

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-501744
(P2017-501744A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(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 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-557547 (P2016-557547)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月9日 (2014. 12. 9)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月1日 (2016. 7. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/069409
 (87) 国際公開番号 W02015/089117
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015. 6. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/913, 891
 (32) 優先日 平成25年12月9日 (2013. 12. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516166030
 アラコス インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 70, サン カルロス, ショアウエイ
 ロード 75, スイート エー
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトシグレック - 8 抗体およびその使用の方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒト化抗シグレック - 8 抗体、ならびに好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害の処置および予防におけるその使用と共に、ヒト化抗シグレック - 8 抗体を含む組成物およびキットを提供する。一態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、ヒトシグレック - 8 に対するヒト化抗体の結合親和性および/または結合アビディティが、ヒトシグレック - 8 に対する抗体 2 E 2 および/または抗体 2 C 4 の結合親和性および/または結合アビディティよりも高いヒト化抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 は、二量体である。

FIG. 8A

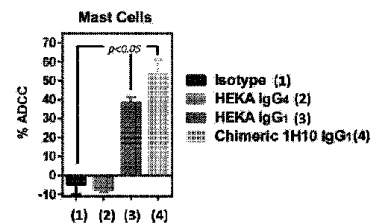
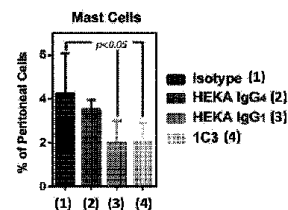


FIG. 8B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトシグレック - 8 に結合するヒト化抗体であって、前記ヒトシグレック - 8 に対する前記ヒト化抗体の結合親和性またはアビディティが、前記ヒトシグレック - 8 に対する抗体 2 E 2 または 2 C 4 の結合親和性またはアビディティよりも高い抗体。

【請求項 2】

ヒトシグレック - 8 に結合するヒト化抗体であって、熱シフトアッセイにおいて少なくとも約 70 の T_m を有する抗体。

【請求項 3】

熱シフトアッセイにおいて少なくとも約 70 から少なくとも約 72 の T_m を有する、請求項 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(ii) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (iii) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(ii) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (iii) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 16 もしくは 21 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 6】

ヒト I g G F c 領域を含む重鎖 F c 領域を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記ヒト I g G F c 領域が、ヒト I g G 1 またはヒト I g G 4 を含む、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記ヒト I g G 4 が、アミノ酸置換 S 2 2 8 P を含み、ここで、前記アミノ酸残基は、K a b a t における通りの E U インデックスに従ってナンバリングされている、請求項 7 に記載の抗体。

30

【請求項 9】

配列番号 75 のアミノ酸配列を含む重鎖、および/または配列番号 76 もしくは 77 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号 87 のアミノ酸配列を含む重鎖、および/または配列番号 76 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 11】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 活性を改善するように遺伝子操作されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つが、フコシル化されていない、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

ヒトシグレック - 8 に結合するヒト化抗体であって、(a) 重鎖可変領域および軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(ii) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む H

50

V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 7 ~ 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含み、重鎖可変領域および軽鎖可変領域、あるいは

(b) 重鎖可変領域および軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含み、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体。

【請求項 1 4】

配列番号 1 1 ~ 1 4 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 2 3 ~ 2 4 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

配列番号 2 ~ 1 4 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 6 ~ 2 4 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトシグレック - 8 に結合するヒト化抗体。

【請求項 1 6】

配列番号 2 ~ 1 0 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 6 ~ 2 2 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトシグレック - 8 に結合するヒト化抗体。

【請求項 1 7】

ヒトシグレック - 8 に結合するヒト化抗体であって、

(a)

- (1) 配列番号 2 6 ~ 2 9 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 1、
 - (2) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
 - (3) 配列番号 3 1 ~ 3 6 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 2、
 - (4) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、
 - (5) 配列番号 3 8 ~ 4 3 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 3、
 - (6) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 および
 - (7) 配列番号 4 5 ~ 4 6 から選択されるアミノ酸配列を含む H C - F R 4
- を含む重鎖可変領域、および/または

(b)

- (1) 配列番号 4 8 ~ 4 9 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 1、
- (2) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
- (3) 配列番号 5 1 ~ 5 3 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 2、
- (4) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
- (5) 配列番号 5 5 ~ 5 8 から選択されるアミノ酸配列を含む L C - F R 3、
- (6) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 および
- (7) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む L C - F R 4

を含む軽鎖可変領域を含む抗体。

【請求項 1 8】

(a)

- (1) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H C - F R 1、
- (2) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
- (3) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H C - F R 2、

- (4) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、
 (5) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HC - FR3、
 (6) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 および
 (7) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む HC - FR4
 を含む重鎖可変領域、および / または

(b)

- (1) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む LC - FR1、
 (2) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、
 (3) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む LC - FR2、
 (4) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、
 (5) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む LC - FR3、
 (6) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 および
 (7) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む LC - FR4
 を含む軽鎖可変領域
 を含む、請求項 17 に記載のヒト化抗体。

10

【請求項 19】

(a)

- (1) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HC - FR1、
 (2) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、
 (3) 配列番号 34 のアミノ酸配列を含む HC - FR2、
 (4) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、
 (5) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HC - FR3、
 (6) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 および
 (7) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む HC - FR4
 を含む重鎖可変領域、および / または

20

(b)

- (1) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む LC - FR1、
 (2) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、
 (3) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む LC - FR2、
 (4) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、
 (5) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む LC - FR3、
 (6) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 および
 (7) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む LC - FR4
 を含む軽鎖可変領域
 を含む、請求項 17 に記載のヒト化抗体。

30

【請求項 20】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作されている、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 21】

前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つが、フコシル化されていない、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 24】

発現ベクターである、請求項 23 に記載のベクター。

【請求項 25】

請求項 22 に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 26】

50

抗体を産生する方法であって、前記抗体を産生する条件下で、請求項 2 5 に記載の宿主細胞を培養するステップを含む方法。

【請求項 2 7】

前記宿主細胞によって産生された前記抗体を回収するステップをさらに含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 または 2 7 に記載の方法によって産生された抗シグレック - 8 抗体。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 2 1 および 2 8 のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 3 0】

ヒトシグレック - 8 に特異的に結合する抗体を含む組成物であって、前記抗体が、Fc 領域と、前記 Fc 領域に連結された N - グリコシド結合型炭水化物鎖とを含み、ここで、前記 N - グリコシド結合型炭水化物鎖の 5 0 % 未満がフコース残基を含有する、組成物。

【請求項 3 1】

前記 N - グリコシド結合型炭水化物鎖のうち実質的に全てが、フコース残基を含有しない、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記抗体が、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体である、請求項 3 0 または 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記抗体が、配列番号 2 ~ 1 0 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 6 ~ 2 2 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 7 ~ 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記抗体が、配列番号 1 1 ~ 1 4 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 2 3 ~ 2 4 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記抗体が、配列番号 2 ~ 1 4 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 6 ~ 2 4 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 8】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 3 0 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の組成

10

20

30

40

50

物。

【請求項 39】

ヒトシグレック - 8 に対する前記抗体の結合親和性またはアビディティーが、前記ヒトシグレック - 8 に対する抗体 2 E 2 または 2 C 4 の結合親和性またはアビディティーよりも高い、請求項 30 ~ 38 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

前記抗体が、熱シフトアッセイにおいて少なくとも約 70 の T_m を有する、請求項 30 ~ 39 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 41】

前記抗体が、熱シフトアッセイにおいて少なくとも約 70 から少なくとも約 72 の T_m を有する、請求項 40 に記載の組成物。 10

【請求項 42】

ヒトシグレック - 8 に結合し、ADCC 活性によりシグレック - 8 を発現する肥満細胞を死滅させる、単離された抗体。

【請求項 43】

治療有効量が投与される場合、対象においてシグレック - 8 を発現する肥満細胞を枯渇させる、請求項 42 に記載の抗体。

【請求項 44】

処置前のベースラインレベルと比較した場合に、前記対象から得られる試料における前記シグレック - 8 を発現する肥満細胞の少なくとも約 20 % を枯渇させる、請求項 43 に記載の抗体。 20

【請求項 45】

前記試料が、組織試料または生体液試料である、請求項 44 に記載の抗体。

【請求項 46】

前記組織試料が、皮膚、肺、骨髄および鼻ポリープからなる群から選択される 1 種または複数である、請求項 45 に記載の抗体。

【請求項 47】

前記生体液試料が、血液、気管支肺胞洗浄液および鼻洗浄液からなる群から選択される 1 種または複数である、請求項 45 に記載の抗体。

【請求項 48】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作されている、請求項 42 ~ 47 のいずれか一項に記載の抗体。 30

【請求項 49】

前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つが、フコシル化されていない、請求項 42 ~ 48 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 50】

アルファ 1, 6 - フコシル基転移酵素 (Fut8) ノックアウトを有する細胞株において産生される、請求項 49 に記載の抗体。

【請求項 51】

1, 4 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT - III) を過剰発現する細胞株において産生される、請求項 49 に記載の抗体。 40

【請求項 52】

前記細胞株が、ゴルジ μ - マンノシダーゼ II (Man II) をさらに過剰発現する、請求項 51 に記載の抗体。

【請求項 53】

ADCC 活性を改善する Fc 領域における少なくとも 1 個のアミノ酸置換を含む、請求項 48 に記載の抗体。

【請求項 54】

ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体である、請求項 42 ~ 53 のいずれか一項に記載の抗体。 50

【請求項 5 5】

ヒト IgG1 抗体である、請求項 4 2 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5 6】

マウス抗体である、請求項 4 2 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5 7】

(a) (i) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域、

10

(b) (i) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域、

(c) (i) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域

20

を含む、請求項 4 2 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5 8】

(a) 配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 5 7 に記載の抗体。

30

【請求項 5 9】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 4 2 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6 0】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 7 ~ 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 4 2 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 6 1】

ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体。

【請求項 6 2】

前記非ヒト霊長類が、ヒヒである、請求項 6 1 に記載の抗体。

【請求項 6 3】

50

(a) (i) 配列番号 89 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 92 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 101 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 104 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域、
(b) (i) 配列番号 90 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 93 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 102 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 105 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域

10

【請求項 64】

前記抗体が、ヒトシグレック - 8 のドメイン 1 におけるエピトープに結合し、ここで、ドメイン 1 は、配列番号 112 のアミノ酸配列を含む、請求項 61 ~ 63 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 65】

前記抗体が、ヒトシグレック - 8 のドメイン 3 におけるエピトープに結合し、ここで、ドメイン 3 は、配列番号 114 のアミノ酸配列を含む、請求項 61 ~ 63 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 66】

ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体である、請求項 61 ~ 65 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 67】

マウス抗体である、請求項 61 ~ 66 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 68】

I g G 1 抗体である、請求項 61 ~ 67 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 69】

前記対象が、ヒトである、請求項 43 ~ 60 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 70】

請求項 42 ~ 69 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸。

30

【請求項 71】

請求項 70 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 72】

発現ベクターである、請求項 71 に記載のベクター。

【請求項 73】

請求項 70 に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 74】

抗体を産生する方法であって、前記抗体を産生する条件下で、請求項 73 に記載の宿主細胞を培養するステップを含む方法。

40

【請求項 75】

前記宿主細胞によって産生された前記抗体を回収するステップをさらに含む、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

請求項 74 または 75 に記載の方法によって産生された抗シグレック - 8 抗体。

【請求項 77】

対象においてシグレック - 8 を発現する細胞によって媒介される疾患を処置または予防する方法であって、請求項 1 ~ 22、28、42 ~ 69 および 76 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 30 ~ 41 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 78】

50

前記疾患が、好酸球媒介性疾患である、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記疾患が、肥満細胞媒介性疾患である、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 80】

前記抗体が、アレルギー反応の 1 種または複数の症状を阻害する、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 81】

前記アレルギー反応が、I 型過敏症反応である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記疾患が、喘息、アレルギー性鼻炎、鼻ポリポーシス、アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹、肥満細胞症、好酸球性白血病および好酸球増加症候群からなる群から選択される、請求項 77 に記載の方法。

10

【請求項 83】

前記疾患が、乏顆粒球型喘息、急性または慢性気道過敏症、好酸球性食道炎、チャージ・ストラウス症候群、サイトカインに関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する悪性病変、物理的蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、圧迫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、食物アレルギーおよびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (A B P A) からなる群から選択される、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 84】

前記対象が、吸入コルチコステロイド、短時間作用型 2 アゴニスト、長時間作用型 2 アゴニストまたはこれらの組合せによって適切に制御されていない喘息を患う、請求項 74 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 85】

対象においてシグレック - 8 を発現する肥満細胞を枯渇させる方法であって、前記対象に、ヒトシグレック - 8 に結合する有効量の抗体を投与するステップを含み、前記抗体が、A D C C 活性によりシグレック - 8 を発現する肥満細胞を死滅させる方法。

【請求項 86】

前記抗体が、処置前のベースラインレベルと比較した場合に、前記対象から得られる試料における前記シグレック - 8 を発現する肥満細胞の少なくとも約 20 % を枯渇させる、請求項 85 に記載の方法。

30

【請求項 87】

前記試料が、組織試料または生体液試料である、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記組織試料が、皮膚、肺、骨髄および鼻ポリープからなる群から選択される 1 種または複数である、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

前記生体液試料が、血液、気管支肺胞洗浄液および鼻洗浄液からなる群から選択される 1 種または複数である、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 90】

前記抗体が、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 活性を改善するように遺伝子操作されている、請求項 85 ~ 89 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 91】

前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つが、フコシル化されていない、請求項 85 ~ 90 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

前記抗体が、アルファ 1 , 6 - フコシル基転移酵素 (F u t 8) ノックアウトを有する細胞株において産生される、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記抗体が、1 , 4 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 I I I (G n T - I I I) を過剰発現する細胞株において産生される、請求項 91 に記載の方法。

50

【請求項 9 4】

前記細胞株が、ゴルジ μ -マンノシダーゼ I I (M a n I I) をさらに過剰発現する、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記抗体が、A D C C 活性を改善する F c 領域における少なくとも 1 個のアミノ酸置換を含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記抗体が、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体である、請求項 8 5 ~ 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記抗体が、ヒト I g G 1 抗体である、請求項 8 5 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 9 8】

前記抗体が、

(a) (i) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、かつ/または (i) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域、

(b) (i) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および/または (i) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 を含む軽鎖可変領域、

(c) (i) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および/または (i) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 8 5 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

30

【請求項 9 9】

前記抗体が、

(a) 配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 8 5 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 0 1】

前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を

50

含むHVR-H2および(iii)配列番号67~70から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または前記軽鎖可変領域が、(i)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項85~97のいずれか一項に記載の方法。

【請求項102】

前記対象が、シグレック-8を発現する細胞によって媒介される疾患を有する、請求項85~101のいずれか一項に記載の方法。

【請求項103】

前記抗体が、アレルギー反応の1種または複数の症状を阻害する、請求項85~102のいずれか一項に記載の方法。

【請求項104】

前記アレルギー反応が、I型過敏症反応である、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

前記疾患が、喘息、アレルギー性鼻炎、鼻ポリポーシス、アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹、肥満細胞症、好酸球性白血病および好酸球増加症候群からなる群から選択される、請求項102に記載の方法。

【請求項106】

前記疾患が、乏顆粒球型喘息、急性または慢性気道過敏症、好酸球性食道炎、チャージ・ストラウス症候群、サイトカインに関連する炎症、シグレック-8を発現する細胞に関連する炎症、シグレック-8を発現する細胞に関連する悪性病変、物理的蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、圧迫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、食物アレルギーおよびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)からなる群から選択される、請求項102に記載の方法。

【請求項107】

前記対象が、吸入コルチコステロイド、短時間作用型2アゴニスト、長時間作用型2アゴニストまたはこれらの組合せによって適切に制御されていない喘息を患う、請求項85~106のいずれか一項に記載の方法。

【請求項108】

請求項42~69および76のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項109】

請求項1~22、28、42~69および76のいずれか一項に記載の抗体または請求項30~41のいずれか一項に記載の組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、その全体が参考として本明細書に援用される、2013年12月9日出願された米国仮特許出願第61/913,891号に対する利益を主張する。

【0002】

ASCIITeキストファイルにおける配列表の提出

ASCIITeキストファイルにおける次の提出の内容は、その全体を参照により本明細書に組み入れられる：コンピュータ可読形式(CRF)の配列表(ファイル名：701712000140SeqList.txt、記録された日付：2014年12月9日、サイズ：115KB)。

【0003】

発明の分野

本発明は、抗ヒトシグレック-8抗体、およびシグレック-8を発現する細胞によって媒介される疾患を処置または予防する方法に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0004】

発明の背景

シグレック（シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン）は、主に白血球に存在し、細胞表面の複合糖質に付着したシアル酸に対するその特異性によって特徴付けられる、1回膜貫通細胞表面タンパク質である。シグレックファミリーは、哺乳動物において見出される少なくとも15種のメンバーを含有する（Pillaiら、Annu Rev Immunol、2012年、30巻：357～392頁）。これらのメンバーは、シアロアドヘシン（sialoadhesion）（シグレック-1）、CD22（シグレック-2）、CD33（シグレック-3）、ミエリン関連糖タンパク質（シグレック-4）、シグレック-5、OBBP1（シグレック-6）、AIRM1（シグレック-7）、SAF-2（シグレック-8）およびCD329（シグレック-9）を含む。ヒトにおいて発現されるが、マウスにおいては発現されないメンバーであるシグレック-8は、新規ヒト好酸球タンパク質を同定する試みの一環として最初に発見された。好酸球による発現に加えて、これは、肥満細胞および好塩基球によっても発現される。シグレック-8は、硫酸化グリカン、すなわち、6'-スルホ-シアリルルイスXまたは6'-スルホ-シアリル-N-アセチル-S-ラクトサミンを認識し、肥満細胞機能を阻害することが示された細胞内免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ITIM）ドメインを含有する。

10

【0005】

肥満細胞と共に、好酸球は、特異的組織部位における感染の制御等、有益な機能的役割を果たす炎症性応答を促進することができる。炎症性応答において、好酸球のアポトーシスは、IL-3およびGM-CSF等、生存促進性サイトカインの活性により阻害され得る。しかし、アポトーシスによって急速に除去されない活性化された好酸球の増加は、既に炎症した部位における好酸球顆粒タンパク質の放出をもたらすことができ、これは、組織を損傷し、炎症をさらに増悪させることができる。チャージ・ストラウス症候群、関節リウマチおよびアレルギー性喘息等、数種類の疾患は、好酸球活性化に関連付けられることが示された（Wechslerら、J Allergy Clin Immunol、2012年、130巻（3号）：563～71頁）。現在、好酸球および肥満細胞の活性等、炎症に関与する免疫細胞の活性を制御することができる治療法の必要がある。

20

以前の研究は、シグレック-8が、シグレック-8の細胞外部分に対して産生された特異的マウス抗体と架橋されると、好酸球が、アポトーシスを起こすことを実証した（Nuttくら、Blood、2003年、336巻：918～24頁）。これらの抗体は、米国特許第8,207,305号、米国特許第8,197,811号、米国特許第7,871,612号および米国特許第7,557,191号に記載されている。しかし、依然として、高い親和性および特異性でヒトシグレック-8を認識するヒト化抗シグレック-8抗体を開発する必要がある。斯かる抗シグレック-8抗体の発見は、好酸球および/または肥満細胞の活性によって媒介される疾患のための処置の開発を可能にすることができる。

30

特許出願、特許公報および科学文献を含む本明細書に引用されるあらゆる参考文献は、個々の参考文献それぞれが具体的かつ個別に参照によりその全体が本明細書に組み入れられると示されているかのように、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第8,207,305号明細書

【特許文献2】米国特許第8,197,811号明細書

【特許文献3】米国特許第7,871,612号明細書

【特許文献4】米国特許第7,557,191号明細書

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Pillaiら、Annu Rev Immunol、2012年、

50

30 卷：357～392 頁

【非特許文献2】Wechslerら、J Allergy Clin Immunol、2012年、130巻(3号)：563～71頁

【非特許文献3】Nutkuら、Blood、2003年、336巻：918～24頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

抗シグレック - 8 抗体 (ヒト化抗シグレック - 8 抗体を含む)、これを含む組成物およびこれを使用する方法が本明細書において提供される。

【0009】

一態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、ヒトシグレック - 8 に対するヒト化抗体の結合親和性および / または結合アビディティが、ヒトシグレック - 8 に対する抗体 2 E 2 および / または抗体 2 C 4 の結合親和性および / または結合アビディティよりも高いヒト化抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 は、二量体である。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 は、免疫グロブリンの F c 領域に融合された細胞外ドメインヒトシグレック - 8 を含む。一部の実施形態において、F c 領域は、ヒト I g G 1 F c 領域である。一部の実施形態において、F c 領域は、ヒト I g G 4 F c 領域である。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 は、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む。

【0010】

一部の実施形態において、ヒト化抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または前記軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 6 もしくは 2 1 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト I g G F c 領域を含む重鎖 F c 領域を含むことができる。さらなる実施形態において、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 または I g G 4 を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 1 は、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む重鎖、および / または配列番号 7 6 もしくは 7 7 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、アミノ酸置換 S 2 2 8 P を含み、アミノ酸残基は、K a b a t における通りの E U インデックスに従ってナンバリングされる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む重鎖、および / または配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。一部の実施形態において、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態

【0011】

別の態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、熱シフトアッセイにおいて少なくとも約 7 0 から少なくとも約 7 2 の T m を有する抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、熱シフトアッセイにおいて約 7 0、約 7 1 または約 7 2 の T m を有する。一部の実施形態において、抗体は、キメラ 2 C 4 抗体と比較した場合に同じまたはより高い T m を有する。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と比較した場合に同じまたはより高い T m を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態において、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 6 もしくは 2 1 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト I g G F c 領域を含む重鎖 F c 領域を含むことができる。さらなる実施形態において、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 または I g G 4 を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 1 は、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む重鎖、および/または配列番号 7 6 もしくは 7 7 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、アミノ酸置換 S 2 2 8 P を含み、アミノ酸残基は、K a b a t における通りの E U インデックスに従ってナンバリングされる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む重鎖、および/または配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。一部の実施形態において、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態において、前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。

【 0 0 1 3 】

さらに別の態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 および 6 7 ~ 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 または 7 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含むヒト化抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 1 1 ~ 1 4 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 2 3 ~ 2 4 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態において、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 6 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 1 6 もしくは 2 1 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト I g G F c 領域を含む重鎖 F c 領域を含むことができる。さらなる実施形態において、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 または I g G 4 を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 1 は、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、アミノ酸置換 S 2 2 8 P を含み、前記アミノ酸残基は、K a b a t における通りの E U インデックスに従ってナンバリングされる。一部の実施形態において、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態において、前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。

【0014】

さらに別の態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、配列番号 2 ~ 14 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 16 ~ 24 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態において、前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。

【0015】

さらに別の態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、配列番号 2 ~ 10 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 16 ~ 22 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態において、抗体の重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。

10

【0016】

別の態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合するヒト化抗体であって、前記抗体が、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、(a) 重鎖可変領域が、(1) 配列番号 26 ~ 29 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 1、(2) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(3) 配列番号 31 ~ 36 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 2、(4) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、(5) 配列番号 38 ~ 43 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 3、(6) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3 および (7) 配列番号 45 ~ 46 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 4 を含み、かつ/または (b) 軽鎖可変領域が、(1) 配列番号 48 ~ 49 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 1、(2) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(3) 配列番号 51 ~ 53 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 2、(4) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、(5) 配列番号 55 ~ 58 から選択されるアミノ酸配列を含む HC - FR 3、(6) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3 および (7) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HC - FR 4 を含むヒト化抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態において、前記抗体の前記重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。

20

30

【0017】

さらに別の態様において、ヒトシグレック - 8 に結合し、ADCC 活性によりシグレック - 8 を発現する肥満細胞を死滅させる、単離された抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、*in vitro* でシグレック - 8 を発現する肥満細胞を死滅させる (例えば、実施例 2 に記載されている細胞培養アッセイにおいて測定される)。一部の実施形態において、抗体は、治療有効量が投与されると、対象においてシグレック - 8 を発現する肥満細胞を枯渇させる。さらなる実施形態において、抗体は、処置前のベースラインレベルと比較した場合に、対象から得られる試料におけるシグレック - 8 を発現する肥満細胞の少なくとも約 20% (例えば、少なくとも) を枯渇させる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、試料は、組織試料または生体液試料となり得る。一部の実施形態において、組織試料は、皮膚、肺、骨髄および鼻ポリープからなる群から選択される 1 種または複数である。一部の実施形態において、生体液試料は、血液、気管支肺胞洗浄液および鼻洗浄液からなる群から選択される 1 種または複数である。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作することができる。一部の実施形態において、抗体の重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。さらなる実施形態において、抗体は、アルファ 1, 6 - フコシル基転移酵素 (Fut 8) ノックアウトを有する細胞株において産生することができる。一部のさらなる実施形態において、抗体は、

40

50

1, 4 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 (acetylglucosaminyltransferase) III (GnT - III) を過剰発現する細胞株において産生することができる。さらなる実施形態において、細胞株は、ゴルジμ - マンノシダーゼ II (Man II) をさらに過剰発現する。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ADC C 活性を改善するFc領域における少なくとも1個のアミノ酸置換を含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体となり得る。一部の実施形態において、抗体は、ヒトIgG1抗体である。一部の実施形態において、抗体は、マウス抗体である。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR - H1、(ii) 配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR - H2および(iii) 配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR - H3を含む重鎖可変領域、および/または(i) 配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR - L1、(ii) 配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR - L2および(iii) 配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR - L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号106のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号109のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR - H1、(ii) 配列番号92のアミノ酸配列を含むHVR - H2および(iii) 配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR - H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i) 配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR - L1、(ii) 配列番号101のアミノ酸配列を含むHVR - L2および(iii) 配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR - L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号107のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号110のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR - H1、(ii) 配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR - H2および(iii) 配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR - H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i) 配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR - L1、(ii) 配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR - L2および(iii) 配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR - L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号108のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号111のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、重鎖可変領域は、(i) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR - H1、(ii) 配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR - H2および(iii) 配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR - H3を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR - L1、(ii) 配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR - L2および(iii) 配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR - L3を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、重鎖可変領域は、(i) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR - H1、(ii) 配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR - H2および(iii) 配列番号67 ~ 70から選択されるアミノ酸配列を含むHVR - H3を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR - L1、(ii) 配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR - L2および(iii) 配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR - L3を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、対象は、ヒトとなり得る。

【0018】

さらに別の態様において、ヒトシグレック - 8および非ヒト霊長類シグレック - 8に結合する抗体が本明細書において提供される。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR - H1、(ii) 配列番号92のアミノ酸配列を含むHVR - H2および(iii) 配列番号95のアミノ酸配列を

含むHVR-H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号107のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号110のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号108のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号111のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒトシグレック-8のドメイン1(例えば、配列番号112のアミノ酸配列を含むドメイン1)におけるエピトープに結合することができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒトシグレック-8のドメイン3(例えば、配列番号114のアミノ酸配列を含むドメイン3)におけるエピトープに結合することができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒトシグレック-8のドメイン2(例えば、配列番号113のアミノ酸配列を含むドメイン2)におけるエピトープに結合することができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト抗体となり得る。一部の実施形態において、抗体は、マウス抗体である。一部の実施形態において、抗体は、IgG1またはIgG4抗体(例えば、ヒトIgG1またはIgG4)である。

【0019】

別の態様において、配列番号116のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号115のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない、抗ヒトシグレック8抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号117のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号115のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号117のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号116のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。本明細書における一部の実施形態において、抗体は、(i)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号106のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号109のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における一部の実施形態において、抗体は、(i)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号92のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号107のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号110のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における一部の実施形態において、抗体は、(i)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖

可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号108のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号111のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0020】

別の態様において、ヒトシグレック-8に結合するヒト化抗体であって、活性化されたヒト好酸球の枯渇におけるEC₅₀が、ヒトシグレック-8に対する抗体2E2または2C4のEC₅₀に満たないヒト化抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、ヒト化抗体のEC₅₀は、ヒトシグレック-8に対する抗体2E2または2C4のEC₅₀の約85%またはそれに満たない。一部の実施形態において、ヒト化抗体のEC₅₀は、ヒトシグレック-8に対する抗体2E2または2C4のEC₅₀の約85%、約80%、約70%、約65%、約60%、約55%、約50%、約45%、約40%、約35%、約30%、約25%、約20%、約15%、約10%もしくは約5%またはそれに満たない。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、ヒト化抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、重鎖可変領域は、(i)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、ヒト化抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号16もしくは21から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むことができる。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、(i)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号67~70から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、ヒト化抗体は、配列番号2~14から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号16~24から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号92のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および/または(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変領域を含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体

は、ヒト I g G F c 領域を含む重鎖 F c 領域を含むことができる。さらなる実施形態において、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 または I g G 4 を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 1 は、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、配列番号 79 のアミノ酸配列を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含む重鎖、および/または配列番号 76 もしくは 77 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、アミノ酸置換 S 2 2 8 P を含み、アミノ酸残基は、K a b a t における通りの E U インデックスに従ってナンバリングされる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む重鎖、および/または配列番号 76 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。

10

【0021】

別の態様において、上述および本明細書に記載されているいずれかの抗体をコードする核酸が本明細書において提供される。さらに別の態様において、本明細書に記載されている核酸を含むベクターが本明細書において提供される。一実施形態において、ベクターは、発現ベクターである。さらに別の態様において、本明細書に記載されている核酸を含む宿主細胞が本明細書において提供される。一部の実施形態において、宿主細胞は、抗体を発現および産生する。

【0022】

別の態様において、抗体を産生する方法であって、本明細書に記載されている抗体をコードする 1 種または複数の核酸を含む宿主細胞を、抗体を産生する条件下で培養するステップを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態において、本方法は、宿主細胞によって産生された抗体を回収するステップをさらに含む。本方法によって産生される抗シグレック - 8 抗体も本明細書において提供される。本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体の抗原結合性断片も本明細書において提供される。

20

【0023】

別の態様において、上述および本明細書に記載されている抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が本明細書において提供される。

【0024】

別の態様において、ヒトシグレック - 8 に特異的に結合する抗体またはその断片を含む組成物であって、抗体が、F c 領域と、F c 領域に連結された N - グリコシド結合型炭水化物鎖とを含み、組成物における N - グリコシド結合型炭水化物鎖の 50 % 未満が、フコース残基を含有する組成物が本明細書において提供される。一部の実施形態において、N - グリコシド結合型炭水化物鎖のうち実質的に全てが、フコース残基を含有しない。一部の実施形態において、抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体である。一部の実施形態において、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 2 ~ 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 16 ~ 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態において、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 67 ~ 70 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 71 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 11 ~ 14 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 23 ~ 24 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態におい

30

40

50

て、抗体は、配列番号 2 ~ 14 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号 16 ~ 24 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、ヒトシグレック - 8 に対する抗体の結合親和性および/または結合アビディティは、ヒトシグレック - 8 に対する抗体 2E2 または 2C4 の結合親和性および/または結合アビディティよりも高くなることができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、熱シフトアッセイにおいて少なくとも約 70 から少なくとも約 72 の T_m を有することができる。一部の実施形態において、抗体は、約 70、約 71 または約 72 の T_m を有する。一部の実施形態において、抗体は、キメラ 2C4 抗体と比較した場合に同じまたはより高い T_m を有する。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 84 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 85 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と比較した場合に同じまたはより高い T_m を有する。

10

20

30

40

50

【0025】

別の態様において、対象においてシグレック - 8 を発現する細胞によって媒介される疾患を処置または予防する方法であって、対象に、有効量の本明細書に記載されている抗体もしくはその抗原結合性断片または本明細書に記載されている組成物を投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態において、疾患は、好酸球媒介性疾患である。一部の実施形態において、疾患は、肥満細胞媒介性疾患である。一部の実施形態において、疾患は、喘息、アレルギー性鼻炎、鼻ポリポーシス、アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹、肥満細胞症、好酸球性白血病および好酸球増加症候群からなる群から選択される。一部の実施形態において、疾患は、乏顆粒球型喘息 (paucigranulocytic asthma)、急性または慢性気道過敏症、好酸球性食道炎、チャージ・ストラウス症候群、サイトカインに関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する悪性病変、物理的蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、圧迫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、食物アレルギーおよびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) からなる群から選択される。一部の実施形態において、抗体は、アレルギー反応の 1 種または複数の症状を阻害する。一部の実施形態において、アレルギー反応は、I 型過敏症反応である。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、対象は、吸入コルチコステロイド、短時間作用型 2 アゴニスト、長時間作用型 2 アゴニストまたはこれらの組合せによって適切に制御されていない喘息を患っていてよい。

【0026】

別の態様において、対象においてシグレック - 8 を発現する肥満細胞を枯渇させる方法であって、対象に、ヒトシグレック - 8 に結合する有効量の抗体を投与するステップを含み、抗体が、ADC 活性によりシグレック - 8 を発現する肥満細胞を死滅させる方法が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、in vitro でシグレック - 8 を発現する肥満細胞を死滅させる (例えば、実施例 2 に記載されている細胞培養アッセイにおいて測定される)。一部の実施形態において、抗体は、処置前のベースラインレベルと比較した場合に、対象から得られる試料におけるシグレック - 8 を発現する肥満細胞の少なくとも約 20% を枯渇させる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、試料は、組織試料または生体液試料となり得る。一部の実施形態において、組織試料は、皮膚、肺、骨髄および鼻ポリープからなる群から選択される 1 種または複数である。一部の実施形態において、生体液試料は、血液、気管支肺胞洗浄液および鼻洗浄液からなる群から選択される 1 種または複数である。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を改善するように遺伝子操作することができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、2 つの重鎖を含むことができ、抗体の 2 つの重鎖のうち少なくとも 1 つまたは両方の重鎖は、フコシル化されていない。さらなる実施形態において、抗体は、アルファ 1, 6 - フコシル基転移酵素 (Fut8) ノックアウトを有する細胞株において産生することができる。一部のさらなる実施形態において、抗体は、1, 4 - N - アセチルグルコサミン転移酵

素 I I I (G n T - I I I) を過剰発現する細胞株において産生することができる。さらなる実施形態において、細胞株は、ゴルジ μ - マンノシダーゼ I I (M a n I I) をさらに過剰発現する。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、A D C C 活性を改善する F c 領域における少なくとも 1 個のアミノ酸置換を含むことができる。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体となり得る。一部の実施形態において、抗体は、ヒト I g G 1 抗体である。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、(i) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域を含む重鎖可変領域、および / または (i) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域を含むことができる。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および / または配列番号 1 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、重鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 7 ~ 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ / または軽鎖可変領域は、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、対象は、シグレック - 8 を発現する細胞によって媒介される疾患を有する。一部の実施形態において、疾患は、喘息、アレルギー性鼻炎、鼻ポリポーシス、アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹、肥満細胞症、好酸球性白血病および好酸球増加症候群からなる群から選択される。一部の実施形態において、疾患は、乏顆粒球型喘息、急性または慢性気道過敏症、好酸球性食道炎、チャージ・ストラウス症候群、サイトカインに関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する悪性病変、物理的蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、圧迫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、食物アレルギーおよびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (A B P A) からなる群から

選択される。一部の実施形態において、抗体は、アレルギー反応の1種または複数の症状を阻害する。一部の実施形態において、アレルギー反応は、I型過敏症反応である。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、対象は、吸入コルチコステロイド、短時間作用型 2アゴニスト、長時間作用型 2アゴニストまたはこれらの組合せによって適切に制御されていない喘息を患っている。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、対象は、ヒトとなり得る。

【0027】

本明細書に記載されている様々な実施形態の特性のうち1種、一部または全てを組み合わせ、本発明の他の実施形態を形作ることができることを理解されたい。本発明の上述および他の態様は、当業者には明らかになるであろう。本発明の上述および他の実施形態を次の詳細な説明によりさらに記載する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、ヒト化抗体の重鎖配列の比較を示す配列アライメントである。マウス2E2抗体の分子モデルにおけるCDRの4内のフレームワーク残基を*で表す；アクセプターヒトフレームワークが異なったCDRの4内の残基およびVCI残基を^において強調し、マウスへのアクセプターヒトフレームワークにおけるこれらの残基の逆変異を@で示す；ヒト生殖系列からの体細胞変異を°で示す；これらの残基が、AF471521FWおよびmou2E2（すなわち、マウス2E2）とは異なった場合、あるいはAF471521フレームワークとは異なり、mou2E2（すなわち、マウス2E2）と同一である場合、アクセプターヒトフレームワークにおける相当する残基は、ヒト生殖系列に復帰変異され、+で示す。重鎖のバージョン2において強調された配列は、最も近縁のヒト生殖系列ファミリー（すなわち、最も近縁の生殖系列配列）へのmou2E2（すなわち、マウス2E2）CDRのストレートグラフトを表す。m2E2VHは、配列番号1に相当する；ヒトFWAF471521は、配列番号120に相当する；生殖系列X92218VH366は、配列番号121に相当する；2E2RHAは、配列番号2に相当する；2E2RHBは、配列番号3に相当する；2E2RHCは、配列番号4に相当する；2E2RHDは、配列番号5に相当する；2E2RHEは、配列番号6に相当する；2E2RHFは、配列番号7に相当する；2E2RHGは、配列番号8に相当する；IGHV4-59FWは、配列番号122に相当する；2E2RHA2は、配列番号9に相当する；および2E2RHB2は、配列番号10に相当する。

【0029】

【図2】図2は、ヒト化抗体の軽鎖配列の比較を示す配列アライメントである。マウス2E2抗体の分子モデルにおけるCDRの4内のフレームワーク残基を*で表す；アクセプターヒトフレームワークが異なるCDRの4内の残基およびVCI残基を+で示す；マウスへのヒトFWにおけるこれらの残基の復帰変異を@で示す；X93721フレームワークにおいてマウスと異なる残基のヒト生殖系列への復帰変異を#で示す。m2E2VKは、配列番号15に相当する；X93721は、配列番号123に相当する；生殖系列X01668は、配列番号124に相当する；m2E2RKAは、配列番号16に相当する；m2E2RKBは、配列番号17に相当する；m2E2RKCは、配列番号18に相当する；m2E2RKDは、配列番号19に相当する；m2E2RKEは、配列番号20に相当する；m2E2RKFは、配列番号21に相当する；およびm2E2RKGは、配列番号22に相当する。

【0030】

【図3】図3は、ヒト化抗体の軽および重鎖の両方において変異したCDR配列の比較を示す配列アライメントである。生殖系列配列により近縁になるようにバリエーションにおいて変異したCDR残基を#で示す。2E2RKAは、配列番号16に相当する；2E2RKFは、配列番号21に相当する；2E2RKA F-Y mutは、配列番号23に相当する；2E2RKF F-Y mutは、配列番号24に相当する；2E2RHAは、配列番号2に相当する；2E2RHEは、配列番号6に相当する；2E2R

10

20

30

40

50

HE S - G mut は、配列番号 11 に相当する； 2 E 2 RHE E - D mut は、配列番号 12 に相当する； 2 E 2 RHE Y - V mut は、配列番号 13 に相当する； および 2 E 2 RHE E - D トリプル mut は、配列番号 14 に相当する。

【 0 0 3 1 】

【 図 4 】 図 4 は、表示温度で 10 分間加熱され、続いて 4 に冷却され、その後にシグレック - 8 結合 ELISA を行った、キメラ 2 C 4 または 2 E 2 RHE と 2 E 2 RKA、2 E 2 RKF、2 E 2 RKA CDR3 変異体または 2 E 2 RKF CDR3 変異体との組合せにコードされる精製された候補抗体によるシグレック - 8 抗原結合の比較を示すグラフである。

【 0 0 3 2 】

【 図 5 】 図 5 は、ch 2 C 4 (すなわち、キメラ 2 C 4 抗体) と比較した、精製された 2 C 4 候補抗体の Tm を示すグラフである。

【 0 0 3 3 】

【 図 6 】 図 6 は、- 20 で 60 分間凍結し、室温で解凍した後の、キメラおよびヒト化抗シグレック - 8 抗体の安定性を示すグラフである。

【 0 0 3 4 】

【 図 7 】 図 7 は、抗シグレック - 8 抗体による好酸球の死滅を示すグラフである。総末梢白血球を表示の抗シグレック - 8 および対照抗体濃度の存在下で 16 時間インキュベートした。好酸球数の低下をフローサイトメトリーによりモニターし、高い側方散乱 (SSC^{H I}) による CD16 - 陰性 IL5R + 細胞の損失として定量化した。

【 0 0 3 5 】

【 図 8 】 図 8 は、抗シグレック - 8 抗体によるヒト肥満細胞の *in vitro* アポトーシスおよび *in vivo* 枯渇を示す一連のグラフである。図 8 A。48 時間目の LDH 放出によって実証される、ヒト造血幹細胞を生着した NSGS マウスの腹膜洗浄液由来の初代ヒト肥満細胞における HEKA IgG4 抗体、非フコシル化 HEKA IgG1 抗体および低フコースキメラ 1H10 IgG1 抗体の NK 細胞媒介性抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性。対照は、シグレック - 8 に結合しないフコシル化ヒト IgG1 アイソタイプ抗体を示す。図 8 B。 *in vivo* におけるシグレック - 8 陽性肥満細胞の枯渇。ヒト肥満細胞に匹敵するレベルで、肥満細胞の表面においてシグレック - 8 を選択的に発現するシグレック - 8 トランスジェニックマウスを、HEKA IgG4 抗体、非フコシル化 HEKA IgG1 抗体、マウス 1C3 抗体またはシグレック - 8 に結合しないヒト IgG4 アイソタイプ対照抗体で腹腔内 (*intraperitoneal*) 処置した。1 群当たり n = 4 マウス。

【 0 0 3 6 】

【 図 9 】 図 9 は、ヒト化抗シグレック - 8 IgG4 抗体によるヒト化マウスにおける I 型過敏症反応の阻害を示すグラフである。抗 NP - IgE (右耳に送達) または PBS 対照 (左耳に送達) による感作および感作 24 時間後に投与した NP - BSA により、生着された NSGS マウスの耳において受動皮膚アナフィラキシー応答を誘導した。* で示す感作 24 時間前または @ で示す感作 2 時間後のいずれかに、HEKA IgG4 またはシグレック - 8 に結合しないヒト IgG4 アイソタイプ対照抗体でマウスを処置した。負荷後 3 時間または 24 時間目の耳の厚さの平均変化および標準誤差を示す。HEKA IgG4 抗体処置マウスは 1 群当たり n = 5 マウス、アイソタイプ対照抗体処置マウスは 1 群当たり n = 4 マウス。

【 0 0 3 7 】

【 図 10 】 図 10 は、フローサイトメトリーによって実証される、ヒヒおよびヒト好酸球 (CD49⁺CD16⁻SSC^{high}細胞) へのマウス抗シグレック - 8 モノクローナル抗体 2E2、1C3 および 1H10 の結合を示す一連のヒストグラムである。ヒストグラムは、シグレック - 8 に結合しないマウス IgG1 アイソタイプ対照抗体と比較した、抗体毎の蛍光強度に対しプロットされたヒヒまたはヒト血液好酸球の数を示す。

【 発明を実施するための形態 】

10

20

30

40

50

【0038】

I. 定義

本発明に関して詳細に記載する前に、本発明が、当然ながら変動し得る特定の組成物または生命システムに限定されないことを理解されたい。本明細書で使用されている用語が、特定の実施形態を記載することのみを目的としており、限定を目的としないことも理解されたい。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されている通り、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、内容がそれ以外を明らかに指示しない限り、複数の指示対象を含む。よって、例えば、「分子(molecule)」と言及される場合、2個またはそれを超える斯かる分子の組合せその他を任意選択で含む。

10

【0039】

用語「約」は、本明細書において、本技術分野における当業者であれば容易に分かるそれぞれの値の通常の変差範囲を指す。本明細書において「約」の値またはパラメータが言及される場合、該値またはパラメータそれ自体に指示される実施形態を含む（および記載する）。

【0040】

本明細書に記載されている本発明の態様および実施形態が、態様および実施形態を「含む」、「からなる」および「から本質的になる」ことを含むことが理解される。

【0041】

用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する全長抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ）および単鎖分子ならびに抗体断片（例えば、Fab、F(ab')₂およびFv）を含む。用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書において「抗体」と互換的に使用される。

20

【0042】

基本的4鎖抗体単位は、2つの同一軽(L)鎖および2つの同一重(H)鎖で構成されたヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれる追加的なポリペプチドと共に5個の基本的ヘテロ四量体単位からなり、10個の抗原結合部位を含有するが、IgA抗体は、J鎖と組み合わせた、重合して多価集合体を形成することができる2~5個の基本的4鎖単位を含む。IgGの場合、4鎖単位は一般に、約150,000ダルトンである。各L鎖は、1個の共有結合性ジスルフィド結合によってH鎖に連結される一方、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて1個または複数のジスルフィド結合によって互いに連結される。各HおよびL鎖は、規則的に間隔をあけた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各H鎖は、N末端において、可変ドメイン(V_H)に続いて、および鎖のそれぞれに対し3個の定常ドメイン(C_H)、μおよびアイソタイプに対し4個のC_Hドメインを有する。各L鎖は、N末端において可変ドメイン(V_L)、続いてその他端に定常ドメインを有する。V_Lは、V_Hと整列され、C_Lは、重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})と整列される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖可変ドメイン間の接合点を形成すると考えられる。V_HおよびV_Lの対形成は共に、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造および特性に関して、例えば、Basic and Clinical Immunology、第8版、Daniel P. Sties、Abba I. TerrおよびTristram G. Parslow(編)、Appleton & Lange、Norwalk、CT、1994年、71頁、第6章を参照されたい。

30

40

【0043】

いずれかの脊椎動物種由来のL鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパおよびラムダと呼ばれる明らかに異なる2型の一方に割り当てることができる。その重鎖の定常ドメイン(CH)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。それぞれ、 γ 、 μ 、および δ および ϵ と命名された重鎖を有する5クラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgGおよびI

50

g Mが存在する。 および クラスは、C H配列における相対的に軽微な差および機能に基づいてサブクラスへとさらに分割され、例えば、ヒトは、次のサブクラスを発現する：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。I g G 1抗体は、アロタイプと名付けられた複数の多型パリアントで存在することができ（J e f f e r i s および L e f r a n c 2009年、m A b s、1巻、4号、1～7頁において概説）、そのうちいずれかが、本発明における使用に適する。ヒト集団における共通アロタイプパリアントは、文字 a、f、n、z によって命名されている。

【0044】

「単離された」抗体は、その産生環境（例えば、天然または組換えによる）の構成成分から同定、分離および/または回収された抗体である。一部の実施形態において、単離されたポリペプチドは、その産生環境由来のあらゆる他の構成成分との関連を含まない。組換えトランスフェクト細胞に起因するもの等、その産生環境の夾雑構成成分は、抗体の研究、診断または治療的使用に典型的に干渉する材料であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含むことができる。一部の実施形態において、ポリペプチドは、（1）例えば、ローリー方法によって決定される抗体の95重量%超まで、一部の実施形態において、99重量%超まで；（1）スピニングカップシークエネーターの使用により、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または（3）クーマシーブルーもしくは銀染色を使用した非還元もしくは還元条件下のSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。単離された抗体は、抗体の天然環境の少なくとも1種の構成成分が存在しないため、組換え細胞内のi n s i t uの抗体を含む。しかし通常、単離されたポリペプチドまたは抗体は、少なくとも1回の精製ステップにより調製される。

10

20

【0045】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る可能な天然起源の変異および/または翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除いて同一である。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、重鎖および/または軽鎖にC末端切断を有する。例えば、1、2、3、4または5個のアミノ酸残基が、重鎖および/または軽鎖のC末端において切断される。一部の実施形態において、C末端切断は、重鎖からC末端リシンを除去する。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、重鎖および/または軽鎖にN末端切断を有する。例えば、1、2、3、4または5個のアミノ酸残基が、重鎖および/または軽鎖のN末端において切断される。一部の実施形態において、トランケート型のモノクローナル抗体は、組換え技法によって作成することができる。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に向けられている。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、複数の抗原部位に向けられている（二重特異性抗体または多特異性抗体等）。修飾語句「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られるという抗体の性状を示し、いずれか特定の方法による抗体の産生を要求するものと解釈するべきではない。例えば、本発明に従って使用するべきモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ方法、組換えDNA方法、ファージディスプレイ技術、およびヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座または遺伝子の一部または全体を有する動物においてヒトまたはヒト様抗体を産生するための技術を含む種々の技法によって作成することができる。

30

40

【0046】

用語「裸の抗体」は、細胞傷害性部分または放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。

【0047】

用語「全長抗体」、「インタクト抗体」または「全抗体」は、抗体断片とは対照的に、その実質的にインタクトな形態の抗体を指すように互換的に使用される。特に、全抗体は、Fc領域を含む重および軽鎖を有する抗体を含む。定常ドメインは、ネイティブ配列定常ドメイン（例えば、ヒトネイティブ配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリア

50

ントとなり得る。場合によっては、インタクト抗体は、1種または複数のエフェクター機能を有することができる。

【0048】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部、インタクト抗体の抗原結合および/または可変領域を含む。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片；ダイアボディ；線状抗体（米国特許第5,641,870号、実施例2；Zapataら、Protein Eng. 8巻(10号)：1057~1062頁[1995年]を参照)；抗体断片から形成された単鎖抗体分子および多特異性抗体が挙げられる。

【0049】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2個の同一抗原結合性断片と、容易に結晶化する能力を反映する命名であるところの、残渣「Fc」断片を産生する。Fab断片は、一方の重鎖のH鎖可変領域ドメイン(V_H)および第1の定常ドメイン(C_{H1})と共にL鎖全体からなる。各Fab断片は、抗原結合に関して一価である、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、単一の大型のF(ab')₂断片を生じ、これは、異なる抗原結合活性を有し、依然として抗原を架橋することができる2個のジスルフィド結合したFab断片に大まかに相当する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1個または複数のシステインを含む数個の追加的な残基をC_{H1}ドメインのカルボキシ末端に有するという点において、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基(複数可)が遊離チオール基を有するFab'の本明細書における命名である。F(ab')₂抗体断片は本来、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片のペアとして産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも公知である。

10

20

【0050】

Fc断片は、ジスルフィドによって一体に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、ある特定の種類の細胞上に存在するFc受容体(FcR)によって認識される領域でもあるFc領域における配列によって決定される。

【0051】

「Fv」は、完全抗原認識および結合部位を含有する最小抗体断片である。この断片は、緊密な非共有結合性会合した1個の重および1個の軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これら2個のドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する6個の高頻度可変性ループ(それぞれHおよびL鎖由来の3個のループ)を発する。しかし、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3個のHVRのみを含むFvの半分)であっても、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識および結合する能力を有する。

30

【0052】

「sFv」または「scFv」としても省略される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖へと接続されたV_HおよびV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。一部の実施形態において、sFvポリペプチドは、V_HおよびV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これは、sFvが、抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。sFvの概説に関しては、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、269~315頁(1994年)を参照されたい。

40

【0053】

本発明の抗体の「機能断片」は、インタクト抗体の抗原結合もしくは可変領域を一般に含むインタクト抗体の部分、または修飾されたFcR結合能を保持もしくは有する抗体のFv領域を含む。抗体断片の例として、抗体断片から形成された線状抗体、単鎖抗体分子および多特異性抗体が挙げられる。

【0054】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、重および/または軽鎖の部分が、特定の種に

50

由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における相当する配列と同一または相同であるが、鎖（複数可）の残りが、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における相当する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）と共に、所望の生物学的活性を呈する限りにおいて、斯かる抗体の断片を特に含む（米国特許第4,816,567号；Morrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81巻：6851～6855頁（1984年））。本明細書における目的のキメラ抗体は、PRIMATIZED（登録商標）抗体を含み、この抗体の抗原結合領域は、例えば、目的の抗原でマカクザルを免疫化することによって産生された抗体に由来する。本明細書において、「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットとして使用される。

10

【0055】

「ヒト化」型の非ヒト（例えば、マウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。一実施形態において、ヒト化抗体は、レシピエントのHVR由来の残基が、所望の特異性、親和性および/または能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）のHVR由来の残基に置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一部の事例において、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、相当する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に存在しない残基を含むことができる。これらの修飾を為して、結合親和性等、抗体性能をさらに精緻化することができる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1、典型的には2個の可変ドメインのうち実質的に全てを含み、それによると、高頻度可変性ループの全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリン配列のものに相当し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものであるが、FR領域は、結合親和性、異性化、免疫原性等、抗体性能を改善する1個または複数の個々のFR残基置換を含むことができるであろう。一部の実施形態において、FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は、H鎖において6個以下であり、L鎖においては、3個以下である。ヒト化抗体は、典型的にはヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも部分も任意選択で含むであろう。さらなる詳細に関して、例えば、Jonesら、Nature 321巻：522～525頁（1986年）；Riechmannら、Nature 332巻：323～329頁（1988年）；およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol. 2巻：593～596頁（1992年）を参照されたい。例えば、VaswaniおよびHamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1巻：105～115頁（1998年）；Harris、Biochem. Soc. Transactions 23巻：1035～1038頁（1995年）；HurleおよびGross、Curr. Op. Biotech. 5巻：428～433頁（1994年）；ならびに米国特許第6,982,321号および同第7,087,409号も参照されたい。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、単一の抗原部位に向けられている。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、複数の抗原部位に向けられている。代替的ヒト化方法は、米国特許第7,981,843号および米国特許出願公開第2006/0134098号に記載されている。

20

30

40

【0056】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の重または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「VH」および「VL」と称することができる。これらのドメインは一般に、抗体の最も可変的な部分であり（同じクラスの他の抗体と比べて）、抗原結合部位を含有する。

【0057】

用語「高頻度可変領域」、「HVR」または「HV」は、本明細書において使用される場合、配列が高頻度可変性であるおよび/または構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6個のHVRを含む；VHにおける3個（H1、H2、H3）およびVLにおける3個（L1、L2、L3）。ネイティブ抗体に

50

において、H3およびL3は、6個のHVRのうち最大の多様性を表示し、H3は特に、抗体への優れた特異性の付与において特有の役割を果たすと考えられる。例えば、Xuら、*Immunity* 13巻：37～45頁(2000年)；JohnsonおよびWu、*Methods in Molecular Biology* 248巻：1～25頁(Lo編、Human Press、Totowa、NJ、2003年)を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる天然起源のラクダ科動物(camelid)抗体は、軽鎖の非存在下で機能的かつ安定的である。例えば、Hamers-Castermanら、*Nature* 363巻：446～448頁(1993年)およびSheriffら、*Nature Struct. Biol.* 3巻：733～736頁(1996年)を参照されたい。

10

【0058】

多数のHVRの図解が使用されており、本明細書に含まれる。Kabat相補性決定領域(CDR)であるHVRは、配列可変性に基づき、最も一般的に使用されている(Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*、第5版、Public Health Service、National Institute of Health、Bethesda、MD(1991年))。Chothia HVRは、その代わりに、構造ループの位置を指す(ChothiaおよびLesk、*J. Mol. Biol.* 196巻：901～917頁(1987年))。「Contact」HVRは、利用できる複雑な結晶構造の解析に基づく。これらのHVRのそれぞれに由来する残基を下に記す。

20

【表A】

ループ	Kabat	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabatナンバリング)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothiaナンバリング)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

30

【0059】

他に断りがなければ、可変ドメイン残基(HVR残基およびフレームワーク領域残基)は、Kabatら(上掲)に従ってナンバリングする。

【0060】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書に定義されているHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0061】

表現「Kabatにおける通りの可変ドメイン残基ナンバリング」または「Kabatにおける通りのアミノ酸位置ナンバリング」およびこれらの変種は、Kabatら(上掲)における抗体の編集の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用されるナンバリング方式を指す。このナンバリング方式を使用して、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはHVRの短縮またはそれへの挿入に相当する、より少ないまたは追加的なアミノ酸を含有することができる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸挿入(Kabatによる残基52a)を、また、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えば、Kabatによる残基82a、82bおよび82c等)を含むことができる。残基のKabatナンバリングは、「標準」Kabatナンバリングされた配列との抗体配列の相同性領域におけるアライメントにより、所定の抗体に対して決定することができる。

40

【0062】

50

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来するV LまたはV Hフレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むことができる、あるいは先在するアミノ酸配列変化を含有することができる。一部の実施形態において、先在するアミノ酸変化の数は、10個もしくはそれに満たない、9個もしくはそれに満たない、8個もしくはそれに満たない、7個もしくはそれに満たない、6個もしくはそれに満たない、5個もしくはそれに満たない、4個もしくはそれに満たない、3個もしくはそれに満たないまたは2個もしくはそれに満たない。

10

【0063】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列し、必要であればギャップを導入して、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮することなく、最大パーセント配列同一性を達成した後に、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、当業者の技能範囲内の様々な仕方で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア等、公表されているコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較されている配列の全長にわたる最大アライメントの達成に必要とされるいずれかのアルゴリズムを含む、配列の整列に適切なパラメータを決定することができる。例えば、所定のアミノ酸配列Bとの、これに関するまたはこれに対する所定のアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性(あるいは、所定のアミノ酸配列Bと、これに関しまたはこれに対し、ある特定の%アミノ酸配列同一性を有するまたは含む所定のアミノ酸配列Aと表現することができる)は、次の通りに計算される：

20

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

(式中、Xは、AおよびBの該プログラムのアライメントにおける配列により同一マッチとしてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性が、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性に等しくならぬことが認められよう。

30

【0064】

特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチドにおけるエピトープ「に結合する」、「に特異的に結合する」または「に特異的な」抗体は、他のいかなるポリペプチドまたはポリペプチドエピトープにも実質的に結合することなく、この特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチドにおけるエピトープに結合する抗体である。一部の実施形態において、無関係の非シグレック-8ポリペプチドへの本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体の結合は、本技術分野で公知の方法(例えば、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA))によって測定されるシグレック-8への抗体結合の約10%未満である。一部の実施形態において、シグレック-8(例えば、二量体型のシグレック-8Fc融合タンパク質(配列番号74))に結合する抗体は、1μM、100nM、10nM、2nM、1nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.1nM、0.01nMまたは0.001nM(例えば、 10^{-8} Mまたはそれに満たない、例えば、 10^{-8} M~ 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} M~ 10^{-13} M)の解離定数(Kd)を有する。

40

【0065】

用語「シグレック-8」は、本明細書において、ヒトシグレック-8タンパク質を指す。この用語は、スプライスパリアントまたはアレルパリアントを含むシグレック-8の天然起源のパリアントも含む。例示的なヒトシグレック-8のアミノ酸配列を配列番号72に示す。別の例示的なヒトシグレック-8のアミノ酸配列を配列番号73に示す。一部の

50

実施形態において、ヒトシグレック - 8 タンパク質は、免疫グロブリン F c 領域に融合されたヒトシグレック - 8 細胞外ドメインを含む。免疫グロブリン F c 領域に融合された例示的なヒトシグレック - 8 細胞外ドメインのアミノ酸配列を配列番号 74 に示す。配列番号 74 における下線を引いたアミノ酸配列は、シグレック - 8 F c 融合タンパク質アミノ酸配列の F c 領域を示す。

【化 1】

ヒトシグレック-8アミノ酸配列

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
 NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLN 10
 YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESQHSRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASVSSPG
 PTTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGD
 TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
 VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
 IIFIVRSCRKKSARPAAGVGDGTMEDAKAIRGSASQGPLETSWKDGNPLKPPPAVAPS
 SGEEGELHYATLSFHKVVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSKEV
 RG (配列番号 72) 20

【化 2】

ヒトシグレック-8アミノ酸配列

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
 NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLN
 YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESQHPRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASVSSPG
 PTTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGD
 TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH 30
 VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
 IIFIVRSCRKKSARPAAGVGDGTMEDAKAIRGSASQGPLETSWKDGNPLKPPPAVAPS
 SGEEGELHYATLSFHKVVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSKEV
 RG (配列番号 73)

【化3】

シグレック-8 Fc融合タンパク質アミノ酸配列

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
 NPDREVQAETQGRFQLLGDIVSNDCSLSIRDARKRDKGSIYFFRLERGSMSKWSYKSQLN
 YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESQHSRNLTCVSPWACKQGTTPPMISWIGASVSSPG
 PTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGDA
 TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
 VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTGSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTHTCPP
 CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQOQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 74)

10

【0066】

「アポトーシスを誘導する」または「アポトーシス性」である抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化および/または膜小胞の形成(アポトーシス小体と呼ばれる)等、標準アポトーシスアッセイによって決定されるプログラム細胞死を誘導する抗体である。例えば、本発明の抗シグレック-8抗体のアポトーシス活性は、アネキシンVで細胞を染色することにより示すことができる。

20

【0067】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域(ネイティブ配列Fc領域またはアミノ酸配列バリエーションFc領域)に起因し得る生物学的活性を指し、抗体アイソタイプにより変動する。抗体エフェクター機能の例として：C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)；食作用；細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方調節；およびB細胞活性化が挙げられる。

【0068】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」は、ある特定の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球およびマクロファージ)上に存在するFc受容体(FcR)に結合した分泌されたIgが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞を、抗原を有する標的細胞に特異的に結合させ、その後、細胞毒で標的細胞を死滅させることができる細胞傷害の形態を指す。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装(arm)」させ、この機構による標的細胞の死滅に必要とされる。ADCCを媒介するための主な細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現する一方、単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFc発現は、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol. 9巻：457~92頁(1991年)の464頁の表3に要約されている。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、ADCCを増強する。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されているもの等、*in vitro* ADCCアッセイを行うことができる。斯かるアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞を含む。その代わりにまたはその上、目的の分子のADCC活性は、*in vivo*で、例えば、Clynesら、PNAS USA 95巻：652~656頁(1998年)に開示されているもの等、動物モデルにおいて評価することができる。ADCC活性および他の抗体特性を変更する他のFcバリエーションは、Ghetieら、Nat Biotech. 15巻：637~40頁、1997年；Duncanら、Nature 332巻：563~564頁、1988年；Lundら、J. Immunol 147巻：2657~2662頁、1991年；Lundら、Mol Immunol

30

40

50

29巻：53～59頁、1992年；Alegreら、Transplantation 57巻：1537～1543頁、1994年；Hutchinsら、Proc Natl. Acad Sci USA 92巻：11980～11984頁、1995年；Jeffersら、Immunol Lett. 44巻：111～117頁、1995年；Lundら、FASEB J 9巻：115～119頁、1995年；Jeffersら、Immunol Lett 54巻：101～104頁、1996年；Lundら、J Immunol 157巻：4963～4969頁、1996年；Armourら、Eur J Immunol 29巻：2613～2624頁、1999年；Idusogieら、J Immunol 164巻：4178～4184頁、2000；Reddyら、J Immunol 164巻：1925～1933頁、2000年；Xuら、Cell Immunol 200巻：16～26頁、2000年；Idusogieら、J Immunol 166巻：2571～2575頁、2001年；Shieldsら、J Biol Chem 276巻：6591～6604頁、2001年；Jeffersら、Immunol Lett 82巻：57～65頁、2002年；Prestaraら、Biochem Soc Trans 30巻：487～490頁、2002年；Lazarら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103巻：4005～4010頁、2006年；米国特許第5,624,821号；同第5,885,573号；同第5,677,425号；同第6,165,745号；同第6,277,375号；同第5,869,046号；同第6,121,022号；同第5,624,821号；同第5,648,260号；同第6,194,551号；同第6,737,056号；同第6,821,505号；同第6,277,375号；同第7,335,742号；および同第7,317,091号に開示されているものを含む。

【0069】

本明細書における用語「Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域およびバリエーションFc領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように使用されている。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226またはPro230の位置のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端に伸びるものと定義される。本発明の抗体における使用に適したネイティブ配列Fc領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む。単一のアミノ酸置換（KabataナンバリングによるS228P；IgG4Proと命名）を導入して、組換えIgG4抗体において観察される異種性を消失させることができる。Angal, S.ら（1993年）Mol Immunol 30巻、105～108頁を参照されたい。

【0070】

「非フコシル化」または「フコース欠損」抗体は、Fc領域を含むグリコシル化抗体バリエーションを指し、このFc領域に付着した糖質構造は、低下したフコースを有するまたはフコースを欠如する。一部の実施形態において、フコースが低下したまたはフコースを欠如する抗体は、改善されたADCC機能を有する。非フコシル化またはフコース欠損抗体は、細胞株において産生される同じ抗体におけるフコースの量と比べて低下したフコースを有する。本明細書において企図される非フコシル化またはフコース欠損抗体組成物は、組成物における抗体のFc領域に付着したN結合型グリカンの約50%未満が、フコースを含む組成物である。

【0071】

用語「フコシル化」または「フコシル化された」は、抗体のペプチド骨格に付着したオリゴ糖内のフコース残基の存在を指す。特に、フコシル化抗体は、例えば、ヒトIgG1 FcドメインのAsn297位における（Fc領域残基のEUナンバリング）、抗体Fc領域に付着したN結合型オリゴ糖の一方または両方における最内側N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基に（1,6）結合型フコースを含む。Asn297は、免疫グロブリンにおける軽微な配列変種により、297位の上流または下流の約+3アミノ酸に、すなわち、294～300位の間に位置することもできる。

【0072】

「フコシル化の程度」は、本技術分野で公知の方法によって、例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI TOF MS) によって評価される N-グリコシダーゼ F 処理抗体組成物において同定された、全オリゴ糖と比べたフコシル化オリゴ糖のパーセンテージである。「完全にフコシル化された抗体」の組成物において、基本的に全オリゴ糖が、フコース残基を含む、すなわち、フコシル化されている。一部の実施形態において、完全にフコシル化された抗体の組成物は、少なくとも約 90% のフコシル化の程度を有する。したがって、斯かる組成物における個々の抗体は、典型的に、Fc 領域における 2 個の N 結合型オリゴ糖のそれぞれにフコース残基を含む。逆に、「完全非フコシル化」抗体の組成物において、基本的にいかなるオリゴ糖もフコシル化されておらず、斯かる組成物における個々の抗体は、Fc 領域における 2 個の N 結合型オリゴ糖のいずれにもフコース残基を含有しない。一部の実施形態において、完全非フコシル化抗体の組成物は、約 10% 未満のフコシル化の程度を有する。「部分的にフコシル化された抗体」の組成物において、オリゴ糖の一部のみが、フコースを含む。組成物が、Fc 領域における N 結合型オリゴ糖にフコース残基を欠如する基本的にあらゆる個々の抗体も、Fc 領域における N 結合型オリゴ糖の両方にフコース残基を含有する基本的にあらゆる個々の抗体も含まないのであれば、斯かる組成物における個々の抗体は、Fc 領域における N 結合型オリゴ糖の一方または両方にフコース残基を含むことができるまたはどちらにも含まない。一実施形態において、部分的にフコシル化された抗体の組成物は、約 10% ~ 約 80% (例えば、約 50% ~ 約 80%、約 60% ~ 約 80% または約 70% ~ 約 80%) のフコシル化の程度を有する。

10

20

【0073】

本明細書における「結合親和性」は、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位およびその結合パートナー (例えば、抗原) の間の非共有結合性相互作用の強度を指す。一部の実施形態において、シグレック - 8 (本明細書に記載されているシグレック - 8 - Fc 融合タンパク質等、二量体の場合がある) に対する抗体の親和性は、一般に、解離定数 (Kd) により表すことができる。親和性は、本明細書に記載されている方法を含む、本技術分野で公知の一般的方法により測定することができる。

【0074】

本明細書における「結合アビディティ」は、分子 (例えば、抗体) の複数の結合部位およびその結合パートナー (例えば、抗原) の結合強度を指す。

30

【0075】

本明細書における抗体をコードする「単離された」核酸分子は、同定され、これが産生された環境においてこれが通常関連する少なくとも 1 種の夾雑核酸分子から分離された核酸分子である。一部の実施形態において、単離された核酸は、産生環境と関連するあらゆる構成成分との関連を含まない。本明細書におけるポリペプチドおよび抗体をコードする単離された核酸分子は、これが天然に見出される形態または設定以外の形態である。したがって、単離された核酸分子は、本明細書において細胞中に天然に存在するポリペプチドおよび抗体をコードする核酸から区別される。

【0076】

用語「医薬製剤」は、活性成分の生物学的活性が有効となることを可能にするような形態の、この製剤が投与される対象にとって容認し難い毒性がある追加的な構成成分を含有しない調製物を指す。斯かる製剤は無菌である。

40

【0077】

本明細書における「担体」は、用いられている投薬量および濃度でこれに曝露される細胞または哺乳動物にとって無毒性の、薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤を含む。多くの場合、生理的に許容される担体は、水性 pH 緩衝溶液である。生理的に許容される担体の例として、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量 (約 10 残基未満の) ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン等のアミノ酸；グル

50

コース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖、二糖および他の糖質；EDTA等のキレート剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成イオン；および/またはTWEEN（商標）、ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS（商標）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0078】

本明細書において、用語「処置」は、臨床病理学の経過において処置されている個体または細胞の天然の経過を変更するように設計された臨床介入を指す。処置の望ましい効果は、疾患進行速度の減少、疾患状態の回復または緩和、および予後の寛解または改善を含む。例えば、障害（例えば、好酸球媒介性疾患）に関連する1種または複数の症状が、軽減または排除される場合、個体はうまく「処置」される。例えば、処置が、疾患に罹った個体のクオリティ・オブ・ライフの増加、疾患処置に必要とされる他の薬物療法の用量の減少、疾患再発の頻度の低下、疾患の重症度の低減、疾患の発症もしくは進行の遅延および/または個体の生存の延長をもたらす場合、個体はうまく「処置」される。

10

【0079】

本明細書において、「と併せて」は、ある処置様式に加えた、別の処置様式の投与を指す。このようなものとして、「と併せて」は、個体へのある処置様式の投与の前、最中または後における、他の処置様式の投与を指す。

【0080】

本明細書において、用語「予防」は、個体における疾患の発生または再発に関する予防法の提供を含む。個体は、障害の素因がある、障害になりやすいまたは障害発症リスクがある可能性があるが、未だ障害と診断されていない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、障害の発症を遅延させるために使用される。

20

【0081】

本明細書において、障害発症「リスクがある」個体は、検出可能な疾患または疾患症状を有していても有していなくてもよく、本明細書に記載されている処置方法に先立ち検出可能な疾患または疾患症状を呈していてもいなくてもよい。「リスクがある」は、個体が、本技術分野で公知の好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害の発症と相関する測定可能なパラメータである1種または複数のリスク因子を有することを意味する。これらのリスク因子のうち1種または複数をもつ個体は、これらのリスク因子の1種または複数がない個体よりも高い障害発症確率を有する。

30

【0082】

「有効量」は、治療的または予防的結果を含む、所望のまたは表示の効果の達成に必要な投薬量および期間で、少なくとも有効な量を指す。有効量は、1回または複数の投与でもたすことができる。「治療有効量」は、特定の障害の測定可能な改善をもたらすために要求される少なくとも最小濃度である。本明細書における治療有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する抗体の能力等の因子に応じて変動し得る。治療有効量は、治療的に有益な効果が、抗体のいかなる毒性または有害効果も上回る量となることもできる。「予防有効量」は、所望の予防的結果の達成に必要な投薬量および期間で有効な量を指す。典型的には、ただし必然的ではなく、予防的用量は、疾患のより早期ステージにおいてまたはそれに先立ち対象において使用されるため、予防有効量は、治療有効量未満となり得る。

40

【0083】

「慢性」投与は、延長された期間で初期治療効果（活性）を維持するために、急性様式とは対照的に継続的な様式での医薬（複数可）の投与を指す。「間欠的」投与は、中断することなく連続的に為されないが、周期性の性質の処置である。

【0084】

本明細書において、「個体」または「対象」は、哺乳動物である。処置目的のための「哺乳動物」は、イヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、スナネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコ等、ヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園、スポーツまたは愛玩動物を含む。一部の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

50

【0085】

I I . 抗シグレック - 8 抗体および組成物

一態様において、本発明は、ヒトシグレック - 8 に結合する単離された抗体を提供する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、次の特徴のうち1種または複数を有する：(1) ヒトシグレック - 8 に結合する；(2) ヒトシグレック - 8 の細胞外ドメインに結合する；(3) マウス抗体 2 E 2 および / またはマウス抗体 2 C 4 よりも高い親和性でヒトシグレック - 8 に結合する；(4) マウス抗体 2 E 2 および / またはマウス抗体 2 C 4 よりも高いアビディティーでヒトシグレック - 8 に結合する；(5) 熱シフトアッセイにおいて約 70 ~ 72 またはより高い T_m を有する；(6) 低下した程度のフコシル化を有するかまたはフコシル化されていない；(7) 好酸球上に発現されたヒトシグレック - 8 に結合し、好酸球のアポトーシスを誘導する；(8) 肥満細胞上に発現されたヒトシグレック - 8 に結合し、肥満細胞を枯渇させる；(9) 肥満細胞上に発現されたヒトシグレック - 8 に結合し、肥満細胞の Fc RI 依存性活性（例えば、ヒスタミン放出、PGD₂ 放出、Ca²⁺ フラックスおよび / または - ヘキソサミニダーゼ放出等）を阻害する；(10) ADC C 活性を改善するように遺伝子操作された；(11) 肥満細胞上に発現されたヒトシグレック - 8 に結合し、ADC C 活性により肥満細胞を死滅させる（*in vitro* および / または *in vivo* で）；(12) ヒトおよび非ヒト霊長類のシグレック - 8 に結合する；(13) ヒトシグレック - 8 のドメイン 1、ドメイン 2 および / またはドメイン 3 に結合する、またはヒトシグレック - 8 のドメイン 1、ドメイン 2 および / またはドメイン 3 を含むシグレック - 8 ポリペプチド（例えば、本明細書に記載されている融合タンパク質）に結合する；ならびに(14) マウス抗体 2 E 2 または 2 C 4 の EC₅₀ に満たない EC₅₀ で活性化された好酸球を枯渇させる。

10

20

【0086】

一態様において、本発明は、ヒトシグレック - 8 に結合する抗体を提供する。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 は、配列番号 72 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 は、配列番号 73 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 1 におけるエピトープに結合し、ドメイン 1 は、配列番号 112 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 2 におけるエピトープに結合し、ドメイン 2 は、配列番号 113 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 3 におけるエピトープに結合し、ドメイン 3 は、配列番号 114 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号 116 のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号 115 のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号 117 のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号 115 のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号 117 のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号 116 のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 の細胞外ドメインにおける線状エピトープに結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 の細胞外ドメインにおける立体構造エピトープに結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、好酸球上に発現されるヒトシグレック - 8 に結合し、好酸球のアポトーシスを誘導する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、肥満細胞上に発現されるヒトシグレック - 8 に結合し、肥満細胞を枯渇させる。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、肥満細胞上に発現されるヒトシグレック - 8 に結合し、肥満細胞媒介性活性を阻害する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、肥満細胞上に発現されるヒトシグレック - 8 に結合し、ADC C 活性により肥満細胞を死滅させる。一部の実施形態において、本明細書に記

30

40

50

載されている抗体は、肥満細胞を枯渇させ、肥満細胞活性化を阻害する。一部の実施形態において、本明細書における抗体は、活性化された好酸球を枯渇させ、肥満細胞活性化を阻害する。

【0087】

ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する、単離された抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。霊長類交差反応性を有する抗体の同定は、非ヒト霊長類における抗シグレック - 8 抗体の前臨床検査に有用となるであろう。一態様において、本発明は、非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体を提供する。一態様において、本発明は、ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体を提供する。一部の実施形態において、非ヒト霊長類シグレック - 8 は、配列番号 118 のアミノ酸配列またはその部分を含む。一部の実施形態において、非ヒト霊長類シグレック - 8 は、配列番号 119 のアミノ酸配列またはその部分を含む。一部の実施形態において、非ヒト霊長類は、ヒヒ（例えば、P a p i o A n u b i s）である。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 1 におけるエピトープに結合する。さらなる実施形態において、ヒトシグレック - 8 のドメイン 1 は、配列番号 112 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 3 におけるエピトープに結合する。さらなる実施形態において、ヒトシグレック - 8 のドメイン 3 は、配列番号 114 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体である。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体は、マウス抗体である。一部の実施形態において、ヒトシグレック - 8 および非ヒト霊長類シグレック - 8 に結合する抗体は、ヒト I g G 1 抗体である。

10

20

【0088】

一態様において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、モノクローナル抗体である。一態様において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、抗体断片（抗原結合性断片を含む）、例えば、F a b、F a b' - S H、F v、s c F v または (F a b')₂ 断片である。一態様において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体である。一態様において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体のいずれかは、精製されている。

30

【0089】

一態様において、シグレック - 8 に結合するマウス 2 E 2 抗体およびマウス 2 C 4 抗体と競合する抗シグレック - 8 抗体が提供される。マウス 2 E 2 抗体およびマウス 2 C 4 抗体と同じエピトープに結合する抗シグレック - 8 抗体も提供される。一態様において、シグレック - 8 への結合に関して本明細書に記載されているいずれかの抗シグレック - 8 抗体（例えば、H E K A、H E K F、1 C 3、1 H 1 0、4 F 1 1）と競合する抗シグレック - 8 抗体が提供される。本明細書に記載されているいずれかの抗シグレック - 8 抗体（例えば、H E K A、H E K F、1 C 3、1 H 1 0、4 F 1 1）と同じエピトープに結合する抗シグレック - 8 抗体も提供される。

40

【0090】

本発明の一態様において、抗シグレック - 8 抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。ある特定の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。ある特定の実施形態において、斯かるベクターを含む宿主細胞が提供される。本発明の別の態様において、抗シグレック - 8 抗体または抗シグレック - 8 抗体をコードするポリヌクレオチドを含む組成物が提供される。ある特定の実施形態において、本発明の組成物は、本明細書に列挙されているもの等、好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害の処置のための医薬製剤である。

【0091】

一態様において、マウス抗体 2 C 4 の H V R 配列のうち 1、2、3、4、5 または 6 個

50

を含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。一態様において、マウス抗体 2 E 2 の H V R 配列のうち 1、2、3、4、5 または 6 個を含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、H V R は、K a b a t C D R または C h o t h i a C D R である。

【 0 0 9 2 】

一態様において、マウス抗体 1 C 3 の H V R 配列のうち 1、2、3、4、5 または 6 個を含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。一態様において、マウス抗体 4 F 1 1 の H V R 配列のうち 1、2、3、4、5 または 6 個を含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。一態様において、マウス抗体 1 H 1 0 の H V R 配列のうち 1、2、3、4、5 または 6 個を含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、H V R は、K a b a t C D R または C h o t h i a C D R である。

10

【 0 0 9 3 】

一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 1 におけるエピトープに結合し、ドメイン 1 は、配列番号 1 1 2 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 2 におけるエピトープに結合し、ドメイン 2 は、配列番号 1 1 3 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック - 8 のドメイン 3 におけるエピトープに結合し、ドメイン 3 は、配列番号 1 1 4 のアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号 1 1 6 のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号 1 1 5 のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号 1 1 7 のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号 1 1 5 のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、配列番号 1 1 7 のアミノ酸を含む融合タンパク質に結合するが、配列番号 1 1 6 のアミノ酸を含む融合タンパク質には結合しない。

【 0 0 9 5 】

一態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック - 8 抗体であって、重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体が本明細書において提供される。

30

【 0 0 9 6 】

一態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック - 8 抗体であって、重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 7 ~ 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 および (i i i) 配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体が本明細書において提供される。

40

【 0 0 9 7 】

一態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック - 8 抗体であって、重鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 および (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含み、かつ/または軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む H V R -

50

L2および(iii)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体が本明細書において提供される。

【0098】

別の態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック-8抗体であって、重鎖可変領域が、(i)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号67~70から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ/または軽鎖可変領域が、(i)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体が本明細書において提供される。

10

【0099】

別の態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック-8抗体であって、重鎖可変領域が、(i)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、かつ/または軽鎖可変領域が、(i)配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック-8のドメイン2におけるエピトープに結合し、ドメイン2は、配列番号113のアミノ酸配列を含む。

20

【0100】

別の態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック-8抗体であって、重鎖可変領域が、(i)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号92のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、かつ/または軽鎖可変領域が、(i)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック-8のドメイン3におけるエピトープに結合し、ドメイン3は、配列番号114のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック-8および非ヒト霊長類シグレック-8に結合する。

30

【0101】

別の態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗シグレック-8抗体であって、重鎖可変領域が、(i)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H2および(iii)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、かつ/または軽鎖可変領域が、(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-L2および(iii)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック-8のドメイン1におけるエピトープに結合し、ドメイン1は、配列番号112のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、ヒトシグレック-8および非ヒト霊長類シグレック-8に結合する。

40

【0102】

本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、この抗体が、ヒトシグレック-8に結合する能力を保持するのであれば、いかなる適したフレームワーク可変ドメイン配列を含むこともできる。本明細書において、重鎖フレームワーク領域は、「HC-FR1~FR4」と命名され、軽鎖フレームワーク領域は、「LC-FR1~FR4」と命名される。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、配列番号26、34、38および45の重鎖可変ドメインフレームワーク配列(それぞれHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3およびHC-FR4)を含む。一部の実施形態において、抗シグレック-8

50

抗体は、配列番号 48、51、55 および 60 の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列（それぞれ LC-FR1、LC-FR2、LC-FR3 および LC-FR4）を含む。一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 48、51、58 および 60 の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列（それぞれ LC-FR1、LC-FR2、LC-FR3 および LC-FR4）を含む。

【0103】

一実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む重鎖可変ドメインを含み、フレームワーク配列は、HC-FR1 ~ HC-FR4 配列、それぞれ配列番号 26 ~ 29 (HC-FR1)、配列番号 31 ~ 36 (HC-FR2)、配列番号 38 ~ 43 (HC-FR3) および配列番号 45 または 46 (HC-FR4) を含み、HVR-H1 は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含み、HVR-H2 は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含み、HVR-H3 は、配列番号 63 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む重鎖可変ドメインを含み、フレームワーク配列は、HC-FR1 ~ HC-FR4 配列、それぞれ配列番号 26 ~ 29 (HC-FR1)、配列番号 31 ~ 36 (HC-FR2)、配列番号 38 ~ 43 (HC-FR3) および配列番号 45 または 46 (HC-FR4) を含み、HVR-H1 は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含み、HVR-H2 は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含み、HVR-H3 は、配列番号 67 ~ 70 から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含み、フレームワーク配列は、LC-FR1 ~ LC-FR4 配列、それぞれ配列番号 48 または 49 (LC-FR1)、配列番号 51 ~ 53 (LC-FR2)、配列番号 55 ~ 58 (LC-FR3) および配列番号 60 (LC-FR4) を含み、HVR-L1 は、配列番号 64 のアミノ酸配列を含み、HVR-L2 は、配列番号 65 のアミノ酸配列を含み、HVR-L3 は、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含み、フレームワーク配列は、LC-FR1 ~ LC-FR4 配列、それぞれ配列番号 48 または 49 (LC-FR1)、配列番号 51 ~ 53 (LC-FR2)、配列番号 55 ~ 58 (LC-FR3) および配列番号 60 (LC-FR4) を含み、HVR-L1 は、配列番号 64 のアミノ酸配列を含み、HVR-L2 は、配列番号 65 のアミノ酸配列を含み、HVR-L3 は、配列番号 71 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 2 ~ 10 から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 16 ~ 22 から選択されるアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 2 ~ 10 から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 23 または 24 から選択されるアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 11 ~ 14 から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 16 ~ 22 から選択されるアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 11 ~ 14 から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 23 または 24 から選択されるアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。

【0104】

一部の実施形態において、重鎖 HVR 配列は、次のものを含む：

10

20

30

40

【化4】

- a) HVR-H1 (IYGAH (配列番号61));
 b) HVR-H2 (VIWAGGSTNYNSALMS (配列番号62)); および
 c) HVR-H3 (DGSSPYYYYSMEY (配列番号63); DGSSPYYYGMEY (配列番号67);
 ; DGSSPYYYYSMDY (配列番号68); DGSSPYYYYSMEV (配列番号69);
 または GSSPYYYGMDV (配列番号70))。

【0105】

一部の実施形態において、重鎖HVR配列は、次のものを含む：

10

【化5】

- a) HVR-H1 (SYAMS (配列番号88); DYYMY (配列番号89); または SSWMN (配列番号90));
 b) HVR-H2 (IISGGSYTYYSDSVKG (配列番号91); RIAPEDGDTEYAPKFQG (配列番号92); または QIYPGDDYTNYNGKFKG (配列番号93)); および
 c) HVR-H3 (HETAQAAWFAY (配列番号94); EGNYYGSSILDY (配列番号95);
 または LGPYGPFAD (配列番号96))。

【0106】

一部の実施形態において、重鎖FR配列は、次のものを含む：

20

【化6】

- a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (配列番号26);
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (配列番号27);
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS (配列番号28); または
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLT (配列番号29));
 b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (配列番号31); WVRQAPGKGLEWLG (配列番号32); WVRQAPGKGLEWLS (配列番号33); WVRQAPGKGLEWVG (配列番号34); WIRQPPGKGLEWIG (配列番号NO:35); または WVRQPPGKGLEWLG (配列番号36));
 c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (配列番号38);
 RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (配列番号39);
 RLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (配列番号40);
 RFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (配列番号41);
 RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (配列番号42); または
 RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (配列番号43)); および
 d) HC-FR4 (WGQGTITVTVSS (配列番号45); または WGQGTITVTVSS (配列番号46))。

30

40

【0107】

一部の実施形態において、軽鎖HVR配列は、次のものを含む：

【化7】

- a) HVR-L1 (SATSSVSYMH (配列番号64));
 b) HVR-L2 (STSNLAS (配列番号65)); および
 c) HVR-L3 (QQRSSYPFT (配列番号66); または QQRSSYPYT (配列番号71))。

【0108】

50

一部の実施形態において、軽鎖HVR配列は、次のものを含む：

【化8】

- a) HVR-L1 (SASSSVSYM (配列番号97); RASQDITNYLN (配列番号98); または SASSSVSYMY (配列番号99));
- b) HVR-L2 (DTSKLAY (配列番号100); FTSRLHS (配列番号101); または DTSSLAS (配列番号102)); および
- c) HVR-L3 (QQWSSNPPT (配列番号103); QQGNTLPWT (配列番号104); または QQWNSDPYT (配列番号105))。

10

【0109】

一部の実施形態において、軽鎖FR配列は、次のものを含む：

【化9】

- a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (配列番号48); または EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (配列番号49));
- b) LC-FR2 (WFQQKPGQAPRLLIY (配列番号51); WFQQKPGQAPRLWIY (配列番号52); または WYQQKPGQAPRLLIY (配列番号53));
- c) LC-FR3 (GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC (配列番号55); GVPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC (配列番号56); GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC (配列番号57); または GIPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC (配列番号58)); および
- d) LC-FR4 (FGPGTKLDIK (配列番号60))。

20

【0110】

一部の実施形態において、ヒトシグレック-8に特異的に結合する抗シグレック-8抗体(例えば、ヒト化抗シグレック-8抗体)であって、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であり、

(a)

- (1) 配列番号26~29から選択されるアミノ酸配列を含むHC-FR1、
- (2) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (3) 配列番号31~36から選択されるアミノ酸配列を含むHC-FR2、
- (4) 配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (5) 配列番号38~43から選択されるアミノ酸配列を含むHC-FR3、
- (6) 配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H3および
- (7) 配列番号45~46から選択されるアミノ酸配列を含むHC-FR4を含む重鎖可変ドメイン

30

および/または

(b)

- (1) 配列番号48~49から選択されるアミノ酸配列を含むLC-FR1、
- (2) 配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (3) 配列番号51~53から選択されるアミノ酸配列を含むLC-FR2、
- (4) 配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (5) 配列番号55~58から選択されるアミノ酸配列を含むLC-FR3、
- (6) 配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L3および
- (7) 配列番号60のアミノ酸配列を含むLC-FR4

40

を含む軽鎖可変ドメイン

を含む抗体が本明細書において提供される。

【0111】

一態様において、配列番号2~10から選択される重鎖可変ドメインを含む、かつ/ま

50

たは配列番号16～22から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号2～10から選択される重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号23もしくは24から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号11～14から選択される重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号16～22から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号11～14から選択される重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号23もしくは24から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号6の重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号16もしくは21から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。

10

【0112】

一態様において、配列番号106～108から選択される重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号109～111から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号106の重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号109の軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号107の重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号110の軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一態様において、配列番号108の重鎖可変ドメインを含む、かつ/または配列番号111の軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。

20

【0113】

一部の実施形態において、配列番号2～14から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、配列番号106～108から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入または欠失を含有するが、このアミノ酸配列を含む抗体は、ヒトシグレック-8に結合する能力を保持する。一部の実施形態において、置換、挿入または欠失(例えば、1、2、3、4または5アミノ酸)は、HVRの外側の領域(すなわち、FR)において生じる。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、配列番号106～108から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

30

【0114】

一部の実施形態において、配列番号16～24から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、配列番号109～111から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック-8抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入または欠失を含有するが、このアミノ酸配列を含む抗体は、ヒトシグレック-8に結合する能力を保持する。一部の実施形態において、置換、挿入または欠失(例えば、1、2、3、4または5アミノ酸)は、HVRの外側の領域(すなわち、FR)におい

40

50

て生じる。一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 16 または 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 109 ~ 111 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0115】

一部の実施形態において、図 1 または図 3 に表される重鎖可変ドメインを含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。

【0116】

一部の実施形態において、図 2 または図 3 に表される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。

10

【0117】

一態様において、本発明は、(a) 図 1 もしくは図 3 に示す V_H H_VR から選択される 1、2 もしくは 3 個の V_H H_VR および / または (b) 図 2 もしくは図 3 に示す V_L H_VR から選択される 1、2 もしくは 3 個の V_L H_VR を含む抗シグレック - 8 抗体を提供する。一態様において、本発明は、図 1 または図 3 に示す重鎖可変ドメインから選択される重鎖可変ドメインおよび、図 2 または図 3 に示す軽鎖可変ドメインから選択される軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック - 8 抗体を提供する。

【0118】

一部の実施形態において、表 3 に示す抗体、例えば、HAKA 抗体、HAKB 抗体、HAKC 抗体等の重鎖可変ドメインおよび / または軽鎖可変ドメインを含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。

20

【0119】

それぞれ、 κ 、 λ および μ と命名された重鎖を有する 5 クラスの免疫グロブリン : I g A、I g D、I g E、I g G および I g M が存在する。および κ クラスは、サブクラスにさらに分けられ、例えば、ヒトは、次のサブクラスを発現する : 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。I g G 1 抗体は、アロタイプと命名される複数の多型パリアントで存在することができ (Jefferys および Lefranc 2009 年、mAbs 1 巻、4 号 1 ~ 7 頁において概説)、そのうちいずれかが、本明細書における実施形態の一部における使用に適する。ヒト集団における共通アロタイプパリアントは、文字 a、f、n、z またはこれらの組合せによって命名されるパリアントである。本明細書における実施形態のいずれかにおいて、抗体は、ヒト I g G Fc 領域を含む重鎖 Fc 領域を含むことができる。さらなる実施形態において、ヒト I g G Fc 領域は、ヒト I g G 1 または I g G 4 を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、アミノ酸置換 S228P を含み、このアミノ酸残基は、Kabatah における通りの E_U インデックスに従ってナンバリングされる。一部の実施形態において、ヒト I g G 1 は、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヒト I g G 4 は、配列番号 79 のアミノ酸配列を含む。

30

【0120】

一部の実施形態において、配列番号 75 のアミノ酸配列を含む重鎖、および / または配列番号 76 もしくは 77 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗シグレック - 8 抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体は、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む重鎖、および / または配列番号 76 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、肥満細胞を枯渇させ、肥満細胞活性化を阻害する。一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、活性化された好酸球を枯渇させ、肥満細胞活性化を阻害する。

40

【0121】

1. 抗体親和性

一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、マウス抗体 2E2 および / またはマウス抗体 2C4 と比較した場合に、ほぼ同じもしくはより高い親和性および / またはより高いアビディティでヒトシグレック - 8 に結合する。ある特定

50

の実施形態において、本明細書に提供される抗シグレック - 8 抗体は、 $1 \mu\text{M}$ 、 150 nM 、 100 nM 、 50 nM 、 10 nM 、 1 nM 、 0.1 nM 、 0.01 nM または 0.001 nM (例えば、 10^{-8} M またはそれに満たない、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。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、マウス抗体 2E2 および / またはマウス抗体 2C4 よりも約 1.5 倍、約 2 倍、約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍または約 10 倍高い親和性で、ヒトシグレック - 8 に結合する。本明細書における一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または配列番号 16 もしくは 21 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0122】

一実施形態において、抗シグレック - 8 抗体の結合親和性は、表面プラズモン共鳴アッセイにより決定することができる。例えば、 K_d または K_d 値は、固定化された抗原 CM5 チップにより約 10 の応答単位 (RU) で 25 にて BIAcore (商標) - 2000 または BIAcore (商標) - 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) を使用することにより測定することができる。簡潔に説明すると、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、BIAcore (登録商標) Inc.) は、供給元の説明書に従って 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) により活性化される。捕捉抗体 (例えば、抗ヒト-Fc) は、 10 mM 酢酸ナトリウム、 $\text{pH} 4.8$ で希釈され、その後、流速 $30 \mu\text{l}/\text{分}$ で注射し、抗シグレック - 8 抗体でさらに固定化する。動態測定のため、二量体シグレック - 8 の 2 倍系列希釈を、 0.05% Tween 20 含有 PBS (PBST) において 25、流速およそ $25 \mu\text{l}/\text{分}$ で注射する。会合および解離センサーグラムを同時に適合することにより、単純 1 対 1 ラングミュア結合モデル (BIAcore (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン 3.2) を使用して、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) は、比 k_{off}/k_{on} として計算する。例えば、Chen, Y.ら (1999年) J. Mol. Biol. 293 巻: 865 ~ 881 頁を参照されたい。

20

【0123】

別の実施形態において、バイオレイヤーインターフェロメトリーを使用して、シグレック - 8 に対する抗シグレック - 8 抗体の親和性を決定することができる。例示的なアッセイにおいて、シグレック - 8 - Fc タグ付けタンパク質は、抗ヒト捕捉センサー上に固定化され、増加濃度のマウス、キメラまたはヒト化抗シグレック - 8 Fab 断片と共にインキュベートされて、例えば、Octet Red 384 System (Forte Bio) 等の機器を使用して親和性測定値を得る。

30

【0124】

抗シグレック - 8 抗体の結合親和性は、例えば、関連技術分野において周知の標準技法を使用して、Munsonら、Anal. Biochem., 107 巻: 220 頁 (1980年) に記載されている Scatchard 解析によって決定することもできる。Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 巻: 660 頁 (1947年) も参照されたい。

40

【0125】

2. 抗体アビディティ

一実施形態において、抗シグレック - 8 抗体の結合アビディティは、表面プラズモン共鳴アッセイにより決定することができる。例えば、 K_d または K_d 値は、BIAcore T100 を使用することにより測定することができる。捕捉抗体 (例えば、ヤギ-抗ヒト-Fc およびヤギ-抗マウス-Fc) は、CM5 チップ上に固定化される。フローセルは、抗ヒトまたは抗マウス抗体により固定化することができる。ある温度および流速、例えば、25、流速 $30 \mu\text{l}/\text{分}$ でアッセイを行う。二量体シグレック - 8 は、アッセイバッファーにおいて様々な濃度で、例えば、 $15 \text{ nM} \sim 1.88 \text{ pM}$ に及ぶ濃度で希釈

50

する。抗体を捕捉し、高速注射、続いて解離を行う。バッファー、例えば、50 mM グリシン pH 1.5 でフローセルを再生する。空の参照セルおよび複数のアッセイバッファー注射により結果をブランク作成し、1:1 グローバルフィットパラメータにより解析する。

【0126】

3. 競合アッセイ

競合アッセイを使用して、2種の抗体が、同一もしくは立体的に重複するエピトープを認識することにより、同じエピトープに結合するか、または一方の抗体が、抗原への別の抗体の結合を競合的に阻害するか決定することができる。このようなアッセイは、本技術分野で公知である。典型的には、抗原または抗原発現細胞が、マルチウェルプレートに固定化され、標識抗体の結合を遮断する非標識抗体の能力が測定される。斯かる競合アッセイに一般的な標識は、放射性標識または酵素標識である。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、細胞（例えば、好酸球）の細胞表面に存在するエピトープへの結合に関して、本明細書に記載されている2E2抗体と競合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、細胞（例えば、好酸球）の細胞表面に存在するエピトープへの結合に関して、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、細胞（例えば、好酸球）の細胞表面に存在するエピトープへの結合に関して、本明細書に記載されている2C4抗体と競合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、細胞（例えば、好酸球）の細胞表面に存在するエピトープへの結合に関して、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（米国特許第8,207,305号に見出されるものと同様に）および配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（米国特許第8,207,305号に見出されるものと同様に）を含む抗体と競合する。

10

20

【0127】

4. 熱的安定性

一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8は、熱シフトアッセイにおいて少なくとも約70、少なくとも約71または少なくとも約72の融解温度（ T_m ）を有する。例示的な熱シフトアッセイにおいて、ヒト化抗シグレック-8抗体を含む試料を、qPCRサーマルサイクラーにおいて1サイクル毎に1増加させつつ71サイクルにわたり蛍光色素（Sypro Orange）と共にインキュベートして、 T_m を決定する。本明細書における一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、マウス2E2抗体および/またはマウス2C4抗体と比較した場合に、同様のまたはより高い T_m を有する。本明細書における一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または配列番号16もしくは21から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、キメラ2C4抗体と比較した場合に同じまたはより高い T_m を有する。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、配列番号84のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と比較した場合に同じまたはより高い T_m を有する。

30

40

【0128】

5. 生物学的活性アッセイ

一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8は、好酸球のアポトーシスを誘導する。一部の他の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8は、肥満細胞を枯渇させる。細胞のアポトーシスを評価するためのアッセイは、本技術分野において周知であり、例えば、アネキシンVによる染色およびTUNNELアッセイが挙げられる。例示的な細胞アポトーシスアッセイにおいて、血液試料由来の新鮮パフィーコート培地を再懸濁し、96ウェルU字底プレートで平板培養する。抗シグレック-8抗体の一連の系列5倍希釈を各ウェルに添加し、このプレートを37、5%CO₂で

50

4時間より長くインキュベートする。PBSに希釈したパラホルムアルデヒドで細胞を固定し、顕微鏡を使用した検出のための好酸球に特異的なコンジュゲートされた抗体で染色する。パフィーコートが抗シグレック-8抗体の存在下でインキュベートされないときと比較した場合に、パフィーコートが抗シグレック-8抗体の存在下でインキュベートされたときの総末梢血白血球における好酸球集団を評価する。別の例示的なアッセイにおいて、血液試料から精製された好酸球（例えば、Miltenyi好酸球単離キット）を培地に再懸濁し、IL-5の存在または非存在下で一晩培養する。培養した好酸球をその後、遠心分離によって収集し、培地に再懸濁し、96ウェルU字底プレートで平板培養する。抗シグレック-8抗体の一連の系列5倍希釈を各ウェルに添加し、このプレートを37、5%CO₂で4時間より長くインキュベートする。本技術分野において周知の標準技法を使用して細胞を固定し、アネキシン-Vで染色し、顕微鏡を使用して好酸球の数を検出する。精製された細胞が抗シグレック-8抗体の存在下でインキュベートされないときと比較した場合に、精製された細胞が抗シグレック-8抗体の存在下でインキュベートされたときの試料における好酸球集団を評価する。

【0129】

一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、ADCC活性を誘導する。一部の他の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、ADCC活性によりシグレック-8を発現する肥満細胞を死滅させる。一部の実施形態において、組成物は、非フコシル化（すなわち、アフコシル化（afucosylated））抗シグレック-8抗体を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されている非フコシル化抗シグレック-8抗体を含む組成物は、部分的にフコシル化された抗シグレック-8抗体を含む組成物と比較した場合に、ADCC活性を増強する。ADCC活性を評価するためのアッセイは、本技術分野において周知であり、本明細書に記載されている。例示的なアッセイにおいて、ADCC活性を測定するために、エフェクター細胞および標的細胞が使用される。エフェクター細胞の例として、ナチュラルキラー（NK）細胞、大型顆粒リンパ球（LGL）、リンホカイン活性化キラー（LAK）細胞ならびにNKおよびLGLを含むPBMC、または好中球、好酸球およびマクロファージ等、細胞表面にFc受容体を有する白血球が挙げられる。標的細胞は、評価しようとする抗体が認識できる抗原を細胞表面に発現するいずれかの細胞である。斯かる標的細胞の例は、細胞表面にシグレック-8を発現する好酸球である。斯かる標的細胞の別の例は、細胞表面にシグレック-8を発現する肥満細胞である。標的細胞は、細胞溶解の検出を可能にする試薬で標識される。標識のための試薬の例として、クロム酸ナトリウム（Na₂⁵¹CrO₄）等、放射性物質が挙げられる。例えば、Immunology、14巻、181頁（1968年）；J. Immunol. Methods、172巻、227頁（1994年）；およびJ. Immunol. Methods、184巻、29頁（1995年）を参照されたい。

【0130】

一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体は、肥満細胞媒介性活性を阻害する。肥満細胞トリプターゼは、総肥満細胞数および活性化のバイオマーカーとして使用されてきた。例えば、血液または尿中の総および活性トリプターゼならびにヒスタミン、N-メチルヒスタミンおよび11-ベータ-プロスタグランジンF₂を測定して、肥満細胞の低下を評価することができる。例えば、例示的な肥満細胞活性アッセイに関して、米国特許出願公開第20110293631号を参照されたい。本明細書における実施例2に記載されているアッセイを使用して、肥満細胞における抗シグレック-8抗体のADCCおよびアポトーシス活性を評価することもできる。

【0131】

6. 融合タンパク質結合アッセイ

融合タンパク質による結合アッセイを使用して、抗体によって認識されるエピトープを決定することができる。エピトープマッピングのために融合タンパク質を使用したアッセイは、本技術分野で公知である。例えば、ヒトIg-Fcに融合されたシグレック-8タ

ンパク質の部分を含む融合タンパク質を、マルチウェルプレートに固定化し、融合タンパク質に結合する抗体の能力を測定する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 115 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質に結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 116 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質に結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 117 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質に結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、配列番号 118 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質に結合する。

【0132】

III. 抗体調製

本明細書に記載されている抗体は、抗体を作製するための本技術分野において利用できる技法を使用して調製されるが、そのうち例示的な方法について次のセクションでより詳細に記載する。

【0133】

1. 抗体断片

本発明は、抗体断片を包含する。抗体断片は、酵素消化等の伝統的な手段または組換え技法によって作製することができる。ある特定の状況下で、全抗体ではなく抗体断片を使用する利点がある。ある特定の抗体断片の概説に関しては、Hudsonら(2003年) Nat. Med. 9巻: 129~134頁を参照されたい。

【0134】

抗体断片の産生のための様々な技法が開発された。伝統的には、このような断片は、インタクト抗体のタンパク質分解的消化により得られた(例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24巻: 107~117頁(1992年); およびBrennanら、Science、229巻: 81頁(1985年)を参照)。しかし、このような断片は現在、組換え宿主細胞によって直接的に産生することができる。Fab、FvおよびScFv抗体断片は全て、E. coliにおいて発現させ、それから分泌させることができ、よって、大量のこのような断片の手軽な産生を可能にする。抗体断片は、上述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SH断片をE. coliから直接的に回収し、化学的にカップリングして、F(ab')₂断片を形成することができる(Carterら、Bio/Technology 10巻: 163~167頁(1992年))。別のアプローチによると、F(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養物から直接的に単離することができる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含む、in vivo半減期が増加したFabおよびF(ab')₂断片が、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体断片の産生のための他の技法は、当業者には明らかとなる。ある特定の実施形態において、抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。WO93/16185; 米国特許第5,571,894号; および同第5,587,458号を参照されたい。FvおよびscFvは、定常領域を欠くインタクトな組み合わせ部位を有する唯一の種である; よって、これらは、in vivo使用における非特異的結合低下に適する可能性がある。scFv融合タンパク質を構築して、scFvのアミノまたはカルボキシ末端のいずれかにおけるエフェクタータンパク質の融合体を生じることができる。Antibody Engineering、Borrebaeck編(上掲)を参照されたい。例えば抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されている「線状抗体」となることもできる。斯かる線状抗体は、単一特異性または二重特異性となり得る。

【0135】

2. ヒト化抗体

本発明は、ヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が、本技術分野で公知である。例えば、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から導入された1個または複

10

20

30

40

50

数のアミノ酸残基を有することができる。このような非ヒトアミノ酸残基は多くの場合、「移入」残基と称され、これは典型的には、「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は基本的に、高頻度可変領域配列をヒト抗体の相当する配列の代わりに置換することにより、Winterの方法に従って行うことができる(Jonesら(1986年)Nature 321巻:522~525頁; Riechmannら(1988年)Nature 332巻:323~327頁; Verhoeyenら(1988年)Science 239巻:1534~1536頁)。したがって、斯かる「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号)、インタクトなヒト可変ドメインに実質的に満たないものが、非ヒト種由来の相当する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的には、いくつかの高頻度可変領域残基およびおそらくいくつかのFR残基が、齧歯類抗体における類似性部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

【0136】

ヒト化抗体の作成において使用するべき軽および重両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性の低下に重要となり得る。いわゆる「ベストフィット(best-fit)」方法によると、齧歯類(例えば、マウス)抗体の可変ドメインの配列が、公知ヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対しクリーニングされる。続いて、齧歯類の配列に最も近縁のヒト配列が、ヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れられる(Simsら(1993年)J. Immunol. 151巻:2296頁; Chothiaら(1987年)J. Mol. Biol. 196巻:901頁)。別の方法は、軽または重鎖の特定のサブグループのあらゆるヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体に同じフレームワークを使用することができる(Carterら(1992年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89巻:4285頁; Prestaら(1993年)J. Immunol., 151巻:2623頁)。

【0137】

抗体が、抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持しつつヒト化されることがさらに一般に望ましい。この目標を達成するため、一方法に従って、ヒト化抗体は、親およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および様々な概念的ヒト化産物の解析のプロセスにより調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、一般的に利用でき、当業者には馴染み深い。選択された候補免疫グロブリン配列の可能な三次元立体構造を図解および表示するコンピュータプログラムを利用できる。このような表示の点検は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性の高い役割の解析、すなわち、その抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を与える残基の解析を可能にする。このようにして、標的抗原(複数可)に対する親和性増加等、所望の抗体特徴が達成できるように、レシピエントおよび移入配列からFR残基を選択し、組み合わせることができる。一般に、高頻度可変領域残基は、直接的におよび最も実質的に、抗原結合への影響に関与する。

【0138】

3. ヒト抗体

本発明のヒト抗シグレック-8抗体は、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るFvクローン可変ドメイン配列(複数可)と公知ヒト定常ドメイン配列(複数可)を組み合わせることにより構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗シグレック-8抗体は、ハイブリドーマ方法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒトミエロマおよびマウス-ヒトヘテロミエロマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol., 133巻:3001頁(1984年); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51~63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987年); および Boernerら, J. Immunol., 147巻:86頁(1991年)によって記載されている。

【0139】

免疫化により、内在性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域（JH）遺伝子のホモ接合型欠失が、内在性抗体産生の完全阻害をもたらすことが記載されている。斯かる生殖系列変異体マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移行は、抗原負荷によるヒト抗体の産生をもたらすであろう。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：2551頁（1993年）；Jakobovitsら、Nature、362巻：255頁（1993年）；Bruggemannら、Year in Immunol.、7巻：33頁（1993年）を参照されたい。

10

【0140】

遺伝子シャッフリングを使用して、非ヒト（例えば、齧歯類）抗体からヒト抗体を得ることもでき、このヒト抗体は、出発非ヒト抗体と同様の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法に従い、本明細書に記載されているファージディスプレイ技法によって得られる非ヒト抗体断片の重または軽鎖可変領域のいずれかを、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置き換え、非ヒト鎖/ヒト鎖scFvまたはFabキメラの集団を作り出す。抗原による選択は、非ヒト鎖/ヒト鎖キメラscFvまたはFabの単離をもたらす、ヒト鎖は、一次ファージディスプレイクローンにおける相当する非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を修復する、すなわち、エピトープは、ヒト鎖パートナーの選択を支配する。残存非ヒト鎖を置き換えるために、このプロセスを反復すると、ヒト抗体が得られる（PCT WO93/06213、1993年4月1日発表を参照）。CDRグラフトによる非ヒト抗体の伝統的なヒト化とは異なり、この技法は、非ヒト起源のFRまたはCDR残基を持たない完全なヒト抗体を提供する。

20

【0141】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2種の異なる抗原に対し結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の形態において、二重特異性抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。ある特定の形態において、結合特異性のうち一方は、シグレック-8に対するものであり、他方は、他のいずれかの抗原に向けられている。ある特定の形態において、二重特異性抗体は、シグレック-8の2種の異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体を使用して、シグレック-8を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を局在化させることもできる。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製することができる。

30

【0142】

二重特異性抗体を作成するための方法は、本技術分野で公知である。MilsteinおよびCuello、Nature、305巻：537頁（1983年）、WO93/08829、1993年5月13日発表およびTrauneckerら、EMBO J.、10巻：3655頁（1991年）を参照されたい。二重特異性抗体作製のさらなる詳細に関しては、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology、121巻：210頁（1986年）を参照されたい。二重特異性抗体は、架橋されたまたは「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体の一方は、アビジンにカップリングすることができ、他方はビオチンにカップリングすることができる。ヘテロコンジュゲート抗体は、いずれか簡便な架橋方法を使用して作成することができる。適した架橋剤は、本技術分野において周知であり、多数の架橋技法と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

40

【0143】

5. シングルドメイン抗体

一部の形態において、本発明の抗体は、シングルドメイン抗体である。シングルド

50

メイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全体もしくは部分または軽鎖可変ドメインの全体もしくは部分を含む単一のポリペプチド (poly peptide) 鎖である。ある特定の実施形態において、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 例えば、米国特許第 6, 248, 516 (B1) 号を参照)。一実施形態において、シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全体または部分からなる。

【0144】

6. 抗体バリエーション

一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗体のアミノ酸配列修飾 (複数可) が企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましくなり得る。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な変化を導入することにより、あるいはペプチド合成により調製することができる。斯かる修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失および/またはそれへの挿入および/またはその置換を含む。欠失、挿入および置換のいずれかの組合せを為して、最終構築物に到達することができるが、この最終構築物が、所望の特徴を保有することを条件とする。アミノ酸変更は、配列が作成されるときに対象抗体アミノ酸配列に導入することができる。

10

【0145】

変異誘発に好まれる位置である、抗体のある特定の残基または領域の同定に有用な方法は、CunninghamおよびWells (1989年) Science, 244巻: 1081~1085頁によって記載されている「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。それによると、残基または標的残基の群が同定され (例えば、arg, asp, his, lysおよびglu等、荷電残基)、中性または負電荷アミノ酸 (例えば、アラニンまたはポリアラニン) によって置き換えられて、抗原とアミノ酸との相互作用に影響を与える。置換に対する機能的感受性を実証するこれらのアミノ酸位置は続いて、置換部位にまたはそれに代えてさらに別のまたは他のバリエーションを導入することにより精緻化される。よって、アミノ酸配列変種を導入するための部位は既定であるが、変異の性質それ自体は既定である必要はない。例えば、所定の部位における変異の性能を解析するために、alaスキャニングまたはランダム変異誘発が、標的コドンまたは領域において行われ、発現された免疫グロブリンが、所望の活性に関してスクリーニングされる。

20

30

【0146】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100またはそれを超える残基を含有するポリペプチドの長さおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例として、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入バリエーションは、抗体の血清半減期を増加させる酵素またはポリペプチドへの抗体のNまたはC末端の融合を含む。

【0147】

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変更される。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の付着を指す。トリペプチド配列、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン (式中、Xは、プロリンを除くいずれかのアミノ酸である) は、アスパラギン側鎖への糖質部分の酵素による付着の認識配列である。よって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的グリコシル化部位を生じる。O結合型グリコシル化は、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンを使用してもよいが、最も一般的にはセリンまたはスレオニンであるヒドロキシアミノ酸への糖、N-アセチルガラクトサミン (acetyl galactosamine)、ガラクトースまたはキシロースのうち1種の付着を指す。

40

【0148】

抗体に対するグリコシル化部位の付加または欠失は、上述のトリペプチド配列 (N結合

50

型グリコシル化部位のための)のうち1種または複数が作出または除去されるように、アミノ酸配列を変更することにより簡便に達成される。変更は、本来の抗体の配列に対する1個または複数のセリンまたはスレオニン残基の付加、欠失または置換によって為すこともできる(O結合型グリコシル化部位のため)。

【0149】

抗体が、Fc領域を含む場合、それに付着した糖質を変更することができる。例えば、抗体のFc領域に付着したフコースを欠如する、成熟糖質構造を有する抗体が、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.)に記載されている。US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)も参照されたい。抗体のFc領域に付着した糖質において二分(bisecting) N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を有する抗体は、WO2003/011878、Jean-Mairetらおよび米国特許第6,602,684号、Umanaらにおいて参照される。抗体のFc領域に付着したオリゴ糖において少なくとも1個のガラクトース残基を有する抗体は、WO1997/30087、Patelらに報告されている。そのFc領域に付着した変更された糖質を有する抗体に関して、WO1998/58964(Raju, S.)およびWO1999/22764(Raju, S.)も参照されたい。修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子に関して、US2005/0123546(Umanaら)も参照されたい。

【0150】

ある特定の実施形態において、グリコシル化バリエーションは、Fc領域に付着した糖質構造が、フコースを欠如するまたは低下したフコースを有するFc領域を含む。斯かるバリエーションは、改善されたADCC機能を有する。任意選択で、Fc領域は、ADCCをさらに改善する1個または複数のアミノ酸置換をそこにさらに含み、例えば、Fc領域の298、333および/または334位(残基のEuナンバリング)における置換が挙げられる。「脱フコシル化(defucosylated)」または「フコース欠損」抗体に関する刊行物の例として: US2003/0157108; WO2000/61739; WO2001/29246; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; WO2003/085119; WO2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; Okazakiら、J. Mol. Biol. 336巻: 1239~1249頁(2004年); Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87巻: 614頁(2004年)が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコシル化を欠損するLec13 CHO細胞(Ripkaら、Arch. Biochem. Biophys. 249巻: 533~545頁(1986年)); 米国特許出願公開第2003/0157108(A1)号、Presta, L.; およびWO2004/056312(A1)、Adamsら、特に、実施例11)と、アルファ-1,6-フコシル基転移酵素遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87巻: 614頁(2004年))等のノックアウト細胞株と、1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III(GnT-III)およびゴルジμ-マンノシダーゼII(ManII)を過剰発現する細胞が挙げられる。

【0151】

野生型CHO細胞において産生された同じ抗体におけるフコースの量と比べて低下したフコースを有する抗体が、本明細書において企図される。例えば、抗体は、ネイティブCHO細胞(例えば、ネイティブFUT8遺伝子を含むCHO細胞等、ネイティブグリコシル化パターンを産生するCHO細胞)によって産生された場合よりも少量のフコースを有する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗シグレック-8抗体は、そのN結合型グリカンの約50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満がフコースを含む抗体である。ある特定の実施形態において、本明細書におい

10

20

30

40

50

て提供される抗シグレック - 8 抗体は、その N 結合型グリカンのいずれもフコースを含まない抗体である、すなわち、抗体は、完全にフコースを含有しない、またはフコースを持たない、またはフコシル化されていない、またはアフコシル化されている。フコースの量は、例えば W O 2 0 0 8 / 0 7 7 5 4 6 に記載されている M A L D I - T O F 質量分析によって測定される、A s n 2 9 7 に付着したあらゆる糖構造の和と比べて（例えば、複合的、ハイブリッドおよび高マンノース構造）、A s n 2 9 7 における糖鎖内のフコースの平均量を計算することにより決定することができる。A s n 2 9 7 は、F c 領域における約 2 9 7 位に位置するアスパラギン残基を指す（F c 領域残基の E u ナンバリング）；しかし、A s n 2 9 7 は、抗体における軽微な配列変種により、2 9 7 位の約 ± 3 アミノ酸上流または下流に、すなわち、2 9 4 ~ 3 0 0 位の間に位置することもできる。一部の実施形態において、抗体の重鎖の少なくとも 1 または 2 つは、フコシル化されていない。

10

【 0 1 5 2 】

一実施形態において、抗体は、その血清半減期を改善するように変更される。抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第 5 , 7 3 9 , 2 7 7 号に記載されている通り、サルベージ受容体結合エピトープを抗体（特に、抗体断片）に取り込ませることができる。本明細書において、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、I g G 分子の *i n v i v o* 血清半減期の増加の原因となる、I g G 分子（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4）の F c 領域のエピトープを指す（U S 2 0 0 3 / 0 1 9 0 3 1 1、米国特許第 6 , 8 2 1 , 5 0 5 号；米国特許第 6 , 1 6 5 , 7 4 5 号；米国特許第 5 , 6 2 4 , 8 2 1 号；米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 6 0 号；米国特許第 6 , 1 6 5 , 7 4 5 号；米国特許第 5 , 8 3 4 , 5 9 7 号）。

20

【 0 1 5 3 】

別の種類のバリエーションは、アミノ酸置換バリエーションである。このようなバリエーションは、異なる残基によって置き換えられた少なくとも 1 個のアミノ酸残基を抗体分子に有する。置換変異誘発のための目的の部位は、高頻度可変領域を含むが、F R 変更も企図される。保存的置換は、表 1 の見出し「好まれる置換」に示す。斯かる置換が、生物学的活性に望ましい変化をもたらす場合、表 1 において「例示的な置換」と命名される、またはアミノ酸クラスを参照しつつさらに後述する、より実質的な変化を導入し、その産物をスクリーニングすることができる。

【表 1】

表 1.

本来の残基	例示的な置換	好まれる置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

【 0 1 5 4 】

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、(a) 例えば、シートもしくはヘリックス立体構造としての、置換の区域におけるポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の嵩の維持におけるその効果が有意に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger、Biochemistry、第2版、73~75頁、Worth Publishers、New York (1975年)):

30

(1) 非極性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 無電荷極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)

40

【 0 1 5 5 】

あるいは、天然起源の残基は、共通側鎖特性に基づき群に分けることができる:

(1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

(2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

(3) 酸性: Asp、Glu;

(4) 塩基性: His、Lys、Arg;

(5) 鎖の配向性に影響を与える残基: Gly、Pro;

(6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

【 0 1 5 6 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちあるクラスから別のクラスへのメンバーの交換

50

を必要とするであろう。斯かる置換された残基は、保存的置換部位または残存（非保存）部位へと導入することもできる。

【0157】

1種類の置換バリエーションは、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）のうち1個または複数の高頻度可変領域残基の置換に關与する。一般に、さらなる開発のために選択されるその結果得られたバリエーション（複数可）は、これを作製する元になった親抗体と比べて修飾された（例えば、改善された）生物学的特性を有するであろう。斯かる置換バリエーションを作製するための簡便な仕方は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟化に關与する。簡潔に説明すると、いくつかの高頻度可変領域部位（例えば、6～7部位）を変異させて、各部位にあらゆる可能なアミノ酸置換を作製する。このように作製された抗体は、各粒子内にパッケージされたファージコートタンパク質（例えば、M13の遺伝子II産物）の少なくとも一部への融合体として繊維状ファージ粒子からディスプレイされる。次に、ファージディスプレイされたバリエーションは、その生物学的活性（例えば、結合親和性）に關してスクリーニングされる。修飾のための候補高頻度可変領域部位を同定するために、スクリーニング変異誘発（例えば、アラニンスクリーニング）を行って、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。その代わりにまたはその上、抗原-抗体複合体の結晶構造を解析して、抗体および抗原の間の接触点を同定することが有益となり得る。斯かる接触残基および隣接する残基は、本明細書に詳述されている技法を含む、本技術分野で公知の技法に従った置換の候補である。斯かるバリエーションが作製されたら、バリエーションのパネルを、本明細書に記載されている技法を含む本技術分野で公知の技法を使用したスクリーニングに付し、1種または複数の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体をさらなる開発のために選択することができる。

10

20

【0158】

抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、本技術分野で公知の種々の方法によって調製される。このような方法として、天然供給源からの単離（天然起源のアミノ酸配列バリエーションの場合）、または先に調製されたバリエーションもしくは非バリエーションの抗体のオリゴヌクレオチド媒介性（または部位特異的）変異誘発、PCR変異誘発およびカセット変異誘発による調製が挙げられるがこれらに限定されない。

【0159】

本発明の抗体のFc領域に1個または複数のアミノ酸修飾を導入し、これにより、Fc領域バリエーションを作製することが望ましくなり得る。Fc領域バリエーションは、ヒンジシステインの位置を含む1個または複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域）を含むことができる。一部の実施形態において、Fc領域バリエーションは、ヒトIgG4 Fc領域を含む。さらなる実施形態において、ヒトIgG4 Fc領域は、アミノ酸置換S228Pを含み、このアミノ酸残基は、Kabataにおける通りのEUインデックスに従ってナンバリングされる。

30

【0160】

本明細書および本技術分野が教示するところに従って、一部の実施形態において、本発明の抗体が、野生型カウンターパート抗体と比較して1個または複数の変更を、例えば、Fc領域に含むことができることが企図される。それにもかかわらず、このような抗体は、その野生型カウンターパートと比較した場合に、治療的有用性に必要とされる実質的に同じ特徴を保持するであろう。例えば、WO99/51642に記載されている通り、例えば、変更された（すなわち、改善または縮小された）C1q結合および/または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらすであろう、ある特定の変更をFc領域に為すことができることが考えられる。Fc領域バリエーションの他の例に關して、DuncanおよびWinter、Nature 322巻：738～40頁（1988年）；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびWO94/29351も参照されたい。WO00/42072（Presta）およびWO2004/056312（Lowman）は、FcRに対し改善または縮小された結合を有する抗体バリエーションにつ

40

50

いて記載する。これらの特許公報の内容は、特に参照により本明細書に組み入れられる。 Shieldsら、*J. Biol. Chem.* 9巻(2号): 6591~6604頁(2001年)も参照されたい。増加された半減期および胎児への母系IgGの移行の原因となる、新生児Fc受容体(FcRn)への改善された結合を有する抗体(Guyerraら、*J. Immunol.* 117巻: 587頁(1976年)およびKimら、*J. Immunol.* 24巻: 249頁(1994年))は、US2005/0014934A1(Hintonら)に記載されている。このような抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する、1個または複数の置換をその中に有するFc領域を含む。変更されたFc領域アミノ酸配列および増加または減少されたC1q結合能を有するポリペプチドバリアントは、米国特許第6,194,551B1号、WO99/51642に記載されている。これらの特許公報の内容は、特に参照により本明細書に組み入れられる。 Idusogieら、*J. Immunol.* 164巻: 4178~4184頁(2000年)も参照されたい。

10

【0161】

7. ベクター、宿主細胞および組換え方法

本発明の抗体の組換え産生のため、これをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング(DNAの増幅)または発現のために複製可能なベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは、従来手順を使用して(例えば、抗体の重および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)容易に単離および配列決定される。多くのベクターを利用できる。ベクターの選択は、一部には、使用するべき宿主細胞に依存する。一般に、宿主細胞は、原核生物または真核生物(一般には哺乳動物)起源のいずれかである。IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE定常領域を含むいかなるアイソタイプの定常領域をこの目的のために使用してもよく、いかなるヒトまたは動物種から斯かる定常領域を得てもよいことが認められよう。

20

【0162】

原核生物(Prokaryotic)宿主細胞を使用した抗体の作製:

a) ベクター構築

本発明の抗体のポリペプチド構成成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準組換え技法を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞等、抗体産生細胞から単離および配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機またはPCR技法を使用して合成することができる。得られた後に、ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主において異種ポリヌクレオチドを複製および発現することができる組換えベクターに挿入する。利用できる本技術分野で公知の多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主に、ベクターに挿入されるべき核酸のサイズおよびベクターで形質転換されるべき特定の宿主細胞に依存するであろう。各ベクターは、その機能(異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現またはその両方)およびこれが存する特定の宿主細胞との適合性に応じて様々な構成成分を含有する。ベクター構成成分として、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種核酸挿入物および転写終結配列が一般に挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【0163】

一般に、宿主細胞と適合性の種に由来するレプリコンおよび対照配列を含有するプラスミドベクターは、このような宿主に関連して使用される。ベクターは通常、複製部位と共に、形質転換細胞における表現型選択をもたらすことができるマーキング配列を保有する。例えば、*E. coli*は典型的に、*E. coli*種に由来するプラスミドであるpBR322を使用して形質転換される。pBR322は、アンピシリン(Amp)およびテトラサイクリン(Tet)抵抗性をコードする遺伝子を含有し、これにより、形質転換細胞を同定するための容易な手段を提供する。pBR322、その派生体または他の微生物プラスミドまたはバクテリオファージは、内在性タンパク質の発現のために微生物によって使用され得るプロモーターを含有することもできるまたは含有するように修飾することも

50

できる。特定の抗体の発現のために使用される p B R 3 2 2 派生体の例は、C a r t e r ら、米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 3 7 号に詳細に記載されている。

【 0 1 6 4 】

加えて、宿主微生物と適合性であるレプリコンおよび対照配列を含有するファージベクターは、このような宿主に関連した形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、G E M . T M . - 1 1 等、バクテリオファージは、E . c o l i L E 3 9 2 等、感受性宿主細胞の形質転換に使用することができる組換えベクターの作成において利用することができる。

【 0 1 6 5 】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成成分のそれぞれをコードする 2 個またはそれを超えるプロモーター - シストロンペアを含むことができる。プロモーターは、その発現をモジュレートするシストロンの上流 (5 ') に位置する非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、2 種のクラス、誘導性および構成的に分類される。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養素の存在もしくは非存在または温度変化に応答して、その制御下でシストロンの転写のレベル増加を惹起するプロモーターである。

【 0 1 6 6 】

種々の潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。制限酵素消化により供給源 DNA からプロモーターを除去し、本発明のベクターへと単離されたプロモーター配列を挿入することにより、選択されたプロモーターは、軽または重鎖をコードするシストロン DNA に作動可能に連結することができる。ネイティブプロモーター配列および多くの異種プロモーターの両方を使用して、標的遺伝子の増幅および / または発現を方向付けることができる。一部の実施形態において、一般に、ネイティブ標的ポリペプチドプロモーターと比較した場合に、より優れた転写および発現された標的遺伝子のより高い収率を可能にするため、異種プロモーターが利用される。

【 0 1 6 7 】

原核生物宿主による使用に適したプロモーターは、P h o A プロモーター、 - ガラクタマーゼ (g a l a c t a m a s e) およびラクトースプロモーター系、トリプトファン (t r p) プロモーター系ならびに t a c または t r c プロモーター等のハイブリッドプロモーターを含む。しかし、細菌において機能的な他のプロモーター (他の公知細菌またはファージプロモーター等) も同様に適する。これらのヌクレオチド配列は発表されているため、当業者であれば、いずれが必要とされる制限部位を供給するためのリンカーまたはアダプターを使用して、操作可能にこれらを標的の軽および重鎖をコードするシストロンにライゲーションすることができる (S i e b e n l i s t ら (1 9 8 0 年) C e l l 2 0 巻 : 2 6 9 頁) 。

【 0 1 6 8 】

本発明の一態様において、組換えベクター内の各シストロンは、発現されたポリペプチドの膜を越えた転座位置を方向付ける分泌シグナル配列構成成分を含む。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成成分となり得る、あるいはベクターに挿入される標的ポリペプチド DNA の一部となり得る。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞によって認識およびプロセッシングされる (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) 配列となるべきである。異種ポリペプチドにとってネイティブなシグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核生物宿主細胞のため、シグナル配列は、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、I p p または熱安定性エンテロトキシン I I (S T I I) リーダー、L a m B、P h o E、P e l B、O m p A および M B P からなる群から例えば選択される原核生物シグナル配列によって置換される。本発明の一実施形態において、発現系の両方のシストロンで使用されるシグナル配列は、S T I I シグナル配列またはそのバリエーションである。

【 0 1 6 9 】

別の態様において、本発明に係る免疫グロブリンの産生は、宿主細胞の細胞質において

10

20

30

40

50

起こることができ、したがって、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在を必要としない。これに関して、免疫グロブリン軽および重鎖は、細胞質内で発現され、フォールドされ、アセンブルされて、機能的免疫グロブリンを形成する。ある特定の宿主系統（例えば、*E. coli* trxB-系統）は、ジスルフィド結合形成に好ましい細胞質条件を提供し、これにより、発現されたタンパク質サブユニットの適切なフォールディングおよびアセンブリを可能にする。ProbaおよびPluckthun、Gene、159巻：203頁（1995年）。

【0170】

本発明の抗体は、分泌され適切にアセンブルされた本発明の抗体の収率を最大化するために、発現されたポリペプチド構成成分の定量的な比をモジュレートすることができる発現系を使用することにより産生することもできる。斯かるモジュレーションは、少なくとも一部には、ポリペプチド構成成分の翻訳強度を同時にモジュレートすることにより達成される。

10

【0171】

翻訳強度をモジュレートするための一技法は、Simmonsら、米国特許第5,840,523号に開示されている。これは、シストロン内の翻訳開始領域（TIR）のバリエーションを利用する。所定のTIRのため、一連のアミノ酸または核酸配列バリエーションを広範な翻訳強度で作製し、これにより、特異的な鎖の所望の発現レベルにこの因子を調整するための簡便な手段を提供することができる。TIRバリエーションは、アミノ酸配列を変更し得るコドン変化をもたらす従来の変異誘発技法によって作製することができる。ある特定の実施形態において、ヌクレオチド配列の変化は、サイレントである。TIRにおける変更は、例えば、シグナル配列における変更と共に、シャインダルガーノ配列の数またはスペーシングの変更を含むことができる。変異体シグナル配列を作製するための一方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変化させない（すなわち、変化がサイレントである）、コード配列の初めにおける「コドンバンク」の作製である。これは、各コドンの第3のヌクレオチド位置を変化させることにより達成することができる；その上、ロイシン、セリンおよびアルギニン等、一部のアミノ酸は、バンクの作成において複雑さを加えることができる複数の第1および第2の位置を有する。この変異誘発方法は、Yansuraら（1992年）METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4巻：151～158頁に詳細に記載されている。

20

30

【0172】

一実施形態において、ベクターのセットが、その中のシストロン毎に広範なTIR強度で作製される。この限定されたセットは、各鎖の発現レベルの比較と共に、様々なTIR強度組合せ下における所望の抗体産物の収率をもたらす。TIR強度は、Simmonsら、米国特許第5,840,523号に詳細に記載されている通り、レポーター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度比較に基づき、所望の個々のTIRが選択されて、本発明の発現ベクター構築物において組み合わせられる。

【0173】

本発明の抗体の発現に適した原核生物宿主細胞は、グラム陰性またはグラム陽性生物等、古細菌および真正細菌を含む。有用な細菌の例として、*Escherichia*（例えば、*E. coli*）、*Bacilli*（例えば、*B. subtilis*）、*Enterobacteria*、*Pseudomonas*種（例えば、*P. aeruginosa*）、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescans*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Shigella*、*Rhizobia*、*Vitreoscilla*または*Paracoccus*が挙げられる。一実施形態において、グラム陰性細胞が使用される。一実施形態において、*E. coli*細胞が、本発明のための宿主として使用される。*E. coli*系統の例として、系統W3110（Bachmann、Cellular and Molecular Biology、2巻（Washington, D.C.: American Society for Microbiology、1987年）、1190～1219頁；ATCC寄託番号27,3

40

50

25) および遺伝子型 W3110 fhuA(tonA)ptr3 lac Iq lacL8 ompT (nmpc-fepE)degP41 kanR を有する系統 33D3 を含むその派生体(米国特許第5,639,635号)が挙げられる。E. coli 294(ATCC31,446)、E. coli B、E. coli 1776(ATCC31,537)およびE. coli RV308(ATCC31,608)等、他の系統およびその派生体も適している。これらの例は、限定的ではなく説明的である。定義された遺伝子型を有する上述の細菌のうちいずれかの派生体を構築するための方法は、本技術分野で公知であり、例えば、Bassら、Proteins、8巻:309~314頁(1990年)に記載されている。細菌の細胞におけるレプリコンの複製能(replicability)を考慮に入れて適切な細菌を選択することが一般に必要である。pBR322、pBR325、pACYC177またはpKN410等、周知のプラスミドが、レプリコンの供給に使用される場合、例えば、E. coli、Serratia または Salmonella 種は、宿主として適切に使用することができる。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌するべきであり、望ましくは、追加的なプロテアーゼ阻害剤を細胞培養において取り込むことができる。

10

【0174】

b) 抗体産生

宿主細胞は、上述の発現ベクターで形質転換され、プロモーターを誘導するため、形質転換体を選択するため、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するための、必要に応じて修飾された従来の栄養培地において培養される。

20

【0175】

形質転換は、DNAが、染色体外エレメントとしてまたは染色体組み込み体により複製可能となるような、原核生物宿主へのDNAの導入を意味する。使用する宿主細胞に応じて、形質転換は、斯かる細胞に適切な標準技法を使用して行われる。塩化カルシウムを用いたカルシウム処理は、実質的な細胞壁障壁を含有する細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための別の方法は、ポリエチレングリコール/DMSOを用いる。使用されるさらに別の技法は、エレクトロポレーションである。

【0176】

本発明のポリペプチドの産生に使用される原核細胞は、本技術分野で公知の、選択された宿主細胞の培養に適した培地において育成される。適した培地の例として、ルリアプロス(LB)に必要な栄養素補充物質を加えたものが挙げられる。一部の実施形態において、培地は、発現ベクターの構築に基づき選ばれる選択用薬剤も含有して、この発現ベクターを含有する原核細胞の成長を選択的に可能にする。例えば、アンピシリン抵抗性遺伝子を発現する細胞の成長のために、培地にアンピシリンが添加される。

30

【0177】

炭素、窒素および無機リン酸塩源に加えていずれか必要な補充物質が、単独でまたは複合的窒素源等の別の補充物質もしくは培地との混合物として導入されて、適切な濃度で含まれていてもよい。任意選択で、培養培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリールおよびジチオスレイトリールからなる群から選択される1種または複数の還元剤を含有することができる。

40

【0178】

原核生物宿主細胞は、適した温度で培養される。ある特定の実施形態において、E. coliの成長のため、成長温度は、約20 から約39、約25 から約37 の範囲であるか、または約30 である。培地のpHは、主に宿主生物に応じて、約5~約9に及ぶいずれかのpHとなり得る。ある特定の実施形態において、E. coliのため、pHは、約6.8~約7.4または約7.0である。

【0179】

誘導性プロモーターが、本発明の発現ベクターにおいて使用される場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に適した条件下で誘導される。本発明の一態様において、PhoAプロモーターが、ポリペプチドの転写を制御するために使用される。したがって、

50

形質転換された宿主細胞は、誘導のためのリン酸塩制限培地において培養される。ある特定の実施形態において、リン酸塩制限培地は、C . R . A . P . 培地である（例えば、S i m m o n s ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s (2 0 0 2 年) 2 6 3 巻 : 1 3 3 ~ 1 4 7 頁を参照）。本技術分野で公知の通り、用いられているベクター構築物に従って、種々の他の誘導因子を使用することができる。

【0180】

一実施形態において、本発明の発現されたポリペプチドは、宿主細胞の周辺質に分泌され、そこから回収される。タンパク質回収は、典型的には、一般に、浸透圧ショック、超音波処理または溶解等の手段による微生物の崩壊に關与する。細胞が崩壊されたら、細胞デブリまたは細胞全体は、遠心分離または濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えば、親和性樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製することができる。あるいは、タンパク質は、培養培地へと輸送され、そこに単離されてもよい。細胞をこの培養物から除去し、産生されたタンパク質のさらなる精製のために培養上清を濾過および濃縮することができる。発現されたポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）およびウエスタンブロットアッセイ等、一般的に公知の方法を使用してさらに単離および同定することができる。

10

【0181】

本発明の一態様において、抗体産生は、発酵プロセスにより大量に行われる。様々な大規模フェドバッチ（fed-batch）発酵手順が、組換えタンパク質の産生のために利用できる。大規模発酵は、少なくとも1000リットルの容量、ある特定の実施形態において、約1,000~100,000リットルの容量を有する。このような発酵槽は、酸素および栄養素、特にグルコースを分布させるための攪拌機羽根車を使用する。小規模発酵は一般に、およそ100リットル以下の容積測定的容量の発酵槽における発酵を指し、約1リットル~約100リットルに及び得る。

20

【0182】

発酵プロセスにおいて、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が適した条件下で所望の密度、例えば、約180~220のOD550まで成長した後に惹起され、このステージにおいて、細胞は定常期初期にある。本技術分野で公知かつ上述の通り、用いられているベクター構築物に従って、種々の誘導因子を使用することができる。誘導に先立ちより短い期間、細胞を育成することができる。細胞は通常、約12~50時間誘導されるが、より長いまたはより短い誘導時間を使用してもよい。

30

【0183】

本発明のポリペプチドの産生収率および質を改善するために、様々な発酵条件を修飾することができる。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切なアセンブリおよびフォールディングを改善するために、Dsbタンパク質（DsbA、DsbB、DsbC、DsbDおよび/またはDsbG）またはFkpA（シャペロン活性を有するペプチジルプロリルc i s , t r a n s - イソメラーゼ）等、シャペロンタンパク質を過剰発現する追加的なベクターを使用して、宿主原核細胞を同時形質転換することができる。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞において産生された異種タンパク質の適切なフォールディングおよび溶解性を容易にすることが実証された。Chenら（1999年）J . B i o l . C h e m . 2 7 4 巻 : 1 9 6 0 1 ~ 1 9 6 0 5 頁 ; G e o r g i o u ら、米国特許第6,083,715号 ; G e o r g i o u ら、米国特許第6,027,888号 ; B o t h m a n n および P l u c k t h u n (2 0 0 0 年) J . B i o l . C h e m . 2 7 5 巻 : 1 7 1 0 0 ~ 1 7 1 0 5 頁 ; R a m m および P l u c k t h u n (2 0 0 0 年) J . B i o l . C h e m . 2 7 5 巻 : 1 7 1 0 6 ~ 1 7 1 1 3 頁 ; A r i e ら (2 0 0 1 年) M o l . M i c r o b i o l . 3 9 巻 : 1 9 9 ~ 2 1 0 頁。

40

【0184】

発現された異種タンパク質（特に、タンパク質分解に感受性のタンパク質）のタンパク質分解を最小化するために、タンパク質分解酵素を欠損したある特定の宿主系統を本発明のために使用することができる。例えば、宿主細胞系統を修飾して、プロテアーゼIII

50

、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVIおよびこれらの組合せ等、公知の細菌プロテアーゼをコードする遺伝子に遺伝的変異(複数可)を生じることができる。いくつかのE. coliプロテアーゼ欠損システムを利用することができ、例えば、Jolyら(1998年)(上掲); Georgiouら、米国特許第5,264,365号; Georgiouら、米国特許第5,508,192号; Haraら、Microbial Drug Resistance、2巻:63~72頁(1996年)に記載されている。

【0185】

一実施形態において、タンパク質分解酵素を欠損し、1種または複数のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドにより形質転換されたE. coli系統が、本発明の発現系における宿主細胞として使用される。

10

【0186】

c) 抗体精製

一実施形態において、本明細書における産生された抗体タンパク質は、さらに精製されて、さらなるアッセイおよび使用のために実質的に均一な調製物を得る。本技術分野で公知の標準タンパク質精製方法を用いることができる。次の手順は、適した精製手順に例示的である: 免疫親和性またはイオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、DEAE等、シリカまたはカチオン交換樹脂におけるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿および例えば、Sephadex G-75を使用したゲル濾過。

20

【0187】

一態様において、固相に固定化されたプロテインAが、本発明の抗体産物の免疫親和性精製のために使用される。プロテインAは、抗体のFc領域に高親和性で結合する、Staphylococcus aureus由来の41kDの細胞壁タンパク質である。Lindmarkら(1983年)J. Immunol. Meth. 62巻:1~13頁。プロテインAが固定化される固相は、ガラスもしくはシリカ表面を含むカラム、またはポア制御(controlled pore)ガラスカラムまたはケイ酸カラムであり得る。一部の適用において、カラムは、グリセロール等の試薬でコーティングされて、夾雑物の非特異的接着性を予防する可能性がある。

30

【0188】

精製の第1のステップとして、上述の細胞培養物に由来する調製物をプロテインA固定化固相にアプライして、プロテインAへの目的の抗体の特異的結合を可能にすることができる。続いて、固相を洗浄して、固相に非特異的に結合した夾雑物を除去する。最後に、溶出により固相から目的の抗体を回収する。

【0189】

真核生物宿主細胞を使用した抗体の作製:

真核生物宿主細胞における使用のためのベクターは一般に、次の非限定的構成成分のうち1種または複数を含む: シグナル配列、複製起点、1種または複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列。

40

【0190】

a) シグナル配列構成成分

真核生物宿主細胞における使用のためのベクターは、目的の成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的な切断部位を有する、シグナル配列または他のポリペプチドを含有することもできる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞により認識およびプロセシングされる(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)配列となり得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列およびウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。斯かる前駆体領域のためのDNAは、抗体をコードするDNAに読み取り枠でライゲーションされる。

【0191】

b) 複製起点

50

一般に、複製起点構成成分は、哺乳動物発現ベクターには必要とされない。例えば、SV40起点は、典型的には、初期プロモーターを含有するという理由でのみ使用することができる。

【0192】

c) 選択遺伝子構成成分

発現およびクローニングベクターは、選択可能マーカーとも命名される選択遺伝子を含有することができる。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリンに対する抵抗性を付与する、(b) 関連する場合、栄養要求性欠乏を補完する、または(c) 複合培地から得ることができない重大な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

10

【0193】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止させるための薬物を利用する。異種遺伝子による形質転換が成功した細胞は、薬物抵抗性を付与するタンパク質を産生し、これにより、この選択レジメンを生き残る。斯かる優性選択の例は、薬物、ネオマイシン、ニコフェノール酸およびハイグロマイシンを使用する。

【0194】

哺乳動物細胞に適した選択可能マーカーの別の例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-Iおよび-II、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等、抗体核酸を取り込む能力のある細胞の同定を可能にするマーカーである。

20

【0195】

例えば、一部の実施形態において、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞はまず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトレキセート(Mtx)を含有する培養培地において全形質転換体を培養することにより同定される。一部の実施形態において、野生型DHFRが用いられる場合に適切な宿主細胞は、DHFR活性を欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株である(例えば、ATCC CRL-9096)。

【0196】

あるいは、抗体、野生型DHFRタンパク質およびアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)等の別の選択可能マーカーをコードするDNA配列で形質転換または同時形質転換された宿主細胞(特に、内在性DHFRを含有する野生型宿主)は、アミノグリコシド系抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシンまたはG418等、この選択可能マーカーのための選択用薬剤を含有する培地における細胞成長により選択することができる。米国特許第4,965,199号を参照されたい。宿主細胞は、グルタミンシンターゼ(GS)を欠損した細胞株を含む、NS0、CHOK1、CHOK1SVまたは派生体を含むことができる。哺乳動物細胞のための選択可能マーカーとしてのGSの使用のための方法は、米国特許第5,122,464号および米国特許第5,891,693号に記載されている。

30

【0197】

d) プロモーター構成成分

発現およびクローニングベクターは通常、宿主生物によって認識され、目的のポリペプチド(例えば、抗体)をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含有する。プロモーター配列は、真核生物で公知である。例えば、実際ではあらゆる真核生物遺伝子は、転写が惹起される部位からおよそ25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から70~80塩基上流に見出された別の配列は、CNCAAT領域であり、Nは、いかなるヌクレオチドでもよい。大部分の真核生物遺伝子の3'端には、コード配列の3'端へのポリAテイルの付加のためのシグナルとなり得るAATAA配列がある。ある特定の実施形態において、これらの配列のいずれかまたは全てを、真核生物発現ベクターに適切に挿入することができる。

40

【0198】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘

50

ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2等）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびサルウイルス40（SV40）等、ウイルスのゲノムから、あるいは異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって制御される、ただし、斯かるプロモーターは、宿主細胞系と適合性であること。

【0199】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシパピローマウイルスを使用して哺乳動物宿主においてDNAを発現するための系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4,601,978号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト β -インターフェロングcDNAの発現について記載するReyesら、Nature 297巻：598~601頁（1982年）も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列をプロモーターとして使用することができる。

10

【0200】

e) エンハンサーエレメント構成成分

高等真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、多くの場合、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより増加される。多くのエンハンサー配列が、哺乳動物遺伝子（グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン）から現在公知である。しかし典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用されるであろう。例として、複製起点の後方（late side）（bp100~270）のSV40エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、マウスサイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後方のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサーエレメントについて記載するYaniv、Nature 297巻：17~18頁（1982年）も参照されたい。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列に対し5'位または3'位においてベクターにスプライスすることができるが、一般に、プロモーターから5'の部位に位置する。

20

30

【0201】

f) 転写終結構成成分

真核生物宿主細胞において使用される発現ベクターは、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列を含有することもできる。斯かる配列は、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'および場合により3'非翻訳領域から一般的に利用できる。このような領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分におけるポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。有用な転写終結構成成分の1種は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026およびそこに開示されている発現ベクターを参照されたい。

40

【0202】

g) 宿主細胞の選択および形質転換

本明細書におけるベクターにおけるDNAのクローニングまたは発現に適した宿主細胞は、脊椎動物宿主細胞を含む、本明細書に記載されている高等真核生物細胞を含む。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の繁殖は、ルーチン手順となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1系列（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚性腎臓系列（懸濁培養における育成のためにサブクローニングされた293または293細胞、Grahamら、J. Gen Virol . 36巻：59頁（1977年））；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-DHFR（CHO、Urlaubら

50

、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77巻：4216頁(1980年)；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather、Biol. Reprod. 23巻：243~251頁(1980年)；サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34)；バッファローラット(buffalo rat)肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065)；マウス乳房腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL 51)；TRI細胞(Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383巻：44~68頁(1982年))；MRC5細胞；FS4細胞；CHOK1細胞、CHOK1SV細胞または派生体およびヒトヘパトーマ系列(Hep G2)である。

10

【0203】

宿主細胞は、抗体産生のために上述の発現またはクローニングベクターにより形質転換され、プロモーターを誘導するため、形質転換体を選択するため、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、必要に応じて修飾された従来の栄養培地において培養される。

【0204】

h) 宿主細胞の培養

本発明の抗体の産生に使用される宿主細胞は、種々の培地において培養することができる。HamのF10(Sigma)、最小必須培地(MEM)、Sigma)、RPMI-1640(Sigma)およびダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、Sigma)等、市販の培地は、宿主細胞の培養に適する。加えて、Hamら、Meth. Enz. 58巻：44頁(1979年)、Barnesら、Anal. Biochem. 102巻：255頁(1980年)、米国特許第4,767,704号；同第4,657,866号；同第4,927,762号；同第4,560,655号；もしくは同第5,122,469号；WO90/03430；WO87/00195；または米国再発行特許(U.S. Pat. Re.)30,985に記載されている培地のいずれかを宿主細胞のための培養培地として使用することができる。これらの培地のいずれも、ホルモンおよび/または他の増殖因子(インスリン、トランスフェリンまたは上皮増殖因子等)、塩(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩等)、バッファー(HEPES等)、ヌクレオチド(アデノシンおよびチミジン等)、抗生物質(GENTAMYCIN(商標)薬物等)、微量元素(マイクロモル濃度範囲内の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義)ならびにグルコースまたは均等なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。他のいずれかの補充物質が、当業者に公知の適切な濃度で含まれていてもよい。温度、pHその他等、培養条件は、発現のために選択された宿主細胞により以前に使用された条件であり、当業者には明らかとなる。

20

30

【0205】

i) 抗体の精製

組換え技法を使用する場合、抗体は、細胞内に産生することができる、あるいは培地に直接的に分泌することができる。抗体が、細胞内に産生される場合、第1のステップとして、宿主細胞または溶解された断片のいずれかの粒子状デブリは、例えば、遠心分離または限外濾過により除去することができる。抗体が、培地に分泌される場合、斯かる発現系から得た上清は、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して先ず濃縮することができる。PMSF等、プロテアーゼ阻害剤が、タンパク質分解を阻害するために前述ステップのいずれかに含まれていてよく、抗生物質が、偶発的な夾雑物の成長を予防するために含まれていてよい。

40

【0206】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ

50

一、ゲル電気泳動、透析および親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、親和性クロマトグラフィーが、簡便な技法である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体に存在するいずれかの免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト 1、 2または 4重鎖に基づく抗体を精製することができる(Lindmarkら、J. Immunol. Methods 62巻: 1~13頁(1983年))。プロテインGは、全マウスアイソタイプおよびヒト 3に推奨される(Gussら、EMBO J. 5巻: 1567~1575頁(1986年))。親和性リガンドが付着するマトリックスは、アガロースであってよいが、他のマトリックスも利用できる。ポア制御ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等、機械的に安定的なマトリックスは、アガロースにより達成され得るものよりも速い流速およびより短い処理時間を可能にする。抗体が、CH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)が、精製に有用である。イオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカにおけるクロマトグラフィー、ヘパリンにおけるクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム等)におけるSEPHAROSE(商標)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿等、タンパク質精製のための他の技法も、回収しようとする抗体に応じて利用できる。

【0207】

いずれか予備的精製ステップ(複数可)の後に、目的の抗体および夾雑物を含む混合物は、例えば、低塩濃度(例えば、約0~0.25M塩)で行われる約2.5~4.5の間のpHの溶出バッファーを使用した低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーにより、さらなる精製に付すことができる。

【0208】

一般に、研究、検査および臨床用途における使用のための抗体を調製するための様々な方法論は、本技術分野において十分に確立されており、上述の方法論と一貫しており、および/または当業者によって特定の目的の抗体に適切であると考慮される。

【0209】

非フコシル化抗体の産生

フコシル化の程度が低下した抗体を調製するための方法が本明細書に提供されている。例えば、本明細書において企図される方法として、タンパク質フコシル化が欠損した細胞株の使用(例えば、Lec13 CHO細胞、アルファ-1,6-フコシル基転移酵素遺伝子ノックアウトCHO細胞、1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IIIを過剰発現する細胞およびゴルジμ-マンノシダーゼIIをさらに過剰発現する細胞等)および抗体の産生に使用される細胞培養培地におけるフコースアナログ(複数可)の添加が挙げられるがこれらに限定されない。Ripkaら、Arch. Biochem. Biophys. 249巻: 533~545頁(1986年);米国特許出願公開第2003/0157108(A1)号、Presta, L;WO2004/056312(A1);Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87巻: 614頁(2004年);および米国特許第8,574,907号を参照されたい。抗体のフコース含量を低下させるための追加的な技法は、米国特許出願公開第2012/0214975号に記載されているGlymaxx技術を含む。抗体のフコース含量を低下させるための追加的な技法は、抗体の産生に使用される細胞培養培地における1種または複数のグリコシダーゼ阻害剤の添加も含む。グリコシダーゼ阻害剤は、-グルコシダーゼI、-グルコシダーゼIIおよび-マンノシダーゼIを含む。一部の実施形態において、グリコシダーゼ阻害剤は、-マンノシダーゼIの阻害剤である(例えば、キフネンシン)。

【0210】

本明細書において、「コアのフコシル化」は、N結合型グリカンの還元末端におけるN-アセチルグルコサミン(「GlcNAc」)へのフコースの付加(「フコシル化」)を

指す。斯かる方法によって産生された抗体およびその組成物も提供される。

【0211】

一部の実施形態において、Fc領域（またはドメイン）に結合した複合N-グリコシド結合型糖鎖のフコシル化が低下される。本明細書において、「複合N-グリコシド結合型糖鎖」は、典型的に、アスパラギン297（Kababの番号に従う）に結合されるが、複合N-グリコシド結合型糖鎖は、他のアスパラギン残基に連結されてもよい。「複合N-グリコシド結合型糖鎖」は、コア構造の非還元末端にマンノースのみが取り込まれた高マンノース型の糖鎖を除外するが、1) コア構造の非還元末端側が、ガラクトース-N-アセチルグルコサミン（「Gal-GlcNAc」とも称される）の1個または複数の分枝を有し、Gal-GlcNAcの非還元末端側が、シアル酸、二分N-アセチルグルコサミンその他を任意選択で有する複合型；または2) コア構造の非還元末端側が、高マンノースN-グリコシド結合型糖鎖および複合N-グリコシド結合型糖鎖の両方の分枝を有するハイブリッド型を含む。

10

【0212】

一部の実施形態において、「複合N-グリコシド結合型糖鎖」は、コア構造の非還元末端側が、ガラクトース-N-アセチルグルコサミン（「Gal-GlcNAc」とも称される）の0、1個または複数の分枝を有し、Gal-GlcNAcの非還元末端側が、シアル酸、二分N-アセチルグルコサミンその他等の構造を任意選択でさらに有する複合型を含む。

20

【0213】

本方法によると、典型的には、ごく微量のフコースが、複合N-グリコシド結合型糖鎖（複数可）に取り込まれる。例えば、様々な実施形態において、組成物中、抗体の約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満または約1%未満が、フコースによりコアがフコシル化されている。一部の実施形態において、組成物中、抗体の実質的に全て（すなわち、約0.5%未満）が、フコースによりコアがフコシル化されていない。一部の実施形態において、組成物中、抗体の約40%超、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超または約99%超が、フコシル化されていない。

30

【0214】

一部の実施形態において、N-グリコシド結合型炭水化物鎖の実質的に全てが、フコース残基を含有しない（すなわち、約0.5%未満）抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態において、抗体重鎖の少なくとも1または2つがフコシル化されていない抗体が本明細書において提供される。

40

【0215】

上述の通り、種々の哺乳動物宿主-発現ベクター系を利用して、抗体を発現させることができる。一部の実施形態において、培養培地は、フコースを補充されない。一部の実施形態において、有効量のフコースアナログが、培養培地に添加される。この文脈において、「有効量」は、抗体の複合N-グリコシド結合型糖鎖へのフコース取り込みを、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%または少なくとも約50%減少させるのに十分なアナログの量を指す。一部の実施形態において、本方法によって産生された抗体は、フコースアナログの非存在下で培養された宿主細胞から産生された抗体と比較した場合に、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%または少なくとも約50%のコアがフコシル化されていないタンパク質（例えば、コアのフコシル化が欠如している）を含む。

50

【0216】

フコースが糖鎖の還元端におけるN-アセチルグルコサミンに結合されていない糖鎖、対、フコースが糖鎖の還元端におけるN-アセチルグルコサミンに結合されている糖鎖の含量（例えば、比）は、例えば、実施例に記載されている通りに決定することができる。他の方法は、ヒドラジン分解または酵素消化（例えば、Biochemical Exp

50

erimentation Methods 23巻: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press)、Reiko Takahashi 編集(1989年)を参照)、放出された糖鎖の蛍光標識または放射性同位元素標識と、続くクロマトグラフィーによる標識された糖鎖の分離を含む。また、放出された糖鎖の組成は、HPAEC-PAD方法によって鎖を解析することにより決定することができる(例えば、J. Liq Chromatogr. 6巻: 1557頁(1983年)を参照)(全般的には、米国特許出願公開第2004/0110282号を参照)。

【0217】

IV. 組成物

一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体のいずれかを含む組成物(例えば、医薬組成物)も本明細書に提供される。一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体を含む組成物であって、抗体が、Fc領域と、Fc領域に連結されたN-グリコシド結合型炭水化物鎖とを含み、N-グリコシド結合型炭水化物鎖の約50%未満が、フコース残基を含有する組成物が本明細書において提供される。一部の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体を含む組成物であって、抗体が、Fc領域と、Fc領域に連結されたN-グリコシド結合型炭水化物鎖とを含み、N-グリコシド結合型炭水化物鎖の実質的に全てが、フコース残基を含有しない組成物が本明細書において提供される。

【0218】

任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と、所望の程度の純度を有する活性成分とを混合することにより、貯蔵のための治療用製剤が調製される(Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro編、Philadelphia, Pa. 2000年)。許容される担体、賦形剤または安定剤は、用いられている投薬量および濃度ではレシピエントに対し無毒性であり、バッファー、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE、二亜硫酸ナトリウム含む抗酸化剤; 保存料、等張化剤(isotonicifier)、安定剤、金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体); EDTA等のキレート剤および/または非イオン性界面活性剤を含む。

【0219】

特に、安定性がpH依存性である場合、バッファーを使用して、治療上の有効性を最適化する範囲にpHを制御することができる。バッファーは、約50mM~約250mMに及ぶ濃度で存在することができる。本発明による使用に適した緩衝剤は、有機および無機酸ならびにこれらの塩の両方を含む。例えば、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩である。その上、バッファーは、ヒスチジンおよびTris等のトリメチルアミン塩で構成され得る。

【0220】

保存料を添加して微生物の成長を予防することができ、これは典型的には、約0.2%~1.0%(w/v)の範囲内で存在する。本発明による使用に適した保存料は、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム; 塩化ヘキサメトニウム; ハロゲン化ベンザルコニウム(例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物)、塩化ベンゼトニウム; チメロサル、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール; メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン; 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-クレゾールを含む。

【0221】

「安定剤」として公知の場合もある等張化剤は、組成物における液体の浸透圧を調整または維持するために存在することができる。タンパク質および抗体等、大型の荷電生体分子と共に使用される場合、これは、アミノ酸側鎖の荷電基と相互作用し、これにより、分子間および分子内相互作用の可能性を減らすことができるため、多くの場合「安定剤」と

10

20

30

40

50

命名される。等張化剤は、他の成分の相対量を考慮に入れつつ、約0.1%～約25重量%の間または約1～約5重量%の間のいずれかの量で存在することができる。一部の実施形態において、等張化剤は、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトール等、多価糖アルコール、三価またはより高次の糖アルコールを含む。

【0222】

追加的な賦形剤は、次のうち1種または複数として機能し得る薬剤を含む：(1)増量剤、(2)溶解促進剤(solubility enhancer)、(3)安定剤および(4)変性または容器壁への接着を予防する薬剤。斯かる賦形剤は、次のものを含む：多価糖アルコール(上に列挙)；アラニン、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、リシン、オルニチン、ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン等、アミノ酸；スクロース、ラクトース、ラクチトール、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース(myoinisitose)、ミオイニシトール(myoinisitol)、ガラクトース、ガラクトール、グリセロール、シクリトール(例えば、イノシトール)、ポリエチレングリコール等、有機糖または糖アルコール；尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロールおよびチオ硫酸ナトリウム等、含硫還元剤；ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは他の免疫グロブリン等、低分子量タンパク質；ポリビニルピロリドン等、親水性ポリマー；単糖(例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース)；二糖(例えば、ラクトース、マルトース、スクロース)；ラフィノース等、三糖；ならびにデキストリンまたはデキストラン等、多糖。

10

20

【0223】

非イオン性界面活性剤または洗剤(「湿潤剤」としても公知)は、治療剤の可溶化を助けると共に、攪拌誘導性凝集から治療タンパク質を保護するために存在することができる。これは、活性治療タンパク質または抗体の変性を引き起こすことなく、製剤を表面ずり応力に曝露させることもできる。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/ml～約1.0mg/mlまたは約0.07mg/ml～約0.2mg/mlの範囲内で存在する。一部の実施形態において、非イオン性界面活性剤は、約0.001%～約0.1%w/vまたは約0.01%～約0.1%w/vまたは約0.01%～約0.025%w/vの範囲

30

40

【0224】

適した非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート(20、40、60、65、80等)、ポロキサマー(polyoxamer)(184、188等)、PLURONIC(登録商標)ポリオール、TRITON(登録商標)、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(TWEEN(登録商標)-20、TWEEN(登録商標)-80等)、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン水素付加ヒマシ油10、50および60、グリセロールモノステアレート、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース(cellulose)ならびにカルボキシメチルセルロースを含む。使用することができるアニオン性洗剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびスルホン酸ジオクチルナトリウムを含む。カチオン性洗剤は、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムを含む。

【0225】

製剤は、in vivo投与に使用するためには、無菌でなければならない。製剤は、滅菌濾過膜を通した濾過により滅菌することができる。本明細書における治療用組成物は一般に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能な共栓を有するバイアルに入れられる。

【0226】

投与の経路は、適した方式での長期間に及ぶ単一または複数のボーラスまたは注入、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、病巣内もしくは関節内経路による注射ま

50

たは注入、局所的投与、吸入または徐放もしくは延長放出手段による等、公知かつ受け入れられた方法に従う。

【0227】

本明細書における製剤は、処置されている特定の徴候の必要に応じて、1種より多くの活性化化合物、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有する化合物を含有することもできる。その代わりにまたはそれに加えて、組成物は、細胞傷害性薬剤、サイトカインまたは成長阻害薬剤を含むことができる。斯かる分子は、意図される目的に有効な量で、組み合わせ適切に存在する。

【0228】

V. 処置方法

対象においてシグレック - 8 を発現する細胞によって媒介される疾患を処置または予防するための方法であって、対象に有効量の本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体（例えば、ヒト化抗シグレック - 8 抗体）またはその組成物を投与するステップを含む方法が、本明細書に提供される。一部の実施形態において、対象（例えば、ヒト患者）は、好酸球媒介性障害と診断された、または好酸球媒介性障害の発症リスクがある。一部の実施形態において、対象（例えば、ヒト患者）は、肥満細胞媒介性障害と診断された、または肥満細胞媒介性障害の発症リスクがある。一部の実施形態において、対象は、好酸球媒介性障害または肥満細胞媒介性障害を有する。

【0229】

好酸球を枯渇または低下させる方法であって、対象に有効量の本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体（例えば、ヒト化抗シグレック - 8 抗体）を投与するステップを含む方法が、本明細書に提供される。一部の実施形態において、好酸球の枯渇または低下は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料）における好酸球集団数を、抗体による処置前の対象由来の試料における好酸球集団数と比較することにより測定される。一部の実施形態において、好酸球の枯渇または低下は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料）における好酸球集団数を、抗体処置なしの別の対象由来の試料における好酸球集団数または抗体処置なしの対象由来の試料における平均好酸球集団数と比較することにより測定される。一部の実施形態において、試料は、組織試料（例えば、肺試料、鼻ポリポーシス試料等）である。一部の実施形態において、好酸球の枯渇または低下は、活性化された好酸球のアポトーシスによるものである。好酸球は、IL - 5、GM - CSF、IL - 33、IFN - 、TNF - およびレプチン等が挙げられるがこれらに限定されない、サイトカインまたはホルモンにより活性化または感作することができる。一部の実施形態において、好酸球の枯渇または低下は、静止した好酸球のアポトーシスによるものである。一部の実施形態において、好酸球の枯渇または低下は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）によるものである。一部の実施形態において、炎症性メディエーターの好酸球産生が、予防または低下される。例示的な炎症性メディエーターとして、活性酸素種、顆粒タンパク質（例えば、好酸球カチオン性タンパク質、主要塩基性タンパク質、好酸球由来神経毒、好酸球ペルオキシダーゼ等）、脂質メディエーター（例えば、PAF、PGE1、PGE2等）、酵素（例えば、エラスターゼ）、増殖因子（例えば、VEGF、PDGF、TGF - 、TGF - 等）、ケモカイン（例えば、RANTES、MCP - 1、MCP - 3、MCP4、エオタキシン等）およびサイトカイン（例えば、IL - 3、IL - 5、IL - 10、IL - 13、IL - 15、IL - 33、TNF - 等）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0230】

肥満細胞を枯渇または低下させる方法であって、対象に有効量の本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体（例えば、ヒト化抗シグレック - 8 抗体）を投与するステップを含む方法も、本明細書に提供される。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または低下は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料または生体液試料）における肥満細胞集団数を、抗体による処置前の対象由来の試料における肥満細胞集団数と比較することにより測定される。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または低下は、

10

20

30

40

50

抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料または生体液試料）における肥満細胞集団数を、抗体処置なしの別の対象由来の試料における肥満細胞集団数または抗体処置なしの対象由来の試料における平均肥満細胞集団数と比較することにより測定される。一部の実施形態において、試料は、組織試料（例えば、皮膚試料、肺試料、骨髄試料、鼻ポリポーシス試料等）である。一部の実施形態において、試料は、生体液試料（例えば、血液試料、気管支肺胞洗浄液試料および鼻洗浄液試料）である。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または低下は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）によるものである。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または低下は、肥満細胞から産生される予め形成または新たに形成された炎症性メディエーターの低下または予防である。例示的な炎症性メディエーターとして、ヒスタミン、N-メチルヒスタミン、酵素（例えば、トリプターゼ、キマーゼ、カテプシン（cathespín）G、カルボキシペプチダーゼ等）、脂質メディエーター（例えば、プロスタグランジンD2、プロスタグランジンE2、ロイコトリエンB4、ロイコトリエンC4、血小板活性化因子、11-ベータ-プロスタグランジンF2等）、ケモカイン（例えば、CCL2、CCL3、CCL4、CCL11（すなわち、エオタキシン）、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL10等）およびサイトカイン（例えば、IL-3、IL-4、IL-5、IL-15、IL-33、GM-CSF、TNF等）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0231】

対象においてシグレック-8を発現する肥満細胞を枯渇させる方法であって、対象に有効量の本明細書に記載されている抗シグレック-8抗体（例えば、ヒト化抗シグレック-8抗体）を投与するステップを含み、抗シグレック-8抗体が、ADCC活性によりシグレック-8を発現する肥満細胞を死滅させる方法も、本明細書に提供される。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、処置前のベースラインレベルと比較した場合に、対象から得られる試料におけるシグレック-8を発現する肥満細胞の少なくとも約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約100%を枯渇させる。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、処置前のベースラインレベルと比較した場合に、対象から得られる試料におけるシグレック-8を発現する肥満細胞の少なくとも約20%を枯渇させる。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または死滅は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料または生体液試料）における肥満細胞集団数を、抗体による処置前の対象由来の試料における肥満細胞集団数と比較することにより測定される。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または死滅は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料または生体液試料）における肥満細胞集団数を、抗体処置なしの別の対象由来の試料における肥満細胞集団数または抗体処置なしの対象由来の試料における平均肥満細胞集団数と比較することにより測定される。一部の実施形態において、試料は、組織試料（例えば、皮膚試料、肺試料、骨髄試料、鼻ポリポーシス試料等）である。一部の実施形態において、試料は、生体液試料（例えば、血液試料、気管支肺胞洗浄液試料および鼻洗浄液試料）である。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、ADCC活性を改善するように遺伝子操作された。一部の実施形態において、抗シグレック-8抗体は、ADCC活性を改善するFc領域における少なくとも1個のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、抗体の重鎖の少なくとも1または2つは、フコシル化されていない。一部の実施形態において、肥満細胞の枯渇または死滅は、肥満細胞から産生される予め形成または新たに形成された炎症性メディエーターの低下または予防である。例示的な炎症性メディエーターとして、ヒスタミン、N-メチルヒスタミン、酵素（例えば、トリプターゼ、キマーゼ、カテプシンG、カルボキシペプチダーゼ等）、脂質メディエーター（例えば、プロスタグランジンD2、プロスタグランジンE2、ロイコトリエンB4、ロイコトリエンC4、血小板活性化因子、11-ベータ-プロスタグランジンF2等）、ケモカイン（例えば、CCL2、CCL3、CCL4、CCL11（すなわち、エオタキシン）、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL10等）およびサイトカイン（例えば、IL-3、IL-4、IL-5、IL-13、IL-15、IL-33、GM-CSF、TNF等）が挙げられるがこ

10

20

30

40

50

れらに限定されない。

【0232】

肥満細胞媒介性活性を阻害する方法であって、対象に有効量の本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体（例えば、ヒト化抗シグレック - 8 抗体）を投与するステップを含む方法も、本明細書に提供される。一部の実施形態において、肥満細胞媒介性活性の阻害は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料または血液試料）における肥満細胞媒介性活性を、抗体による処置前の対象由来の試料における肥満細胞媒介性活性と比較することにより測定される。一部の実施形態において、肥満細胞媒介性活性の阻害は、抗体による処置後の対象由来の試料（例えば、組織試料または生物学的試料）における肥満細胞媒介性活性を、抗体処置なしの別の対象由来の試料における肥満細胞媒介性活性または抗体処置なしの対象由来の試料における平均肥満細胞媒介性活性と比較することにより測定される。一部の実施形態において、試料は、組織試料（例えば、皮膚試料、肺試料、骨髄試料、鼻ポリポーシス試料等）である。一部の実施形態において、試料は、生体液試料（例えば、血液試料、気管支肺胞洗浄液試料および鼻洗浄液試料）である。一部の実施形態において、肥満細胞媒介性活性の阻害は、肥満細胞脱顆粒の阻害である。一部の実施形態において、肥満細胞媒介性活性の阻害は、気道平滑筋収縮の阻害である。一部の実施形態において、肥満細胞媒介性活性の阻害は、肥満細胞におけるカルシウムフラックスの阻害である。一部の実施形態において、肥満細胞媒介性活性の阻害は、肥満細胞からの予め形成または新たに形成された炎症性メディエーターの放出の阻害である。例示的な炎症性メディエーターとして、ヒスタミン、N - メチルヒスタミン、酵素（例えば、トリプターゼ、キマーゼ、カテプシン G、カルボキシペプチダーゼ等）、脂質メディエーター（例えば、プロスタグランジン D 2、プロスタグランジン E 2、ロイコトリエン B 4、ロイコトリエン C 4、血小板活性化因子、11 - ベータ - プロスタグランジン F 2 等）、ケモカイン（例えば、CCL 2、CCL 3、CCL 4、CCL 11（すなわち、エオタキシン）、CXCL 1、CXCL 2、CXCL 3、CXCL 10 等）およびサイトカイン（例えば、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 13、IL - 15、IL - 33、GM - CSF、TNF 等）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

【0233】

疾患の予防または処置のため、活性薬剤の適切な投薬量は、上に定義されている通り、処置しようとする疾患の種類、疾患の重症度および経過、薬剤が予防または治療目的のいずれで投与されるか、以前の治療法、対象の臨床歴および薬剤に対する応答、ならびに担当医の裁量に依存するであろう。薬剤は、一度に、または一連の処置にわたって対象に適切に投与される。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態において、記載されている抗シグレック - 8 抗体の投与間の間隔は、約 1 ヶ月間またはそれより長い。一部の実施形態において、投与間の間隔は、約 2 ヶ月間、約 3 ヶ月間、約 4 ヶ月間、約 5 ヶ月間、約 6 ヶ月間またはそれより長い。本明細書において、投与間の間隔は、ある抗体投与と次の抗体投与との間の期間を指す。本明細書において、約 1 ヶ月間の間隔は、4 週間を含む。したがって、一部の実施形態において、投与間の間隔は、約 4 週間、約 8 週間、約 12 週間、約 16 週間、約 20 週間、約 24 週間またはそれより長い。一部の実施形態において、処置は、複数の抗体投与を含み、投与間の間隔は変動し得る。例えば、第 1 の投与と第 2 の投与との間の間隔は、約 1 ヶ月間であり、その後の投与間の間隔は、約 3 ヶ月間である。一部の実施形態において、第 1 の投与と第 2 の投与との間の間隔は、約 1 ヶ月間であり、第 2 の投与と第 3 の投与との間の間隔は、約 2 ヶ月間であり、その後の投与間の間隔は、約 3 ヶ月間である。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、平坦な (flat) 用量で投与される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、用量当たり約 150 ~ 約 450 mg の投薬量で対象に投与される。一部の実施形態において、抗シグレック - 8 抗体は、用量当たり約 150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、350 mg、400 mg および 450 mg のいずれかの投薬量で対象に投与される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、約 0.1 mg / kg ~ 約 10 mg / kg また

30

40

50

は約 1.0 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の投薬量で対象に投与される。一部の実施形態において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体は、約 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg、4.5 mg/kg、5.0 mg/kg、5.5 mg/kg、6.0 mg/kg、6.5 mg/kg、7.0 mg/kg、7.5 mg/kg、8.0 mg/kg、8.5 mg/kg、9.0 mg/kg、9.5 mg/kg または 10.0 mg/kg のいずれかの投薬量で対象に投与される。上述の投薬頻度のいずれを使用してもよい。

【0234】

本明細書において企図される処置方法は、本明細書に記載されている抗シグレック - 8 抗体による、好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害の処置である。好酸球媒介性障害は、好酸球遊走、走化性、作製または顆粒化に関連する障害または疾患を含む。同様に、肥満細胞媒介性障害は、肥満細胞遊走、走化性、作製または顆粒化に関連する障害または疾患を含む。本発明の製剤で処置可能な好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害は、喘息、アレルギー性鼻炎、鼻ポリポーシス、アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹（例えば、慢性特発性蕁麻疹および慢性自発性蕁麻疹）、肥満細胞症、好酸球性白血病および好酸球増加症候群を含む。本発明の製剤で処置可能な好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害は、乏顆粒球型喘息、急性または慢性気道過敏症、好酸球性食道炎、チャグ・ストラウス症候群、サイトカインに関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する炎症、シグレック - 8 を発現する細胞に関連する悪性病変、物理的蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、圧迫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、食物アレルギーおよびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ABPA）も含む。

10

20

【0235】

本明細書における方法の一部の実施形態において、本明細書に提供される抗シグレック - 8 抗体は、アレルギー反応の 1 種または複数の症状を阻害する。一部の実施形態において、アレルギー反応は、I 型過敏症反応である。

【0236】

アレルギー性鼻炎結膜炎または枯草熱としても公知のアレルギー性鼻炎は、吸入性アレルゲンに対するアトピー性反応の最も一般的な徴候であり、その重症度および持続時間は多くの場合、アレルゲンへの曝露の強度および長さと同様に関連する。これは慢性疾患であり、いかなる年齢で最初に出現することもできるが、発病は通常、小児期または青年期の間である。典型的な発作は、大量の水様鼻漏、発作的なくしゃみ、鼻閉塞ならびに鼻部および口蓋のそう痒からなる。後鼻腔粘液ドレナージも、咽頭炎、咳払いおよび咳を引き起こす。結膜および眼瞼の激しいそう痒、発赤、涙ならびに羞明を伴うアレルギー性眼瞼結膜炎の症状も存在し得る。重度の発作は、多くの場合、全身性倦怠感、脱力感、疲労、場合によっては、激しいくしゃみ期間の後の筋痛を伴う。

30

【0237】

可逆性閉塞性気道疾患としても公知の喘息は、呼吸刺激物質および気管支収縮剤化学物質に対する気管支樹の応答性亢進によって特徴付けられ、自発的にまたは処置により可逆性である喘鳴、呼吸困難、胸部絞扼感および咳の発作を生じる。これは、気道全体に關与する慢性疾患であるが、時折の軽度一過性エピソードから重度慢性の生命に關わる気管支閉塞へと重症度が変動する。喘息発作の身体的兆候は、頻呼吸、聞き取れる喘鳴および呼吸副筋の使用を含む。末梢血および鼻分泌物における好酸球のレベル上昇と同様に、速い脈拍および血圧上昇も典型的に存在する。喘息およびアトピーは共存し得るが、喘息患者の約半数のみが、同様にアトピー性であり、さらにより少ないパーセンテージのアトピー患者が喘息も有する。しかし、喘息は、特に小児期において、非アトピー性個体よりも頻りにアトピー性個体間で起こるという点において、アトピーおよび喘息は、完全に無関係とは限らない。喘息はさらに、2 種のサブグループ、外因性喘息および内因性喘息へと歴史的に分類されている。加えて、喘息は、気道の慢性炎症、異なる患者間の頻度で環境的トリガーに反応して変動する急性増悪に關与する。重症例において、気道の慢性再

40

50

造形が起こり得る。

【0238】

アレルギー性、アトピー性または免疫性喘息としても公知の外因性喘息は、通常、乳児期または小児期である年少期に喘息を一般に発症する患者の説明である。湿疹またはアレルギー性鼻炎を含むアトピーの他の徴候が多くの場合共存する。喘息性発作は、花粉の季節において、動物の存在下で、またはハウスダスト、羽毛枕もしくは他のアレルゲンへの曝露下で起こり得る。皮膚検査は、原因となるアレルゲンに対する陽性膨疹・紅斑反応を示す。興味深いことに、血清総IgE濃度は頻繁に上昇するが、正常の場合もある。非アレルギー性または特発性(idiopathic)喘息としても公知の内因性喘息は、典型的には、顕性呼吸感染後に成人期において最初に起こる。症状は、花粉の季節または他のアレルゲンへの曝露とは無関係な慢性または再発性気管支閉塞を含む。皮膚検査は、通常のアトピー性アレルゲンに対し陰性であり、血清IgE濃度は正常である。追加的な症状は、痰血液および好酸球増加症を含む。本特許出願の目的のため、「好酸球媒介性障害」は、アレルギー性および非アレルギー性喘息の両方を含む。一部の実施形態において、好酸球媒介性障害(複数可)および/または肥満細胞媒介性障害(複数可)の対象は、吸入コルチコステロイド、短時間作用型2アゴニスト、長時間作用型2アゴニストまたはこれらの組合せによって適切に制御されていない喘息を患う。

10

【0239】

湿疹、神経皮膚炎、アトピー性湿疹またはベニエ痒疹としても公知のアトピー性皮膚炎は、アトピーの家族性および免疫性特色を有する患者のサブセットに特異的な一般的な慢性皮膚障害である。本質的特色は、ある特定の部位に偏向した特徴的な対称的に分布した皮膚噴出物を誘導する、そう痒性皮膚炎症性応答である。アトピー性皮膚炎は、アレルギー性鼻炎および喘息ならびに高IgEレベル、皮膚炎の重症度と関連するため、皮膚型のアトピーとして分類されるが、しかし、皮膚検査におけるアレルゲンへの曝露と必ずしも相関するとは限らず、脱感作(他のアレルギー性疾患とは異なり)は、有効な処置ではない。高血清IgEは、アレルギー性喘息の診断にとって確証的であるが、正常レベルは、これを妨げない。疾患の発病は、いかなる年齢で起こることもでき、病変は、紅斑性浮腫性丘疹またはプラークと鱗屑と共に急性的に始まる。そう痒は、水疱(weeping)および痂皮、続いて慢性苔癬化をもたらす。細胞レベルでは、急性病変は、浮腫性(edemous)であり、真皮に単核細胞、CD4リンパ球が浸潤する。好中球、好酸球、形質細胞および好塩基球は稀であるが、脱顆粒肥満細胞が存在する。慢性病変は、上皮肥厚化、角化症および不全角化を特色とし、真皮に単核細胞、ランゲルハンス細胞および肥満細胞が浸潤する。小神経の神経周膜の関与を含む、線維症の焦点部分も存在し得る。

20

30

【0240】

蕁麻疹および血管浮腫は、表在性皮膚血管におけるヒスタミン刺激された受容体に起因する身体的腫脹、紅斑症およびそう痒を指し、全身性アナフィラキシーの特質的皮膚特色である。全身性アナフィラキシーは、薬物、昆虫毒または食物に起因する、複数の臓器で同時に起こるIgE媒介性反応の発生である。これは、アレルゲン誘導性肥満細胞負荷IgEによって突然に引き起こされ、様々な生体臓器の機能における深刻な生命に関わる変更をもたらす。血管崩壊、急性気道閉塞、皮膚血管拡張および浮腫ならびに胃腸管および尿生殖器筋痙攣が、ほぼ同時に起こるが、必ずしも同じ程度で起こるとは限らない。アナフィラキシーの病態は、血管浮腫および高度膨脹した肺を含み、粘膜が気道を塞ぎ、限局的無気肺となる。細胞レベルでは、肺は、急性喘息発作のときと同様と思われ、気管支粘膜下腺の過分泌、粘膜および粘膜下浮腫、気管支周囲血管性うっ血ならびに気管支壁における好酸球増加症を伴う。肺浮腫および出血が存在し得る。気管支筋痙攣、高度膨脹、さらには肺胞の破裂も存在し得る。ヒトアナフィラキシーの重要な特色は、喉頭、気管、喉頭蓋および下咽頭の粘膜固有層における浮腫、血管性うっ血および好酸球増加症を含む。アレルゲンへの曝露は、経口摂取、注射、吸入または皮膚もしくは粘膜との接触によるものとなり得る。反応は、アレルゲンへの曝露後の数秒または数分以内に始まる。最初に恐怖または切迫した破滅の感覚、続いて急速に、1種または複数の標的臓器系：心血管、呼

40

50

吸、皮膚または胃腸管における症状が生じ得る。アナフィラキシーの原因となるアレルゲンは、アトピーと一般的に関連するアレルゲンとは異なる。食物、薬物、昆虫毒またはラテックスは、一般的な供給源である。食物アレルゲンは、甲殻類、軟体動物（例えば、ロブスター、エビ、カニ）、魚類、マメ科植物（例えば、ピーナッツ、エンドウマメ、豆、甘草）、種子（例えば、ゴマ、綿実、キャラウェイ、マスタード、亜麻仁、ヒマワリ）、木の実、液果、卵白、ソバおよびミルクに存在するアレルゲンを含む。薬物アレルゲンは、異種タンパク質およびポリペプチド、多糖ならびにハプテン薬に存在するアレルゲンを含む。昆虫アレルゲンは、ミツバチ、イエロー・ジャケット (yellow jacket)、スズメバチ (hornet)、カリバチ (wasp) およびアカヒアリを含む Hymenoptera 昆虫を含む。エピネフリンは、アナフィラキシーのための典型的な処置であるが、抗ヒスタミン薬または他のヒスタミン遮断薬が、典型的に、重症度の低い蕁麻疹または血管浮腫 (angioedemic) 反応のために処方される。

10

【0241】

鼻ポリポーシスは、鼻腔へと成長して飛び出す炎症組織によって特徴付けられる、上気道の慢性炎症性疾患であり、正確な病因は不明であるが、成人の1~5%の間の有病率を有することが公知である (Settipane GA: Epidemiology of nasal polyps, Allergy Asthma Proc, 1996年、17巻: 231~236頁)。鼻ポリポーシスは、典型的には、20歳またはそれより年上の男性において呈し、鼻閉塞、嗅覚鈍麻および再発性感染を引き起こし、通年性アレルギー性鼻炎よりも有意に大きい影響をクオリティ・オブ・ライフに与える (Liら、Characterizing T-Cell Phenotypes in Nasal Polyposis in Chinese Patients, J Invest Allergol Clin Immunol, 2009年; 19巻(4号): 276~282頁)。鼻ポリポーシスの全患者の最大3分の1が、喘息であると報告されるが、喘息患者の7%のみが、鼻ポリポーシスを有する。鼻ポリポーシスに関係付けられる優勢である細胞型は、好酸球および肥満細胞を含む。

20

【0242】

VI. 製造品またはキット

別の態様において、本明細書に記載されている抗シグレック - 8抗体を含む、製造品またはキットが提供される。製造品またはキットは、本発明の方法における抗体の使用のための説明書をさらに含むことができる。よって、ある特定の実施形態において、製造品またはキットは、個体における好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害を処置または予防するための方法であって、有効量の抗シグレック - 8抗体を個体に投与するステップを含む方法における抗シグレック - 8抗体の使用のための説明書を含む。ある特定の実施形態において、個体は、ヒトである。一部の実施形態において、個体は、喘息、アレルギー性鼻炎、鼻ポリポーシス、アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹、肥満細胞症、好酸球性白血病および好酸球増加症候群からなる群から選択される疾患を有する。ある特定の実施形態において、個体は、乏顆粒球形喘息、急性または慢性気道過敏症、好酸球性食道炎、チャグ・ストラウス症候群、サイトカインに関連する炎症、シグレック - 8を発現する細胞に関連する炎症、シグレック - 8を発現する細胞に関連する悪性病変、物理的蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、圧迫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、食物アレルギーおよびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) からなる群から選択される疾患を有する。

30

40

【0243】

製造品またはキットは、容器をさらに含むことができる。適した容器は、例えば、ボトル、バイアル（例えば、デュアルチャンバーバイアル）、シリンジ（シングルまたはデュアルチャンバーシリンジ等）および試験管を含む。容器は、ガラスまたはプラスチック等、種々の材料でできていてよい。容器は、製剤を保持する。

【0244】

製造品またはキットは、容器に貼られたまたは付随する、製剤の再溶解および/または使用に関する指示を示すことができるラベルまたは添付文書をさらに含むことができる。

50

ラベルまたは添付文書は、製剤が、個体における好酸球媒介性障害および/または肥満細胞媒介性障害を処置または予防するための、皮下、静脈内または他の様式の投与に有用であるまたは意図されることをさらに示すことができる。製剤を保持する容器は、使い捨てバイアルであっても多重使用バイアルであってもよく、これは、再溶解された製剤の反復投与を可能にする。製造品またはキットは、適した希釈液を含む第2の容器をさらに含むことができる。製造品またはキットは、他のバッファー、希釈液、フィルター、針、シリンジおよび添付文書と使用説明書を含む、商業的、治療的および使用者の見地から望ましい他の材料をさらに含むことができる。

【0245】

特異的な実施形態において、本発明は、単一用量投与単位のためのキットを提供する。斯かるキットは、シングルまたはマルチチャンバーの両方の予め充填されたシリンジを含む、治療抗体の水性製剤の容器を含む。例示的な予め充填されたシリンジは、V e t t e r G m b H、ドイツ、ラーフェンスブルクから入手できる。

10

【0246】

本明細書における製造品またはキットは、第2の医薬を含む容器を任意選択でさらに含み、この場合、抗シグレック-8抗体が、第1の医薬であり、この物品またはキットは、有効量で第2の医薬で対象を処置するための、ラベルまたは添付文書における説明書をさらに含む。例示的な第2の医薬は、抗I g E抗体、抗ヒスタミン薬、気管支拡張薬、グルココルチコイド、N S A I D、うっ血除去薬、咳止め薬、鎮痛薬、T N F - アンタゴニスト、インテグリンアンタゴニスト、免疫抑制剤、I L - 4 アンタゴニスト、I L - 1 3 アンタゴニスト、二重I L - 4 / I L - 1 3 アンタゴニスト、D M A R D、B細胞表面マーカーに結合する抗体および/またはB A F F アンタゴニストとなり得る。

20

【0247】

別の実施形態において、自動注射装置における投与のための、本明細書に記載されている製剤を含む製造品またはキットが本明細書において提供される。自動注射器は、起動すると、患者または管理者の追加的な必要な動作なしでその内容物を送達する注射装置として説明することができる。送達速度が一定でなければならず、送達時間が僅かな間よりも長い場合、これは、治療用製剤のセルフメディケーションに特に適する。

【0248】

本発明は、次の実施例を参照することによって、より十分に理解されるであろう。しかし、実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈するべきではない。本明細書に記載されている実施例および実施形態が、単なる説明目的であり、これを踏まえた様々な修正または変更が、当業者に示唆され、本願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲内に含まれるべきであることが理解される。

30

【実施例】

【0249】

シグレック(シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン)は、主に白血球上に存在する1回膜貫通細胞表面タンパク質である。シグレックファミリーのメンバーであるシグレック-8は、新規ヒト好酸球タンパク質を同定する試みの一環として最初に発見された。ヒト好酸球による発現に加えて、これは、肥満細胞によっても発現される。シグレック-8は、硫酸化グリカン、6'-スルホ-シアリルルイスXを認識し、肥満細胞機能を阻害することが示された細胞内免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITIM)ドメインを含有する。シグレック-8に対するマウス抗体、2E2および2C4抗体は、米国特許第8,207,305号;米国特許第8,197,811号、米国特許第7,871,612号および米国特許第7,557,191号に記載されている。マウス抗シグレック-8 2C4抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、例えば、米国特許第8,207,305号においてそれぞれ配列番号2および配列番号4として見出すことができる。

40

【0250】

(実施例1)

50

キメラ抗シグレック - 8 抗体の作製および特徴付け

マウス 2 E 2 抗体およびマウス 2 C 4 抗体からキメラ抗体を作製し、その後、ヒトシグレック - 8 への結合活性に関して解析した。

【0251】

方法および結果

キメラ 2 E 2 抗体 (c h 2 E 2) およびキメラ 2 C 4 抗体 (c h 2 C 4) の作製

キメラ 2 E 2 抗体 (c h 2 E 2) の作製のため、RNeasy Miniキット (Qiagen) を使用して、急速凍結したマウスハイブリドーマ 2 E 2 細胞ライセートを処理して、製造元のプロトコルに従って全 RNA を単離した。製造元のプロトコルに従って第 1 鎖 cDNA 合成キット (GE Life Sciences) を使用して、単離された RNA の 3 μg 試料を逆転写して 2 E 2 cDNA を産生した。2 E 2 cDNA をその後、Phusion Flash High-Fidelity PCR マスターミックス (Thermo Scientific) を使用した PCR により増幅し、PCR 反応物における配列を確認した。免疫グロブリン重鎖可変領域 (VH) cDNA およびカップ軽鎖可変領域 (VL) を、Phusion High-Fidelity PCR マスターミックスを使用して PCR 増幅した。各 PCR 反応の結果は、単一の増幅産物であり、製造元のプロトコルに従って QIAquick PCR 精製キット (Qiagen) を使用してこれを精製し、免疫グロブリン鎖毎の配列を得た。カップ軽鎖可変領域のコンセンサス配列を 2 E 2 VK と命名し、重軽鎖可変領域のコンセンサス配列を 2 E 2 VH と命名した。2 E 2 VK タンパク質配列は、Gln が Glu に置き換えられた第 1 の残基を除いて、マウス 2 C 4 IgG1 抗体 (Kiklyら、J. Allergy Clin Immunol.、2000 年；105 巻：1093 ~ 1100 頁を参照) と同一であったが、2 E 2 VH タンパク質配列は、2 C 4 と完全に同一であった。

【0252】

キメラ発現ベクターの構築は、リガーゼ非依存的クローニングを使用した、IgG / カップ定常領域ベクターへの増幅された可変領域のクローニングを必要とした。簡潔に説明すると、pCMV ベクターを BfuA1 (BspM1) で消化し、消化されたベクターをゲル電気泳動によって精製し、T4 DNA ポリメラーゼおよび 100 mM dATP とのインキュベーションにより、ベクターにおける適合性オーバーハングを作製した。挿入物のため、リーダー配列の 3' 端、すなわち、フォワードプライマーまたは定常領域 (IgG1 またはカップ) の初め、すなわち、リバースプライマーと、続く可変領域 (各方向における) の初めを含有するプライマーを用いて、2 E 2 cDNA から抗体配列を PCR により増幅した。PCR 精製キット (Qiagen) を使用して、増幅された挿入物を精製し、T4 DNA ポリメラーゼおよび 100 mM dTTP とのインキュベーションにより、挿入物における相補的オーバーハングを作製した。ベクターおよび挿入物を室温でインキュベートし、化学的にコンピテントな TOP10 細菌 (Invitrogen) の形質転換に使用し、この細菌をその後、カナマイシンを含有する培養プレートで平板培養した。数個のクローンを単離し、PCR によってコロニーをスクリーニングした。正確なサイズの PCR 産物を含有するクローンを選択し、ミニプレップキット (Qiagen) を使用して DNA を単離し、DNA を配列決定した。

【0253】

キメラ 2 C 4 抗体 (c h 2 C 4) の作製のため、2 C 4 重鎖可変領域 (VH) およびカップ軽鎖可変領域 (VK) を合成し (Gene Script)、キメラ 2 E 2 抗体のクローニングに使用した同じ方法を適用した。Expifectamine 293 発現系キット (Invitrogen) に提供される Expifectamine 293 試薬を使用して、製造元のプロトコルに従い、Expifectamine 293 トランスフェクション培地 (Invitrogen) および抗生物質において成長する Expifectamine 293 懸濁細胞 (ヒト胚性腎臓細胞) を、ch2E2 重鎖および ch2E2 カップ軽鎖をコードする構築物または ch2C4 重鎖および ch2C4 カップ軽鎖をコードする構築物 (各 1 μg DNA) でコトランスフェクトした。6 ウェルプレート内の 2 ml 成長培地において細胞を 7 日間育成し、その後、培地を

収集し、ELISAにより組換えタンパク質発現に関してアッセイした。

【0254】

キメラ抗体のシグレック - 8 結合活性

キメラ2E2およびキメラ2C4 IgG1K抗体による組換えヒトシグレック - 8 細胞外ドメイン (ECD) の結合をELISAにより測定した。シグレック - 8 結合アッセイのため、ウェル当たり30 μ Lの0.4 μ g/mLシグレック - 8 ECDで一晩4にてコーティングし、続いて洗浄バッファー (0.1% Tween 20) におけるウェル洗浄によりコーティング溶液を除去し、90 μ Lの5% BSA/TBS溶液で2時間室温にてブロッキングすることにより、384ウェル Spectra Plate (Perkin Elmer) を調製した。0.2% BSA/TBSにおけるキメラ抗体 (ch2E2 または ch2C4) またはマウス抗体 (m2E2 または m2C4) の3倍系列希釈 (出発濃度は5000 ng/mL) を、各コーティングされたウェルに添加した。このプレートを2時間室温でインキュベートし、ウェルをその後洗浄し、続いて、0.2% BSA/TBS溶液に希釈したヤギ抗ヒトFcペルオキシダーゼコンジュゲート (1:10000希釈) または抗マウスFcペルオキシダーゼコンジュゲート (1:30000希釈) を添加した。プレートを45分間室温でインキュベートし、続いて洗浄し、各ウェルに30 μ L K-blue HRP基質 (Sky Bio Ltd) を添加した。室温15分間のインキュベーション後に、各ウェルへの10 μ LのRed Stop溶液 (Sky Bio Ltd) の添加により反応を停止させた。ELISAリーダー PHERA Star FS (BMG Labtech) を使用して、650 nmにおける実験試料の光学密度を読み取った。

10

20

【0255】

両方のキメラ抗体が、匹敵するEC₅₀値で完全シグレック - 8 ECDに結合した。キメラ抗体ch2E2は、マウス抗体m2E2と比較した場合に、より低いEC₅₀値でシグレック - 8 ECDに結合した (表2)。

【表2】

表2. ヒトシグレック-8 ECDへの抗体結合

	m2E2	ch2E2 精製	ch2E2	ch2C4
EC50	0.1003	0.05701	0.04759	0.07411

30

【0256】

(実施例2)

ヒト化抗シグレック - 8 抗体の作製および特徴付け

キメラ抗体2E2およびキメラ抗体2C4の配列を使用して、マウス2E2抗体のヒト化バージョンを設計した。

【0257】

方法および結果

ヒト化抗シグレック - 8 抗体の設計

International Immunogenetics Database 2009 (Lefranc, M.P., Nucleic Acid Res., 2003年、31巻(1号): 307~10頁) および Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (最終アップデート1999年11月17日) (Kabatら、NIH National Technical Information Service、1991年、1~3242頁) から得たヒトおよびマウス免疫グロブリンのタンパク質配列を使用して、Kabatアライメントにおけるヒト免疫グロブリン配列のデータベースを編集した。編集されたデータベースは、10,906種のVHおよび2,912種のVK配列を含有した。

40

【0258】

50

Discovery Studioパッケージ (Accelerlys, Inc.) に含まれる Modeller プログラム (Eswara, Curr. Protoc. Bioinformatics, 2006年、第5章: 第5.6節) を使用して、マウス抗体 2C4 可変領域の相同性モデルが計算された。抗体 pdb 構造データベース (Accelerlys, Inc.) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 解析によって決定される通り、1a70.pdb、1dqd.pdb および 1ORS.pdb の原子座標は、それぞれ VH、VL および骨格/接合点のための最高フレームワーク同一性配列鑄型であった。これらの鑄型を使用して、フレームワークの 30 種の初期モデルを作製し、最低エネルギーモデルを使用して、20 種のループモデル (全 CDR ループが含まれる) を作製し、Kabat 定義を使用してその 5 種の最良のループ鑄型により、最終マウス 2C4 モデルを最終的に作製した。

10

【0259】

ヒト化は、適したヒト V 領域の同定を必要とした。Gibbs 配列解析プログラム (MRCT) を使用して、様々な選択判断基準を使用して、2C4 VH および VK タンパク質配列によりヒト VH および VK データベースを照合した。Discovery Studio プログラム (Accelerlys) を使用して、マウス抗体 2C4 の最終相同性モデルにおける CDR 残基の 4 内のフレームワーク (FW) 残基 (Kabat 定義) を同定し、「4 CDR エンベロープ」と命名した。2C4 VH に対し高い 4 CDR エンベロープ および / または VCI 同一性を保有した、2C4 と CDR 1、2 および 3 長さ同一性を共有するヒト VH 配列は存在しなかった。AF471521 は、鍵となるフレームワーク残基 (19/24 4 エンベロープ および 18/22 VCI) の最高同一性スコアを有する、14 残基の CDR 3 サイズを有する次善の候補であったが、他の配列は、追加的な差を有し、そのためより低い優先順位になった。しかし、AF471521 は、その生殖系列 VH 遺伝子 X92218 から 11 個の体細胞変異を有した。体細胞変異を軽減するため、生殖系列とは異なるおよび / またはマウスにおいて保存されていない、いずれかのフレームワーク残基をヒト生殖系列配列に復帰変異させた。したがって、6 個のフレームワーク残基を生殖系列に復帰変異させ、生殖系列と異なる残る 5 残基は、鍵となるフレームワーク残基であり、マウス配列と同一であった。

20

【0260】

適したアクセプターヒトフレームワークは、2C4 抗体の相同性モデルを使用して同定されたため、2E2 抗体の CDR をアクセプターヒトフレームワークにグラフトすることにより、合成タンパク質および DNA 配列を設計した。2E2 RHA の初期設計は、2E2 VH 由来の CDR 1、2 および 3 を AF471521 のアクセプター FW にグラフトすることであった。AF471521 の FW 配列への 2E2 VH CDR のインターカレーション (灰色の陰) は、初期ヒト化バリエーションの 2E2 RHA の設計をもたらした (図 1)。Kabat の 24、48、49、67 および 68 位における 5 個の 4 の CDR エンベロープ / VCI 残基は、2E2 RHA において保存されておらず、これらをヒト化バージョン 2E2 RHB においてマウスの均等な残基に復帰変異させた、または次のバリエーションにおいて一度に 1 種を変異させた: 配列を *in silico* でアSEMBルし、2E2 RHA ~ 2E2 RHG と命名した (図 1)。

30

40

【0261】

軽鎖をヒト化するために、重鎖と同様のプロセスでヒト kappa 鎖を同定した。AY867246 は、4 CDR エンベロープ / VCI において 2E2 VK に対し最高の同一性を有する配列であったが、6 個の体細胞変異を有していた。21/25 4 エンベロープ および 15/17 VCI ならびに最も近い生殖系列 VK 遺伝子、X01668 からの唯一の体細胞変異を含有した X93721 を支持して、AY867246 を廃棄した。X93721 由来のフレームワークを使用して、ヒト化構築物のための DNA およびタンパク質を設計した。2E2 VK 由来の CDR 1、2 および 3 (灰色の陰) を、X93721 のアクセプター FW にグラフトして、2E2 RKA を作製した (図 2)。バリエーション 2E2 RKB におけるまたは個々に次のバリエーションにおける均等なマウス残基に復帰変異

50

された、2 E 2 R K Aにおける4個のマッチしない4 CDRエンベロープ残基、3、47、58および71が存在した：配列を*in silico*でアセンブルし、2 E 2 R K A ~ 2 E 2 R K Gと命名した(図2)。

【0262】

ヒト化抗シグレック - 8 抗体の作製

2 E 2 R H Aおよび2 E 2 R K Aの遺伝子を合成し(GenScript)、ヒト配列にコドン最適化した。天然ヒトフレームワーク配列A F 4 7 1 5 2 1およびX 9 3 7 2 1、それぞれ重および軽鎖、ならびに天然マウスCDR配列を*in silico*でアセンブルし、2 E 2 R H A ~ 2 E 2 R H Gおよび2 E 2 R K A ~ 2 E 2 R K Gと命名した。ソフトウェアアルゴリズム(GenScript)を使用して、ヒト細胞によって優先的に利用されるコドンを使用するようにサイレント変異誘発により配列を最適化し、合成した。R H A / BおよびR K A / B構築物を、キメラ抗体のPCR増幅に関する実施例1の上述の通り、発現ベクターおよび挿入物に対する特異的プライマーによりPCR増幅し、キメラ抗体の作製に関して実施例1に記載されている通り、リガーゼ非依存的クローニング反応によりI g G / カッパ定常領域ベクターへと挿入し、TOP 10細菌の形質転換に使用した。R K AおよびR H Aをその後、製造元のプロトコルに従って、Quick Change Lightning部位特異的変異誘発キット(Stratagene)を使用したPCR変異誘発により修飾して、全ヒト抗体バリエーションを得た(図1、図2、表3、表4および表5)。

【表 3 - 1】

表 3. キメラ抗体バリエーションおよびヒト化抗体バリエーションの可変領域のアミノ酸配列

抗体名	可変重鎖	可変軽鎖
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK
ch2E2	ch2E2 VH (配列番号1)	ch2E2 VK (配列番号15)
cVIIKA	ch2E2 VH (配列番号1)	2E2 RKA (配列番号16)
cVIIKB	ch2E2 VH (配列番号1)	2E2 RKB (配列番号17)
IIAcVK	2E2 RI1A (配列番号2)	ch2E2 VK (配列番号15)
IIBcVK	2E2 RI1B (配列番号3)	ch2E2 VK (配列番号15)
IIAKA	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKA (配列番号16)
IIAKB	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKB (配列番号17)
IIAKC	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKC (配列番号18)
IIAKD	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKD (配列番号19)
IIAKE	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKE (配列番号20)
IIAKF	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKF (配列番号21)
IIAKG	2E2 RI1A (配列番号2)	2E2 RKG (配列番号22)
IIBKA	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKA (配列番号16)
IIBKB	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKB (配列番号17)
IIBKC	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKC (配列番号18)
IIBKD	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKD (配列番号19)
IIBKE	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKE (配列番号20)
IIBKF	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKF (配列番号21)
IIBKG	2E2 RI1B (配列番号3)	2E2 RKG (配列番号22)
IICKA	2E2 RI1C (配列番号4)	2E2 RKA (配列番号16)
IICKB	2E2 RI1C (配列番号4)	2E2 RKB (配列番号17)
IICKC	2E2 RI1C (配列番号4)	2E2 RKC (配列番号18)
IICKD	2E2 RI1C (配列番号4)	2E2 RKD (配列番号19)
IICKE	2E2 RI1C (配列番号4)	2E2 RKE (配列番号20)
IICKF	2E2 RI1C (配列番号4)	2E2 RKF (配列番号21)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

HCKG	2E2 RHC (配列番号4)	2E2 RKG (配列番号22)
HDKA	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKA (配列番号16)
HDKB	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKB (配列番号17)
HDKC	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKC (配列番号18)
HDKD	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKD (配列番号19)
HDKE	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKE (配列番号20)
HDKF	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKF (配列番号21)
HDKG	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKG (配列番号22)
HEKA	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKA (配列番号16)
HEKB	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKB (配列番号17)
HEKC	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKC (配列番号18)
HEKD	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKD (配列番号19)
HEKE	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKE (配列番号20)
HEKF	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKF (配列番号21)
HEKG	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKG (配列番号22)
HFKA	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKA (配列番号16)
HFKB	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKB (配列番号17)
HFKC	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKC (配列番号18)
HFKD	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKD (配列番号19)
HFKE	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKE (配列番号20)
HFKF	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKF (配列番号21)
HFKG	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKG (配列番号22)
HGKA	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKA (配列番号16)
HGKB	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKB (配列番号17)
HGKC	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKC (配列番号18)
HGKD	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKD (配列番号19)
HGKE	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKE (配列番号20)
HGKF	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKF (配列番号21)
HGHG	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKG (配列番号22)
HA2KA	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKA (配列番号16)

10

20

30

40

【表 3 - 3】

HA2KB	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKB (配列番号17)
HB2KA	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKA (配列番号16)
HB2KB	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKB (配列番号17)
HA2KF	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKF (配列番号21)
HB2KF	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKF (配列番号21)
HA2KC	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKC (配列番号18)
HA2KD	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKD (配列番号19)
HA2KE	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKE (配列番号20)
HA2KF	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKF (配列番号21)
HA2KG	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKG (配列番号22)
HB2KC	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKC (配列番号18)
HB2KD	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKD (配列番号19)
HB2KE	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKE (配列番号20)
HA2KFmut	2E2 RHA2 (配列番号9)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HB2KFmut	2E2 RHB2 (配列番号10)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HEKAmut	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKA F-Y mut (配列番号23)
HEKFmut	2E2 RHE (配列番号6)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HAKFmut	2E2 RHA (配列番号2)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HBKFmut	2E2 RHB (配列番号3)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HCKFmut	2E2 RHC (配列番号4)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HDKFmut	2E2 RHD (配列番号5)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HFKFmut	2E2 RHF (配列番号7)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
HGKFmut	2E2 RHG (配列番号8)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
RHE Y-VKA	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKA (配列番号16)
RHE Y-VKB	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKB (配列番号17)
RHE Y-VKC	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKC (配列番号18)
RHE Y-VKD	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKD (配列番号19)
RHE Y-VKE	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKE (配列番号20)
RHE Y-VKF	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKF (配列番号21)
RHE Y-VKG	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKG (配列番号22)

10

20

30

40

【表 3 - 4】

RHE E-DKA	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKA (配列番号16)
RHE E-DKB	2E2 RHE E-D (配列番号12)	2E2 RKB (配列番号17)
RHE E-DKC	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKC (配列番号18)
RHE E-DKD	2E2 RHE E-D (配列番号12)	2E2 RKD (配列番号19)
RHE E-DKE	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKE (配列番号20)
RHE E-DKF	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKF (配列番号 21)
RHE E-DKG	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKG (配列番号 22)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
RHE S-GKA	2E2 RHE S-G (配列番号 11)	2E2 RKA (配列番号16)
RHE S-GKB	2E2 RHE S-G (配列番号11)	2E2 RKB (配列番号 17)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (配列番号11)	2E2 RKC (配列番号18)
RHE S-GKD	2E2 RHE S-G (配列番号11)	2E2 RKD (配列番号19)
RHE S-GKE	2E2 RHE S-G (配列番号 11)	2E2 RKE (配列番号 20)
RHE S-GKF	2E2 RHE S-G (配列番号 11)	2E2 RKF (配列番号 21)
RHE S-GKG	2E2 RHE S-G (配列番号 11)	2E2 RKG (配列番号 22)
RHEトリプル-KA	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKA (配列番号16)
RHEトリプル-KB	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKB (配列番号17)
RHEトリプル-KC	2E2 RHEトリプル (配列番号14)	2E2 RKC (配列番号18)
RHEトリプル-KD	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKD (配列番号 19)
RHEトリプル-KE	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKE (配列番号 20)
RHEトリプル-KF	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKF (配列番号21)
RHEトリプル-KG	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKG (配列番号 22)
RHEトリプル-KFmut	2E2 RHEトリプル (配列番号 14)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号 24)
RHE Y-VKFmut	2E2 RHE Y-V (配列番号13)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号24)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (配列番号 12)	2E2 RKF F-Y mut (配列番号 24)

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 4. 2E2抗体バリエーションおよびヒト化抗体バリエーション由来のHVRのアミノ酸配列

抗体鎖	HVR1	HVR2	HVR3
2E2 抗体			
重鎖	IYGAH 配列番号 61	VIWAGGSTNYSALMS 配列番号 62	DGSSPYYSMEY 配列番号 63

【表 4 - 2】

軽鎖	SATSSVSYMH 配列番号 64	STSNLAS 配列番号 65	QQRSSYPFT 配列番号 66
<i>ヒト化重鎖バリエント 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2, および 2E2 RHB2</i>			
重鎖	IYGAH 配列番号 61	VIWAGGSTNYNSALMS 配列番号 62	DGSSPYYYSMY 配列番号 63
<i>ヒト化軽鎖バリエント 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF, および 2E2 RKG</i>			
軽鎖	SATSSVSYMH 配列番号 64	STSNLAS 配列番号 65	QQRSSYPFT 配列番号 66
<i>ヒト化重鎖バリエント 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V, および 2E2 RHE トリプル</i>			
2E2 RHE S-G	IYGAH 配列番号 61	VIWAGGSTNYNSALMS 配列番号 62	DGSSPYYYGMEY 配列番号 67
2E2 RHE E-D	IYGAH 配列番号 61	VIWAGGSTNYNSALMS 配列番号 62	DGSSPYYYSMIDY 配列番号 68
2E2 RHE Y-V	IYGAH 配列番号 61	VIWAGGSTNYNSALMS 配列番号 62	DGSSPYYYSMYV 配列番号 69
2E2 RHE トリプル	IYGAH 配列番号 61	VIWAGGSTNYNSALMS 配列番号 62	DGSSPYYYGMDV 配列番号 70
<i>ヒト化軽鎖バリエント 2E2 RKA F-Y および 2E2 RKF F-Y</i>			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYMH 配列番号 64	STSNLAS 配列番号 65	QQRSSYPYT 配列番号 71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYMH 配列番号 64	STSNLAS 配列番号 65	QQRSSYPYT 配列番号 71

10

20

【表 5 - 1】

表 5. E2抗体バリエーションおよびヒト化抗体バリエーション由来のFRのアミノ酸配列

重鎖	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QVQLKESGPGGLVA PSQSLSTICTVSGFS LT (配列番号 25)	WVRQPPGKGLEW LG (配列番号 30)	RLSISKDNSKSQLV LKINSLQTDDTAL YYCAR (配列番号 37)	WGQGTSVTVSS (配列番号 44)
2E2 RHA	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号 26)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号 31)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号 38)	WGQGTITVTVSS (配列番号 45)
2E2 RHB	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGF SLT (配列番号 27)	WVRQAPGKGLEW LG (配列番号 32)	RLSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号 39)	WGQGTITVTVSS (配列番号 45)
2E2 RHC	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGF SLT (配列番号 27)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号 31)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号 38)	WGQGTITVTVSS (配列番号 45)

10

20

【表 5 - 2】

2E2 RHD	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW LS (配列番号33)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号38)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	
2E2 RHE	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VG (配列番号34)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号38)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	10
2E2 RHF	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号31)	RLISKDNSKNTV YLQMNSLRAEDTA VYYCAR (配列番号40)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	
2E2 RHG	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号31)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号41)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	
2E2 RHA2	QVQLQESGPGLVK PSIFLSTCTVSGG SIS (配列番号28)	WIRQPPGKGLEW G (配列番号35)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCAR (配列番号42)	WGQGTIVTVSS (配列番号46)	20
2E2 RHB2	QVQLQESGPGLVK PSIFLSTCTVSGF SLT (配列番号29)	WVRQPPGKGLEW LG (配列番号36)	RLISKDNSKNTVY LKLSSVTAADTAV YYCAR (配列番号43)	WGQGTIVTVSS (配列番号46)	
2E2 RHE S-G	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VG (配列番号34)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号38)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	30
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VG (配列番号34)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号38)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VG (配列番号34)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号38)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	40
2E2 RHE トリプル	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (配列番号26)	WVRQAPGKGLEW VG (配列番号34)	RFISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (配列番号38)	WGQGTIVTVSS (配列番号45)	

【表 5 - 3】

軽鎖	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMASASP GIEKVSITC (配列番号47)	WIFQQKPGTSPKLV IY (配列番号50)	GVPVRI:SGSGSGTIS YSLTISRMEAEEDA ATYYC (配列番号54)	FGSGTKLEIK (配列番号59)
RKA	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WIFQQKPGQAPRLI IY (配列番号51)	GIPARF:SGSGSGTID FTLTISSELEPEDEFAV YYC (配列番号55)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKB	EIILTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号49)	WIFQQKPGQAPRLI WIY (配列番号52)	GVPARF:SGSGSGT DYTLTISSELEPEDE AVYYC (配列番号56)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKC	EIILTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号49)	WIFQQKPGQAPRLI IY (配列番号51)	GIPARF:SGSGSGTID FTLTISSELEPEDEFAV YYC (配列番号55)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKD	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WIFQQKPGQAPRLI WIY (配列番号52)	GIPARF:SGSGSGTID FTLTISSELEPEDEFAV YYC (配列番号55)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKE	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WIFQQKPGQAPRLI IY (配列番号51)	GVPARF:SGSGSGT DFLTISSELEPEDEFA VYYC (配列番号57)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKF	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WIFQQKPGQAPRLI IY (配列番号51)	GIPARF:SGSGSGTID YTLTISSELEPEDEFA VYYC (配列番号58)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKG	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WYQQKPGQAPRLI LIY (配列番号53)	GIPARF:SGSGSGTID FTLTISSELEPEDEFAV YYC (配列番号55)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WIFQQKPGQAPRLI IY (配列番号51)	GIPARF:SGSGSGTID FTLTISSELEPEDEFAV YYC (配列番号55)	FGPGTKLDIK (配列番号60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (配列番号48)	WIFQQKPGQAPRLI IY (配列番号51)	GIPARF:SGSGSGTID YTLTISSELEPEDEFA VYYC (配列番号55)	FGPGTKLDIK (配列番号60)

10

20

30

40

【0263】

クローンを配列決定し、製造元のプロトコールに従ってプラスミドミニプレップキット (Qiagen) または Pure Yield プラスミドマキシプレップシステム (Promega) を使用して、発現プラスミドDNAを調製した。ヒト化またはキメラVHおよび

50

びV Kをコードする発現プラスミド調製物を使用して、実施例1における上述の通り、E x p i 2 9 3細胞 (I n v i t r o g e n) をトランスフェクトした。細胞を無血清培地において7日間培養し、その上で、細胞由来の馴化培地を収集し、E L I S Aによりアッセイして、抗体の産生を確認した。

【0264】

ヒト化V HおよびV K構築物にコードされる抗体によるシグレック - 8 結合

ヒト化設計に伴ういずれが著しい問題を同定する試みにおいて、基本のヒト化重および軽鎖を、そのキメラカウンターパートとペアにした。シグレック - 8 抗原を使用して、実施例1に記載されている通り、E L I S Aにより抗体結合を測定した。2 E 2 R H Bは、キメラ軽鎖とペアになった場合、R H A重鎖よりも強力であると思われたが、重鎖キメラ構築物 (c V H) に会合したR K B構築物は、ペア化c V K構築物の両方よりも高い効力でシグレック - 8 抗原に結合した。これらの結果は、重および軽鎖両方のためのヒト化設計が、おおよそ正確であり、全てシグレック - 8 に結合したが、さらなる研究が、より優れた結合特徴を有する追加的なヒト化抗体の同定に必要とされることを確認した。

10

【0265】

キメラカウンターパートと組み合わせた完全ヒト化抗体によるシグレック - 8 結合

完全ヒト化抗体重および軽鎖を組み合わせ、キメラ抗体と比較した場合の4 およびカノニカルフレームワーク残基ならびに接合点残基の置き換えが、2 E 2のヒト化成功に十分であるか決定した。E x p i 2 9 3細胞を、異なるヒト化重鎖ベクターに会合した異なるヒト化軽鎖ベクターの組合せでコトランスフェクトした。シグレック - 8 抗原を使用して、実施例1に記載されている通り、E L I S Aにより抗体結合を測定した。キメラ対照と比較した、シグレック8へのこれらの抗体の結合は、H B K AおよびH B K Bが、H A K AおよびH A K Bよりも優れた組合せであると思われることを示した(表6)。

20

【0266】

完全ヒト化抗体によるシグレック - 8 結合

重鎖における単一アミノ酸置換の相対的な重要性を決定するために、ヒト化重鎖R H C (A 2 4 V)、R H D (V 4 8 L)、R H E (S 4 9 G)、R H F (F 6 7 L)およびR H G (T 6 8 S)を全軽鎖バリエーションと組み合わせて発現させ、R H AおよびR H Bバージョンならびにキメラ抗体対照と比較した。シグレック - 8 E C Dに結合するこれらの抗体の結果は、これらのヒト化抗体組合せが全て、ファミリーR H A、R H FおよびR H G (全軽鎖バリエーションと)を除いて、同じ効力でシグレック - 8 に結合したことを示唆した(表6)。

30

【0267】

次に、単一アミノ酸置換により、R K AからR K Bに軽鎖を変化させると、抗体結合に影響を与えるか決定した。キメラ抗体ならびにR K AおよびR K Bバージョンと比較した場合に、軽鎖R K C (V 3 I)、R K D (V 4 8 L)、R K E (L 4 7 W)およびR K F (E 5 8 V)と全重鎖バリエーションとの組合せからなる抗体の結合を評価した。結合のパターンに有意に影響を与えた軽鎖バリエーションが存在するようには思われなかった(表6)。加えて、全重鎖バリエーションと組み合わせて、軽鎖生殖系列残基F 7 1 Y (R K G)の関連性も試験したところ、結果は、この残基が概して、大幅な結合減退を引き起こしたことを実証した。

40

【0268】

H E K AおよびH E K Fが、シグレック - 8 に対する最良の候補抗体であると思われた。したがって、E L I S Aを行って、対照としてのキメラ抗体ならびにH E K AおよびH E K Fの両方と比較した場合に、抗原に最高の効力で結合した抗体を再検査した。結果は、ヒト化重およびヒト化軽鎖の異なる組合せが、R H Aとの組合せは別として、シグレック - 8と同様の仕方で結合したことを示した(表6)。結果は、H E K AおよびH E K Fが、非常に優れた候補であり、キメラ陽性対照と有利に比較され、フレームワークに最小マウス残基を有したことを強調した。

【0269】

50

2 E 2 R Hバージョン2およびCDR変異バリエーションの作製

その後のヒト化重鎖は、最も近縁の生殖系列遺伝子に基づき作製した。2 E 2 V Hと最も類似の生殖系列であるIGHV4-59生殖系列配列(図1)を使用して、マウスCDRのグラフトを設計し、上述の他の構築物と同じ方式で合成(GenScript)および調製して、第1のバージョンのRHAおよびRHB鎖との比較のためのヒト化抗体を作製した。加えて、抗体が、生殖系列に変化されたある特定のCDR3残基に耐容性を示し得るか決定するために、部位特異的変異誘発により、RHEバリエーション重鎖のCDR3に3個の変異を導入し(単一およびトリプル変異)、RKAおよびRKF軽鎖のCDR3に1個の変異(図3)を導入した。上述の同じ方法を使用して、RHE変異またはRKA/RKF変異を含有する抗体を発現させ、相補鎖の完全パネルと組み合わせた。

10

【0270】

ヒト生殖系列にグラフトされた重鎖CDRを、他の重鎖バージョンと比較した。ストレートグラフト(RHA2)は、抗原への結合を完全に崩壊し、マウスに復帰変異した4/VCI残基を有する生殖系列フレームワーク(RHB2)は、第1のRHBバリエーションと非常に同様に挙動したが、RHBの5個と比較して10個のマウス残基を含有した。結合データは、両方の鎖のCDR3における変異の導入の影響を図解し、重鎖における変異が、シグレック-8への結合に有害な効果を有した一方、軽鎖変異も、そのまま、さらなる改善をもたらさなかったが、最良の抗体が、RHB(全マウス復帰変異)およびRHE、重鎖候補を含有する抗体であったことを示唆した(表6)。

【表 6 - 1】

表 6. ヒトシグレック-8 ECDに結合する抗体

ヒト化抗体							
抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)
ПАКА	0.058	ПСКА	0.056	ПЕКА	0.112	ПГКА	0.061
ПАКВ	0.071	ПСКВ	0.065	ПЕКВ	0.057	ПГКВ	0.134
ПАКС	0.066	ПСКС	0.058	ПЕКС	0.065	ПГКС	0.065
ПАКD	0.058	ПСКD	0.049	ПЕКD	0.070	ПГКD	0.047
ПАКE	0.052	ПСКE	0.059	ПЕКE	0.205	ПГКE	0.116
ПАКF	0.062	ПСКF	0.050	ПЕКF	0.097	ПГKF	0.088
ПАКG	0.189	ПСКG	0.273	ПЕКG	0.302	ПГKG	0.254
HBKA	0.070	HDKA	0.067	ch2F2 精製	0.062	VHVK	0.043
HBKB	0.056	HDKB	0.055			eVHKA	NA
HBKC	0.033	HDKC	0.057			eVHKB	0.027
HBKD	0.039	HDKD	0.048			HAcVK	0.067
HBKE	0.061	HDKE	0.065			HBcVK	0.066
HBKF	0.051	HDKF	0.057			ch2F2 精製	0.062
HBKG	0.212	HDKG	0.113				
ch2F2 精製	0.044	ch2F2 精製	0.062				
ヒト化抗体							
抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)		
ch2C4	0.057	ch2C4	0.079	ch2C4 T1	0.075		
HFKA	0.106	ПАКА	0.085	ПА2КА	NA		
HFKB	0.099	ПАКF	0.078	ПА2KB	124.30		
HFKC	0.063	HBKA	0.055	HB2KA	NA		
HFKD	0.058	HBKF	0.066	HB2KB	0.051		
HFKE	0.104	HA2KF	8.719	ch2C4	0.069		
HFKF	0.118	HB2KF	0.063	ПА2KC	0.488		
HFKG	0.355	ПЕКА	0.068	ПА2KD	NA		
		ПЕКВ	0.063	HA2KE	NA		
		ПЕКС	0.069	ПА2KF	NA		

10

20

30

40

【表 6 - 2】

		HEKD	0.059	HA2KG	NA		
		HEKE	0.057	HB2KC	0.101		
		HEKF	0.064	HB2KD	0.075		
		HEKF T2	0.064	HB2KE	0.087		
		mo2C4	0.115	HB2KF	0.089		
				HB2KG	0.227		
CDR ヒト抗体バリエーション							
抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)		
ch2C4	0.052	ch2C4	0.208	ch2C4	0.057		
RHE Y-V KA	0.088	RHE S-GKA	50.620	HAKFmut	0.086		
RHE Y-V KB	0.306	RHE S-GKB	626.900	HBKFmut	0.048		
RHE Y-V KC	0.215	RHE S-GKC	173.300	HCKFmut	0.078		
RHE Y-V KD	0.283	RHE S-GKD	8.647	HDKFmut	0.056		
RHE Y-V KE	0.070	RHE S-GKE	NA	HEKFmut	0.072		
RHE Y-V KF	0.091	RHE S-GKF	3.279	HFKFmut	0.057		
RHE Y-V KG	8.808	RHE S-GKG	33.540	HEKFmut	0.062		
RHE E-D KA	0.388	RHE トリプル-KA	18.640				
RHE E-D KB	0.289	RHE トリプル-KB	NA				
RHE E-D KC	0.516	RHE トリプル-KC	NA				
RHE E-D KD	0.316	RHE トリプル-KD	13.200				
RHE E-D KE	0.364	RHE トリプル-KE	34.060				
RHE E-D KF	0.445	RHE トリプル-KF	NA				
RHE E-D KG	NA	RHE トリプル-KG	NA				
CDR ヒト抗体バリエーション							
抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)	抗体	EC50 (nM)		
ch2C4	0.075	ch2C4	0.075	ch2C4	0.175		
HEKA	0.054	HA2KA	NA	RHE S-G KFmut	207.100		
HEKE	0.042	HA2KB	124.300	RHE トリプル KFmut	NA		
HEKF	0.074	HA2KFmut	31.610	HEKF	0.052		
RHE Y-V KFmut	0.398	HB2KA	0.051	HEKA	0.064		
RHE E-D KFmut	1.399	HB2KB	0.069				
		HB2KFmut	0.080				

注記：各段は、1つの実験を表す；NAは、入手不可能を示す。

【0271】

高温に対するヒト化候補抗体の熱安定性

ヒト化抗体の熱安定性を比較した。抗体を、-20～85 に変動する、より高い温度

10

20

30

40

50

に10分間付し、室温へと冷却し、各候補のEC80濃度におけるELISAアッセイにおいて評価した。リード抗体候補は、安定的に思われた(図4)。HEKA/KFとCDRL3(すなわち、軽鎖のCDR3)変異抗体は、68において完全に不活性であったが、キメラは、70で不活性であり、この温度において、リード候補HEKAおよびHEKFは、依然として25~50%活性を有し、75でようやく完全不活性を示した。

【0272】

ヒト化候補抗体T_mの決定

リード抗体の融解温度を決定するために、CDRL3(すなわち、軽鎖のCDR3)変異を有するキメラ、HEKA、HEKFおよび同じヒト化候補を、2ステップ親和性クロマトグラフィーおよびゲル濾過システムにおいて精製し、熱シフトアッセイにおいて検査した。2種の異なる濃度で抗体を蛍光色素(Sypro Orange)と共に、qPCRサーマルサイクラーにおいてサイクル毎に1増加させつつ71サイクルインキュベートした。T_mは、50%最大蛍光の温度として定義された。キメラおよび5種のヒト化抗体のT_mは、熱安定性アッセイで得られた結果を確認した:最も安定的な抗体は、検査した他のヒト化抗体よりも高いT_mを有するHEKAおよびHEKFであった。HEKAは、キメラ抗体よりも高いT_mを有する(図5および表7)。

【表7】

表7. キメラ抗体およびヒト化抗体のT_m

抗体	TM
chVHVK 2uM	71 °C
chVHVK 1uM	71 °C
HEKA 2uM	72 °C
HEKA 1uM	72 °C
HEKF 2uM	70 °C
HEKF 1uM	70 °C
HEKAmut 2uM	68 °C
HEKAmut 1uM	68 °C
HEKFmut 2uM	67 °C
HEKFmut 1uM	68 °C

【0273】

ヒト化候補抗体の親和性およびアビディティ

Biacore T200を使用したSPR解析により、抗体アビディティ決定を行った。マウス、キメラおよびヒト化抗シグレック-8抗体へのヒトシグレック-8 EC Dタンパク質の結合をBiacore T100において測定した。捕捉抗体(ヤギ-抗ヒト-Fcおよびヤギ-抗マウス-Fc、Jackson ImmunoResearch製)を製造元のプロトコール(Biacore、GE)に従ってCM5チップに固定化した。フローセル1、2および3を抗ヒトで、フローセル4を抗マウス抗体で固定化した。アッセイを25、流速30μl/分で行った。アッセイバッファーは、超純水において作成した20mM Tris-HCl pH8.3、150mM塩化ナトリウム、0.05%ポリソルベート20、10%グリセロール、0.1%BSAであった。二量体シグレック-8(単量体および多量体シグレック-8の不純物は、分子ふるいクロマトグラフィーにより除去した)を、アッセイバッファーにおいて15nMから1.88pMへと2倍希釈で希釈した。およそ120RUの変化まで抗体を捕捉した。6分間高速注射、続い

て120分間解離を行った。フローセルを50mMグリシンpH1.5で再生した。結果は、空の参照セルおよび複数のアッセイバッファー注射により二重にブランク作成し、1:1グローバルフィットパラメータにより解析した。

【0274】

マウス2E2およびキメラ2E2抗体のアビディティは、それぞれ28pMおよび16pMであると決定された(表8)。ヒト化抗体のアビディティは、HEKAが17pM、HEKFが21pMであり、この結果は、ヒト化が、結合活性の保持および増強に成功したことを示した。

【表8】

表 8. マウス抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体のアビディティ決定

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
マウス 2E2	5.56E+05	1.54E-05	28
キメラ 2E2	8.51E+05	1.32E-05	16
HEKA	6.38E+05	1.11E-05	17
HEKF	6.78E+05	1.40E-05	21

10

【0275】

バイオレイヤーインターフェロメトリー(ForteBio)により抗体親和性決定も行った。ヒトシグレック-8タンパク質へのマウス、キメラおよびヒト化抗シグレック-8抗体Fab断片の結合をForteBio Octet Red 384において測定した。アッセイバッファーにおいて25で1000のRPMにてアッセイを行った。HBSバッファーと1xForteBio Kineticsバッファーを、ストック溶液(それぞれBiacore BR-10670、ForteBio18-132)から超純水において作成した。Fab断片(製造元の仕様書に従いThermo-Pierce固定化パインで抗体を消化した)を、アッセイバッファーにおいて50nMから1.56nMへと2倍希釈で希釈した。シグレック-8-Fcタグ付けタンパク質を、およそ1.2のnm変化まで、アッセイバッファーにおいて100nMで抗ヒト捕捉センサーに3

20

30

【0276】

マウス2E2およびキメラ2E2 Fab断片の親和性は、それぞれ536pMおよび585pMであると決定された(表9)。ヒト化抗体の親和性は、HEKAが464pM、HEKFが592pMであり、この結果は、ヒト化が、これら2種のヒト化抗体の結合活性の保持に成功したことを示した。HEKAは、このアッセイにおいてマウスおよびキメラ2E2よりも高いシグレック-8に対する一価親和性を有した。ヒト化抗体バリエーション、HEKA mutおよびHEKF mutの親和性は、それぞれ902pMおよび1160pMのKDによるピコモル濃度範囲でもあった。

40

【表 9】

表 9. マウス抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体の親和性決定

Antibody	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (pM)
マウス 2E2	1.14E+06	6.12E-04	536
キメラ 2E2	9.51E+05	5.56E-04	585
HEKA	1.04E+06	4.82E-04	464
HEKF	9.20E+05	5.45E-04	592
HEKAmut	7.26E+05	6.55E-04	902
HEKFmut	4.45E+05	5.16E-04	1160

10

【0277】

ヒト化候補抗体の溶解性

遠心分離フィルター装置 (Amicon 30K 4mL、4000g、5分間 - 最初の濃縮; Amicon Ultra 0.5mL 3K、14000g - 次の濃縮) を使用して、精製されたキメラおよび候補抗体を逐次的に濃縮し、各ステップで濃度を測定した。全試料を沈殿することなく総計で最大21~24倍に濃縮し、ELISAにより検査したところ、シグレック-8に対する結合効力を失ったものはないことが示された。抗体は、少なくとも25mg/mLまでの濃度で沈殿する傾向がなかった。特に、ch2E2の溶解性は、少なくとも18mg/mLであり、HEKAは、少なくとも25mg/mL、HEKFは、少なくとも8mg/mL、HEKAmutは、少なくとも29mg/mL、HEKFmutは、少なくとも17mg/mLであった。

20

【0278】

ヒト化候補抗体の凝集

解析に先立ち試料を濾過し、いかなる塩またはタンパク質沈殿も除去し、濃度を再度測定した。続いて、これを0.4mL/分で、HPLCシステムにおける分子ふるいカラムへと注射し、多角度光散乱により解析して、絶対モル質量を決定し、凝集をチェックした。全バリエントが、134.9~138.2kDaに及ぶ平均分子量による凝集の徴候を示さなかったが、この結果は、この解析におけるIgG単量体の予想の範囲であった(表10)。

30

【0279】

全試料は、単分散 ($M_w/M_n < 1.05$) であった。しかし、分布解析プロットは、グリコシル化バリエント (ch2C4、HEKAおよびHEKFmut) の存在を示した。分布解析プロットは、全試料における約105~120kDa種の存在も示し、これは、崩壊した抗体または低グリコシル化バリエントである可能性がある。質量回収は、82.9~102.8% (注射された質量を上回る計算された質量) の間であり、この結果は、優れたタンパク質回収を示し、試料は、カラムに固着したりまたは不溶性の凝集体を含有したりしなかったようであり、このような凝集体はガードカラムによって保持されたものと予想される。全体的に見て、データは、解析した抗シグレック-8抗体試料のいずれにも有意な凝集体が存在しないことを示した(表10)。

40

【表 10】

表 10. キメラバリエント抗体およびヒト化バリエント抗体の凝集解析

	MW (kDa)	不確実性	多分散 (Mw/Mn)	不確実性	計算された 質量 (μg)	質量 分率 (%)	質量 回収率 (%)
ch2C4	138.7	0.80%	1.01	1.10%	11.02	100	96.6
ch2C4	134.6	0.80%	1.017	1.10%	10.86	100	95.2
平均	136.6		1.013		10.94	100	95.9
% 標準偏差	2.1		0.445		0.11	0	1
HEKA	134	0.90%	1.03	1.30%	15	100	102.8
HEKA	135.9	0.90%	1.01	1.30%	14.4	100	98.6
平均	134.9		1.02		14.7	100	100.7
% 標準偏差	1		0.014		0.43	0	2.9
HEKA Mut	135.4	0.80%	1.013	1.10%	13.61	100	98.8
HEKA Mut	137.3	0.90%	1.011	1.30%	13.68	100	99.3
平均	136.3		1.012		13.65	100	99
% 標準偏差	1.3		0.001		0.05	0	0.4
HEKF	291	13.90%	1.742	14.40%	4.83	100	88.1
HEKF	138.2	0.80%	1.01	1.10%	4.54	100	82.9
平均	214.6		1.376		4.69	100	85.5
% 標準偏差	50.3		37.622		4.31	0	4.3

10

20

【0280】

ヒト化候補抗体の凍結融解安定性

精製されたキメラ ch2C4 抗体、ヒト化 HEKA および HEKF 抗体ならびにヒト化 HEKA mut および HEKF mut 抗体バリエントを、60 分間 -20℃ に付し、室温で解凍し、候補毎に EC80 濃度における ELISA アッセイにおいて使用した。HEKA が、このアッセイにおいて最高の安定性を示した (図 6)。

30

【0281】

非フコシル化抗体の ADCC 活性

材料

RBC 溶解バッファー (10 × RBC 溶解バッファー) : 製造元の指示通りに 1 × へと希釈 (eBioscience、00-4300-54)。

【0282】

PBS : DPBS、Ca²⁺ / Mg²⁺ 不含 (Hyclone、SH30028.02)。

【0283】

完全 RPMI : 滅菌濾過した RPMI - 1640 (Invitrogen)、10% FBS 含有。

40

【0284】

96 ウェル U 字底プレート (Falcon、353077)。

【0285】

LDH アッセイ : Cytotoxic 96 非放射性細胞傷害アッセイ (Promega、G1780)。

【0286】

固定バッファー : PBS における 1 ~ 4% パラホルムアルデヒド。PBS (Electron Microscopy Diatom、50-980-488) において希釈することにより 16% パラホルムアルデヒド (EM グレード、メタノール不含) から調製。

【0287】

50

方法

好酸球における抗シグレック - 8 抗体の A D C C およびアポトーシス活性を検査するために、新鮮末梢血白血球 (P B L) を、キメラおよびマウス 2 E 2 抗体と共にインキュベートした。低フコースキメラ 2 E 2 I g G 1 抗体は、好酸球の最も強力な死滅を示し、フコシル化キメラ 2 E 2 I g G 1 よりも有意に高い効力を有し、低フコース型の抗体のより高い A D C C 活性と一貫した (図 7) 。

【 0 2 8 8 】

総末梢血白血球における抗シグレック - 8 抗体活性の評価のため、収集から 2 4 時間未満の採取されたドナー血液から標準方法によって P B L を得て、完全 R P M I 培地に再懸濁する。細胞を計数し、完全 R P M I 培地において $1.0 \times 10^6 / \text{mL}$ となるよう調整し、無菌 9 6 ウェル U 字底プレートで $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ にて平板培養する。抗シグレック - 8 抗体を $0.0001 \text{ ng} / \text{mL} \sim 10 \mu\text{g} / \text{mL}$ の間の濃度で添加する。プレートを 200 g で 1 分間遠心分離し、加湿 3 7 インキュベーター内で $5\% \text{ CO}_2$ にて > 4 時間インキュベートする。フローサイトメトリーによって細胞集団を評価して、例えば、表 1 1 に示す試薬を使用し、フローサイトメトリーによって評価して、好酸球および好塩基球の枯渇を査定する。CCR3 陽性、CD16 陰性顆粒細胞 (高い側方散乱) の細胞の除去を使用して、好酸球の枯渇を検出することができる。好塩基球数は、例えば、CCR3 陽性低側方散乱細胞の解析により決定することができる。

【 表 1 1 - 1 】

表 11. 試薬

標的	フォーマット	クローン	標的種	宿主	アイソタイプ	ベンダー	カタログ番号
7AAD	7AAD	N/A	N/A	N/A	N/A	BD	559925
アネキシン V	PE	N/A	N/A	N/A	N/A	BD	559763
CD117	APC	A3C6E2	ヒト	マウス	IgG ₁	Miltenyi	130-091-733
CD16	FITC	3G8	ヒト	マウス	IgG ₁	BD	555406

【 表 1 1 - 2 】

CD193 (CCR3)	Alexa Fluor® 647	5E8	ヒト	マウス	IgG _{2b}	BD	558208
CDw125 (IL-5Rα)	PE	A14	ヒト	マウス	IgG ₁	BD	555902
切断型 PARP	Alexa Fluor® 647	F21-852	ヒト	マウス	IgG ₁	BD	558710
FCεR1α	FITC	AER-37 CRA1	ヒト	マウス	IgG _{2b}	Miltenyi	130-095-978
アイソタイプ IgG ₁	PE	MOPC-21	N/A	マウス	IgG ₁	BD	555749
アイソタイプ IgG _{2b}	FITC	27-35	N/A	マウス	IgG _{2b}	BD	555742
アイソタイプ IgG _{2b}	APC	eBMG2b	N/A	マウス	IgG _{2b}	eBioscience	17-4732

【 0 2 8 9 】

精製された好酸球におけるアポトーシスを誘導する抗シグレック - 8 抗体の能力の評価のため、血液試料からの収集から 2 4 時間未満に採取した新鮮パフィーコートまたは均等な血液製剤を使用する。製造元の説明書 (Miltenyi 好酸球単離キット、130-092-010) に従って好酸球の精製を行う。精製された好酸球を $1 \times 10^6 / \text{mL}$ で完全 R P M I 培地に再懸濁し、IL-5 (約 $1 \text{ ng} / \text{mL} \sim$ 約 $50 \text{ ng} / \text{mL}$ の濃度で)

の存在または非存在下で一晩培養する。翌日、プレートまたはフラスコの反復した洗浄により、培養された好酸球を収集する。細胞を $200 \sim 400$ gで10分間未満遠心分離し、 1×10^6 / mLで完全RPMI培地に再懸濁する。好酸球を $100 \mu\text{L}$ / ウェルで無菌96ウェルU字底プレートで平板培養する。完全RPMI培地に調製した $100 \mu\text{L}$ の $2 \times$ 試薬を各ウェルに添加し、上述通りに希釈物を調製する。プレートを 200 gで1分間遠心分離し、加湿37 インキュベーター内で $5\% \text{CO}_2$ にて4時間インキュベートする。製造元の説明書に従ってアネキシン-V染色を行い、アポトーシスおよび壊死細胞をフローサイトメトリーによって解析する。

【0290】

単離された肥満細胞における抗シグレック-8抗体のADCCおよびアポトーシス活性の評価のため、ヒト肥満細胞は、発表されたプロトコル(Guhlら、BioSci. Biotechnol. Biochem.、2011年、75巻:382~384頁; Kulkaら、In Current Protocols in Immunology、2001年(John Wiley & Sons, Inc.))に従ってヒト組織から単離する、または例えばYokoiら、J Allergy Clin Immunol.、2008年、121巻:499~505頁に記載されている通りに、ヒト造血幹細胞から分化させる。精製された肥満細胞を 1×10^6 / mLで無菌96ウェルU字底プレートにおける完全RPMI培地に再懸濁し、 $0.0001 \text{ ng/mL} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の間に及ぶ濃度の抗シグレック-8抗体の存在または非存在下で30分間インキュベートする。精製されたナチュラルキラー(NK)細胞または新鮮PBLありまたはなしで、試料をさらに4~16時間インキュベートして、ADCCを誘導する。肥満細胞を検出するための蛍光コンジュゲート抗体(CD117およびFcR1)ならびに生きておりおよび死んでいるまたは瀕死の細胞を識別するためのアネキシン-Vおよび7AADを使用したフローサイトメトリーにより、アポトーシスまたはADCCによる細胞死滅を解析する。製造元の説明書に従ってアネキシン-Vおよび7AAD染色を行う。

【0291】

*in vitro*におけるヒト化抗体の好酸球枯渇活性の評価

マウス2E2抗体と比較した場合の正常ヒト血液由来の好酸球のシグレック-8媒介性枯渇を誘導するその能力に関してヒト化抗体を*in vitro*で評価した。

【0292】

収集後24時間未満に採取されたヒトドナー血液から得た末梢血白血球(PBL)を、完全RPMI培地[(10%胎仔ウシ血清を補充したRPMI-1640培地(Invitrogen、カタログ番号A10491-01))]に再懸濁した。 50 ng/mL 組換えヒトIL-5(R&D Systems、カタログ番号205-IL-025)を補充した完全RPMI培地に、1 mL当たり 10^7 となるよう細胞を調整し、 $100 \mu\text{L}$ / ウェルで無菌96ウェルU字底プレートで平板培養した。 $0.1 \text{ pg/mL} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ (すなわち、 1 pg/mL 、 10 pg/mL 、 0.1 ng/mL 、 1 ng/mL 、 10 ng/mL 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ および $10 \mu\text{g/mL}$)に及ぶ濃度で抗シグレック-8抗体を添加して、用量応答および50%最大好酸球枯渇(EC_{50})をもたらす濃度を決定した。プレートを 200 gで1分間遠心分離し、加湿37 インキュベーター内で $5\% \text{CO}_2$ にて16時間インキュベートした。IL-5の存在下における抗シグレック-8抗体によるPBLの16時間インキュベーションは、シグレック-8媒介性アポトーシスに対し好酸球を感作した。フローサイトメトリーにより細胞集団を評価して、好酸球の枯渇を査定した。CCR3陽性顆粒(高い側方散乱)細胞の除去により好酸球枯渇を検出した。

【0293】

HEKAmut IgG1抗体を除く被験ヒト化抗体のそれぞれは、ヒト好酸球の枯渇に関して、マウス2E2抗体と比較した場合に均等なまたは増加した効力(すなわち、より低い EC_{50})を示した(表12)。HEKA IgG1抗体およびHEKA IgG4抗体は、同様の効力を示したため、ヒト好酸球の枯渇に関する抗体効力は、アイソタイ

10

20

30

40

50

ブに依存しなかった。

【表 1 2】

表 12. *in vitro*における好酸球の枯渇に関するヒト化抗シグレック-8抗体の効力

抗体	アイソタイプ	好酸球の枯渇に関する平均 EC ₅₀ (ng/ml)
2E2	IgG1	6.8
HEKA	IgG1	4.3
HEKA	IgG4	3.9
HEKAmut	IgG1	43.3
HEKF	IgG1	6.7
HEKFmut	IgG1	6.9

10

平均 EC₅₀ は、2 回の独立的アッセイの好酸球枯渇に必要とされる平均最大半量抗体濃度を示す。

【0294】

活性アイソタイプを有する抗シグレック-8抗体は、*in vitro*および*in vivo*においてヒト肥満細胞のADCC媒介性死滅を誘導することができる

強力なFc受容体媒介性ADCC活性を有するヒト化抗シグレック-8抗体を作製するために、フコシル基転移酵素8を欠損するCHO細胞株(Lonza、ポテリジェント(Potelligent)CHOK1SV細胞)からHEKA IgG1抗体を発現させて、1,6フコースを欠如する糖質を有する抗体(すなわち、非フコシル化抗体)を作製した。HEKA IgG1抗体とは異なるシグレック-8の細胞外領域を認識する、マウスIgG2aアイソタイプを有するマウスモノクローナル抗シグレック-8抗体(すなわち、1C3抗体)を実施例3に記載されている通りに作製した。キメラ1H10抗体は、マウスモノクローナル抗体1H10のV-領域およびヒトIgG1カップ定常領域を含有する。10μMキフネンシンの存在下で培養したヒト293TS細胞株からキメラ1H10抗体を発現させて、低フコース抗体を作製し、プロテインA親和性クロマトグラフィーにより精製した。

20

【0295】

ヒト肥満細胞に対しNK細胞媒介性ADCC活性を誘導する非フコシル化HEKA IgG1およびキメラ1H10低フコース抗体の能力を*in vitro*で評価した。ヒト造血幹細胞を生着した免疫不全NSGSマウスの腹腔の洗浄により、初代ヒト肥満細胞を単離した。10μg/mlの非フコシル化HEKA IgG1抗体、キメラ1H10低フコース抗体、HEKA IgG4抗体またはアイソタイプ対照ヒトIgG1抗体と、精製したヒトCD56⁺CD16⁺NKエフェクター細胞と共に、エフェクター対標的細胞(E:T)比10.75:1で肥満細胞を48時間インキュベートした。Cytotoxicity 96細胞傷害アッセイキット(Promega、カタログ番号G1780)を使用して、LDH放出によりADCC活性を決定した。非フコシル化HEKA IgG1抗体およびキメラ1H10低フコース抗体は、48時間後にヒト肥満細胞の顕著なADCC媒介性死滅を誘導した(図8A)。非フコシル化または低フコース抗シグレック-8抗体によって誘導されたLDH放出は、溶解溶液(Promega、カタログ番号G1821)を使用して誘導された最大LDH放出の38~53%であった。

30

40

【0296】

肥満細胞、好酸球および好塩基球の表面においてヒトシグレック-8が選択的に発現されるトランスジェニックマウスモデルにおいて、*in vivo*でシグレック-8陽性肥満細胞を枯渇させる抗シグレック-8抗体の能力を評価した。腹腔内注射により100μgのHEKA IgG4抗体、HEKA IgG1非フコシル化ヒト化抗体、マウス1C3抗体(マウスIgG2aアイソタイプ)またはヒトIgG1アイソタイプ対照抗体でマウスを2回処置した。2回の腹腔内注射を48時間置いて投与し、第2の注射の48時間後に、腹腔の洗浄により腹腔肥満細胞を単離した。非フコシル化HEKA IgG1抗体およびマウス1C3抗体投与は、腹腔肥満細胞の有意な枯渇をもたらした。対照的に、HEKA IgG4抗体は、有意な肥満細胞枯渇を示さず、活性アイソタイプが、肥満細胞

50

の *in vivo* 枯渇に必要とされることを示す (図 8 B)。これらの結果は、シグレック - 8 の細胞外ドメインの異なる領域に対し作製された、活性アイソタイプ、マウス Ig G 2 a アイソタイプまたはヒト Ig G 1 非フコシル化アイソタイプを有する 2 種の異なる抗シグレック - 8 抗体が、*in vivo* でシグレック - 8 陽性肥満細胞を枯渇させることができることを実証する。

【0297】

シグレック - 8 は、急速に内部移行され、したがって、ADCC 活性の誘導に適さないと記載されているため、これらの結果は予想外であった。O'Reilly ら、Trends Pharmacol Sci., 2009 年、30 巻 (5 号) : 240 ~ 248 頁を参照されたい。

10

【0298】

ヒト化抗シグレック - 8 は、*in vivo* でヒト肥満細胞によって媒介される Ig E 誘導性受動皮膚アナフィラキシー反応を阻害する

ヒト造血幹細胞 (HSC) の生着後に大量のヒト肥満細胞を作製することができる免疫不全マウスが記載されている (Tanaka ら、J Immunol., 2012 年、188 巻 (12 号) : 6145 ~ 55 頁)。NSGS と命名されたマウス系統 (Jackson Laboratory) は、IL - 2 受容体ガンマ鎖遺伝子の欠失を有する非肥満糖尿病 / 重度複合免疫不全 (NOD SCID) マウスの派生体である (NSG マウス)。NSG マウスは其上、ヒト造血幹細胞の生着を容易にするため、3 種のヒトサイトカイン (幹細胞因子 [SCF]、IL - 3 および GM - CSF) のトランスジェニックである。NSG マウスの生着後に、ヒト CD 34⁺ 細胞は、ヒト好酸球および増強された数のヒト肥満細胞を作製する。生着 NSG マウスにおける両方の細胞型は、ヒト末梢血および組織から単離される相当する細胞型におけるレベルに匹敵するレベルでシグレック - 8 を発現する。よって、このようなマウスは、*in vivo* でのヒト細胞における抗シグレック - 8 抗体の活性の評価のための魅力的なモデルを提供する。

20

【0299】

肥満細胞活性における抗シグレック - 8 抗体の効果を *in vivo* で評価するために、ヒト化 NSG マウスにおける Ig E 媒介性耳介腫脹モデルを確立した。このモデルにおいて、ハプテンコンジュゲートウシ血清アルブミン (NP - BSA) の全身性注射の 24 時間前の、片耳への特異的モノクローナル抗ハプテン Ig E (抗 NP Ig E) の注射により、受動皮膚アナフィラキシー (PCA)、I 型過敏症反応を誘導した。ヒトイプシロン定常領域を有するキメラ抗 NP Ig E を使用して、ハプテンに対するヒト肥満細胞特異的応答が生じることを確実にし、耳の厚さの変化により、即時型および後期浮腫性応答を測定した。

30

【0300】

アッセイの 8 ~ 12 週間前に、NSG マウスにヒト CD 34⁺ HSC を生着した。ヒト定常領域を有するキメラモノクローナル抗 NP Ig E を、100 ng の用量でマウスの右耳に皮内注射して、マウス皮膚肥満細胞ではなくヒト肥満細胞を感作し、PBS を左耳に皮内注射した。24 時間後、0.5 mg NP - BSA の静脈内注射により PCA を誘導した。抗 NP Ig E による感作 24 時間前または感作 2 時間後に、静脈内注射により、0.1 mg 抗シグレック - 8 抗体 (すなわち、HEKA Ig G 4 抗体) またはヒト Ig G 4 アイソタイプ対照抗体をマウスに投薬した。誘導後最大 4 時間目および誘導後 24 時間目の時点で耳の厚さを測定して、それぞれ初期および後期耳介腫脹応答を決定した。

40

【0301】

HEKA Ig G 4 抗体は、*in vivo* モデルにおけるこの PCA における初期および後期皮膚性アレルギー反応の両方を予防または阻害した (図 9)。このモデルにおいて、初期反応は、肥満細胞脱顆粒およびヒスタミン放出に依存するが、後期反応は、サイトカインを含む *de novo* 合成されたメディエーターの肥満細胞分泌ならびに好酸球および好塩基球浸潤に依存する。HEKA Ig G 4 抗体は、抗 NP Ig E を感作 24

50

時間前または感作2時間後のいずれかに投薬した場合、ヒト化NSGSマウスにおけるPCA応答も予防または阻害した(図9)。抗体処置の有害効果は、これらの実験経過において観察されなかった。

【0302】

(実施例3)

マウス抗シグレック-8抗体の作製および特徴付け

シグレック-8の細胞外領域は、3個の免疫グロブリン様ドメインで構成される：リガンドに結合する特有のN末端V-セットドメイン(ドメイン1)と、続く2個のC-セットドメイン(ドメイン2および3)。抗体1C3は、ヒトシグレック-8の組換え細胞外ドメイン(配列番号74)に対して産生されたIgG2a重鎖およびカッパ軽鎖を有するマウスモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体1H10および4F11は、ヒトシグレック-8の組換え細胞外ドメイン(配列番号74)に対して産生されたマウスIgG1重鎖およびカッパ軽鎖抗体である。表13を参照されたい。これらの抗体は、ヒト(配列番号74)および非ヒト霊長類(配列番号118)由来の組換えシグレック-8配列に結合した抗体のハイブリドーマスクリーニングから同定された。

【表13】

表 13. マウス1C3、1H10および4F11抗体由来のHVRのアミノ酸配列

抗体	鎖	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	重鎖	SYAMS 配列番号88	IISGGGSYTYSDSVKG 配列番号91	HETAQAAWFAY 配列番号94
1H10	重鎖	DYYMY 配列番号89	RIAPEDGDTEYAPKFQG 配列番号92	EGNYYGSSILDY 配列番号95
4F11	重鎖	SSWMN 配列番号90	QIYPGDDYTNYNGKFKG 配列番号93	LGPYGPFFAD 配列番号96
1C3	軽鎖	SASSSVSYM H 配列番号97	DTSK LAY 配列番号100	QQWSSNPPT 配列番号103
1H10	軽鎖	RASQDITNYLN 配列番号98	FTSRLHS 配列番号101	QQGNTLPWT 配列番号104
4F11	軽鎖	SASSSVSYM Y 配列番号99	DTSSLAS 配列番号102	QQWNSDPYT 配列番号105

【0303】

抗シグレック-8抗体のエピトープを含む領域を同定するために、ヒトIg-Fcに融合されたシグレック-8細胞外ドメインのそれぞれを含有する融合タンパク質を発現させ、CHO細胞から精製した。抗体結合の決定のためのELISAアッセイにおいて、ヒトドメイン1(配列番号115)、ドメイン1および2(配列番号116);またはドメイン1、2および3(配列番号117)を含有する融合タンパク質を使用した。一部の実験において、アヌビスヒビ(Papio anubis)由来のシグレック-8(国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)参照配列XP_009193370.1)の細胞外ドメイン1、2および3(配列番号118)を含有する融合タンパク質と比較した場合の、ヒトシグレック-8に対する抗体の特異性を評価した。

【0304】

抗体結合アッセイのため、ELISAプレート(MaxiSorp; Nunc)を0.2 μg/mlの融合タンパク質で一晩4℃にてコーティングし、PBSに溶解した2% B

S Aで1時間室温にてブロッキングした。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体を添加し、プレートを2時間室温にてインキュベートした。プレートの洗浄後に、西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を添加し、プレートを1時間インキュベートした。二次抗体は、ヒト化抗体に対しては抗ヒトH+L HRP (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号709-035-149)、またはマウス抗体に対しては抗マウスH+L HRP (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号715-035-151)であった。プレートをTMB基質 (Sigma、カタログ番号T0440-1L)で発色させた。

【0305】

マウス2E2抗体およびHEKA IgG1抗体は、ドメイン1融合タンパク質に結合し、これら2種の抗体のエピトープが、N末端リガンド結合ドメインに存することを示す(表14)。対照的に、マウス1C3抗体は、ドメイン1およびドメイン2融合タンパク質に結合したが、ドメイン1融合タンパク質への検出可能な結合を実証せず、この抗体のエピトープが、ドメイン2にあることを示す(表14)。

【表14】

表14. ヒトシグレック-8におけるエピトープへの抗シグレック-8抗体の結合

抗体	ドメイン1-Fc (配列番号115)	ドメイン1+2-Fc (配列番号116)	ドメイン1+2+3-Fc (配列番号117)	エピトープ ドメイン
2E2	+	+	+	1
HEKA	+	+	+	1
1C3	-	+	+	2

【0306】

マウス4F11および1H10抗体は、ヒトシグレック-8およびオリーブヒヒ(Papio anubis)由来の予測されるシグレック-8タンパク質配列(国立バイオテクノロジー情報センター参照配列XP_009193370.1)に結合した。ドメイン融合タンパク質のELISAスクリーニングにおいて、また、還元SDS-PAGEゲルのウエスタンブロットにおいて、4F11は、ヒトシグレック-8ドメイン1における線状エピトープを認識し、1H10は、ヒトシグレック-8ドメイン3における配列を含む線状エピトープを認識した。1C3は、ヒトシグレック-8ドメイン2における変性した配列を認識せず、これが、立体構造エピトープを認識したことを示す。抗体4F11および1H10は、それぞれ5.9および41 ng/ml の EC_{50} で、50 ng/ml IL-5の存在下でヒト末梢血白血球からの強力な好酸球枯渇を示す(表15)。ヒトシグレック-8に特異的なマウス1C3抗体およびマウス2E2抗体は、ヒトシグレック-8と交差反応しなかった。

【表15】

表15. ヒトまたはヒトシグレック-8におけるエピトープへの抗シグレック-8抗体の結合およびヒト好酸球に対する抗体の枯渇活性

抗体	ヒトシグレック-8 ドメインにおける エピトープ	線状エピトープ (還元 SDS-PAGE)	ヒト交差反応性 (ELISA)	好酸球死滅の平均 EC_{50} (ng/ml) (2ドナー)
4F11	1	+	+	5.9
1H10	3	+	+	41
1C3	2	-	-	7.7
2E2	1	+	-	6.9

平均 EC_{50} は、2回の独立的アッセイの好酸球枯渇に必要とされる平均最大半量抗体濃度を示す。

【0307】

ヒトおよびヒヒ好酸球への抗体の結合をフローサイトメトリーにより決定した。ヒトまたはヒヒ末梢血白血球調製物を、飽和量の抗シグレック - 8モノクローナル抗体 2E2、1C3および1H10またはマウスIgG1アイソタイプ対照抗体で標識した。抗シグレック - 8抗体を二次抗マウスIgG H+L AlexaFluor 647により可視化した。高粒度散乱と共にCD49dおよびCD16に対する霊長類交差反応性モノクローナル抗体を使用して、好酸球を同定した。マウス1H10抗体は、ヒヒおよびヒト好酸球に結合した一方、マウス2E2および1C3抗体は、ヒト好酸球に結合したが、ヒヒ好酸球と交差反応しなかった(図10)。ヒトシグレック - 8に結合する他のモノクローナルマウス抗シグレック - 8抗体は、非ヒト霊長類シグレック - 8を認識しないことが示されていたため、これらの結果は予想外であった。Hudsonら、J. Clin. Immunol.、2011年、31巻(6号): 1045~53頁を参照されたい。

10

配列

【化10】

マウス2E2重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

QVQLKESGPGGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNY
NSALMSRSLISKDNSKSKVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQGTSVT
VSS (配列番号1)

【化11】

20

2E2 RHA重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQGT
TVSS (配列番号2)

【化12】

2E2 RHB重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRSLISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQGT
TVSS (配列番号3)

30

【化13】

2E2 RHC重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQGT
TVSS (配列番号4)

40

【化14】

2E2 RHD重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQGT
TVSS (配列番号5)

【化 1 5】

2E2 RHE重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
 NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
 TTVVSS (配列番号6)

【化 1 6】

2E2 RHF重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
 YNSALMSRLTISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
 TVVSS (配列番号7)

10

【化 1 7】

2E2 RHG重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
 YNSALMSRFSISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
 TVVSS (配列番号8)

20

【化 1 8】

2E2 RHA2重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIIYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTN
 SALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
 LTVVSS (配列番号9)

【化 1 9】

2E2 RHB2重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTIIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
 YNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
 LTVVSS (配列番号10)

30

【化 2 0】

2E2 RHE S-G変異体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
 NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
 TTVVSS (配列番号11)

40

【化 2 1】

2E2 RHE E-D重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLLTIYGAWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
 NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMDYWGQGT
 TVTVSS (配列番号12)

【化 2 2】

2E2 RHE Y-V重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLLTIYGAWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
 NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEVWGQGT
 TVTVSS (配列番号13)

10

【化 2 3】

2E2 RHEトリプル変異体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLLTIYGAWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
 NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMDVWGQGT
 TTVTVSS (配列番号14)

20

【化 2 4】

マウス2E2軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
 SGSGSGTSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (配列番号15)

【化 2 5】

2E2 RKA軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号16)

30

【化 2 6】

2E2 RKB軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGVPARF
 SGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号17)

【化 2 7】

2E2 RKC軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFS
 GSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号18)

40

【化 2 8】

2E2 RKD軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLWIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号19)

【化 2 9】

2E2 RKE軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号20)

10

【化 3 0】

2E2 RKF軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号21)

【化 3 1】

2E2 RKG軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (配列番号22)

20

【化 3 2】

2E2 RKA F-Y変異体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (配列番号23)

30

【化 3 3】

2E2 RKF F-Y変異体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (配列番号24)

【化 3 4】

HEKA IgG1重鎖およびHEKF IgG1重鎖のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号75)

40

50

【化 3 5】

HEKAカッパ軽鎖のアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 76)

【化 3 6】

10

HEKFカッパ軽鎖のアミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
 SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 77)

【化 3 7】

20

IgG1重鎖定常領域のアミノ酸配列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 78)

【化 3 8】

30

IgG4重鎖定常領域のアミノ酸配列 (IgG4は、S228P変異を含有)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (配列番号 79)

【化 3 9】

40

Igカッパ軽鎖定常領域のアミノ酸配列

RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 80)

【化 4 0】

マウス2C4および2E2 IgG1重鎖のアミノ酸配列

QVQLKRASGPGGLVAPSQSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
 YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGTSV
 TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPA
 VLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNV AHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSS
 VFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST
 FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA
 KDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSN
 WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPG (配列番号 81)

10

【化 4 1】

マウス2C4カッパ軽鎖のアミノ酸配列

EIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
 SGSGSGTSYSLTISRMEAE DAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPT VSIFFPSSEQ
 LTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (配列番号 82)

20

【化 4 2】

マウス2E2カッパ軽鎖のアミノ酸配列

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
 SGSGSGTSYSLTISRMEAE DAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPT VSIFFPSSEQ
 LTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (配列番号 83)

30

【化 4 3】

キメラ2C4および2E2 IgG1重鎖のアミノ酸配列

QVQLKRASGPGGLVAPSQSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
 YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGTSV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 84)

40

【化 4 4】

キメラ2C4カッパ軽鎖のアミノ酸配列

EIILTQSPAIMASASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
 SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 85)

【化 4 5】

10

キメラ2E2カッパ軽鎖のアミノ酸配列

QIILTQSPAIMASASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
 SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 86)

【化 4 6】

20

HEKA IgG4重鎖のアミノ酸配列 (IgG4は、S228P変異を含有)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS~~LT~~IYG~~AH~~WVRQAPGKGLEWVGV~~I~~WAGGST
 NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPY~~Y~~YSMEYWGQGT
 TVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~G~~VHTFP
 AVLQSSGLYSLSSV~~VT~~VPSSSLG~~TK~~TYTCNV~~D~~HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~PPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSV~~M~~HEALHNHYTQKSLSLSL~~SL~~G (配列番号 87)

30

【化 4 7】

マウス1C3重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (下線を引いた残基は、Chothiaナンバリングに従ったCDR H1およびH2を含む)

EVQV~~V~~ESGGDLVKSGGSLKLS~~CA~~ASGFP~~F~~SSY~~AM~~SWVRQTPDKRLEWVAIISSGGSYTY
 YSDSVKGRFTISRDN~~AK~~NTLYLQMS~~SL~~KSEDTAMYYCARHETAQA~~AW~~FAYWGQGTLV
 TVSA (配列番号 106)

40

【化 4 8】

マウス1H10重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (下線を引いた残基は、Chothiaナンバリングに従ったCDR H1およびH2を含む)

EVQLQQSGAELVRPGASV~~KL~~SCTASG~~FN~~IKDY~~MY~~WVKQRPEQGLEWIGRI~~AP~~EDGDT
 EYAPKFQGKATVTADTSSNTAYLHLS~~SL~~TSEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWGQGT
 LTVSS (配列番号 107)

【化 4 9】

マウス4F11重鎖可変ドメインのアミノ酸配列(下線を引いた残基は、Chothiaナンバリングに従った

CDR H1およびH2を含む)

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFRSSWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDDY
TNYNGKFKGKVTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLGPYPGFADWGQGLVT
VSA (配列番号 108)

【化 5 0】

マウス1C3軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

10

QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA YGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK (配列番号 109)

【化 5 1】

マウス1H10軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (配列番号 110)

【化 5 2】

20

マウス4F11軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列

QIVLTQSPAIVSASPGKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSSLASGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRIESEDAANYCQQWNSDPYTFGGGTKLEIK (配列番号 111)

【化 5 3】

ヒトシグレック-8ドメイン1のアミノ酸配列

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTRP (配列番号 112)

30

【化 5 4】

ヒトシグレック-8ドメイン2のアミノ酸配列

DILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPKQDH
GTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVS (配列番号 113)

【化 5 5】

40

ヒトシグレック-8ドメイン3のアミノ酸配列

YPPWNLTMTVFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTL
CPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLA
AVGG (配列番号 114)

【化 5 6】

ヒトシグレック-8ドメイン1融合タンパク質のアミノ酸配列

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGTSDPVGHWFRAGDR
 PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDWISNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
 MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPIEGRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号115)

10

【化 5 7】

ヒトシグレック-8ドメイン1および2融合タンパク質のアミノ酸配列

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGTSDPVGHWFRAGDR
 PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDWISNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
 MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTTPMI
 SWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSIEGRSD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号
 116)

20

【化 5 8】

ヒトシグレック-8ドメイン1、2および3融合タンパク質のアミノ酸配列

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGTSDPVGHWFRAGDR
 PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDWISNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
 MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTTPMI
 SWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWN
 LTMTVFQGDASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSS
 NPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTGSRPVSQVTLAAVGGIE
 GRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列
 番号117)

30

40

【化 5 9】

ヒシグレック-8ドメイン1、2および3融合タンパク質のアミノ酸配列

MEGDRKYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPKDDWTYS DPVHGYWFRAGDR
PYQEAPVATNPNPDTEVQAETQGRFQLLGDRWSNDCSLSINDARKGDEGSYFFRLERGR
MKWSYKSQLNYKAKQLSVFVTALTQRPDILIQGTLES GHPRNLTCVWPWACEQRMPPM
ISWIGTSVSSLGPITARFSVLTLPKPKQDHGTS LTCQVTLPGTGVTTRTVQLDVSYPWPW
LTVTVFQGGDDTASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTRGSLTLCPSQPW
NPGLELLLRVHVKDEGEFTCQAENPRGSQHISLSLSLQNEGTGTARPVSEVTLAAVGGIE
GRSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列
番号118)

10

【化 6 0】

ヒシグレック-8ドメイン1、2および3のアミノ酸配列

MEGDRKYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPKDDWTYS DPVHGYWFRAGDR
PYQEAPVATNPNPDTEVQAETQGRFQLLGDRWSNDCSLSINDARKGDEGSYFFRLERGR
MKWSYKSQLNYKAKQLSVFVTALTQRPDILIQGTLES GHPRNLTCVWPWACEQRMPPM
ISWIGTSVSSLGPITARFSVLTLPKPKQDHGTS LTCQVTLPGTGVTTRTVQLDVSYPWPW
LTVTVFQGGDDTASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTRGSLTLCPSQPW
NPGLELLLRVHVKDEGEFTCQAENPRGSQHISLSLSLQNEGTGTARPVSEVTLAAVGG
(配列番号119)

20

30

【 図 5 】

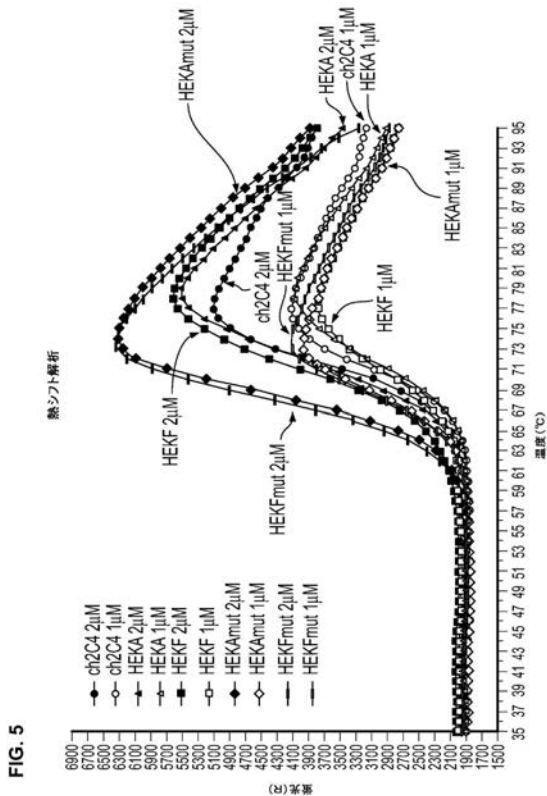


FIG. 5

【 図 6 】

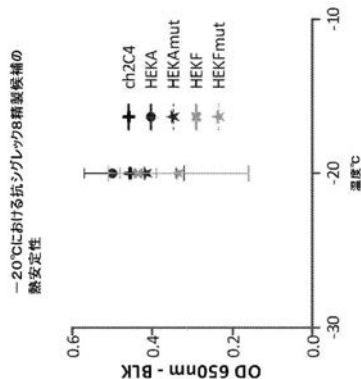


FIG. 6

【 図 7 】

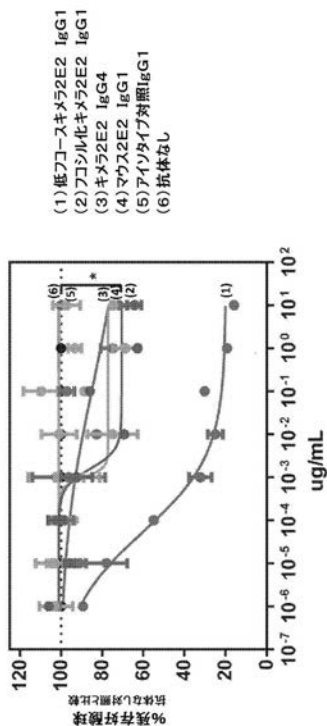


FIG. 7

【 図 8 】

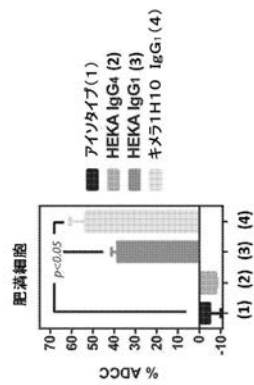


FIG. 8A

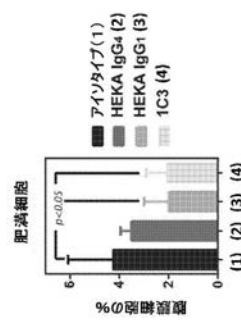
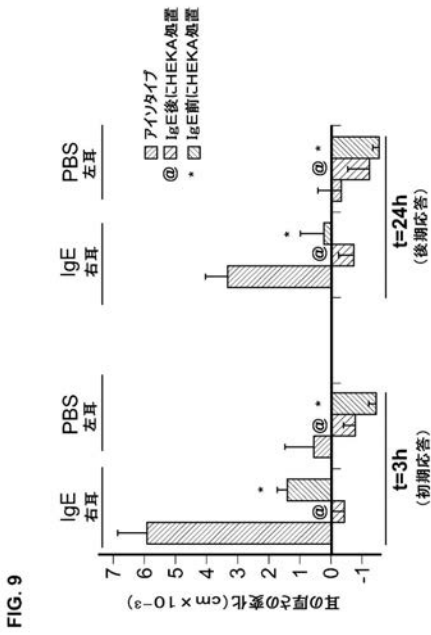
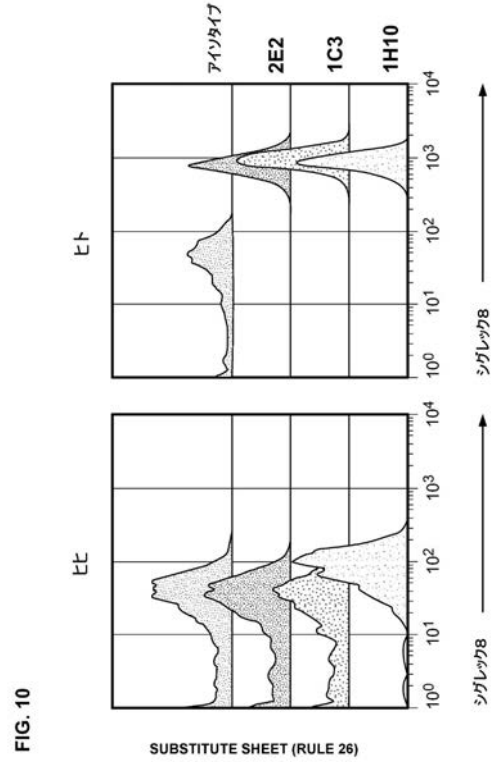


FIG. 8B

【 図 9 】



【 図 10 】



【 配列表 】

2017501744000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/069409
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DATABASES PATENTSCOPE, GOOGLE; EPOQUE: MEDLINE, WPI, EPODOC; STN: CAPLUS, BIOSIS; GenomeQuest SEARCH TERMS: siglec-8; SAF-2; antibodies and like terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 6 March 2015		Date of mailing of the international search report 06 March 2015
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Ann Le AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832745

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2014/069409
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2001/066126 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 13 September 2001 pages 10-13; example 2; SEQ ID No: 2 AND 4; page 2; claims 17 and 18; page 7; pages 13-15; pages 16-17 ; see pages 3, 12, 16 and claim 28	1-4, 6, 7, 8, 22-29, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70-83, 84, 108 and 109
Y	page 3; pages 10-13; example 2; SEQ ID No: 2 AND 4; page 2; claims 17 and 18; page 7; pages 13-15; pages 16-17 ; see pages 3, 12, 16 and claim 28	12, 30-33, 38-41, 42-56, 59, 69, 85-97, 100 and 102-107
X	US 7557191 B2 (ABRAHAMSON et al.) 07 July 2009 see column 10-13; example 2; sequence ID No: 2 and 4; column 2 lines 45-49; claims 2 and 5; see column 7; column 12-15; columns 12-16; column 21-24; example 5; column 16	1-4, 6, 7, 8, 11, 22-29, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70-83, 84, 108 and 109
Y	see column 4 ;see column 10-13; example 2; sequence ID No: 2 and 4; column 2 lines 45-49; claims 2 and 5; see column 7; column 12-15; columns 12-16; column 21-24; example 5; column 16	12, 30-33, 38-41, 42-56, 59, 69, 85-97, 100 and 102-107
X	VON GUNTEN, S. et al., 'Intravenous immunoglobulin preparations contain anti-Siglec-8 autoantibodies', J ALLERGY CLIN IMMUNOL, 2007, Vol. 119 No.4, pages 1005-1011 see abstract and pages 1008- 1011	1-3, 11, 77, 78, and 83
Y	YAMANE-OHNUKI, N. et al., 'Establishment of <i>FUT8</i> Knockout Chinese Hamster Ovary Cells: An Ideal Host Cell Line for Producing Completely Defucosylated Antibodies With Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity', BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2005, VOL. 87, No. 5, pages 614-622 pages 615-621	12, 30-33 and 38-41
Y	KIWAMOTO, T. et al., 'Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell associated conditions', Pharmacol Ther . Author manuscript available in PMC 2013 September 01, pages 1-22; Published in final edited form as: Pharmacol Ther . 2012 September ; 135(3): 327-336. see abstract and page 9	42-56, 59, 69, 85-97, 100 and 102-107
A	FERRARA, C. et al. 'Modulation of Therapeutic Antibody Effector Functions by Glycosylation Engineering: Influence of Golgi Enzyme Localization Domain and Co-Expression of Heterologous β 1, 4- <i>N</i> acetylglucosaminyltransferase III and Golgi α -mannosidase II', 2006, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 93, No. 5, pages 851-861	
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/069409

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2014/069409

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2014/069409
Supplemental Box	
<p>Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <p><u>Invention I:</u></p> <p>Claims 1-29 and claims 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 66, 67,69, 70, 71- 84, 108, 109 (in part) are directed to humanized anti Siglec-8 antibodies.</p> <p>The feature of humanized antibodies which bind to human Siglec-8 is specific to this group of claims.</p> <p><u>Invention II:</u></p> <p>Claims 30, 31 and claims 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 , 77-84, 108, 109(in part) are directed to specific glycosylated anti Siglec-8 antibodies.</p> <p>The feature of antibodies which binds to human Siglec- 8 wherein there is a N-glycoside-linked carbohydrate chains linked to the Fc region, wherein less than 50% of the N-glycoside-linked carbohydrate chains contain a fucose residue, is specific to this group of claims.</p> <p><u>Invention III:</u></p> <p>Claims 42-53, 56, 85-95 and claims 54, 55, 57, 58, 59, 60, 69, 70, 71-84, 96-108, 109 (in part) are directed to the the killing of mast cells expressing human Siglec-8 with anti Siglec-8 antibodies.</p> <p>The feature of antibodies which bind to human Siglec-8 on mast cells and kill mast cells expressing Siglec-8 by ADCC activity is specific to this group of claims.</p> <p><u>Invention IV:</u></p> <p>Claims 61-65 and claims 66, 67,69, 70, 71- 84, 108, 109 (in part) are directed to antibodies which bind to human and non human primate Siglec-8.</p> <p>The feature of antibodies that bind to both human Siglec-8 and non-human primate Siglec-8 is specific to this group of claims.</p> <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the binding of antibodies to human Siglec-8.</p> <p>However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in:</p> <p>D2: US 7557191 B2 (ABRAHAMSON et al.) 07 July 2009</p> <p>Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>.</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2014/069409	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2001/066126 A1	13 September 2001	EP 1272205 A1	08 Jan 2003
		EP 1272205 B1	07 Aug 2013
		JP 2003525615 A	02 Sep 2003
		JP 4860877 B2	25 Jan 2012
		US 2007264258 A1	15 Nov 2007
		US 7557191 B2	07 Jul 2009
		US 2008213212 A1	04 Sep 2008
		US 7871612 B2	18 Jan 2011
		US 2011217319 A1	08 Sep 2011
		US 8197811 B2	12 Jun 2012
		US 2010056760 A1	04 Mar 2010
		US 8207305 B2	26 Jun 2012
		US 2003092091 A1	15 May 2003
		US 7557191 B2	07 July 2009
EP 1272205 A1	08 Jan 2003		
EP 1272205 B1	07 Aug 2013		
JP 2003525615 A	02 Sep 2003		
JP 4860877 B2	25 Jan 2012		
US 2008213212 A1	04 Sep 2008		
US 7871612 B2	18 Jan 2011		
US 2011217319 A1	08 Sep 2011		
US 8197811 B2	12 Jun 2012		
US 2010056760 A1	04 Mar 2010		
US 8207305 B2	26 Jun 2012		
US 2003092091 A1	15 May 2003		
WO 0166126 A1	13 Sep 2001		
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 ベピントン, クリストファー アール.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ファラハティ, ルストム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ソーサ, フェルナンデス キャロライナ リタ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マシューズ, デイビッド ジョン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 トマセヴィック, ネナド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ウィリアムズ, ジェイソン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 レオン, ジョン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ ロード 7
 5, スイート エー, アラコス インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA88X AA90X AA91X AB01 AC14 BA02
 CA44

4C085 AA14 AA16 CC23 DD62

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74