヒクルを含有できる。キャリアは例えばリン酸塩緩衝食塩水、生理食塩水、水、クエン酸/スクロース/ツイーン処方およびエマルジョン、例えば油/水エマルジョンを包含する。

【0273】

組成物は活性な治療剤および種々の他の薬学的に受容可能な成分を含むことができる。Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980))を参照できる。所望の形態は投与の意図される様式および処置用途により変動する。組成物はまた、所望の製剤に応じて、動物またはヒトへの投与のための医薬組成物を製剤するために一般的に使用されているベヒクルとして定義される、薬学的に受容可能な非毒性のキャリアまたは希釈剤を含むことができる。希釈剤は組み合わせの生物学的活性に影響しないように選択する。このような希釈剤の例は蒸留水、生理学的リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液およびHank's溶液を包含する。さらにまた、医薬組成物または製剤はまた他のキャリア、アジュバント、または、非毒性、非処置性、非免疫原性の安定化剤等を含んでよい。経口投与用の組成物の固体製剤は適当なキャリアまたは賦形剤、例えばコーンスターチ、ゼラチン、乳糖、アカシア、スクロース、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、炭酸カルシウム、塩化ナトリウムまたはアルギン酸を含有できる。使用できる錠剤崩壊剤は例えば微結晶セルロース、コーンスターチ、澱粉グリコール酸ナトリウムおよびアルギン酸を包含する。使用できる錠剤結着剤は、アカシア、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン (PovidoneTM)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、澱粉およびエチルセルロースを包含する。使用できる潤滑剤はステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリコーン液、タルク、ワックス、油脂およびコロイド状シリカを包含する。他の賦形剤は例えば、着色料、味マスキング剤、溶解促進剤、懸濁剤、圧縮剤、腸溶性コーティング、持続放出促進剤等を包含する。

30

40

50

【0274】

抗体は活性成分の持続放出を可能にするような態様で製剤することができる蓄積注射またはインプラント製剤の形態で投与できる。例示される組成物はHClでpH6.0に調節した50mM L-ヒスチジンおよび150mM NaClからなる水性の緩衝液中に製剤した5mg/mlの抗体またはそのフラグメントを含む。モノクローナル抗体用の適当な製剤緩衝液の別の例は20mMクエン酸ナトリウム、pH6.0、10%スクロースおよび0.1%ツイーン80を含有する。

【0275】

一部の実施形態においては、水または他の水性ベヒクル中に調製された経口投与用の医薬組成物の液体製剤は種々の懸濁剤、例えばメチルセルロース、アルギネート、トラガカント、ペクチン、ケルギン、カラギーナン、アカシア、ポリビニルピロリドンおよびポリビニルアルコールを含有できる。本発明の医薬組成物の液体製剤は活性化合物、水和剤、甘味料および着色料およびフレーバー剤を共に含有する溶液、エマルジョン、シロップおよびエリキシルも包含できる。投与すべき動物の肺内に吸入のための医薬組成物の種々の液体および粉末の製剤が従来の方法により製造できる。

【0276】

一部の実施形態においては、注射用の医薬組成物の液体製剤は種々のキャリア、例えば植物油、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、エチルラクテート、エチルカーボネート、イソプロピルミリステート、エタノール、ポリオール、例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等を含むことができる。一部の実施形態においては、組成物はシトレート/スクロース/ツイーンのキャリアを含む。静脈内注射のためには、組成物の水溶解型を点滴法により投与することができ、これにより、抗カビ剤および生理学的に許容される賦形剤を含有する医薬品製剤を注入する。生理学的に許容される賦形剤は例えば5%デキストロース、0.9%食塩水、リンゲル液または他の適当な賦形剤を包含できる。組成物の適当な不溶性型は水性基剤または薬学的に受容可能な油脂基剤、例えば長鎖脂肪酸のエステル、例えばオレイン酸エチル中の懸濁液として調製して投与することができる。

【0277】

組成物は例えば注射用の溶液、水性の懸濁液または溶液、非水性の懸濁液または溶液、固体および液体の経口用製剤、軟膏剤、ゲル、軟膏、皮内パッチ、クリーム、ローション、錠剤、カプセル、持続放出製剤等であることができる。一部の実施形態においては、局所適用のためには、医薬組成物は適当な軟膏中に製剤できる。一部の実施形態においては、局所用の半固体の軟膏製剤は典型的には医薬品用のクリーム基剤のようなキャリア中に約1~20%または5~10%の活性成分の濃度を含む。局所用組成物の製剤の一部の例は、活性成分および種々の支持体およびベヒクルを含有する滴下剤、チンキ、ローション、クリーム、溶液および軟膏を包含する。

【0278】

典型的には、組成物は溶液または懸濁液のいずれかとしての注射剤であり；注射前に液体ベヒクル中の溶液または懸濁液とするのに適する固体形態も製造できる。調製物はまたリポソームまたは微粒子、例えばポリラクチド、ポリグリコリドまたは共ポリマー中に乳化またはカプセル化して増強されたアジュバント作用を得ることもできる(Langer, Science, 1990, 249, 1527およびHanes, Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 28, 97を参照できる)。滅菌注射用調製物、例えば滅菌された注射用の水性または油性の懸濁液も製造できる。この懸濁液は適当な分散剤、水和剤および懸濁剤を用いながら当該分野で知られた手法に従って製剤してよい。一部の実施形態においては、医薬組成物はタンパク質に対する宿主の免疫応答を低減または防止するためにマイクロカプセル中で送達することができる。

【0279】

症状を処置するための本発明の組成物の有効用量は、多種類の要因、例えば投与手段、標的部位、被験体の生理学的状況、被験体がヒトか動物か、他の医薬を投与するか、およ

10

20

30

40

50

び、投与が予防的または処置的のいずれかであるかにより変動する。通常は被験体はヒトであるが、非ヒト動物、例えばトランスジェニック哺乳類も処置することができる。

【0280】

抗体を用いた受動免疫のためには、用量範囲は約0.0001~100mg/kg、約0.01~200mg/kg、または約0.01~20mg/kg宿主体重の範囲である。例えば用量は1mg/kg体重または10mg/kg体重、または、1~10mg/kgの範囲内、または少なくとも1mg/kgであることができる。被験体にはこのような用量を毎日、または一日おき、週一回、または経験的に決定されたいずれかの他の日程に従って投与することができる。例示される処置は長期間、例えば少なくとも6ヶ月に渡って複数回の投薬における投与を意図する。別の例示される処置方法は2週に1回、または

10

【0281】

抗体は通常は、複数回投与される。各投薬の時間間隔は週、月または年単位であることができる。一部の実施形態においては用量は1~1000mg/ml、そして一部の方法においては25~300μg/mlの血漿中抗体濃度を達成するように調節する。あるいは、抗体は持続放出製剤として投与ことができ、その場合より低頻度の投与を要する

20

【0282】

用量および投与頻度は処置が予防的であるか処置的であるかにより変動する場合がある。予防的適用の場合、本発明の抗体またはそのカクテルを含有する組成物は被験体の抵抗性を増強するために既に疾患状況にあるわけではない被験体に対して投与される。このような量を「予防有効量」と定義する。この用途においては厳密な量はやはり被験体の健康の状況および全体的免疫性に依存するが、一般的に投薬当たり0.1~25mg、特に投薬当たり0.5~2.5mgの範囲である。長期間に渡り比較的低頻度の間隔で比較的低

30

【0283】

処置用途の場合は、比較的高用量（例えば投薬当たり約1~200mgの抗体、ただし5~25mgの用量がより一般的に使用されている）を比較的に短い時間間隔で与えることができる。疾患の進行を低減または停止させるまで、そして場合により被験体が疾患症状の部分的または完全な緩解を示すまで必要となる場合がある。その後、患者には予防的用法において投与することができる。

【0284】

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメント、またはそれを含む組成物は、被験体に対し、注射により、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、骨髄内、脳室内、硬膜内、動脈内、血管内、関節内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝臓内、脊髄内、腫瘍内、頭蓋内、腸内、肺内、経粘膜、舌下または炎症または腫瘍生育の部位に局所的に、標準的な方法を用いて投与することができる。あるいは、抗体またはそのフラグメントまたはそれを含む組成物は経口、経鼻、眼内、直腸内または局所を包含する経路により被験体に投与できる。タンパク質薬剤の投与の最も典型的な経路は血管内、皮下または筋肉内であるが、他の経路も有効である場合がある。一部の実施形態においては、抗体は持続放出組成物またはMedipadTM装置のような装置として投与される。タンパク質薬剤はまた呼吸管を介して、例えば乾燥粉末吸入装置、ネブライザーまたは計量用量吸入器を用いて投与することもできる。

40

【0285】

50

一部の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、手術中に直接適用される腐食性のインプラントの蓄積注射のような手段により、または、被験体への注入ポンプまたは生体適合性の持続放出インプラントの移植により、持続放出投与により被験体に投与することができる。あるいは抗体またはそのフラグメントは1、3または6ヶ月の蓄積注射または生体分解性の材料および方法を用いることによる等の注射可能な蓄積投与経路によるか、または、抗体、抗体誘導體または医薬組成物を含有する経皮パッチを被験体の皮膚に適用し、一般的にはパッチ当たり1～5時間、被験体の皮膚にパッチを接触させたままとすることにより、被験体に投与することができる。

【0286】

組成物は場合により免疫障害の処置に少なくとも部分的に有効である他の薬剤と組み合わせ投与することができる。一部の実施形態においては、医薬組成物はさらに免疫抑制性または免疫調節性の化合物を含む。例えば、このような免疫抑制性または免疫調節性の化合物は以下のものの1つ、すなわち、CD28を介したT細胞同時刺激シグナリングを中断させる薬剤；カルシニューリンシグナリングを中断させる薬剤、コルチコステロイド、抗増殖剤、および、例えばCD45、CD2、IL2R、CD4、CD8およびRANKFcR、B7、CTLA4、TNF、LT およびVLA-4を包含する免疫細胞の表面上に発現されるタンパク質に特異的に結合する抗体であってよい。さらにまた、一部の実施形態においては、免疫抑制性または免疫調節性の化合物はタクロリムス、シロリムス、ミコフェノレートモフェチル、ミゾルピン、デオキシスベルグアリン、ブレキナールナトリウム、レフルノミド、ラパマイシンまたはアザスピランである。

【0287】

本発明はまた本明細書に記載した抗体またはそのフラグメントのいずれかを含むキットを提供する。キットは例えば容器、パッケージまたはディスペンサーをラベルおよび投与または使用の説明書と共に包含することができる。

【0288】

本発明はまたCD154関連のヒトの疾患または障害を処置または防止する方法を提供する。一部の実施形態においては、方法は、CD154関連のヒトの疾患または障害が軽減または防止されるように、本明細書に記載した抗体またはそのフラグメントのいずれか、またはそれを含む組成物の処置または予防有効量をヒトに投与することを含む。本発明の目的のためには、「投与」とは当業者の知る抗体、抗体フラグメントまたは組成物を投与する標準的な方法のいずれかを意味し、本明細書に記載した例に限定されない。

【0289】

一部の実施形態においては、処置されるべき被験体は本明細書に開示した処置に適する疾患または状態を有することが予め診断されている。このような被験体はすなわち、処置が必要であると診断されている。あるいは、処置は特定の疾患または状態を処置するが、同時に他の未診断の状態も同様に処置することを意図してよい。

【0290】

疾患または障害に罹患している被験体の処置は標準的な方法を用いてモニタリングできる。一部の方法は例えば、薬剤の用量の投与の前に被験体の抗体のレベルまたはプロファイルのベースライン値を測定すること、および、これを処置後のプロファイルまたはレベルについての値と比較することを包含する。例えば、同じ試料の反復測定における実験誤差の典型的な限度より高値であるような有意な増大がレベルまたはプロファイルの値におけるこのような測定の平均からの1標準偏差として示されれば、正の処置結果（すなわち、薬剤の投与が所望の応答を達成した）の合図である。免疫応答の値が有意に変化しないか、低下した場合は、負の処置結果が示される。

【0291】

他の実施形態においては、レベルまたはプロファイルの平均および標準偏差のような対照値を対照集団に関して求める。典型的には、対照集団の個体は以前の投与を受けていない。次に治療剤を投与された後の被験体におけるレベルまたはプロファイルの測定値を対照値と比較する。対照値と比較して有意な増大、例えば平均値から1標準偏差より高値で

10

20

30

40

50

あるものは、正または十分な処置結果の合図となる。有意な増大または低下が存在しないことは、負または不十分な処置結果の合図となる。治療剤の投与は一般的に対照値と比較してレベルが増大し続けている間は継続する。以前の通り、対照値と比較して定常状態が達成されれば治療剤投与は中断するか、または用量および/または頻度を低減することができることを示している。

【0292】

他の実施形態においては、レベルまたはプロファイルの対照値、例えば平均および標準偏差は、治療剤の投与を受けており、そしてそのレベルまたはプロファイルが投与にตอบสนองして定常状態となった個体の対照集団から求める。被験体におけるレベルまたはプロファイルの測定された値を対照値と比較する。被験体における測定されたレベルが例えば対照値から有意に、例えば1標準偏差分、異なっていない場合は、処置は中断することができる。被験体におけるレベルが対照値より有意に低値であれば、薬剤の継続投与が補償される。被験体のレベルが対照値より低値に持続していれば、処置の変更が示される場合がある。

10

【0293】

他の実施形態においては、現在処置を受けていないが処置過程の前歴のある被験体の抗体のレベルまたはプロファイルをモニタリングすることにより処置の再開が必要であるかどうかを決定する。被験体において測定されたレベルまたはプロファイルを前の処置過程の後に被験体において以前に達成された値と比較することができる。同じ試料の反復測定における誤差の典型的な限度より高値であるような、以前の測定と比較した場合の有意な低下は処置を再開できることを示す。あるいは、被験体において測定された値を処置過程の後の被験体集団において測定された対照値（平均+標準偏差）と比較できる。あるいは、被験体において測定された値を、症状を有さないままでいる予防的投与被験体集団または疾患の特性の緩解を示している処置的投与被験体の集団における対照値と比較できる。これらの場合の全てにおいて、対照値と比較した場合の有意な低下、例えば標準偏差分を超えるものは、被験体において処置を再開するべきであることを示している。

20

【0294】

投与後の抗体プロファイルは典型的には抗体濃度の急速なピーク値の出現とその後の指数的減衰を示す。さらに投薬を行わない場合は、減衰は投与された抗体の半減期に応じて数日~数ヶ月の期間内に投与前のレベルに近づく。一部のヒト抗体の半減期の例は20日のオーダーである。

30

【0295】

一部の方法においては、被験体におけるある抗原に対する抗体のベースライン測定を投与前に行い、その後直ぐに第2の測定を行なうことによりピーク抗体レベルを測定し、そしてさらに1回以上の測定を間隔を置いて行うことにより抗体の減衰をモニタリングする。抗体のレベルがベースラインまたはベースラインを差し引いたピークの所定のパーセンテージ、例えば50%、25%または10%にまで減少した時点で、抗体の追加投薬を行う。他の実施形態においては、ピーク、およびその後測定された、バックグラウンドを差し引いたレベルを前に測定された比較対照レベルと比較することにより他の被験体における有益な予防的または処置的な投与の様式を構成する。測定された抗体レベルが比較対照レベルより有意に低値、例えば処置から利益を得る被験体の集団における比較対照値の標準偏差を平均値から差し引いたものより低値であれば、抗体の追加投与が指示される。

40

【0296】

別の実施形態は、障害の診断またはモニタリングのために研究者または医師が日常的に参考にしていくずれかの当該分野で認知された生理学的症状、例えば身体的または精神的な症状を処置の過程に渡ってモニタリングすることを包含する。

【0297】

他の実施形態においては、本明細書に開示した抗体またはそのフラグメントまたはそれを含む医薬組成物は被験体における免疫応答を抑制することができる。抗体、抗体誘導

50

体または医薬組成物は有効抑制量において被験体に投与する。抗体、抗体誘導体、例えばCD154結合フラグメントまたは医薬組成物の「有効抑制量」とは、それが投与される被験体においてCD154-CD40相互作用を抑制するために有効である任意の量である。「抑制量」を決定する方法は当該分野でよく知られており、例えば被験体が関与している型、被験体の体格および送達される治療剤を包含する要因により変動する。

【0298】

特定の実施形態においては、抗CD154抗体、抗体誘導体または抗体または抗体誘導体を含む医薬組成物はCD154分子に結合することができる。別の実施形態においては、抗CD154抗体、抗体誘導体または抗体または抗体誘導体を含む医薬組成物はCD154-CD40相互作用を抑制することにより免疫応答を抑制することができる。

10

【0299】

一部の実施形態においては抗CD154抗体、抗体誘導体または抗体または抗体誘導体を含む医薬組成物は炎症を抑制することができる。本発明の目的のためには、炎症応答は、浮腫および貪食性白血球遊走を伴う毛細管拡張の結果としての赤熱、腫脹、灼熱感と疼痛を特徴とする。炎症応答の一部の例は関節炎、接触性皮膚炎、高IgE症候群、炎症性腸疾患、アレルギー性喘息および特発性炎症疾患を包含する。関節炎の一部の例は慢性関節リウマチ、非リウマチ炎症性関節炎、ライム病に関連する関節炎および炎症性変形性関節症を包含する。特発性炎症性疾患の一部の例は乾癬および全身エリテマトーデスを包含する。本明細書に開示した化合物および/または組成物を用いて処置することができる別の疾患、障害および状態は例えばアテローム性動脈硬化症、重症筋無力症、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、真性糖尿病、クローン病、多発性硬化症および薬物誘発性自己免疫疾患、例えば薬物誘発性狼瘡を包含する。

20

【0300】

一部の実施形態においては、化合物および組成物は移植された器官、例えば移植された心臓、腎臓、肝臓、皮膚、膵島細胞および骨髄の被験体による拒絶を抑制するために使用できる。別の実施形態においては、化合物および組成物は移植片対宿主病、アレルギー性応答、例えば枯草熱またはペニシリンまたは他の薬剤に対するアレルギー、感染性疾患から誘導される自己免疫応答に罹患した被験体における自己免疫応答を抑制するため、または被験体における線維症を抑制するために使用できる。線維症の例は肺線維症および線維性疾患を包含する。肺線維症の例は、成人呼吸促進症候群に続発性の肺線維症、薬物誘発性肺線維症、特発性肺線維症または過敏性肺炎を包含する。線維性疾患の例はC型肝炎、B型肝炎、肝硬変、毒性傷害に続発性の肝硬変、薬物に続発性の肝硬変、ウイルス感染に続発性の肝硬変および自己免疫疾患に続発性の肝硬変を包含する。

30

【0301】

一部の実施形態においては、化合物および組成物は例えばライター症候群、脊椎関節炎、ライム病、HIV感染、梅毒および結核から誘導される自己免疫応答に罹患した被験体における自己免疫応答を抑制することができる。

【0302】

一部の実施形態においては、化合物および組成物は胃腸疾患、例えば食道運動障害、炎症性腸疾患および強皮症を抑制することができる。あるいは、化合物および組成物は脈管疾患、例えばアテローム性動脈硬化症および再灌流傷害を抑制できる。

40

【0303】

一部の実施形態においては、化合物および組成物はT細胞癌、例えばT細胞白血病およびリンパ腫に罹患した被験体におけるT細胞の腫瘍細胞の増殖を抑制できる。あるいは化合物および組成物はHTLV-Iウイルスによる被験体のT細胞のウイルス感染を抑制できる。

【0304】

一部の実施形態においては化合物および組成物はhu5c8により特異的に認識されるタンパク質を発現する被験体における腫瘍細胞または新生物性の細胞を画像化するために使用できる。被験体における腫瘍細胞または新生物性の細胞を画像化するための1つの方

50

法は、抗体または抗体フラグメントと腫瘍細胞または新生物性の細胞の表面上のタンパク質との間の複合体の形成を可能とする条件下に抗体またはそのフラグメントまたはそれを含む組成物の有効量を被験体に投与すること、および、形成したいずれかの抗体/タンパク質複合体または抗体フラグメント/複合体を画像化することにより被験体内のいずれかの腫瘍細胞または新生物性の細胞を画像化することを含む。

【0305】

一部の実施形態においては、化合物および組成物はh u 5 c 8により特異的に認識されるタンパク質を発現する被験体における腫瘍細胞または新生物性の存在を検出するために使用できる。被験体における腫瘍細胞または新生物性の存在を検出するための1つの方法は、抗体または抗体フラグメントとタンパク質との間の複合体の形成を可能にする条件下に抗体または抗体フラグメントまたはそれを含む組成物の有効量を被験体に投与すること、被験体から未結合の画像化剤を浄化すること、および、形成された抗体/タンパク質複合体または抗体フラグメント/複合体の存在を検出することを含み、このような複合体の存在は被験体内の腫瘍細胞または新生物性の細胞の存在を示す。

10

【0306】

抗体またはそのフラグメントおよびそれを含む組成物は、処置の1日において投与される外来性抗原のような短時間に被験体が曝露される抗原に対する免疫応答を防止することのような特定の適応症のための単回用量として投与できる。このような処置の例は、治療剤、例えば抗原性医薬品、アレルゲンまたは血液製剤または遺伝子療法ベクターと共に本発明の抗体または抗体誘導体を同時投与することを包含する。移植された組織に対する、または、長期的に投与される抗原性医薬品に対する免疫反応を制御する場合のように抗原が長期的に存在する適応症においては、本発明の抗体、抗体誘導体または医薬組成物は、数日から数週間、乃至は被験体の生涯に渡る医療上指示される程度の長期間に渡って間隔を置いて投与される。

20

【0307】

一部の実施形態においては上記した方法により処置できる被験体は動物、例えば哺乳類、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（ラット、マウス、ハムスターおよびモルモットを包含する）、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌおよびネコである。大部分の例においては、哺乳類はヒトである。

【0308】

本発明はまたC D 1 5 4に関連するヒトの疾患または障害を処置するために本明細書に記載したペプチドまたはそのフラグメント、または抗体またはそのフラグメントのいずれかの使用を提供する。

30

【0309】

本発明はまたC D 1 5 4に関連するヒトの疾患または障害の処置のための医薬の製造における本明細書に記載したペプチドまたはそのフラグメント、または抗体またはそのフラグメントのいずれかの使用を提供する。

【0310】

本明細書に開示した実施形態は以下の実施例に基づいてより良好に理解される。しかしながら、考察する特定の方法及び結果は後に記載する本発明の実施形態においてより詳細に説明されている通り本発明を説明しているに過ぎないことは当業者の知る通りである。

40

【0311】

出願を通じてカッコ内において種々の公開物および参考文献を参照している。これ等の公開物および参考文献の開示内容は、その全体において、本発明が関わる技術の現況をより詳細に説明するために本出願に参照により組み込まれる。材料、方法及び実施例は説明的なものに過ぎず、限定する意図はない。

【0312】

当業者の知る組み換えDNA技術の一般的原則を説明している標準的な参考研究は、A u s u b e l e t a l . , C u r r e n t P r o t o c o l s I n M o l e c

50

ular Biology, John Wiley & Sons, New York (1988 and Supplement to 2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989); Kaufman et al., Eds., Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine, CRC Press, Boca Raton (1995); McPher-son, Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991)を包含する

10

【0313】

当業者の知る免疫学の一般的原則を説明している標準的な参考研究は、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1999); および Roitt et al., Immunology, 3d Ed., Mosby-Year Book Europe Limited, London (1993)を包含する。当業者の知る医学的生理学および薬理学の一般的原則を説明している標準的な参考研究は、Fauci et al., Eds./ Harrison's Principles Of Internal Medicine, 14th Ed., McGraw-Hill Companies, Inc. (1998)を包含する。

20

【実施例】

【0314】

実施例を通して、特段の記載が無い限り、以下の材料および方法を用いた。以下の実施例は本発明の方法および生成物を説明するものである。当業者の知る分子生物学で通常遭遇する記載した条件およびパラメーターの適当な変更および適合は本発明の精神および範囲に包含される。

【0315】

一般的に本発明の実施では特段の記載が無い限り、化学、分子生物学、組み換えDNA技術、免疫学（特に例えば抗体技術）および電気泳動における標準的な手法を用いる。例えば Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); および Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992)を参照できる。

30

40

【0316】

(実施例1: 抗体設計)

本明細書に記載した方法を用いて至適化された抗体（またはその抗原結合フラグメント）を得たが、当業者の知る他の方法も制限無く使用できる。コンピューター分析に基づき、所定の抗体内において、至適化された抗体-抗原複合体内の電荷分布と元の抗体-抗原複合体内のそれとの間に差（差が大きいほど、有意性が高値である）が有る位置を発見することができる。このような電荷分布の差はまた溶媒中で抗原に結合した場合の抗体の結

50

合自由エネルギーの変化にも関連する。次にそのような位置におけるアミノ酸残基を、元の抗体の静電気力が至適化抗体におけるものにより近似する（または別の実施形態においてはより発散した形態となる）ように変化させることにより、溶媒中で抗原に結合した場合の抗体の結合自由エネルギーを調節することができる。抗体に対する変化の導入は本明細書に記載した、そして、参照により本明細書に組み込まれる国際出願 P C T / U S 0 4 / 2 4 2 0 0 に記載された一連の個別の基準または規則に従う。

【 0 3 1 7 】

(1 . 向上した機能のために抗体を修飾する場合の規則)

抗体を修飾する場合の規則は以下の通り適用した。抗体の抗原結合親和性を、例えばその結合を向上または復活させるために調節するには、基本的な配列および/または構造のデータをまず獲得する。静電的電荷至適化の手法を次に適用することにより向上した親和性の変異体を示唆した。典型的には、静電的電荷至適化をまず用いて結合のためには至適未満である C D R 残基の位置を決定した (Lee et al., J. Chem. Phys., 1997, 106, 8681 - 8690; Kangas et al., J. Chem. Phys., 1998, 109, 7522 - 7545)。次に1つ以上の C D R 変異 (すなわち、修飾) をさらにコンピューター分析に付す。これらの計算に基づいて、次に、本発明の規則にしたがって1つ以上の修飾を有する修飾された抗体のサブセットについて結合親和性を測定した。

10

【 0 3 1 8 】

連続体静電気モデルを用いて、静電的電荷至適化を抗体 C D R のアミノ酸の各側鎖に対して実施した。電荷至適化は原子の中心における電荷を与えるが、実際の変異を常時もたらずわけではない。従って、電荷至適化の過程は目的の位置における天然の側鎖の特性を示すように強いる種々の制約事項と共に実施した。例えば至適化は、実質側鎖電荷 - 1、0 および + 1 について、原子の電荷が特定の値、例えば 0 . 8 5 電子の電荷単位を超えないという追加の制約事項と共に実施した。次に、候補のアミノ酸側鎖位置およびそれらの位置における残基の修飾を、至適化において観察された静電的結合自由エネルギーの潜在的獲得に基づいて測定した。

20

【 0 3 1 9 】

ネイティブの残基から完全に非荷電の側鎖同配体、例えば同じ形状を有するが原子上に電荷を有さないか、または部分的に電荷を有するものへの移行における結合自由エネルギーの差 (k c a l / m o l) を計算した。負の数は結合親和性の予測増大を示す。実質側鎖電荷が + 1、0 および - 1 である至適電荷分布を用いて結合自由エネルギーの差を計算した。

30

【 0 3 2 0 】

結合自由エネルギーの差が望ましく ($G < - 0 . 2 5 \text{ k c a l / m o l}$)、そしてネイティブの残基から完全非荷電側鎖同配体、例えば同じ形状を有するが原子上に電荷を有さないか、または部分的に電荷を有する残基への変遷を伴っている場合、非極性側鎖を有するアミノ酸、例えば A l a、C y s、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、V a l のセットからの修飾を選択した。

【 0 3 2 1 】

側鎖における至適電荷分布および - 1 の実質側鎖電荷から得ることができる結合自由エネルギーの差が良好である ($G < - 0 . 2 5 \text{ k c a l / m o l}$) 場合には、負荷電の側鎖を有するアミノ酸、例えば A s p、G l u のセットからの修飾を選択した。

40

【 0 3 2 2 】

同様に、側鎖における至適電荷分布および + 1 の実質側鎖電荷から得ることができる結合自由エネルギーの差が良好である ($G < - 0 . 2 5 \text{ k c a l / m o l}$) 場合には、正荷電の側鎖を有するアミノ酸、例えば A r g、H i s、L y s のセットからの修飾を選択した。

【 0 3 2 3 】

最後に、側鎖における至適電荷分布および 0 の実質側鎖電荷から得ることができる結合

50

自由エネルギーの差が良好である ($G < -0.25 \text{ kcal/mol}$) 場合は、非荷電の極性の側鎖を有するアミノ酸、例えば Asn、Cys、Glu、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr に Cys、Gly、Met および Phe が付加されたもののセットからの修飾を選択した。

【0324】

本明細書に記載したとおり、設計された修飾抗体をインシリコで構築し、そして結合エネルギーを再計算した。修飾された側鎖は、各側鎖につき最も望ましい位置を決定するための60度の二面角増分を用いてCHARMMにおけるロータマー二面角スキャンを実施することにより構築した。次に結合エネルギーを野生型(親)および変異体(修飾)の複合体につき、ポアソン-ボルツマンの静電エネルギーおよびファンデルワールスエネルギーおよび埋没表面積に関する別の項を用いながら計算した。

10

【0325】

次にこれ等のコンピューター変法による計算の結果を例えばインシリコまたは別の実験的構造/機能データに基づいた方法の次回反復の後に必要に応じて再評価した。

【0326】

規則は以下の通り分類できる幾つかの予測を可能にする。

1) 結合により部分的に埋没する抗体上の残基の関与する相互作用界面における修飾(相互作用は抗原との水素結合を作成することにより向上する);

2) 結合により埋没するため脱溶媒のペナルティーを支払うが抗原とは直接の静電的相互作用を示さない抗体上の極性残基の修飾(野生型残基と同様の形状を有する疎水性の残基を修飾することによるか、または、良好な静電的相互作用を示すことができる残基を負荷することにより、通常は向上がもたらされる); および、

20

3) 非相補性の電位の領域にある抗体上の表面残基の修飾。これ等の修飾は結合界面における充填相互作用を混乱させることなく抗体と抗原の間の長距離の静電的相互作用を向上させると考えられる。

【0327】

第1の型の修飾は、これ等の残基が抗原の充足していない水素パートナーとの水素結合を本質的に作ることから、基本的な物理/化学の問題を精査することにより求められる。他の方法とは異なり、本発明の規則は脱溶媒のコストが有益な相互作用エネルギーを相殺できるようにする意外な残基修飾を可能にしている。

30

【0328】

第2の型の修飾は、獲得エネルギーが主に良好ではない脱溶媒を排除しつつ非極性の相互作用を維持する結果であることから、さらに別のセットの修飾を示している。

【0329】

第3の型の修飾は、親和性における有意な獲得の可能性を示す長距離の相互作用に関わる。これらの型の修飾は、それらが抗原との直接の接触を行わないため、抗体-抗原界面における繊細な相互作用における混乱を小さくするため、特に興味深いものである。

【0330】

従って、所望の側鎖の化学的特徴を規則に従いながら候補アミノ酸位置について求められた場合には、残基の位置は例えば本明細書にさらに説明する通り、置換、挿入または欠失により修飾または改変した。

40

【0331】

抗体修飾に関する上記規則のほかに、特定の決定事項、例えば溶媒の作用も、至適電荷分布の初回(およびその後の)計算の因数に組み入れることができる。

【0332】

(2. 抗体またはその抗原結合フラグメントの取得)

天然に存在しない抗体(またはその抗原結合フラグメント)を作成することを目標とした本発明の方法は、必須ではないが、抗体を取得することから始まる。その抗体は本明細書においては「親」抗体、または場合により「第1」抗体と称し、そして、それを用いることにより、その抗体内(例えば親抗体内)または親抗体の配列と同様であるかその一部

50

を含有する配列を有する修飾または改変された抗体内のいずれかでアミノ酸残基1つ以上を修飾または改変することが可能となるような情報を得ることができる。本明細書に記載する通り、例えば親抗体のCDR（またはその部分）の1つ以上を標準的な遺伝子操作手法により修飾された抗体の相当するCDRと置き換えることにより、いわゆるCDR移植または移植物を達成した。従って、哺乳類のモノクローナルまたはポリクローナル抗体（例えばネズミまたは霊長類）、キメラ、CDR移植、ヒト化またはヒトの抗体を用いて方法を開始した。

【0333】

親抗体は当該分野で認知されている入手元から得るか、または、当該分野で認知されている技術に従って作成した。例えば親抗体は別の原料または種、例えばネズミから誘導されたCDR領域を有するCDR移植またはヒト化抗体であった。

10

【0334】

本発明の親抗体またはいずれかの修飾された抗体はまたモノクローナル抗体の様式であることができる。モノクローナル抗体を作成するための方法は当該分野で知られているもの（例えばKohler and Milstein, Nature, 1975, 256, 495-497参照）並びにミエロマ細胞内に免疫グロブリンコードDNAを安定に導入するための手法（例えばOiet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 825-829; Neuberger, EMBO J., 1983, 2, 1373-1378; およびOchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 6351-6355参照）である。これ等の手法は、インビトロ変異誘発およびDNAトランスフェクションを含んでおり、組み換え免疫グロブリンの構築を可能にし；これ等の手法を用いて本発明の方法において使用される親および修飾抗体を製造、またはこれ等の方法から得られる修飾抗体を製造することができる。あるいは、親抗体を市販品の供給元から入手することができる。抗体フラグメント（scFvおよびFab）はまたE. coliから製造することもできる（製造方法および細胞の宿主はさらに後に記載する）。

20

【0335】

親抗体はIgA、IgD、IgE、IgGまたはIgMのクラスの抗体であることができる。

【0336】

上記した通り、本発明の方法は4量体抗体のみ以外にも適用できる（例えばGクラスの免疫グロブリン（IgG）の構造を有する抗体）。例えば抗体を修飾する方法はいずれかの抗体の抗原結合フラグメントを用いても同様に実施できる。フラグメントは組み換え的に製造することができ、そして、タンパク質分解酵素で抗体を消化することにより、操作、合成または製造することができる。例えば、フラグメントはFabフラグメントであることができ；パインで消化することにより、2つの重鎖を連結している、鎖間（例えばV_H-V_Hなど）ジスルフィド結合の前の領域において抗体を切断する。これにより軽鎖および重鎖のV_HおよびC_H1のドメインを含有する2つの同一のフラグメントが形成される。あるいは、フラグメントはF(ab')₂フラグメントであることができる。これ等のフラグメントは鎖間ジスルフィド結合の後の重鎖を切断し、両方の抗原結合部位を含有するフラグメントをもたらすペプシンで抗体を消化することにより作成できる。さらに代替法としては「1本鎖」抗体を使用することである。1本鎖Fv(scFv)フラグメントは種々の方法で構築できる。例えばV_H鎖のC末端をV_L鎖のN末端に連結することができる。典型的には、リンカー（例えば(GGGGS)₄）をV_HとV_Lの間に入れる。しかしながら、鎖を連結できる順番は反転させることができ、そして検出または精製を容易にするタグ（例えばMyc-、His-、またはFLAG-タグ）を含ませることができる（これ等のようなタグは本発明のいずれかの抗体または抗体フラグメントに付随させることができ；それらの使用はscFvに限定されない）。従って、後述する通り、タグ付けされた抗体は本発明の範囲に包含される。別の実施形態においては、本明細書に記載した方法において使用される、またはそれらの方法により作成された抗体は、重鎖2量

30

40

50

体または軽鎖 2 量体であることができる。さらにまた、抗体の軽鎖または重鎖またはその部分、例えば単ドメイン抗体 (D A b) を使用することができる。

【 0 3 3 7 】

本発明の方法は反復可能であるため、親抗体は天然に存在する抗体でなくてもよい。抗体を修飾する方法は必要な限り多数回反復できるため、原料抗体 (またはその抗原結合フラグメント) は完全に非ヒトであるか、または、ヒト F R および非ヒト (例えばネズミ) C D R を含有する抗体であることができる。すなわち、「親」抗体は親和性を向上させるために本発明の方法に付される C D R 移植抗体、例えば親和性成熟抗体であることができる。上記した通り、親和性は、単に、それが天然に存在するヒト抗体 (F R ドナー) のその抗原に対する親和性と概ね同様となる (または有意に不良とはならない) 程度まで向上させられ得る。すなわち、「親」抗体はむしろ、修飾の 1 回以上のより初期のラウンドにより作成された抗体、例えば 1 種より多い配列 (例えばヒトの F R および非ヒトの C D R) を含有する抗体であってよい。本発明の方法は 1 つ以上の非ヒト (例えばネズミ) 由来の C D R およびヒト抗体の F R を含む「親」抗体の使用を包含する。あるいは、親抗体は完全にヒトのものであることもできる。

10

【 0 3 3 8 】

構造が入手可能であれば、当然ながら、(それを再度作成するのではなく) その構造からコンピューター分析を開始してよい。

【 0 3 3 9 】

(3 . 抗体 - 抗原の構造データの情報に基づく本発明の方法)

20

タンパク質は、そのアミノ酸の配列により、そして所定のタンパク質 (またはタンパク質含有複合体) が提供される溶媒により決定される 3 次元構造に折りたたまれることが解っている。タンパク質の 3 次元構造はその生物学的活性および安定性に影響し、その構造は多くの方法において決定または予測することができる。一般的に、経験的な方法は物理的・生化学的分析を使用する。あるいは、3 次構造は既知 3 次元構造を有する 1 つ以上の相同タンパク質 (またはタンパク質複合体) の 3 次元構造のモデル構築を用いて予測することができる。X 線結晶分析はおそらくはタンパク質構造を決定する最良の既知方法 (従って、「結晶構造」という用語は「構造」という用語の代わりに用いてよい) であるが、推定はまた円偏光二色性、光散乱を用いて、または、放射エネルギーの吸収および発光を測定することにより行うこともできる。他の有用な手法は中性子回折および核磁気共鳴 (N M R) を包含する。これ等の方法の全ては当該分野でよく知られており、そして標準的なテキストブック (例えば *Physical Chemistry*, 4th Ed., W . J . Moore, Prentiss - Hall, N . J ., 1972 または *Physical Biochemistry*, K . E . Van Holde, Prentiss - Hall, N . J ., 1971)) および多くの公開物において十分説明されている。これ等の手法のいずれかを実施することにより抗体または抗体 - 抗原含有複合体の構造を決定することができ、次にこれを本発明の方法に従って分析し、そして例えば本発明の方法の 1 つ以上の工程に情報提供することができる。

30

【 0 3 4 0 】

同様にこれ等および類似の方法は例えば単鎖抗体、F a b フラグメント等からなるフラグメントを含む抗体フラグメントに結合した抗原の構造を得るために使用できる。抗体、抗体フラグメントまたは s c F v - 抗原複合体の結晶を形成するための方法は例えば *van den Elsen et al.* (参照により本明細書に組み込まれる *Proc . Natl . Acad . Sci . USA*, 1999, 96, 13679 - 13684) により報告されている。

40

【 0 3 4 1 】

(4 . コンピューター分析)

本発明の方法を実施する際に使用される基本的なコンピューター方式は例えば参考として全体が本明細書中で援用される米国特許第 6, 230, 102 号に記載されている。

【 0 3 4 2 】

50

上記した通り、好ましくは本明細書に記載した個別の基準または規則に従って、抗体とそれが結合する抗原との間の静電気力のコンピューター分析の結果に応じて抗体を改変（または「修飾」）する。コンピューター分析は抗体内の至適電荷分布を予測可能とし、そして、コンピューターシステムにおいて電荷分布を示す1つの方法は多重極のセットとして示すことである。あるいは、電荷分布は抗体の原子の位置に存在する点電荷のセットにより表すことができる。電荷分布（好ましくは至適電荷分布）を求めた後、電荷分布に合致、またはより高度に合致するように抗体を調節することができる。

【0343】

コンピューター分析は米国特許第6,230,102号に記載された計算を実施するコンピューター実行プロセスにより媒介してよい。コンピュータープログラムは本明細書においては抗原-抗体結合の現実の状況を考慮するように適合させる（そして他の方法とは異なり、本発明の方法は、溶媒中の抗体とその抗原の間の結合における例えば溶媒、長距離の静電気、および誘電効果を考慮する）。プロセスは、成熟した抗体とその抗原の間の結合自由エネルギーへの静電気の寄与を、未修飾の（「原料」または「親」）抗体のものと比較して最小限にする「成熟した」抗体上への電荷分布を達成する。典型通り、本明細書に記載したオペレーションを実施するコンピューターシステム（またはデバイス）（およびより詳細には米国特許第6,230,102号）はユーザーに情報をディスプレイするアウトプットデバイスを含む（例えばCRTディスプレイ、LCD、プリンター、通信デバイス、例えばモデム、オーディオアウトプット等）。さらにまた、部分的または全体的に方法を実施するための説明書を、説明書を実施するための電子デバイス内における使用に適する媒体に付与することができる。すなわち、本発明の方法はソフトウェア（例えばコンピューターリーダブルの説明書）およびハードウェア（例えばコンピューター、ロボットおよびチップ）を含む高スループットの方法に改良することができる。コンピューター実行プロセスは特定のコンピュータープラットフォーム、特定のプロセッサ、または特定のハイレベルなプログラミング言語に限定されない。

【0344】

有用なプロセスは例えば米国特許第6,230,102号に記載されており、そしてより詳細な解説は例えばLee and Tidor (J. Chem. Phys., 1997, 106, 8681-8690)に記載されており、これ等はともに参照により本明細書に組み込まれる。

【0345】

（5. 構造に基づくコンピューター設計方法）

抗体のその抗原への親和性を向上させるための例示される方法は構造に基づくコンピューター設計方法である。このような方法の1つはデッドエンド排除アルゴリズムを用いた側鎖リパッキングとして知られている（例えばLasters et al., Protein Eng., 8, 815-22; Looger et al., J. Mol. Biol., 307, 429-45; Dahiyat et al., Protein Sci., 5, 895-903参照）。このような計算において、抗体残基は20個の天然に存在するアミノ酸のいずれかにコンピューター処理により同時に変異され、そして、得られた変異体の親和性もコンピューター処理により評価する。コンピューター処理により作成された変異体のリストは変異体の計算された安定性により分類することができ、これにより、実験的に発現されることになる変異体のリストが作成される。計算においては、タンパク質骨格の可撓性は殆ど、または全く許されず、これにより設計された変異体が所定のCDRコンフォメーションと共に安定であること予測されることを確保する。すなわち、コンピューター分析によりその抗原への親和性を増強する抗体の変異を予測することが可能となる。

【0346】

（6. 抗体およびその抗原結合フラグメントの作成）

抗体、例えばキメラ、ヒト化、モノクローナルおよび単鎖抗体の選択、クローニングおよび製造は当該分野でよく知られている。さらにまた、hu5c8mAbのヒト化は以前

に報告されている (Lederman S et al., J Exp Med. 1992, Apr 1; 175 (4): 1091-101 および Karpusas M et al., Structure (Camb). 2001 Apr 4; 9 (4): 321-9 をそれぞれ参照できる)。この抗体は ATCC (PTA-4931) より入手可能である。5c8 抗体は NS0 ミエローマ細胞中で安定に発現され、そしてプロテイン A およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGE および分析用ゲル濾過クロマトグラフィーによればタンパク質は期待されたジスルフィド結合 4 量体を形成していたことが解った。本発明の単鎖抗体は典型的には E. coli 中で発現させ、標準的手法を用いて免疫精製した。

【0347】

(7. 5c8 Fab の製造)

二重シストロンプラスミド pBEF064 により 5c8 Fab を発現させた。第 1 のシストロンは 118 アミノ酸重鎖可変領域をコードする 5c8 重鎖の 354 ヌクレオチドとそれにインフレームで続くヒト IgG1 定常ドメインの最初の 102 アミノ酸をコードする 306 ヌクレオチドおよび 6 ヒスチジンタグをコードする 18 ヌクレオチドを含有している。第 2 のリボソーム進入部位は重鎖シストロンの末端の 7 ヌクレオチド後に位置している。第 2 のシストロンは 111 アミノ酸 5c8 軽鎖可変領域をコードする 333 ヌクレオチドとそれにインフレームで続く 107 アミノ酸軽鎖定常ドメインをコードする 321 ヌクレオチドを含有している。発現は E. coli 中で行い、ara-BAD プロモーターにより駆動し、そして重鎖および軽鎖は OmpA (重鎖) および PhoA (軽鎖) ペリプラズム局在シグナルによりペリプラズム空間に指向させる。ペリプラズム局在シグナルはペリプラズム移出の間にタンパク質から切断された。

【0348】

(8. 結合試験)

結合試験は典型的には KinExATM キットを用いて実施した。試験はキット内に与えられたカラムに抗体 (または抗原結合フラグメント) の希釈溶液を通過させることにより実施し、そして、抗体 (またはその抗原結合フラグメント) の一部がビーズ上の抗原と相互作用する。次に抗体 (またはそのフラグメント) を、蛍光染料 Cy5 と結合体化した 二次抗ヒト IgG 重鎖および軽鎖抗体によって 検出した (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA)。

蛍光染料からのシグナルがタンパク質濃度に比例するように抗体 (またはそのフラグメント) の濃度を設定した。相互作用の溶液相の親和性を得るために、抗体 (またはそのフラグメント) を可溶性抗原の連続希釈物と混合した。これ等のタンパク質 (抗体および抗原) を室温における 3 時間インキュベーションまたは 4 における一夜インキュベーションの間に平衡に達するようにした。混合物を抗原含有カラム上に流し、そしてシグナルは溶液中に残存する未結合の抗体 (または抗体フラグメント) の量に比例していた。得られたデータを直線 - 対数グラフ用紙にプロットし、そして KD の値を与える非直線回帰による二次曲線にフィットさせた。

【0349】

(9. 5c8-CD154 結合試験)

ELISA 系の競合的結合試験を実施した。抗 c-myc mAb を室温で 2 時間 PBS 中 10 μg/ml で NUNC Maxi sorb プレート上にコーティングした。未標識の 5c8 Fab (変異体または野生型) の連続希釈物を作成し、等容量の固定濃度 (30 ng/ml) のビオチン標識 5c8 Fab 競合体と混合し、プレートに添加した。室温で 2 時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、結合したビオチン標識 5c8 Fab 競合体をストレプトアビジン-HRP で検出した。結合親和性は 4 パラメーター曲線フィットにより求めた。

【0350】

(実施例 2: 抗体)

(1. 抗体の作成)

hu5c8mAbの選択、クローニングおよびヒト化は以前に報告されている。Lederman S et al., J Exp Med. 1992, Apr 1; 175(4): 1091-101およびKarpusas M et al., Structure (Camb). 2001 Apr 4; 9(4): 321-9をそれぞれ参照できる。hu5c8mAbハイブリドームはATCC (HB10916)により入手可能である。

【0351】

(2. CD154結合試験)

FACS系の競合的結合試験をATCC (CRL-10915)より入手可能なhuCD154+D1.1細胞において実施した。細胞表面CD154への0.1mg/mlのビオチン化hu5c8mAbの結合をhu5c8mAbまたは他の抗体の滴定物に対して競合させた。細胞結合ビオチン化hu5c8mAbをstreptavidin-フィコエリスリン(PE)を用いて検出した(BD-PharMingen San Diego, CA, USA)。相対的な結合親和性は4パラメーター曲線フィットのIC50値から推定した。

10

【0352】

(3. CD154-Fc R結合試験)

Fc R結合親和性は、抗原とFc R担持細胞(後述)の間の「架橋」を形成する抗体の能力に基づいた試験を用いて測定した。Fc RI (CD64)架橋形成試験はPBS中1mg/mlの組み換え可溶性ヒトCD154 (Biogen, Karpusas M et al., Structure. 1995 Dec 15; 3(12): 1426)で4-一夜96穴MaxisorbELISAプレート(Nalge-Nunc, Rochester, NY, USA)をコーティングすること、および、次いで、PBS中1%BSAでブロッキングすることにより実施した。次に抗体の滴定物を37°Cで30分間CD154に結合させ、プレートを洗浄し、そして蛍光標識U937 (CD64+)細胞の結合を測定した。U937細胞は10%FBS、10mM HEPES、L-グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを有するRPMI培地中で育成させ、1:2にスプリットし、そして試験前の1日間1000単位/mlのIFN-γで活性化し、Fc RIの発現を増大させた。

20

【0353】

Fc RII (CD16)架橋形成試験は、CD16でトランスフェクトした蛍光標識Jurkat細胞(寄贈元: Dana Farber Institute, Boston, MA, USA)のmAb依存性結合の測定と共に、96穴組織培養プレート(Corning Life Sciences Acton, MA, USA)中に生育させたCD154発現チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Biogen)の単層を用いて実施した。CHO-CD154+細胞を 1×10^5 個/mlで96穴プレートに播種し、10%透析FBS、100nMメトトレキサート、L-グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを添加したMEM中でコンフルエントとなるまで生育させた(全試薬の入手元: Gibco-BRL Rockville, MD, USA)。10%FBS、400mg/mlゲネチシン、10mM HEPES、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI中(全試薬の入手元: Gibco-BRL)で生育させたCD16+Jurkat細胞を試験実施前1日に1:2にスプリットした。

30

40

【0354】

Fc RIおよびFc RIIレセプターの両方の試験において、Fcレセプター担持細胞は37°Cで20分間、2', 7'-ビス-(2-カルボキシエチル)-5-(および-6)-カルボキシフルオレセインアセトキシメチルエステル(BCECF-AM) (Molecular Probes Eugene, OR, USA)で標識した。過剰のBCECF-AMを除去するために洗浄した後、 1×10^5 個の標識細胞を37°Cで30分間試験中インキュベートした。未結合のFc R+細胞を数回洗浄して除去し、プレートを、励起波長485nmおよび発光波長530nmを用いてCytofluor235

50

0 蛍光マイクロプレートリーダー (Millipore Corporation Bedford, MA, USA) 上で読み取った。

【0355】

(実施例3: 抗CD154抗体の抗原結合親和性の向上)

本実施例においては処置上関連する抗原標的に対する抗体の結合親和性を向上させるための方法を記載する。

【0356】

免疫学的応答の媒介に關与するタンパク質のTNFファミリーのメンバーであるヒトCD154に対する抗体(例えば Yamada et al., Transplantation, 2002, 73, S36-9; Schonbeck et al., Cell. Mol. Life Sci., 2001, 58, 4-43; Kirk et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Sci., 2001, 356, 691-702; Fiumara et al., Br. J. Haematol., 2001, 113, 265-74; および Biancone et al., Int. J. Mol. Med., 1999, 3, 343-53 参照)をマウスの親和性成熟化により成育させた。5c8モノクローナル抗体をこの試験から開発し、CD154により媒介される病理学的過程を抑制することを測定した。

【0357】

親和性5c8/CD154相互作用を増大させる試みにおいて、静電的電荷至適化の手法を、向上した親和性の変異体を示唆するための2レベル操作法において、抗体-抗原複合体の結晶構造に適用した。第1に、静電的電化至適化を用いて結合のためには至適未満であるCDR残基の位置を決定した(Lee and Tidor, J. Chem. Phys., 1997, 106, 8681-8690; Kangas and Tidor, J. Chem. Phys., 1998, 109, 7522-7545)。第2にCDR変異のセットをさらにコンピューター分析するために求めた。これらの計算に基づいて、単一の変異を有する23個の修飾抗体(すなわち、23個の「単一変異体」)について結合親和性をコンピューター処理により調べた。単一変異体のうち8つが静電エネルギーの項目および完全なエネルギー機能の項目、例えばファンデルワールスエネルギーの項目および溶媒接触性表面積の項目の双方において野生型抗体より良好であることが予測された。これ等の項目は静電気力には無関係であるが、それらを計算することにより、設計された変異が他の残基に接触せず、そして埋没表面積の量を有意に低減しないことを確実なものとし; すなわち、複雑な形態の増大した埋没表面積は通常は有利である(下記の表の「全エネルギー」のコラムを参照)。

【0358】

電荷至適化の結果に基づいて、変異をコンピューター分析のために測定した(至適電荷分布および現在の残基よりも至適状態により近い設計変異を調べ; このプロセスは検査により行った)。電荷至適化は原子中心の電荷を与えたが、実際の変異はもたらさなかった。電荷至適化の1ラウンドは天然の側鎖の特性を示すように強いる種々の制約事項と共に実施した。例えば至適化は、実質側鎖電荷-1、0および+1について、原子の電荷が0.85電子の電荷単位の絶対値を超えないという追加の制約事項と共に実施した。

【0359】

CD154/5c8複合体(PDBコード: 1I9R)の結晶構造をプログラムCHARMM(Accelrys, Inc., San Diego, CA)と共に、水素を付加するための標準的操作法を用いて作成した。N-アセトアミドおよびN-メチルアミドのパッチをそれぞれN末端およびC末端に適用した。連続体静電気モデルを用いて、静電的電荷至適化をACQ2抗体CDRのアミノ酸の各側鎖に対して実施した。次に至適化において観察された静電結合エネルギーの潜在的獲得に基づいて適切な側鎖変異を決定した。側鎖は各側鎖につき最も望ましい位置を決定するための60度の二面角増分を用いてCHARMMにおけるロータマー二面角スキャンを実施することにより構築した。次に結合エネルギーを野生型および変異体の複合体につき、ポアソン-ボルツマンの静電エネルギー

およびファンデルワールスエネルギーおよび埋没表面積に関する別の項を用いながら計算した。

【0360】

ヒト化中和抗体(5c8)のFabフラグメントと複合体化したCD40リガンドの結晶構造はpH6.50において3.1 まで解った。CD154は天然では3量体であるため、複合体には3つの5c8Fab分子および5つのCD154分子が存在する。これ等は3つの独立したCD154/5c8界面を複合体中に形成する。亜鉛(Zn)原子は5c8Fabの各々に結合しており、そしてそれは計算に使用した。計算は3つの界面に対して独立して実施し、全3部位に関して野生型より良好であることがわかったアミノ酸置換を利用した。

10

【0361】

以下の表は3種全ての5c8分子の軽鎖におけるCDR可変ループ1に関して得られた至適化の結果を示している。Mut(変異エネルギー)のコラムはネイティブの残基から完全に非荷電の側鎖同配体、例えば同じ形状を有するが原子上に電荷または部分的電荷を有さない残基への移行における結合自由エネルギーの差(kcal/mol表示)に相当する。負の数は結合親和性の予測増大を示す。Opt-1のコラムは側鎖における至適電荷分布および実質側鎖電荷-1を用いて得ることができる結合自由エネルギーの差に相当する。Opt0およびOpt1のコラムは実質電荷がそれぞれ0および+1である至適電荷を用いた場合の結合自由エネルギーの差に相当する。これ等の結果および構造の目視による検査に基づき、これ等の結合自由エネルギーの向上を有効利用する変異を設計する。

20

【0362】

(表1-5c8CDR軽鎖可変ループ1について得られた至適化結果)

【0363】

【表1】

鎖残基	Mut	Opt-1	Opt0	Opt1
1L 24 ARG	-0.11	0.17	-0.11	-0.37
1L 26 SER	-0.06	-0.59	-0.06	0.57
1L 27 GLN	0.21	-1.21	-0.95	-0.26
1L 28 ARG	0.11	-0.96	-0.71	-0.40
1L 30 SER	-0.01	-0.14	-0.42	-0.47
1L 31 SER	-1.23	3.88	-2.16	-0.42
1L 32 SER	1.45	0.91	-0.65	-0.67
1L 33 THR	-0.02	-0.66	-0.41	0.07
1L 34 TYR	-0.25	-1.00	-1.10	-0.80
1L 35 SER	-0.02	0.00	-0.11	0.04
1L 36 TYR	0.01	-0.95	-1.31	1.74

30

40

50

1L 38 HSD	-0.15	-0.48	-0.70	-0.62	
2L 24 ARG	-0.46	-1.04	-0.46	0.13	
2L 26 SER	-0.29	-1.60	-0.79	0.19	
2L 27 GLN	0.26	-0.88	-0.41	0.35	
2L 28 ARG	-0.59	-0.94	-0.46	0.08	10
2L 30 SER	0.08	-0.38	-0.55	-0.42	
2L 31 SER	-0.98	4.04	-1.89	-0.54	
2L 32 SER	0.74	2.31	-0.86	-0.87	
2L 33 THR	0.00	-0.65	-0.38	0.09	
2L 34 TYR	-0.09	-0.62	-0.48	-0.12	
2L 35 SER	0.09	0.02	0.09	0.18	
2L 36 TYR	0.10	-1.70	-1.24	2.37	20
2L 38 HSD	-0.23	-1.20	-1.17	-0.79	
3L 24 ARG	-0.35	-0.34	-0.35	-0.35	
3L 26 SER	-0.27	-1.23	-0.53	0.27	
3L 27 GLN	0.11	-1.07	-0.71	-0.08	
3L 28 ARG	-0.30	-0.85	-0.30	0.15	30
3L 30 SER	0.03	0.02	-0.29	-0.36	
3L 31 SER	-1.06	4.02	-2.03	-0.90	
3L 32 SER	0.82	1.18	-0.85	-1.05	
3L 33 THR	0.20	-0.32	-0.15	0.29	
3L 34 TYR	0.09	-0.80	-0.74	-0.38	
3L 35 SER	0.06	-0.05	-0.10	-0.02	40
3L 36 TYR	0.04	-0.99	-1.30	1.66	
3L 38 HSD	-0.20	-0.46	-0.76	-0.72	

上記した通り、設計された変異体をインシリコで構築し、結合エネルギーを再計算した。これ等のコンピューター処理による変異の計算の結果を以下に示す。数字は野生型から変異体への結合親和性における変化を示す（負数は変異体がより良好であることを示す）。5 c 8 の全 3 鎖に関するエネルギーを示す。

【 0 3 6 4 】

（表 2 - 5 c 8 c D R のコンピューター処理による変異の計算）

【 0 3 6 5 】

【表 2】

鎖変異体

自由エネルギー

静電学

鎖変異体	自由エネルギー	静電学
1H TYR33PHE	0.197	-2.741
1H ASN59ASP	-0.995	-2.548
1H ASN59LEU	-1.294	-2.517
1L SER26ASP	-0.703	-0.712
1L GLN27GLU	-0.514	-0.357
1L SER31VAL	8.154	-1.739
1L THR33ASP	-0.219	-0.916
1L TYR54GLU	-0.999	-0.729
2H TYR33PHE	0.623	-2.726
2H ASN59ASP	-0.218	-2.885
2H ASN59LEU	-1.116	-3.067
2L SER26ASP	-1.333	-1.627
2L GLN27GLU	-0.658	-0.395
2L SER31VAL	9.293	-0.832
2L THR33ASP	-0.430	-1.359
2L TYR54GLU	-1.012	-1.030
3H TYR33PHE	0.145	-1.979
3H ASN59ASP	-0.837	-2.267
3H ASN59LEU	-1.179	-2.271
3L SER26ASP	-0.540	-0.565
3L GLN27GLU	-0.497	-0.342
3L SER31VAL	8.129	-1.284
3L THR33ASP	-0.337	-0.676
3L TYR54GLU	-1.123	-0.825

結果が示す通り、上記したコンピューター処理プロセスは親和性増強側鎖変異を予測するために良好に実施できた。

【 0 3 6 6 】

第1の型の変異は、これ等の残基が本質的に抗原の充足していない水素パートナーと水素結合を形成することから、検査により解明した。意外にも、脱溶媒のコストは大部分の場合において有利な相互作用エネルギーを相殺していると思われた。第2の型の変異は、エネルギー獲得が主に、望ましくない脱溶媒を排除しつつ非極性の相互作用を維持している結果であることから、直接性がより低い型またはセットの変異を示している。第3の変異型は親和性の有意な獲得の可能性を示す長距離の相互作用に関わる。これ等の型の変異は、それらが抗原との直接の接触を行わないため、抗体 - 抗原界面における繊細な相互作用

40

50

用における混乱を小さくするため、特に興味深いものである。

【0367】

上記した通り得られたコンピューター処理によるデータに従って、5c8 (Fabフラグメント)の変異体を作成し、そしてCD154に対するそれらの親和性を上記したELISA系の競合的結合試験およびKinExA™試験において野生型5c8 Fabの親和性と比較した。変異体の一部の選択された結果を以下の表に示す。親和性試験を実施した場合は、結果は元の5c8 (野生型)を超えた親和性倍加分として示した。1.0より大きい数字は増大した親和性を示し、1.0より小さい数字は低下した親和性を示す。

【0368】

(表3 - 5c8 改変 Fab 抗体フラグメントに関する観察された親和性の変化)

10

【0369】

【表3】

重鎖 変異	軽鎖 変異	野生型に対するELISA 改善倍数	KinExa K_d (pM)	変異体 番号
(野生型)	(野生型)	1.0	264	
T30H	-	2.3	307	1
Y33W	-	7.0	169	2
-	Y36W		420	3
S54N	-	2.0	298	4
-	T33W	5.0	158	5
-	S26D	2.6	142	6
-	Q27E	6.3	81	7
-	S31V	0.02		8
-	T33D	0.22		9
-	Y54E	0.06		10
Y33F	-	0.05		11
N59D	-	0.13		12
N59L	-	0.01		13
-	S26D/Q27E	5.6	41	14
-	S26D/Q27E/T33W	3.8	44	15

20

30

T30H	S26D/Q27E	5.8	70	16
Y33W	S26D/Q27E/T33W	5.9	23	17
T30H	S26D/Q27E/T33W	5.4	54	18
S54N	S26D/Q27E		65	19
S54N	S26D/Q27E/T33W		44	20
T30H/Y33W/S54N	S26D/Q27E		101	21
T30H/Y33W/S54N	S26D/Q27E/T33W		55	22
Y33W	S26D/Q27E	5.2	53	23
T30H/Y33W	S26D/Q27E	8.0	52	24
T30H/Y33W	S26D/Q27E/T33W	5.6	12	25
T30H/S54N	S26D/Q27E/T33W		63	26
Y33W/S54N	S26D/Q27E/T33W		52	27
Y33W/S54N	S26D/Q27E		77	28

10

5c8抗体のCDRにおける50アミノ酸上の理想的な電荷分布からの偏差の分析により、野生型と比較して高値のCD154に対する親和性を有する5変異体：Asn59Asp、Asn59Leu、Ser26Asp、Gln27GluおよびTyr54Gluの予測が可能となった。これ等の変異体を構築し、競合的ELISAにより特性化した。進歩した親和性の変異体S26DおよびQ27Eもまた野生型5c8Fabと比較して9倍高値の親和性を有する二重変異体に組み合わせた。

20

【0370】

側鎖リパッキングアルゴリズムを5c8のCDRに適用した。30CDR残基につき、 10^4 個の配列をコンピューター分析し、14の単一および二重変異体を実験的フォローアップ用に選択した。数種の変異体は野生型5c8Fabと比較して高値の親和性を示した。側鎖リパッキング変異体をさらに高値の親和性の静電的変異体と組み合わせた。組み合わせた5つの点変異は野生型と比較して25倍高値の親和性を有していた。さらにまた細胞内においてそれは完全長5c8抗体により示されるブロッキングに匹敵するICAMアップレギュレーション(CD40-CD154相互作用の生物学的帰結)のより優れた抑制を示していた。変異体予測における40%の全体的ヒット率が両方の方法において達成された。

30

【0371】

T細胞依存性B細胞活性化試験を実施した。T細胞依存性B細胞活性化の抑制はD1.1: Ramosの同時培養において測定した。CD154によるB細胞上のCD40の係留はB細胞の活性化およびICAM-1(CD54)のアップレギュレーションをもたらす。抗CD154mAbおよびFabはCD40-CD154相互作用を破壊することによりB細胞の活性化を抑制する。概すれば、抗CD154Fabの滴定物を1:4比のD1.1: Ramos細胞に添加し、一夜インキュベートした。Ramos細胞上のICAM-1のアップレギュレーションを定量化する2色FACS染色(CD20FITC/CD54APC)を実施した。結果を表4に示す。

40

【0372】

(表4 - T細胞依存性B細胞活性化試験において観察された力価)

【0373】

【表 4】

重鎖 変異	軽鎖 変異	IC50 (ug/ml)
(野生型)	(野生型)	1.215
-	S26D/Q27E	0.287
Y33W	S26D/Q27E/T33W	0.131
T30H/Y33W	S26D/Q27E/T33W	0.165

10

(同等物)

当業者にとっては日常の実験を超えるものを使用することなく本明細書に記載した本発明の特定の実施形態の多くの同等物が存在する。このような同等物は後に記載する請求項により包含されることを意図している。

【0374】

本明細書に記載したもの以外の本発明の種々の変更が、上記から、当業者には明らかとなるであろう。このような変更もまた添付する請求項の範囲内に属することを意図している。本出願において引用した各参考文献（例えば学術誌類、米国特許または非米国特許、特許出願公開、国際特許出願公開、Genbankアクセッション番号等）は参考として全体が本明細書中で援用される。

20

【配列表】

0005102028000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
G 0 1 N	33/532 (2006.01)	G 0 1 N	33/532 A
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 L
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/02 C
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00 Z
A 6 1 K	47/34 (2006.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/42 (2006.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	21/04
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
		A 6 1 P	35/00
		A 6 1 P	35/02

- (72)発明者 ファン フリーメン, ヘルマン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, クレイギー ストリート 5
 6
- (72)発明者 ルゴフスコイ, アレクセイ アレクサンドロビッチ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1, ウォバーン, センター ストリート 2 4
- (72)発明者 ハンフ, カール ジェイ. エム.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 2 1, ビルリカ, リッジ ロード 9

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 Structure, (2001), 9, [4], p.321-329
 Gene, (1993), 137, [1], p.109-118

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/00-15/90
 PubMed

专利名称(译)	抗CD154抗体		
公开(公告)号	JP5102028B2	公开(公告)日	2012-12-19
申请号	JP2007523693	申请日	2005-07-26
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司, Emuei公司		
当前申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司, Emuei公司		
[标]发明人	ファンフリーメンヘルマン ルゴフスコイアレクセイアレクサンドロビッチ ハンフカールジェイエム		
发明人	ファン フリーメン, ヘルマン ルゴフスコイ, アレクセイ アレクサンドロビッチ ハンフ, カール ジェイ. エム.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/532 A61K39/395 A61K51/00 A61K49/00 A61K47/34 A61K47/42 A61P29/00 A61P37/08 A61P19/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P37/04 A61P21/04 A61P7/04 A61P7/06 A61P3/10 A61P37/06 A61P11/00 A61P1/16 A61P35/00 A61P35/02		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/14 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/00 C07K16/2875 C07K2299/00 C07K2317/24 C07K2317/55 C07K2317/76 C07K2317/92 Y10S435/81		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.102 G01N33/532.A A61K39/395.L A61K49/02.C A61K49/00.Z A61K47/34 A61K47/42 A61K39/395.N A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/08 A61P19/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P37/04 A61P21/04 A61P7/04 A61P7/06 A61P3/10 A61P37/06 A61P11/00 A61P1/16 A61P35/00 A61P35/02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/591337 2004-07-26 US		
其他公开文献	JP2008511290A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了肽及其片段。本发明还提供了包含它们的抗体或其片段。与野生型5c8抗体相比，所述肽包含至少一个氨基酸取代。本发明还提供了用于治疗受试者中CD154相关疾病或CD154相关病症的组合物。本发明还提供了治疗受试者中CD154相关疾病或CD154相关病症的方法。

【化1】

CDRの定義

	Kabat	Chothia	MacCallum	5c8
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	53-55	47-58	50-66
VH CDR3	95-102	96-101	93-101	99-107
VL CDR1	24-34	26-32	30-36	24-38
VL CDR2	50-56	50-52	46-55	54-60
VL CDR3	89-97	91-96	89-96	93-101