

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-93880

(P2018-93880A)

(43) 公開日 平成30年6月21日(2018.6.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-8673 (P2018-8673)	(71) 出願人	506153815
(22) 出願日	平成30年1月23日 (2018.1.23)		ロシュ グリクアート アクチエンゲゼル
(62) 分割の表示	特願2015-525859 (P2015-525859)		シャフト
原出願日	平成25年8月6日 (2013.8.6)		スイス国、ツェーハー—8952 シュリ
(31) 優先権主張番号	61/681, 239	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成24年8月9日 (2012.8.9)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		(74) 代理人	100135415
			弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A S G P R抗体およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】アシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) に特異的な抗体、および細胞活性に影響を及ぼすエフェクター部分を選択的に送達するための抗体の提供。

【解決手段】特定の配列を有する A S G P R に特異的な抗体、細胞活性に影響を及ぼすエフェクター部分を選択的に送達するための抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター及び宿主細胞、抗体を産生するための方法、及び抗体を含む薬学的組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アジアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) に特異的に結合可能な抗体であって

- a) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 2 の軽鎖可変領域配列 ;
- b) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 3 0 の軽鎖可変領域配列 ;
- c) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 3 2 の軽鎖可変領域配列 ; または
- d) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 3 4 の軽鎖可変領域配列

を含む、前記抗体。

【請求項 2】

- a) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 3 6 の軽鎖可変領域配列 ;
- b) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 3 8 の軽鎖可変領域配列 ;
- c) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 4 0 の軽鎖可変領域配列 ;
- d) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 4 2 の軽鎖可変領域配列 ;
- e) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 4 4 の軽鎖可変領域配列 ;
- f) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 4 6 の軽鎖可変領域配列 ; または
- g) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列および配列番号 4 8 の軽鎖可変領域配列

10

を含む、請求項 1 の抗体のアフィニティ成熟変異体。

【請求項 3】

抗体が、

- (i) ヒトおよびカニクイザル (c y n o m o l g u s m o n k e y) A S G P R に特異的に結合可能な ;
- (ii-1) 表面プラズモン共鳴 (S P R) によって、F a b 断片として測定した際、ヒト A S G P R に、 $1 \mu M$ より小さい解離定数 (K_D) で結合する ;
- (iv-1) A S G P R への結合に関して、A S G P R の天然リガンドと競合しない ;
- (iv-2) A S G P R への結合に関して、A S G P R の天然リガンドであるアジアロフェチユインと競合しない ;
- (v-1) C L E C 1 0 A に検出可能に結合しない ;
- (v-2) ヒト C L E C 1 0 A に検出可能に結合しない ;
- (vi-1) A S G P R 発現を欠く細胞に特異的に結合しない ;
- (vi-2) A S G P R 発現を欠くヒト細胞に特異的に結合しない ;
- (vi-3) A S G P R 発現を欠くヒト血液細胞に特異的に結合しない ;
- (vii) A S G P R 発現細胞表面上の A S G P R に抗体が結合した際、前記細胞に内在化される ;
- (viii) A S G P R 発現細胞表面上の A S G P R に抗体が結合した際、前記細胞に内在化され、そして、前記細胞内に内在化されるのとほぼ同じ速度で、前記細胞表面にリサイクルされて戻る ; および / または
- (ix) 前記細胞表面上の A S G P R に抗体が結合した際、細胞表面で、A S G P R 発現の下方制御を有意には誘導しない、

20

30

請求項 1 または 2 のいずれか一項の抗体。

【請求項 4】

40

- (ii-2) 表面プラズモン共鳴 (S P R) によって、F a b 断片として測定した際、ヒト A S G P R に、 $100 nM$ より小さい解離定数 (K_D) で結合する

請求項 3 の抗体。

【請求項 5】

- (ii-3) 表面プラズモン共鳴 (S P R) によって、F a b 断片として測定した際、ヒト A S G P R に、 $1 nM$ より小さい解離定数 (K_D) で結合する

請求項 3 の抗体。

【請求項 6】

抗体が、

- (i) ヒトおよびカニクイザル (c y n o m o l g u s m o n k e y) A S G P R に特

50

異的に結合可能な；

(iii-1) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によって、IgG₁として測定した際、ヒトASGPRに、1 μMより小さいK_Dで結合する；

(iv-1) ASGPRへの結合に関して、ASGPRの天然リガンドと競合しない；

(iv-2) ASGPRへの結合に関して、ASGPRの天然リガンドであるアジアロフェチユインと競合しない；

(v-1) CLEC10Aに検出可能に結合しない；

(v-2) ヒトCLEC10Aに検出可能に結合しない；

(vi-1) ASGPR発現を欠く細胞に特異的に結合しない；

(vi-2) ASGPR発現を欠くヒト細胞に特異的に結合しない；

(vi-3) ASGPR発現を欠くヒト血液細胞に特異的に結合しない；

(vii) ASGPR発現細胞表面上のASGPRに抗体が結合した際、前記細胞に内在化される；

(viii) ASGPR発現細胞表面上のASGPRに抗体が結合した際、前記細胞に内在化され、そして、前記細胞内に内在化されるのとほぼ同じ速度で、前記細胞表面にリサイクルされて戻る；および/または

(ix) 前記細胞表面上のASGPRに抗体が結合した際、細胞表面で、ASGPR発現の下方制御を有意には誘導しない、

請求項1または2のいずれか一項の抗体。

【請求項7】

(iii-2) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によって、IgG₁として測定した際、ヒトASGPRに、500 nMより小さいK_Dで結合する請求項6の抗体。

【請求項8】

(iii-3) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によって、IgG₁として測定した際、ヒトASGPRに、100 nMより小さいK_Dで結合する請求項6の抗体。

【請求項9】

(iii-4) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によって、IgG₁として測定した際、ヒトASGPRに、10 nMより小さいK_Dで結合する請求項6の抗体。

【請求項10】

ヒト抗体である、請求項1～9いずれか一項の抗体。

【請求項11】

抗体が、

(i-1) ヒトFc領域を含む；

(i-2) ヒトIgG Fc領域を含む；

(i-3) ヒトIgG₁ Fc領域を含む；

(ii) 全長抗体である；

(iii-1) IgGクラス抗体である；および/または

(iii-2) IgG₁サブクラス抗体である、

請求項1～10いずれか一項の抗体。

【請求項12】

Fc受容体、特にFc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる修飾を、Fc領域中に含む、請求項11の抗体であって、

(i) 前記Fc受容体が活性化Fc受容体である；

(ii) 前記Fc受容体が、FcRIIIa (CD16a)、FcRI (CD64)、FcRIIa (CD32)、およびFcRI (CD89)の群より選択される；

(iii-1) 前記Fc受容体がFcRIIIaである；

(iii-2) 前記Fc受容体がヒトFcRIIIaである；

	10
	20
	30
	40
	50

(iv) 抗体が、P 3 2 9、L 2 3 4 および L 2 3 5 (E U 番号付け) より選択される位置で F c 領域中にアミノ酸置換を含む；および / または

(v) 抗体が、F c 領域中にアミノ酸置換 P 3 2 9 G、L 2 3 4 A および L 2 3 5 A (E U 番号付け) を含む、

前記抗体。

【請求項 1 3】

抗体が、

(i) 2 つの非同ー抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾を、F c 領域中に含む；

(ii) C H 3 ドメイン中の 2 つの抗体重鎖間の界面内に修飾を含み、i) 1 つの重鎖の C H 3 ドメインにおいて、アミノ酸残基はより大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって 1 つの重鎖の C H 3 ドメイン中の界面内に突起 (「ノブ」) を生成し、これを他方の重鎖の C H 3 ドメイン中の界面内の空洞 (「穴」) 中に配置可能であり、そして i i) 他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいて、アミノ酸残基はより小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって第二の C H 3 ドメイン中の界面内に空洞 (「穴」) を生成し、この中に第一の C H 3 ドメイン中の界面内の突起 (「ノブ」) が配置可能である；および / または

(iii-1) 1 つの抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 W を、そして他方の抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V を含む、または

(iii-2) 1 つの抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 W およびアミノ酸置換 S 3 5 4 C を、そして他方の抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A および Y 4 0 7 V を含む、または

(iii-3) 1 つの抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 W およびアミノ酸置換 S 3 5 4 C を、そして他方の抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V および Y 3 4 9 C を含む、

請求項 1 1 または 1 2 の抗体。

【請求項 1 4】

エフェクター部分が抗体に付着している、請求項 1 ~ 1 3 いずれか一項の抗体であって、

(i) 抗体に付着しているエフェクター部分が 1 以下であり；および

(ii) 前記エフェクター部分がサイトカイン分子である；または

(iii) 前記エフェクター部分がヒトサイトカインである；または

(iv) 前記エフェクター部分がインターフェロン分子である；または

(v-1) 前記エフェクター部分が、インターフェロン・アルファである；

(v-2) 前記エフェクター部分が、ヒト・インターフェロン・アルファである；または

(v-3) 前記エフェクター部分が、ヒト・インターフェロン・アルファ 2 またはヒト・インターフェロン・アルファ 2 a である、

前記抗体。

【請求項 1 5】

エフェクター部分が抗体に付着している、請求項 1 ~ 1 3 いずれか一項の抗体。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項の抗体またはその抗原結合部分をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 のポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項 1 8】

(i) 前記抗体の発現に適した条件下で、請求項 1 7 の宿主細胞を培養し、そして

(i i) 前記抗体を回収する

工程を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項の抗体を産生するための方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項の抗体および薬学的に許容されうるキャリアーを含む、

薬学的組成物。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項の抗体を含む薬剤、あるいは請求項 19 の薬学的組成物であって、

- (i) 疾患の治療または予防において使用するための；
- (ii-1) 肝臓疾患の治療または予防において使用するための；
- (ii-2) ウイルス感染である肝臓疾患の治療または予防において使用するための；
- (ii-3) 肝炎ウイルス感染である肝臓疾患の治療または予防において使用するための；
- (ii-4) B型肝炎ウイルス(HBV)感染である肝臓疾患の治療または予防において使用するための；
- (iii-1) 癌の治療または予防において使用するための；
- (iii-2) 肝臓癌の治療または予防において使用するための；
- (iii-3) 肝細胞癌(HCC)の治療または予防において使用するための、

前記薬剤あるいは薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的に、アジアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)に特異的な抗体、および細胞活性に影響を及ぼすエフェクター部分を選択的に送達するための該抗体の使用に関する。さらに、本発明は、こうした抗体をコードするポリヌクレオチド、ならびにこうしたポリヌクレオチドを含むベクターおよび宿主細胞に関する。本発明はさらに、本発明の抗体を産生するための方法に、そして疾患治療において該抗体を用いる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アジアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)は、2つのサブユニット、H1およびH2で構成される膜貫通受容体である。該サブユニットは、細胞外ストーク領域を通じてオリゴマー化すると考えられる。ASGPRは、C型レクチンファミリー(カルシウムイオン依存性レクチン)のメンバーであり、そして非常に多様な脱シアル化糖タンパク質のエンドサイトーシスおよび分解を仲介する。ASGPRは、肝臓実質細胞(肝細胞)上で選択的に発現され、これによって、肝臓特異的療法の魅力的なターゲットとなっている。多くの肝臓疾患、例えば肝炎、肝硬変または肝細胞癌(HCC)は、ウイルス感染、例えばB型肝炎ウイルス(HBV)またはC型肝炎ウイルス(HCV)感染によって、直接または間接的に引き起こされうる。HCVでの慢性感染は、肝硬変およびHCCの主因の1つである。同様に、慢性HBV感染は、米国において、慢性肝臓疾患および肝硬変の5~10%を構成する。HBVおよびHCV感染に関して認可された療法には、インターフェロン(IFN)、例えばインターフェロン・アルファが含まれる。しかし、副作用によって、多くの症例において、これらの療法を発展させ、そして広く用いることが妨げられてきている。こうしたIFN関連副作用は、部分的に、IFNへの全身曝露後に、末梢血細胞において、インターフェロン刺激遺伝子(ISG)が誘導されるためであると考えられる。したがって、肝臓疾患に関するIFN療法に関連する副作用を最小限にするために、そしてまた、慣用的なインターフェロンの抗ウイルス効果を増大させるために、IFNを肝臓に選択的に送達することが望ましい。ASGPRは、こうした選択的送達のために、肝細胞上の潜在的なターゲット分子として認識されてきている。例えば、WO92/22310は、アジアロ糖タンパク質に組換えIFNをコンジュゲート化することによって、インターフェロンを肝臓にターゲティングするためのアプローチを記載する。同様のアプローチにおいて、インターフェロン分子自体を修飾して、ASGPRに結合するためのアジアロ-インターフェロンを産生してきている(EtoおよびTakahashi, Nat Med 5, 577-581(1999))。より最近、抗ASGPR単一可変ドメイン(dAb)抗体に基づくアプローチも記載されてきている(WO 2011/086143)。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】WO 92 / 22310

【特許文献2】WO 2011 / 086143

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】EtoおよびTakahashi, Nat Med 5, 577-581 (1999)

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、これらのアプローチはいずれも、これまでのところ臨床的に成功することが示されておらず、そして療法分子、例えばインターフェロンを肝臓に選択的に送達するための、改善されたターゲティング分子に対する必要性がなおある。本発明の抗体は、いくつかの好適な特性を組み合わせ、例えば肝臓疾患の治療のために、ASGPR発現細胞にインターフェロンなどのエフェクター部分をターゲティングするのに特に適したものとなっている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

20

発明の概要

1つの側面において、本発明は、アジアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)に特異的に結合可能な抗体であって、a)配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列；b)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列；c)配列番号8の重鎖可変領域配列および配列番号6の軽鎖可変領域配列；d)配列番号12の重鎖可変領域配列および配列番号10の軽鎖可変領域配列；e)配列番号20の重鎖可変領域配列および配列番号18の軽鎖可変領域配列；f)配列番号24の重鎖可変領域配列および配列番号22の軽鎖可変領域配列；g)配列番号28の重鎖可変領域配列および配列番号26の軽鎖可変領域配列；h)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号30の軽鎖可変領域配列；i)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号32の軽鎖可変領域配列；j)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号34の軽鎖可変領域配列；またはk)配列番号24の重鎖可変領域配列および配列番号22の軽鎖可変領域配列を含む、前記抗体を提供する。

30

【0007】

特定の態様において、抗体は、配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む。別の特定の態様において、抗体は、配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む。

【0008】

さらなる側面において、本発明は、ASGPRのエピトープへの結合に関して、配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む抗体と競合する、ASGPRに特異的に結合可能な抗体を提供する。1つの態様において、前記抗体は、ASGPRのストーク領域におけるエピトープを認識する。1つの態様において、前記抗体は、配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む抗体のアフィニティ成熟変異体である。1つの態様において、前記抗体は、配列番号16の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である重鎖可変領域配列、および配列番号14の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、前記抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、前記抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号16の重鎖可変領域配列を含む。

40

50

【0009】

さらにさらなる側面において、本発明は、ASGPRのエピトープへの結合に関して、配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む抗体と競合する、ASGPRに特異的に結合可能な抗体を提供する。1つの態様において、前記抗体は、ASGPRの炭水化物認識ドメイン(CRD)におけるエピトープを認識する。1つの態様において、前記抗体は、配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む抗体のアフィニティ成熟変異体である。1つの態様において、前記抗体は、配列番号4の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である重鎖可変領域配列、および配列番号2の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、前記抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、前記抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号4の重鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、前記抗体は、a)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号36の軽鎖可変領域配列；b)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号38の軽鎖可変領域配列；c)配列番号8の重鎖可変領域配列および配列番号40の軽鎖可変領域配列；d)配列番号12の重鎖可変領域配列および配列番号42の軽鎖可変領域配列；e)配列番号20の重鎖可変領域配列および配列番号44の軽鎖可変領域配列；f)配列番号24の重鎖可変領域配列および配列番号46の軽鎖可変領域配列；またはg)配列番号28の重鎖可変領域配列および配列番号48の軽鎖可変領域配列を含む。

10

20

【0010】

1つの態様において、本発明の抗体は、ヒトおよびカニクイザル(cynomolgus monkey)ASGPRに特異的に結合可能である。1つの態様において、抗体は、表面プラズモン共鳴(SPR)によって、Fab断片として測定した際、ヒトASGPRに、1μMより小さい、特に100nMより小さい、より具体的には1nMより小さい解離定数(K_D)で結合する。1つの態様において、抗体は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって、IgG₁として測定した際、ヒトASGPRに、1μMより小さい、特に500nMより小さい、より具体的には100nMより小さい、またはさらに10nMより小さいK_Dで結合する。1つの態様において、抗体は、ASGPRへの結合に関して、ASGPRの天然リガンドと競合しない。特定の態様において、ASGPRの前記天然リガンドはアジアロフェチュインである。1つの態様において、抗体は、CLEC10A、特にヒトCLEC10Aに検出可能に結合しない。1つの態様において、抗体は、ASGPR発現を欠く細胞、特にヒト細胞、より具体的にはヒト血液細胞に特異的に結合しない。1つの態様において、抗体は、ASGPR発現細胞表面上のASGPRに抗体が結合した際、前記細胞に内在化される。特定の態様において、抗体は、前記細胞内に内在化されるのとほぼ同じ速度で、前記細胞表面にリサイクルされて戻る。1つの態様において、抗体は、前記細胞表面上のASGPRに抗体が結合した際、細胞表面で、ASGPR発現の下方制御を有意には誘導しない。

30

【0011】

1つの態様において、本発明の抗体はヒト抗体である。1つの態様において、抗体は、ヒトFc領域、特にIgG₁Fc領域、より具体的にはIgG₁Fc領域を含む。1つの態様において、抗体は全長抗体である。1つの態様において、抗体は、IgGクラス抗体、特にIgG₁サブクラス抗体である。1つの態様において、抗体は、Fc受容体、特にFc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる修飾を、Fc領域中に含む。特定の態様において、前記Fc受容体は活性化Fc受容体である。さらに特定の態様において、前記Fc受容体は、FcRIIIa(CD16a)、FcRI(CD64)、FcRIIIa(CD32)、およびFcRI(CD89)の群より選択される。より特定の態様において、前記Fc受容体はFcRIIIa、特にヒトFcRIIIaである。1つの態様において、抗体は、P329、L234およびL235(EU番号付け)より選択される位でFc領域中にアミノ酸置換を含む。1つの態様において、抗体は、F

40

50

c領域中にアミノ酸置換P329G、L234AおよびL235A(EU番号付け)を含む。さらなる態様において、抗体は、2つの非同ー抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾を、Fc領域中に含む。特定の態様において、前記修飾は、抗体重鎖の一方におけるノブ修飾、および2つの抗体重鎖のもう一方における穴修飾を含む、ノブを穴に(knob-into-hole)修飾である。1つの態様において、抗体は、CH3ドメイン中の2つの抗体重鎖間の界面内に修飾を含み、i)1つの重鎖のCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基はより大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって1つの重鎖のCH3ドメイン中の界面内に突起(「ノブ」)を生成し、これを他方の重鎖のCH3ドメイン中の界面内の空洞(「穴」)中に配置可能であり、そしてii)他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基はより小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって第二のCH3ドメイン中の界面内に空洞(「穴」)を生成し、この中に第一のCH3ドメイン中の界面内の突起(「ノブ」)が配置可能である。1つの態様において、抗体は、1つの抗体重鎖において、アミノ酸置換T366Wおよび場合によってアミノ酸置換S354Cを、そして他方の抗体重鎖において、アミノ酸置換T366S、L368A、Y407Vおよび場合によってY349Cを含む。

10

20

30

40

50

【0012】

1つの側面において、本発明は、エフェクター部分が抗体に付着している、上記態様のいずれかが記載の、ASGPRに特異的に結合可能な抗体を提供する。1つの態様において、1より多いエフェクター部分が抗体に付着していない。1つの態様において、前記エフェクター部分はサイトカイン分子である。1つの態様において、前記サイトカイン分子は、場合によってペプチドリンカーを通じて、抗体重鎖の1つのカルボキシ末端アミノ酸に、アミノ末端アミノ酸で融合している。1つの態様において、前記サイトカイン分子はヒトサイトカインである。1つの態様において、前記サイトカイン分子はインターフェロン分子である。特定の態様において、前記インターフェロン分子は、インターフェロン・アルファ、特にヒト・インターフェロン・アルファ、より具体的には、ヒト・インターフェロン・アルファ2(配列番号138を参照されたい)またはヒト・インターフェロン・アルファ2a(配列番号139を参照されたい)である。サイトカイン分子がインターフェロン分子である1つの態様において、抗体は、表面上にASGPRを発現する細胞において、抗ウイルス活性を有する。特定の態様において、抗体は、表面上に有意なレベルのASGPRを発現しない細胞においては、抗ウイルス活性をまったく持たない。さらなる特定の態様において、前記抗ウイルス活性は、ウイルス感染の阻害、ウイルス複製の阻害、細胞殺傷の阻害およびインターフェロン刺激遺伝子の誘導より選択される。

【0013】

本発明はさらに、本発明の抗体をコードする、ポリヌクレオチドを提供する。さらに提供するものは、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクターである。別の側面において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む、宿主細胞を提供する。本発明はまた、(i)前記抗体の発現に適した条件下で、本発明の宿主細胞を培養し、そして(ii)前記抗体を回収する工程を含む、本発明の抗体を産生するための方法も提供する。やはり提供するものは、前記方法によって産生される、ASGPRに特異的に結合可能な抗体である。

【0014】

1つの側面において、本発明は、本発明の抗体および薬学的に許容されうるキャリアーを含む、薬学的組成物を提供する。本発明の抗体または薬学的組成物はまた、薬剤として使用するため、そして肝臓疾患、特にウイルス感染、より具体的には肝炎ウイルス感染、特にB型肝炎ウイルス(HBV)感染の治療または予防において使用するためにも提供される。本発明の抗体または薬学的組成物はまた、癌、特に肝臓癌、より具体的には肝細胞癌(HCC)の治療または予防において使用するためにも提供される。さらに提供するものは、治療が必要な個体において、疾患を治療するための薬剤製造のための、本発明の抗体の使用、および個体において疾患を治療する方法であって、前記個体に、薬学的に許容されうる型の本発明の抗体を含む組成物の療法的有効量を投与する工程を含む、前記方法で

ある。1つの態様において、前記疾患は肝臓疾患である。より具体的な態様において、前記肝臓疾患はウイルス感染である。さらにより特定の態様において、前記肝臓疾患は肝炎ウイルス感染、特にHBV感染である。別の態様において、前記疾患は癌である。さらにより特定の態様において、前記癌は肝臓癌である。さらにより特定の態様において、前記肝臓癌は肝細胞癌(HCC)である。1つの態様において、前記個体は哺乳動物、特にヒトである。さらなる側面において、本発明の抗体は、個体において、ASGPRを発現している細胞をターゲティングするために提供される。やはり提供するのは、個体においてASGPRを発現している細胞をターゲティングするための方法であって、前記個体に、薬学的に許容されうる型の本発明の抗体を含む組成物を投与する工程を含む、前記方法である。1つの態様において、前記細胞は肝臓細胞、特に肝細胞である。1つの態様において、前記個体は哺乳動物、特にヒトである。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】生成した抗原構築物の模式図。すべての抗原のヌクレオチド配列を、ヒト由来IgG₁ Fc配列のC末端に融合させた。ASGPR由来CRDおよびCLEC10A由来CRDを、Fc(穴)断片をコードする配列に融合させ、そしてFc二量体あたり単量体ディスプレイを生じるFc(ノブ)断片をコードする配列と同時発現させた。左から右に、Fc-CRD(ASGPR1)、Fc-ストーク(ASGPR1)、Fc-ストーク-CRD(ASGPR1)、Fc-CRD(CLEC10A)、Fc-ストーク(CLEC10A)、Fc-ストーク-CRD(CLEC10A)。太い曲線：(G₄S)₃リンカー；太い直線：XaおよびIgAse切断部位。

20

【図2】重鎖および軽鎖のCDR3領域においてランダム化された一般的なFabライブラリーの生成の模式的概観。第一の工程において、3つのPCR断片を生成し、これを次いで、(重複伸長によるスプライシング；SOE)PCRによって融合させた。最終断片をゲル精製し、NcoI/NheIで消化し、同様に処理したアクセプター・ファージミドとともに連結し、そして細菌内に形質転換した。PCR1(A、B、C)：(1) LMB3；(2) (A) VI₃19L3rV / (B) VI₃19L3rHV / (C) VI₃19L3rHLV。PCR2：(3) RJH80；(4) DP47CDR3_{ba(mod)}。PCR3(A、B、C)：(5) (A) DP47v4₄ / (B) DP47v4₆ / (C) DP47v4₈；(6) fdseq1ong

30

【図3】ヒトIgG₁抗体として、HepG2細胞に対する選択された抗ヒトASGPR H1特異的クローンの結合分析。抗体濃度は30 μg/mlであった。アイソタイプ対照抗体は、陰性対照として働いた。

【図4】テルビウムで標識した膜貫通ASGPR H1-SNAPタグ融合タンパク質を発現している一過性トランスフェクション細胞に対するFRET分析。50~0.39 nMの範囲の濃度で抗体を添加し、その後、アクセプター分子として、抗ヒトFc-d2(ウェルあたり最終200 nM)の添加によって、分析を行った。特異的FRETシグナルを3時間後に測定し、そしてKD値を計算した(KD_{51A12} = 200 nM、KD_{R7F12} = 22 nM、KD_{R9E10} = 6.2 nM、KD_{R5C2} = 5.9 nM、KD_{4F3} = 4.5 nM)。

40

【図5】ASGPRに対する天然リガンドであるアシアロフェチュイン、および抗ASGPR H1抗体の競合。細胞に対して、示す抗体を希釈列で添加する前に、HepG2細胞を標識アシアロフェチュインとプレインキュベーションした。細胞に対する両方の構成要素の結合をFACS分析によって分析した。(A)抗体検出；(B)アシアロフェチュイン検出。

【図6】図5の説明と同じ。

【図7-1】IgGとしての2つの抗ヒトASGPR H1抗体クローン51A12および4F3の内在化分析。(A)抗体をHepG2細胞と4でインキュベーションして、内在化を防止し、そして細胞をあらかじめ温めた培地中で培養する前に、4で洗浄し、

50

そして37℃で最長120分間インキュベーションした。示す時点で試料を採取し、氷上で二次抗体で標識し、そしてPFAを用いて固定した。(B)(A)に記載するのと同じ工程を行ったが、抗体を細胞と37℃でインキュベーションして、ASGPRが内在化するのを可能にした。

【図7-2】IgGとしての2つの抗ヒトASGPR H1抗体クローン51A12および4F3の内在化分析。(C)(A)に記載するのと同じ工程を行ったが、直接FITC標識抗体を用いた。PEコンジュゲート化抗Fc抗体を用いて、細胞表面に結合した抗体を検出した。(D)(C)と同じ実験を行ったが、FITCシグナルを示し、表面曝露および内在化抗体の両方を示した。

【図8】クローン51A12のLCDR3領域のランダム化戦略。(A)親クローン51A12のLCDR3タンパク質配列、(B)システインおよびグリコシル化配列を含まない、ライブラリーのためのテンプレートとして働くプラスミドのLCDR3タンパク質配列、および(C)LCDR3のランダム化位を示す。ライブラリー生成中、三ヌクレオチドプライマーは、システインまたはグリコシル化部位の形成に寄与するアミノ酸をコードする3つ組を排除することを可能にする。

【図9】テンプレート51A12のLCDR3においてランダム化されたアフィニティ突然変異ライブラリーの生成の模式的概観(A82G、C112S、C113S、S116A)(配列番号33)。第一の工程において、2つのPCR断片を生成し、これを次いで、(SOE)PCRによって融合させた。最終断片をゲル精製し、NcoI/PstIで消化し、同様に処理したアクセプター・ファージミドとともに連結し、そして細菌内に形質転換した。PCR1:(1)LMB3、(2)LCDR3 rev. PCR2:(3)LCDR3 rand、(4)fdseq long。

【図10】ヒトFab断片としての、HepG2細胞に対するアフィニティ成熟51A12由来クローンの結合分析。10、3.3、および1.1μg/mlのFab濃度を用いた。親クローン51A12(配列番号2および4)、グリコシル化配列を欠くクローン51A12(S116A)(配列番号4および30)、および対照として働く、アフィニティ成熟ライブラリーのテンプレートクローン51A12(A82G、C112S、C113S、S116A)。

【図11】ヒトIgG₁抗体としての、HepG2細胞に対するアフィニティ成熟51A12由来クローンの結合分析。0.01~20μg/mlの範囲の希釈列の濃度を用いた。親クローン51A12(配列番号2および4)は対照として働いた(A)。10μg/mlの濃度でのHeLa細胞に対する結合分析を陰性対照として用いた(B)。

【図12】生成した抗体-サイトカイン・コンジュゲートの模式図。インターフェロン-2aをコードする遺伝子を、ノブ修飾を含むASGPR H1特異的抗体重鎖のC末端に融合させた。穴修飾を含む対応するASGPR H1特異的重鎖および軽鎖の同時発現によって、抗体-サイトカインタンパク質の二価ASGPR結合を達成する((A)、2:1価)一方、Fc(穴)断片配列の発現は、分子あたり1つのみのASGPR H1特異的結合部位を含む、単量体抗体-サイトカイン・コンジュゲートを生じた((B)、1:1価)。小さい黒点:FcR結合を防止する修飾(例えば、L234A L235A P329G)。大きい黒点:ヘテロ二量体化を促進する修飾(例えばノブを穴に)。

【図13】選択した抗体-IFNイムノコンジュゲート(51A12 kih IgG-IFN)の精製および分析的特徴付け。精製法はアフィニティ工程(プロテインA)(A)の後、サイズ排除クロマトグラフィ(Superdex 200、GE Healthcare)(B)を伴った。最終産物を分析し、そして分析的サイズ排除クロマトグラフィ(Superdex 200カラム)(C)および微量流体タンパク質分析(Caliper)またはSDS-PAGE(D)によって特徴付けた(図14-19についても同様)。

【図14】選択した抗体-IFNイムノコンジュゲート(4F3 kih IgG-IFN)の精製および分析的特徴付け。

【図15】選択した抗体-IFNイムノコンジュゲート(51A12(C7) kih

10

20

30

40

50

I g G - I F N) の精製および分析的特徴付け。

【図16】選択した抗体 - I F N イムノコンジュゲート (5 1 A 1 2 (C 1) k i h

I g G - I F N) の精製および分析的特徴付け。

【図17】選択した抗体 - I F N イムノコンジュゲート (5 1 A 1 2 (E 7) k i h

I g G - I F N) の精製および分析的特徴付け。

【図18】選択した抗体 - I F N イムノコンジュゲート (アイソタイプ対照 k i h I

g G - I F N) の精製および分析的特徴付け。

【図19】選択した抗体 - I F N イムノコンジュゲート (一価 5 1 A 1 2 k i h I

g G - I F N) の精製および分析的特徴付け。

【図20】A S G P R 特異的 I g G k i h I F N 融合構築物 5 1 A 1 2 (A) およ
び 4 F 3 (B) の結合選択性。H e p G 2、初代ヒト肝細胞、H u h - 7 細胞、A 5 4 9
細胞、H e l a 細胞、および 2 9 3 T 細胞を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 5 1 A 1 2 - I F N (A)
または 4 F 3 - I F N (B) と、氷上で 4 5 分間インキュベーションした。3 回洗
浄した後、細胞を二次ヤギ抗ヒト I g G 抗体で氷上で 3 0 分間染色し、そして細胞を 3 回洗
浄した後、C a l i b u r フローサイトメーターを用いて、分析した。Z e n o n (登録
商標) R - フニコエリトリン・ヒト I g G 標識キットを製造者の指示にしたがって用いて
、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の直接標識 5 1 A 1 2 I g G k i h I F N (A) および 4 F 3
I g G k i h I F N (B) を用いることによって、ヒト P B M C に対する結合を行
い、アイソタイプ I g G k i h I F N および C D 8 1 m A b をそれぞれ、陰性お
よび陽性対照として用いた。

10

20

【図21】初代ヒト肝細胞および H e p G 2 細胞に対する A S G P R m A b 4 F 3 -
I F N の結合飽和曲線。3 人の異なるドナー由来のヒト肝細胞 (A ~ C) および H e p
G 2 細胞 (D) に対する A S G P R m A b 4 F 3 - I F N の結合飽和。細胞を連続
希釈した 4 F 3 I g G k i h I F N と氷上で 4 5 分間インキュベーションした。
3 回洗浄した後、細胞を二次ヤギ抗ヒト I g G 抗体で氷上で 3 0 分間染色し、そして再び
3 回洗浄した後、C a l i b u r フローサイトメーターを用いて、分析した。

【図22】特異的抗体の存在下での、長時間に渡る A S G P R の表面曝露レベルの分析。
H e p G 2 細胞を、A S G P R 特異的クローン 5 1 A 1 2 I g G あるいは対応する一価
または二価抗体 - サイトカイン・コンジュゲートのいずれかとインキュベーションした。
5 時間後まで細胞試料を採取し、そして A S G P R に対する I g G 構築物の結合を、抗体
(A) またはサイトカイン (B) のいずれかの検出によって測定した。抗 C D 2 0 抗体 (G A 1 0 1) を陰性対照として用いた。

30

【図23】クローン 5 1 A 1 2 抗体 - サイトカイン・コンジュゲートの迅速な内在化。A
l e x a 4 8 8 標識 5 1 A 1 2 I g G k i h I F N 構築物を、H e p G 2 細胞と
インキュベーションし、そして 1 0 スタック (z レベル) に渡って、1 時間、共焦点顕微
鏡によって、A S G P R が仲介する構築物の内在化を記録した。細胞表面上の抗体 - サイ
トカイン・コンジュゲートの結合は、均質な分布よりもむしろ、クラスターで生じる (A)
。細胞表面にひとたび結合すると、コンジュゲートは小胞中に非常に迅速に内在化し、
これは、細胞体内に輸送される (B、単一細胞が取り巻く)。次いで、小胞は、細胞の頂
端側にリサイクルされて戻る (未提示)。

40

【図24】E M C V C P E (A) および H C V レプリコン (B) アッセイにおける、A
S G P R m A b - I F N 分子および他の対照 I F N 分子の抗ウイルス活性。(A) E
M C V ウイルスを添加する前に 3 時間、連続希釈した I F N 分子で H e l a 細胞を前処理
した。細胞を 2 4 時間培養し、そして C e l l T i t e r G l o を添加することによっ
て、細胞生存度を測定した。(B) H u h - 7 2 2 0 9 レプリコン細胞を、連続希釈し
た I F N 分子で処理し、そして 3 日後にルシフェラーゼ活性を測定した。

【図25】多様な肝臓および非肝臓細胞における 5 1 A 1 2 - I F N による I S G 誘導
。肝臓細胞 (初代肝細胞 (B) および H e p G 2 (A)) および非肝臓細胞 (ヒト P B M
C (D) および H e l a (C)) を、多様な連続希釈 I F N 分子で 6 時間処理し、総 R
N A を抽出し、そして T a q M a n R T - P C R を用いて、I S G M X 1 (A、C)

50

および R s a d 2 (B、D) 遺伝子発現を定量化した。示すデータは、3 またはそれより多い実験由来である。

【図 2 6】初代ヒト肝細胞 (P H H) (B) および H u h 7 (A) 細胞における、5 1 A 1 2 - I F N および 4 F 3 - I F N による持続性 I S G 誘導。初代ヒト肝細胞 (P H H) および H u h 7 細胞を、連続希釈した I F N 分子で、6 時間 (左) および 7 2 時間 (右) 処理し、総 R N A を抽出し、そして T a q M a n R T - P C R を用いて、I S G M X 1 (A) および R s a d 2 (B) 遺伝子発現を定量化した。

【図 2 7】サル肝臓試料における代表的な I S G 発現。異なる時点で収集した 4 つの用量群由来のサル肝臓試料を、マイクロアレイによって分析した。4 つの代表的な I S G 遺伝子の発現を 3 D グラフで示す。4 つの用量群を示す。各用量群に関して、左から右に、パ

10

ネル (A) において、インターフェロン・モジュール M 3 . 1 の遺伝子に関して、ベースラインからの倍変化発現値 (挿入図を参照されたい) を、R 統計パッケージ (www.r-project.org) を用いて、血液および肝臓試料の両方に関して、ヒートマップ型にプロットした。肝臓インターフェロン誘導遺伝子の教師なし階層的クラスタ形成によって、第 1 日および第 3 日、1 0 μ g / k g 用量の 5 1 A 1 2 において、非常に誘導されるが、アイソタイプ I F N 化合物によっては誘導されないサブセット (破線の長方形) が明らかになる。

20

【図 2 8 B】(B) 遺伝子のこのサブセットを、肝臓および血液の両方に関してプロットした。このサブセットの教師なし階層的クラスタを形成すると、血液および肝臓の間の発現の示差的パターンが明らかになり、ここで、ヒートマップの上半分は、5 1 A 1 2 に関する肝臓における誘導であるが、1 0 μ g / k g 用量のアイソタイプ - I F N では見られない誘導を示し、そして下半分は、高用量でのアイソタイプ - I F N に関して血液のみにおける誘導を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

30

定義

本明細書において、用語は、以下に別に定義しない限り、当該技術分野において一般的に用いられるように用いられる。

【0017】

「アジア口糖タンパク質受容体」は A S G P R と略され、別に示さない限り、哺乳動物、例えば霊長類 (例えばヒト)、非ヒト霊長類 (例えばカニクイザル) および齧歯類 (例えばマウスおよびラット) を含む、任意の脊椎動物供給源由来の、任意の天然 A S G P R を指す。用語は、「全長」のプロセッシングされていない A S G P R、ならびに細胞におけるプロセッシングから生じる A S G P R の任意の型を含む。該用語はまた、A S G P R の天然存在変異体、例えばスプライス変異体またはアレル変異体も含む。1 つの態様において、本発明の抗体は、ヒト A S G P R、特にヒト A S G P R H 1、より具体的にはヒト A S G P R H 1 の細胞外ドメインに特異的に結合可能である。

40

【0018】

ヒト A S G P R H 1 (C L E C 4 H 1 としても知られる) のアミノ酸配列は、UniProt (www.uniprot.org) 寄託番号 P 0 7 3 0 6 (バージョン 1 3 1)、または N C B I (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_001662.1 に示される。ヒト A S G P R H 1 の細胞外ドメイン (E C D) は、アミノ酸 6 2 ~ 2 9 1 位に渡る。ヒト F c 領域に融合したヒト A S G P R H 1 E C D のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 1 2 9 および 1 3 0 に示す。A S G P R H 1 E C D は、全長配列のアミノ酸 6 2 位からアミノ酸 1 6 0 位あたり

50

に渡るストーク領域（配列番号123および124は、ヒトFc領域に融合したヒトASGPR H1ストーク領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す）、および全長配列のアミノ酸161位からアミノ酸278位あたりに渡る炭水化物認識ドメイン（CRD）（配列番号117および118は、ヒトFc領域に融合したヒトASGPR H1 CRD領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す）を含む。

【0019】

1つの態様において、抗体はまた、カニクイザルASGPR、特にカニクイザルASGPR H1、より具体的にはカニクイザルASGPR H1の細胞外ドメインに結合可能である。カニクイザルASGPR H1の配列は、NCBI GenBank 寄託番号EHH57654.1に示される。配列番号131および132は、それぞれ、ヒトFc領域に融合したカニクイザルASGPR H1 ECDのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

10

【0020】

「ヒトCLEC10A」によって、UniProt 寄託番号Q8IUN9（バージョン86）に記載されるタンパク質、特に全長配列のアミノ酸61位からアミノ酸316位に渡る、前記タンパク質の細胞外ドメインを意味する。配列番号133および134は、それぞれ、ヒトFc領域に融合したヒトCLEC10A ECDのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【0021】

本明細書において、用語「コンジュゲート」は、1つのエフェクター部分、およびさらなるペプチド分子、特に抗体を含む、融合ポリペプチド分子を指す。抗体およびエフェクター部分の融合タンパク質は、「イムノコンジュゲート」と称される。本明細書で言及されるような（免疫）コンジュゲートは、融合タンパク質であり、すなわち（免疫）コンジュゲートの構成要素は、直接またはペプチドリinkerを通じてのいずれかで、ペプチド結合によって互いに連結される。

20

【0022】

「エピトープ」は、抗体によって結合される抗原の領域である。該用語は、抗体が結合し、抗体-抗原複合体を形成する、ポリペプチド巨大分子上の部位（例えばアミノ酸の連続ストレッチ、または非隣接アミノ酸の異なる領域で構成されるコンホメーション配置）を指す。

30

【0023】

「エピトープへの結合に関して競合する抗体」は、競合アッセイにおいて、50%またはそれより高く、その抗原への参照抗体の結合を遮断し、そして逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて、50%またはそれより高く、その抗原への抗体の結合を遮断する、抗体を指す。例示的な競合アッセイを本明細書に提供する。

【0024】

「特異的結合」によって、結合が、抗原に関して選択的であり、そして望ましくないまたは非特異的な相互作用から識別可能であることを意味する。酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）または当業者によく知られる他の技術、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術（BIAcore装置上で分析）（Liljebladら, Glyco J 17, 323-329 (2000)）、および伝統的な結合アッセイ（Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)）のいずれかを通じて、抗体が特異的抗原に結合する能力を測定することも可能である。1つの態様において、関連しないタンパク質に対する抗体の結合の度合いは、例えばSPRによって測定した際、抗原への抗体の結合の約10%未満である。特定の態様において、抗原に結合する抗体は、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $1\ \text{nM}$ 、 $0.1\ \text{nM}$ 、 $0.01\ \text{nM}$ 、または $0.001\ \text{nM}$ （例えば $10^{-8}\ \text{M}$ またはそれ未満、例えば $10^{-8}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ 、例えば $10^{-9}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ ）の解離定数（ K_D ）を有する。

40

【0025】

「アフィニティ」または「結合アフィニティ」は、分子（例えば抗体）の単一結合部位

50

およびその結合パートナー（例えば抗原）の間の非共有相互作用の総計の強度を指す。別に示さない限り、本明細書において、「結合アフィニティ」は、結合対（例えば抗体および抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する、内因性の結合アフィニティを指す。分子XのそのパートナーYに対するアフィニティは、一般的に、解離定数（ K_D ）によって表され、これは、解離および会合速度定数（それぞれ、 k_{off} および k_{on} ）の比である。したがって、速度定数の比が同じであり続ける限り、同等のアフィニティは、異なる速度定数を含むことも可能である。アフィニティは、本明細書に記載するものを含めて、当該技術分野に知られる一般的な方法によって測定可能である。アフィニティを測定するための特定の手法は、表面プラズモン共鳴（SPR）である。

【0026】

「減少した結合」、例えばFc受容体に対する減少した結合は、例えばSPRによって測定した際の、それぞれの相互作用に関するアフィニティの減少を指す。明確にするために、該用語には、アフィニティのゼロまでの減少（または分析法の検出限界より下）、すなわち相互作用の完全な撤廃もまた含まれる。逆に、「増加した結合」は、それぞれの相互作用に関する結合アフィニティの増加を指す。

【0027】

「内在化」によって、前記分子の細胞内空間への取り込みによって、細胞表面から分子を除去することを意味する。内在化の特定の型は、受容体が仲介するエンドサイトーシスであり、これは、細胞表面（膜貫通）受容体へのリガンドまたは抗体の結合に際して、受容体および結合したリガンドまたは抗体を含有する形質膜小胞の内側への出芽によって起こる。当該技術分野に知られる技術を用いて、内在化を評価してもよい。細胞表面上のタンパク質レベルのFACSによる決定に基づく方法を、以下の実施例に記載する。

【0028】

用語「リサイクリング」は、本明細書において、細胞内へ分子が先に内在化した後の、前記細胞の表面上での前記分子の再出現を指す。リサイクリングは、分子が、内在化に際して、細胞内で分解されないことを示す。リサイクリングが内在化と同じ速度で起こるならば、動的安定状態に到達し、この場合、細胞表面上の分子数は本質的に一定である。リサイクリングは、当該技術分野に周知の技術によって、以下の実施例に記載するように、例えば、FACSによる細胞表面上のタンパク質レベルの決定によって、または（共焦点）顕微鏡法を用いることによって、検出可能である。

【0029】

「下方制御」によって、細胞表面内または細胞表面での特定のタンパク質、例えば細胞表面受容体のコピー数の減少を意味する。下方制御は、本明細書において、特に、細胞表面上に存在する細胞表面タンパク質のコピー数の、例えば内在化および/または分解、または発現減少による、減少を指す。タンパク質レベルの下方制御は、例えばウェスタンブロット（全体のタンパク質レベルに関して）またはFACS（表面タンパク質レベルに関して）を含めて、当該技術分野において確立された多様な方法によって検出可能である。

【0030】

本明細書において、用語「エフェクター部分」は、例えばシグナル伝達または他の細胞経路を通じて、細胞活性に影響を及ぼす、分子、特にポリペプチド分子（例えばタンパク質または糖タンパク質）を指す。したがって、細胞膜の外側からのシグナルを伝達して、エフェクター部分に対する1またはそれより多い受容体を所持する細胞における反応を調節する、受容体仲介性シグナル伝達と、エフェクター部分を関連付けることも可能である。1つの態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する1またはそれより多い受容体を所持する細胞において、細胞傷害性反応を誘発することも可能である。別の態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する1またはそれより多い受容体を所持する細胞において、増殖反応を誘発することも可能である。別の態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する受容体を所持する細胞において、分化を誘発することも可能である。別の態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する受容体を所持する細胞において、内因性細胞タンパク質の発現を改変する（

10

20

30

40

50

すなわち上方制御するかまたは下方制御する)ことも可能である。エフェクター部分の限定されない例には、小分子、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、酵素、基質、および補因子が含まれる。エフェクター部分を、多様な配置で、抗体と会合させてもよい。

【0031】

用語「付着」には、化学結合またはペプチド結合を含む、任意の種類の相互作用による連結が含まれる。

「融合」は、ペプチド結合によって、直接、あるいは1またはそれより多いペプチドリンカーを通じて連結される構成要素を指す。

【0032】

本明細書において、用語「サイトカイン」は、生物学的または細胞機能またはプロセス(例えば免疫、炎症、および造血)を仲介するおよび/または制御する分子を指す。用語「サイトカイン」には、本明細書において、リンホカイン、ケモカイン、モノカイン、およびインターロイキンが含まれる。サイトカインの例には、限定されるわけではないが、GM-CSF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IFN-、IFN-、IFN-、MIP-1、MIP-1、TGF-、TNF-、およびTNF-が含まれる。特定のサイトカインは、インターフェロン(IFN)、特にIFN-である。特定の態様において、サイトカインはヒトサイトカインである。特定のサイトカイン、ヒトIFN₂およびIFN_{2a}の配列を、それぞれ、配列番号138および139に示す。

10

20

【0033】

「インターフェロン刺激遺伝子」(ISG)は、インターフェロン分子、特にIFN分子と細胞を接触させることによって、前記細胞におけるその発現が刺激されうる遺伝子を指す。典型的には、ISGは、インターフェロンに活性化される1またはそれより多いシグナル伝達分子(例えばSTAT)が結合し、それによってISGの発現増進を導く、認識配列(例えばインターフェロン刺激反応要素(ISRE))を含む。ISGの例には、MX1(ミクソウイルス耐性1、インターフェロン誘導タンパク質p78としてもまた知られる)、RSAD2(ラジカルS-アデノシルメチオニンドメイン含有2、サイトメガロウイルス誘導遺伝子5としてもまた知られる)、HRASLS2(HRAS様サブレッサー2)、IFIT1(テトラトリコペプチド反復を含むインターフェロン誘導タンパク質1)、およびIFITM2(インターフェロン誘導性膜貫通タンパク質2)が含まれる。

30

【0034】

本明細書において、用語「一本鎖」は、ペプチド結合によって直線状に連結されたアミノ酸単量体を含む分子を指す。1つの態様において、エフェクター部分は、一本鎖ペプチド分子である。一本鎖エフェクター部分の限定されない例には、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、酵素、基質、および補因子が含まれる。エフェクター部分がサイトカインであり、そして関心対象のサイトカインが通常、天然で多量体として見出される場合、多量体サイトカインの各サブユニットは、エフェクター部分の一本鎖によって連続してコードされる。したがって、有用な一本鎖エフェクター部分の限定されない例には、GM-CSF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IFN-、IFN-、IFN-、MIP-1、MIP-1、TGF-、TNF-、およびTNF-が含まれる。

40

【0035】

本明細書において、用語「エフェクター部分受容体」は、エフェクター部分に特異的に結合可能なポリペプチド分子を指す。エフェクター部分が、1より多い受容体に特異的に結合する場合、エフェクター部分に特異的に結合するすべての受容体は、そのエフェクター部分に関して、「エフェクター部分受容体」である。例えば、IFNがエフェクター部分である場合、IFN分子(例えばIFNに融合した抗体)に結合するエフェクタ

50

一部分受容体は、IFN 受容体 1 または 2 である (ヒト IFN 受容体 1 に関しては、UniProt 寄託番号 P17181 (バージョン 121) および NCBI RefSeq NP_000620.2、ならびにヒト IFN 受容体 2 に関しては、UniProt 寄託番号 P48551 (バージョン 131) および NCBI RefSeqs NP_997467.1 および NP_997468.1 を参照されたい)。

【0036】

用語「抗体」は、本明細書において、最も広い意味で用いられ、そして限定されるわけではないが、望ましい抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば二重特異性抗体)、および抗体断片を含む、多様な抗体構造を含む。

【0037】

「抗体断片」は、損なわれていない (intact) 抗体が結合する抗原に結合する損なわれていない抗体の部分を含む、損なわれていない抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、限定されるわけではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、(Fab')₂、ディアボディ、直鎖抗体、一本鎖抗体分子 (例えば scFv)、および単ドメイン抗体が含まれる。特定の抗体断片の概説に関しては、Hudsonら, Nat Med 9, 129-134 (2003) を参照されたい。scFv断片の概説に関しては、例えば Plueckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113 中, Rosenburg および Moore 監修, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照されたい; また、WO 93/16185; ならびに米国特許第 5,571,894 号 および 第 5,587,458 号 も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、そして増加した in vivo 半減期を有する Fab および (Fab')₂ 断片の考察に関しては、米国特許第 5,869,046 号 を参照されたい。ディアボディは、二価または二重特異性でありうる、2つの抗原結合部位を持つ抗体断片である。例えば、EP 404,097; WO 1993/01161; Hudsonら, Nat Med 9, 129-134 (2003); および Hollingerら, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993) を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディもまた、Hudsonら, Nat Med 9, 129-134 (2003) に記載される。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてまたは一部あるいは軽鎖可変ドメインのすべてまたは一部を含む抗体断片である。特定の態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., マサチューセッツ州ウォルサム; 例えば、米国特許第 6,248,516 B1 号 を参照されたい)。限定されるわけではないが、本明細書に記載するような、損なわれていない抗体のタンパク質分解的消化、ならびに組換え宿主細胞 (例えば大腸菌 (E. coli) またはファージ) による産生を含む、多様な技術によって、抗体断片を作製してもよい。

【0038】

用語「全長抗体」、「損なわれていない抗体」、および「全抗体」は、本明細書において、交換可能に用いられ、天然抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、または本明細書に定義するような Fc 領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

【0039】

「天然抗体」は、多様な構造を持つ天然存在免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然 IgG クラス抗体は、約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合された 2つの軽鎖および 2つの重鎖で構成される。N 末端から C 末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも称される可変領域 (VL)、その後、重鎖定常領域とも呼ばれる 3つの定常ドメイン (CH1、CH2、および CH3) を有する。同様に、N 末端から C 末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも称される可変領域 (VL)、その後、軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン (CL) を有する。抗体重鎖は、(IgA)、(IgD)、(IgE)、(

10

20

30

40

50

I g G) または μ (I g M) と称される 5 つのタイプの 1 つに割り当て可能であり、これらのいくつかはさらに、サブタイプ、例えば 1 (I g G $_1$)、 2 (I g G $_2$)、 3 (I g G $_3$)、 4 (I g G $_4$)、 1 (I g A $_1$) および 2 (I g A $_2$) にさらに分割可能である。抗体軽鎖は、カッパ (κ) およびラムダ (λ) と称される 2 つのタイプの 1 つに割り当て可能である。I g G クラス抗体は、本質的に 2 つの F a b 断片および F c ドメインからなり、免疫グロブリンヒンジ領域を通じて連結される。

【 0 0 4 0 】

本明細書において、「F a b 断片」は、V L ドメインおよび軽鎖の定常ドメイン (C L) を含む軽鎖断片、ならびに V H ドメインおよび重鎖の第一の定常ドメイン (C H 1) を含む、抗体断片を指す。

【 0 0 4 1 】

抗体または免疫グロブリンの「クラス」は、重鎖によって所持される定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。抗体の 5 つの主要なクラス：I g A、I g D、I G E、I g G、および I g M があり、そしてこれらのいくつかは、さらにサブクラス (アイソタイプ)、例えば I g G $_1$ 、I g G $_2$ 、I g G $_3$ 、I g G $_4$ 、I g A $_1$ 、および I g A $_2$ に分割可能である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 κ 、 λ 、および μ と称される。

【 0 0 4 2 】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗原への抗体の結合に關与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれ、V H および V L) は、一般的に、類似の構造を有し、各ドメインは、4 つの保存されるフレームワーク領域 (F R) および 3 つの超可変領域 (H V R) を含む。例えば、Kindt ら、Kuby Immunology, 第 6 版, W. H. Freeman and Co., 91 ページ (2007) を参照されたい。単一 V H または V L ドメインは、抗原結合特異性を与えるのに十分でありうる。

【 0 0 4 3 】

用語「超可変領域」または「H V R」は、本明細書において、配列が超可変であり、そして / または構造的に定義されるループ (「超可変ループ」) を形成する、抗体可変ドメインの領域各々を指す。一般的に、天然の 4 鎖抗体は、6 つの H V R を含み ; 3 つは V H 中 (H 1、H 2、H 3) にあり、そして 3 つは V L 中 (L 1、L 2、L 3) にある。H V R は、一般的に、超可変ループ由来、および / または相補性決定領域 (C D R) 由来のアミノ酸残基を含み、後者は最高の配列可変性を持ち、そして / または抗原認識に關与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基 26 ~ 32 (L 1)、50 ~ 52 (L 2)、91 ~ 96 (L 3)、26 ~ 32 (H 1)、53 ~ 55 (H 2)、および 96 ~ 101 (H 3) に存在する (Chothia および Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 - 917 (1987))。例示的な C D R (C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3、C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3) は、L 1 のアミノ酸残基 24 ~ 34、L 2 の 50 ~ 56、L 3 の 89 ~ 97、H 1 の 31 ~ 35 B、H 2 の 50 ~ 65 および H 3 の 95 ~ 102 に存在する (Kabat ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。V H 中の C D R 1 を例外として、C D R は、一般的に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。C D R はまた、抗原と接触する残基である「特異性決定残基」または「S D R」も含む。S D R は、短縮 - C D R または a - C D R と称される C D R の領域内に含有される。例示的な a - C D R (a - C D R - L 1、a - C D R - L 2、a - C D R - L 3、a - C D R - H 1、a - C D R - H 2、および a - C D R - H 3) は、L 1 のアミノ酸残基 31 ~ 34、L 2 の 50 ~ 55、L 3 の 89 ~ 96、H 1 の 31 ~ 35 B、H 2 の 50 ~ 58、および H 3 の 95 ~ 102 に存在する (Almagro および Fransson, Front. Biosci. 13, 1619 - 1633 (2008) を参照された

10

20

30

40

50

い)。別に示さない限り、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書において、Kabataら、上記にしたがって番号付けされる(「Kabata番号付け」と称される)。

【0044】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に、4つのFRドメイン:FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。したがって、HVRおよびFR配列は、一般的に、VH(またはVL)中、以下の順序で現れる:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0045】

「アフィニティ成熟」抗体は、こうした改変を持たない親抗体と比較して、1またはそれより多い超可変領域(HVR)中に1またはそれより多い改変を持つ抗体を指し、こうした改変は、抗原に対する抗体アフィニティの改善を生じる。

【0046】

用語「親抗体」は、本明細書において、抗体変異体の調製の出発点または基礎として働く抗体を指す。1つの態様において、親抗体は、ヒト化またはヒト抗体である。

「ヒト抗体」は、ヒトまたはヒト細胞によって産生されるか、あるいはヒト抗体レパートリーまたは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のものに対応するアミノ酸配列を所持するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に排除する。

【0047】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において、実質的に均質な抗体集団から得られる抗体、すなわち個々の抗体を含む集団が、例えば天然存在突然変異またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる突然変異を含有するありうる変異体抗体を除いて、同一であり、そして/または同じエピトープに結合する抗体を意味し、こうした変異体は一般的に少量でしか存在しない。典型的には、異なる決定基(エピトープ)に対して向けられる、異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられる。したがって、修飾語句「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られているものとしての抗体の特性を示し、そしていかなる特定の方法による抗体の産生も必要とするとは見なされないものとする。例えば、本発明にしたがって用いようとするモノクローナル抗体は、限定されるわけではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージ-ディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む、多様な技術によって作製可能であり、こうした方法およびモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は、本明細書に記載される。

【0048】

用語「Fcドメイン」または「Fc領域」は、本明細書において、定常領域の少なくとも部分を含む抗体重鎖のC末端領域を定義するよう用いられる。該用語には、天然配列Fc領域および変異体Fc領域が含まれる。IgG Fc領域は、IgG CH2およびIgG CH3ドメインを含む。ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」は、通常、ほぼ231位のアミノ酸残基から、ほぼ340位のアミノ酸残基に渡る。1つの態様において、炭水化物鎖がCH2ドメインに付着する。CH2ドメインは、本明細書において、天然配列CH2ドメインまたは変異体CH2ドメインであることも可能である。「CH3ドメイン」は、Fc領域中のC末端からCH2ドメインまでの残基のストレッチを含む(すなわち、IgGのほぼ341位のアミノ酸残基からほぼ447位のアミノ酸残基)。CH3領域は、本明細書において、天然配列CH3ドメインまたは変異体CH3ドメイン(例えば、その1つの鎖に、導入された「突起」(「ノブ」)を、そしてその他方の鎖に、対応して導入された「空洞」(「穴」)を持つCH3ドメイン;本明細書に明らかに援用される米国特許第5,821,333号を参照されたい)であることも可能である。こうした変異体CH3ドメインを用いて、本明細書に記載するような2つの同一でない抗体

10

20

30

40

50

重鎖のヘテロ二量体化を促進することも可能である。1つの態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端に渡る。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在してもまたはしなくてもよい。別に明記しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるような、EUインデックスとも称されるEU番号付け系にしたがう。

【0049】

用語「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプで異なる、抗体のFc領域に起因するその生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例には：C1q結合および補体依存性細胞傷害性(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞伸介性細胞傷害性(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体伸介性抗原取り込み、細胞表面受容体(例えばB細胞受容体)の下方制御、およびB細胞活性化が含まれる。

【0050】

「活性化Fc受容体」は、抗体のFc領域による会合後、受容体所持細胞がエフェクター機能を実行するように刺激する事象を誘発する、Fc受容体である。活性化Fc受容体には、FcRIIIa(CD16a)、FcRI(CD64)、FcRIIIa(CD32)、およびFcRI(CD89)が含まれる。特定の活性化Fc受容体は、ヒトFcRIIIa(UniProt寄託番号P08637(バージョン141))を参照されたい)である。

【0051】

用語「ペプチドリンカー」は、典型的には約2~20アミノ酸である、1またはそれより多いアミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは当該技術分野に知られるか、または本明細書に記載される。適切な非免疫原性リンカーペプチドには、例えば、(G₄S)_n、(SG₄)_nまたはG₄(SG₄)_nペプチドリンカーが含まれる。「n」は一般的に1~10、典型的には2~4の間の数字である。

【0052】

「ヘテロ二量体化を促進する修飾」は、ペプチド主鎖の操作、またはポリペプチド、例えば抗体重鎖の翻訳後修飾であり、ホモ二量体を形成するような、同一ポリペプチドを持つポリペプチドの会合を減少させるかまたは防止する。本明細書において、ヘテロ二量体化を促進する修飾には、特に、二量体を形成することが望ましい2つのポリペプチド各々に作製される別個の修飾が含まれ、ここで、修飾は、2つのポリペプチドの会合を促進するように、互いに相補的である。例えば、ヘテロ二量体化を促進する修飾は、それぞれ、その会合が立体的にまたは静電的に好ましくなるように、二量体を形成することが望ましいポリペプチドの一方または両方の構造または電荷を改変することも可能である。ヘテロ二量体化は、2つの非同ポリペプチド、例えば重鎖各々に付着しているさらなる構成要素(例えばエフェクター部分)が同じではない2つの抗体重鎖の間で起こる。本発明にしたがった抗体において、ヘテロ二量体化を促進する修飾は、Fcドメイン中、特にCH3ドメイン中である。いくつかの態様において、ヘテロ二量体化を促進する修飾はアミノ酸突然変異、特にアミノ酸置換を含む。特定の態様において、ヘテロ二量体化を促進する修飾は、2つの抗体重鎖各々において、別個のアミノ酸突然変異、具体的にはアミノ酸置換を含む。

【0053】

「ノブを穴に修飾」は、CH3ドメイン中の2つの抗体重鎖の間の界面内の修飾を指し、i)1つの重鎖のCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基はより大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって1つの重鎖のCH3ドメイン中の界面内に突起(「ノブ」)を生成し、これを他方の重鎖のCH3ドメイン中の界面内の空洞(「穴」)

10

20

30

40

50

中に配置可能であり、そして i i) 他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいて、アミノ酸残基はより小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって第二の C H 3 ドメイン中の界面内に空洞 (「穴」) を生成し、この中に第一の C H 3 ドメイン中の界面内の突起 (「ノブ」) が配置可能である。1つの態様において、「ノブを穴に修飾」は、1つの抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 W および場合によってアミノ酸置換 S 3 5 4 C を、そして他方の抗体重鎖において、アミノ酸置換 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V および場合によって Y 3 4 9 C を含む。

【 0 0 5 4 】

アミノ酸「置換」は、1つのアミノ酸の別のアミノ酸でのポリペプチド中の交換を指す。1つの態様において、アミノ酸は、類似の構造的および/または化学的特性を有する別のアミノ酸で置換され、例えば保存的アミノ酸置換である。「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性性質の類似性に基づいて行われうる。例えば、非極性 (疎水性) アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれ; 極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれ; 陽性荷電 (塩基性) アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれ; そして陰性荷電 (酸性) アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーの、別のクラスに対する交換を伴うであろう。例えばアミノ酸置換は、1つのアミノ酸の、異なる構造的および/または化学的特性を有する別のアミノ酸での置換を生じることにも可能であり、例えば1つの群 (例えば極性) 由来のアミノ酸の、異なる群 (例えば塩基性) 由来の別のアミノ酸での置換がある。当該技術分野に周知の遺伝的または化学的方法を用いて、アミノ酸置換を生成してもよい。遺伝的方法には、部位特異的突然変異誘発、PCR、遺伝子合成等が含まれうる。遺伝子操作以外の方法によって、アミノ酸側鎖基を改変する方法が意図され、例えば化学修飾もまた有用でありうる。本明細書において、同じアミノ酸置換を示すために、多様な指定が用いられうる。例えば、Fcドメインの329位のプロリンからグリシンへの置換は、329G、G329、G₃₂₉、P329GまたはPro329G1yと示されうる。

【 0 0 5 5 】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、配列を整列させ、そして必要であればギャップを導入して最大配列同一性パーセントを達成した後、そしていかなる保存的置換も配列同一性の一部と見なさずに、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の割合と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のための整列は、当該技術分野の技術範囲内の多様な方式で、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegaAlign (DNASTAR) ソフトウェアを用いて、達成可能である。当業者は、配列を整列させるために、適切なパラメータを決定可能であり、これには、比較しようとする配列の全長に渡って、最大整列を達成するのに必要ないかなるアルゴリズムも含まれる。しかし、本明細書の目的のため、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて、アミノ酸同一性%値を生成する。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって作成され、そしてソースコードは、米国著作権局, Washington D.C., 20559にユーザー文書とともにファイリングされ、米国著作権登録番号TXU510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc.、カリフォルニア州サウスサンフランシスコから公的に入手可能であるか、またはソースコードからコンパイル可能である。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX (登録商標) V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム上で使用するためにはコンパイルしなければならない。すべての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムによって設定され、そして多様ではない。ALIGN-2をアミノ酸配列比較に使用する状況においては、所定のアミノ酸配列Aの、所定のアミノ酸配列Bへの、Bとの、ま

10

20

30

40

50

たはBに対するアミノ酸配列同一性%（あるいは所定のアミノ酸配列Bへの、Bとの、またはBに対する特定のアミノ酸配列同一性%を有するかまたは含む、所定のアミノ酸配列Aと表現することも可能である）は、以下のように計算される：

分数 X / Y の 100 倍

式中、Xは、AおよびBのプログラムの整列中の配列整列プログラムALIGN-2によって同一マッチとスコアリングされたアミノ酸残基の数であり、そしてYはB中のアミノ酸残基総数である。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さと同じでない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%と等しくないであろうことが認識されるであろう。別に明記しない限り、本明細書で用いるすべてのアミノ酸配列同一性%値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて、直前の

10

【0056】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書において、交換可能に用いられ、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、そしてDNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および/またはその類似体、あるいはDNAもしくはRNAポリメラーゼによって、または合成反応によって、ポリマー内に取り込まれうる任意の基質であってもよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびその類似体を含んでもよい。ヌクレオチド配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、合成後に作製される修飾（単数または複数）、例えば標識へのコンジュ

20

【0057】

用語「ベクター」は、本明細書において、連結している別の核酸を増殖させることが可能な核酸分子を指す。該用語には、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびに導入されている宿主細胞ゲノム内に取り込まれたベクターが含まれる。特定のベクターは、機能可能であるように連結されている核酸の発現を指示することが可能である。こうしたベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と称される。

【0058】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養」は、交換可能に用いられ、そしてこうした細胞の子孫を含めて、外因性核酸が導入されている細胞を指す。宿主細胞には、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これには、初代形質転換細胞、および継代数に関わらず、これに由来する子孫が含まれる。子孫は、親細胞と核酸内容物が完全に同一でなくてもよく、突然変異を含有してもよい。元来形質転換された細胞において、スクリーニングされるかまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。宿主細胞は、本発明の抗体を生成するために使用可能な任意のタイプの細胞系である。宿主細胞には、培養細胞、例えば哺乳動物培養細胞、例えばいくつかのみ挙げれば、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞またはハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞、および植物細胞が含まれるが、また、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物または培養植物または動物組織内に

30

40

【0059】

剤の「有効量」は、投与される細胞または組織において、生理学的変化を生じるのに必要な量を指す。

剤、例えば薬学的組成物の「療法的有効量」は、望ましい療法的または予防的結果を達成するのに必要な投薬量および期間で、有効な量を指す。剤の療法的有効量、例えば、疾患の不都合な影響を排除するか、減少させるか、遅延させるか、最小限にするか、または防止する。

【0060】

「個体」または「被験体」は、哺乳動物である。哺乳動物には、限定されるわけではな

50

いが、家畜（例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えばヒトおよび非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ、および齧歯類（例えばマウスおよびラット）が含まれる。特に、個体または被験体はヒトである。

【0061】

用語「薬学的組成物」は、含有される活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような型で、そして配合物を投与する被験体に対して、許容しえないほど毒性であるさらなる構成要素をまったく含有しない、調製物を指す。

【0062】

「薬学的に許容されうるキャリアー」は、活性成分以外であり、被験体に対して毒性でない、薬学的組成物中の成分を指す。薬学的に許容されうるキャリアーには、限定されるわけではないが、緩衝剤、賦形剤、安定化剤、または保存剤が含まれる。

10

【0063】

本明細書において、「治療」（およびその文法的な変形、例えば「治療する」または「治療すること」）は、治療中の個体において、疾患の天然経過を改変することを試みる臨床的介入を指し、そして予防のため、または臨床病理経過中のいずれで実行することも可能である。治療の望ましい効果には、限定されるわけではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患の任意の直接または間接的病理学的結果の減少、転移の防止、疾患進行速度の減少、疾患状態の回復および緩和、ならびに予後の寛解または改善が含まれる。いくつかの態様において、本発明の抗体を用いて、疾患の発症を遅延させるかまたは疾患の進行を緩慢にする。

20

【0064】

本発明の抗体

本発明は、アジアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）に結合する、新規抗体、特にモノクローナル抗体を提供する。

【0065】

第一の側面において、本発明は、アジアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）に特異的に結合可能な抗体であって、a) 配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列；b) 配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列；c) 配列番号8の重鎖可変領域配列および配列番号6の軽鎖可変領域配列；d) 配列番号12の重鎖可変領域配列および配列番号10の軽鎖可変領域配列；e) 配列番号20の重鎖可変領域配列および配列番号18の軽鎖可変領域配列；f) 配列番号24の重鎖可変領域配列および配列番号22の軽鎖可変領域配列；g) 配列番号28の重鎖可変領域配列および配列番号26の軽鎖可変領域配列；h) 配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号30の軽鎖可変領域配列；i) 配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号32の軽鎖可変領域配列；j) 配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号34の軽鎖可変領域配列；またはk) 配列番号24の重鎖可変領域配列および配列番号22の軽鎖可変領域配列を含む、前記抗体を提供する。

30

【0066】

本発明にしたがって、特定の抗体は、配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む。この抗体クローンは4F3と称される。本発明にしたがった別の特定の抗体は、配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む。この抗体は51A12と称される。

40

【0067】

本発明は、ASGPRに特異的に結合可能であり、そして抗体4F3とASGPRのエピトープへの結合に関して競合する抗体を提供する。1つの態様において、こうした抗体は、4F3と同じエピトープに結合する。4F3抗体は、ASGPRのストーク領域中のエピトープを認識する。したがって、1つの態様において、こうした抗体は、ASGPRのストーク領域中のエピトープを認識する。本発明によってやはり意図されるのは、4F3抗体のアフィニティ成熟変異体である。1つの態様において、こうした抗体は、配列番号16の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である重鎖可変領

50

域配列、および配列番号14の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、こうした抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、こうした抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号16の重鎖可変領域配列を含む。4F3抗体の変異体はまた、変異体軽鎖可変領域とともに、4F3の重鎖可変領域と同一である重鎖可変領域も含んでもよく、またはその逆でもよい。

【0068】

本発明はさらに、ASGPRに特異的に結合可能であり、そして抗体51A12とASGPRのエピトープへの結合に関して競合する抗体を提供する。1つの態様において、こうした抗体は、51A12と同じエピトープに結合する。51A12抗体は、ASGPRの炭水化物認識ドメイン(CRD)中のエピトープを認識する。したがって、1つの態様において、こうした抗体は、ASGPRのCRD中のエピトープを認識する。本発明によってやはり意図されるのは、51A12抗体のアフィニティ成熟変異体、特に軽鎖CDR3または51A12のランダム化によって得られる変異体である。1つの態様において、こうした抗体は、配列番号4の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である重鎖可変領域配列、および配列番号2の配列に少なくとも約96%、97%、98%または99%同一である軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、こうした抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む。1つの態様において、こうした抗体は、1、2、3、4、5、6または7の、特に2、3、4または5のアミノ酸置換を含む配列番号4の重鎖可変領域配列を含む。51A12抗体の変異体はまた、変異体軽鎖可変領域とともに、51A12の重鎖可変領域と同一である重鎖可変領域も含んでもよく、またはその逆でもよい。1つの態様において、こうした抗体は、a)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号36の軽鎖可変領域配列；b)配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号38の軽鎖可変領域配列；c)配列番号8の重鎖可変領域配列および配列番号40の軽鎖可変領域配列；d)配列番号12の重鎖可変領域配列および配列番号42の軽鎖可変領域配列；e)配列番号20の重鎖可変領域配列および配列番号44の軽鎖可変領域配列；f)配列番号24の重鎖可変領域配列および配列番号46の軽鎖可変領域配列；またはg)配列番号28の重鎖可変領域配列および配列番号48の軽鎖可変領域配列を含む。

【0069】

好ましくは、本発明の抗体はヒト抗体であり、すなわち抗体はヒト可変および定常領域を含む。1つの態様において、抗体は、ヒトFc領域、特にヒトIgG₁ Fc領域、より具体的にはヒトIgG₁ Fc領域を含む。本発明にしたがった特定の抗体は、全長抗体、特に全長IgG₁クラス抗体、より具体的には全長IgG₁サブクラス抗体である。あるいは、抗体は、抗体断片であってもよい。1つの態様において、抗体は、Fab断片またはscFv断片中である。いくつかの態様において、抗体は、免疫グロブリンヒンジ領域、特にヒトIgGヒンジ領域、より具体的にはヒトIgG₁ヒンジ領域によって連結された、Fab断片およびFc領域、特にヒトIgG₁ Fc領域、より具体的にはヒトIgG₁ Fc領域を含む。特に、抗体は、免疫グロブリンヒンジ領域によって連結された、Fab断片およびFc領域を含んでもよく、ここでさらなるFab断片は存在しない。こうした態様において、抗体は、本質的に、1つのFab断片を欠く全長抗体である。

【0070】

本発明の抗体で構成されるFc領域は、天然Fc領域に比較した際、多様な修飾を含んでもよい。

Fcドメインは、ターゲット組織における優れた集積および好ましい組織-血液分布比に寄与する長い血清半減期を含む、好ましい薬理学的特性を抗体に与えるが、同時に、好ましい抗原所持細胞に対するよりも、Fc受容体を発現している細胞への抗体の望ましくないターゲティングを導きうる。さらに、Fc受容体シグナル伝達経路の同時活性化は、サイトカイン放出を導く可能性もあり、これは、特に、付着したエフェクター部分(例え

10

20

30

40

50

ばサイトカイン)を有する抗体において、サイトカイン受容体の過剰な活性化および全身投与に際して重度の副作用を生じうる。したがって、いくつかの態様において、抗体は、非修飾Fc領域を含む対応する抗体に比較した際、Fc領域中に、Fc受容体、特にFc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる修飾を含む。Fc受容体への結合は、ELISAによって、または表面プラズモン共鳴(SPR)によって、標準的な装置、例えばBIAcore装置(GE Healthcare)および組換え発現によって選られるものなどのFc受容体を用いて、容易に決定可能である。結合アフィニティを測定するための、特定の例示的なおよび典型的な態様を以下に記載する。1つの態様にしたがって、BIACORE(登録商標)T100装置(GE Healthcare)を、CM5チップ上に固定されたリガンド(Fc受容体)とともに25で用いた表面プラズモン共鳴によって、Fc受容体への結合アフィニティを測定する。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5、GE Healthcare)を、供給者の指示にしたがって、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化する。組換えリガンドを10mM酢酸ナトリウム、pH5.5で、0.5~30μg/mlに希釈した後、10μl/分の流速で注入して、およそ100~5000反応単位(RU)のカップリングタンパク質を達成する。リガンド注入後、1Mエタノールアミンを注入して未反応基をブロックする。動力学的測定のため、抗体の3~5倍の連続希釈(~0.01nM~300nMの間の範囲)をHBS-EP+(GE Healthcare、10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%サーファクタントP20、pH7.4)中、25で、およそ30~50μl/分の流速で注入する。会合および解離センサーグラムを同時に適合させることによって、単純な1対1ラングミュア結合モデル(BIACORE(登録商標)T100評価ソフトウェアバージョン1.1.1)を用いて、会合速度(k_{on})および解離速度(k_{off})を計算する。平衡解離定数(K_D)を比 k_{off}/k_{on} として計算する。例えば、Chenら、J Mol Biol 293, 865-881(1999)を参照されたい。あるいは、特定のFc受容体を発現することが知られる細胞株、例えばFcγRIIIa受容体を発現しているNK細胞を用いて、Fc受容体に対する結合アフィニティ抗体を評価してもよい。

【0071】

修飾において、Fc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる1またはそれより多いアミノ酸突然変異を含む。典型的には、同じ1またはそれより多いアミノ酸突然変異が、Fcドメイン中、2つの抗体重鎖の各々に存在する。1つの態様において、前記アミノ酸突然変異は、少なくとも2倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍、Fc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる。Fc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる、1より多いアミノ酸突然変異がある態様において、これらのアミノ酸突然変異の組み合わせは、少なくとも10倍、少なくとも20倍、またはさらに少なくとも50倍、Fc受容体への抗体の結合アフィニティを減少させる。1つの態様において、抗体は、非修飾Fcドメインを含む抗体に比較した際、20%未満、特に10%未満、より具体的には5%未満の、Fc受容体に対する結合アフィニティを示す。

【0072】

1つの態様において、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。特定の態様において、Fc受容体はFc受容体、より具体的にはFcγRIIIa、FcγRIまたはFcγRIIa受容体である。好ましくは、これらの受容体各々への結合が減少する。いくつかの態様において、補体構成要素への結合アフィニティ、特にC1qへの結合アフィニティもまた減少する。1つの態様において、新生Fc受容体(FcRn)への結合アフィニティは減少しない。FcRnへの実質的に類似の結合、すなわち前記受容体への抗体の結合アフィニティの保持は、抗体が、FcRnへの抗体の非修飾型の結合アフィニティの約70%より高い結合アフィニティを示す場合、達成されている。本発明の抗体は、こうしたアフィニティの約80%より高い、そしてさらに約90%より高いアフィニティを示すこ

10

20

30

40

50

とも可能である。1つの態様において、アミノ酸突然変異はアミノ酸置換である。1つの態様において、抗体は、P329位(EU番号付け)でFc領域中にアミノ酸置換を含む。より具体的な態様において、アミノ酸置換はP329AまたはP329G、特にP329Gである。1つの態様において、抗体は、S228、E233、L234、L235、N297およびP331より選択される位で、Fc領域中にさらなるアミノ酸置換を含む。より具体的な態様において、さらなるアミノ酸置換は、S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297DまたはP331Sである。特定の態様において、抗体は、P329、L234およびL235位で、Fc領域中にアミノ酸置換を含む。より具体的な態様において、抗体は、アミノ酸突然変異L234A、L235AおよびP329G(LALA P329G)を含む。アミノ酸置換のこの組み合わせは、本明細書にその全体が援用される、PCT特許出願第PCT/EP2012/055393号に記載されるように、ヒトIgG抗体のFc受容体結合をほぼ完全に無効にする。PCT特許出願第PCT/EP2012/055393号はまた、こうした修飾抗体を調製する方法、およびFc受容体結合またはエフェクター機能などのその特性を決定するための方法も記載する。

10

【0073】

当該技術分野に周知の遺伝的または化学的方法を用いて、アミノ酸欠失、置換、挿入または修飾によって、Fc領域中に修飾を含む抗体を調製することも可能である。遺伝的方法には、コードDNA配列の部位特異的突然変異誘発、PCR、遺伝子合成等が含まれる。例えば配列決定によって、正しいヌクレオチド変化を検証してもよい。

20

【0074】

Fc受容体結合を減少させる修飾を含む抗体は、一般的に、対応する非修飾抗体と比較した際、エフェクター機能減少、特にADCC減少を有する。いくつかの態様において、抗体はADCC減少を有する。特定の態様において、ADCC減少は、非修飾Fc領域を含む対応する抗体によって誘導されるADCCの20%未満である。当該技術分野に知られる方法によって、抗体のエフェクター機能を測定することも可能である。関心対象の分子のADCC活性を評価する*in vitro*アッセイの例は、米国特許第5,500,362号; Hellstromら Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063(1986)およびHellstromら, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502(1985); 米国特許第5,821,337号; Bruggemannら, J Exp Med 166, 1351-1361(1987)に記載される。あるいは、非放射性アッセイ法を使用してもよい(例えば、フローサイトメトリー用のACTITM非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. カリフォルニア州マウンテンビュー); およびCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega、ウィスコンシン州マディソン)を参照されたい)。こうしたアッセイの有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、関心対象の分子のADCC活性を*in vivo*で、例えばClynesら, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656(1998)に開示されるものなどの動物モデルにおいて、評価してもよい。いくつかの態様において、補体構成要素、特にC1qに対する抗体の結合もまた減少する。したがって、補体依存性細胞傷害性(CDC)もまた減少しうる。C1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合可能であるかどうか、そしてしたがってCDC活性を有するかどうかを決定してもよい。例えばWO 2006/029879およびWO 2005/100402中のC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するため、CDCアッセイを行ってもよい(例えば、Gazzano-Santoroら, J Immunol Methods 202, 163(1996); Craggら, Blood 101, 1045-1052(2003); ならびにCraggおよびGlennie, Blood 103, 2738-2743(2004)を参照されたい)。

30

40

50

【0075】

上記のそしてPCT特許出願第PCT/EP2012/055393の抗体に加えて、Fc受容体結合および/またはエフェクター機能が減少した抗体にはまた、Fc領域残基238、265、269、270、297、327および329の1またはそれより多くに置換を持つものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。こうしたFc突然変異体には、アミノ酸265、269、270、297および327位の2またはそれより多くでの置換を含むFc突然変異体が含まれ、残基265および297のアラニンへの置換を含む、いわゆる「DANA」Fc突然変異体が含まれる(米国特許第7,332,581号)。

【0076】

IgG₄抗体は、IgG₁抗体に比較した際、Fc受容体への減少した結合アフィニティおよび減少したエフェクター機能を示す。したがって、いくつかの態様において、本発明の抗体は、IgG₄サブクラス抗体、特にヒトIgG₄サブクラス抗体である。1つの態様において、IgG₄抗体は、S228位で、Fc領域中にアミノ酸置換、具体的には、アミノ酸置換S228Pを含む。Fc受容体への結合アフィニティおよび/またはそのエフェクター機能をさらに減少させるため、1つの態様において、IgG₄抗体は、L235位でアミノ酸置換、具体的にはアミノ酸置換L235Eを含む。別の態様において、IgG₄抗体は、P329位でアミノ酸置換、具体的には、アミノ酸置換P329Gを含む。特定の態様において、IgG₄抗体は、S228、L235およびP329位でアミノ酸置換、具体的には、アミノ酸置換S228P、L235EおよびP329Gを含む。こうした修飾IgG₄抗体およびそのFc受容体は、本明細書にその全体が援用される、PCT特許出願第PCT/EP2012/055393号に記載される。

【0077】

本発明にしたがった抗体は、付着したサイトカインなどのエフェクター部分を有してもよい。特定の態様において、抗体は、2つの抗体重鎖の1つに融合したただ1つの単一エフェクター部分を含み、したがって、これらの抗体は、2つの非同ーポリペプチド鎖を含む。同様に、本発明の抗体は、Fab断片の1つを欠く全長抗体であってもよく、したがって、全抗体重鎖、ならびにVHおよびCH1ドメインを欠く抗体重鎖を含む。これらのポリペプチドの組換え同時発現および続く二量体化は、2つのポリペプチドのいくつかのありうる組み合わせを導き、このうち、2つの非同ーポリペプチドのヘテロ二量体のみが有用である。組換え産生において、こうした抗体の収量および純度を改善するため、したがって、2つの非同ーポリペプチド(例えばエフェクター部分を含む2つのポリペプチドまたはエフェクター部分を欠く2つのポリペプチド)のホモ二量体の形成を妨害する、そして/またはエフェクター部分を含むポリペプチドおよびエフェクター部分を欠くポリペプチドのヘテロ二量体の形成を促進する修飾を、抗体のFc領域に導入することが好適でありうる。したがって、いくつかの態様において、本発明の抗体は、Fc領域中に、2つの非同ー抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾を含む。ヒトIgG抗体の2つの重鎖の間の最も広範なタンパク質-タンパク質相互作用の部位は、Fc領域のCH3ドメイン中である。したがって、1つの態様において、前記修飾は、Fc領域のCH3ドメイン中である。特定の態様において、前記修飾はノブを穴に修飾であり、2つの抗体重鎖の一方の抗体重鎖にノブ修飾を、そしてもう一方に穴修飾を含む。ノブを穴に技術は、例えば、US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgwayら, Prot Eng 9, 617-621(1996)およびCarter, J Immunol Meth 248, 7-15(2001)に記載される。一般的に、該方法は、ヘテロ二量体形成を促進し、そしてホモ二量体形成を妨害するため、突起が空洞中に配置可能であるように、第一のポリペプチドの界面に突起(「ノブ」)を、そして第二のポリペプチドの界面中に対応する空洞(「穴」)を導入することを伴う。突起は、第一のポリペプチドの界面から小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(例えばチロシンまたはトリプトファン)で置換することによって構築される。突起と同一のまたは類似のサイズの補償空洞は、大きいアミノ酸側鎖をより小さいもの(例えばアラニンまたはスレオニン)で置

10

20

30

40

50

換することによって、第二のポリペプチドの界面中に生成される。したがって、1つの態様において、抗体は、CH₃ドメイン中の2つの抗体重鎖間の界面内に修飾を含み、i) 1つの重鎖のCH₃ドメインにおいて、アミノ酸残基はより大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって1つの重鎖のCH₃ドメイン中の界面内に突起(「ノブ」)を生成し、これを他方の重鎖のCH₃ドメイン中の界面内の空洞(「穴」)中に配置可能であり、そしてii) 他方の重鎖のCH₃ドメインにおいて、アミノ酸残基はより小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって第二のCH₃ドメイン中の界面内に空洞(「穴」)を生成し、この中に第一のCH₃ドメイン中の界面内の突起(「ノブ」)が配置可能である。突起および空洞は、例えば部位特異的突然変異誘発によって、またはペプチド合成によって、ポリペプチドをコードする核酸を改変することによって、作製可能である。特定の態様において、ノブ修飾は、2つの抗体重鎖の一方に、アミノ酸置換T366W(EU番号付け)を含み、そして穴修飾は、2つの抗体重鎖の他の一方に、アミノ酸置換T366S、L368A、Y407V(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、ノブ修飾を含む抗体重鎖は、さらに、アミノ酸置換S354Cを含み、そして穴修飾を含む抗体重鎖はさらに、アミノ酸置換Y349Cを含む。これらの2つのシステイン残基の導入は、Fc領域中の2つの抗体重鎖間で、ジスルフィド架橋の形成を生じ、二量体をさらに安定化させる(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15(2001))。別の態様において、2つの非同ー抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾は、例えばPCT公報WO 2009/089004に記載されるような、静電ステアリング効果を仲介する修飾を含む。一般的に、この方法は、ホモ二量体形成が静電的に好ましくないが、ヘテロ二量体化が静電的に好ましいように、2つの抗体重鎖の界面の1またはそれより多いアミノ酸残基を、荷電アミノ酸残基によって置換することを含む。抗体が、付着したエフェクター部分を有する特定の態様において、ノブ修飾を含む抗体重鎖のアミノまたはカルボキシ末端アミノ酸にエフェクター部分を融合させる。理論によって束縛されることは望ましくないが、エフェクター部分をノブ含有重鎖に融合させると、2つのエフェクター部分を含むホモ二量体抗体の生成がさらに最小限にされるであろう(2つのノブ含有ポリペプチドの立体構造衝突)。同様に、抗体が、Fc領域に融合したただ1つのFab断片を含む態様において、Fab断片は、好ましくは、ノブ修飾を含むFc領域の重鎖に融合される。

【0078】

本発明の抗体は、例えば療法的適用のために特に好適である、いくつかの特性を組み合わせる。例えば、抗体は、ヒトおよびカニクイザルに関して交差反応性であり、これは、例えば、ヒト使用の前に、カニクイザルにおける*in vivo*研究を可能にする。したがって、1つの態様において、本発明の抗体は、ヒトおよびカニクイザルASGPRに特異的に結合可能である。さらに、本発明の抗体は、特に強いアフィニティおよび/またはアビディティでASGPRに結合する。1つの態様において、抗体は、表面プラズモン共鳴(SPR)によって、Fab断片として測定した際、ヒトASGPRに、1μMより小さい、特に100nMより小さい、より具体的には1nMより小さい解離定数(K_D)で結合する。SPRによって結合アフィニティを測定するための方法を本明細書に記載する。特に、測定を25℃の温度で行う。1つの態様において、ニュートラビジン捕捉によって、NLCチップ上に固定されたビオチン化一価(av_i-Fc-ヒトASGPR H1CRD、配列番号118)または二価(av_i-Fc-ヒトASGPR H1ストーク-CRD、配列番号130)ASGPR H1抗原とともに、25℃でProtein XPR36装置(Biorad)を用いたSPRによって、Fab断片としての抗体のアフィニティ(K_D)を測定する。例示的な方法において、固定用の抗原を、PBST(10mMリン酸、150mM NaCl pH7.4、0.005% Tween-20)で10μg/mlに希釈し、そして多様な接触時間で、30μl/分で注入して、垂直配向で、200、400または800反応単位(RU)の固定レベルを達成する。続いて、分析物(抗体)を注入する。1ショット動力学測定のため、注入方向を水平配向に変化させて、そして精製Fab断片の2倍希釈シリーズ(100~6.25nMの間の濃度範囲で

多様)を、別個のチャンネル1~5に沿って、150または200sの会合時間、および240または600sの解離時間で、50、60または100 μ l/分で同時に注入する。緩衝液(PBST)を第六のチャンネルに沿って注入して、参照のための「インライン」ブロックを提供する。会合および解離センサーグラムを同時に適合させることによって、ProteOn Manager v3.1ソフトウェアにおいて、単純な1対1ラングミュア結合モデルを用いて、会合速度定数(k_{on})および解離速度定数(k_{off})を計算する。平衡解離定数(K_D)を、比 k_{off}/k_{on} として計算する。10mMグリシン、pH1.5を流速100 μ l/分、30sの接触時間で用いて、水平配向で再生を行う。別の態様において、抗体は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって、IgG₁として測定した際、1 μ Mより小さい、特に500nMより小さい、より具体的には100nMより小さい、またはさらに10nMより小さい K_D で、ヒトASGPRに結合する。FRETによって結合アフィニティ(またはアビディティ)を測定するための方法を本明細書に記載する。1つの態様において、FRETドナー分子で標識した全長ASGPRタンパク質を発現している細胞を、抗体と接触させ、そして適切なFRETアクセプター分子で標識した二次抗体によって、結合した抗体を検出することによって測定を行う。例示的な方法において、SNAPタグをコードするDNA配列(Cisbioより購入したプラスミド)を、PCRによって増幅し、そして全長ヒトASGPR H1配列を含有する発現ベクター(Origene)内に連結する。生じる融合タンパク質は、C末端SNAPタグを伴う全長ASGPR H1で構成される。トランスフェクション試薬としてLipofectamine 2000を用いて、HEK293細胞を10 μ g DNAでトランスフェクションする。20時間のインキュベーション時間後、細胞をPBSで洗浄し、そして100nM SNAP-Lumi4Tb(Cisbio)を含有するLabMed緩衝液(Cisbio)中で、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションして、SNAPタグの特異的標識を導く。続いて、細胞をLabMed緩衝液で4回洗浄して、未結合色素を除去する。緩衝液に比較して、615nmでのテルビウムの放出を測定することによって、標識効率を決定する。次いで、細胞を-80 $^{\circ}$ Cで最長6ヶ月間凍結保存することも可能である。50~0.39nMの範囲の濃度のASGPR特異的抗体を、標識細胞(ウェルあたり100細胞)に添加し、その後、FRETのアクセプター分子として抗ヒトFc-d2(Cisbio、ウェルあたり最終200nM)を添加することによって、アビディティを測定する。RTで3時間のインキュベーション時間後、蛍光読み取り装置(Victor 3、Perkin Elmer)を用いて、アクセプター色素の放出(665nm)ならびにドナー色素の放出(615nm)を決定する。ドナー放出に対するアクセプター放出の比を計算し、そしてバックグラウンド対照(抗ヒトFc-d2を含む細胞)の比を減じる。GraphPad Prism5ソフトウェアで曲線を分析して、そして K_D 値を計算してもよい。本発明の抗体のさらなる利点は、これらが受容体の天然リガンド(アシアロ糖タンパク質、例えばアシアロフェチュイン)とASGPRへの結合に関して競合しないことであり、すなわち、抗体結合は、ASGPRリガンドの存在によって影響を受けず、そしてASGPRの天然機能に干渉しないことである。1つの態様において、抗体は、ASGPRへの結合に関して、ASGPRの天然リガンドと競合しない。特定の態様において、ASGPRの前記天然リガンドは、アシアロフェチュインである。当該技術分野に周知の方法によって、競合を測定してもよい。1つの態様において、FACSによって、例えばASGPR発現細胞株、蛍光標識リガンド、および異なる蛍光標識を有する二次抗体での、結合した抗体の検出を用いて、ASGPRの天然リガンドとの競合を測定する。例示的な方法において、肝細胞癌細胞株HepG2を用いる。96ウェル丸底プレート中、ウェルあたり0.2ミオ(mio)細胞を、40 μ lのAlexa488標識アシアロフェチュイン(ウシ胎児血清由来、Sigma Aldrich #A4781、最終濃度100 μ g/ml)と、4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションする。ASGPRへのリガンド結合はカルシウム依存性であるため、結合はカルシウムの存在下で行う。0.1%BSAを含有するHBSSで細胞を1回洗浄することによって、未結合タンパク質を除去する。次いで、40 μ lの抗ASGPR抗体(30、6、および1.25 μ g

10

20

30

40

50

/ml最終濃度)を、100 µg/mlのアシアロフェチュインの存在下で、細胞に添加する。細胞を4で30分間インキュベーションし、そして細胞を1回洗浄することによって、未結合タンパク質を除去する。APCコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗ヒトIgG Fcガンマ断片特異的二次F(ab')₂断片(Jackson ImmunoResearch #109-136-170; 0.1%BSAを含有するHBS中、作業溶液1:50)を二次抗体として用いる。4で30分間インキュベーションした後、洗浄することによって、未結合二次抗体を除去する。1%PFAを用いて細胞を固定し、そしてBD FACS CantoII(ソフトウェアBD DIVA)を用いて、リガンドならびに抗体の結合を分析する。本発明の抗体の主要な利点は、これらがASGPRに対して高い特異性を持つことである。例えばヒトASGPR H1に対する強い結合にもかかわらず、抗体は、ヒトASGPR H1の最も近い相同体であると同定されたCLEC10Aに検出可能には結合しない。1つの態様において、抗体は、CLEC10A、特にヒトCLEC10Aに検出可能に結合しない。特に、抗体は、結合をSPR(本明細書に記載するとおり)によって測定した際、CLEC10Aに検出可能に結合しない。さらに、抗体は、ASGPRを発現しない細胞には、対応する非ターゲティング抗体(アイソタイプ対照)と類似の度合いまでしか結合しない。したがって、1つの態様において、抗体は、ASGPR発現を欠く細胞、特にヒト細胞、より具体的にはヒト血液細胞には、特異的に結合しない。ASGPR発現を欠く例示的な細胞には、Hela細胞(子宮頸癌由来のヒト細胞株)、A459ヒト非小細胞肺癌細胞、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞、および(ヒト)PBMCが含まれる。特定の細胞への結合または結合の欠如は、例えばFACSによって容易に決定可能である。こうした方法は、当該技術分野によく確立され、そしてまた、以下の実施例に記載される。抗ASGPR抗体の重要な特徴は、内在化特性である。例えば、ASGPR発現細胞にエフェクター部分をターゲティングするために抗体を用いようとする場合、抗体が、エフェクター部分受容体の活性化のために十分に長い時間、細胞表面上に存在することが望ましい。本発明の抗体は、ASGPRへの結合に際して、ASGPR発現細胞内に内在化するが、これらは細胞内部で分解されることなく、細胞表面にリサイクルされて戻る。したがって、1つの態様において、抗体は、ASGPRを発現する細胞の表面上のASGPRに抗体が結合した際、前記細胞内に内在化される。特定の態様において、抗体は、前記細胞内に内在化されるのと同様速度で、前記細胞の表面にリサイクルされて戻る。細胞表面タンパク質およびそれに結合した抗体の内在化およびリサイクリングは、確立された方法、例えばFACSまたは(共焦点)顕微鏡技術によって、容易に測定可能である。1つの態様において、内在化および/またはリサイクリングをFACSによって測定する。抗体が持続した効果を有するためには、そのターゲット抗原が本質的に一定のレベルで存在することが重要である。しばしば、抗体のターゲット抗原への結合は、後者の下方制御を誘導し、抗体の有効性減少を導く。しかし、本発明の抗体は、こうした効果を持たない。1つの態様において、抗体は、細胞表面上のASGPRへの抗体の結合に際して、前記細胞の表面でのASGPR発現の下方制御を有意には誘導しない。細胞の表面での抗原発現レベルは、FACSなどの確立された方法によって容易に決定可能である。

【0079】

付着したエフェクター部分を含む抗体

本発明にしたがった特に有用な抗体は、エフェクター部分、例えばサイトカインが付着した抗体である。エフェクター部分、例えばサイトカインに融合した抗体はまた、本明細書において、イムノコンジュゲートとも称される。付着したエフェクター部分を含む抗体は、単一で、または組み合わせて、本発明の抗体に関連する上記の特徴いずれを取り込んでよい。

【0080】

したがって、1つの側面において、本発明は、任意の上記態様にしたがって、ASGPRへの特異的結合が可能な抗体であって、エフェクター部分が抗体に付着している、前記抗体を提供する。1つの態様において、1より多くないエフェクター部分が抗体に付着す

10

20

30

40

50

る。さらなるエフェクター部分が存在しないと、それぞれのエフェクター部分受容体が提示される部位への抗体のターゲティングが減少し、それによって、抗体の実際のターゲット抗原、ASGPRが提示される部位へのターゲティングおよび該部位での集積が改善される。さらに、それぞれのエフェクター部分受容体に対するアビディティ効果が存在しないため、抗体の静脈内投与に際して、末梢血中のエフェクター部分受容体陽性細胞の活性化が減少しうる。本発明で使用するためのエフェクター部分は、一般的に、例えばシグナル伝達経路を通じて、細胞活性に影響を及ぼすポリペプチドである。したがって、本発明で有用なエフェクター部分は、細胞膜外部からシグナルを伝達して、細胞内で反応を調節する、受容体仲介性シグナル伝達に関連することも可能である。例えば、エフェクター部分はサイトカインであってもよい。特定の態様において、エフェクター部分はヒトである。特定の態様において、エフェクター部分は、ペプチド分子であり、そしてペプチド結合を通じて抗体に融合される（すなわち、抗体およびエフェクター分子は、融合タンパク質を形成する）。1つの態様において、エフェクター部分は、一本鎖ペプチド分子である。さらなる態様において、エフェクター部分は、アミノ末端アミノ酸で、抗体の重鎖の1つのカルボキシ末端アミノ酸に、場合によってペプチドリンカーを通じて、融合している。適切な非免疫原性ペプチドリンカーには、例えば、 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ または $G_4(SG_4)_n$ ペプチドリンカーが含まれる。「n」は一般的に1~10、典型的には2~4の間の数字である。上述のように、抗体がFc領域中にノブを穴に修飾を含む態様において、エフェクター部分を、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合させることが好ましい。

10

20

【0081】

1つの態様において、前記エフェクター部分は、サイトカイン分子である。有用なサイトカインの例には、限定されるわけではないが、GM-CSF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TGF- β 、TNF- α 、およびTNF- β が含まれる。1つの態様において、前記サイトカイン分子は、アミノ末端アミノ酸で、抗体重鎖の1つのカルボキシ末端アミノ酸に、場合によってペプチドリンカーを通じて、融合している。1つの態様において、前記サイトカイン分子はヒトサイトカインである。1つの態様において、前記サイトカイン分子はインターフェロン分子である。特定の態様において、前記インターフェロン分子はインターフェロン・アルファ、特にヒト・インターフェロン・アルファ、より具体的にはヒト・インターフェロン・アルファ2（配列番号138を参照されたい）またはヒト・インターフェロン・アルファ2a（配列番号139を参照されたい）である。インターフェロン・アルファは、抗ウイルス活性を有することが知られる。したがって、インターフェロン分子を本発明の抗体に付着させると、ウイルス感染ASGPR発現細胞をターゲティングするのに特に有用である。サイトカイン分子がインターフェロン分子である1つの態様において、抗体は表面上にASGPRを発現している細胞において、抗ウイルス活性を有する。1つの態様において、前記細胞は肝臓細胞、特に肝細胞、より具体的にはヒト肝細胞である。1つの態様において、前記抗ウイルス活性は選択的である。特定の態様において、抗体は、表面上に有意なレベルのASGPRを発現しない細胞において、抗ウイルス活性を持たない。1つの態様において、前記細胞は、血液細胞、特にヒト血液細胞である。1つの態様において、前記抗ウイルス活性。本発明にしたがった抗ASGPR抗体に付着したインターフェロン分子のこの選択性は、いかなる意図されるターゲット細胞（例えば肝細胞）および影響を受けるべきではない細胞（例えば血液細胞）の間を区別しない、非ターゲティング化インターフェロン分子とは対照的であり、そして主要な毒性の問題を伴わず、ありうる療法的使用に非常に重要である。さらに特定の態様において、前記抗ウイルス活性は、ウイルス感染の阻害、ウイルス複製の阻害、細胞殺傷の阻害および1またはそれより多いインターフェロン刺激遺伝子の誘導より選択される。特定の態様において、1またはそれより多いインターフェロン刺激遺伝子は、MX1（ミクソウイルス耐性1、インターフェロン誘導性タンパク質p78としてもまた知られる）、RSAD2（ラジカルS-アデノシルメチオニンドメイン含有2、サイトメガロウイルス誘導性遺伝子5として

30

40

50

もまた知られる)、H R A S L S 2 (H R A S 様サブレッサー2)、I F I T 1 (テトラトリコペプチド反復を含むインターフェロン誘導性タンパク質1)、およびI F I T M 2 (インターフェロン誘導性膜貫通タンパク質2)の群より選択される。1つの態様において、1またはそれより多いインターフェロン刺激遺伝子の誘導は、付着したインターフェロン分子がない対応する抗体による誘導と比較した際、mRNAレベルで、少なくとも1.5倍、特に少なくとも2倍、より具体的には少なくとも5倍の誘導である。mRNAレベルでの遺伝子誘導は、本明細書に記載するような、定量的逆転写(RT)PCRまたはマイクロアレイ分析を含む、当該技術分野でよく確立された方法によって測定可能である。細胞を試験化合物とプレインキュベーションし、その後、ウイルスを添加し、そしてインキュベーション後に生存細胞を定量化する、ウイルス防御アッセイによって、細胞殺傷の阻害を決定してもよい。典型的なこうしたアッセイを実施例に記載する。マディン・ダービー・ウシ腎臓(MDBK)細胞を、抗体および対照と1~4時間プレインキュベーションする。次いで、水疱性口内炎ウイルスをさらに16~24時間添加する。インキュベーション工程終了時、生存細胞をクリスタルバイオレット染色溶液(0.5%)で染色し、そして690nmの参照波長とともに、550~600nmで、マイクロプレート読み取り装置を用いて、生存細胞の定量化を実行する。ウイルス複製の評価のための例示的なアッセイもまた、実施例中に提供する。このアッセイは、ニシストロン性C型肝炎ウイルス(HCV)レプリコンで安定トランスフェクションされたHu h 7由来肝癌細胞株を用い、該レプリコンは、HCV IRESによって駆動される第一のオープンリーディングフレームが、ネオマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(NPTII)に融合したレニラ属(renilla)ルシフェラーゼ遺伝子を含み、そしてEMCV IRESによって駆動される第二のオープンリーディングフレームが、NK5.1レプリコン・主鎖由来のHCV非構造遺伝子、NS3、NS4a、NS4b、NS5AおよびNS5Bを含み、細胞を37°Cで、5%CO₂を含む加湿大気中、GlutamaxTMおよび100mg/mlピルビン酸ナトリウムを補ったDMEM中で培養する。培地には、さらに、10%(v/v)FBS(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシンおよび1%(v/v)ジエネティシンを補った。5%(v/v)FBSを含むDMEM中の細胞を、90μl体積中、5000細胞/ウェルで、96ウェルプレート中にプレATINGする。プレATINGの24時間後、抗体(または対照としての培地)を、12ウェルに渡って3倍希釈で(0.01~2000pM)、10μl体積中で細胞に添加し、したがって、抗体添加後の最終体積は100μlである。レニラ属ルシフェラーゼアッセイ系(Promega、#E2820)を用いて、レニラ属ルシフェラーゼレポーターシグナルを、抗体を添加した72時間後に読み取る。対照試料(抗体の非存在下)と比較した際、レニラ属ルシフェラーゼレポーターのレベルの50%の減少が観察される化合物濃度として、EC₅₀値を計算する。XLFIT4プログラム(ID Business Solutions Ltd.、英国サリー)を用いることによって、用量反応曲線およびEC₅₀値を得る。特定の態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列を含む全長ヒトIgG₁抗体であり、前記抗体は、Fc領域中にFcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる修飾およびノブを穴に修飾を含み、前記ノブを穴に修飾は、一方の抗体重鎖中にノブ修飾を、そして他方の抗体重鎖に穴修飾を含み、そして前記抗体は、ペプチドリッカーを通じて、抗体重鎖の1つのC末端アミノ酸に、N末端アミノ酸で融合したIFN₂分子を有する。特定の態様において、FcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる前記修飾は、各抗体重鎖中にアミノ酸置換L234A、L235AおよびP329G(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、前記ノブ修飾は、アミノ酸置換T366Wを含み、そして穴修飾は、アミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらにさらなる特定の態様において、前記IFN₂分子は、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合する。さらにより特定の態様において、前記抗体は、配列番号68、配列番号70および配列番号72、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

【0082】

別の特定の態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む全長ヒトIgG₁抗体であり、前記抗体は、Fc領域中にFcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる修飾およびノブを穴に修飾を含み、前記ノブを穴に修飾は、一方の抗体重鎖中にノブ修飾を、そして他方の抗体重鎖に穴修飾を含み、そして前記抗体は、ペプチドリンカーを通じて、抗体重鎖の1つのC末端アミノ酸に、N末端アミノ酸で融合したIFN γ 2分子を有する。特定の態様において、FcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる前記修飾は、各抗体重鎖中にアミノ酸置換L234A、L235AおよびP329G(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、前記ノブ修飾は、アミノ酸置換T366Wを含み、そして穴修飾は、アミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらにさらなる特定の態様において、前記IFN γ 2分子は、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合する。さらにより特定の態様において、前記抗体は、配列番号50、配列番号52および配列番号54、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0083】

さらに別の特定の態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48の群より選択される軽鎖可変領域配列を含む全長ヒトIgG₁抗体であり、前記抗体は、Fc領域中に、FcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる修飾およびノブを穴に修飾を含み、前記ノブを穴に修飾は、一方の抗体重鎖中にノブ修飾を、そして他方の抗体重鎖に穴修飾を含み、そして前記抗体は、ペプチドリンカーを通じて、抗体重鎖の1つのC末端アミノ酸に、N末端アミノ酸で融合したIFN γ 2分子を有する。特定の態様において、FcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる前記修飾は、各抗体重鎖中にアミノ酸置換L234A、L235AおよびP329G(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、前記ノブ修飾は、アミノ酸置換T366Wを含み、そして穴修飾は、アミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらにさらなる特定の態様において、前記IFN γ 2分子は、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合する。さらにより特定の態様において、前記抗体は、配列番号52、配列番号54のポリペプチド配列、ならびに配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106および配列番号108の群より選択されるポリペプチド配列、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

【0084】

さらなる態様において、本発明の抗体は、配列番号92、配列番号52および配列番号54、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。別の態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号94、配列番号52および配列番号54、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらにさらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号56、配列番号58および配列番号60、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号62、配列番号64および配列番号66、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号74、配列番号76および配列番号78、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号80、配列番号82および配列番号84、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号86、配列番号88および配列番号90、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

【0085】

別の態様において、本発明にしたがった抗体は、2つのFab断片の1つを欠き、そして配列番号16の重鎖可変領域配列および配列番号14の軽鎖可変領域配列を含み、前記抗体は、Fc領域中にFcRIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる修飾お

よびノブを穴に修飾を含み、前記ノブを穴に修飾は、一方の抗体重鎖中にノブ修飾を、そして他方の抗体重鎖に穴修飾を含み、そして前記抗体は、ペプチドリンカーを通じて、抗体重鎖の1つのC末端アミノ酸に、N末端アミノ酸で融合したIFN 2分子を有する。特定の態様において、Fc RIIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる前記修飾は、各抗体重鎖中にアミノ酸置換L234A、L235AおよびP329G(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、前記ノブ修飾は、アミノ酸置換T366Wを含み、そして穴修飾は、アミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらにさらなる特定の態様において、前記IFN 2分子は、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合する。さらにより特定の態様において、前記抗体は、配列番号68、配列番号70および配列番号116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

10

【0086】

別の態様において、本発明にしたがった抗体は、2つのFab断片の1つを欠き、そして配列番号4の重鎖可変領域配列および配列番号2の軽鎖可変領域配列を含む全長ヒトIgG₁抗体であり、前記抗体は、Fc領域中に、Fc RIIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる修飾およびノブを穴に修飾を含み、前記ノブを穴に修飾は、一方の抗体重鎖中にノブ修飾を、そして他方の抗体重鎖に穴修飾を含み、そして前記抗体は、ペプチドリンカーを通じて、抗体重鎖の1つのC末端アミノ酸に、N末端アミノ酸で融合したIFN 2分子を有する。特定の態様において、Fc RIIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる前記修飾は、各抗体重鎖中にアミノ酸置換L234A、L235AおよびP329G(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、前記ノブ修飾は、アミノ酸置換T366Wを含み、そして穴修飾は、アミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらにさらなる特定の態様において、前記IFN 2分子は、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合する。さらにより特定の態様において、前記抗体は、配列番号50、配列番号52および配列番号116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

20

【0087】

さらに別の態様において、本発明にしたがった抗体は、2つのFab断片の1つを欠き、そして配列番号4の重鎖可変領域配列、ならびに配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48の群より選択される軽鎖可変領域配列を含む全長ヒトIgG₁抗体であり、前記抗体は、Fc領域中にFc RIIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる修飾およびノブを穴に修飾を含み、前記ノブを穴に修飾は、一方の抗体重鎖中にノブ修飾を、そして他方の抗体重鎖に穴修飾を含み、そして前記抗体は、ペプチドリンカーを通じて、抗体重鎖の1つのC末端アミノ酸に、N末端アミノ酸で融合したIFN 2分子を有する。特定の態様において、Fc RIIIIaへの抗体の結合アフィニティを減少させる前記修飾は、各抗体重鎖中にアミノ酸置換L234A、L235AおよびP329G(EU番号付け)を含む。さらなる特定の態様において、前記ノブ修飾は、アミノ酸置換T366Wを含み、そして穴修飾は、アミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらにさらなる特定の態様において、前記IFN 2分子は、ノブ修飾を含む抗体重鎖に融合する。さらにより特定の態様において、前記抗体は、配列番号52、配列番号116のポリペプチド配列、ならびに配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106および配列番号108の群より選択されるポリペプチド配列、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

30

40

【0088】

さらなる態様において、本発明の抗体は、配列番号92、配列番号52および配列番号116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。別の態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号94、配列番号52および配列番号116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらにさらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号56、配列番号58および配列番号116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本

50

発明にしたがった抗体は、配列番号 62、配列番号 64 および配列番号 116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号 74、配列番号 76 および配列番号 116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号 80、配列番号 82 および配列番号 116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、本発明にしたがった抗体は、配列番号 86、配列番号 88 および配列番号 116、または機能性を保持するその変異体のポリペプチド配列を含む。

【0089】

本発明の抗体には、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108 および 116 に示す配列に、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一である配列を有するものが含まれ、その機能性断片または変異体が含まれる。本発明はまた、保存的アミノ酸置換を含むこれらの配列を含む抗体も含む。

10

【0090】

ポリヌクレオチド

本発明は、本明細書に記載するような抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。

20

【0091】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109 および 117 に示す配列に、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるものが含まれ、その機能性断片または変異体が含まれる。

【0092】

本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを、全抗体をコードする単一ポリヌクレオチドとして、または同時発現される複数の（例えば 2 またはそれより多い）ポリヌクレオチドとして、発現させてもよい。同時発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、例えばジスルフィド結合または他の手段を通じて会合して、機能する抗体を形成してもよい。例えば、抗体の軽鎖部分は、抗体の重鎖部分とは別個のポリヌクレオチドによってコードされてもよい。同時発現された場合、重鎖ポリペプチドは、軽鎖ポリペプチドと会合して抗体を形成するであろう。別の例において、エフェクター部分を含む抗体の重鎖部分は、抗体の他の重鎖部分とは別個のポリヌクレオチドによってコードされてもよい。同時発現された際、重鎖ポリペプチドは会合して、（軽鎖ポリペプチド（単数または複数）とともに）機能する抗体を形成するであろう。

30

40

【0093】

1つの態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46 または 48 に示すような可変領域配列をコードする配列を含む。別の態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108 または 116 に示すようなポリペプチド配列をコードする配列を含む。別の態様において、本発明は

50

さらに、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109 および 117 に示す核酸配列に、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列を含む。別の態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109 または 117 に示す核酸配列を含む。別の態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46 または 48 のアミノ酸配列に、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である可変領域配列をコードする配列を含む。別の態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108 または 116 のアミノ酸配列に、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一であるポリペプチド配列をコードする配列を含む。本発明は、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、保存的アミノ酸置換を含み、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46 または 48 の可変領域配列をコードする配列を含む。本発明はまた、抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、保存的アミノ酸置換を含み、配列番号 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108 または 116 のポリペプチド配列をコードする配列を含む。

【0094】

特定の態様において、ポリヌクレオチドまたは核酸は DNA である。他の態様において、本発明のポリヌクレオチドは RNA、例えばメッセンジャー RNA (mRNA) の形である。本発明の RNA は、一本鎖または二本鎖であってもよい。

【0095】

組換え法

本発明の抗体を、例えば固相ペプチド合成 (例えば Merrifield 固相合成) または組換え産生によって得てもよい。組換え産生のため、例えば上述のような、抗体 (断片) をコードする 1 またはそれより多いポリヌクレオチドを単離し、そしてさらなるクローニングおよび / または宿主細胞における発現のため、1 またはそれより多いベクター内に挿入する。こうしたポリヌクレオチドは、慣用法を用いて、容易に単離および配列決定可能である。1 つの態様において、1 またはそれより多い本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくは発現ベクターを提供する。当業者に周知の方法を用いて、適切な転写 / 翻訳制御シグナルとともに、抗体 (断片) のコード配列を含有する発現ベクターを構築することも可能である。これらの方法には、in vitro 組換え DNA 技術、合成技術および in vivo 組換え / 遺伝的組換えが含まれる。例えば、Maniatisら, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUA

10

20

30

40

50

L, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); および Ausubelら, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989) に記載される技術を参照されたい。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部であってもよく、あるいは核酸断片でもよい。発現ベクターには、抗体(断片)をコードするポリヌクレオチド(すなわちコード領域)を、プロモーターおよび/または他の転写または翻訳制御要素と機能可能である関連でクローニングした、発現カセットが含まれる。本明細書において、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸部分である。「停止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)は、アミノ酸には翻訳されないものの、存在する場合、コード領域の一部と見なされることも可能であるが、いかなる隣接配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5' および 3' 非翻訳領域等も、コード領域の一部ではない。2 またはそれより多いコード領域は、単一ポリヌクレオチド構築物中、例えば単一ベクター上に存在していてもよいし、または別個のポリヌクレオチド構築物中、例えば別個の(異なる)ベクター上に存在していてもよい。さらに、任意のベクターが、単一コード領域を含有してもよいし、あるいは2 またはそれより多いコード領域を含んでもよく、例えば本発明のベクターは、1 またはそれより多いポリペプチドをコードしてもよく、これらは翻訳後にまたは翻訳と同時に、タンパク質分解的切断を通じて、最終タンパク質に分離される。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、本発明の抗体(断片)をコードするポリヌクレオチドに融合したかまたは融合していない、異種コード領域、あるいはその変異体または誘導体をコードしてもよい。異種コード領域には、限定なしに、特殊化要素またはモチーフ、例えば分泌性シグナルペプチドまたは異種機能ドメインが含まれる。機能可能である関連は、遺伝子産物、例えばポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現を制御配列(単数または複数)の影響または制御下に配置する方式で、1 またはそれより多い制御配列に関連している場合である。2 つのDNA断片(例えばポリペプチドコード領域およびそれに関連するプロモーター)は、プロモーター機能の誘導が、望ましい遺伝子産物をコードするmRNAの転写を生じる場合、そして2 つのDNA断片の間の連結の性質が、発現制御配列が遺伝子産物の発現を導く能力に干渉しないか、またはDNAテンプレートが転写される能力に干渉しない場合、「機能可能であるように関連」している。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写を達成可能である場合、ポリペプチドをコードする核酸と機能可能であるように関連している。プロモーターは、あらかじめ決定された細胞でのみ、DNAの実質的な転写を指示する細胞特異的プロモーターであってもよい。プロモーターに加えて、他の転写制御要素、例えばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルをポリヌクレオチドと機能可能であるように関連させて、細胞特異的転写を導いてもよい。適切なプロモーターおよび他の転写制御領域を本明細書に開示する。多様な転写制御領域が当業者に知られる。これらには、限定なしに、脊椎動物細胞で機能する転写制御領域、例えば限定されるわけではないが、サイトメガロウイルス(例えば、イントロンAとコンジュゲート化された極初期プロモーター)、サルウイルス40(例えば初期プロモーター)、およびレトロウイルス(例えばラウス肉腫ウイルス)由来のプロモーターおよびエンハンサー・セグメントが含まれる。他の転写制御領域には、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギα-グロビンなどの脊椎動物遺伝子由来のもの、ならびに真核細胞において遺伝子発現を制御可能な他の配列が含まれる。さらなる適切な転写制御領域には、組織特異的プロモーターおよびエンハンサー、ならびに誘導性プロモーター(例えばプロモーター誘導性テトラサイクリン)が含まれる。同様に、多様な翻訳制御要素が、当該技術分野の一般の当業者に知られる。これらには、限定されるわけではないが、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、ならびにウイルス系由来の要素(特に内部リボソーム進入部位、またはIRES、CITE配列としても知られる)が含まれる。発現カセットにはまた、他の特徴、例えば複製起点、および/または染色体組込み要素、例えばレトロウイルス末端反復

10

20

30

40

50

配列 (L T R)、またはアデノ随伴ウイルス (A A V) 反転末端反復 (I T R) もまた含まれることも可能である。

【 0 0 9 6 】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コード領域を、本発明のポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドの分泌を指示する分泌性またはシグナルペプチドをコードするさらなるコード領域と関連させてもよい。例えば、抗体の分泌が望ましい場合、シグナル配列をコードする D N A を、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸の上流に配置してもよい。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、シグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有し、こうした配列は、粗面小胞体を渡る成長中のタンパク質鎖の排出が開始されたならば、成熟タンパク質から切断される。一般の当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドが、一般に、ポリペプチドの N 末端に融合するシグナルペプチドを有し、翻訳されたポリペプチドからシグナルペプチドが切断されて、ポリペプチドの分泌型または「成熟」型が産生されることを知っている。特定の態様において、天然シグナルペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖または軽鎖シグナルペプチド、あるいは機能可能であるように関連したポリペプチドの分泌を指示する能力を保持する、その配列の機能的誘導体を用いる。あるいは、異種哺乳動物シグナルペプチド、またはその機能性誘導体を用いてもよい。例えば、野生型リーダー配列を、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (T P A) またはマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列で置換してもよい。分泌シグナルペプチドの例示的なアミノ酸配列を配列番号 1 3 5 ~ 1 3 7 に示す。

10

20

【 0 0 9 7 】

後の精製を容易にする (例えばヒスチジンタグ) か、または抗体標識を補助するために使用可能である低分子タンパク質配列をコードする D N A が、抗体 (断片) をコードするポリヌクレオチド内に、またはその末端に含まれてもよい。

【 0 0 9 8 】

さらなる態様において、本発明の 1 またはそれより多いポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。特定の態様において、本発明の 1 またはそれより多いベクターを含む宿主細胞を提供する。ポリヌクレオチドおよびベクターは、それぞれ、ポリヌクレオチドおよびベクターに関連する、本明細書記載の任意の特徴のいずれを、単独で、または組み合わせて取り込んでもよい。1つのこうした態様において、宿主細胞は、本発明の抗体 (の一部) をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む (例えば、こうしたベクターで形質転換されているかまたはトランスフェクションされている)。本明細書において、用語「宿主細胞」は、本発明の抗体またはその断片を生成するように操作可能な、任意の種類 of 細胞系を指す。抗体を複製し、そしてその発現を補助するのに適した宿主細胞が当該技術分野に周知である。こうした細胞を、適切なように特定の発現ベクターでトランスフェクションまたは形質導入して、そして多量のベクター含有細胞を、大規模発酵をシードするために増殖させて、臨床的適用のために十分な量の抗体を得ることも可能である。適切な宿主細胞には、原核微生物、例えば大腸菌、または多様な真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O)、昆虫細胞等が含まれる。例えば、特に、グリコシル化が必要でない場合、細菌において、ポリペプチドを産生してもよい。発現後、ポリペプチドを可溶性分画中の細菌細胞ペーストから単離して、そしてさらに精製してもよい。原核生物に加えて、真核微生物、例えば糸状真菌または酵母は、ポリペプチドコードベクターの適切なクローニングまたは発現宿主であり、これには、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的にまたは完全にヒトグリコシル化パターンを持つ、ポリペプチドの産生を生じる、真菌および酵母株が含まれる。Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)、および Liら, Nat Biotech 24, 210-215 (2006) を参照されたい。(グリコシル化) ポリペプチドの発現に適切な宿主細胞はまた、多細胞生物 (無脊椎動物および脊椎動物) 由来である。無脊椎動物細胞の例には、植物および昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と組み合わせて使用可能な多くのバキュロウイルス株、特にスポドブレタ・フルギペルダ (S p o d o

30

40

50

ptera frugiperda)細胞のトランスフェクション用のものが同定されてきている。植物細胞培養もまた、宿主として利用可能である。例えば米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号および第6,417,429号(トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES^{T M}技術を記載する)を参照されたい。脊椎動物細胞もまた宿主として使用可能である。例えば、懸濁中で増殖するよう適応した哺乳動物細胞株が有用でありうる。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7);ヒト胚性腎臓株(例えばGrahamら, J Gen Virol 36, 59(1977)に記載されるような293または293T細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウス・セルトリ細胞(例えばMather, Biol Reprod 23, 243-251(1980)に記載されるようなTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、バッファロー・ラット肝臓細胞(BRL 3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝臓細胞(Hep G2)、マウス乳腺腫瘍細胞(MMT 060562)、TRI細胞(例えばMatherら, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68(1982)に記載されるようなもの)、MRC 5細胞、およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、dhfr⁻ CHO細胞(Urlaubら, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216(1980))を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞;ならびに骨髄腫細胞株、例えばYO、NS0、P3X63およびSp2/0が含まれる。タンパク質産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説には、YazakiおよびWu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo監修, Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268(2003)を参照されたい。宿主細胞には、いくつかのみを挙げると培養細胞、例えば哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞および植物細胞が含まれるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物あるいは培養植物または動物組織内に含まれる細胞も含まれる。1つの態様において、宿主細胞は、真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞またはリンパ系細胞(例えば、YO、NS0、Sp20細胞)が含まれる。これらの系において、外来(foreign)遺伝子を発現するための標準的な技術が当該技術分野に知られる。発現される産物が重鎖および軽鎖の両方を有する抗体であるように、抗体鎖の他方もまた発現するように、抗体の重鎖または軽鎖のいずれかを含むポリペプチドを発現する細胞を操作してもよい。

【0099】

1つの態様において、本発明にしたがった抗体を産生する方法であって、本明細書に提供するような抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養し、そして宿主細胞(または宿主細胞培地)から抗体を回収する工程を含む、前記方法を提供する。

【0100】

抗体をエフェクター部分に融合させる場合、これらの構成要素を、互いに遺伝的に融合させる。その構成要素が、互いに直接、またはリンカー配列を通じて間接的に融合されるように、抗体を設計してもよい。当該技術分野に周知の方法にしたがって、リンカーの組成および長さを決定してもよく、そして有効性に関して試験してもよい。また、望ましい場合、融合物の個々の構成要素を分離するための切断部位、例えばエンドペプチダーゼ認識配列を取り込むため、さらなる配列が含まれてもよい。

【0101】

特定の態様において、本発明の抗体は、少なくとも、ASGPRに結合可能な抗体可変領域配列を含む。可変領域は、天然または非天然存在抗体およびその断片の一部を形成し、そしてそれらに由来してもよい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生する方法が当該技術分野に周知である(例えば、HarlowおよびLane, "An

tibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい)。固相合成を用いて非天然存在抗体を構築してもよいし、組換え的に産生してもよいし(例えば米国特許第4,186,567号に記載されるように)、または例えば、可変重鎖および可変軽鎖を含むコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって、得てもよい(例えば、McCaffertyに対する米国特許第5,969,108号を参照されたい)。

【0102】

本発明において、いかなる動物種の抗体を用いてもよい。本発明で有用な限定されない抗体は、ネズミ、霊長類またはヒト起源のものでありうる。抗体をヒト使用に意図する場合、抗体の定常領域がヒト由来である、抗体のキメラ型を用いてもよい。抗体のヒト化型または完全ヒト型もまた、当該技術分野に周知の方法にしたがって、調製可能である(例えばWinterに対する米国特許第5,565,332号を参照されたい)。限定されるわけではないが、(a)非ヒト(例えばドナー抗体)CDRを、決定的なフレームワーク残基(例えば優れた抗原結合アフィニティまたは抗体機能を保持するために重要なもの)の保持を伴うまたは伴わないヒト(例えばレシピエント抗体)フレームワークおよび定常領域上に移植すること、(b)非ヒト特異性決定領域(SDRまたはa-CDR;抗体-抗原相互作用に重要な残基)のみを、ヒトフレームワークおよび定常領域に移植すること、または(c)全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によって、ヒト様部分でこれらを「クローキング」することを含む、多様な方法によって、ヒト化を達成してもよい。ヒト化抗体および該抗体を作製する方法は、例えば、AlmagroおよびFransson, Front Biosci 13, 1619-1633(2008)に概説され、そしてさらに、例えば、Riechmannら, Nature 332, 323-329(1988); Queenら, Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033(1989);米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号および第7,087,409号; Jonesら, Nature 321, 522-525(1986); Morrisonら, Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855(1984); MorrisonおよびOi, Adv Immunol 44, 65-92(1988); Verhoeyenら, Science 239, 1534-1536(1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217(1994); Kashmiriら, Methods 36, 25-34(2005)(SDR(a-CDR)移植を記載する); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498(1991)(「再表面形成(resurfacing)」を記載する); Dall'Acquaら, Methods 36, 43-60(2005)(「FRシャフリング」を記載する);ならびにOsbourneら, Methods 36, 61-68(2005)およびKlimkaら, Br J Cancer 83, 252-260(2000)(FRシャフリングに向けた、「ガイド付き選択」アプローチを記載する)に記載される。本発明にしたがった特定の抗体は、ヒト抗体である。当該技術分野に知られる多様な技術を用いて、ヒト抗体およびヒト可変領域を産生することも可能である。ヒト抗体は、一般的に、van Dijkおよびvan de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74(2001)ならびにLonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459(2008)に記載される。ヒト可変領域は、ハイブリドーマ法によって作製されたヒト・モノクローナル抗体の一部を形成してもよいし、そしてこれに由来してもよい(例えば、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)を参照されたい)。また、抗原曝露に反応して、損なわれていないヒト抗体またはヒト可変領域を持つ損なわれていない抗体を産生するよう修飾されているトランスジ

エニック動物に、免疫原を投与することによって、ヒト抗体およびヒト可変領域を調製してもよい(例えば、Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125(2005)を参照されたい)。また、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変領域配列を単離することによって、ヒト抗体およびヒト可変領域を生成してもよい(例えば、Hoogenboomら Methods in Molecular Biology 178中, 1-37(O'Brienら監修, Human Press, Totowa, NJ, 2001);およびMcCaffertyら, Nature 348, 552-554; Clacksonら, Nature 352, 624-628(1991)を参照されたい)。ファージは、典型的には、一本鎖Fv(scFv)断片としてまたはFab断片としてのいずれかで抗体断片をディスプレイする。ファージディスプレイによる抗体調製の詳細な説明は、実施例に見出されうる。

10

【0103】

特定の態様において、例えば、その全内容が本明細書に援用される、PCT公報WO 2011/020783(アフィニティ成熟に関連する実施例を参照されたい)または米国特許出願公報第2004/0132066号に開示される方法にしたがって、増進された結合アフィニティを有するように、本発明の抗体を操作する。酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)または当業者によく知られる他の技術、例えば表面プラズモン共鳴技術(Liljebbladら, Glyco J 17, 323-329(2000))、および伝統的結合アッセイ(Heeley, Endocr Res 28, 217-229(2002))のいずれかを通じて、本発明の抗体が、特異的抗原決定基に結合する能力を測定してもよい。競合アッセイを用いて、特定の抗原への結合に関して参照抗体と競合する抗体、例えば、ASGPRへの結合に関して、51A12抗体と競合する抗体を同定してもよい。特定の態様において、こうした競合抗体は、参照抗体によって結合されるものと同じエピトープ(例えば直鎖またはコンホメーションエピトープ)に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法が、Morris(1996) "Epitope Mapping Protocols", Methods in Molecular Biology vol. 66中(Humana Press, Totowa, NJ)に提供される。例示的な競合アッセイにおいて、固定抗原(例えばASGPR)を、抗原に結合する第一の標識抗体(例えば51A12抗体)、および抗原への結合に関して、第一の抗体と競合する能力に関して試験中である第二の非標識抗体を含む溶液中で、インキュベーションする。第二の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定抗原を、第一の標識抗体を含むが第二の非標識抗体を含まない溶液中でインキュベーションする。抗原への第一の抗体の結合を許容する条件下でインキュベーションした後、過剰な非結合抗体を除去し、そして固定抗原と会合している標識の量を測定する。固定抗原と会合している標識の量が、対照試料と比較して試験試料で実質的に減少している場合、これは、抗原への結合に関して、第二の抗体が第一の抗体と競合することを示す。HarlowおよびLane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual 第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring H

20

30

40

【0104】

本明細書に記載するように調製した抗体を、高性能液体クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ等の当該技術分野に知られる技術によって精製してもよい。特定のタンパク質を精製するために用いられる実際の条件は、部分的に、純電荷、疎水性、親水性等の要因に応じるであろうし、そして当業者には明らかであろう。アフィニティークロマトグラフィ精製のため、抗体が結合する抗体、リガンド、受容体または抗原を用いてもよい。例えば、本発明の抗体のアフィニティークロマトグラフィ精製のため、プロテインAまたはプロテインGを含むマトリックスを用いてもよい。連続プロテインAまたはGアフィニティークロマ

50

トグラフィおよびサイズ排除クロマトグラフィを用いて、実施例に本質的に記載するような抗体を単離してもよい。ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィ等を含む多様な周知の分析法のいずれによって、抗体の純度を決定してもよい。例えば、実施例に記載されるように発現された重鎖融合タンパク質は、還元SDS-PAGEによって立証されるように、損なわれておらず、そして適切に組み立てられたことが示された(図13~19を参照されたい)。

【0105】

組成物、配合物、および投与経路

さらなる側面において、本発明は、例えば以下の療法的方法のいずれかで使用するための、本明細書に提供する任意の抗体を含む薬学的組成物を提供する。1つの態様において、薬学的組成物は、本明細書に提供する任意の抗体、および薬学的に許容されうるキャリアーを含む。別の態様において、薬学的組成物は、本明細書に提供する任意の抗体、および例えば以下に記載するような少なくとも1つのさらなる療法剤を含む。

10

【0106】

さらに提供するものは、*in vivo*での投与に適した型の本発明の抗体を産生する方法であって、(a)本発明にしたがった抗体を得て、そして(b)少なくとも1つの薬学的に許容されうるキャリアーとともに、抗体を配合し、それによって、*in vivo*での投与のための抗体調製物を配合する、前記方法である。

【0107】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容されうるキャリアー中に溶解したかまたは分散した、療法的有効量の1またはそれより多い抗体を含む。句「薬学的にまたは薬理的に許容されうる」は、一般的に、使用する投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である、すなわち、適切であるように、動物、例えばヒトに投与した際に、不都合な、アレルギー性のまたは他の有害な反応を生じない、分子実体および組成物を指す。本明細書に援用される、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 Mack Printing Company, 1990に例示されるように、少なくとも1つの抗体および場合によってさらなる活性成分を含有する薬学的組成物の調製が、本開示を考慮して当業者には知られるであろう。さらに、動物(例えばヒト)投与のため、調製物は、生物学的標準の米国食品医薬品局または他の国における対応する監督官庁によって必要とされるような、無菌性、発熱性、一般的な安全性および純度標準を満たさなければならないことが理解されるであろう。好ましい組成物は、凍結乾燥配合物または水溶液である。本明細書において、「薬学的に許容されうるキャリアー」には、一般の当業者に知られるであろうように、あらゆる溶媒、緩衝液、分散媒体、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、保存剤(例えば抗細菌剤、抗真菌剤)、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、酸化防止剤、タンパク質、薬剤、薬剤安定化剤、ポリマー、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、フレーバー剤、色素、同様の物質およびその組み合わせが含まれる(例えば、本明細書に援用されるRemington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329を参照されたい)。任意の慣用的キャリアーが活性成分と不適合である場合を除き、療法的または薬学的組成物中のその使用が意図される。

20

30

40

【0108】

組成物は、固体型、液体型またはエアロゾル型を投与しようとしているか、そして注射などの投与経路のために無菌である必要があるかどうかに応じて、異なるタイプのキャリアーを含んでもよい。本発明の抗体(および任意のさらなる療法剤)を、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、脾臓内、腎臓内、胸膜内、気管内、鼻内、硝子体内、腔内、直腸内、腫瘍内、筋内、腹腔内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍内、眼内、経口、局所、局在、吸入による(例えばエアロゾル吸入)、注射、注入、連続注入、局在化灌流で、ターゲット細胞を直接浸し、カテーテルを通じ、洗浄を通じ、クリーム中、脂質組成物(例えばリポソーム)中、または他の方法によって、あ

50

るいは一般の当業者に知られるであろうように、前述の任意の組み合わせによって、投与してもよい（例えば、本明細書に援用される、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 Mack Printing Company, 1990を参照されたい）。非経口投与、特に静脈内注射が、本発明の抗体などのポリペプチド分子を投与するために最も一般的に用いられる。

【0109】

非経口組成物には、注射、例えば皮下、経皮、病変内、静脈内、動脈内、筋内、クモ膜下内または腹腔内注射による投与のために設計されるものが含まれる。注射のため、本発明の抗体を水溶液、好ましくは生理学的に適合する緩衝液、例えばハクス溶液、リンゲル溶液、または生理学的生理食塩水緩衝液中で配合してもよい。溶液は、配合用（formulatory）剤、例えば懸濁剤、安定化剤および/または分散剤を含有してもよい。あるいは、抗体は、適切なビヒクル、例えば無菌発熱物質不含水で、使用前に構成するための粉末型であってもよい。本発明の抗体を、必要に応じて、以下に列挙する多様な他の成分とともに、適切な溶媒中に必要な量で取り込むことによって、無菌注射可能溶液を調製する。無菌性は、例えば無菌濾過膜を通じた濾過によって、容易に達成可能である。一般的に、基本的分散媒体および/または他の成分を含有する無菌ビヒクル内に、多様な無菌活性成分を取り込むことによって、分散物を調製する。無菌注射可能溶液、懸濁物またはエマルジョンを調製するための無菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥または凍結乾燥技術であり、これらの技術は、活性成分の粉末に加えて、先に無菌濾過した液体培地由来の任意のさらなる望ましい成分を生じる。液体媒体は、必要な場合、適切に緩衝されていなければならない、そして液体希釈剤はまず、十分な生理食塩水またはグルコースで、注射前に等張にされる。組成物は、製造および保存の条件下で安定でなければならない、そして微生物、例えば細菌および真菌の混入作用に対して保持されなければならない。内毒素混入は、安全なレベルに、例えば0.5 ng/mgタンパク質未満に、最小限に維持されなければならないことが認識されるであろう。適切な薬学的に許容されるキャリアーには、限定されるわけではないが：リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。水性注射懸濁物は、懸濁物の粘性を増加させる化合物、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストラン等を含有してもよい。場合によって、懸濁物はまた、適切な安定化剤、または高濃度溶液の調製を可能にするための、化合物溶解度を増加させる剤も含有してもよい。さらに、適切な油性注射懸濁物として、活性化合物の懸濁物を調製してもよい。適切な親油性溶媒またはビヒクルには、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばエチルクリーツ（cleats）またはトリグリセリド、またはリポソームが含まれる。

【0110】

例えばコアセルベート化技術によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中、それぞれ、コロイド性薬剤送達系（例えばリポソーム、アルブミン微小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセ

10

20

30

40

50

ル)中に、活性成分を封入してもよい。こうした技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版 Mack Printing Company, 1990)に開示される。持続放出調製物を調製してもよい。持続放出調製物の適切な例には、ポリペプチドを含有する固形疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスが含まれ、このマトリックスは、成形物品の形、例えばフィルムまたは微小カプセルであってもよい。特定の態様において、注射可能組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンまたはその組み合わせの組成物中で用いることによって、達成可能である。

【0111】

先に記載した組成物に加えて、また、抗体をデポ調製物として配合してもよい。移植によって(例えば皮下または筋内)、または筋内注射によって、こうした長期作用性配合物を投与してもよい。したがって、例えば、適切なポリマー性または疎水性物質とともに(例えば許容されうる油中のエマルジョンとして)、あるいはイオン交換樹脂として、あるいは難溶性誘導體として、例えば難溶性塩として、抗体を配合してもよい。

10

【0112】

慣用的な混合、溶解、乳化、被包、捕捉または凍結乾燥法によって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を製造することも可能である。1またはそれより多い生理学的に許容されうるキャリアー、希釈剤、賦形剤、またはタンパク質を薬学的に使用可能な調製物にプロセッシングするのを容易にする補助剤を用いて、慣用的な方式で薬学的組成物を配合することも可能である。適切な配合物は、選択した投与経路に応じる。

20

【0113】

抗体を、遊離酸または塩基中、中性または塩型で、組成物に配合してもよい。薬学的に許容されうる塩は、遊離酸または塩基の生物学的活性を実質的に保持する塩である。これらには、酸付加塩、例えばタンパク質性組成物の未結合(free)アミノ基で形成されるもの、あるいは例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸などの有機酸で形成されるものが含まれる。未結合カルボキシル基で形成される塩はまた、無機塩基、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄;あるいは有機塩基、例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンまたはプロカインに由来してもよい。薬学的塩は、対応する未結合塩基型よりも、水性および他のプロトン性溶媒中でより可溶性である傾向がある。

30

【0114】

療法的な方法および組成物

本明細書に提供する任意の抗体は、療法的な方法で使用可能である。

療法的な方法で使用するため、適切な医療行為と一致する様式で、本発明の抗体を配合し、投薬し、そして投与するであろう。この背景で考慮するための要因には、治療しようとする特定の障害、治療しようとする特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、剤の送達部位、投与方法、投与スケジュールング、および医療従事者に知られる他の要因が含まれる。

【0115】

1つの側面において、薬剤として使用するための本発明の抗体を提供する。さらなる側面において、疾患を治療する際に使用するための本発明の抗体を提供する。特定の態様において、治療法で使用するための本発明の抗体を提供する。1つの態様において、本発明は、治療が必要な個体において、疾患を治療する際に使用するための本明細書記載の抗体を提供する。特定の態様において、本発明は、疾患を有する個体を治療する方法であって、療法的有効量の抗体を個体に投与する工程を含む、前記方法において使用するための抗体を提供する。特定の態様において、治療しようとする疾患は肝臓疾患である。例示的な肝臓疾患には、肝炎、肝硬変、または肝臓癌、例えば肝細胞癌が含まれる。特定の態様において、疾患は、ウイルス感染、特に肝炎ウイルス感染、より具体的にはHBV感染である。別の特定の態様において、疾患は、癌、特に肝臓癌、より具体的には肝細胞癌(HCC)である。特定の態様において、方法はさらに、個体に、療法的有効量の少なくとも1

40

50

つのさらなる療法剤、例えば治療しようとする疾患がウイルス感染である場合は抗ウイルス剤、または治療しようとする疾患が癌である場合は抗癌剤を投与する工程をさらに含む。上記態様のいずれか記載の「個体」は、哺乳動物、好ましくはヒトである。

【0116】

さらなる側面において、本発明は、治療が必要な個体において疾患を治療するための薬剤の製造または調製における、本発明の抗体の使用を提供する。1つの態様において、薬剤は、疾患を有する個体に、療法的有効量の薬剤を投与する工程を含む、疾患を治療する方法において使用するためのものである。特定の態様において、治療しようとする疾患は肝臓疾患である。特定の態様において、疾患はウイルス感染、特に肝炎ウイルス感染、より具体的にはHBV感染である。他の態様において、治療しようとする疾患は癌である。特定の態様において、疾患は肝臓癌、特に肝細胞癌(HCC)である。1つの態様において、方法はさらに、個体に療法的有効量の少なくとも1つのさらなる療法剤、例えば治療しようとする疾患がウイルス感染である場合は抗ウイルス剤、または治療しようとする疾患が癌である場合は抗癌剤を投与する工程をさらに含む。上記態様のいずれか記載の「個体」は、哺乳動物、好ましくはヒトであることも可能である。

10

【0117】

さらなる側面において、本発明は、個体において疾患を治療するための方法であって、本発明の抗体の療法的有効量を、前記個体に投与する工程を含む、前記方法を提供する。1つの態様において、薬学的に許容されうる型で本発明の抗体を含む組成物を前記個体に投与する。特定の態様において、治療しようとする疾患は肝臓疾患である。特定の態様において、疾患はウイルス感染、特に肝炎ウイルス感染、より具体的にはHBV感染である。他の態様において、治療しようとする疾患は癌である。特定の態様において、疾患は肝臓癌、特に肝細胞癌(HCC)である。特定の態様において、方法はさらに、療法的有効量の少なくとも1つのさらなる療法剤、例えば治療しようとする疾患がウイルス感染である場合は抗ウイルス剤、または治療しようとする疾患が癌である場合は抗癌剤を投与する工程をさらに含む。上記態様のいずれか記載の「個体」は、哺乳動物、好ましくはヒトであることも可能である。

20

【0118】

本発明の抗体はまた、診断試薬としても有用である。抗原決定基への抗体の結合は、抗体に付着した標識によって、または本発明の抗体に特異的な標識二次抗体を用いることによって、容易に検出可能である。

30

【0119】

いくつかの態様において、本発明の抗体の有効量を細胞に投与する。他の態様において、本発明の抗体の療法的有効量を、疾患の治療のため、個体に投与する。

疾患の防止または治療のため、本発明の抗体の適切な投薬量(単独で用いた場合、あるいは1またはそれより多い他のさらなる療法剤と用いた場合)は、治療しようとする疾患のタイプ、投与経路、患者の体重、抗体のタイプ、疾患の重症度および経過、予防的または療法的目的で抗体を投与するか、以前のまたは同時の療法的介入、患者の臨床歴および抗体に対する反応、ならびに主治医の決定権に応じるであろう。投与に關与する医師は、いかなる場合も、個々の被験体に対する、組成物中の活性成分(単数または複数)の濃度、および適切な用量(単数または複数)を決定するであろう。限定されるわけではないが、多様な時点に渡る単一のまたは多数回の投与、ポラス投与、ならびにパルス注入を含む多様な投薬スケジュールが本明細書に意図される。

40

【0120】

1回、または一連の治療に渡って、患者に抗体を適切に投与する。疾患のタイプおよび重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$)の抗体が、例えば1またはそれより多い別個の投与によって、あるいは連続注入によってのいずれかで、患者に投与するための最初の候補投薬量であってもよい。1つの典型的な1日投薬量は、上述の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であってもよい。数日またはそれより長い期間に渡る反復投与に関しては、状態に

50

じて、治療は、一般的に、疾患症状の望ましい抑制が生じるまで、持続されるであろう。1つの例示的な抗体投薬量は、約0.005 mg/kg ~ 約10 mg/kgの範囲であろう。他の限定されない例において、用量はまた、投与あたり、約1 µg/kg体重、約5 µg/kg体重、約10 µg/kg体重、約50 µg/kg体重、約100 µg/kg体重、約200 µg/kg体重、約350 µg/kg体重、約500 µg/kg体重、約1 mg/kg体重、約5 mg/kg体重、約10 mg/kg体重、約50 mg/kg体重、約100 mg/kg体重、約200 mg/kg体重、約350 mg/kg体重、約500 mg/kg体重から約1000 mg/kg体重またはそれより多い範囲、そしてそこから導き出せる任意の範囲を含んでもよい。本明細書に列挙する数値から導き出せる範囲の限定されない例において、上記数値に基づいて、約5 mg/kg体重 ~ 約100 mg/kg体重、約5 µg/kg体重 ~ 約500 mg/kg体重の範囲等を投与してもよい。したがって、約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kgまたは10 mg/kg（または任意のその組み合わせ）の1またはそれより多い用量を、患者に投与してもよい。こうした用量を断続的に、例えば毎週または3週ごと（例えば患者が抗体の約2 ~ 約20、または例えば約6用量を投与されるように）投与してもよい。最初のより高い装填用量の後、1またはそれより多い、より低い用量を投与してもよい。しかし、他の投薬措置が有用でありうる。この療法の進行は、慣用的技術およびアッセイによって、容易に監視される。

10

【0121】

本発明の抗体は、一般的に、意図される目的を達成するために有効な量で用いられるであろう。疾患状態を治療するかまたは防止するための使用のため、本発明の抗体、またはその薬学的組成物を、療法的有効量で投与するかまたは適用する。療法的有効量の決定は、特に本明細書に提供する詳細な開示を考慮した際、十分に当業者の能力の範囲内である。

20

【0122】

全身投与のため、療法的有効用量をまず、*in vitro*アッセイ、例えば細胞培養アッセイから概算してもよい。次いで、細胞培養において決定されるようなIC₅₀を含む循環濃度範囲を達成するような用量を、動物モデルにおいて配合してもよい。こうした情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定してもよい。

【0123】

最初の投薬量をまた、当該技術分野に周知の技術を用いて、*in vivo*データ、例えば動物モデルから概算してもよい。一般の当業者は、動物データに基づいてヒトへの投与を容易に最適化することも可能である。

30

【0124】

投薬量および間隔を個々に調整して、療法的効果を維持するのに十分な抗体血漿レベルを提供してもよい。注射による投与のための有用な患者投薬量は、約0.1 ~ 50 mg/kg/日、典型的には約0.5 ~ 1 mg/kg/日の範囲である。各日、多数の用量を投与することによって、療法的に有効な血漿レベルを達成してもよい。血漿中のレベルを例えばHPLCによって測定してもよい。

【0125】

局所投与または選択的取り込みの場合、抗体の有効局所濃度は、血漿濃度に関連しない可能性もある。当業者は、過度の実験を伴わずに、療法的有効局所投薬量を最適化することを可能にするであろう。

40

【0126】

本明細書記載の抗体の療法的有効用量は、一般的に、実質的な毒性を引き起こすことなく、療法的利益を提供するであろう。抗体の毒性および療法的有効性を、細胞培養または実験動物において、標準的薬学的方法によって決定することも可能である。細胞培養アッセイおよび動物研究を用いて、LD₅₀（集団の50%に対して致死性である用量）およびED₅₀（集団の50%において療法的に有効である用量）を決定してもよい。毒性および療法的効果の間の用量比は、比LD₅₀/ED₅₀として表されうる、療法的指数で

50

ある。大きな療法的指数を示す抗体が好ましい。1つの態様において、本発明にしたがった抗体は、高い療法的指数を示す。ヒトで使用するのに適した投薬量範囲を配合する際に、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを用いてもよい。投薬量は好ましくは、ほとんどまたはまったく毒性を伴わず、ED₅₀を含む循環濃度の範囲内にある。多様な要因、例えば使用する投薬型、利用する投与経路、被験体の状態等に応じて、投薬量は、この範囲内で多様でありうる。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を概観して、個々の医師によって選択されてもよい（例えば本明細書にその全体が援用される、Fingler, 1975, : The Pharmacological Basis of Therapeutics 中, 第1章, p. 1）。

【0127】

本発明の抗体で治療される患者の主治医は、どのようにして、そしていつ、毒性、臓器機能不全等のために、投薬を終結させるか、中断するか、または調整するかを知っているであろう。逆に、主治医はまた、臨床的反応が適切でない（毒性を除く）場合、より高いレベルに治療を調整することも知っているであろう。関心対象の障害の管理において、投与用量の規模は、治療しようとする状態の重症度、投与経路等に応じて、多様であろう。状態の重症度は、例えば、部分的に、標準的予後評価法によって、評価可能である。さらに、用量、そしておそらく用量頻度はまた、個々の患者の年齢、体重、および反応に応じて多様であろう。

【0128】

他の剤および治療

本発明の抗体を、療法において、1またはそれより多い他の剤と組み合わせて投与してもよい。例えば、本発明の抗体を、少なくとも1つのさらなる療法剤と同時投与してもよい。用語「療法剤」は、こうした治療が必要な個体において、症状または疾患を治療するために投与される任意の剤を含む。こうしたさらなる療法剤は、治療しようとする特定の徴候に適した任意の活性成分、好ましくは互いに不都合に影響しない相補的活性を持つものを含んでもよい。特定の態様において、さらなる療法剤は抗ウイルス剤である。他の態様において、さらなる療法剤は抗癌剤である。

【0129】

こうした他の剤は、意図する目的のために有効な量で、組み合わせて適切に存在する。こうした他の剤の有効量は、用いる抗体の量、障害または治療のタイプ、および上に論じる他の要因に応じる。抗体は、一般的に、本明細書に記載するものと同じ投薬量および投与経路で、または本明細書に記載する投薬量の1~99%で、または経験的に/臨床的に適切と決定される任意の投薬量および任意の経路によって、用いられる。

【0130】

上述のこうした併用療法は、組み合わせた投与（2またはそれより多い療法剤が同じまたは別個の組成物中で含まれる）、および別個の投与を含み、後者の場合、本発明の抗体の投与は、さらなる療法剤および/またはアジュバントの投与前、投与と同時、および/または投与後に生じてもよい。

【0131】

製造品

本発明の別の側面において、上記障害の治療、防止および/または診断に有用な物質を含有する製造品を提供する。製造品は、容器およびラベルまたは添付文書を、容器上にまたは容器と関連して含む。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグ等が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な物質で形成されてもよい。容器は、単独の、あるいは状態を治療し、防止し、そして/または診断するのに有効な別の組成物と組み合わせた、組成物を保持し、そして無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体である。標識または添付文書は、組成物を、選択した状態を治療するために用いることを示す。さらに、製造品は、(a) 組成物を含有する第一の容器であって、組成物が本発明の抗体

10

20

30

40

50

を含む、前記容器；および（b）組成物を含有する第二の容器であって、組成物がさらなる療法剤を含む、第二の容器を含むことも可能である。本発明のこの態様における製造品は、組成物を用いて、特定の状態を治療することが可能であることを示す、添付文書をさらに含んでもよい。あるいは、またはさらに、製造品は、薬学的に許容されうる緩衝剤、例えば注射用の静菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液を含む第二（または第三）の容器を含んでもよい。これにはさらに、商業的およびユーザーの視点から、他の望ましい物質も含まれてもよく、これには、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジが含まれる。

【実施例】

【0132】

以下は、本発明の方法および組成物の例である。上に提供する一般的な説明を考慮して、多様な他の態様を実施可能であることが理解される。

組換えDNA技術

標準法を用いて、Sambrook, J.ら, Molecular cloning : A laboratory manual ; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, New York, 1989に記載されるように、DNAを操作した。製造者の指示にしたがって、分子生物学的試薬を用いた。

【0133】

ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は： Kabat, E. A.ら (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication No 91-3242に記載される。

【0134】

DNA配列決定

二本鎖配列決定によって、DNA配列を決定した。

遺伝子合成

必要な場合、望ましい遺伝子セグメントを、適切なテンプレートを用いてPCRによって生成するか、または自動化遺伝子合成によって、合成オリゴヌクレオチドおよびPCR産物から、Geneart AG (Regensburg, ドイツ)で合成してもよい。正確な遺伝子配列が入手可能でない場合、最も近い相同体由来の配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、そして適切な組織から生じるRNAから、RT-PCRによって遺伝子を単離した。単一制限エンドヌクレアーゼ切断部位が隣接する遺伝子セグメントを、標準的クローニング/配列決定ベクター内にクローニングした。プラスミドDNAを形質転換細菌から精製し、そして濃度をUV分光計によって決定した。サブクローニングした遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。それぞれの発現ベクター内へのサブクローニングを可能にするために、適切な制限部位を伴って、遺伝子セグメントを設計した。真核細胞における分泌のためにタンパク質をターゲティングするリーダーペプチドをコードする5'端DNA配列を含めて、すべての構築物を設計した。配列番号135~137は、例示的なリーダーペプチドを生じる。

【0135】

抗原発現ベクターのクローニング

関心対象の抗原をコードする増幅DNA断片を、インフレームで、可溶性および精製タグとして働くヒトIgG₁ Fcコード断片の下流で、哺乳動物レシピエントベクター内に挿入した(図1)。野生型Fc配列(配列番号123、125、127、129、131、133)を含む抗原-Fc融合物の発現は、ホモ二量体分子を生じた(av i - Fc - ヒトASGPR H1ストーク:配列番号124、av i - Fc - カニクイザルASGPR H1ストーク:配列番号126、av i - Fc - ヒトASGPR H1ストークCRD:配列番号130、av i - Fc - カニクイザルASGPR H1ストークCRD:配列番号132)。タンパク質CLEC10Aは、ASGPR H1と最も近い相同体と同

10

20

30

40

50

定され、そして構築物 *avi-Fc-ヒトCLEC10A* ストック (配列番号 128) および *avi-Fc-ヒトCLEC10A* ストック CRD (配列番号 134) を、選択した結合剤の特異性を試験するために発現させた。単量体状態にある抗原を発現するため、DNA 断片を、「穴」突然変異を含有する *Fc* 部分 (配列番号 117、119) に融合させ、そして *Fc-「ノブ」* (配列番号 121) 対応物とともに発現した (*Fc-ヒトASGP R H1 CRD*: 配列番号 118 および 122、*avi-Fc-ヒトCLEC10A CRD*: 配列番号 120 および 122)。抗原発現は、一般的に、MPSV プロモーターによって駆動され、そして転写は、CDS の下流に位置する合成ポリA シグナル配列によって終結した。さらに、すべての構築物は、Bir A ビオチンリガーゼとの同時発現中、特異的ビオチン化を可能にする N 末端 *Avi* タグを含有した。発現カセットに加えて、各ベクターは、EBV-EBNA 発現細胞株における自律複製のための EBV ori P 配列を含有した。

10

【0136】

抗原および抗体の産生および精製

抗原および抗体の両方を、EBV 由来タンパク質 EBNA を安定発現する HEK 293 細胞に一過性にトランスフェクションした。同時に、ビオチンリガーゼ Bir A をコードするプラスミドを同時トランスフェクションすると、*in vivo* で *Avi* タグ特異的ビオチン化が可能になった。次いで、プロテイン A カラム、その後、ゲル濾過を用いて、タンパク質を精製した。

20

【0137】

一般的なラムダ Fab ライブラリーの生成

以下の V ドメイン対を用いて、ヒト生殖系列遺伝子に基づき、Fab 形式で、一般的なラムダ抗体ライブラリーを生成した: DP47-ラムダライブラリーを生じる V_L3__19 ラムダ軽鎖と V_H3__23 重鎖。ライブラリーを軽鎖の CDR3 (L3) および重鎖の CDR3 (H3) においてランダム化し、そして「重複伸長によるスプライシング」(SOE) PCR によって 3 つの断片から組み立てた。断片 1 は、ランダム化 L3 を含む抗体遺伝子の 5' 端を含み、断片 2 は、L3 の終わりから H3 の始まりに渡る中央定常断片であり、一方、断片 3 は、ランダム化 H3 および Fab 断片の 3' 部分を含む。以下のプライマー組み合わせを用いて、ライブラリーのためのライブラリー断片を生成した: 断片 1 (LMB3 (配列番号 146) - V_L__3__19__L3r プライマー (配列番号 143~145))、断片 2 (RJH80 (配列番号 148) - DP47CDR3__ba(mod) (配列番号 149))、断片 3 (DP47-v4 プライマー (配列番号 140~142) - fdseq1ong (配列番号 147)) (表 1)。ライブラリー断片生成のための PCR パラメータは、5 分間 94 °C の最初の変性、25 周期の 60 秒間 94 °C、60 秒間 55 °C、60 秒間 72 °C、および 10 分間 72 °C の最終伸長であった。組み立て PCR のため、テンプレートとしての 3 断片の等モル比を用いて、パラメータは、3 分間 94 °C の最初の変性、および 5 周期の 60 秒間 94 °C、60 秒間 55 °C、120 秒間 72 °C であった。この段階で、外側プライマーを添加し、そしてさらなる 20 周期を行った後、10 分間 72 °C の最終伸長を行った (図 2)。十分な量の全長ランダム化 Fab 断片を組み立てた後、これらを、同様に処理したアクセプターファージミドベクターと平行して、NcoI/NheI で消化した。15 μg の Fab ライブラリー挿入物を 13.3 μg のファージミドベクターと連結した。精製した連結物を 60 回の形質転換に用い、1.5 × 10⁹ 形質転換体を生じた。Fab ライブラリーをディスプレイするファージミド粒子をレスキューし、そして選択に用いるために、PEG/NaCl 精製によって精製した。

30

40

【0138】

表 1. 一般的なラムダライブラリーの生成に用いたプライマーの配列

【0139】

【表 1 - 1】

配列番号	名称	配列
140	DP47-v4-4	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG 1 : G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%; 2 : G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%; 3 : G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; 4 : F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; 5 : K=70, R=30%
141	DP47-v4-6	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG 1 : G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%; 2 : G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%; 3 : G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; 4 : F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; 5 : K=70, R=30%
142	DP47-v4-8	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1-2-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG 1 : G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%; 2 : G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%; 3 : G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; 4 : F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; 5 : K=70, R=30%
143	VI_3_19_L3 r_V	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC <u>VHV</u> <u>ATT</u> <u>ACC</u> <u>GCT</u> <u>ACT</u> <u>ATC</u> <u>ACG</u> GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下線: 60%は元来の塩基そして 40%は M としてランダム化 太字および斜字: 60%は元来の塩基そして 40%は N としてランダム化
144	VI_3_19_L3 r_HV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC <u>CMM</u> <u>ATG</u> <u>ATT</u> <u>ACC</u> <u>GCT</u> <u>ACT</u> <u>ATC</u> <u>ACG</u> GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下線: 60%は元来の塩基そして 40%は M としてランダム化 太字および斜字: 60%は元来の塩基そして 40%は N としてランダム化

10

20

30

40

【 0 1 4 0 】

【表 1 - 2】

145	VI_3_19_L3 r_HLV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC <u>RHM VWG</u> <u>ATG ATT ACC GCT ACT ATC ACG</u> GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTC CGC 下線: 60%は元来の塩基そして 40%は M としてランダム化 太字および斜字: 60%は元来の塩基そして 40%は N としてランダム化
146	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
147	fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
148	RJH80	TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC
149	DP47CDR3_ ba (mod)	CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC

10

【 0 1 4 1 】

一般的ラムダ Fab ライブラリーからの抗ヒト ASGPR H1 結合剤の選択

HEK 293 に発現される、ヒト IgG1 抗体の Fc 部分に融合した単量体または二量体ヒト ASGPR タンパク質断片 (配列番号 118、120、124、126、128、130、132、134) を用いて、ヒト ASGPR H1 の細胞外ドメイン (ECD) の全体または断片に対する選択を行った。Fc 「ノブを穴に」形式を用いた単量体 Fc 融合物として、ASGPR H1 CRD および CLEC10A CRD を発現する (C 末端に融合した CRD を所持するただ 1 つの Fc) 一方、すべてのストーク断片および総 ECD をホモ二量体 Fc 融合タンパク質として発現した (図 1)。N 末端 avi タグを通じて、ビオチンリガーゼ BirA の同時発現によって、抗原を酵素的にビオチン化した。以下のパターンにしたがって、溶液中で、パニング周期を実行した: (1) Fc 結合剤を回避するため、NUNC maxisorp プレート上に 10 µg/ml でコーティングしたヒト IgG₁ を用いて、 $\sim 10^{12}$ のファージミド粒子をあらかじめきれいにする (preclearing)、(2) 100 nM ビオチン化抗原タンパク質に、あらかじめきれいにした反応の上清由来の非 Fc 結合ファージミド粒子を、総体積 1 ml 中で 0.5 時間結合させる、(3) ストレプトアビジンでコーティングした 5.4×10^7 の磁気ビーズを 10 分間添加することによって、ビオチン化抗原および付着した特異的結合ファージを捕捉する、(4) 5 x 1 ml PBS/Tween-20 および 5 x 1 ml PBS を用いてビーズを洗浄する、(5) 1 ml の 100 mM トリエチルアミン (TEA) を 10 分間添加することによってファージ粒子を溶出し、そして 500 µl の 1 M Tris/HCl pH 7.4 を添加することによって中和する、(6) 対数期の大腸菌 (E. coli) TG1 細胞を、上清中のファージ粒子に再感染させ、ヘルパーファージ VCS M13 に感染させ、そして続いて、続く選択周期で用いようとするファージミド粒子を PEG/NaCl 沈殿させる。一定のまたは減少する (10^{-7} M \sim 2×10^{-9} M) 抗原濃度のいずれかを用いて、3 ~ 5 周期に渡って選択を行った。周期 2 において、ストレプトアビジンビーズの代わりにニュートラビジン・プレートを用いて、抗原-ファージ複合体の捕捉を行った。ELISA によって、特異的結合剤を以下のように同定した: ウェルあたり 100 µl の 50 nM ビオチン化ヒト Fc-ストーク-CRD、Fc-CRD、または Fc-ストークをニュートラビジン・プレート上にコーティングした。Fab 含有細菌上清を添加し、そして抗 Flag/HRP 二次抗体を用いることによって、Flag タグを通じて、結合している Fab を検出した。バックグラウンドを超えて有意なシグナルを示すクローンを、配列決定 (配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 および 27) およびさらなる分析のため、選考通過とした。

20

30

40

50

【0142】

Fabの精製

細菌培養由来のFab（配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および28として列挙される可変ドメインのタンパク質配列）を、動力学的パラメータの正確な分析のために精製した。各クローンに関して、500mlの培養に、対応するファージミドを宿する細菌を接種し、そして1mM IPTGで、OD₆₀₀ 0.9に誘導した。その後、培養を25℃で一晩インキュベーションし、そして遠心分離によって採取した。再懸濁したペレットを25ml PPB緩衝液（30mM Tris-HCl pH8、1mM EDTA、20%スクロース）中で20分間インキュベーションした後、細菌を再び遠心分離し、そして上清を採取した。このインキュベーション工程を25mlの5mM MgSO₄溶液で1回反復した。両方のインキュベーション工程の上清をプールし、濾過し、そしてIMACカラム（His gravitrap、GE Healthcare）上に装填した。続いて、カラムを40mlの洗浄緩衝液（500mM NaCl、20mMイミダゾール、20mM NaH₂PO₄、pH7.4）で洗浄した。溶出（500mM NaCl、500mMイミダゾール、20mM NaH₂PO₄ pH7.4）後、PD10カラム（GE Healthcare）を用いて溶出液を再緩衝した。次いで、精製したFabの動力学的パラメータを、200nM~6.25nMの範囲の希釈列で、SPR分析（Proteon XPR36、Biorad）によって研究した。

10

【0143】

SPRによるアフィニティ決定

ニュートラビジン捕捉によって、NLCチップ上に固定された一価（avi-Fc-ヒトASGPR H1 CRD、配列番号118）または二価（avi-Fc-ヒトASGPR H1ストーク-CRD、配列番号130）ASGPR H1抗原とともに、25℃でProteon XPR36装置（Biorad）を用いた表面プラズモン共鳴によって、選択したFabクローンのアフィニティ（K_D）を測定した。組換え抗原（リガンド）の固定：抗原をPBST（10mMリン酸、150mM NaCl pH7.4、0.05% Tween-20）で10μg/mlに希釈し、次いで、多様な接触時間で、30μl/分で注入して、垂直配向で200、400または800反応単位（RU）の固定レベルを達成した。分析物注入：1ショット動力学的測定のため、注入方向を水平配向に変化させて、精製Fab（100~6.25nMの濃度範囲で多様）の2倍希釈シリーズを、別個のチャンネル1~5に沿って、150または200sの会合時間、および240または600sの解離時間で、50、60または100μl/分で同時に注入した。緩衝液（PBST）を第六のチャンネルに沿って注入して、参照のための「インライン」ブランクを提供した。会合および解離センサグラムを同時に適合させることによって、Proteon Manager v3.1ソフトウェアにおいて、単純な1対1ラングミュア結合モデルを用いて、会合速度定数（k_{on}）および解離速度定数（k_{off}）を計算した。平衡解離定数（K_D）を、比k_{off}/k_{on}として計算した。10mMグリシン、pH1.5を流速100μl/分、30sの接触時間で用いて、水平配向で再生を行った。2つのクローン、51A12（配列番号002および004）および52C4（配列番号006および008）は、ASGPR H1 CRDに特異的であることが見出された。顕著なことに、クローン51A12は、ナノモル未満の範囲でアフィニティを明らかにした。クローン5A4（配列番号010および012）、4F3（配列番号014および016）、R5C2（配列番号018および020）、R9E10（配列番号022および024）、およびR9E10（配列番号026および028）をASGPR H1のストーク領域またはストークおよびCRDの間の界面のいずれかに対して作製した。対応するヒトおよびカニクイザルエピトープに対するアフィニティは同様であった。対照的に、avi-FcヒトCLEC10AストークCRD（配列番号134）に対しては結合は検出されず、これらの結合剤の高い特異性が立証された。興味深いことに、クローン5A4は、ストーク抗原には強い結合を示したが、ストーク-CRDに対しては示さなかった。す

20

30

40

50

すべての測定のパラメータおよび熱力学的データを表2に要約する。

【0144】

表2. 抗ASGPR H1 Fabの動的および熱力学的パラメータ

【0145】

【表2】

抗体クローン	huASGPR H1 ストリーク	cyASGPR H1 ストリーク	huASGPR H1 ストリーク CRD	cyASGPR H1 ストリーク CRD	hu/cyASGPR H1 CRD	huCLEC10A ストリーク CRD
	ka (1/Ms) kd (1/s) KD (M)	ka (1/Ms) kd (1/s) KD (M)				
52C4					1.39 x 10 ⁵ 3.96 x 10 ⁻³ 2.86 x 10⁻⁸	結合なし
51A12					1.10 x 10 ⁵ 6.28 x 10 ⁻⁵ 5.70 x 10⁻¹⁰	結合なし
5A4	2.44 x 10 ⁵ 1.05 x 10 ⁻³ 4.30 x 10⁻⁹	3.72 x 10 ⁵ 1.40 x 10 ⁻³ 3.76 x 10⁻⁹				結合なし
4F3	1.51 x 10 ⁵ 4.45 x 10 ⁻³ 2.95 x 10⁻⁸	1.43 x 10 ⁵ 4.80 x 10 ⁻³ 3.36 x 10⁻⁸	2.24 x 10 ⁵ 4.08 x 10 ⁻³ 1.82 x 10⁻⁸	1.69 x 10 ⁵ 3.65 x 10 ⁻³ 2.16 x 10⁻⁸		結合なし
R9E10			5.86 x 10 ⁵ 2.11 x 10 ⁻³ 3.60 x 10⁻⁹	4.60 x 10 ⁵ 1.99 x 10 ⁻³ 4.34 x 10⁻⁹		結合なし
R7E12			2.94 x 10 ⁵ 2.68 x 10 ⁻³ 9.12 x 10⁻⁹	2.47 x 10 ⁵ 2.36 x 10 ⁻³ 9.55 x 10⁻⁹		結合なし
R5C2			4.23 x 10 ⁵ 1.12 x 10 ⁻³ 2.65 x 10⁻⁹	3.34 x 10 ⁵ 1.14 x 10 ⁻³ 3.41 x 10⁻⁹		結合なし

10

20

30

40

【0146】

発現ベクターへの可変抗体ドメインのクローニング

S PRによって対応する抗原に特異的結合を示すすべてのFabを、IgG₁/ラムダ抗体に変換した。したがって、重鎖および軽鎖vドメインのPCR増幅DNA断片を、インフレームで、ヒトIgG₁定常重鎖またはヒト定常ラムダ軽鎖いずれかを含有するそれぞれのレシピエント哺乳動物発現ベクター内に挿入した。抗体発現は、MPSVプロモーターによって駆動され、そして転写は、CDSの下流に位置する合成ポリAシグナル配列によって終結した。発現カセットに加えて、各ベクターは、EBV-EBNA発現細胞株に

50

おける自律複製のため、EBV oriP配列を含有した。

【0147】

HepG2細胞への抗体の結合分析

肝細胞癌細胞株HepG2へのヒトIgG₁抗ASGPR抗体の結合をFACSによって測定した。簡潔には、96ウェル丸底プレート中、ウェルあたり0.2ミオ細胞を、30 μg/mlの濃度の抗ASGPR抗体と、300 μl中、4で30分間インキュベーションした。0.1%BSAを含有するPBSで細胞を洗浄することによって、未結合抗体を除去した。FITCコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗ヒトIgG Fcガンマ断片特異的二次F(ab')₂断片(Jackson ImmunoResearch #109-096-098; PBS、0.1%BSA中、作業溶液1:20)を用いて、結合した抗体を検出した。4で30分間インキュベーションした後、洗浄することによって、未結合抗体を除去し、そして1%PFAを用いて細胞を固定した。BD FACS CantoII(ソフトウェアBD DIVA)を用いて、細胞を分析した(図3)。すべての抗体は、HepG2細胞に強い結合を示した。

10

【0148】

蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)分析によって、ASGPR発現細胞上のエピトープに対するIgGのアビディティを決定した。この分析のため、SNAPタグをコードするDNA配列(Cisbioより購入したプラスミド)をPCRによって増幅し、そして全長ヒトASGPR H1配列を含有する発現ベクター(Origene)内に連結した。生じた融合タンパク質は、C末端SNAPタグを伴う、全長ASGPR H1で構成された。トランスフェクション試薬としてLipofectamine 2000を用いて、10 μg DNAで、HEK293細胞をトランスフェクションした。20時間のインキュベーション時間後、細胞をPBSで洗浄し、そして100 nM SNAP-Lumi4Tb(Cisbio)を含有するLabMed緩衝液(Cisbio)中、37で1時間インキュベーションして、SNAPタグの特異的標識を導いた。続いて、細胞をLabMed緩衝液で4回洗浄して、未結合色素を除去した。緩衝液に比較して、615 nmでのテルビウム放出を測定することによって、標識効率を決定した。次いで、細胞を-80で最長6ヶ月間凍結保存した。50~0.39 nMの範囲の濃度で、ASGPR特異的抗体を標識細胞(ウェルあたり100細胞)に添加し、その後、FRETのアクセプター分子として抗ヒトFc-d2(ウェルあたり最終200 nM)を添加することによって、アビディティを測定した。RTで3時間のインキュベーション時間後、アクセプター色素(665 nm)ならびにドナー色素(615 nm)の放出を、蛍光読み取り装置(Victor 3、Perkin Elmer)を用いて決定した。アクセプター放出対ドナー放出の比を計算し、そしてバックグラウンド対照(抗huFc-d2を含む細胞)の比を減じた。GraphPad Prism5で曲線を分析して、そしてK_D値を計算した。(図4)。クローン4F3は、SPRによって測定すると、ASGPR H1ストーク-CRDに対する最低のアフィニティを示す(表2)一方、細胞表面へのIgGとしての結合強度は、強いアビディティによって駆動され、4F3を、低濃度で最強の結合強度を持つクローンにした。対照的に、CDRに結合するクローン51A12は、SPR研究において、精製抗原に対するよりも細胞に対して、低い抗体濃度で、有意により弱い結合強度を示す。

20

30

40

【0149】

天然ASGPRリガンドとの結合競合

ASGPRの天然リガンドとしての脱シアル化糖タンパク質、例えばアシアロフェチュインと、ASGPR抗体の競合を、肝細胞癌細胞株HepG2を用いて分析した。96ウェル丸底プレート中、ウェルあたり0.2ミオ細胞を、40 μlのAlexa488標識アシアロフェチュイン(ウシ胎児血清由来、Sigma Aldrich #A4781、最終濃度100 μg/ml)と、4で30分間インキュベーションした。ASGPRへのリガンド結合はカルシウム依存性であるため、結合はカルシウムの存在下で行った。0

50

． 1 % B S A を含有する H B S S で細胞を 1 回洗淨することによって、未結合タンパク質を除去した。次いで、40 μ l の抗 A S G P R 抗体 (3 0、6、および 1 . 2 5 μ g / m l 最終濃度) を、1 0 0 μ g / m l のアシアロフェチュインの存在下で、細胞に添加した。細胞を 4 \times で 3 0 分間インキュベーションし、そして細胞を 1 回洗淨することによって、未結合タンパク質を除去した。A P C コンジュゲート化 A f f i n i P u r e ヤギ抗ヒト I g G F c ガンマ断片特異的二次 F (a b ') 2 断片 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h # 1 0 9 - 1 3 6 - 1 7 0 ; 0 . 1 % B S A を含有する H B S S 中、作業溶液 1 : 5 0) を二次抗体として用いた。4 \times で 3 0 分間インキュベーションした後、洗淨することによって、未結合二次抗体を除去した。1 % P F A を用いて細胞を固定し、そして B D F A C S C a n t o I I (ソフトウェア B D D I V A) を用いて分析した。C D R 特異的抗体およびストーク - C R D 特異的抗体の両方の分析によって、抗体は、アシアロフェチュインの存在とは独立に A S G P R H 1 に結合し、そして逆も当てはまり、そして結合競合は起こらないことが明らかになった (図 5 および 6) 。

10

【 0 1 5 0 】

内在化研究

A S G P R への結合後、肝臓細胞内への脱シアル化糖タンパク質の取り込みは、非常に迅速に起こることが知られる。この受容体仲介性エンドサイトーシス中、エンドソーム管腔は、酸性になり、受容体 - リガンド複合体が解離することが可能になる。リガンドが、リソソームにおける分解のためにターゲティングされる一方、A S G P R は、リサイクルされて細胞表面に戻ることが示された。細胞表面上での抗体の保持時間を分析するため、肝細胞癌細胞株 H e p G 2 を用いて、A S G P R - 抗体複合体の内在化を分析した。内在化を阻害するため、A S G P R 陽性 H e p G 2 細胞を細胞培地中、4 \times にシフトさせた。振盪装置上、4 \times で抗体 (3 0 μ g / m l) と 4 5 分間インキュベーションした後、冷 P B S で 2 回洗淨することによって、未結合抗体を除去し、そして細胞を再懸濁し、そしてあらかじめ 3 7 $^{\circ}$ に温めた培地中で培養して、受容体仲介エンドサイトーシスを含む細胞代謝を再活性化させた。1 つのアリコットを直ちに採取し、そして氷上に保存し、これはゼロ時点に相当した。残りの細胞を 3 7 $^{\circ}$ でインキュベーションし、そして 5、1 5、3 0、および 1 2 0 分後、さらなる試料を採取し、そして冷 P B S で洗淨して、さらなる内在化を停止させた。P E コンジュゲート化 A f f i n i P u r e ヤギ抗ヒト I g G F c ガンマ特異的二次 F (a b ') 2 抗体断片 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h # 1 0 9 - 1 1 6 - 1 7 0、作業溶液 1 : 5 0) を用いて、細胞表面に結合した抗体を検出した。4 \times で 3 0 分間インキュベーションした後、0 . 1 % B S A を含有する P B S で洗淨することによって、未結合抗体を除去した。1 % P F A を用いて細胞を固定し、そして B D F A C S C a n t o I I (ソフトウェア B D D I V A) を用いて分析した。図 7 A は、クローン 4 F 3 および 5 1 A 1 2 の例示的な細胞表面曝露抗体レベルを示す。興味深いことに、細胞外抗体シグナルは、最初の 3 0 分の間に有意に (最大 6 0 % シグナル減少) に減少したが、次いで、残りの時間経過に渡って、減少は遅延された。この結果は、抗体が非常に効率的に内在化するが、次いで、次第に細胞表面にリサイクルされて戻り、一定の内在化およびリサイクリングの動的安定状態条件を導くことを示す。この仮説を支持するため、同じ実験であるが、抗体と細胞のインキュベーションを、細胞培地中、3 7 $^{\circ}$ で 4 5 分間、実行する実験を行った。これらの条件によって、受容体 - 抗体複合体が形成され、そして全インキュベーション時間中に内在化されることが可能になり、最終的に定常的なエンドサイトーシスおよびリサイクリングの安定状態を導くことが可能になる。その後、温かい P B S で 2 回洗淨することによって、未結合抗体を除去し、そして細胞を温かい培地に再懸濁した。1 つの試料を直ちに採取し、そして氷上に保存し、これはゼロ時点に相当した。残りの細胞を 3 7 $^{\circ}$ でインキュベーションし、そして 5、1 5、3 0、および 1 2 0 分後、さらなる試料を採取し、そして冷 P B S で洗淨して、さらなる内在化を停止させた。上述のように、表面曝露抗体の検出を行った。F A C S 分析によって、シグナル強度の減少は、4 \times よりも 3 7 $^{\circ}$ で抗体をインキュベーションした後、実験の時間経過中により顕著でないことが明らかになり、3 7 $^{\circ}$ での抗体のインキュベシ

20

30

40

50

オンが、抗体 - 受容体複合体の内在化およびリサイクリングの平衡を生じることが示唆された (図 7 B)。一定の内在化およびリサイクリングの仮説をさらに支持するため、直接 FITC 標識抗体セットを用いて、ASGPR H1 特異的抗体の内在化をさらに分析した。以前のように、標識抗体を HepG2 細胞と 4 でインキュベーションして、抗体が ASGPR H1 に結合するが、内在化しないことを可能にした。振盪装置上、抗体 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 4 で 45 分間インキュベーションした後、冷 PBS で 2 回洗浄することによって、未結合抗体を除去し、そして細胞を再懸濁し、そしてあらかじめ 37 に温めた培地中で培養して、受容体仲介エンドサイトーシスを含む細胞代謝を再活性化させた。0、5、15、30、および 120 分後、細胞アリコットを採取し、そして冷 PBS で洗浄して、さらなる内在化を停止させた。PE コンジュゲート化 AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG Fc ガンマ特異的二次 F(ab')₂ 抗体断片 (Jackson ImmunoResearch #109-116-170、作業溶液 1:50) を用いて、細胞表面に結合した抗体を検出した。先に見られたように、表面曝露の検出レベルは、安定化される前、最初の 30 分の間に有意に減少した (図 7 C)。しかし、表面曝露抗体および内在化抗体の両方に相当する FITC シグナルによる IgG の検出は、抗体総量が長期に渡って一定のままであることを明らかにした (図 7 D)。この結果は、抗体が、定常の内在化およびリサイクリングの動的安定状態条件にあるという知見を強く支持する。

10

【0151】

クローン 51A12 に基づく L3 アフィニティライブラリーの生成

抗体配列の分析によって、51A12 軽鎖の CDR3 領域中に 2 つのホットスポット、すなわち 2 つの隣接するシステインおよびグリコシル化部位が明らかになった (図 8)。システインおよびグリコシル化を伴わない 51A12 由来クローンの生成のため、LCDR3 をランダム化した成熟ライブラリーを生成した。クローン 51A12 の配列 (A82G、C112S、C113S、S116A) (配列番号 33) をランダム化のテンプレートとして用いた。「RDISSNR AVR N」位をコードするトリプレットをセグメント全体に渡ってランダム化した。ライブラリー生成のため、2 断片の重複 PCR 産物から生じる DNA 部分をファージベクター内にクローニングした。断片 1 の生成のため、プライマーの組み合わせ LCDR3 rand (配列番号 151) および fdseq1ong (配列番号 147) (表 1 および 3) を用い、テンプレートとしてクローン 51A12 (A82G、C112S、C113S、S116A) を用いた。増幅条件には、最初の 5 分間 94 のインキュベーション工程、その後、各々、30 秒間 94 変性、30 秒間 60 アニールリング、および 90 秒間 72 伸長工程からなる 25 周期、その後、最終の 10 分間 72 伸長工程が含まれた。生じた断片を、アガロースゲル上で精製した。プライマーの組み合わせ LCDR3 rev (配列番号 150) および LMB3 (配列番号 146) で、断片 2 を生成した (表 1 および 3)。増幅条件には、最初の 5 分間 94 のインキュベーション工程、その後、各々、30 秒間 94 変性、30 秒間 60 アニールリング、および 30 秒間 72 伸長工程からなる 25 周期、その後、最終の 10 分間 72 伸長工程が含まれた。両方の断片の組み立てのため、等モル量の断片 1 および 2 を用いた。増幅条件には、最初の 5 分間 94 のインキュベーション工程、その後、各々、1 分間 94 変性、1 分間 60 アニールリング、および 120 秒間 72 伸長工程からなり、プライマーを伴わない 5 周期が含まれた。外側プライマー LMB3 および fdseq1ong を添加した後、同じパラメータを用いて、20 のさらなる周期を行った。最後に、最終 10 分間 72 インキュベーション工程を行った。どちらも、生じたゲル精製 DNA 断片およびクローン 51A12 (A82G、C112S、C113S、S116A) (配列番号 33) を、NcoI/PstI で消化した (図 9)。ライブラリーを生成するため、10 μg 挿入物および 30 μg ベクターを用いて、連結を行った。精製した連結物をエレクトロポレーションによって、TG1 細菌内に形質転換して、 3×10^9 形質転換体を生じた。Fab ライブラリーをディスプレイするファージミド粒子をレスキューし、そして選択に用いるため、PEG/NaCl 精製によって精製した。

20

30

40

【0152】

50

表 3 . L 3 アフィニティ成熟ライブラリーの生成に用いたプライマーの配列

【 0 1 5 3 】

【表 3】

配列番号	名称	配列
150	LCDR3rev	GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTC
151	LCDR3 rand	GAGGCTGACTATTACTGTA ACTCC 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11 TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC 1: 50% R, 3.1% 残り (S, T, C なし); 2: 50% D, 2.8% 残り (C なし); 3: 50% I, 2.8% 残り (C なし); 4: 50% S, 2.8% 残り (C なし); 5: 50% S, 2.8% 残り (C なし); 6: 50% N, 2.8% 残り (C なし); 7: 50% R, 2.8% 残り (C なし); 8: 50% A, 3.1% 残り (S, T, C なし); 9: 50% V, 2.8% 残り (C なし); 10: 50% R, 2.8% 残り (C なし); 11: 50% N, 2.8% 残り (C なし)

10

【 0 1 5 4 】

20

システインおよびグリコシル化部位を伴わない、アフィニティ成熟 5 1 A 1 2 由来クローンの選択

標準的プロトコル (Silacciら (2005), Proteomics 5, 2340-50) を用いたファージディスプレイによって、LCDR3 内にシステインおよびグリコシル化部位を含まないアフィニティ成熟 5 1 A 1 2 由来 Fab の生成を行った。第一のパンニング周期において、以下の方法にしたがって、溶液中で選択を行った: (1) 10^{12} のファージミド粒子を、10 nM ビオチン化 Fc-CRD に、総体積 1 ml 中で 0.5 時間結合させる、(2) ストレプトアビジンでコーティングした 5.4×10^7 の磁気ビーズを 10 分間添加することによって、ビオチン化 Fc-CRD および特異的に結合したファージ粒子を捕捉する、(3) 5×1 ml PBS / Tween-20 および 5×1 ml PBS を用いてビーズを洗浄する、(4) 1 ml の 100 mM TEA を 10 分間添加することによってファージ粒子を溶出させ、そして 500 μ l の 1 M Tris / HCl pH 7.4 を添加することによって中和する、(5) 指数増殖期の大腸菌 TG1 細胞を再感染させる、そして (6) ヘルパーファージ VCSM13 に感染させ、そして続いて、続く選択周期で用いようとするファージミド粒子を PEG / NaCl 沈殿させる。減少する (10^{-9} M ~ 0.5×10^{-9} M) 抗原濃度を用いて、3 周期に渡って選択を行った。周期 2 および 3 において、ストレプトアビジンビーズの代わりにニュートラビジン・プレートを用いて、抗原-ファージ複合体の捕捉を行った。さらに、ニュートラビジン・プレートを 2 l PBS 中で 3 時間洗浄した。ELISA によって、特異的結合剤を以下のように同定した: ウェルあたり 100 μ l の 50 nM ビオチン化 Fc-CRD をニュートラビジン・プレート上にコーティングした。Fab 含有細菌上清を添加し、そして抗 Flag / HRP 二次抗体を用いることによって、Flag タグを通じて、結合している Fab を検出した。ELISA 陽性クローンを、96 ウェル形式で、可溶性 Fab 断片として細菌発現させ、そして上清を、Proteon XPR36 を用いた SPR 分析によって、動力学スクリーニング実験に供した。最高のアフィニティ定数を持つ Fab を発現しているクローンを同定し、そして対応するファージミドの軽鎖を配列決定した (5 1 A 1 2 __C1、配列番号 35; 5 1 A 1 2 __C7、配列番号 37; 5 1 A 1 2 __E7、配列番号 39; 5 1 A 1 2 __H3、配列番号 41; 5 1 A 1 2 __A6、配列番号 43; 5 1 A 1 2 __D1、配列番号 45; 5 1 A 1 2 __H6、配列番号 47)。すべてのクローンは、軽鎖 CDR3 領域中にいかなる決定的なアミノ酸も含まなかった。

30

40

50

【0155】

S P Rによる、5 1 A 1 2に基づくアフィニティ成熟クローンのアフィニティ決定
 ニュートラビジョン捕捉によって、N L Cチップ上に固定されたビオチン化一価 (a v i -
 F c - ヒト A S G P R H 1 C R D、配列番号 1 1 8) または二価 (a v i - F c - ヒ
 ト A S G P R H 1 ストック - C R D、配列番号 1 3 0) A S G P R H 1 抗原とともに
 、 2 5 で P r o t e O n X P R 3 6 装置 (B i o r a d) を用いた表面プラズモン共
 鳴によって、親重鎖 (配列番号 4) およびアフィニティ成熟軽鎖 (5 1 A 1 2 __ C 1、配
 列番号 3 6 ; 5 1 A 1 2 __ C 7、配列番号 3 8 ; 5 1 A 1 2 __ E 7、配列番号 4 0 ;
 5 1 A 1 2 __ H 3、配列番号 4 2 ; 5 1 A 1 2 __ A 6、配列番号 4 4 ; 5 1 A 1 2
 __ D 1、配列番号 4 6 ; 5 1 A 1 2 __ H 6、配列番号 4 8) からなる精製 5 1 A 1 2 由
 来 F a b 断片のアフィニティ (K_D) を測定した。組換え抗原 (リガンド) の固定 : 抗原
 を P B S T (1 0 m M リン酸、1 5 0 m M N a C l p H 7 . 4、0 . 0 0 5 % T w
 e e n - 2 0) で 1 0 μ g / m l に希釈し、次いで、多様な接触時間で、3 0 μ l / 分
 で注入して、垂直配向で 2 0 0、4 0 0 または 8 0 0 反応単位 (R U) の固定レベルを達成
 した。分析物注入 : 1 ショット動力的測定のため、注入方向を水平配向に変化させて、
 精製 F a b (1 2 . 5 ~ 0 . 7 8 n M の濃度範囲で多様) の 2 倍希釈シリーズを、別個の
 チャンネル 1 ~ 5 に沿って、1 5 0 または 2 0 0 s の会合時間、および 3 6 0 0 s の解離時
 間で、1 0 0 μ l / 分で同時に注入した。緩衝液 (P B S T) を第六のチャンネルに沿って
 注入して、参照のための「インライン」ブランクを提供した。会合および解離センサ
 グラムを同時に適合させることによって、P r o t e O n M a n a g e r v 3 . 1 ソフト
 ウェアにおいて、単純な 1 対 1 ラングミュア結合モデルを用いて、会合速度定数 (k_o_n)
 および解離速度定数 (k_o_ff) を計算した。平衡解離定数 (K_D) を、比 k_o_ff
 / k_o_n として計算した。1 0 m M グリシン、p H 1 . 5 を流速 1 0 0 μ l / 分、3 0 s
 の接触時間で用いて、水平配向で再生を行った。選択したクローンの大部分は、親クロー
 ンと同様のアフィニティを示したが、クローン 5 1 A 1 2 __ A 6 (配列番号 4 4) は、有
 意に改善されたアフィニティを示した (表 4) 。

10

20

【0156】

表 4 . アフィニティ成熟抗 A S G P R 1 F a b の動力的および熱力的パラメー
 タ

【0157】

30

【表 4】

ASGPR CRD 特異的結合剤	ヒト / カニクイザル ASGPR1 CRD		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
51A12	1.10E+05	6.28E-05	5.70E-10
51A12 A82G S116A	1.27E+05	1.60E-04	1.25E-09
51A12 S116A	1.31E+05	1.78E-4	1.43E-09
51A12_C1	1.74E+05	4.19E-05	2.41E-10
51A12_E7	2.15E+05	9.64E-05	4.48E-10
51A12_H3	1.63E+05	8.30E-05	5.10E-10
51A12_A6	3.26E+05	2.61E-05	8.01E-11
51A12_C7	1.99E+05	4.67E-05	2.35E-10
51A12_D1	4.00E+05	8.85E-05	2.21E-10
51A12_H6	0.86E+05	2.79E-05	3.25E-10

10

20

【0158】

HepG2細胞へのアフィニティ成熟51A12誘導体の結合分析

選択したアフィニティ成熟51A12誘導体のASGPR陽性肝細胞癌細胞株HepG2への結合を、FACSによって測定した。陰性対照として、ASGPR陰性細胞株Helaを用いた。96ウェル丸底プレート中、ウェルあたり0.2ミオ細胞を、精製Fab断片(1.1、3.3および10 μ g/ml)またはヒトIgG₁変換抗体(0.01、0.04、0.1、0.4、1.1、3.3および10 μ g/ml)のいずれかと、300 μ l中、4で30分間インキュベーションした。0.1%BSAを含有するPBSで細胞を洗浄することによって、未結合抗体を除去した。FITCコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗ヒトF(ab')₂断片特異的二次F(ab')₂断片(Jackson Immuno Research Lab #109-096-097)またはFITCコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗ヒトIgG₁Fcガンマ断片特異的二次F(ab')₂断片(Jackson ImmunoResearch #109-096-098; PBS、0.1%BSA中、作業溶液1:20)のいずれかを用いて、結合した分子を検出した。4で30分間インキュベーションした後、洗浄することによって、未結合抗体を除去し、そして1%PFAを用いて細胞を固定した。BD FACS CantoII(ソフトウェアBD DIVA)を用いて、細胞を分析した。HepG2細胞へのFab結合の分析によって、すべてのクローンの強い結合が明らかになった(図10)。変異体51A12_A6(配列番号44)は、SPR分析および細胞結合研究の両方において、最強の結合剤であった。HepG2細胞へのIgG₁変換抗体としてのクローン変異体の結合分析は、すべてのクローンに関して同様に強い結合パターンを生じ(図11A)、一方、最高抗体濃度でのHela細胞への結合は、非常に弱いかまたは検出不能であり(図11B)、これらのクローン変異体の特異性を強調した。

30

40

【0159】

IgG-IFN DNA構築物の生成

ASGPR H1抗体、51A12、51A12(S116A)、51A12(A82G、S116A)、52C4、5A4、4F3、R5C2、R9E10、R7E12、51

50

A 1 2 __ C 1、5 1 A 1 2 __ C 7、5 1 A 1 2 __ E 7、5 1 A 1 2 __ H 3、5 1 A 1 2 __ A 6、5 1 A 1 2 __ D 1 および 5 1 A 1 2 __ H 6 に基づいて、A S G P R H 1 ターゲティング化 I g G - I F N 融合タンパク質をコードする D N A 配列を生成し、ここで、1つのインターフェロン - 2 a (I F N) を、図 1 2 A に示すように、1つのヘテロ二量体重鎖の C 末端に融合させた。A S G P R H 1 が選択的に発現される肝臓の肝細胞へのターゲティングは、二価抗体 F a b 領域を通じて達成される (アビディティ効果)。単一 I F N の存在を生じるヘテロ二量体化は、ノブを穴に (k i h) 技術を適用することによって達成される。ホモ二量体 I g G サイトカイン融合物の生成を最小限にするため、(G ₄ S)₃ リンカーを通じて、ノブ含有 I g G 重鎖の C 末端 (C 末端 L y s 残基の欠失を含む) にサイトカインを融合させた。抗体 - サイトカイン融合物は、I g G 様特性を有する。F c R 結合 / エフェクター機能を減少させ、そして F c R 同時活性化を防止するため、P 3 2 9 G L 2 3 4 A L 2 3 5 A (L A L A) 突然変異を F c ドメイン中に導入した。しかし、F c R n 結合は損なわれなかった。これらのイムノコンジュゲートをコードする D N A 配列を、配列番号 4 9、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2)、配列番号 5 5、5 7 および 5 9 (5 2 C 4)、配列番号 9 3、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 A 8 2 G、S 1 1 6 A)、配列番号 9 1、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2、S 1 1 6 A)、配列番号 6 1、6 3 および 6 5 (5 A 4)、配列番号 6 7、6 9 および 7 1 (4 F 3)、配列番号 7 3、7 5 および 7 7 (R 5 C 2)、配列番号 7 9、8 1 および 8 3 (R 9 E 1 9)、配列番号 8 5、8 7 および 8 9 (R 7 E 1 2)、配列番号 9 5、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ C 1)、配列番号 9 7、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ C 7)、配列番号 9 9、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ E 7)、配列番号 1 0 1、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ H 3)、配列番号 1 0 3、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ A 6)、配列番号 1 0 5、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ D 1)、配列番号 1 0 7、5 1 および 5 3 (5 1 A 1 2 __ H 6) に示す。さらに、別の穴 - 重鎖を生成し、ここでは、V H および C H 1 ドメインの両方を欠失させた (配列番号 1 1 5)。生じた F c 断片は、全長ノブ重鎖とヘテロ二量体化することが可能であり、単一サイトカイン融合を伴う一価抗体を導いた (図 1 2 B)。機能アッセイに関する陰性対照として、明記するターゲットに I g G が結合しない対照 D P 4 7 G S / D P L 1 6 非ターゲティング化 I g G - I F N a タンパク質をコードする対応する D N A 構築物を生成した。このアイソタイプ・イムノコンジュゲートの D N A 配列を、配列番号 1 0 9、1 1 1 および 1 1 3 に提供する。

【 0 1 6 0 】

抗体 - サイトカイン構築物の発現および精製

リン酸カルシウムトランスフェクションを用いて、指数関数的に増殖している H E K 2 9 3 - E B N A 細胞を哺乳動物発現ベクターで同時トランスフェクションすることによって、イムノコンジュゲートを産生した。あるいは、懸濁中で増殖している H E K 2 9 3 - E B N A 細胞を、ポリエチレンイミン (P E I) によって、それぞれの発現ベクターでトランスフェクションした。続いて、1アフィニティ工程 (プロテイン A)、その後、サイズ排除クロマトグラフィ (S u p e r d e x 2 0 0、G E H e a l t h c a r e) で構成される方法によって、I g G - サイトカイン融合タンパク質を上清から精製した。プロテイン A カラム (H i T r a p P r o t A、G E H e a l t h c a r e) を、2 0 m M リン酸ナトリウム、2 0 m M クエン酸ナトリウム p H 7 . 5 中で平衡化した。上清を装填した後、カラムをまず、2 0 m M リン酸ナトリウム、2 0 m M クエン酸ナトリウム p H 7 . 5 で洗浄し、そして続いて、1 3 . 3 m M リン酸ナトリウム、2 0 m M クエン酸ナトリウム、5 0 0 m M 塩化ナトリウム、p H 5 . 4 5 で洗浄した。I g G - サイトカイン融合タンパク質を、2 0 m M クエン酸ナトリウム、1 0 0 m M 塩化ナトリウム、1 0 0 m M グリシン、p H 3 で溶出させた。分画を中和し、プールし、そして最終配合緩衝液 (2 5 m M リン酸カリウム、1 2 5 m M 塩化ナトリウム、1 0 0 m M グリシン、p H 6 . 7、または 2 0 m M ヒスチジン、1 4 0 m M N a C l、p H 6 . 0) 中、サイズ排除クロマトグラフィ (H i L o a d 1 6 / 6 0 S u p e r d e x 2 0 0、G E H e a l t h c a r e) によって精製した。アミノ酸配列に基づいて計算したモル消光係数を用い

10

20

30

40

50

て、光学密度 (OD) を 280 nm で測定することによって、精製タンパク質試料のタンパク質濃度を決定した。イムノコンジュゲートの純度および分子量を、還元剤 (5 mM 1,4-ジチオトレイトール) の存在下および非存在下で、SDS-PAGE または Caliper によって分析した。製造者の指示にしたがって、NuPAGE (登録商標) プレキャストゲル系 (Invitrogen) を用いた (4~20% Tris-グリシングルまたは 3~12% Bis-Tris)。Superdex 200 10/300 GL 分析用サイズ排除カラム (GE Healthcare) を用いて、2 mM MOPS、150 mM NaCl、0.02% NaN₃、pH 7.3 流動緩衝液中、25 でイムノコンジュゲート試料の凝集物含量を分析した。図 13 (51A12 kih IgG IFN、配列番号 50、52、54)、図 14 (4F3 kih IgG IFN、配列番号 68、70、72)、図 15 (51A12__C1 kih IgG IFN、配列番号 96、52、54)、図 16 (51A12__E7 kih IgG IFN、配列番号 100、52、54)、図 17 (51A12__C7 kih IgG IFN、配列番号 98、52、54)、図 18 (非ターゲット化 kih IgG IFN、配列番号 110、112、114) および図 19 (一価 51A12 kih IgG IFN、配列番号 50、52、116) 中、選択したクローンに関して、分析データの要約を示す。

【0161】

SPR による、ASGPR H1 に対する IgG-IFN イムノコンジュゲートのアフィニティ決定

ProteOn XPR36 装置 (Biorad) 上で、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって、例示的な IgG-IFN イムノコンジュゲートとして用いたクローン 51A12 および 52C4 の ASGPR H1 結合活性を決定し、そして対応する非修飾 IgG 抗体に比較した。ビオチン化 avi-Fc ヒト ASGPR H1 CRD 抗原をニュートラビジン捕捉によって NLC チップ上に固定した。組換え抗原 (リガンド) の固定: 抗原を PBST (10 mM リン酸、150 mM 塩化ナトリウム pH 7.4、0.005% Tween-20) で 10 µg/ml に希釈し、次いで、多様な接触時間で、30 µl/分で注入して、垂直配向で 400 反応単位 (RU) の固定レベルを達成した。分析物注入: 1 ショット動力的測定のため、注入方向を水平配向に変化させて、精製 IgG、一価および二価抗体-サイトカイン融合物 (50~3.25 nM の濃度範囲で多様) の 2 倍希釈シリーズを、別個のチャンネル 1~5 に沿って、120 または 200 s の会合時間、および 300 s の解離時間で、50 µl/分で同時に注入した。緩衝液 (PBST) を第六のチャンネルに沿って注入して、参照のための「インライン」ブランクを提供した。会合および解離センサーグラムを同時に適合させることによって、ProteOn Manager v3.1 ソフトウェアにおいて、単純な 1対1 ラングミュア結合モデルを用いて、会合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) を計算した。平衡解離定数 (K_D) を、比 k_{off}/k_{on} として計算した。10 mM グリシン、pH 1.5 を流速 100 µl/分、30 s の接触時間で用いて、水平配向で再生を行った。データは、方法の誤差内で、ヒト ASGPR H1 に関するアフィニティ (一価ディスプレイ) およびアビディティ (二量体ディスプレイ) が、クローン 51A12 に基づく (配列番号 50、52、54)、およびクローン 52C4 に基づく (配列番号 56、58、60) イムノコンジュゲート両方に関して保持されることを示す (表 5)。

【0162】

表 5. ASGPR H1 に対するクローン 51A12 および 52C4 の一価および二価結合形式の動力的および熱力学的パラメータ

【0163】

【表 5】

結合剤名称	結合アーム の数	ヒト/ カニクイザル ASGPR1 CRD		
		k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
51A12 IgG	2	3.5×10^5	7.34×10^{-5}	2.1×10^{-10}
51A12 kih IgG-IFN α	2	6.74×10^5	15.7×10^{-5}	2.33×10^{-10}
51A12 Fab	1	1.10×10^5	6.28×10^{-5}	5.71×10^{-10}
一価 51A12 kih IgG-IFN α	1	2.45×10^5	13.9×10^{-5}	5.68×10^{-10}
52C4 IgG	2	5.57×10^5	49.9×10^{-5}	0.89×10^{-9}
52C4 kih IgG-IFN α	2	4.26×10^5	$49E \times 10^{-5}$	1.15×10^{-9}
52C4 Fab	1	1.39×10^5	396×10^{-5}	28.6×10^{-9}
一価 52C4 kih IgG-IFN α	1	1.14×10^5	302×10^{-5}	26.5×10^{-9}

10

20

【 0 1 6 4 】

ASGPR陽性および陰性細胞に対するIgG-IFN イムノコンジュゲートの結合抗体コンジュゲートの特異性を特徴付けるため、抗体-サイトカイン・コンジュゲートをASGPR陽性および陰性細胞の両方とインキュベーションし、そして特異的結合をFACS分析によって測定した。このため、初代ヒト肝細胞(3人のドナー由来; Celis In Vitro Technologies (メリーランド州ボルチモア)より購入)、Huh-7細胞、HepG2細胞、A549細胞、Hela細胞、および293T細胞(各 1×10^5)を、 $1 \mu\text{g}$ のASGPR H1特異的IgG kih IFN試料と氷上で45分間インキュベーションした。洗浄後、細胞を標識ヤギ抗ヒトIgG二次抗体(BD Biosciences、カリフォルニア州サンディエゴ)と氷上で30分間インキュベーションした。3回の洗浄後、Caliburフローサイトメーターを用いたFACS分析によって、染色した細胞を分析した。すべてのFACSアッセイにおいて、アイソタイプ対照コンジュゲート(非ターゲティング化kih IgG IFN、配列番号110、112、114)を用いて、バックグラウンドを決定し、これを試験抗体に関するMFI値から減じた。製造者の指示にしたがって、直接標識抗体コンジュゲート(Zenon(登録商標)R-フィコエリトリン・ヒトIgG標識キット、Life Technologies)を用いることによって、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)への結合分析を行った。結合分析によって、クローン51A12 IgG kih IFN(配列番号50、52、54)および4F3 IgG kih IFN(配列番号68、70、72)が、ASGPR陽性細胞に対して高い特異的結合を示す一方、ASGPR陰性細胞上のシグナルは、アイソタイプ対照コンジュゲートに匹敵したことが明らかになった(図20)。さらに、クローン4F3 IgG kih IFNの結合飽和曲線を分析した。このため、抗体-IFNコンジュゲートを、 $0.0001 \sim 6.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の希釈列で、初代ヒト肝細胞(3人のドナー由来)とインキュベーションし、そしてFACS分析によって結合強度を記録した。図21に示すように、初代ヒト肝細胞上の、ならびに対照細胞株HepG2上の結合飽和には、 $0.25 \sim 0.74 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体濃度で到達し、そしてより高い抗体濃度は、結合シグナルをさらには有意には増加させなかった。

30

40

50

【0165】

長期に渡るHepG2細胞上の表面曝露ASGPRレベルの分析

ASGPRへの結合後、肝臓細胞内への脱シアル化糖タンパク質の取り込みは、非常に迅速に起こることが知られる。この受容体仲介性エンドサイトーシス中、エンドソームの管腔は酸性になり、受容体-リガンド複合体が解離することを可能にする。リガンドが、リソソームにおける分解のためにターゲティングされる一方、ASGPRは、リサイクルされて細胞表面に戻ることが示された。受容体結合後の内在化は、いくつかの受容体に関して、受容体発現の下方制御を誘発することが示されたため、抗ASGPR H1抗体の存在下での表面曝露ASGPRのレベルを長期に渡って測定した。この実験のため、HepG2細胞を、最長5時間、IgGとして、あるいは一価または二価抗体-IFN融合タンパク質としてのいずれかのクローン51A12由来抗体とインキュベーションした。陰性対照として、HepG2細胞に対する結合特異性を持たない関連しない抗体を用いた(GA101)(すべての抗体は30μg/ml)。37でのインキュベーション中、30、60、120、180、および300分後、試料を採取し、そして冷PBSで洗浄した。APCコンジュゲート化ヤギ抗ヒトIgG Fc断片特異的二次F(ab')₂断片(Jackson Immuno Research Lab、作業溶液1:50)を用いて、細胞表面に結合した抗体を検出した。4で30分間インキュベーションした後、0.1%BSAを含有するPBSで洗浄することによって、未結合抗体を除去した。1%PFAを用いて細胞を固定し、そしてBD FACS CantoII(ソフトウェアBD DIVA)を用いて分析した。抗体-サイトカイン融合物の完全性を検証するため、IFNの存在もまた検出した。細胞を、ヒト・インターフェロン・アルファに対するマウス・モノクローナル抗体(MMHA-1、#21105-1、R&D Systems、5μg/ml)と4で30分間インキュベーションした。0.1%BSAを含有するPBSで洗浄することによって、未結合抗体を除去し、そしてFITCコンジュゲート化抗マウスF(ab')₂断片(Serotec、STAR105F;作業溶液1:50)を二次抗体として用いた。1%PFAを用いて細胞を固定し、そしてBD FACS CantoII(ソフトウェアBD DIVA)を用いて分析した。図22に示す結果によって、ASGPRに結合した一定レベルの表面曝露抗体が示され、測定した期間に渡って、結合が誘導する受容体の下方制御はまったくなかった。注目すべきことに、単量体IgG-IFN構築物は、最強のシグナルを生じ、これはおそらく、ASGPR複合体あたり単量体IgG-IFN分子の数の倍が結合可能であるという事実のためである可能性が最も高い(図22A)。

10

20

30

【0166】

共焦点顕微鏡

共焦点顕微鏡によって、抗体-サイトカイン融合構築物のASGPRが仲介する内在化の三次元および時間分解分析を行った。この分析のため、細胞インキュベーター中、HepG2細胞をガラス底プレート(Nunc)上で50~60%集密に増殖させた。次いで、プレートをあらかじめ温めたPBS(37)で2回リンスして、PBSで培地を置換して、そして迅速に顕微鏡ステージ上にプレATINGした(37、5%CO₂)。この実験のため、クローン51A12 kih IgG IFNをAlexa488で直接標識した。標識構築物(20μg/ml)を、顕微鏡ステージで、HepG2細胞に直接添加した。回転板共焦点顕微鏡を用いて、抗体添加の5分後に獲得を開始した。データ獲得を、3秒ごとに1時間(100x拡大)、全細胞の厚みをカバーする10スタック(zレベル)で行った。抗体-サイトカイン構築物の、表面曝露ASGPRへの結合は、等しくは分布しておらず、クラスター形成していることが見出された(図23A)。クラスターは、全表面に渡って広がっていた。この実験の時間分解分析によって、数分以内に、抗体-サイトカイン融合構築物の即時内在化が起こることが明確に明らかであった(図23B)。小胞中のIgG-サイトカイン構築物の内在化後、タンパク質が細胞の頂端側の表面に輸送されて戻る(データ未提示)。

40

【0167】

50

S P Rによる、インターフェロン - アルファ受容体 2 への I g G - I F N 免疫コンジュゲートのアフィニティ決定

ProteOn XPR36 装置 (Biorad) 上の表面プラズモン共鳴 (S P R) によって、高アフィニティ・インターフェロン - アルファ受容体 2 (I F N A R 2) への I g G - I F N アルファ免疫コンジュゲートの結合活性を決定し、そしてロフェロンと比較した。商業的に入手可能な I F N A R 2 - F c 融合タンパク質 (R & D S y s t e m s) を標準的アミンカップリングによって、センサーチップ表面上に垂直配向で固定した。1ショット動力学的測定のため、注入方向を水平配向に変化させて、精製抗体 - サイトカイン融合物 (5 0 ~ 3 . 2 5 n M の間の濃度範囲で多様) の 2 倍希釈シリーズを、別個のチャンネル 1 ~ 5 に沿って、1 2 0 または 2 0 0 s の会合時間、および 3 0 0 s の解離時間で、5 0 μ l / 分で同時に注入した。緩衝液 (P B S T) を第六のチャンネルに沿って注入して、参照のための「インライン」ブランクを提供した。会合および解離センサーグラムを同時に適合させることによって、ProteOn Manager v 3 . 1 ソフトウェアにおいて、単純な 1 対 1 ラングミュア結合モデルを用いて、会合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) を計算した。平衡解離定数 (K_D) を、比 k_{off} / k_{on} として計算した。1 0 m M グリシン、pH 1 . 5 を流速 1 0 0 μ l / 分、3 0 s の接触時間で用いて、水平配向で再生を行った。抗体 - サイトカイン融合タンパク質の測定されるアフィニティは、ほぼ ($k_{on} 1 . 5 7 \times 1 0^6 1 / M s$; $k_{off} 6 . 1 5 \times 1 0^{-3} 1 / s$; $K_D 4 n M$) であり、そしてしたがって、組換え産生タンパク質ロフェロンの公表されるアフィニティに匹敵し、I g G の C 末端への I F N の融合が、I F N A R 2 への結合アフィニティにまったく影響を持たないことが示された。

10

20

【 0 1 6 8 】

A S G P R m A b - I F N の抗ウイルス活性の決定

I g G - サイトカイン融合物の一部としての I F N の機能的活性を分析するため、そしてロフェロンと比較するため、I F N 融合構築物の生物学的活性を、ウイルス保護アッセイにおいて試験した。この研究のため、M D B K 細胞をロフェロンまたは抗体 - サイトカイン融合物のいずれかと、1 ~ 4 時間、プレインキュベーションした。次いで、水疱性口内炎ウイルスをさらに 1 6 ~ 2 4 時間添加した。このインキュベーション工程終了時、生存細胞をクリスタルバイオレット染色溶液 (0 . 5 %) で染色し、そして 6 9 0 n m の参照波長とともに、5 5 0 ~ 6 0 0 n m で、マイクロプレート読み取り装置を用いて、生存細胞の定量化を実行した。4 パラメータ - ロジスティクスあてはめ関数を用いて、標準化ロフェロン溶液に対して、全用量 - 反応曲線分析において、すべての I g G - サイトカイン構築物の生物学的活性を決定した。表 6 に示すように、抗体 - I F N 融合構築物は、抗体の結合価とは独立に、約 5 % のロフェロン活性に対応する活性を示す。I g G の C 末端への I F N の融合は、I F N A R 2 への結合アフィニティにまったく影響を持たないため (上記に示す) 、低アフィニティ・インターフェロン - アルファ受容体 1 (I F N A R 1) への相互作用が立体的に損なわれ、最終的に、I F N A R 全複合体 (h o l o c o m p l e x) のシグナル伝達減少を導く可能性が高い。

30

【 0 1 6 9 】

表 6 . ロフェロンと比較した抗体 - サイトカイン・コンジュゲートの機能性 I F N 活性

40

【 0 1 7 0 】

【表 6】

試料名	ピクトグラム	ロフェロンに比較した損失 (%)
ASGPR 51A12 kih IFNa		-94.3
一価 :ASGPR 51A12 kih IFNa		-94.9
一価 ASGPR 52C4 kih IFNa		-94.8

10

【0171】

HCVレプリコンおよびEMCV CPEアッセイにおけるASGPR特異的IgG-IFN コンジュゲートの抗ウイルス活性

20

IgG-IFN 融合タンパク質の機能的活性を特徴付け、そして商業的に入手可能なロフェロンおよびペガシス(PEGインターフェロン-2a)と比較するため、ASGPR陽性細胞(Huh7-2209-3)およびASGPR陰性細胞(HeLa)を用いて、抗ウイルス活性を研究した。

【0172】

ASGPR陰性細胞に対する化合物の抗ウイルス活性を分析するため、HeLa細胞を96ウェル不透明壁プレート中、15,000/ウェルで植え付けた。一晚培養後、ウェルを空にし、そしてEMEM(10%FBSを含む)中で希釈した50μl抗体-サイトカイン・コンジュゲートを添加した。HeLa細胞をIgG-IFN 構築物で37で3時間、前処理した後、50μl EMCV(VR-1762、ATCC)を各ウェル内に添加した(EMEM中、2,000TCID50/ウェル)。CellTiter-Gloキット(G7572、Promega)を用いて、生存細胞を感染24時間後に測定した。100μl CellTiter-Glo試薬を各ウェルに添加して、そして穏やかに振盪しながら、室温で10分間インキュベーションした。次いで、Berthold Mithrasルミノメーター(Berthold Technologies)を用いることによって、発光シグナルを記録した。結果は、生存細胞の割合に相当し(図24A)、そしてEC₅₀値ならびに実験反復数を表7に要約する。ASGPR陰性HeLa細胞上、ロフェロンに関するEC₅₀値は、4F3 IgG kih IFNなどの他の化合物に関するよりも最大75倍小さく、この化合物の機能的活性が、試験した他の化合物のものよりはるかに高いことが示される。対照的に、ペガシスの活性は、ASGPR特異的IgG kih IFNA コンジュゲートのものに匹敵した。

30

40

【0173】

ニシストロン性HCVレプリコンの安定トランスフェクションによって、ASGPR陽性Huh7由来肝癌細胞株2209-23を進展させ、このレプリコンのうち、HCV IRESによって駆動される第一のオープンリーディングフレームは、ネオマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(NPTII)と融合したレニラ属シフェラーゼ遺伝子含有し、そしてEMCV IRESによって駆動される第二のオープンリーディングフレームは、NK5.1レプリコン主鎖由来のHCV非構造遺伝子、NS3、NS4a、NS4b、NS5AおよびNS5Bを含有する。細胞を37で、5%CO₂を含む加湿大気中、GlutaMaxTMおよび100mg/mlピルビン酸ナトリウム(#1056

50

9 - 0 1 0) を補った D M E M 中で培養した。培地には、さらに、1 0 % (v / v) F B S (# 1 0 0 8 2 - 1 3 9)、1 % (v / v) ペニシリン / ストレプトマイシン (# 1 5 1 4 0 - 1 2 2) および 1 % (v / v) ジエネティシンを補った。すべての試薬を I n v i t r o g e n より得た。

【 0 1 7 4 】

5 % (v / v) ウシ胎児血清を含有する D M E M 中の H u h 7 2 2 0 9 - 2 3 細胞を、9 0 μ l 体積中、5 0 0 0 細胞 / ウェルで、9 6 ウェルプレート中にプレーティングした。プレーティングした 2 4 時間後、抗体 - サイトカイン・コンジュゲート (または対照としての培地) を、1 2 ウェルに渡って 3 倍希釈で (0 . 0 1 ~ 2 0 0 0 p M)、1 0 μ l 体積中で添加した。化合物添加後の最終体積は 1 0 0 μ l であった。レニラ属ルシフェラーゼアッセイ系 (P r o m e g a、# E 2 8 2 0) を用いて、レニラ属ルシフェラーゼレポーターシグナルを、化合物を添加した 7 2 時間後に読み取った。対照試料 (抗体の非存在下) に比較した際、レニラ属ルシフェラーゼレポーターのレベルの 5 0 % の減少が観察される化合物濃度として、E C ₅₀ 値を計算した。X L f i t 4 プログラム (I D B u s i n e s s S o l u t i o n s L t d .、英国サリー) を用いることによって、用量 - 反応曲線および E C ₅₀ 値を得た。A S G P R 陰性細胞に曝露した際の抗体 - サイトカイン構築物の減少した抗ウイルス活性 (表 6 および図 2 4 A) にもかかわらず、クローン 5 1 A 1 2 I g G k i h I F N および 4 F 3 I g G k i h I g G は、A S G P R 陽性細胞株 H u h 7 2 2 0 9 - 2 3 とインキュベーションした際、ロフェロンよりも、ウイルス感染および増殖から、細胞を防御する際に、より強力であった (図 2 4 B および表 7)。対照的に、アイソタイプ対照 (非ターゲティング化 I g G k i h I F N) の強度は、有意により低く、A S G P R H 1 に、I g G k i h I F N コンジュゲートをターゲティングする陽性結果を強調した。

10

20

【 0 1 7 5 】

表 7 . 多様な A S G P R H 1 特異的抗体 - I F N コンジュゲートの抗ウイルス活性の要約

【 0 1 7 6 】

【 表 7 】

IFNα 分子	HCV レプリコン (Huh-7)				EMCV アッセイ (Hela)			
	平均	EC50 (pM)	STDEV	n=	平均	EC50 (pM)	STDEV	n=
ロフェロン		0.07	0.03	4		1.8	0.4	6
ベガシス		0.96	0.46	5		61.2	9.4	9
アイソタイプ -IFN		0.59	0.12	3		108.3	5.0	6
51A12-IFN		0.02	0.01	4		68.2	14.4	6
4F3-IFNα		0.04	0.01	4		135.6	29.1	6
R7E12-IFN		0.11	0.04	3		29.2	2.3	6
R9E10-IFN		0.43	0.21	3		49.0	5.6	6
R5C2-IFN		0.54	0.23	3		56.3	4.9	6
5A4-IFN		0.86	0.4	3		58.7	5.8	6

30

40

【 0 1 7 7 】

肝臓細胞および非肝臓細胞における A S G P R 特異的 I g G - I F N コンジュゲートの I F N 活性

I F N は、数百の I F N 刺激遺伝子 (I S G) の誘導を通じて、その抗ウイルス活性を発揮する。抗ウイルス活性を検証するため、そしてさらに、A S G P R ターゲティングが仲介する I F N 活性増進を確認するため、本発明者らは、肝臓細胞および非肝臓細胞における I S G 発現を決定した。肝臓細胞 (主に肝細胞および H e p G 2) および非肝臓

50

細胞（ヒトPBM CおよびH e l a）を多様な連続希釈I F N 分子で6時間処理し、そして5 P R I M E RNA抽出キット（# F P 2 3 0 2 5 3 0、5 P R I M E、メリーランド州ガイザーズバーグ）を用いて、細胞から総R N Aを抽出した。

【0178】

I S G 遺伝子M X 1およびR S A D 2に関するT a q M a n（リアルタイムP C R）アッセイをカスタム設計した。関心対象のA f f y m e t r i xプロンプ配列内、または関心対象の参照m R N Aの3'コード配列内にあるようにアッセイを選択した。

【0179】

A B I P R I S M（登録商標）7900HT配列検出系（A p p l i e d B i o s y s t e m s）上ですべての遺伝子発現アッセイを実行した。P C R混合物は、各反応に関して、10 μ l P e r f e C T a（登録商標）q P C R F a s t M i x、R O X ^T M（Q u a n t a）、1 μ l T a q M a nまたは0.06 μ l I D Tアッセイ、および2 μ l D E P C処理水（A m b i o n、A p p l i e d B i o s y s t e m s）からなった。c D N A試料をR Nアーゼ不含水（A m b i o n、A p p l i e d B i o s y s t e m s）中で10 ng / μ lに希釈し、そして13 μ lの分配前のアッセイP C R混合物を含有する、384ウェル光学プレート（A p p l i e d B i o s y s t e m s）に、7 μ lを添加した。1つのアッセイでターゲット遺伝子に関して、または1つのアッセイで内因性対照遺伝子アッセイ、18 S、G A P D H（アカゲザル（R h e s u s））、A C T B（アカゲザル）およびG U S B（アカゲザル）に関して、すべての試料をクエリーした（T a q M a n遺伝子発現アッセイ、A p p l i e d B i o s y s t e m s）。各測定を3つ組で行った。以下のP C R条件を用いた：45 で2分間、次いで95 で3分間、その後、95 で15秒間および60 で45秒間を40周期。

【0180】

ターゲット遺伝子の発現レベルを、18 S、A C T B、G A P D HおよびG U S Bの幾何平均に対して標準化し、そして相対発現（E）として表した。E = 2^(-C t)、式中、C tは、参照および増幅が恣意的閾値を超えるターゲット遺伝子周期の間の相違である。図25に示すように、アイソタイプI g G k i h I F N 対照は、ロフェロンに比較して減少したI S G誘導を示し、すべての細胞において、ペガシス（P E G - I F N）と類似の活性であった。A S G P R陰性H e l aおよびP B M C細胞において、クローン51A12 I g G k i h I F N もまた、アイソタイプ対照と同様の減少した活性を示した。しかし、A S G P R陽性肝臓細胞H e p G 2および初代ヒト肝細胞において、クローン51A12 I g G k i h I F N は、アイソタイプ対照と比較して、ロフェロンと類似のレベルまで増進したI F N 活性を示した。この結果は、51A12抗体-I F N コンジュゲートの上述の増進された抗ウイルス活性を確認する。

【0181】

これらのA S G P Rターゲティング化I F N 分子がI F N 活性を維持しているかどうかを理解するため、本発明者らは、最長72時間、H u h - 7および初代肝細胞におけるI S G発現を監視した。図26に示すように、A S G P Rターゲティング化I F N 分子51A12 I g G k i h I F N および4F3 I g G k i h I F N はどちらも、72時間の処理後、持続したI S G誘導を示し、一方、ペガシスおよびロフェロンは、72時間で有意に減少したI S G誘導を示した。

【0182】

カニクイザル単回用量P K / P D研究

A S G P R抗体に基づいてターゲティングされたI F N 分子が、非肝臓細胞において減少したI F N 活性を、そして肝臓細胞において増進されたI F N 活性を示す（肝臓ターゲティング化I F N 効果）というi n v i t r o結果に促され、カニクイザル研究を設計して、i n v i v oで、肝臓ターゲティング化I F N 効果を確認した。A S G P R特異的クローン51A12は、同一のアフィニティでヒトおよびサルA S G P Rに結合し、そしてヒトI F N は、サルにおいて類似の活性を有するため、肝臓ターゲティング化I F N概念証明研究のため、サルをP K / P Dモデルとして用いることも可能である

。サル研究において、本発明者らは、51A12 IgG kih IFN およびアイソタイプIgG kih IFN 対照を直接比較した。どちらの分子も、1または10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のいずれかの投薬レベルで皮下注射し、サルの血液および肝臓生検試料を投薬前および投薬後に収集し、そしてそのPK（薬物動態学）およびPD（薬力学）を監視した。用量群を表8に列挙する。

【0183】

表8. 12匹のカニクイザルを以下に示すような4つの群に分けた。

【0184】

【表8】

群	用量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), 化合物	動物数	配合物強度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 51A12, SC, 単回用量	3	20
2	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 51A12, SC, 単回用量	3	2
3	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, アイソタイプ対照, SC, 単回用量	3	20
4	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, アイソタイプ対照, SC, 単回用量	3	2

10

【0185】

試料収集、トランスファーおよび保存

血液（およそ1ml）を、投薬5日前、ならびに注射2、6、12、24、48、72、96、168、および336時間後に、各動物から収集した。薬物動態学用の試料を、抗凝血剤を含まずに、試験管に収集した。薬物動態学用の血液を、薬力学的血液収集前に収集した。

20

【0186】

遺伝子発現研究のため、血液（およそ2.5ml）を、投薬5日前、ならびに注射2、6、12、24、48、72、96、168、および336時間後に、各動物から収集した。試料をPAXgeneTM血液RNA収集試験管内に収集し、そして8~10回反転させることによって試験管を混合した。PAXgeneTM血液RNA収集試験管が、静脈切開術順序において最後に採血される試験管であった（すなわち、臨床病理および薬物動態学的収集後）。

30

【0187】

第-5日、ならびに第2日、第4日、および第8日に、各動物から、腹腔鏡法によって、肝臓組織を肝臓における2つの別個の位置から収集した（少なくとも25mg/試料）。各組織試料を切除し、そして直ちに別個のあらかじめ重量測定し、そしてラベリングした凍結バイアル試験管に入れ、そして液体窒素中で瞬間凍結した。即時凍結が必要であるため、試料バイアルは肝臓試料収集後には重量測定されなかった。第-5日および第2日、各動物の第一の肝臓組織アリコットを肝臓の左側葉から採取し、そして各動物の第二の肝臓組織アリコットを肝臓の右側葉から採取した。第4日および第8日、各動物の第一の肝臓組織アリコットを肝臓の左中葉から採取し、そして各動物の第二の肝臓組織アリコットを肝臓の右中葉から採取した。肝臓生検試料を2ml試験管中、瞬時凍結した。ドライアイス上であらかじめ冷却したRNAlater-ICE（P/N 7031、Ambion）を、凍結組織に添加し、そして-80で保存した。プロトコルにしたがって、血液試料をPAXgene試験管に入れ、そしてプロセッシングするまで-80で保存した。

40

【0188】

サル血清試料におけるクローン51A12 IgG kih IFN およびアイソタイプIgG kih IFN 対照の測定
捕捉試薬として抗IFN抗体（ロット番号34495-28、Roche Nutley、米国ニュージャージー州）を、そして検出試薬としてHRP標識抗ヒトFc抗体（ロ

50

ット番号Wbr72_MM_090602、Roche Diagnostics、ドイツ・ペンツベルク)を用いる、サンドイッチELISAアッセイを用いて、カニクイザル血清アリコットを投薬化合物に関して分析した。プレートを抗IFN 抗体で室温で1時間コーティングした後、プレートを2%BSAブロッキング緩衝液で1時間処理した。洗浄後、HRP標識抗ヒトFc抗体を各ウェルに添加し、そして穏やかに振盪しながら1時間インキュベーションした。洗浄後、100µl/ウェルTMB基質溶液(#11484281001、Roche Diagnostics、ドイツ・ペンツベルク)を約20分間添加した。次いで、50µl/ウェルの2N HClを添加することによって、反応を停止した。プレートを、参照波長650nmとともに、450nmで2分間以内読み取った。この方法の定量化下限(LLoQ)は、10ng/mlであった。アッセイの精密度(precision)(%CV)および正確性(accuracy)(%相対誤差)は、許容基準を満たした。試料とともに分析したQC試料の分析によって監視されるようなアッセイ性能は、表9に示すとおりであった。血清濃度を表10~13に示す。10µg/kgでのアイソタイプIgG kih IFN の単回注射は、血液中の有意な曝露を生じ、これは、1週間ではほぼ100ng/mlでピークとなった。対照的に、同じ用量レベルで、51A12 IgG kih IFN は、いかなる時点でも定量化レベル未満であった。どちらの分子も血液中、1µg/kg用量レベルで検出不能であった。PKパラメータを表14に要約する。

10

【0189】

表9. カニクイザル血清におけるクローン51A12 IgG kih IFN 品質管理試料の分析性能

20

【0190】

【表9】

実験日	曲線番号	QC1 30.0 ng/mL	QC2 90.0 ng/mL	QC3 270 ng/mL
13-Dec-2011	1	24.3	78.8	252
		29.1	95.2	236
13-Dec-2011	2	*	76.4	251
		26.5	94.7	247
20-Dec-2011	3	21.7	74.7	245
		28.6	84.3	264
	4	25.4	82.6	288
		28.2	91.2	279
平均		26.3	84.7	258
%CV		10.2	9.6	6.9
% 相対誤差		-12.3	-5.9	-4.4
* 脱活性化				

30

40

【0191】

表10. 1µg/kgアイソタイプIgG kih IFN の血清濃度(ng/ml)

【0192】

【表 10】

時間 [h]	被験体 1	被験体 2	被験体 3	平均	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
6	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
12	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
24	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
48	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
72	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
96	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
168	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
336	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				

10

20

【0193】

表 11. 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 51A12 IgG kih IFN の血清濃度 (ng/ml)

【0194】

30

【表 1 1】

時間 [h]	被験体 1	被験体 2	被験体 3	平均	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
6	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
12	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
24	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
48	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
72	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
96	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
168	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
336	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				

10

20

【 0 1 9 5 】

表 1 2 . 1 0 μ g / k g 5 1 A 1 2 I g G k i h I F N の血清濃度 (n g / m l)

30

【 0 1 9 6 】

【表 1 2】

時間 [h]	被験体 1	被験体 2	被験体 3	平均	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
6	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
12	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
24	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
48	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
72	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
96	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
168	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
336	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				

10

20

【 0 1 9 7 】

表 1 3 . 1 0 μ g / k g アイソタイプ I g G k i h I F N の血清濃度 (n g / m l)

【 0 1 9 8 】

30

【表 1 3】

時間 [h]	被験体 1	被験体 2	被験体 3	平均	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	33.7	12.4	23.1			2
6	49.8	40.9	61.5	50.7	10.3	20.3	3
12	66.4	44.3	67.9	59.5	13.2	22.2	3
24	109	63.1	71.1	81.1	24.5	30.2	3
48	119	99.3	88.3	102	15.6	15.3	3
72	105	88.2	94.0	95.7	8.53	8.9	3
96	124	85.0	95.2	101	20.2	20.0	3
168	78.9	56.5	58.3	64.6	12.4	19.2	3
336	19.6	11.0	BLQ<10.0	15.3			2

10

20

【 0 1 9 9 】

表 1 4 . 1 0 μ g / k g アイソタイプ - I F N のカニクイザル血清 P K パラメータ

【 0 2 0 0 】

【表 1 4】

パラメータ	単位	被験体 1	被験体 2	被験体 3	平均	S.D.	%CV	n
元来の用量	μg/kg	10	10	10				
C _{max}	ng/ml	124	99	95	106	16	14.8	3
T _{max}	時間	96	48	96	80	28	34.6	3
AUC	ng*時間/ml	25251	18124	13279	18885	6022	31.9	3
AUC 間隔	時間	(0-336)	(0-336)	(0-168)				
AUC/用量	ng*時間/ml/μg/kg	2525	1812	1328	1888	602	31.9	3
AUC 外挿	ng*時間/ml	27615	19253	21839	22903	4281	18.7	3
% AUC 外挿	%	8.6	5.9	39	17.9	18.5	104	3
AUC 外挿/ 用量	ng*時間/ml/μg/kg	2762	1925	2184	2290	428	18.7	3
T _{1/2}	時間	83.6	71.1	102	85.5	15.4	18.0	3

10

20

【0201】

RNA抽出

96の肝臓生検試料(48匹の動物×試料採取あたり2つの生検)から、Qiagen RNeasyミニキット(P/N 74104)を用いて、総RNAを抽出し、そしてNanodrop 8000上で定量化した。肝臓試料の総RNA品質を、Caliper LabChip GX上で評価した。すべての試料由来のRNAは、qPCRおよびマイクロアレイに基づく遺伝子発現測定を実行するために十分な量および品質であった。

30

【0202】

発現分析(Raleigh、ノースカロライナ州)で、120の血液試料から総RNA単離および定量化を行った。Agilent Bioanalyzer 2100上で、血液試料の総RNA品質を評価した。すべての試料由来のRNAは、qPCRおよびマイクロアレイに基づく遺伝子発現測定を実行するために十分な量および品質であった。

40

【0203】

マイクロアレイ分析

2つの別個のプロトコルを用いて、総RNAをcDNAに変換した。Affymetrix GeneChip HT 3' IVT Express(P/N 901225)およびNuGEN Ovation RNA増幅系V2(P/N 3100-60)。

【0204】

血液

製造者のプロトコルにしたがって、GeneChip HT 3' IVT発現キットを用いて、肝臓生検試料由来の100ngの総RNAを二本鎖cDNAおよび増幅RNA(aRNA)に変換した。ハイブリダイゼーション混合物は、12.5μg aRNA、2

50

xハイブリダイゼーション混合物 (P/N 900720)、DMSO、20xハイブリダイゼーション対照、およびオリゴB2対照を含有した。

【0205】

肝臓

製造者のプロトコルにしたがって、NuGEN Ovation RNA増幅系V2キットを用いて、血液試料由来の50ng総RNAを一本鎖cDNAに変換した。ハイブリダイゼーション混合物は、3μg SPIA増幅cDNA、2xハイブリダイゼーション混合物 (P/N 900720)、DMSO、20xハイブリダイゼーション対照、およびオリゴB2対照を含有した。

【0206】

肝臓および血液試料のためのハイブリダイゼーション混合物を、Affymetrix GeneChipヒトゲノムU133 Plus 2.0アレイにハイブリダイズさせた。製造者 (Affymetrix) に示唆されるように、染色および洗浄工程を行った。ハイブリダイズしたAffymetrix GeneChipアレイ各々を、GeneChipスキャナ3000 7G (Agilent/Affymetrix) でスキャンした。画像分析をAffymetrix GCOSソフトウェアで行った。標準化品質管理測定基準を用いて、生じる.celファイルを評価した。データを標準化し、そして標準データ分析パッケージを用いて、発現値計算/示差発現を決定した。

【0207】

図27において、サル肝臓試料における4つの代表的なISG、HRASLS2、ITI44、IFIT1、およびIFITM2の発現をグラフにする。これらの4つのISGの発現のより頑強な誘導は、アイソタイプIgG kih IFN 投薬サルに比較して、51A12 IgG kih IFN 投薬サルで見出された。

【0208】

IFN遺伝子発現分析 (M3.1ヒートマップ)

IFN分子によるIFN刺激遺伝子発現をより包括的に分析するため、血液トランスクリプトーム研究 (Chaussabelら (2008), Immunity 29, 150-64) から決定したIFN遺伝子モジュールを用いて、IFN反応を分析した。図28Aに示すように、インターフェロン・モジュールM3.1の遺伝子のベースラインからの倍変化発現値を、血液および肝臓試料の両方に関して、R統計パッケージ (www.r-project.org) を用いて、ヒートマップ形式でプロットした。肝臓インターフェロン誘導遺伝子の教師なし階層的クラスタ形成によって、第1日および第3日に、10μg/kg用量の51A12において非常に誘導されるが、アイソタイプIFN化合物では誘導されないサブセット (破線の長方形) が明らかになる。教師なし階層的クラスタ形成では、このサブセットは、血液および肝臓の間の発現の示差的パターンを明らかにし、ここで、いくつかの遺伝子は、10μg/kg用量で、51A12によって、肝臓においてより有意に誘導されたが、アイソタイプ-IFNでは誘導されず、そして他の遺伝子は、高用量で、アイソタイプIFNによって、血液中でより有意に誘導された (図28B)。

【0209】

要約すると、ASGPRがターゲティングするIFN分子51A12 IgG kih IFNは、血液中では検出不能な曝露を示し、そしてアイソタイプIFN対照と比較した際、血液中ではより低いIFN活性 (ISG発現刺激) であるが、サル肝臓においてはより高いIFN活性であった。

【0210】

前述の発現は、理解を明らかにする目的のため、例示および例によって、ある程度詳細に記載されてきているが、説明および実施例は、本発明の範囲を限定すると見なしてはならない。本明細書に引用するすべての特許および科学文献の開示は、その全体が本明細書に援用される。

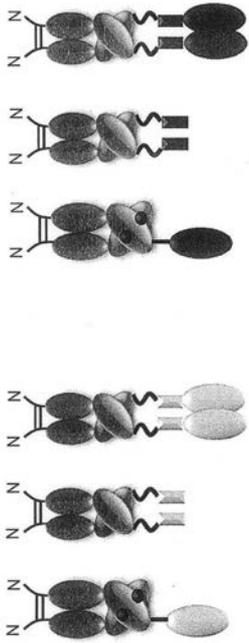
10

20

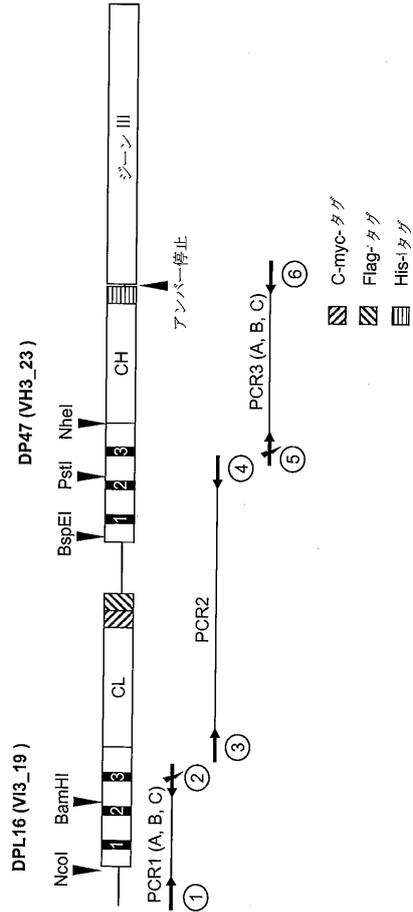
30

40

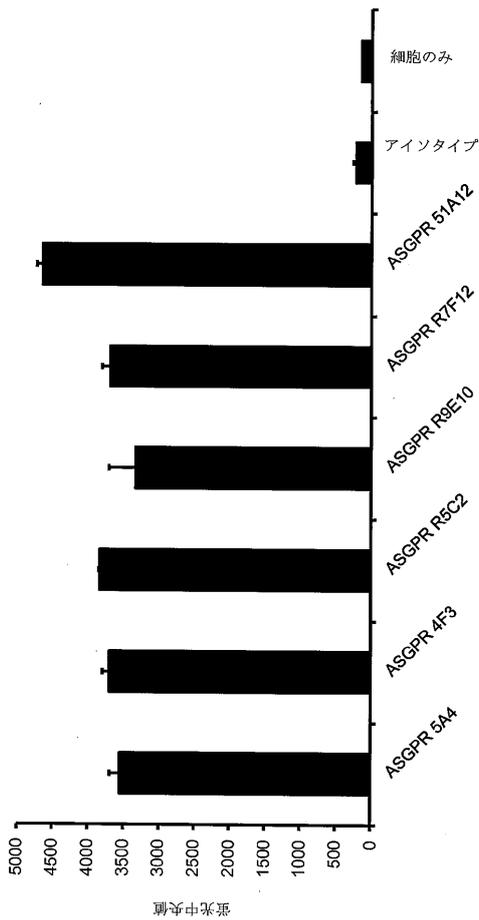
【 図 1 】



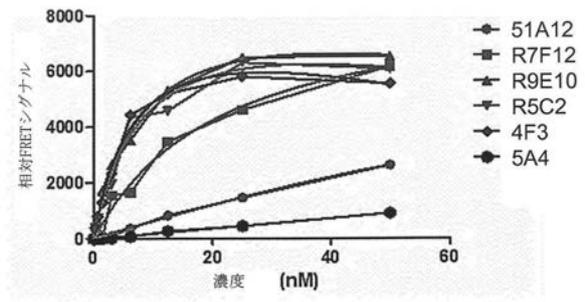
【 図 2 】



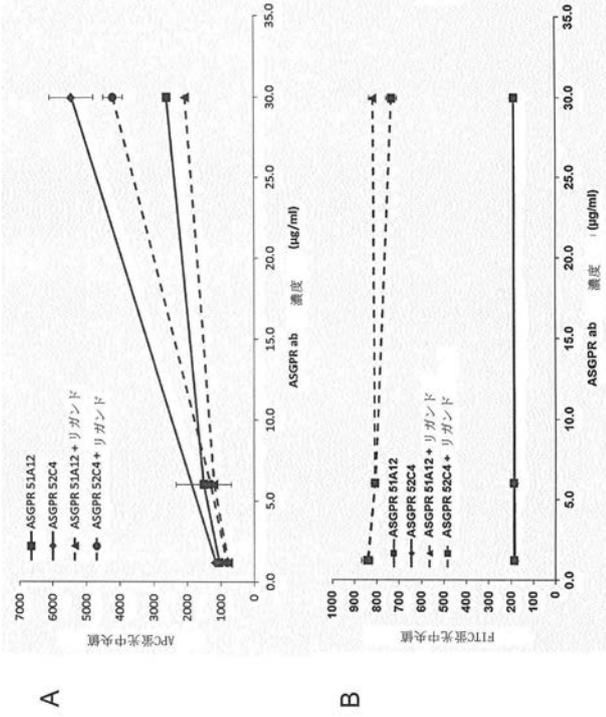
【 図 3 】



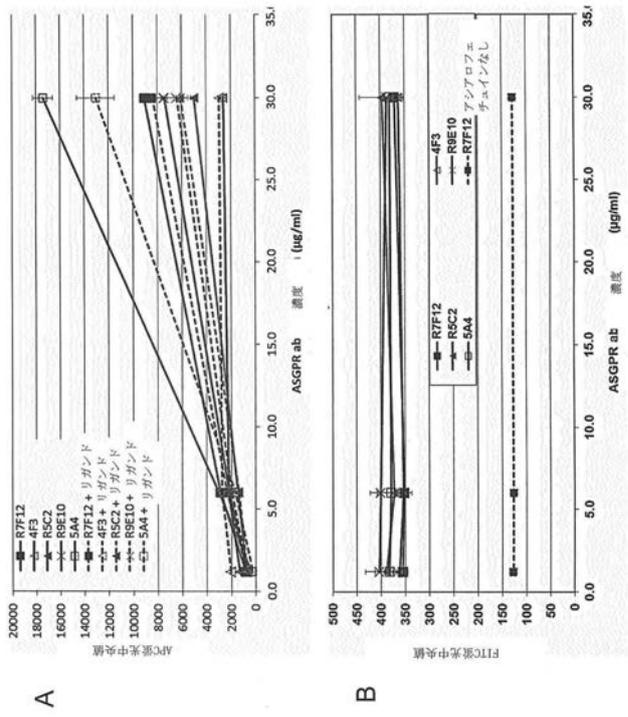
【 図 4 】



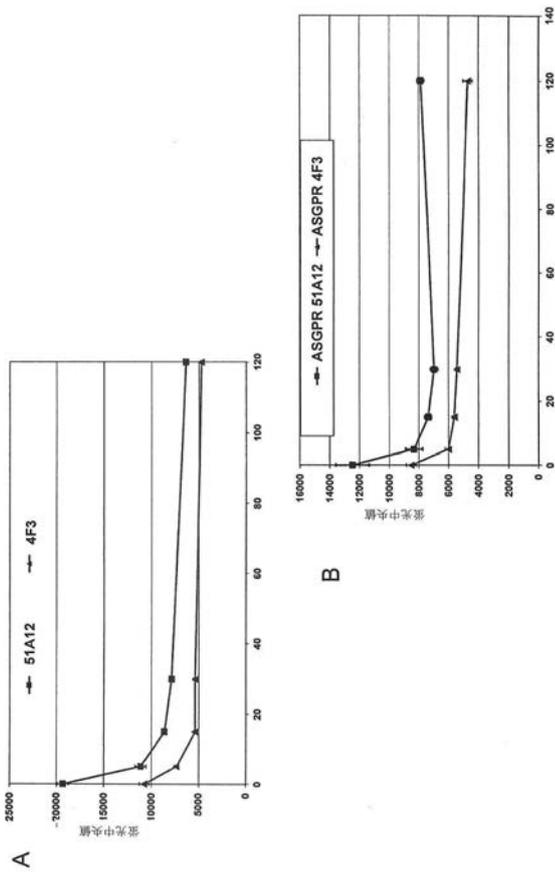
【 図 5 】



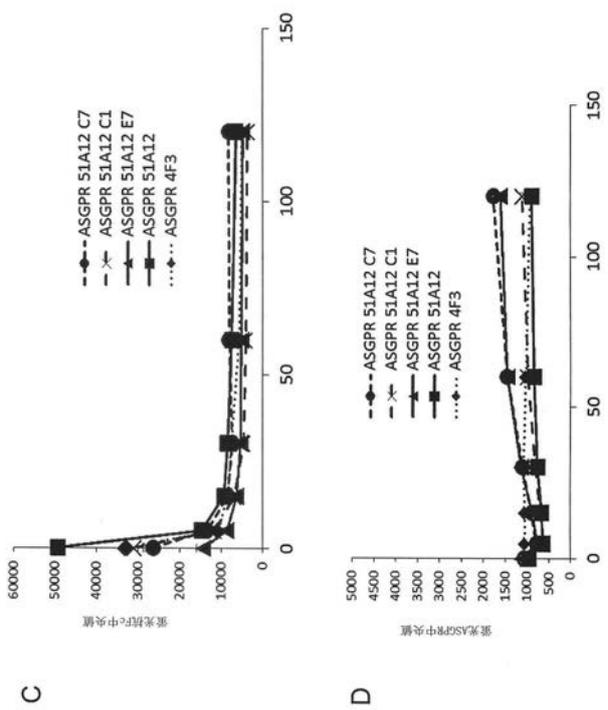
【 図 6 】



【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】

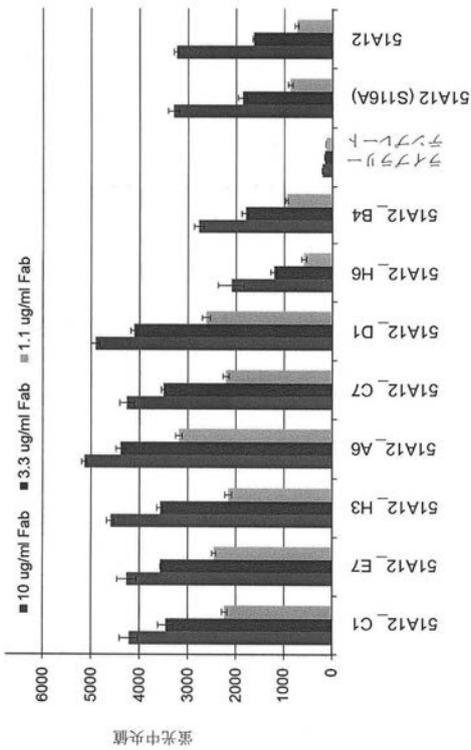


【 8 】

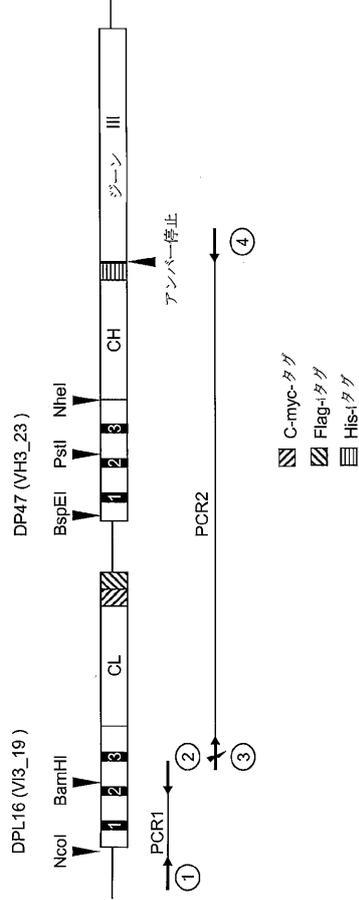
89 90 91 92 93 94 95 95a 95b 95c 95d 96 97 98 99

(A) C N S R D I C C N R S V R R N F G G G T K
 (B) C N S R D I S S N R A V R R N F G G G T K
 (C) x x x x x x x x x x x x x x x x

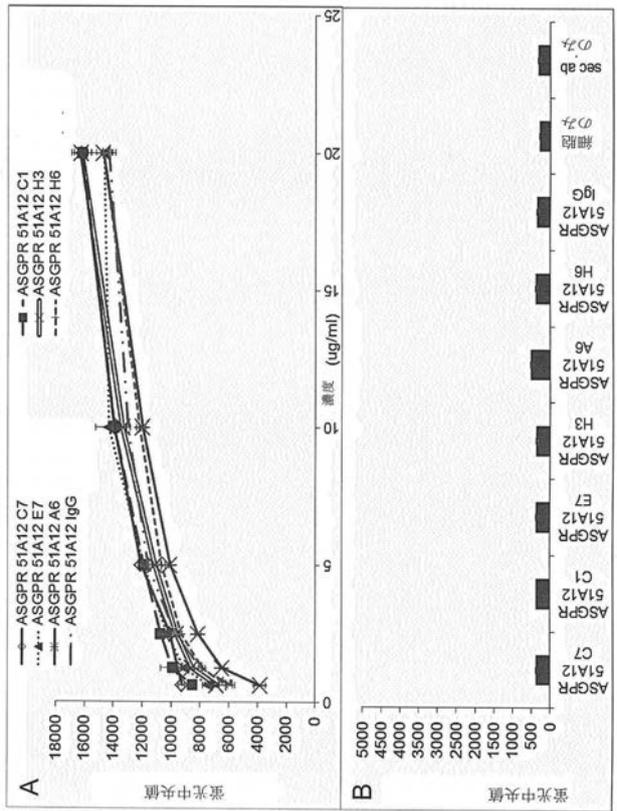
【 10 】



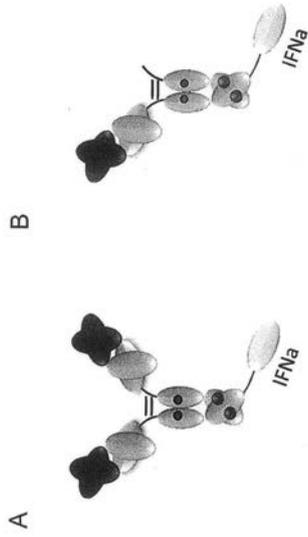
【 9 】



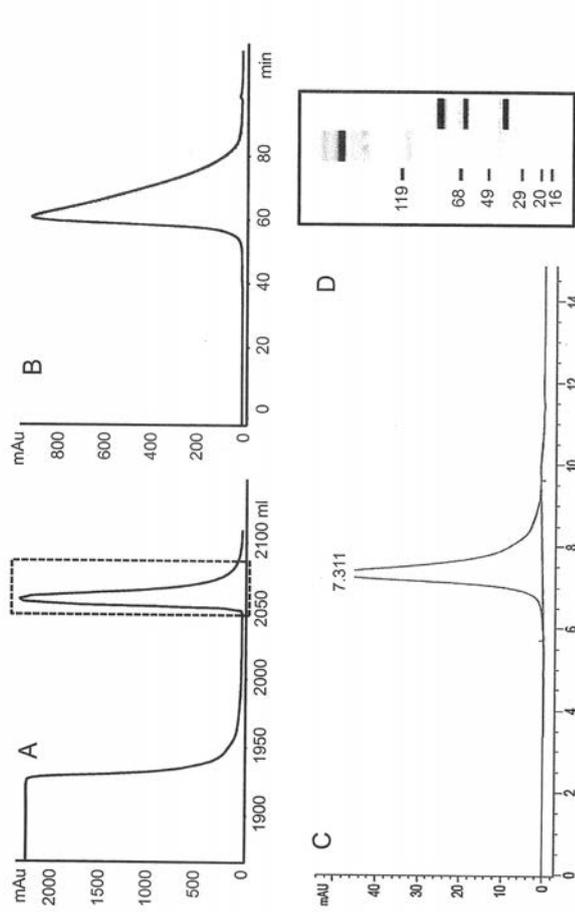
【 11 】



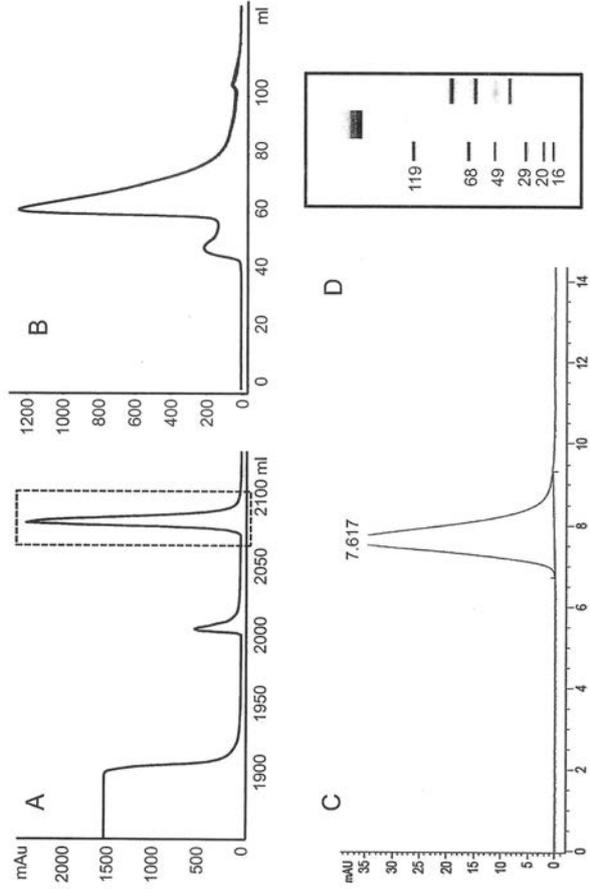
【 図 1 2 】



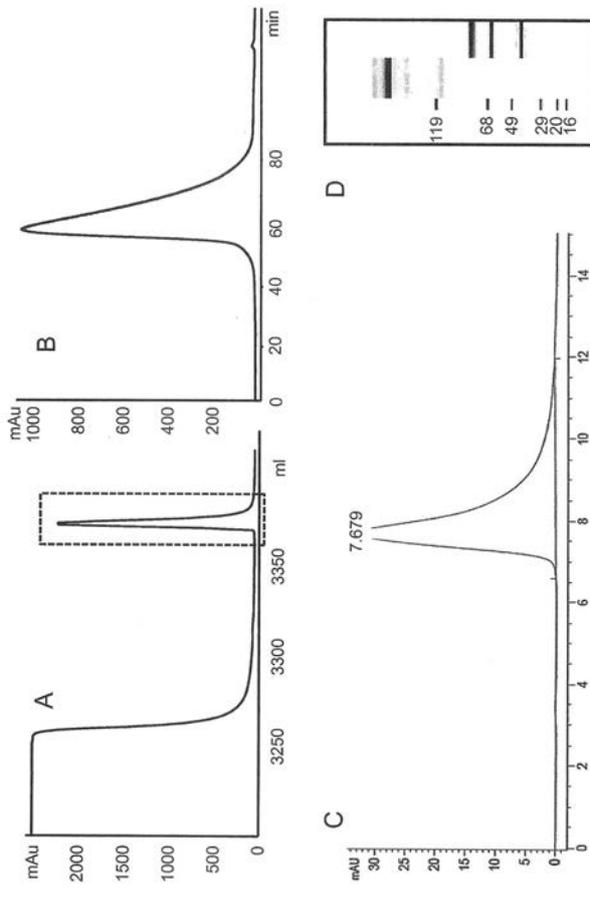
【 図 1 4 】



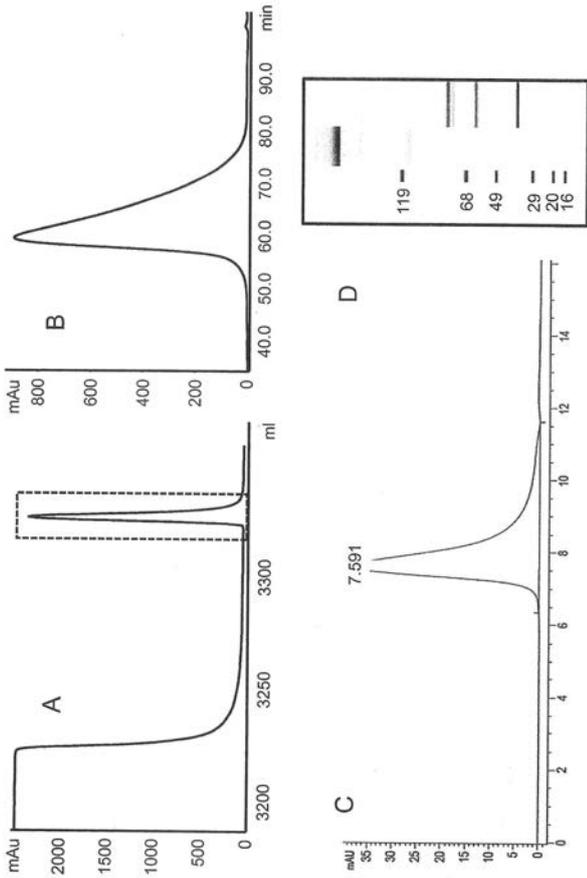
【 図 1 3 】



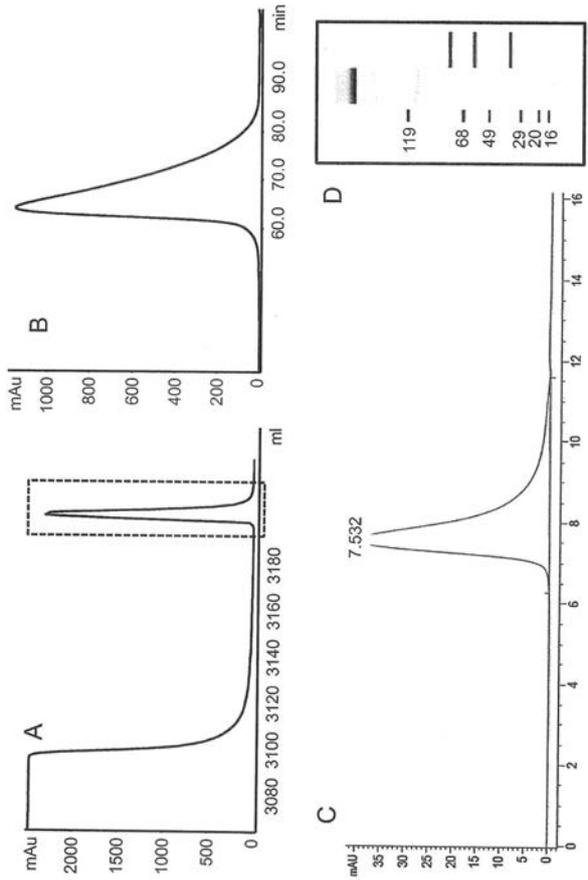
【 図 1 5 】



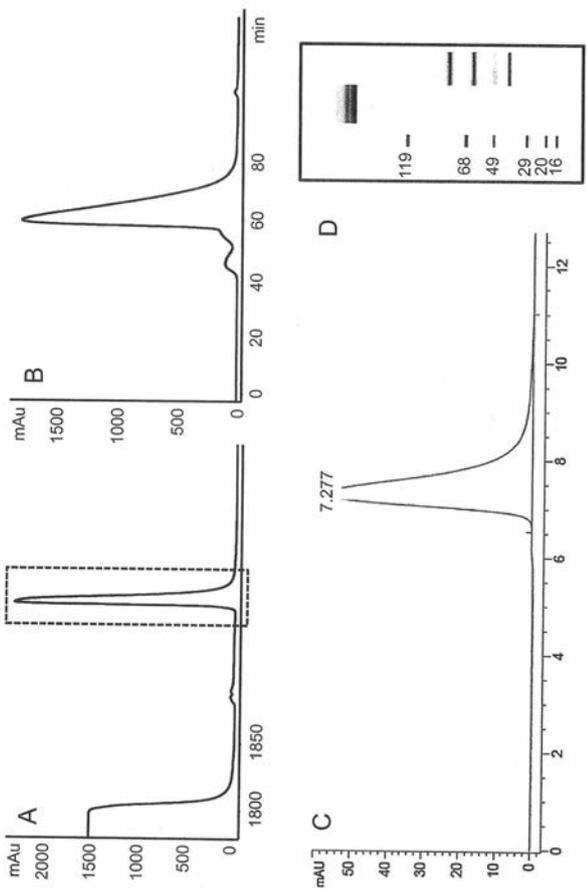
【 16 】



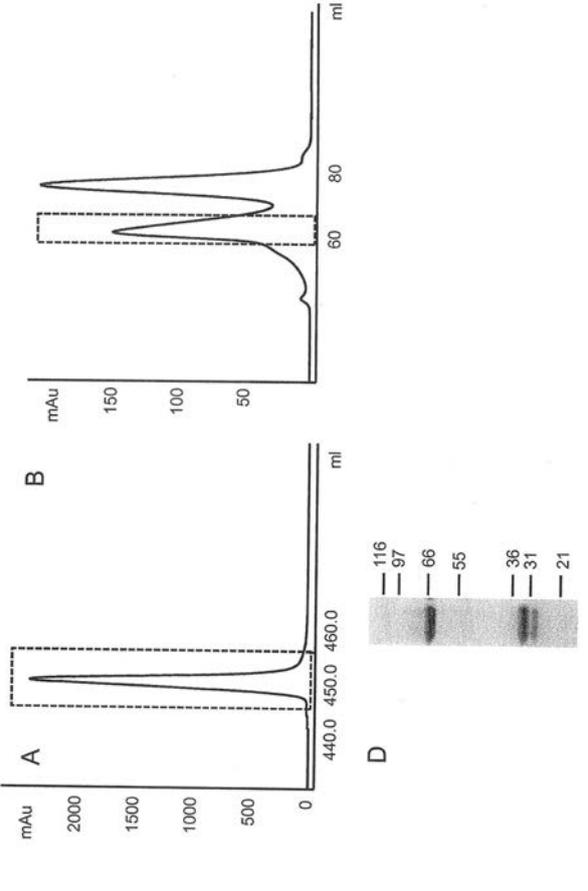
【 17 】



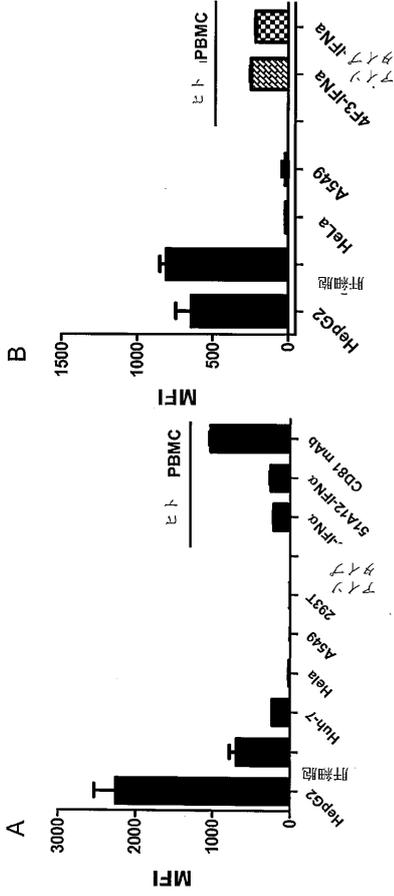
【 18 】



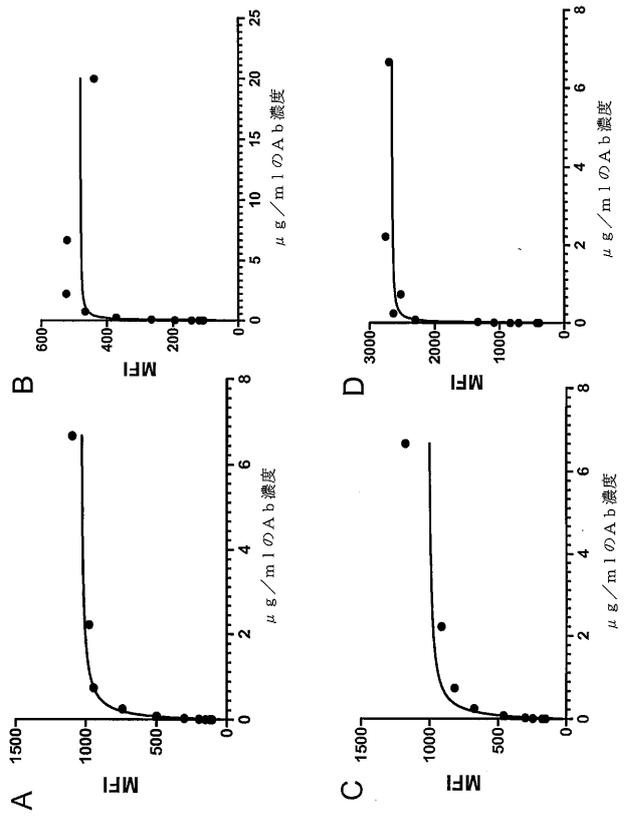
【 19 】



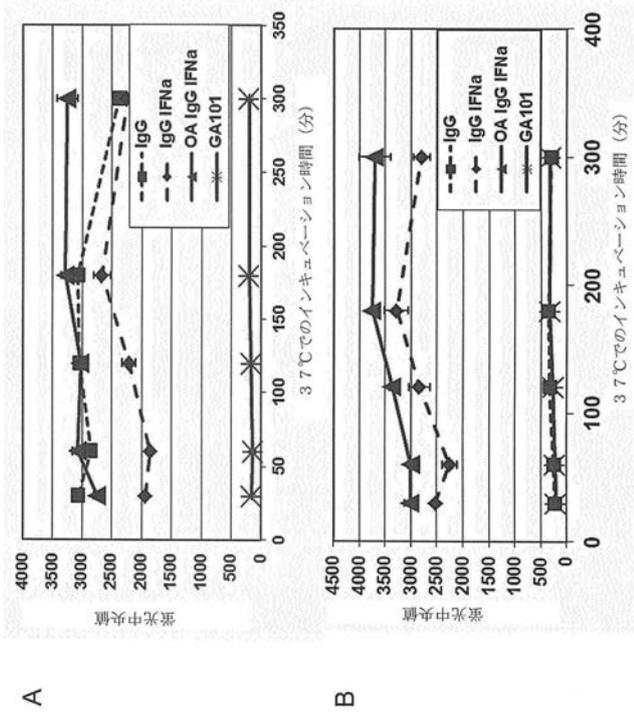
【 図 2 0 】



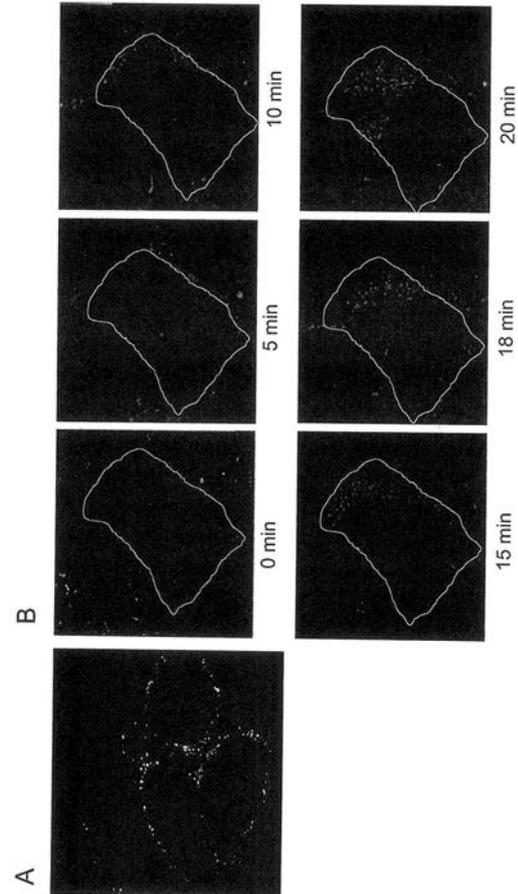
【 図 2 1 】



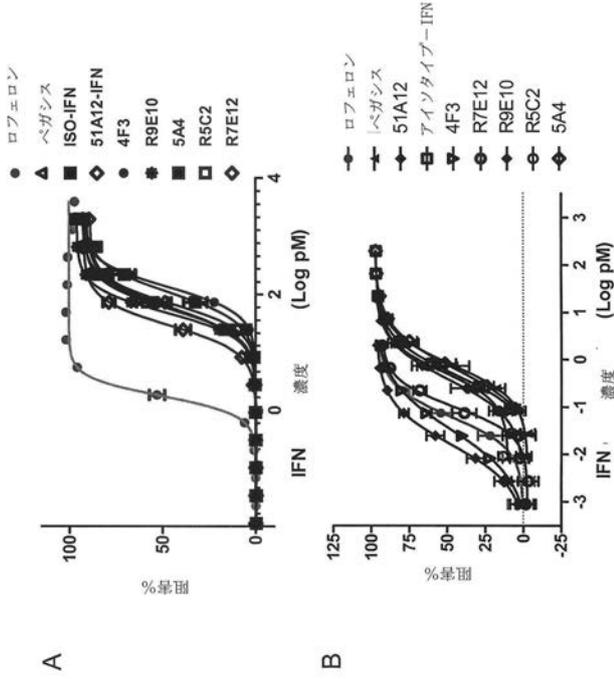
【 図 2 2 】



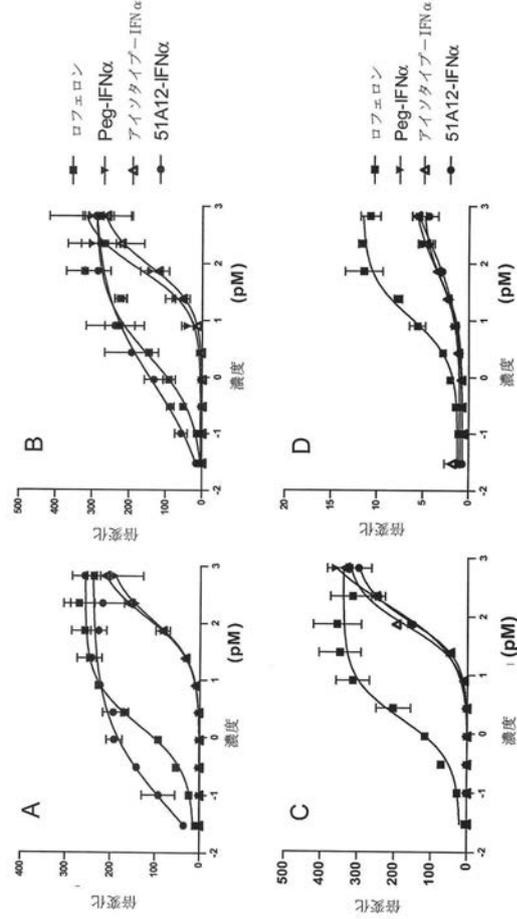
【 図 2 3 】



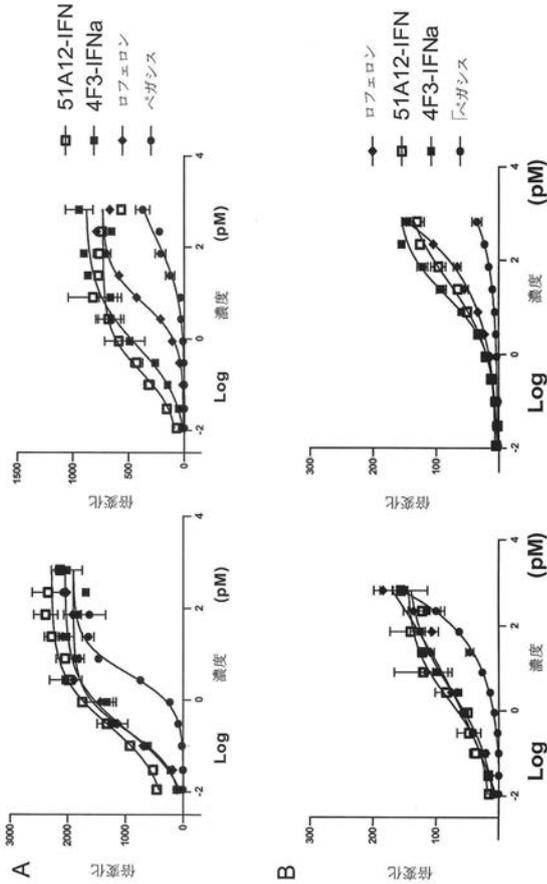
【 図 2 4 】



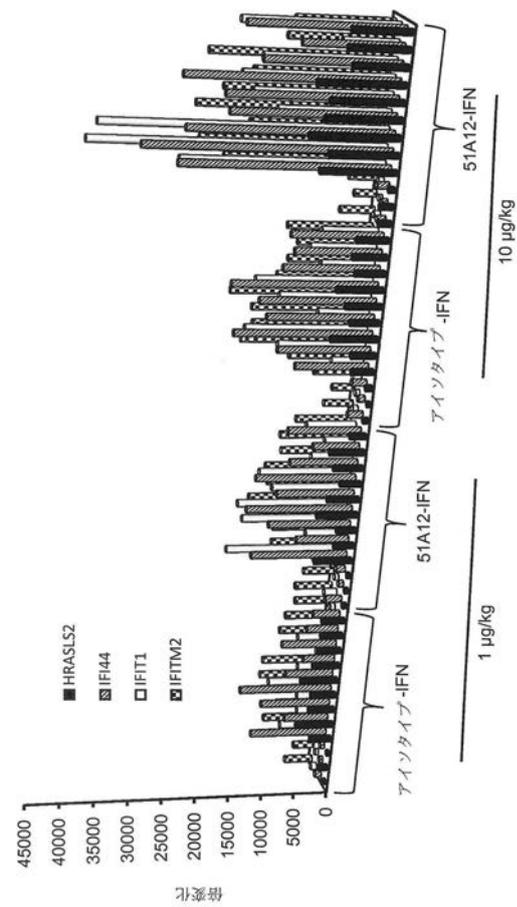
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	F
C 0 7 K 14/56 (2006.01)	C 0 7 K 14/56	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	C 0 7 K 14/52	

- (72)発明者 ホーファー, トーマス
 スイス国 8 0 4 6 チューリッヒ, アルテ・ミュールアッカーシュトラッセ 5 0
- (72)発明者 ジー, チャーンホワ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 0 3 9, リヴィングストン, ノース・ドライブ 3 1
- (72)発明者 メスナー, エッケハルト
 スイス国 8 2 8 0 クロイツリンゲン, フェルゼンブルクヴェーク 5
- (72)発明者 ウマナ, パプロ
 スイス国 8 8 3 2 ヴォルララウ, フェルゼンラインシュトラッセ 2 8
- F ターム(参考) 4B064 AG09 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA05
 4B065 AA93X AA93Y AA99Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C085 AA13 BB12
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA16 DA76 EA27
 EA28 EA29 FA74 GA26