

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6400480号  
(P6400480)

(45) 発行日 平成30年10月3日 (2018. 10. 3)

(24) 登録日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006. 01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 37/04 (2006. 01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 31/00 (2006. 01)

A 6 1 P 31/00

請求項の数 16 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-556935 (P2014-556935)  
 (86) (22) 出願日 平成24年11月30日 (2012. 11. 30)  
 (65) 公表番号 特表2015-508763 (P2015-508763A)  
 (43) 公表日 平成27年3月23日 (2015. 3. 23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/074093  
 (87) 国際公開番号 W02013/120554  
 (87) 国際公開日 平成25年8月22日 (2013. 8. 22)  
 審査請求日 平成27年11月27日 (2015. 11. 27)  
 (31) 優先権主張番号 61/598, 968  
 (32) 優先日 平成24年2月15日 (2012. 2. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 12158974. 1  
 (32) 優先日 平成24年3月12日 (2012. 3. 12)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 509091848  
 ノヴォ ノルディスク アー/エス  
 デンマーク、ハウスヴェア ディーケー  
 2880, ノヴォ アレー  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドグリカン認識タンパク質1に結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a. 配列番号19のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～109ならびに配列番号20のアミノ酸24～33、アミノ酸49～55およびアミノ酸88～96に示されているC D R配列を有する抗体；

b. 配列番号15のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸98～108ならびに配列番号16のアミノ酸24～34、アミノ酸51～56およびアミノ酸89～97に示されているC D R配列を有する抗体；

c. 配列番号27のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～106ならびに配列番号28のアミノ酸24～33、アミノ酸49～54およびアミノ酸87～95に示されているC D R配列を有する抗体；

d. 配列番号23のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～108ならびに配列番号24のアミノ酸24～33、アミノ酸49～55およびアミノ酸88～96に示されているC D R配列を有する抗体；

e. 配列番号31のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～109ならびに配列番号32のアミノ酸24～35、アミノ酸51～57およびアミノ酸90～98に示されているC D R配列を有する抗体；ならびに/または

f. 配列番号35のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～109ならびに配列番号36のアミノ酸24～34、アミノ酸50～56およびアミノ酸89～96に示されているC D R配列を有する抗体

10

20

と、PGLYRP1との結合について競合することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VHが、配列番号15のアミノ酸残基31～35(SYWMN)に対応するCDRH1配列；配列番号15のアミノ酸50～66(MIHPDSETRLNQKFKD)に対応するCDRH2配列；および配列番号15のアミノ酸残基98～108(DYSDYDGFAY)に対応するCDRH3配列を含み；

前記VLが、配列番号16のアミノ酸残基24～34(RASQSIDYLH)に対応するCDRL1配列；配列番号16のアミノ酸残基51～56(ASQSIG)に対応するCDRL2配列；および配列番号16のアミノ酸残基89～97(QNGHSFPLT)に対応するCDRL3配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項 3】

重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VHが、配列番号19のアミノ酸残基31～35(DYNMY)に対応するCDRH1配列；配列番号19のアミノ酸50～66(YIDPYNGDTSYNQKFKG)に対応するCDRH2配列；および配列番号19のアミノ酸残基99～109(GDYGNPFYLDY)に対応するCDRH3配列を含み；

前記VLが、配列番号20のアミノ酸残基24～33(SVSSSVNYMY)に対応するCDRL1配列；配列番号20のアミノ酸残基49～55(DTSKLPS)に対応するCDRL2配列；および配列番号20のアミノ酸残基88～96(QQWTSNPPT)に対応するCDRL3配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

20

【請求項 4】

重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VHが、配列番号23のアミノ酸残基31～35(DTYIH)に対応するCDRH1配列；配列番号23のアミノ酸50～66(RIDPANDDTKYDPNFQG)のCDRH2配列；および配列番号23のアミノ酸残基99～108(SDSDSWFAY)のCDRH3配列を含み；

前記VLが、配列番号24のアミノ酸残基24～33(SVSSSVNFMN)に対応するCDRL1配列；配列番号24のアミノ酸残基49～55(DTSKLAP)に対応するCDRL2配列；および配列番号24のアミノ酸残基88～96(HQWSSSYLT)に対応するCDRL3配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 5】

重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VHが、配列番号27のアミノ酸残基31～35(DYNMH)に対応するCDRH1配列；配列番号27のアミノ酸50～66(YVDPYDGGTSSNQKFKG)に対応するCDRH2配列；および配列番号27のアミノ酸残基99～106(EVPPYFDY)に対応するCDRH3配列を含み；

前記VLが、配列番号28のアミノ酸残基24～33(VASSSVTYMY)に対応するCDRL1配列；配列番号28のアミノ酸残基49～54(THPLAS)に対応するCDRL2配列；および配列番号28のアミノ酸残基87～95(PHWNTNPPT)に対応するCDRL3配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

30

【請求項 6】

重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VHが、配列番号31のアミノ酸残基31～35(DYYMY)に対応するCDRH1配列；配列番号31のアミノ酸50～66(AISDDSTYTYPPDSVKG)に対応するCDRH2配列；および配列番号31のアミノ酸残基99～109(GGYGNLYAMDY)に対応するCDRH3配列を含み；

前記VLが、配列番号32のアミノ酸残基24～35(TASSSVSSSYLH)に対応するCDRL1配列；配列番号32のアミノ酸残基51～57(STSNLAS)に対応するCDRL2配列；および配列番号32のアミノ酸残基90～98(HQYHRSPFT)に対応するCDRL3配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

【請求項 7】

重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VHが、配列番号35のアミノ酸残基31～35(NYVMH)に対応するCDRH1配列；配列番号35のアミノ酸50～66(WINPFNDGTNYNENFKN)に対応するCDRH2配列；および配列番号35のアミノ

50

酸残基99～109(SGFITTLIEDY)に対応するCDRH3配列を含み；

前記VLが、配列番号36のアミノ酸残基24～34(KASESVGSFVS)に対応するCDRL1配列；配列番号36のアミノ酸残基50～56(GASNRYT)に対応するCDRL2配列；および配列番号36のアミノ酸残基89～96(GQYYTHPT)に対応するCDRL3配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項8】

前記VHが配列番号15を含み、前記VLが配列番号16を含む、請求項2に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項9】

前記VHが配列番号19を含み、前記VLが配列番号20を含む、請求項3に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項10】

前記VHが配列番号23を含み、前記VLが配列番号24を含む、請求項4に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項11】

前記VHが配列番号27を含み、前記VLが配列番号28を含む、請求項5に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項12】

前記VHが配列番号31を含み、前記VLが配列番号32を含む、請求項6に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項13】

前記VHが配列番号35を含み、前記VLが配列番号36を含む、請求項7に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項14】

PGLYRP1に特異的に結合し、PGLYRP1に媒介されるTREM-1活性を低下させることができる、請求項1から13のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項15】

配列番号37(II型1.0 PGLYRP1)および/または配列番号38(II型2.0 PGLYRP1)に特異的に結合することができる、請求項1から14のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項16】

炎症性疾患、心血管疾患、脳卒中、虚血再灌流傷害、肺炎、敗血症または癌の治療または予防のための、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学の分野に関する。より詳細には、本発明は、骨髄細胞で発現されるトリガー受容体(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cell)(TREM-1)を刺激することができるリガンド、ならびにTREM-1のリガンドに結合する抗体を同定するための方法に関する。そのような抗体は、骨髄細胞活性化、したがって、炎症反応を調節することができる。

【背景技術】

【0002】

ペプチドグリカン認識タンパク質1(別名PGLYRP1、PGRP-S、TNFSF3L、PGRP、TAG7およびPGRPSとして公知である)は、好中球において発現され、それらが活性化すると放出される。PGLYRP1は疾患組織に極めて豊富に存在し、先天性免疫系による細菌感染の排除において重要な役割を果たすことが示されている。PGLYRPタンパク質のファミリー(PGLYRP1、PGLYRP2、PGLYRP3、PGLYRP4)は、全て細菌のペプチドグリカン(PGN)と相互作用するが、タンパク質のPGN結合部位には重要な差異がある。PGLYRP1には、未知のエフェクターまたは

10

20

30

40

50

シグナル伝達タンパク質に対する結合部位を構成すると仮説が立てられた追加的な溝がある(J. Mol. Biol. 347:683-691頁(2005年))。PGLYRP1は、高度に保存された、シグナルペプチドおよびペプチドグリカン結合ドメインからなる196アミノ酸長のタンパク質である。

#### 【 0 0 0 3 】

PGLYRP1によって媒介されるシグナル伝達機構を同定することは、種々の感染性および炎症性疾患におけるこのタンパク質の機能を理解し、それにより、操作するために重要である。

#### 【 0 0 0 4 】

TREM-1には、同様に、免疫調節におけるよく説明された効果があるが、TREM-1に媒介される免疫機能が導かれる機構はこれまで理解されていない。TREM-1は、単球、マクロファージおよび好中球などの骨髄細胞で発現される受容体である。TREM-1は、単一の細胞外免疫グロブリンドメインおよび短い細胞質尾部を含む、234アミノ酸からなる膜貫通タンパク質である。TREM-1は明らかなシグナル伝達モチーフを有さないが、活性化されると、二量体/多量体を形成し、ITAMを含有するシグナル伝達アダプタータンパク質、DAP12と会合することによってシグナル伝達を媒介する。下流のシグナル伝達は、SykおよびZap70のリン酸化を含みうる。下流のシグナル伝達は、NFAT、ELK、NK-カッパB転写因子の活性化を含みうる。TREM-1が活性化されると、それがトリガーとなり、TNF- (TNF-アルファ)、IL-8および単球走化性タンパク質-1などの炎症促進性サイトカインが骨髄細胞から放出される。

#### 【 0 0 0 5 】

TREM-1は敗血症、関節リウマチ(RA)および炎症性腸疾患(IBD)の患者において上方制御されており、また、TREM-1が炎症性疾患の発生および進行に寄与するという理論を裏付ける証拠が増加している。TREM-1シグナル伝達を遮断することには、RAおよびIBDのin vivoマウスモデルにおいて治療的活性があることがさらに示されている。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 WO2005040219

【 特許文献 2 】 米国特許出願公開第20050238646号

【 特許文献 3 】 米国特許出願公開第20020161201号

【 特許文献 4 】 米国特許第5,677,425号

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 J. Mol. Biol. 347:683 ~ 691頁(2005年)

【 非特許文献 2 】 、Birdら、Science 1988年;242:42S ~ 426頁

【 非特許文献 3 】 Hustonら PNAS 1988年;85:5879 ~ 5883頁

【 非特許文献 4 】 Illら、Protein Eng 1997年;10: 949 ~ 57頁

【 非特許文献 5 】 HolligerおよびHudson、Nat Biotechnol 2005年;2S: 1126 ~ 1136頁

【 非特許文献 6 】 Angalら、Mol Immunol. 199S;30:105 ~ 8頁

【 非特許文献 7 】 Kabatら(1991年) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91 ~ 3242

【 非特許文献 8 】 ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol 1987年;196:901 ~ 917頁

【 非特許文献 9 】 Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年

【 非特許文献 1 0 】 Davenportら、Internat. Immunopharmacol 2: 653 ~ 672頁、2002年

【 非特許文献 1 1 】 Karttunen, J. & Shastri, N.(1991年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88、3972 ~ 3976頁

【 非特許文献 1 2 】 Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Matilla, P., Crabtree, G. R. & Herzenberg, L. A.(1990年) Genes Dev. 4、1823 ~ 1834頁

10

20

30

40

50

【非特許文献 1 3】Bouchonら、2000、J. Immunol 164巻 4991～4995頁)

【非特許文献 1 4】Sanderson S、Int. Immun. 1994年

【非特許文献 1 5】Zhang Jら、Protein Expression and Purification、65巻、2009年5月1日発行、77～8頁

【非特許文献 1 6】Blood 2005年、106: 2551～58頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

TREM-1活性化の作用様式は、TREM-1を活性化するリガンドが当技術分野で知られていないので、まだ分かっていない。したがって、当技術分野において、TREM-1のリガンドを同定する手段が必要とされている。当技術分野において、TREM-1とそのリガンドの相互作用を減少させること、遮断すること、またはそれに干渉することができる抗体などの分子を同定する方法が必要とされている。当技術分野において、TREM-1のリガンドに結合し、したがって、そのリガンドによるTREM-1の刺激を減少させること、遮断すること、またはそれに干渉することができる抗体などの分子が必要とされている。当技術分野において、TREM-1のリガンドに結合することができる抗体などの分子が必要とされている。当技術分野において、TREM-1のリガンドに結合し、したがって、TREM-1活性化およびシグナル伝達を遮断することができる抗体などの分子が必要とされている。当技術分野において、TREM-1のリガンドに結合し、したがって、TREM-1を発現している骨髄細胞からのサイトカインの放出を減少させることまたは遮断することができる抗体などの分子が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本明細書には、TREM-1のリガンド、およびTREM-1のリガンドに結合することができる抗体などの分子を同定するための方法およびアッセイが開示されている。本明細書には、TREM-1活性化に影響を及ぼすことができる抗体が記載されている。したがって、本明細書で開示されている抗体は、医薬品として使用するために適している。TREM-1のリガンドに結合し、TREM-1とそのリガンドの相互作用を減少させるまたは遮断する抗体は、関節リウマチ、乾癬性関節炎および炎症性腸疾患などの慢性の炎症性疾患の個体の生活の質に実質的な影響を与える。

【0010】

本発明は、TREM-1のリガンド、および本発明ではPGLYRP1と同定されたTREM-1のリガンドに結合する抗体などの分子を同定するための方法に関する。本発明は、本発明の方法によって同定することができるPGLYRP1抗体にも関する。したがって、本発明は、PGLYRP1によるTREM-1の活性化を改変することができるPGLYRP1抗体、例えば、PGLYRP1によるTREM-1活性(シグナル伝達および/または活性化)を低下させることができるPGLYRP1抗体などに関する。TREM-1活性を低下させる抗体は、炎症を治療するために使用することができる。

【0011】

TREM-1リガンドを同定するための方法は、(a)TREM-1、TREM-1に対するシグナル伝達タンパク質および前記シグナル伝達タンパク質によって活性化されるレポーター構築物を発現している細胞を培養する工程と、(b)前記TREM-1を発現している細胞の、TREM-1活性化のトリガーとなる細胞、化合物または体液、例えば、生体液または組織などと接触させた際の活性を検出、好ましくは定量する工程と、(c)(b)の培養物を、TREM-1を活性化する成分と接触させる工程と、(d)TREM-1に結合する成分を単離する工程と、(e)単離された成分を特徴付ける工程とを含む。本発明によってPGLYRP1と同定された、TREM-1に対するリガンドを使用してTREM-1の活性を改変することができる。

【0012】

PGLYRP1に特異的に結合し、TREM-1に媒介される細胞活性を改変する分子を同定するための方法は、(a)実施形態1から18までのいずれか1つに記載の細胞を培養する工程と、(b)前記TREM-1を発現している細胞の、PGLYRP1、および場合によってPGNなどの多量体化剤と接触させた際の活性を検出、好ましくは定量する工程と、(c)(b)の培養物を、PGLYRP1に

特異的に結合する分子と接触させる工程と、(d)前記TREM-1を発現している細胞の活性が、(b)において測定されたその活性よりも低い、または高いことを検出、好ましくは定量する工程とを含む。

【0013】

TREM-1に媒介される細胞活性を改変するPGLYRP1抗体を同定するための方法は、(a)TREM-1、TREM-1に対するシグナル伝達タンパク質および前記シグナル伝達タンパク質によって活性化されるレポーター構築物を発現している細胞を培養する工程と、(b)前記TREM-1を発現している細胞の、PGLYRP1、および場合によってPGNなどの多量体化剤との組み合わせと接触させた際の活性を検出、好ましくは定量する工程と、(c)(b)の培養物を、PGLYRP1に結合する抗体と接触させる工程と、(d)前記TREM-1を発現している細胞の活性が、(b)において測定されたその活性よりも低い、または高いことを検出、好ましくは定量する工程とを含む。

10

【0014】

TREM-1に媒介される細胞活性を低下させるPGLYRP1抗体を同定する1つの方法は、(a)TREM-1、シグナル伝達タンパク質、例えばDAP12など、およびレポーター遺伝子、例えば、ルシフェラーゼまたはベータガラクトシダーゼなどを発現しているT細胞などの細胞を培養する工程と、(b)前記細胞を、活性化された好中球、および場合によってPGNなどの多量体化剤との組み合わせと一緒にインキュベートする工程と、(c)前記細胞の発光を検出、好ましくは定量する工程と、(d)前記細胞および活性化された好中球の培養物をPGLYRP1抗体と接触させる工程と、(e)前記細胞の発光が(c)において測定された活性よりも低いことを検出、好ましくは定量する工程とを含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】好中球によりBWZ-TREM-1レポーター細胞株が活性化されることを示すグラフである。BWZレポーター細胞株はヒトTREM-1を発現し、Promega、DenmarkからのBeta-Glo Assay Systemキットを使用して発光によって定量化することができるNFAT連結ベータ( )-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子の活性化を媒介する。この図では、TNF-アルファ( )、IL-6、IFN-ガンマ( )およびGM-CSFを含有するサイトカインカクテルまたはToll様受容体(TLR)活性化「カクテル」(TLRLおよびTLR2ミックス(tlrl-kit2hm、Invivogen、Sigma-Aldrich、Denmark)のいずれかの存在下で、ならびにこれらの活性化混合物の別々の成分の存在下で、好中球と一緒に培養した際のレポーター細胞株の活性化が例示されている。

30

【図2A】TREM-1-四量体組換えタンパク質を用いた、PGNで刺激した好中球のフローサイトメトリー染色を示すグラフである。対照タンパク質は結合しないが(図2A)、TREM-1-四量体(配列番号2)は、PGNで活性化された好中球のサブセットに結合し(図2B)、これに対して、別のTREM-1タンパク質は競合することができるが(図2D)、対照タンパク質は競合することができず(図2C)、これにより、相互作用の特異性が確認される。

【図2B】TREM-1-四量体組換えタンパク質を用いた、PGNで刺激した好中球のフローサイトメトリー染色を示すグラフである。対照タンパク質は結合しないが(図2A)、TREM-1-四量体(配列番号2)は、PGNで活性化された好中球のサブセットに結合し(図2B)、これに対して、別のTREM-1タンパク質は競合することができるが(図2D)、対照タンパク質は競合することができず(図2C)、これにより、相互作用の特異性が確認される。

40

【図2C】TREM-1-四量体組換えタンパク質を用いた、PGNで刺激した好中球のフローサイトメトリー染色を示すグラフである。対照タンパク質は結合しないが(図2A)、TREM-1-四量体(配列番号2)は、PGNで活性化された好中球のサブセットに結合し(図2B)、これに対して、別のTREM-1タンパク質は競合することができるが(図2D)、対照タンパク質は競合することができず(図2C)、これにより、相互作用の特異性が確認される。

【図2D】TREM-1-四量体組換えタンパク質を用いた、PGNで刺激した好中球のフローサイトメトリー染色を示すグラフである。対照タンパク質は結合しないが(図2A)、TREM-1-四量体(配列番号2)は、PGNで活性化された好中球のサブセットに結合し(図2B)、これに対して、別のTREM-1タンパク質は競合することができるが(図2D)、対照タンパク質は競合する

50

ことができず(図2C)、これにより、相互作用の特異性が確認される。

【図3】PGLYRP1は、TREM-1を用いて免疫沈降(IP)/質量分析(MS)によって同定されることを示す図である。可溶性TREM-FcをPGNで活性化された好中球と一緒にインキュベートし、架橋結合させ、免疫沈降させ、その後、浄化し、トリプシン消化し、質量分析した。TREM-1結合タンパク質の免疫沈降により、特異的なタンパク質3種、対照タンパク質と重複するタンパク質73種がもたらされ、72種が対照タンパク質単独で沈殿した(バックグラウンド)。表は、TREM-1特異的免疫沈降およびその後の質量分析の結果を示す。

【図4A】可溶性TREM-1がPGLYRP1に結合することを示すグラフである。組換えPGLYRP1を発現しているHEK293トランスフェクタントに対するTREM-1を用いたフローサイトメトリー染色によって(図4A)、ならびにPGLYRP1とTREM-1四量体(配列番号2)の間の相互作用のBiacore解析およびForteBio解析によって示されている。可溶性ヒトPGLYRP1は、10 µg/mlの可溶性大腸菌(E.coli)ペプチドグリカン(PGN)の存在下、および不在下で、固定化したヒトTREM-1に結合した(図4B)。単独のPGNも、固定化したヒトPGLYRP1に結合し(図4C)、可溶性ヒトTREM-1は、PGLYRP1表面をPGNに曝露し、PGNが結合する前後に、固定化したPGLYRP1に結合した(図4D)。

【図4B】可溶性TREM-1がPGLYRP1に結合することを示すグラフである。組換えPGLYRP1を発現しているHEK293トランスフェクタントに対するTREM-1を用いたフローサイトメトリー染色によって(図4A)、ならびにPGLYRP1とTREM-1四量体(配列番号2)の間の相互作用のBiacore解析およびForteBio解析によって示されている。可溶性ヒトPGLYRP1は、10 µg/mlの可溶性大腸菌(E.coli)ペプチドグリカン(PGN)の存在下、および不在下で、固定化したヒトTREM-1に結合した(図4B)。単独のPGNも、固定化したヒトPGLYRP1に結合し(図4C)、可溶性ヒトTREM-1は、PGLYRP1表面をPGNに曝露し、PGNが結合する前後に、固定化したPGLYRP1に結合した(図4D)。

【図4C】可溶性TREM-1がPGLYRP1に結合することを示すグラフである。組換えPGLYRP1を発現しているHEK293トランスフェクタントに対するTREM-1を用いたフローサイトメトリー染色によって(図4A)、ならびにPGLYRP1とTREM-1四量体(配列番号2)の間の相互作用のBiacore解析およびForteBio解析によって示されている。可溶性ヒトPGLYRP1は、10 µg/mlの可溶性大腸菌(E.coli)ペプチドグリカン(PGN)の存在下、および不在下で、固定化したヒトTREM-1に結合した(図4B)。単独のPGNも、固定化したヒトPGLYRP1に結合し(図4C)、可溶性ヒトTREM-1は、PGLYRP1表面をPGNに曝露し、PGNが結合する前後に、固定化したPGLYRP1に結合した(図4D)。

【図4D】可溶性TREM-1がPGLYRP1に結合することを示すグラフである。組換えPGLYRP1を発現しているHEK293トランスフェクタントに対するTREM-1を用いたフローサイトメトリー染色によって(図4A)、ならびにPGLYRP1とTREM-1四量体(配列番号2)の間の相互作用のBiacore解析およびForteBio解析によって示されている。可溶性ヒトPGLYRP1は、10 µg/mlの可溶性大腸菌(E.coli)ペプチドグリカン(PGN)の存在下、および不在下で、固定化したヒトTREM-1に結合した(図4B)。単独のPGNも、固定化したヒトPGLYRP1に結合し(図4C)、可溶性ヒトTREM-1は、PGLYRP1表面をPGNに曝露し、PGNが結合する前後に、固定化したPGLYRP1に結合した(図4D)。

【図5A】組換えPGLYRP1によるTREM-1レポーター細胞株の活性化を示すグラフである。組換えPGLYRP1(cat番号2590-PG-050R&D Systems Minneapolis MN、USA)、ならびに社内で生成したPGLYRP1(配列番号1)を用いてTREM-1レポーター細胞株を刺激することにより、PGNの存在下で用量依存的応答がもたらされる(図5A)。このPGLYRP1に誘導される応答は、TREM-1-Fc融合物タンパク質によって特異的に遮断することができ(図5B)、これにより、TREM-1特異的シグナルが検証される。

【図5B】組換えPGLYRP1によるTREM-1レポーター細胞株の活性化を示すグラフである。組換えPGLYRP1(cat番号2590-PG-050R&D Systems Minneapolis MN、USA)、ならびに社内で生成したPGLYRP1(配列番号1)を用いてTREM-1レポーター細胞株を刺激することにより、PGNの存在下で用量依存的応答がもたらされる(図5A)。このPGLYRP1に誘導される応答は、TREM-1-Fc融合物タンパク質によって特異的に遮断することができ(図5B)、これにより、TREM-1特異的シグナルが検証される。

10

20

30

40

50

M-1特異的シグナルが検証される。

【図 6 A】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断することができることが示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリガーTREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図 6 B】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断することができることが示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリガーTREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図 6 C】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断するこ

10

20

30

40

50



とができることが示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリガーTREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図6D】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断することができることが示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリガーTREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図6E】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断することができることが示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリ

リガー-TREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図6F】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断することができると示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリガー-TREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図6G】モノクローナル抗PGLYRP1抗体が、PGNで活性化された好中球を用いて刺激したレポーターアッセイにおいてTREM-1応答を遮断することができることを示すグラフである。抗体ハイブリドーマクローン上清の例を、種々のプレートにおいて、活性化シグナルを遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。少数の抗体(点線の下のもの、例えば、F10、F95など)が、このシグナルを遮断することができる。黒い点は各プレート内のアイソタイプ対照を示す(図6A)。図6Bは、2種の追加的な遮断性PGLYRP1抗体M-hPGRPS-2F5および-2F7を生じた別の融合物の試験を示す。市販の抗PGLYRP1 mAbの試験により、これらは高用量においてさえこのシグナルを遮断することができないが、市販のポリクローナルPGLYRP1 pAb(AF2590、R&D SystemsMinneapolis MN、USA)はこのシグナルを遮断することができると示されている。図6Cは、Thermo Scientific(Thermo Scientific、Waltham MA、USA)から市販されている抗PGLYRP1 mAb 188C424と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Dは、市販の抗PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Eは、市販の抗PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological、Salem MA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。図6Fは、市販の抗PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz CA、USA)と、アイソタイプ対照(MAB002)およびポリクローナル抗PGLYRP1 pAb(AF2590)との比較を示す。SC 6D653 mAbについて見られた活性のわずかな低下は、1  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた抗TREM-1 mAbを用いたPGLYRP1非依存性シグナルトリガー-TREM-1が同じ現象を示すので(図6G)、アジ化物含有製剤に起因すると思われる。

【図7】ヒトRA滑液中に存在するTREM-1リガンドがTREM-1を刺激することができることを示すグラフである。図7は、プレートに結合させた作動性抗TREM-1 mAb(R&D MAB1278、Minneapolis、MN、USA)がTREM-1を刺激すること(星印)、およびPGNを添加したRA滑液(SF)試料が、PGLYRP1ポリクローナル抗体(AF2590)によって中和することができるhTREM-1リガンド活性を示したことを示し、これにより、TREM-1活性がPGLYRP1依存であることが示されている。

【図8】II型PGLYRP1構築物の全体的な構造を示す図である。ICは細胞内ドメインを示し、TMは膜貫通ドメインを示し、これらはどちらも、hPGLYRP1のEC(細胞外)ドメインと組み合わせたMDL-1タンパク質配列に由来する。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

配列の簡単な説明

配列番号1は、成熟、全長hPGLYRP1ペプチド配列のアミノ酸配列を示す。

## 【0017】

配列番号2は、以下のエレメント: ヒトTREM-1 ECD、リンカーペプチド、ヒトTREM-1 ECD、野生型とは異なる7つの突然変異(L15A、L16E、G18A、A111S、P112S、D137E、L139M)を有するヒトアロタイプIgG1 Fcを含有する組換えタンパク質配列を示す。

## 【0018】

配列番号3は、野生型とは異なる5つの突然変異: L15A、L16E、G18A、A111S、P112Sを有するヒトアロタイプIgG1 Fcを示す。

10

## 【0019】

配列番号4は、N末端からC末端まで以下のエレメント: 6×HISタグ、ストレプトアビジン結合タンパク質ドメイン(SBP)の2つのコピー、GSリンカー、軟骨オリゴマータンパク質(COMP)のC末端、GSリンカー、hDCIR-ECDを含有する組換えタンパク質配列を示す。

## 【0020】

配列番号5は、以下のエレメント: hTREM-1-ECD、GSリンカー、軟骨オリゴマータンパク質(COMP)のC末端、GSリンカー、ストレプトアビジン結合タンパク質ドメイン(SBP)の2つのコピー、6×HISタグを含有する組換えタンパク質配列を示す。

## 【0021】

20

配列番号6は、N末端からC末端への順序で以下のエレメント、ヒトCD83 ECD、G4S×3リンカーペプチド、ヒトCD83 ECD、ヒトアロタイプIgG1 Fc突然変異体を含有する組換えタンパク質配列を示す。

## 【0022】

配列番号7は、C末端GPIシグナル配列を有する全長ヒトPGLYRP1をコードするcDNA配列を示す。この配列を、EcoR1制限部位およびXho1制限部位を介してpcDNA3.1zeo(+)(Invitrogen: V860-20, Carlsbad, CA, USA)にクローニングした。

## 【0023】

配列番号8は、成熟全長hTREM-1 ECD(aa.21~200)を示す。

## 【0024】

30

配列番号9は、G4S×3リンカーによって分離されたCD33リーダータンデムhTREM細胞外ドメインに対するcDNAを示す。5' EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列、CD33リーダー配列、その後、間にKpnI制限部位および3回繰り返されるグリシン-グリシン-グリシン-セリンスペーサー(G4S×3)を有するヒトTREM-1の細胞外ドメイン(aa17~200)、その後ヒトTREM-1の細胞外ドメイン(aa17~200)の追加的なコピーおよびクローニングを可能にするためのApa1部位を有する合成cDNAである。

## 【0025】

配列番号10は、五量体hTREM-COMP-SBP38×2-6HISを示す。EcoR1部位およびコザックは5'にあり、BamH1部位はORFの3'にある。

## 【0026】

40

配列番号11は、EcoR1およびApa1を有するpJSV002-hFc6mutベクターにクローニングしたhCD83四量体を示す。EcoR1部位およびコザックは5'にあり、Apa1部位はORFの3'にある。

## 【0027】

配列番号12は、五量体6HIS-SBP38×2-COMP-hDCIRを示す。EcoR1部位およびコザックは5'にあり、BamH1はORFの3'にある。

## 【0028】

配列番号13は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F36、mAb0182)の可変性重鎖の核酸配列を示す。

## 【0029】

配列番号14は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F36、mAb0182)の可変性軽鎖の核酸配列を

50

示す。

【 0 0 3 0 】

配列番号15は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F36、mAb0182)の可変性重鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 1 】

配列番号16は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F36、mAb0182)の可変性軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 2 】

配列番号17は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F10)の可変性重鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 3 3 】

配列番号18は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F10)の可変性軽鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 3 4 】

配列番号19は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F10)の可変性重鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 5 】

配列番号20は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F10)の可変性軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 6 】

配列番号21は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F105、mAb0184)の可変性重鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 3 7 】

配列番号22は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F105、mAb0184)の可変性軽鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 3 8 】

配列番号23は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F105、mAb0184)の可変性重鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 9 】

配列番号24は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F105、mAb0184)の可変性軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 0 】

配列番号25は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F95)の可変性重鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 4 1 】

配列番号26は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F95)の可変性軽鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 4 2 】

配列番号27は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F95)の可変性重鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 3 】

配列番号28は、モノクローナルPGLYRP1抗体(1F95)の可変性軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 4 】

配列番号29は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F5)の可変性重鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 4 5 】

配列番号30は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F5)の可変性軽鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 4 6 】

配列番号31は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F5)の可変性重鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 7 】

配列番号32は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F5)の可変性軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 8 】

配列番号33は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F7)の可変性重鎖の核酸配列を示す。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

配列番号34は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F7)の可変性軽鎖の核酸配列を示す。

【0050】

配列番号35は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F7)の可変性重鎖のアミノ酸配列を示す。

【0051】

配列番号36は、モノクローナルPGLYRP1抗体(2F7)の可変性軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【0052】

配列番号37は、II型1.0 PGLYRP1のアミノ酸配列を示す。

【0053】

配列番号38は、II型2.0 PGLYRP1のアミノ酸配列を示す。

【0054】

配列番号39は、エピトープタグのアミノ酸配列を示す。

【0055】

配列番号40は、全長ヒトPGLYRP2のアミノ酸配列を示す。

【0056】

配列番号41は、全長ヒトPGLYRP3のアミノ酸配列を示す。

【0057】

配列番号42は、全長ヒトPGLYRP4のアミノ酸配列を示す。

【0058】

配列番号43は、hCD33-hTrem1 ECD(aa17~200)-Fc6mutの核酸配列を示す。

【0059】

配列番号44は、hCD33-hTrem1 ECD(aa17~200)-Fc6mutのアミノ酸配列を示す。

【0060】

配列番号45は、hCD33-hTremL1 ECD(aa16~162)-Fc6mutの核酸配列を示す。

【0061】

配列番号46は、hCD33-hTremL1 ECD(aa16~162)-Fc6mutのアミノ酸配列を示す。

【0062】

配列番号47は、hCD33-hTremL2 ECD(aa19~268)-Fc6mutの核酸配列を示す。

【0063】

配列番号48は、hCD33-hTremL2 ECD(aa19~268)-Fc6mutのアミノ酸配列を示す。

【0064】

配列番号49は、hCD33-hTREM2-Fc6mut二量体の核酸配列を示す

【0065】

配列番号50は、hCD33-hTREM2-Fc6mut二量体のアミノ酸配列を示す。

【0066】

配列番号51は、プライマーの核酸配列を示す。

【0067】

配列番号52は、プライマーの核酸配列を示す。

【0068】

配列番号53は、hCD33のアミノ酸配列を示す。

【0069】

説明

本発明は、本発明においてPGLYRP1と同定されているTREM-1のシグナル伝達パートナーに特異的に結合し、PGLYRP1とそのシグナル伝達パートナーであるTREM-1との結合に影響を及ぼすことができる抗体などの分子を同定するための方法に関する。PGLYRP1を使用してTREM-1の活性を改変することができる。したがって、本発明は、PGLYRP1によって媒介される炎症反応に影響を及ぼす抗体などの分子に関する。PGLYRP1に結合し、TREM-1活性化およびシグナル伝達に影響を及ぼすことができる抗体が創出され、同定された。

【0070】

TREM-1のリガンドを同定するため、およびPGLYRP1に特異的に結合し、PGLYRP1によるTREM-1の活性化を低下させるまたは遮断することができる抗体などの分子を同定するための

10

20

30

40

50

方法またはアッセイは、以下の通り創出することができる。

【0071】

第1の細胞または第1の細胞の集団に、TREM-1またはその断片、シグナル伝達タンパク質およびレポーター構築物をコードする遺伝子をトランスフェクトする。細胞は、骨髄細胞などの造血起源であってもよく、T細胞であってもよく、そのような分子をトランスフェクトし、発現させることができる任意の他の細胞型であってもよい。シグナル伝達タンパク質は、TREM-1からレポーター構築物にシグナルを直接、または間接的に伝達するまたは伝えることができる任意のタンパク質であってもよく、それらとして、DAP10、DAP12、TCRゼータ、FcガンマリII、Fc受容体、またはTREM-1からレポーター構築物にシグナルを伝達するまたは伝えることができる任意の他のタンパク質を挙げることができる。あるいは、シグナル伝達タンパク質は、TREM-1/シグナル伝達キメラ分子であってもよい。レポーター構築物は転写因子およびレポーター遺伝子を含み、それが今度は定量できるシグナルなどの検出可能なシグナルを生じるレポータータンパク質をコードする。転写因子はNFATまたはNFkBまたは当技術分野で公知の任意の他の適切な転写因子であってもよい。レポーター遺伝子は、ベータ( )-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、クロラムフェニコールトランスフェラーゼまたは検出可能なシグナルを生じることができる任意の他のレポータータンパク質をコードしてよい。このバイオアッセイに使用することができる1つの適切な細胞株はBWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ T細胞(本明細書では「BWZ/hTREM-1レポーター細胞」とも識別される)であり、その創出については実施例に詳細に記載されている。活性化されると、BWZ/hTREM-1レポーター細胞はベータ( )-ガラクトシダーゼを産生し、この産生は、Beta Glow(商標)(PRomega E4720、Madison,WI、USA)などの当技術分野で公知の設備またはキットを使用して測定することができる。

【0072】

第1の細胞または第1の細胞の集団は、PGLYRP1、および場合によって多量体化剤と一緒にインキュベートすることによって活性化することができる。任意選択の多量体化剤は、PGLYRP1の足場として作用し、ペプチドグリカン(PGN)、好中球細胞外トラップ(NET)、ヒアルロン酸、プロテオグリカン構造、例えば、パーシカン、アグリカン、デコリンまたはフィブリンなど、またはPGLYRP1を多量体化することもしくは提示することができる任意の他の天然に存在するマトリックス構造または分子であってもよい。第1の細胞は、表面上または細胞内でPGLYRP1を発現する第2の細胞の1つまたは複数と一緒にインキュベートすることによって活性化することができる。細胞内発現の例は、分泌顆粒におけるPGLYRP1の貯蔵であってもよい。したがって、第2の細胞は、PGLYRP1をコードする遺伝子を発現するまたはそれをトランスフェクトされ、表面上でPGLYRP1を発現する任意の細胞(または細胞の集団)であってもよい。そのような第2の細胞は、原核細胞であっても、真核細胞、例えば、CHO細胞、BHK細胞またはHEK細胞などの哺乳動物の細胞などであってもよい。第2の細胞は、活性化された好中球であってもよい。好中球は、個体の全血または組織から得ることができ、原体で、または精製した好中球として使用することができる。好中球の細菌による活性化を模倣する任意の作用剤、例えば、PGN-SA、PGN-EB、PGN-EC、PGN-BS(InVivogen、tlrl-pgnsa、SanDiego、CA)などの細菌の細胞壁由来のペプチドグリカン(PGN)などを使用して好中球を活性化することができる。

【0073】

次いで、第1の細胞または第1の細胞の集団の活性を検出し、好ましくは測定する。

【0074】

第1の細胞とPGLYRP1を発現している第2の細胞の培養物および/または第1の細胞の培養物を、PGLYRP1、および場合によってPGNなどの多量体化剤と一緒にインキュベートし、PGLYRP1に対して生じた抗体と接触させる。第1の細胞または第1の細胞の集団の活性を検出し、好ましくは測定する。

【0075】

このように、TREM-1のリガンドであるPGLYRP1に結合することができ、PGLYRP1とTREM-1の相互作用に影響を及ぼす抗体を同定することができる。第1の細胞の活性の上昇を引き

10

20

30

40

50

起こすPGLYRP1抗体は、PGLYRP1とTREM-1の相互作用を増強し、本明細書では「刺激性PGLYRP1抗体」と同定される。第1の細胞の活性の低下を引き起こすPGLYRP1抗体は、PGLYRP1とTREM-1の相互作用を減少させる、それに干渉する、またはそれを遮断し、本明細書では「阻害性PGLYRP1抗体」と同定される。阻害性PGLYRP1抗体は、TREM-1活性化およびシグナル伝達を減少させるまたはそれを遮断する。

【0076】

したがって、本発明は、PGLYRP1抗体の機能の特徴付ける方法に関する。PGLYRP1に特異的に結合することができ、TREM-1活性化および下流のシグナル伝達に対する任意の効果を有する抗体は、本明細書では「機能性PGLYRP1抗体」と称される。したがって、「機能性PGLYRP1抗体」という用語は、刺激性PGLYRP1抗体および阻害性PGLYRP1抗体の両方を包含するものとする。

10

【0077】

さらに、本発明は、PGLYRP1に特異的に結合し、PGLYRP1とTREM-1との相互作用を減少させる、それに干渉する、またはそれを遮断し、したがって、TREM-1活性化および下流のシグナル伝達を減少させることができる抗体に関する。本発明の抗体は、TREM-1を発現している骨髄細胞のサイトカインの産生を減少させる免疫調節機能を有しうる。例えば、本発明の抗体は、骨髄細胞、例えば、マクロファージおよび/もしくは好中球など、ならびに/または疾患組織内の骨髄細胞、例えば、滑液組織などからのTNF-アルファ( )、IL-1ベータ(b)、IL-6、IFN-ガンマ( )、MIP-1ベータ(b)、MCP-1、IL-8および/またはGM-CSFの放出を減少させるまたは妨げることができる。本発明の抗体は、好中球の応答を下方制御することができる。

20

【0078】

本発明によるPGLYRP1抗体は、いくつかの異なる機構の1つまたは組合せによってTREM-1活性化を低下させるまたは遮断し、それによりTREM-1に直接、または間接的に影響を及ぼすことができる。本発明の抗体は、PGLYRP1がTREM-1と機能的な複合体を創出することを防ぐことができる。

【0079】

本発明の抗体は、TREM-1活性化および下流のシグナル伝達を減少させるまたは遮断することによってPGLYRP1機能を遮断することができる。

【0080】

30

本発明は、本明細書に開示されている方法以外の他の手段によって同定することができる阻害性PGLYRP1抗体にも関する。

【0081】

本発明の抗体は、ヒトPGLYRP1およびヒト以外の種由来のPGLYRP1のどちらにも結合することができる。したがって、「PGLYRP1」という用語は、本明細書で使用される場合、無脊椎動物種または脊椎動物種などの任意の適切な生物体から得ることができるPGLYRP1の任意の天然に存在する形態を包含する。本明細書に記載のように使用するためのPGLYRP1は、脊椎動物のPGLYRP1、例えば、とりわけ霊長類(例えば、ヒト、チンパンジー、カニクイザルまたはアカゲザルなど);げっ歯類(例えば、マウスまたはラットなど)、ウサギ類(例えば、ウサギなど)、または偶蹄類(ウシ、ヒツジ、ブタまたはラクダなど)由来のPGLYRP1などの哺乳動物のPGLYRP1などであってよい。PGLYRP1はヒトPGLYRP1(配列番号1)であることが好ましい。PGLYRP1は、適切な細胞内で翻訳後プロセッシングを受けたPGLYRP1タンパク質などの成熟型のPGLYRP1であってよい。そのような成熟PGLYRP1タンパク質は、例えば、グリコシル化されていてよい。PGLYRP1は全長PGLYRP1タンパク質であってよい。PGLYRP1はスプライス変異体であってよい。

40

【0082】

本発明の抗体は、配列番号37(II型1.0 PGLYRP1)および/または配列番号38(II型1.0 PGLYRP1)などのPGLYRP1の変異体にも特異的に結合することができてよい。

【0083】

本発明の抗体は、ヒトTREM-1およびヒトとは別の種由来のTREM-1のどちらの活性(シグ

50

ナル伝達および/または活性化)にも影響を及ぼすこと、例えば、阻害すること/低下させること/遮断することなどができうる。したがって、「TREM-1」という用語は、本明細書で使用される場合、任意の適切な生物体から得ることができるTREM-1の天然に存在する形態をいずれも包含する。例えば、本明細書に記載のように使用するためのTREM-1は、脊椎動物のTREM-1、例えば、とりわけ、霊長類(例えば、ヒト、チンパンジー、カニクイザルまたはアカゲザルなど);げっ歯類(例えば、マウスまたはラットなど)、ウサギ類(例えば、ウサギなど)、または偶蹄類(ウシ、ヒツジ、ブタまたはラクダなど)由来のTREM-1などの哺乳動物のTREM-1などであってよい。TREM-1はヒトTREM-1であることが好ましい。TREM-1は、適切な細胞内で翻訳後プロセッシングを受けたTREM-1タンパク質などの成熟型のTREM-1であってよい。そのような成熟TREM-1タンパク質は、例えば、グリコシル化されていてよい。TREM-1は全長TREM-1タンパク質であってよい。TREM-1はスプライス変異体であってよい。

10

#### 【0084】

「抗体」という用語は、本明細書では、PGLYRP1またはその一部に特異的に結合することができる、生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来するタンパク質を指す。この用語は、任意のアイソタイプ(すなわちIgA、IgE、IgG、IgMおよび/またはIgY)の全長抗体ならびに任意のその単鎖または断片を包含する。PGLYRP1またはその一部に特異的に結合する抗体は、排他的にPGLYRP1またはその一部に結合することができる、または、限られた数の相同な抗原またはその一部に結合することができる。

#### 【0085】

20

本発明の抗体は、Bリンパ球の単一のクローンから直接、または間接的に得ることができるという意味で、モノクローナル抗体であってよい。本発明の抗体はモノクローナル抗体であってよい。ただし、188C424(Thermo Scientific)、4H230もしくは9A319(US Biological)またはClone 6D653(Santa Cruz Biotechnology)ではない。

#### 【0086】

本発明の抗体は単離することができる。「単離された抗体」という用語は、その天然の環境の別の/他の成分から分離および/もしくは回収され、かつ/またはその天然の環境中の成分の混合物から精製された抗体を指す。

#### 【0087】

抗体は、原核細胞、真核細胞または細胞抽出物から得た無細胞株において組換えによって発現させることができる。原核細胞は大腸菌であってよい。真核細胞は、酵母、昆虫または哺乳動物の細胞、例えば、霊長類(例えば、ヒト、チンパンジー、カニクイザルまたはアカゲザルなど)、げっ歯類(例えば、マウスまたはラットなど)、ウサギ類(例えば、ウサギなど)または偶蹄類(ウシ、ヒツジ、ブタまたはラクダなど)である生物体由来の細胞などであってよい。適切な哺乳動物の細胞株としては、これだけに限定されないが、HEK293細胞、CHO細胞およびHELA細胞が挙げられる。PGLYRP1抗体は、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイなどの当業者に公知の他の方法の手段によっても作製することができる。本発明の抗体は、適切な哺乳動物を、PGLYRP1、PGLYRP1を発現している細胞または両方の組合せを用いて免疫化することによってin vivoにおいて生じさせることができる。

30

40

#### 【0088】

PGLYRP1抗体は、例えば、実施例に記載の方法を用いて作製し、スクリーニングし、精製することができる。簡単に述べると、PGLYRP1ノックアウト(KO)マウスまたはTREM-1 KOマウスを含めた任意の適切なマウスを、PGLYRP1、PGLYRP1を発現している細胞または両方の組合せを用いて免疫化することができる。ハイブリドーマの上清の一次スクリーニングを、直接ELISAまたはFMATを用いて実施することができ、二次スクリーニングを、フローサイトメトリーを用いて実施することができる。次いで、陽性ハイブリドーマの上清、ならびに精製された抗体を、例えば、全長PGLYRP1との結合についてスクリーニングすることができる。次いで、陽性ハイブリドーマの上清または精製された抗体を、TREM-1担持細胞のPGLYRP1による刺激を減少させるまたは遮断するそれらの能力について試験すること

50



ができる。本発明の方法をこの目的のために用いることができる。

【0089】

本発明の全長抗体は、少なくとも4つのポリペプチド鎖:すなわち、ジスルフィド結合によって相互接続された2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含んでよい。特に薬学的に興味深い1つの免疫グロブリンサブクラスはIgGファミリーであり、これはアイソタイプIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に細分することができる。IgG分子は、2つ以上のジスルフィド結合によって連鎖した2つの重鎖、および、それぞれがジスルフィド結合によって重鎖に付着した2つの軽鎖で構成される。重鎖は、重鎖可変領域(VH)および最大3つの重鎖定常(CH)領域:CH1、CH2およびCH3を含んでよい。軽鎖は、軽鎖可変領域(VL)および軽鎖定常領域(CL)を含んでよい。VH領域およびVL領域は、さらに、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存された領域が散在する相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域に細分することができる。VH領域およびVL領域は、一般には、3つのCDRおよび4つのFRで構成され、それらはアミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置されている。重鎖および軽鎖の超可変領域は、抗原(PGLYRP1)と相互作用することができる[結合]ドメインを形成し、一方、抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、これだけに限定されないが、種々の免疫系の細胞(エフェクター細胞)、Fc受容体および古典的補体系の第1の成分(C1q)を含めた宿主組織または因子の結合を媒介しうる。

【0090】

抗原結合性断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)、Fv(一般には、抗体の単一の腕のVLドメインおよびVHドメイン)、単鎖Fv(scFv;例えば、Birdら、Science 1988年;242:42S~426頁;およびHustonら PNAS 1988年;85:5879~5883頁を参照されたい)、dsFv、Fd(一般には、VHドメインおよびCHIドメイン)、およびdAb(一般には、VHドメイン)断片;VH、VL、VhH、およびV-NARドメイン;単一のVHおよび単一のVL鎖を含む一価の分子;ミニボディ(minibody)、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、およびカップパボディ(kappa body)(例えば、IIIら、Protein Eng 1997年;10:949~57頁を参照されたい);ラクダIgG;IgNAR;ならびに1つまたは複数の単離されたCDRまたは機能性パラトープが挙げられ、単離されたCDRまたは抗原結合性の残基またはポリペプチドは、機能性抗体断片が形成されるように会合または連結し合わせることができる。種々の種類の抗体断片が、例えば、HolligerおよびHudson、Nat Biotechnol 2005年;2S:1126~1136頁;WO2005040219、および米国特許出願公開第20050238646号および同第20020161201号に記載または概説されている。

【0091】

抗体の抗原結合機能は全長抗体の断片によって成されうることが示されているので、本発明に関しては抗体の特定の抗原結合性断片が適しうる。抗体の「抗原結合性断片」という用語は、本明細書に記載のヒトPGLYRP1または別の種由来のPGLYRP1などの抗原に特異的に結合する能力を保持する1つまたは複数の抗体の断片を指す。抗原結合性断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)S、Fv(一般には、抗体の単一の腕のVLドメインおよびVHドメイン)、単鎖Fv(scFv;例えば、Birdら、Science 1988年;242:42S~426頁;およびHustonら PNAS 1988年;85:5879~5883頁を参照されたい)、dsFv、Fd(一般には、VHドメインおよびCHIドメイン)、およびdAb(一般には、VHドメイン)断片;VH、VL、VhH、およびV-NARドメイン;単一のVHおよび単一のVL鎖を含む一価の分子;ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、およびカップパボディ(例えば、IIIら、Protein Eng 1997年;10:949~57頁を参照されたい);ラクダIgG;IgNAR;ならびに1つまたは複数の単離されたCDRまたは機能性パラトープが挙げられ、単離されたCDRまたは抗原結合性の残基またはポリペプチドは、機能性抗体断片が形成されるように会合または連結し合わせることができる。種々の種類の抗体断片が、例えば、HolligerおよびHudson、Nat Biotechnol 2005年;2S:1126~1136頁;WO2005040219、および米国特許出願公開第20050238646号および同第20020161201号に記載または概説されている。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技法を用いて得ることができ、断片は、インタクトな抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングすることができる。

## 【0092】

本発明の抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であってよい。「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、フレームワーク領域の少なくとも一部分および/またはCDR領域の少なくとも一部分がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を包含するものとする。(例えば、ヒト抗体は、フレームワーク領域およびCDR領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有してよい)。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、*in vitro*におけるランダム突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発によってまたは*in vivo*における体細胞突然変異によって導入された突然変異)を含んでよい。

10

## 【0093】

そのようなヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体であってよい。そのようなヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合した、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得たB細胞を含むハイブリドーマによって作製することができる。

## 【0094】

ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系配列の選択で築き、天然および合成の配列多様性によりさらに多様化した配列ライブラリーから単離することができる。

## 【0095】

20

ヒト抗体は、ヒトリンパ球を*in vitro*において免疫化し、その後、リンパ球を、エプスタイン・バーウイルスを用いて形質転換することによって調製することができる。

## 【0096】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、任意の修飾された形態のヒト抗体、例えば、抗体と別の作用剤または抗体のコンジュゲートなどを指す。

## 【0097】

「ヒト化抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、非ヒト免疫グロブリンに由来する1つまたは複数の配列(CDR領域)を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体を指す。したがって、ヒト化抗体は、少なくともレシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類由来のものなどの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域由来の残基と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。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンのFR残基を対応する非ヒト残基で置き換える。そのような修飾の例は、いわゆる逆突然変異の1つまたは複数の導入である。

30

## 【0098】

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おいては見いだされない残基を含んでよい。これらの修飾を行って、抗体性能をさらに洗練させる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR残基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FR残基である可変ドメインを少なくとも1つ、一般には2つ含む。ヒト化抗体は、場合によって、免疫グロブリン定常領域(Fc)、一般にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分も含む。

40

## 【0099】

「ヒト化抗体誘導体」という用語は、任意の修飾された形態のヒト化抗体、例えば、抗体と別の作用剤または抗体のコンジュゲートなどを指す。

## 【0100】

「キメラ抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子が、一般には、異なる種が起源である免疫グロブリンの可変領域遺伝子および定常領域遺伝子から遺伝子工学によって構築されたものである抗体を指す。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変性セグメントをヒト定常セグメントにつなげることがで

50

きる。

#### 【0101】

抗体の結晶化可能断片領域(「Fc領域」/「Fcドメイン」)は、抗体のN末端領域であり、定常CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。Fcドメインは、Fc受容体と称される細胞表面受容体、ならびに補体系のいくつかのタンパク質と相互作用することができる。Fc領域により、抗体が免疫系と相互作用することが可能になる。本発明の一態様では、抗体は、Fc領域内に修飾を含むように、一般には、とりわけ、血清半減期、補体結合、Fc-受容体結合性、タンパク質の安定性および/または抗原依存性細胞傷害性、またはその欠如などの、その機能的性質の1つまたは複数が変更されるように工学的に操作する。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾することもでき(例えば、1つまたは複数の化学的部分を抗体に付着させることができる)、そのグリコシル化が変更されるように、さらに抗体の1つまたは複数の機能的性質が変更されるように修飾することもできる。修飾されたFcドメインは、それぞれ特定のFc受容体の親和性の低下をもたらす突然変異(L234A、L235E、およびG237A)およびC1qに媒介される補体結合の低下をもたらす突然変異(A330SおよびP331S)の1つまたは複数、あるいは全てを含むことが好ましい(EU指標による残基の番号付け)。

10

#### 【0102】

本発明の抗体のアイソタイプは、IgG、例えば、IgG1など、例えば、IgG2など、例えば、IgG4などであってよい。所望であれば、抗体のクラスは公知の技法によって「スイッチ」することができる。例えば、最初にIgM分子として作製された抗体をIgG抗体にクラススイッチすることができる。クラススイッチ技法を用いて、あるIgGサブクラスを別のIgGサブクラスに、例えば、IgG1からIgG2もしくはIgG4に、IgG2からIgG1もしくはIgG4に、またはIgG4からIgG1もしくはIgG2に変換することもできる。異なるIgGサブクラス由来の領域を組み合わせることによって定常領域キメラ分子を生成するための抗体の遺伝子工学的操作も実施することができる。

20

#### 【0103】

一実施形態では、CH1のヒンジ領域を、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変更される、例えば、増加または減少するように修飾する。この手法は、例えば、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号においてさらに説明されている。

#### 【0104】

定常領域は、抗体が安定化するように、例えば、二価の抗体が2つの一価のVH-VL断片に分離するリスクが低下するようにさらに修飾することができる。例えば、IgG4定常領域において、残基S241をプロリン(P)残基に突然変異させて、ヒンジにおける完全なジスルフィド架橋の形成を可能にすることができる(例えば、Angalら、Mol Immunol. 199S;30:105~8頁を参照されたい)。

30

#### 【0105】

抗体またはその断片は、それらの相補性決定領域(CDR)に関して定義することもできる。「相補性決定領域」または「超可変領域」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合性に関与するアミノ酸残基が位置している抗体の領域を指す。CDRは、一般に、軽鎖可変ドメイン内のアミノ酸残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメイン内の31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3);(Kabatら(1991年)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91~3242)、ならびに/または「超可変ループ」(軽鎖可変ドメイン内の残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメイン内の26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3);ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol. 1987年;196:901~917頁由来の残基で構成される。一般には、この領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabatら、上記に記載の方法によって行われる。「Kabat位置」、「Kabat残基」、および「Kabatによる」などの句は、本明細書では、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについてのこの番号付け系を指す。Kabat番号付け系を使用して、ペプチドの実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのフレームワーク(FR)またはCDRの短縮、またはそこへの挿入に対応する、より少ないまたは追加的なアミノ酸を含有してよい。

40

50

例えば、重鎖可変ドメインは、CDR H2の残基52の後ろにアミノ酸挿入(Kabatによるによる残基52a、52bおよび52c)、および重鎖FR残基82の後ろに残基の挿入(例えば残基82a、82b、および82cなど、Kabatによる)を含んでよい。残基のKabat番号付けは、所与の抗体について、「標準の」Kabat番号を付した配列を有する抗体の配列と相同の領域においてアラインメントすることによって決定することができる。

【0106】

「フレームワーク領域」または「FR」残基という用語は、本明細書で定義されているCDR内にはないVHまたはVLのアミノ酸残基を指す。

【0107】

本発明の抗体は、本明細書に開示されている特定の抗体の1つまたは複数由来のCDR領域、例えば、配列番号15、配列番号16、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号24、配列番号27、配列番号28、配列番号31、配列番号32、配列番号35または配列番号36内からのCDR領域などを含んでよい。

10

【0108】

1F36抗体は、配列番号15に示されている重鎖および配列番号16に示されている軽鎖を有する。本発明の抗体は、この可変性重鎖配列および/またはこの可変性軽鎖配列を含んでよい。1F36抗体は、配列番号15のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸98～108ならびに配列番号16のアミノ酸24～34、アミノ酸51～56およびアミノ酸89～97に示されているCDR配列を有する。本発明の抗体は、これらのCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを含んでよい。

20

【0109】

本発明による抗体は、配列番号15のアミノ酸残基31～35(SYWMN)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列;および/または配列番号15のアミノ酸50～66(MIHPDSETRLNQKFKD)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列;および/または配列番号15のアミノ酸残基98～108(DYSDYDGFAY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含んでよい。

【0110】

本発明による抗体は、配列番号16のアミノ酸残基24～34(RASQISDYLYH)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列;および/または配列番号16のアミノ酸残基51～56(ASQSIS)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号16のアミノ酸残基89～97(QNGHSFPLT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含んでよい。

30

【0111】

1F10抗体は、配列番号19に示されている重鎖および配列番号20に示されている軽鎖を有する。本発明の抗体は、この可変性重鎖配列および/またはこの可変性軽鎖配列を含んでよい。1F10抗体は、配列番号19のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～109ならびに配列番号20のアミノ酸24～33、アミノ酸49～55およびアミノ酸88～96に示されているCDR配列を有する。本発明の抗体は、これらのCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを含んでよい。

40

【0112】

本発明による抗体は、配列番号19のアミノ酸残基31～35(DYNMY)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列;および/または配列番号19のアミノ酸50～66(YIDPYNGDTSYNQKFKG)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列;および/または配列番号19のアミノ酸残基99～109(GDYGNPFYLDY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で

50

置換されていてよいCDRH3配列を含んでよい。

【0113】

本発明による抗体は、配列番号20のアミノ酸残基24～33(SVSSSVNYMY)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列;および/または配列番号20のアミノ酸残基49～55(DTSKLPS)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号20のアミノ酸残基88～96(QQWTSNPPT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含んでよい。

【0114】

1F105抗体は、配列番号23に示されている重鎖および配列番号24に示されている軽鎖を有する。本発明の抗体は、この可変性重鎖配列および/またはこの可変性軽鎖配列を含んでよい。1F105抗体は、配列番号23のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～108ならびに配列番号24のアミノ酸24～33、アミノ酸49～55およびアミノ酸88～96に示されているCDR配列を有する。本発明の抗体は、これらのCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを含んでよい。

【0115】

本発明による抗体は、配列番号23のアミノ酸残基31～35(DTYIH)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列;および/または配列番号23のアミノ酸50～66(RIDPANDDTKYDPNFQG)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列;および/または配列番号23のアミノ酸残基99～108(SDNSDSWFAY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含んでよい。

【0116】

本発明による抗体は、配列番号24のアミノ酸残基24～33(SVSSSVNFMN)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列;および/または配列番号24のアミノ酸残基49～55(DTSKLAP)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号24のアミノ酸残基88～96(HQWSSYSLT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含んでよい。

【0117】

1F95抗体は、配列番号27に示されている重鎖および配列番号28に示されている軽鎖を有する。本発明の抗体は、この可変性重鎖配列および/またはこの可変性軽鎖配列を含んでよい。1F95抗体は、配列番号27のアミノ酸31～35、アミノ酸50～66およびアミノ酸99～106ならびに配列番号28のアミノ酸24～33、アミノ酸49～54およびアミノ酸87～95に示されているCDR配列を有する。本発明の抗体は、これらのCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを含んでよい。

【0118】

本発明による抗体は、配列番号27のアミノ酸残基31～35(DYNMH)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列;および/または配列番号27のアミノ酸50～66(YVDPYDGGTSSNQKFKG)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列;および/または配列番号27のアミノ酸残基99～106(EVPYYFDY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含んでよい。

【0119】

本発明による抗体は、配列番号28のアミノ酸残基24～33(VASSSVTYMY)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換され

10

20

30

40

50

ていてよいCDRL1配列;および/または配列番号28のアミノ酸残基49~54(THPLAS)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号28のアミノ酸残基87~95(PHWNTNPPT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含んでよい。

【0120】

2F5抗体は、配列番号31に示されている重鎖および配列番号32に示されている軽鎖を有する。本発明の抗体は、この可変性重鎖配列および/またはこの可変性軽鎖配列を含んでよい。2F5抗体は、配列番号31のアミノ酸31~35、アミノ酸50~66およびアミノ酸99~109ならびに配列番号32のアミノ酸24~33、アミノ酸49~55およびアミノ酸88~96に示されているCDR配列を有する。本発明の抗体は、これらのCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを含んでよい。

10

【0121】

本発明による抗体は、配列番号31のアミノ酸残基31~35(DYYMY)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列;および/または配列番号31のアミノ酸50~66(AISDDSTYTYPPDSVKG)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列;および/または配列番号31のアミノ酸残基99~109(GGYGNLYAMDY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含んでよい。

20

【0122】

本発明による抗体は、配列番号32のアミノ酸残基24~35(TASSSVSSSYLH)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列;および/または配列番号32のアミノ酸残基51~57(STSNLAS)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号32のアミノ酸残基90~98(HQYHRSPFT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含んでよい。

【0123】

2F7抗体は、配列番号35に示されている重鎖および配列番号36に示されている軽鎖を有する。本発明の抗体は、この可変性重鎖配列および/またはこの可変性軽鎖配列を含んでよい。2F5抗体は、配列番号35のアミノ酸31~35、アミノ酸50~66およびアミノ酸99~109ならびに配列番号36のアミノ酸24~34、アミノ酸50~56およびアミノ酸89~96に示されているCDR配列を有する。本発明の抗体は、これらのCDR配列の1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを含んでよい。

30

【0124】

本発明による抗体は、配列番号35のアミノ酸残基31~35(NYVMH)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列;および/または配列番号35のアミノ酸50~66(WINPFNDGTNYNENFKN)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列;および/または配列番号35のアミノ酸残基99~109(SGFITTLIEDY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含んでよい。

40

【0125】

本発明による抗体は、配列番号36のアミノ酸残基24~34(KASESVGSFVS)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列;および/または配列番号36のアミノ酸残基50~56(GASNRYT)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号36のアミノ酸残基89~96(GQYYTHPT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置

50

換されていてよいCDRL3配列を含んでよい。

【0126】

「抗原」(Ag)という用語は、免疫適格性脊椎動物を免疫化して、Agを認識する抗体(Ab)を産生させるために使用される分子実体を指す。本明細書では、Agはより広範に称され、一般に、Abによって特異的に認識される標的分子を包含し、したがって、Abを生成するために用いられる免疫プロセス、または他のプロセス、例えばファージディスプレイにおいて使用される分子の断片または模倣物を包含するものとする。

【0127】

「エピトープ」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体(Ab)などの「抗原結合性ポリペプチド」と、その対応する抗原(Ag)との間の分子相互作用に関して定義される。一般に、「エピトープ」とは、Abが特異的に結合するAg上の区域または領域、すなわち、Abと物理的に接触する区域または領域を指す。物理的接触は、Ab分子およびAg分子内の原子についての種々の基準(例えば、距離のカットオフ2~6 Å、例えば、3 Åなど、例えば、4 Åなど、例えば、5 Åなど;または溶媒露出度)を用いて定義することができる。タンパク質エピトープは、Abとの結合に直接関与するAg内のアミノ酸残基(エピトープの免疫優性成分とも称される)および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例えば、Abによって有効に遮断されるAgのアミノ酸残基、すなわちAbの「溶媒排除表面(solvent-excluded surface)」および/または「フットプリント」内のアミノ酸残基などを含んでよい。

【0128】

エピトープという用語は、本明細書では、PGLYRP1抗体に特異的に結合する、PGLYRP1の任意の特定の領域内の両方の種類の結合領域を含む。PGLYRP1は、いくつもの異なるエピトープを含んでよく、エピトープは、これだけに限定することなく、成熟PGLYRP1コンフォメーション内の互いと近くに位置する1つまたは複数の連続していないアミノ酸からなるコンフォメーションエピトープ、および、全部または一部において、PGLYRP1と共有結合により付着した分子構造、例えば、炭水化物基などからなる翻訳後エピトープを含んでよい。PGLYRP1は、直線状エピトープも含んでよい。

【0129】

所与の抗体(Ab)/抗原(Ag)対に関するエピトープは、種々の実験的なエピトープマッピング方法およびコンピュータによるエピトープマッピング方法を用いて異なる詳細度のレベルで説明し、特徴付けることができる。実験的な方法としては、突然変異誘発、X線結晶構造解析、核磁気共鳴(NMR)分光法、水素重水素交換質量分析(HX-MS)および種々の競合結合方法;当技術分野で公知の方法が挙げられる。各方法は独特の原理に依拠するので、エピトープについての説明は、それを決定した方法と密接に関連する。したがって、用いたエピトープのマッピング方法に応じて、所与のAb/Ag対に関するエピトープは違うように説明される。

【0130】

最も詳細なレベルでは、AgとAbとの間の相互作用に関するエピトープは、Ag-Ab相互作用において存在する原子の接触を定義する空間的座標、ならびに結合の熱力学的性質へのそれらの相対的な寄与に関する情報によって説明することができる。より低い詳細度のレベルでは、エピトープは、AgとAbとの間の原子の接触を定義する空間的座標によって特徴付けることができる。さらに低い詳細度のレベルでは、エピトープは、それに含まれるアミノ酸残基によって、Ab:Ag複合体内の原子間の距離またはその溶媒露出度などの特定の基準によって定義される通り特徴付けることができる。さらに低い詳細度のレベルでは、エピトープは、機能によって、例えば他のAbとの競合結合によって特徴付けることができる。エピトープは、より一般的に、別のアミノ酸によって置換することによってAbとAgとの間の相互作用の特性が変更されるアミノ酸残基を含むと定義することもできる。

【0131】

Ab、例えばFab断片とおよびそのAgとの間の複合体の空間的座標によって定義される、X線により得られる結晶構造に関しては、エピトープという用語は、本明細書では、別段の指定がある場合または文脈と矛盾する場合を除き、Ab内の重原子から、例えば2~6 Å、例

10

20

30

40

50

えば、3 など、例えば、4 など、例えば、5 などの距離内に重原子(すなわち、非水素原子)を有することを特徴とするPGLYRP1残基と明確に定義される。

【0132】

用いるエピトープのマッピング方法に左右されるエピトープの説明および定義は異なる詳細度のレベルで得られるという事実から、同じAgに対する異なるAbについてのピトープの比較も同様に異なる詳細度のレベルで行うことができることになる。

【0133】

アミノ酸レベルで説明される、例えばX線構造から決定されるエピトープは、同じアミノ酸残基のセットを含有していれば、同一であると言える。エピトープは、少なくとも1つのアミノ酸がそれらのエピトープに共有されていれば、重複していると言える。エピトープは、それらのエピトープに共有されているアミノ酸残基がなければ、別々(独特)であると言える。

【0134】

用語「パラトープ」の定義は、上記の「エピトープ」の定義から、視点を逆にすることによって導かれる。したがって、「パラトープ」という用語は、Agと特異的に結合する、すなわちAgと物理的に接触する、Ab上の区域または領域を指す。

【0135】

Fab断片などのAbとそのAgとの間の複合体の空間的座標によって定義される、X線により得られる結晶構造に関しては、パラトープという用語は、本明細書では、別段の指定がある場合または文脈と矛盾する場合を除き、PGLYRP1内の重原子から4  の距離内に重原子(すなわち、非水素原子)を有することを特徴とするAg残基と明確に定義される。

【0136】

所与の抗体(Ab)/抗原(Ag)対に関するエピトープおよびパラトープは、常套的な方法によって同定することができる。例えば、一般的なエピトープの場所は、異なる断片または変異体PGLYRP1ポリペプチドに結合する抗体の能力を評価することによって決定することができる。抗体と接触するPGLYRP1内の特定のアミノ酸(エピトープ)およびPGLYRP1と接触する抗体内の特定のアミノ酸(パラトープ)も、常套的な方法を用いて決定することができる。例えば、抗体および標的分子を組み合わせることができ、Ab:Ag複合体を結晶化することができる。複合体の結晶構造を決定し、抗体とその標的との間の相互作用の特定の部位を同定するために使用することができる。

【0137】

同じ抗原に結合する抗体は、それらに共通する抗原に同時に結合するそれらの能力に関して特徴付けることができ、「競合結合」/「ビニング(binning)」に供することができる。この状況において、「ビニング」という用語は、同じ抗原に結合する抗体をグループ分けする方法を指す。抗体の「ビニング」は、表面プラズモン共鳴(SPR)、ELISAまたはフローサイトメトリーなどの標準の技法に基づくアッセイにおける、2つの抗体のそれらに共通する抗原への競合結合に基づいてよい。

【0138】

抗体の「ピン」は、参照抗体を用いて定義する。第2の抗体が参照抗体と同時に抗原に結合することができなければ、第2の抗体は、参照抗体と同じ「ピン」に属すると言える。この場合、参照抗体および第2の抗体は抗原の同じ部分に競合的に結合し、「競合抗体」という語が作られる。第2の抗体が、参照抗体と同時に抗原に結合することができれば、第2の抗体は、別の「ピン」に属すると言える。この場合、参照抗体および第2の抗体は抗原の同じ部分に競合的に結合せず、「非競合抗体」という語が作られる。

【0139】

抗体「ビニング」では、エピトープに関する直接的な情報はもたらされない。競合抗体、すなわち同じ「ピン」に属する抗体は、同一のエピトープを有する、重複しているエピトープを有する、または、別のエピトープを有することさえある。後者は、抗原上のそのエピトープに結合した参照抗体が、第2の抗体が抗原上のそのエピトープと接触するために必要な空間を占めている場合である(「立体的な障害」)。非競合抗体は、一般に別のエ



ピトープを有する。

【0140】

本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について1F10と競合することができうる。本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について1F36/mAb0182と競合することができうる。本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について1F95と競合することができうる。本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について1F105/mAb0184と競合することができうる。本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について2F5と競合することができうる。本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について2F7と競合することができうる。したがって、本発明による抗体は、これらの抗体の任意の1つまたは複数と同じピンに属しうる。

【0141】

「結合親和性」という用語は、本明細書では、2つの分子、例えば抗体またはその断片と抗原の間の非共有結合性相互作用の強度の測定を指す。「結合親和性」という用語は、一価の相互作用(内因性の活性)を説明するために使用される。

【0142】

2つの分子、例えば抗体またはその断片と抗原の間の、一価の相互作用による結合親和性は、平衡解離定数( $K_D$ )を決定することによって定量することができる。今度は、 $K_D$ は、複合体の形成および解離のカイネティクスを、例えばSPR法によって測定することによって決定することができる。一価の複合体の会合および解離に対応する速度定数は、それぞれ会合速度定数 $k_a$ (または $k_{on}$ )および解離速度定数 $k_d$ (または $k_{off}$ )と称される。 $K_D$ は、方程式 $K_D=k_d/k_a$ によって $k_a$ および $k_d$ に関連付けられる。

【0143】

上記の定義に従って、異なる分子相互作用に関連付けられる結合親和性、例えば、所与の抗原に対する異なる抗体の結合親和性の比較などを、個々の抗体/抗原複合体についての $K_D$ 値を比較することによって比べることができる。

【0144】

本発明のPGLYRP1抗体のその標的(PGLYRP1)に対する $K_D$ は、 $1 \times 10^{-6}$ M以下、 $1 \times 10^{-7}$ M以下、 $1 \times 10^{-8}$ M以下、または $1 \times 10^{-9}$ M以下、または $1 \times 10^{-10}$ M以下、 $1 \times 10^{-11}$ M以下、 $1 \times 10^{-12}$ M以下または $1 \times 10^{-13}$ M以下である。

【0145】

本発明による抗体は、PGLYRP1との結合について、天然に存在するリガンドまたは受容体または別の抗体などの別の分子と競合することができうる。したがって、本発明による抗体は、PGLYRP1と、同じくPGLYRP1に結合することができる別の分子の親和性よりも大きな親和性で結合することができうる。抗原との結合について天然のリガンド/受容体と競合する抗体の能力は、抗体と抗原との間の特異的な相互作用などの対象の相互作用についての $K_D$ 値と、対象でない相互作用の $K_D$ 値を決定し、比較することによって評価することができる。

【0146】

「結合特異性」という用語は、本明細書では、抗体またはその断片などの分子と、単一の排他的な抗原との相互作用、または限られた数の高度に相同な抗原(またはエピトープ)との相互作用を指す。PGLYRP1に特異的に結合することができる抗体は、似ていない分子には結合することができない。本発明による抗体は、PGLYRP2、PGLYRP3およびPGLYRP4などのPGLYRPファミリーメンバーに結合することができなくてよい。本発明による抗体は、ヒトPGLYRP2、ヒトPGLYRP3およびヒトPGLYRP4などのヒトPGLYRPファミリーメンバーに結合することができなくてよい。

【0147】

相互作用の特異性および平衡結合定数の値は、周知の方法によって直接決定することができる。リガンド(例えば、抗体など)の、それらの標的に結合する能力を評価するための標準のアッセイは当技術分野で公知であり、それらとしては、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、RIA、およびフローサイトメトリー分析が挙げられる。抗体の結合カイネティクスおよび結合親和性も、SPRなどの当技術分野で公知の標準のアッセイによって評価

10

20

30

40

50

することができる。

【0148】

抗体と標的との結合を、その標的の別のリガンド、例えば、別の抗体などと標的との結合と比較する競合的結合アッセイを行うことができる。

【0149】

別の態様では、本発明は、本発明の分子、例えば、本明細書に記載のPGLYRP1抗体、ポリヌクレオチド、ベクターおよび細胞などを含む組成物および製剤を提供する。例えば、本発明は、薬学的に許容される担体と一緒に製剤化された本発明の1つまたは複数のPGLYRP1抗体を含む医薬組成物を提供する。

【0150】

したがって、本発明の1つの目的は、そのようなPGLYRP1抗体を0.25mg/ml ~ 250mg/mlの濃度で含み、pHが2.0 ~ 10.0である医薬製剤を提供することである。製剤は、緩衝系、防腐剤、等張化剤(tonicity agent)、キレート化剤、安定剤、または界面活性物質、ならびにそれらのさまざまな組合せの1つまたは複数をさらに含んでよい。医薬組成物における防腐剤、等張剤(isotonic agent)、キレート化剤、安定剤および界面活性物質の使用は当業者に周知である。Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照することができる。

【0151】

一実施形態では、医薬製剤は、水性製剤である。そのような製剤は、一般には、液剤または懸濁剤であるが、コロイド、分散剤、エマルション、および多相材料も包含しうる。「水性製剤」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む製剤と定義される。同様に、「水性液剤」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む液剤と定義され、「水を含む水性懸濁剤」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む懸濁剤と定義される。

【0152】

別の実施形態では、医薬製剤は、凍結乾燥製剤であり、医師または患者は使用する前にそれに溶媒および/または希釈剤を加える。

【0153】

別の態様では、医薬製剤は、そのような抗体の水性溶液、および緩衝剤を含み、抗体は、1mg/ml以上の濃度で存在し、前記製剤のpHは約2.0 ~ 約10.0である。

【0154】

本発明のPGLYRP1抗体およびそのような抗体を含む医薬組成物は、例えば、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)、過敏性腸症候群、関節リウマチ(RA)、乾癬、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、1型糖尿病、グレース病、多発性硬化症(MS)、自己免疫性心筋炎、川崎病、冠動脈疾患、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺疾患、自己免疫性甲状腺炎、強皮症、全身性硬化症、変形性関節症、アトピー性皮膚炎、白斑、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、自己免疫性腎炎、グッドパスチャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、アレルギー、喘息および急性炎症または慢性炎症のいずれかの結果である他の自己免疫疾患などの炎症性疾患を治療するために使用することができる。本発明のPGLYRP1抗体およびそのような抗体を含む医薬組成物は、心血管疾患、脳卒中、虚血再灌流傷害、肺炎、敗血症および癌を治療するために使用

【0155】

本発明のPGLYRP1抗体は、炎症性腸疾患の個体の治療において使用するために適している。炎症性腸疾患(IBD)は、口から肛門までの胃腸管の任意の部分に影響を及ぼし、多種多様な症状を引き起こす可能性がある疾患である。IBDは、主に、腹痛、下痢(血性でありうる)、嘔吐、または体重減少を引き起こすが、胃腸管の外部の合併症、例えば、皮膚発疹、関節炎、眼の炎症、疲労、および集中力の欠如なども引き起こす可能性がある。IBDの患者は、2つの主要なクラス、潰瘍性大腸炎(UC)の患者とクローン病(CD)の患者に分けることができる。CDは一般に回腸および結腸に關与し、腸の任意の領域に影響を及ぼす可能性があるが、多くの場合、不連続であり(疾患の病巣領域は腸中に拡散する)、一方、UC

10

20

30

40

50

は、常に、直腸(結腸)に関与し、より連続的である。CDでは、炎症は経壁性であり、膿瘍、瘻孔および狭窄が生じるが、UCでは、炎症は一般には粘膜に局限される。クローン病に対する公知の薬学的または外科的治療法は存在しないが、UCの患者の一部は、結腸の外科的除去によって治療することができる。治療の選択肢は、症状を制御すること、寛解を維持すること、および、再燃を予防することに制限される。診療所における炎症性腸疾患における有効性は、実験室試験および生活の質の質問票に基づくスコアリング尺度であるCDに対するクローン病活性指数(CDAI)スコアの低下として測定することができる。動物モデルでは、有効性は、大部分は体重の増加によって測定され、便の硬さ、重量および血便の組合せである疾患活性指数(DAI)によっても測定される。

【0156】

10

本発明のPGLYRP1抗体は、関節リウマチの個体の治療において使用するために適している。関節リウマチ(RA)は、体の全てとは言わなくともそのほとんどに影響を及ぼす全身疾患であり、関節炎の最も一般的な形態の1つである。RAは、疼痛、凝り、温感、発赤および腫脹を引き起こす関節の炎症を特徴とする。この炎症は、炎症細胞が関節に侵入し、これらの炎症細胞が骨および軟骨を消化することができる酵素を放出した結果である。結果として、この炎症により、重度の骨および軟骨損傷、ならびに他の生理的影響の中でも関節の悪化および重度の疼痛が導かれる。関与する関節は、その形状およびアラインメントを失い、その結果、疼痛および運動の喪失が生じる可能性がある。

【0157】

20

当技術分野で公知の関節リウマチについての動物モデルがいくつか存在する。例えば、コラーゲン誘導関節炎(CIA)モデルでは、マウスにおいてヒト関節リウマチに似た炎症性関節炎が発生している。CIAはRAと同様の免疫学的特徴および病理学的特徴を共有するので、このことにより、このモデルは潜在的なヒト抗炎症性化合物をスクリーニングするための適切なモデルになる。このモデルにおける有効性は、関節の腫脹の減少によって測定する。診療所におけるRAにおける有効性は、関節の腫脹、赤血球沈降速度、C反応性タンパク質レベルおよび抗シトルリン化タンパク質抗体などの血清因子のレベルの組合せとして測定される、患者における症状を減少させる能力によって測定する。

【0158】

30

本発明のPGLYRP1抗体は、乾癬の個体の治療において使用するために適している。乾癬は、かなりの不快感を引き起こす可能性があるT細胞に媒介される皮膚の炎症性障害である。乾癬は、現在は治療法が存在せず、全ての年齢の人に影響を及ぼす疾患である。軽度の乾癬の個体は、多くの場合、局所用剤によってその疾患を制御することができるが、世界的に百万人を超える患者が紫外線治療または全身免疫抑制療法を必要としている。残念ながら、紫外線放射の不自由およびリスク、ならびに多くの療法の毒性により、それらの長期使用が制限される。さらに、患者は、通常、乾癬を再発し、いくつかの場合には、免疫抑制療法を停止した直後にリバウンドする。最近開発されたCD4+T細胞の移入に基づく乾癬のモデルは、ヒト乾癬の多くの態様を模倣し、したがって、乾癬の治療において使用するために適した化合物を同定するために用いることができる(Davenportら、Internat. Immunopharmacol 2: 653~672、2002年)。このモデルにおける有効性は、スコアリングシステムを使用した皮膚病態の減少によって測定される。同様に、患者における有効性を皮膚病態の減少によって測定する。

40

【0159】

本発明のPGLYRP1抗体は、乾癬性関節炎の個体の治療において使用するために適している。乾癬性関節炎(PA)は、乾癬の患者のサブセットにおいて起こる炎症性関節炎の一種である。これらの患者では、皮膚病態/症状は、関節リウマチにおいて見られるものと同様の関節の腫脹を伴う。PAは、スケーリングを伴う、斑状の隆起した赤色の皮膚炎症の領域を特徴とする。乾癬は、多くの場合、肘および膝の先端、頭皮、臍ならびに生殖器領域または肛門の周辺に影響を及ぼす。乾癬を有する患者のおよそ10%で、関連する炎症が関節にも発生する。

【0160】

50

「治療」という用語は、本明細書で使用される場合、それを必要とする任意のヒトまたは他の動物対象の医学療法を指す。前記対象は、医療実践者または獣医療実践者による身体検査を受けていると考えられ、前記実践者は、前記治療を用いることが前記ヒトまたは他の動物対象の健康に有益であると示しうる試験的または決定的な診断をしている。前記治療のタイミングおよび目的は、対象の健康の現状などの多くの因子に応じて、個体によって変動しうる。したがって、前記治療は、予防的、待機的、対症的および/または治療的であってよい。

【0161】

本発明に関して、予防的治療、待機的治療、対症的治療および/または治療的治療は、本発明の別々の態様を示しうる。

10

【0162】

本発明の抗体は、例えば、静脈内など、例えば、筋肉内など、例えば、皮下など、非経口的に投与することができる。あるいは、本発明の抗体は、例えば、経口的、または局所的など、経口経路によって投与することができる。本発明の抗体は、予防的に投与することができる。本発明の抗体は、治療的に(要望に応じて)投与することができる。

【0163】

例示的な実施形態

1. TREM-1、TREM-1に対するシグナル伝達タンパク質および前記シグナル伝達タンパク質によって活性化されるレポーター構築物を発現している細胞。

【0164】

2. 造血起源である、実施形態1に記載の細胞。

20

【0165】

3. 骨髄細胞である、実施形態2に記載の細胞。

【0166】

4. T細胞である、実施形態2に記載の細胞。

【0167】

5. シグナル伝達タンパク質がDAP10である、実施形態1から4のいずれか1つに記載の細胞。

【0168】

6. シグナル伝達タンパク質がDAP12である、実施形態1から4のいずれか1つに記載の細胞。

30

【0169】

7. シグナル伝達タンパク質がTCRゼータである、実施形態1から4のいずれか1つに記載の細胞。

【0170】

8. シグナル伝達タンパク質がFcガンマRIIIである、実施形態1から4のいずれか1つに記載の細胞。

【0171】

9. シグナル伝達タンパク質がFc受容体である、実施形態1から4のいずれか1つに記載の細胞。

40

【0172】

10. レポーター構築物が転写因子およびレポーター遺伝子を含む、実施形態1から9のいずれか1つに記載の細胞。

【0173】

11. 前記転写因子がNFATである、実施形態10に記載の細胞。

【0174】

12. 前記転写因子がNFkBである、実施形態11に記載の細胞。

【0175】

13. 前記レポーター遺伝子が -ガラクトシダーゼをコードする、実施形態10から12のいずれか1つに記載の細胞。

50

## 【 0 1 7 6 】

14.前記レポーター遺伝子がルシフェラーゼをコードする、実施形態10から12のいずれか1つに記載の細胞。

## 【 0 1 7 7 】

15.前記レポーター遺伝子が緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする、実施形態10から12のいずれか1つに記載の細胞。

## 【 0 1 7 8 】

16.前記レポーター遺伝子がクロラムフェニコールトランスフェラーゼをコードする遺伝子である、実施形態10から12のいずれか1つに記載の細胞。

## 【 0 1 7 9 】

17.BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ T細胞である、実施形態1から4、実施形態6、実施形態10から11、および実施形態13のいずれか1つに記載の細胞。

## 【 0 1 8 0 】

18.前記細胞をPGLYRP1と接触させる工程を含む、実施形態1から17のいずれか1つに記載の細胞を刺激する方法。

## 【 0 1 8 1 】

19.前記細胞をPGLYRP1およびPGNと接触させる工程を含む、実施形態1から17のいずれか1つに記載の細胞を刺激する方法。

## 【 0 1 8 2 】

20.前記PGLYRP1が細胞によって発現される、実施形態18から19のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 8 3 】

21.PGLYRP1を発現している細胞が原核細胞である、実施形態20に記載の方法。

## 【 0 1 8 4 】

22.PGLYRP1を発現している細胞が真核細胞である、実施形態20に記載の方法。

## 【 0 1 8 5 】

23.PGLYRP1を発現している細胞が哺乳動物の細胞である、実施形態22に記載の方法。

## 【 0 1 8 6 】

24.PGLYRP1を発現している細胞が活性化された好中球である、実施形態23に記載の方法。

## 【 0 1 8 7 】

25.PGLYRP1を発現している細胞がHEK細胞である、実施形態23に記載の方法。

## 【 0 1 8 8 】

26.TREM-1リガンドを同定する方法であって、(a)実施形態1から18のいずれか1つに記載の細胞を培養する工程と、(b)前記TREM-1を発現している細胞の、TREM-1活性化のトリガーとなる細胞、体液、例えば、生体液または組織などと接触させた際の活性を検出、好ましくは定量する工程と、(c)(b)の培養物をTREM-1タンパク質と接触させる工程と、(d)TREM-1に結合する成分を単離する工程と、(e)単離された成分を特徴付ける工程とを含む方法。

## 【 0 1 8 9 】

27.PGLYRP1に特異的に結合し、TREM-1に媒介される細胞活性を改変する分子を同定する方法であって、(a)実施形態1から18のいずれか1つに記載の細胞を培養する工程と、(b)前記TREM-1を発現している細胞の、PGLYRP1、および場合によってPGNなどの多量体化剤と接触させた際の活性を検出、好ましくは定量する工程と、(c)(b)の培養物を、PGLYRP1に特異的に結合する分子と接触させる工程と、(d)前記TREM-1を発現している細胞の活性が、(b)において測定されたその活性よりも低い、または高いことを検出、好ましくは定量する工程とを含む方法。

## 【 0 1 9 0 】

28.TREM-1に媒介される細胞活性を改変するPGLYRP1抗体またはその断片を同定する方法であって、(a)実施形態1から18のいずれか1つに記載の細胞を培養する工程と、(b)前記TR

10

20

30

40

50

EM-1を発現している細胞の、PGLYRP1、および場合によってPGNなどの多量体化剤と接触させた際の活性を検出、好ましくは定量する工程と、(c)(b)の培養物を、PGLYRP1に結合する抗体と接触させる工程と、(d)前記TREM-1を発現している細胞の活性が、(b)において測定されたその活性よりも低い、または高いことを検出、好ましくは定量する工程とを含む方法。

【 0 1 9 1 】

29. 前記PGLYRP1抗体またはその断片が、TREM-1に媒介される細胞活性を低下させ、(d)において測定される第1の細胞の活性が、(b)において測定されたその活性よりも低い、実施形態27に記載の方法。

【 0 1 9 2 】

10

30. 前記PGLYRP1抗体またはその断片が、TREM-1に媒介される細胞活性を上昇させ、(d)において測定される第1の細胞の活性が、(b)において測定されたその活性よりも高い、実施形態27に記載の方法。

【 0 1 9 3 】

31. 実施形態28から30のいずれか1つに記載の方法によって同定されるPGLYRP1抗体またはその断片。

【 0 1 9 4 】

32. PGLYRP1に特異的に結合し、PGLYRP1に媒介されるTREM-1活性を低下させることができるPGLYRP1抗体またはその断片。

【 0 1 9 5 】

20

33. TREM-1を発現する細胞からの1つまたは複数のサイトカインの放出を減少させることができる、実施形態31から32のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 1 9 6 】

34. モノクローナル抗体である、実施形態31から33のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 1 9 7 】

35. ヒト化抗体である、実施形態31から34のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 1 9 8 】

36. ヒト抗体である、実施形態31から34のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 1 9 9 】

30

37. キメラ抗体である、実施形態31から34のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 2 0 0 】

38. 前記抗体のアイソタイプがIgGである、実施形態31から37のいずれか1つに記載の抗体。

【 0 2 0 1 】

39. 前記アイソタイプがIgG1、IgG2またはIgG4である、実施形態38に記載の抗体。

【 0 2 0 2 】

40. 前記抗体のアイソタイプがIgG1である、実施形態37に記載の抗体。

【 0 2 0 3 】

41. 前記抗体のアイソタイプがIgG4である、実施形態37に記載の抗体。

40

【 0 2 0 4 】

42. PGLYRP1との結合について抗体1F10と競合することができる、実施形態31から41のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 2 0 5 】

43. PGLYRP1との結合について抗体1F36/mAb 0182と競合することができる、実施形態31から41のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 2 0 6 】

44. PGLYRP1との結合について抗体1F95と競合することができる、実施形態31から41のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【 0 2 0 7 】

50

45. PGLYRP1との結合について抗体1F105/mAb 0184と競合することができる、実施形態31から41のいずれか1つに記載の抗体。

【0208】

46. PGLYRP1との結合について抗体2F5と競合することができる、実施形態31から41のいずれか1つに記載の抗体。

【0209】

47. PGLYRP1との結合について抗体2F7と競合することができる、実施形態31から41のいずれか1つに記載の抗体。

【0210】

48. 配列番号37(II型1.0 PGLYRP1)および/または配列番号38(II型2.0 PGLYRP1)に特異的に結合することができる、実施形態31から47のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

10

【0211】

49. 標的に対する $K_D$ が、表面プラズモン共鳴を用いて決定した場合に、 $1 \times 10^{-6}M$ 以下、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下、 $1 \times 10^{-8}M$ 以下、または $1 \times 10^{-9}M$ 以下、または $1 \times 10^{-10}M$ 以下、 $1 \times 10^{-11}M$ 以下、 $1 \times 10^{-12}M$ 以下または $1 \times 10^{-13}M$ 以下である、実施形態31から48のいずれか1つに記載の抗体またはその断片。

【0212】

50. 重鎖が、配列番号15のアミノ酸残基31～35(SYWMN)に対応するCDRH1配列であって、前記アミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列; および/または配列番号15のアミノ酸50～66(MIHPDSETRLNQKFQD)に対応するCDRH2配列であって、前記アミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列; および/または配列番号15のアミノ酸残基98～108(DYSDYDGFAY)に対応するCDRH3配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含む、実施形態31から49のいずれか1つに記載の抗体。

20

【0213】

51. 重鎖が、配列番号19のアミノ酸残基31～35(DYNMY)に対応するCDRH1配列であって、前記アミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列; および/または配列番号19のアミノ酸50～66(YIDPYNGDTSYNQKFQK)に対応するCDRH2配列であって、前記アミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列; および/または配列番号19のアミノ酸残基99～109(GDYGNPFYLDY)に対応するCDRH3配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含む、実施形態31から49のいずれか1つに記載の抗体。

30

【0214】

52. 重鎖が、配列番号23のアミノ酸残基31～35(DTYIH)に対応するCDRH1配列であって、前記アミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列; および/または配列番号23のアミノ酸50～66(RIDPANDDTKYDPNFQG)のCDRH2配列であって、前記アミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列; および/または配列番号23のアミノ酸残基99～108(SDNSDSWFAY)のCDRH3配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含む、実施形態31から49のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0215】

53. 重鎖が、配列番号27のアミノ酸残基31～35(DYNMH)に対応するCDRH1配列であって、前記アミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列; および/または配列番号27のアミノ酸50～66(YVDPYDGGTSSNQKFQK)に対応するCDRH2配列であって、前記アミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列; および/または配列番号27のアミノ酸残基99～106(EVPYYFDY)に対応するCDRH3配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含む、実施形態31から49のいずれか1つに記載の抗体。

【0216】

50

54. 重鎖が、配列番号31のアミノ酸残基31～35(DYYMY)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列; および/または配列番号31のアミノ酸50～66(AISDDSTYTYPPDSVKG)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列; および/または配列番号31のアミノ酸残基99～109(GGYGNLYAMDY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含む、実施形態31から49のいずれか1つに記載の抗体。

【0217】

55. 重鎖が、配列番号35のアミノ酸残基31～35(NYVMH)に対応するCDRH1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH1配列; および/または配列番号35のアミノ酸50～66(WINPFNDGTNYNENFKN)に対応するCDRH2配列であって、これらのアミノ酸の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸残基で置換されていてよいCDRH2配列; および/または配列番号35のアミノ酸残基99～109(SGFITTLIEDY)に対応するCDRH3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRH3配列を含む、実施形態31から49のいずれか1つに記載の抗体。

【0218】

56. 軽鎖が、配列番号16のアミノ酸残基24～34(RASQSIDYLH)に対応するCDRL1配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列; および/または配列番号16のアミノ酸残基51～56(ASQSIG)に対応するCDRL2配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列; および/または配列番号16のアミノ酸残基89～97(QNGHSFPLT)に対応するCDRL3配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含む、実施形態50から55のいずれか1つに記載の抗体。

【0219】

57. 軽鎖が、配列番号20のアミノ酸残基24～33(SVSSSVNYMY)に対応するCDRL1配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列; および/または配列番号20のアミノ酸残基49～55(DTSKLPS)に対応するCDRL2配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列; および/または配列番号20のアミノ酸残基88～96(QQWTSNPPT)に対応するCDRL3配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含む、実施形態50から55のいずれか1つに記載の抗体。

【0220】

58. 軽鎖が、配列番号24のアミノ酸残基24～33(SVSSSVNFMN)に対応するCDRL1配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列; および/または配列番号24のアミノ酸残基49～55(DTSKLAP)に対応するCDRL2配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列; および/または配列番号24のアミノ酸残基88～96(HQWSSYSLT)に対応するCDRL3配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含む、実施形態50から55のいずれか1つに記載の抗体。

【0221】

59. 軽鎖が、配列番号28のアミノ酸残基24～33(VASSSVTYMY)に対応するCDRL1配列であって、前記アミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列; および/または配列番号28のアミノ酸残基49～54(THPLAS)に対応するCDRL2配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列; および/または配列番号28のアミノ酸残基87～95(PHWNTNPPT)に対応するCDRL3配列であって、前記アミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含む、実施形態50から55のいずれか1つに記載の抗体。

【0222】

60. 軽鎖が、配列番号32のアミノ酸残基24～35(TASSSVSSSYLH)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよ

10

20

30

40

50



いCDRL1配列;および/または配列番号32のアミノ酸残基51~57(STSNLAS)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号32のアミノ酸残基90~98(HQYHRSPFT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含む、実施形態50から55のいずれか1つに記載の抗体。

【0223】

61. 軽鎖が、配列番号36のアミノ酸残基24~34(KASEVGSFVS)に対応するCDRL1配列であって、これらのアミノ酸残基の1つ、2つまたは3つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL1配列;および/または配列番号36のアミノ酸残基50~56(GASNRYT)に対応するCDRL2配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL2配列;および/または配列番号36のアミノ酸残基89~96(GQYYTHPT)に対応するCDRL3配列であって、これらのアミノ酸残基の1つまたは2つが異なるアミノ酸で置換されていてよいCDRL3配列を含む、実施形態50から55のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0224】

62. 医薬として使用するための、実施形態31から61のいずれか1つに記載の抗体。

【0225】

63. 炎症性疾患の治療において使用するための、実施形態31から62のいずれか1つに記載の抗体。

【0226】

64. 医薬として使用するための、PGLYRP1に特異的に結合し、PGLYRP1に媒介されるTREM-1活性を低下させることができる抗体。

20

【0227】

65. 炎症性疾患の治療において使用するための、PGLYRP1に特異的に結合し、PGLYRP1に媒介されるTREM-1活性を低下させることができる抗体。

【0228】

66. 炎症性疾患が自己免疫疾患である、実施形態62から65のいずれか1つに記載の使用。

【0229】

67. 自己免疫疾患が関節リウマチ(RA)である、実施形態66に記載の使用。

【0230】

68. 自己免疫疾患が炎症性腸疾患(IBD)および/または潰瘍性大腸炎である、実施形態66に記載の使用。

30

【0231】

69. 自己免疫疾患が乾癬性関節炎(PA)である、実施形態66に記載の使用。

【0232】

70. 心血管疾患、脳卒中、虚血再灌流傷害、敗血症および/または癌の治療における、実施形態62または64に記載の使用。

【0233】

本発明は、さらに限定するものと解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例示される。全ての図面ならびに本出願全体を通して引用された全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容は、明白に参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0234】

(実施例)

(実施例1)

BWZ.36ヒトTREM-1:DAP12安定細胞株の生成

BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ細胞株(本明細書では「BWZ/hTREM-1レポーター細胞」とも称される)は、BW5147 T細胞(ハツカネズミ(*Mus musculus*)胸腺リンパ腫細胞株、ATCC TIB-47、LGC Standards、Middelsex, UK)に由来し、NFATプロモーターエレメントの4つのコピーによって調節されるLacZレポーター構築物を含有する(Karttunen, J. & Shastri, N. (1991年) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3972-3976頁およびFiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Matilla, P., Crabtree, G. R. & Herzenberg, L. A. (1990年)

50

Genes Dev. 4、1823-1834頁を参照されたい)。TREM-1 cDNA(Gene Bank Ref. ID: NM\_018643.2, Sino Biological Inc., Beijing, China)を鋳型として、ならびにオリゴ5' TAGTAGGGATCCGCTGGTGCACAGGAAGG(配列番号51)および5' TAGTAGGCGGCCGCTTCGTGGGCCTAGGGTAC(配列番号52)をプライマーとして使用してpIREShygベクターGenBankアクセッション番号U89672(Cat番号6061-1, Clontech Laboratories, CA, USA)にクローニングしたTREM/DAP12/pMX-IRESベクター(SmaI部位からBamHI部位までのTREM-1の786bpをコードする)を、Superfectトランスフェクション試薬(Cat番号301305, Qiagen Nordic, Denmark)を使用してPLAT-Eパッケージング細胞株(W. Yokoyama, Washington Universityにより提供された;あるいは、Cat番号RV-101, Cell Biolabs Inc, Bio-Mediator KY, Vantaa, Finland)にトランスフェクトした。TREM/DAP12/pMX-IRESウイルス粒子を含有するPLAT-E上清を使用して、BWZ.36細胞を以下の通り

10

感染させた: BWZ.36細胞 $2 \times 10^5$ 個を6ウェルプレートで培養し、培地を、ウイルス粒子を含有する上清+8mg/mlのポリブレン1.5mlと交換した。6~8時間後、通常培地1.5mlをプレートに加え、細胞をさらに24時間インキュベートした。TREM-1を安定に発現しているBWZ.36細胞株を、抗TREM-1モノクローナル抗体(クローン21C7; Bouchonら、2000、J. Immunol 164巻 4991~4995頁)を用いて染色し、細胞選別によって単離した。

#### 【0235】

(実施例2)

TREM-1に対するリガンドを発現している細胞を同定するためのバイオアッセイの創出

TREM-1レポーター細胞株を、実施例1に記載の通りNFAT-lacZ担持細胞株BWZ.36(Sanders on S, Int. Immun. 1994年)をhTREM-1およびDAP12でトランスフェクトすることによって生成した。このBWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ細胞株(本明細書ではBWZ/hTREM-1レポーター細胞とも称される)は、TREM-1の抗体に媒介される架橋結合に高度に応答し、1~10  $\mu$ g/mlのプレートに結合させた市販の抗TREM-1抗体を用いて刺激した際のNFATに駆動されるLacZ産生の誘導がアイソタイプ対照と比較して約40倍である。レポーター細胞におけるNFATに駆動されるLacZ産生は、発光に基づくキットであるBeta Glow(商標)(PROMEGA E4720, Madison, WI)を使用してアッセイすることができる。プレートを、アイソタイプ対照またはTREM-1 MAB1278(PBS中3  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ L/ウェルの濃度)(R&D Systems, Minneapolis, USA)を用いて、4 で16時間、または37 、5 %CO<sub>2</sub>で2時間にわたってコーティングし、10 mlのVersene(カタログ番号15040, Gibco, Carlsbad CA, USA)を加えることによってBWZ/h

20

30

#### 【0236】

これらのTREM-1応答性の細胞を使用して、TREM-1リガンドを発現している細胞を同定した。そのような細胞の1つは全血由来の好中球であることが分かった。健康なドナーの好中球をフィコールおよびデキストラン沈降によって精製し、PGN(InVivogen, tlr1-pgnsa, San Diego, CA, USA)を用いて一晩刺激した。簡単に述べると、BWZ/hTREM-1レポーター細胞を活性化された好中球の培養物にレポーター細胞:好中球の比率1:3で加えた。ポリ-D-リシンコーティングした黒色細胞培養物プレート(#356640, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)でアッセイを実行した。24時間培養した後に、BetaGlo試薬(E4720 from Promega, Madison, WI, USA)を使用してTREM-1活性化を読み取り、Perkin ElmerのTopCount Luminescence counterを使用して発光を測定した。

40

#### 【0237】

in vitroで刺激した好中球はTREM-1シグナル伝達を誘導することができるリガンドを保有し、健康なドナーの全血由来の好中球をデキストラン沈降によって精製し、多数の試薬を用いて一晩刺激した。細菌による細胞の活性化を模倣するPGN-SA(InVivogen, tlr1-pgnsa, San Diego, CA, USA)が好中球からのTREM-1応答性シグナルを刺激することができた唯一の試薬であった。次いで、これらの活性化された好中球を使用して、BWZ/hTREM-1レポ

50

ーター細胞株を、細胞を共培養することによって刺激した。簡単に述べると、BWZ/hTREM-1レポーター細胞を活性化された好中球の培養物にレポーター細胞:好中球の比率1:3で加えた。ポリ-D-リシンコーティングした黒色細胞培養プレート(Cat番号356640 BD Biosciences, San Jose, CA, USA)でアッセイを実行した。24時間培養した後に、BetaGlo試薬(Cat番号E4720, Promega, Madison, WI, USA)を使用してTREM-1活性化を読み取り、Perkin Elmer, Waltham MA, USAのTopCount Luminescence counterを使用して発光を測定した。図1に示されているように、PGNで刺激した好中球と共培養したBWZ/hTREM-1細胞においてレポーター活性の顕著な誘導が観察された。この誘導は、好中球の活性化に高度に依存した。休止状態の好中球(バー2、好中球)では応答は見られなかった。同様に、BWZ/hTREM-1レポーター細胞を好中球の不在下でTLRLカクテル中のPGN-SAを用いて刺激した場合(バー1-TLRL)、応答は見られず、これは、応答がただ単にBWZ/hTREM-1細胞に対するPGNの直接の影響ではないことを実証している。好中球をサイトカイン混液で活性化すること(バー3+4好中球+サイトカイン)ではいずれも正確なTREM-1活性化シグナルはもたらされなかった。

【0238】

(実施例3)

PGNで活性化された好中球と可溶性TREM-1の結合

PGNで刺激した好中球はTREM-1活性化を誘導することができ、これは、PGNで刺激した好中球の培養物中にTREM-1刺激因子が存在したことを示す。好中球上にTREM-1と相互作用するタンパク質が存在することを確認するために、PGNで刺激した好中球を組換えTREM-1四量体タンパク質を用いて染色し、フローサイトメトリーによって解析した。簡単に述べると、Astarte Biologics(Redmond, WA, USA)から入手したヒト全血から、フィコール-デキストラン沈降法によって顆粒球を単離した。50mlのチューブ中フィコール3、血液4の比率で、FicollPaque(17-0840-03, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)勾配で血液を層別化し、次いで、22℃、400×gで30分、ブレーキなしで遠心分離した。中間のPBMCバンドを吸引によって穏やかに除去した。濃縮RBCの上に層別化された顆粒球を吸引し、50mlのポリプロピレンチューブに移した。顆粒球および混入RBCを1×PBSで40mlに希釈し、その後、PBS溶液中4%デキストラン500(Sigma, 31392, St Louis, MO, USA)10mlを加えた。穏やかに反転させることによって混合した後、チューブを22℃で20~30分放置した。次いで、顆粒球に富む上清を新しいチューブに写し、22℃、250×gで5分遠心分離し、上清を吸引し、廃棄した。浸透圧溶解を用いて混入RBCを除去した。簡単に述べると、細胞ペレットを0.2%NaCl 7.5mlに再懸濁させ、55~60秒穏やかに混合し、1.2%NaCl溶液17.5mlを加えた。次いで、PBSを用いて体積を50mlにし、250×gで5分間回転させ、ペレットを0.2%NaCl 7.5mlに再懸濁させて、2回目の溶解を繰り返した。最終的な顆粒球ペレットをRPMI/10%FBSに再懸濁させた。

【0239】

単離された顆粒球を、RPMI/10%FBS+10 µg/mlのPGN-SA(InvivogenTlr1-pgnsa, San Diego, CA, USA)中3.8 E6個/mlの密度で7日間培養した。細胞を遠心分離することによってペレット化し、染色のためにPBS/2%FBSに再懸濁させた。次いで、再懸濁させた顆粒球を96ウェルプレート(丸底)に100,000個/ウェルの密度で、2 µg/mlのプロープの存在下または不在下で、100 µg/ml (50×)の特異的なまたは無関連の競合タンパク質を伴って、または伴わずにプレーティングした。細胞をプロープ/競合剤と一緒に、50 µl/ウェルの体積で、4℃で1時間インキュベートした。インキュベーションの最後に、150 µl/ウェルのPBS/2%FBSを加え、細胞をペレット化した。ペレット化した細胞を50 µl/ウェルのヤギ抗hFc F(ab')<sub>2</sub>/PEコンジュゲート(Jackson ImmunoResearch 109-116-098, West Grove, PA, USA)に再懸濁させ、4℃で30分間インキュベートした。150 µl/ウェルのPBS/2%FBSを加え、細胞をペレット化した。ペレット化した細胞を、200 µl/ウェルのPBS/2%FBSでさらに洗浄し、ペレット化した。次いで、洗浄した細胞を100 µl/ウェルの固定液(1:1 PBS: Cytofix, 554655, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)に再懸濁させ、室温で5分インキュベートした。100 µl/ウェルのPBS/2%FBSを固定した細胞に加え、次いで、細胞をペレット化した。次いで、染色/固定した細胞を、LSR IIフローサイトメーター(BD Biosciences, San Jo

se, CA, USA)でフローサイトメトリー分析するために、100  $\mu$ l/ウェルのPBS/2%FBSに再懸濁させた。

【0240】

プローブセット:

Fc mut 5.36mg/ml 配列番号3

hTREM-1 tet/Fc mut 1.07mg/ml 配列番号2

【0241】

hTREM-1 tet/Fc mutに対する競合剤:

50  $\times$  DCIR COMP 0.3mg/ml 配列番号4

50  $\times$  TREM COMP 1.14mg/ml 配列番号5

【0242】

フローサイトメトリーのデータからヒストグラムを作成した。ヤギ抗hFc/PEコンジュゲート由来のバックグラウンド蛍光を各ヒストグラムにおいてバックグラウンドとして示し、「PE」と名付けた。二次ヤギ抗hFc/PEコンジュゲート抗体と結合した細胞の百分率を示す同一のマーカーが各ヒストグラム上に描かれている。陰性対照であるFc mutタンパク質では2%の陽性結合細胞が示され、これは、ヤギ抗hFc/PEコンジュゲート単独で見られたバックグラウンド蛍光と同一であった(図2A)。細胞を2  $\mu$ g/mlのhTREM-1/四量体で染色した場合、39%が陽性であった(図2B)。100  $\mu$ g/mlのDCIR COMPタンパク質に関連してTREM-1四量体結合を行った場合、細胞の41%が陽性であり、これにより、DCIR COMPがTREM-1四量体と結合について競合しないことが確認された(図2C)。100  $\mu$ g/mlのTREM-1 COMPの存在下でTREM-1四量体結合を行った場合、細胞の10%が陽性であり、これにより、TREM COMPタンパク質が細胞との結合についてTREM-1四量体と競合することが示された(図2D)。

【0243】

(実施例4)

好中球で発現されるTREM-1リガンドとしてのPGLYRP1の同定

免疫沈降と質量分析(IP-MS)を合わせて用いることによってPGLYRP1をTREM-1リガンドとして同定した。リガンドを同定するための親和性「ベイト」分子として可溶性TREM-1四量体を使用した。簡単に述べると、TREM-1-四量体-Fc(配列番号2)および別のCD83-Fc(配列番号5)をそれぞれ、100  $\mu$ g/mlの最終濃度で、上記の通りデキストラン沈降によって精製したヒト好中球27,000万個と一緒に、1mLのPBS中4 で90分、軽く振とうしながらインキュベートした。ペレット化した後、細胞を、架橋剤3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオネート](DTSSP)(Thermo Scientific: 21578、Rockford、IL、USA)を2mMの濃度で含むPBS緩衝液1mLに再懸濁させ、室温で30分インキュベートした。細胞を、1mLのPBSを用いて3回洗浄し、その後、1mLのRIPA緩衝液中(Thermo Scientific、89901、Rockford、IL、USA)に溶解させた。溶解物を4 、15,000  $\times$  gで10分間遠心分離して不溶性材料を除去した。Protein A Mag Sepharose(商標)ビーズ(GE Healthcare Life Sciences、28-9670-56、Piscataway、NJ、USA)を使用して、Fcとカップリングしたプローブと架橋結合した好中球タンパク質を上清から免疫沈降させた。簡単に述べると、まずビーズ50  $\mu$ LをPBS 200  $\mu$ Lで洗浄し、次いで、細胞溶解物1mLに再懸濁させ、4 で60分インキュベートし、磁気によって捕捉し、RIPA緩衝液200  $\mu$ Lで2回、次いでPBS 200  $\mu$ Lで3回、逐次的に洗浄した。最終的な磁気捕捉物からPBSを除去したら、8Mの尿素、100mMのトリス(pH 8.0)、および15mMのTCEP(Thermo Scientific、77720、Rockford、IL、USA)を含有する緩衝液200  $\mu$ Lを使用して磁気ビーズからタンパク質を溶出させ、室温で30分間インキュベートし、ビーズを捕捉し、上清をMicrocon Ultracel YM-30フィルター(Millipore、42410、Billerica、MA、USA)に移した。試料を20 、14,000  $\times$  gで30~60分、濾過膜の上部に液体がなくなるまで回転させた。次いで、保持されたタンパク質を、8Mの尿素中50mMのIAA(ヨードアセトアミド)100  $\mu$ Lを用いて、暗所、室温で30分にわたってアルキル化した。フィルターを50mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100  $\mu$ Lで2回洗浄し、次いで、新しい収集管に移した。50mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 60  $\mu$ L中トリプシン(Cat番号V5111、Promega、Madison WI、USA)1  $\mu$ gを加え、その後、37 で一晚インキュベートした。14,000  $\times$  gで30分遠心分離し、その後、フィルターを50mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

10

20

30

40

50

50  $\mu$ Lで洗浄することによってトリプシン消化物を収集した。消化物10  $\mu$ Lを、LTQ-Orbitrap-XL質量分光計(Thermo Scientific、Waltham、MA、USA)を使用してLC/MS/MSによって分析した。データを、SEQUEST-Sorcerer engine(4.0.4 build)(SageN、Milpitas、CA、USA)を使用してIPIヒトデータベース(v3.81)と対照して検索し、次いで、Scaffold 3(PRoteome Software、Portland、OR、USA)を用いて後処理して、タンパク質IDをフィルタリングし、偽発見率は1%であった。陰性対照サブトラクション後、PGLYRP1は、hTREM-1四量体と特異的に会合する信頼度の高いタンパク質であることが見いだされた。好中球における免疫沈降により、同定されたタンパク質148種のうち、72種のタンパク質が単独の対照構築物(CD83)によって免疫沈降し、73種のタンパク質がTREM-1およびCD83と同一であり、3種のみがTREM-1特異的である(図3)ことが示された。その後、異なるドナー由来の好中球を使用して実験を繰り返し、再度、PGLYRP1がhTREM-1と特異的に相互作用すると同定された。

10

## 【0244】

## (実施例5)

HEK293 6Eにより発現されたヒトPGLYRP1の精製

ヒトCD33シグナルペプチド配列(配列番号53)とヒト成熟PGLYRP1コード配列(配列番号1)を融合することによって組換えタンパク質配列を構築した。生じたオープンリーディングフレームをpcDNA3.1/Zeo(+)ベクター(Life Technologies、Carlsbad CA、USA)に、CMVプロモーターの後ろにクローニングした。次いで、293fectin<sup>TM</sup>(Life Technologies、Carlsbad CA、USA)をベンダーのプロトコールに従って用いて、pcDNA3.1-hPGLYRP1構築物をHEK 293 6E細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした5日後に、分泌されたヒトPGLYRP1を含有する培養上清を、遠心分離(15,000rpm  $\times$  20分、4 )することによって採取し、次いで、0.22  $\mu$ mの硝酸セルロース膜を用いて濾過することによって清澄化した。清澄化した上清を、まず20mMのクエン酸ナトリウム、pH5.0中に10倍希釈し、次いで、Hitrap SP HP 5mlカラム(17-1151-01 GE Healthcare、Uppsala、Sweden)に適用し、その後、20mMのクエン酸ナトリウムpH5.0を用いて5カラム体積の洗浄を行った。次いで、結合したヒトPGLYRP1を、20mMのクエン酸ナトリウム、pH5.0、1MのNaClの0~100%直線勾配を30カラム体積で用いて溶出させた。ヒトPGLYRP1の二量体型および単量体型を含有する画分を別々にプールし、Amicon ultra 15遠心ユニット(UFC800324 3,000 kDa MWCO、Millipore、Hellerup、Denmark)によって4ml未満まで濃縮した。二量体プールおよび単量体プールをさらに最終精製し、HiLoad 26/60 Superdex 75 318mlカラム(17-1070-01 GE Healthcare、Uppsala、Sweden)によって緩衝液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)と交換した。濃縮後、NANODROP UV分光計を用いて280nmの吸収を測定することによって最終的なタンパク質の濃度を決定した。タンパク質の純度をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって評価した。

20

30

## 【0245】

## (実施例6)

大腸菌により発現されたヒトPGLYRP1のリフォールディングおよび精製

ヒトPGLYRP1を大腸菌(*Escherichia Coli*)BL21(DE3)細胞において封入体として発現させた。細菌を遠心分離によって採取し、50mMのトリス-HCl、pH8.0、500mMのNaCl、5mMのEDTA、0.5%トリトンX100に再懸濁させ、超音波処理によって破壊した。不溶性ペレットを50mMのトリス、pH8.0、1%トリトンX-100、2Mの尿素で3回、および50mMのトリス、pH8.0で1回洗浄し、次いで、50mMのトリス-HCl、6Mの塩酸グアニジン、pH7.4、1mMのDTT(最終的なタンパク質の濃度20mg/ml)に可溶化させた。in vitroにおいてフォールディングさせるために、可溶化されたヒトPGLYRP1封入体を50mMのトリス、pH8.0、2mMのEDTA、5mMのシステアミン、0.5mMのシスタミン、0.4Mのアルギニン(最終的なタンパク質の濃度1mg/ml)中に希釈した。4 で一晩置いた後、フォールディング混合物を遠心分離/濾過によって清澄化し、次いで、10mMのMES、pH3.5中に12倍に希釈して、伝導率およびpHを低下させた(最終的なpH約5.8、伝導率約6mS/cm)。次いで、希釈したフォールディング混合物をHitrap SP HP 5mlカラム(17-1151-01 GE Healthcare、Uppsala、Sweden)に適用し、その後、50mMのMES、pH5.8を用いて5カラム体積の洗浄を行った。次いで、結合したヒトPGLYRP1を、50mMのM

40

50

ES、pH5.8、1MのNaClの0～60%の直線勾配を20カラム体積で用いて溶出させた。リフォールディングしたヒトPGLYRP1を含有する画分をプールし、Amicon ultra 15遠心ユニット(UFC800324 3,000 kDa MWCO、Millipore、Hellerup、Denmark)によって4ml未満まで濃縮した。次いで、HiLoad 26/60 Superdex 75 318mlカラム((17-1070-01 GE Healthcare、Uppsala、Sweden)を使用してタンパク質を最終精製し、緩衝液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)と交換した。大多数のリフォールディングしたヒトPGLYRP1タンパク質が単量体型であった。濃縮後、NANODROP UV分光計を用いて280nmの吸収を測定することによって最終的なタンパク質の濃度を決定した。タンパク質の純度をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって評価した。

【0246】

10

(実施例7)

マウスの免疫化およびmAbの同定

抗体を生じさせるために、精製されたヒトPGLYRP1を使用してマウスを免疫化した。簡単に述べると、1回の免疫化当たり20 µgの組換えPGLYRP1を用いて、マウスを3回免疫化した。第1の免疫化は完全フロイントアジュバント(Cat番号3018、Statens Serum Institut、Copenhagen、Denmark)を使用して皮下に行った。続く2回の免疫化は、不完全フロイントアジュバント(Cat番号3016、Statens Serum Institut、Copenhagen、Denmark)を使用して腹腔内に行った。最後の免疫化の10日後、頬の血液を抜き取り、直接ELISAで血清をPGLYRP1に対して試験した。

【0247】

20

(実施例8)

可溶性TREM-1とPGLYRP1の結合

新規のタンパク質間相互作用を検証する1つの一般的な方法は、組換え試薬を使用して相互作用を再構成することによるものである。この目的のために、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)構造の翻訳後付加C末端エピトープシグナル伝達を有する組換えヒトPGLYRP1を発現させた。末端GPI構造を含有するタンパク質を原形質膜上にディスプレイする標的とする。この一般に適用される技法により、そうでなければ可溶性のタンパク質をディスプレイし、フローサイトメトリー技法によって結合について試験することが可能になる。図4aでは、HEK-2936E細胞に、pCDNA 3.1/zeo(+)hPGLYRP1-GPI(配列番号7)をトランスフェクトした。Optimem(Cat番号31985062、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) 100 µl中にDNA 3 µgを希釈した。293fectin(Cat番号51-0031、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)4 µLをOptimem(Cat番号31985062、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) 100 µLに加え、22℃で5分間インキュベートした。DNA/Optimemミックスおよび293fectin/Optimemミックスを混ぜ合わせ、室温でさらに20分インキュベートした。HEK-2936E細胞を、Freestyle培地(Cat番号12338、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)中に1e6個/mlで3mlまで希釈し、6ウェルディッシュ(Cat番号35-3046、Biosciences San Jose、CA、USA)にプレATINGし、次いで、DNA/293fectinミックスを細胞に滴下添加した。細胞を37℃

30

で48時間、振とうしながらインキュベートした。1 µg/mlのヒトTREM-1-G4S×3-TREM-1/Fc6mut(配列番号2)をPBS/2%FBS中に希釈し、プローブ50 µLを、丸底96ウェルプレート(Cat番号3799、Costar、Lowell、MA、USA)中、トランスフェクトされたHEK293-6E細胞80,000個に加えた。細胞を4℃で1時間インキュベートし、その後、PBS/2%FBS 200 µLで2回洗浄した。1 µg/mlのPEヤギ抗ヒトFc(Cat番号109-116-098、Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA、USA)50 µLを加え、さらなる時間インキュベートし、その後、PBS/2%FBSで2回洗浄した。細胞を1:1 PBS希釈したBDCytofix(Cat番号554655、BD Biosciences、San Jose、CA、USA)中で5分間固定し、5分間インキュベートし、その後、PBS/2%FBS 200 µLで洗浄した。細胞をPBS/2%FBS 100 µLに再懸濁させた後、FACS LSRII(BD Biosciences、San Jose、CA)で解析した。この実験の結果が図4aに示されており、染色されなかった細胞が黒い実線(G03)で示されている。偽トランスフェクトされた細胞のTREM-1-G4S×3-TREM-1/Fc6mut染色が破線で示されており、染色されなかった細胞と比較して結合は示されていない。最後に、ヒトPGLYRP1-GPIをトランスフェクトした細胞は、点線で示されているTREM-1-G4

40

50

S×3-TREM-1/Fc6mutに頑強に結合する。結合の定量化は平均蛍光強度、MFIで表されている。

#### 【0248】

フローサイトメトリーに加えて、表面プラズモン共鳴 (SPR) を測定することによってもタンパク質間相互作用も一般に評価される。BiacoreT200 (GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) 計器を使用して、ヒトTREM-1とヒトPGLYRP1との間の相互作用、および同様にヒトPGLYRP1と、超音波処理した可溶性大腸菌ペプチドグリカン (Cat番号t1rl-ksspgn、Invivo gen、San Diego、CA、USA) との間の相互作用を解析した。アッセイは全て25、1×HBS-Pランニング緩衝液 (Cat番号BR-1006-71、GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) 中、20~30 μL/分の流速で実施した。

#### 【0249】

図4Bでは、4641.1RUのヒトTREM-1四量体 (配列番号2) を、Biacore CM5チップ (Cat番号BR-1005-30、BR-1000-50、GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) と、製造者が推奨する方法に従ってアミンカップリングした。PGLYRP1 (Cat番号2590-PG、R&D Systems、Minneapolis、USA) を1×HBS-Pランニング緩衝液 (Cat番号BR-1006-71、GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) 中、10 μg/mLの可溶性大腸菌ペプチドグリカン (Cat番号t1rl-ksspgn、Invivogen、San Diego、CA、USA) の存在下または不在下で150nMまで希釈し、TREM-1表面に注入した。データは、活性化しブロッキングした (エタノールアミンを用いて) 参照表面に対して参照サブトラクションしたものである。PGLYRP1はPGNの存在下および不在下のどちらでもTREM-1と結合するが、PGLYRP1がPGNと架橋結合した場合に顕著な結合活性効果があると思われる。

#### 【0250】

図4Cでは、274.8RUのPGLYRP1二量体 (配列番号1) を、Biacore CM5チップ (Cat番号BR-1005-30、BR-1000-50、GE Healthcare、Piscataway、NJ) とアミンカップリングした。可溶性大腸菌ペプチドグリカン (Cat番号t1rl-ksspgn、Invivogen、San Diego、CA、USA) を1×HBS-Pランニング緩衝液 (Cat番号BR-1006-71、GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) 中10 μg/mLまで希釈し、PGLYRP1表面に注入した。データは、活性化しブロッキングした (エタノールアミンを用いて) 参照表面に対して参照サブトラクションしたものである。

#### 【0251】

図4Dでは、図4Cにおけるものと同じチップを使用した (274.8RUのPGLYRP1二量体、(配列番号1)。TREM-1二量体 (配列番号8) を1×HBS-Pランニング緩衝液 (BR-1006-71、GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) 中150nMまで希釈し、ペプチドグリカンを繰り返し注入する前後の両方に注入した (図Bに示されている)。データは、活性化しブロッキングした (エタノールアミンを用いて) 参照表面に対して参照サブトラクションしたものであり、緩衝液ブランク注入のシグナルもサブトラクションしてある。TREM-1は、固定化したPGLYRP1との明白な結合を示す。可溶性TREM-1二量体は、固定化したPGLYRP1単独と、またはPGNをローディングしたPGLYRP1と同様に結合する。表面に固定化したTREM-1受容体と可溶性PGLYRP1およびPGNとの全体的な結合は、高度に架橋結合したPGLYRP1による結合活性効果によって増強されるPGLYRP1:TREM-1複合体についてのそれほど大きくない親和性からなる。

#### 【0252】

(実施例9)

組換えPGLYRP1によるTREM-1応答の活性化

組換えPGLYRP1がTREM-1応答を活性化することができるかを検査するために、BWZ/hTREM-1レポーター細胞株を黒色96ウェルプレートに播種し、10 μg/mlのPGNの存在下または不在下で、組換えヒトPGLYRP1 (Cat番号2590-PG-050、R&D Systems: Minneapolis、MN) を用いて刺激した。24時間培養した後に、BetaGlo試薬 (Cat番号E4720、Promega Madison、WI、USA) を使用してTREM-1活性化を読み取り、Perkin ElmerのTopCount Luminescence counterを使用して発光を測定した。図5aに示されているように、TREM-1レポーター細胞株をPGLYRP1で刺激することにより、PGNの存在下で用量依存的なTREM-1の活性化が誘導された。PGN-EC (大腸菌由来)、PGN-SA (黄色ブドウ球菌 (S.aureus) 由来) およびPGN-BS (枯草菌 (B.

10

20

30

40

50

subtilis)由来)(Invivogen、San Diego、CA、USA)を含めたいくつかの異なるPGNを試験し、これらは全てPGLYRP1に誘導されるTREM-1応答を促進することができた。

#### 【0253】

組換えPGLYRP1によって誘導される応答は、組換えTREM-1-Fc融合物タンパク質(配列番号2)(図5b)を加えることによって、またはポリクローナル抗PGLYRP1抗体(Cat番号AF-2590、R&D Systems: Minneapolis、MN、USA)を加えることによって阻害することができ、これにより、PGLYRP1がTREM-1リガンドであること、ならびに可溶性TREM-1および抗PGLYRP1がTREM-1アンタゴニストとして潜在的に有用であることが確認される。

#### 【0254】

(実施例10)

PGLYRP1によって刺激されたM1マクロファージからのTNFアルファ放出

単球をM1マクロファージに分化させ、PGLYRP1複合体を用いて刺激し、その結果、2つの異なるドナーでTNFアルファが放出された。

#### 【0255】

したがって、都合のよい実験の反復をもたらす、多数のドナー由来の初代細胞のフリーザーバンク収集物を確立することの価値が当業者には理解されよう。in vitroで得られるマクロファージは末梢血単球から以下の通り作製される。負に濃縮された単球を、Research Blood Components(Brighton、MA、USA)から入手した末梢血「Leukopak」から、Rosette Sepキット(cat番号Cat番号15068 Stem cell technologies、Vancouver BC、Canada)を製造者の説明書に従って使用して単離した。単離された単球を10%DMSO/FBS一定分量に50e6細胞/mlで懸濁させ、-80℃まで徐々に冷却した。マクロファージ細胞を作製するために、1つまたは複数の凍結した単球のバイアルを37℃のウォーターバス中で急速に解凍し、10%FBS(Cat番号03-600-511、Thermo Fisher、Waltham MA、USA)を伴う成長培地[RPMI 1640(Cat番号72400-047、Life Technologies、Carlsbad CA、USA))を用いて10mlまで希釈し、250gで5分遠心分離した。細胞を、50ng/mlのヒトMCSF(Cat番号PHC9501、Life Technologies、Carlsbad CA、USA)を補充した成長培地中に2e6細胞/mlまで懸濁させ、組織培養処理したペトリ式組織培養物プレートに入れ、5%CO<sub>2</sub>、2%O<sub>2</sub>の「低酸素」雰囲気が維持されるようにプログラミングした加湿インキュベーターに入れた。培養3日目に、細胞に、50ng/mlのヒトMCSFを補充した成長培地を等体積で加えた。6日培養した後に、単球がM0マクロファージに分化した。培地を、M1マクロファージに対しては50ng/mlのヒトIFNγ(Cat番号、PHC4031、Life Technologies、Carlsbad CA、USA)、またはM2マクロファージに対しては40ng/mlのヒトIL-4(Cat番号PHC0045、Life Technologies、Carlsbad CA、USA)を補充した成長培地に変えることによってM0細胞をさらに分化させ、インキュベーターに戻してさらに22時間置いた。7日目に、マクロファージがバイオアッセイにおいて使用するために適切に分化した。簡単に述べると、1×PBS、その後PBS中5mMのEDTAで洗浄することによってマクロファージをペトリプレートから回収した。次いで、プレートを37℃に戻して30分間置き、10mlのシリンジおよび22Gの針を使用して細胞をプレートから「パワー洗浄(power wash)」した。次いで、細胞を成長培地中に希釈し、250gで5分間遠心分離し、その後、細胞ペレットを懸濁させて最終濃度を1×10<sup>6</sup>/mlにした。

#### 【0256】

上記の通り調製したマクロファージ細胞を、馴化培地においてTREM-1リガンドを用いた細胞の刺激に応答して産生されたTNF-アルファなどのサイトカインをELISAによって測定するバイオアッセイにおいて使用した。そのようなバイオアッセイを、TREM-1特異的抗体によるTREM-1リガンド刺激の遮断を測定するためにさらに利用した。TREMリガンドまたは陰性対照を成長培地中4×濃度で調製し、50マイクロリットル/ウェルを96ウェルマイクロタイターのディッシュに加えた。TREM-1リガンドの最終濃度は7.5ng/mlの組換えヒトPGLYRP1(実施例5に記載の通り生成した)および3μg/mlのPGN-BS(Cat番号、tlrl-pgnbs、Invivogen、San Diego CA、USA)からなった。細胞を上記の通り加湿した低酸素条件下で22時間培養した後、馴化培地を収集し、TNF-アルファレベルをELISAによって製造者の説明書に従って測定した(Cat番号DY210、R&D Systems、Minneapolis MN、USA)。



【 0 2 5 7 】

【表 1】

	ドナー1 TNF- $\alpha$ , pg/ml		ドナー2 TNF- $\alpha$ , pg/ml	
	平均	SD	平均	SD
以下を伴う M1 マクロファージ:				
添加なし	0	0	22	1
0.4 $\mu$ g/ml PGN-BS	357	153	764	139
2.0 $\mu$ g/ml PGN-BS	3086	151	5792	226
5 $\mu$ g/ml PGLYRP1 + 0.4 $\mu$ g/ml PGN-BS	7502	384	7819	945
5 $\mu$ g/ml PGLYRP1 + 2 $\mu$ g/ml PGN-BS	31440	1030	40418	1633

10

【 0 2 5 8 】

この実施例により、TREM-1リガンドであるPGLYRP1が、2つの異なるドナー由来のマクロファージからのTNF $\alpha$ 放出をさらに増加させることができることが示される。

【 0 2 5 9 】

20

(実施例11)

PGLYRP1を用いて刺激した際のRA患者由来の滑液組織細胞からのサイトカインの放出

滑液組織試料をRA患者から人工膝関節全置換の間に得た。単一の滑液組織細胞の懸濁液を、4mg/mlのコラゲナーゼ(Cat番号11088793001、Roche、Mannheim、Germany)および0.1mg/mlのDNA分解酵素(Cat番号11284932001、Roche、Mannheim、Germany)によって37℃で1時間にわたって消化することによって単離した。

【 0 2 6 0 】

培養培地RPMI(Cat番号R0883,Sigma Aldrich,St Louis、MO、USA)+10%FCS(Cat番号.S0115、BioChrom AG、Grand Island、NY 14072、USA)中、 $1 \times 10^5$ 個/ウェルの滑液組織細胞を4  $\mu$ g/mlのPGLYRP1および1  $\mu$ g/mlのPGN-ECNDi(Cat番号tlrl-kipgn、Invivogen,San Diego、CA 92121、USA)で刺激した。24時間インキュベートした後、細胞の上清を採取し、サイトカインをELISA(TNF $\alpha$ (Cat番号DY210、R&D Systems、Minneapolis、MN55413 USA)、IL-1b(Cat番号88-7010-88、eBioscience、San Diego CA USA)、GM-CSF(Cat番号88-7339-88、eBioscience、San Diego CA USA)またはFlowcytomix(TNF $\alpha$ 、IL-1b、MIP-1b、MCP-1、IL-6、およびIL-8(Cat番号BMS、eBioscience、San Diego CA USA)のいずれかによって測定した。TREM-1リガンドで刺激すると滑液組織細胞からサイトカインが分泌された。

30

【 0 2 6 1 】

【表 2】

サイトカイン (pg/ml)	PGN	PGN+PGLYRP1
TNF アルファ	623.69	1444.59
IL-1 ベータ	2419.42	3772.74
GM-CSF	181.91	615.91
MIP-1 ベータ	2457.955	4394.725
MCP-1	273.055	471.26
IL-6	2056.94	4189.355
IL-8	2574.56	5509.195

10

## 【 0 2 6 2 】

この実施例により、関節リウマチ患者由来の滑液組織由来の細胞がTREM-1リガンドであるPGLYRP1による刺激に、多数のサイトカインを分泌することによって応答することが示される。

20

## 【 0 2 6 3 】

(実施例12)

TREM-1活性化を阻害する抗PGLYRP1 mAbの同定

TREM-1応答を遮断することができるモノクローナル抗PGLYRP1 mAbを同定するために、wtbalb/cマウスを、組換えヒトPGLYRP1を用いて免疫化した。PGLYRP1タンパク質に対する直接ELISAによって一次スクリーニングを行い、その後、PGLYRP1に特異的なハイブリドーマの上清を全てBWZ/hTREM-1レポーター細胞アッセイにおいて試験して、実施例1に記載されているPGNで刺激した好中球によって誘導されるTREM-1活性化を阻害することができるモノクローナル抗PGLYRP1抗体を同定した。バイオアッセイを以下の通り実行した：hTREM-1/BWZ.36細胞40,000個/ウェルを、底が透明の黒色96ウェルプレートに、最大下陽性シグナルをもたらすために2.5 µg/mlのPGN-ECndi(Cat番号t1rl-kipgn、Invivogen San Diego、CA、USA)を伴う75ng/mlのPGLYRP1(配列番号1)の存在下で、あるいは、陽性シグナルをもたらすために最大下レベル(1 µg/ml)のプラスチックに吸着させた抗TREM-1モノクローナル抗体(Cat番号MAB1278 R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)の存在下でプレーティングした。試験抗体を、アッセイを10 µg/mlで開始し、5段階の2倍希釈で力価決定した。アッセイを37 °Cで一晩インキュベートし、Beta Glo(Cat番号E4740、Promega Madison、WI、USA)をBeta Gloプロトコールに従って用いて展開し、発光を記録した。データをプロットし試験抗体濃度に対するBeta Glo相対発光単位を示した。非中和性陰性対照であるmIgG1(Cat番号MAB002、R&D Systems Minneapolis、MN、USA)および中和性陽性対照であるポリクローナルヤギ抗hPGLYRP1抗体(Cat番号AF2590、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)を各アッセイプレートに供した。図6aに示されているように、F10、F14、F29、F36、F38、F77、F95およびF105が、PGLYRP1に対するTREM-1応答を遮断できると同定された。図6Bには、他のPGLYRP1抗体ハイブリドーマの上清がTREM-1依存性シグナルを遮断することができることが示されている。M-hPGRPS-2F5(配列番号31~32および-2F7(配列番号35~36)は非常に効率的な遮断薬である。対照的に、市販のモノクローナル抗PGLYRP1抗体を同じアッセイプロトコールにおいて抗PGLYRP1ヤギポリクローナル陽性対照(Cat番号AF2590、R&D Systems Minneapolis、MN、USA)と並行して試験することにより、これらはいずれもTREM-1活性化を遮断することができなかったことが示された(図6C)。試験した抗PGLYRP1抗体は、Thermo Scientificの188C424(6D)、US Biologicalの4H230および9A319 Mab(図6D、6E)を含み、これらは全て、TREM-1バイオアッセイのPGLYRP1刺激を遮断することがで

30

40

50

きなかった。Santa Cruz Biotechnologyのクローン6D653(図6Fおよび6G)は、このMabはPGLYRP1(6F)および抗TREM-1刺激(6G)のどちらも遮断したが、陽性対照である抗PGLYRP1ポリクローナルAbはPGLYRP1に媒介される活性化のみを遮断したという観察に基づいて、アッセイを非特異的に遮断することが見いだされた。この非特異的な遮断は、バイオアッセイに対するアジ化物の毒性に起因する可能性がある。

【 0 2 6 4 】

結論として、PGLYRP1に結合するだけでなく、そのTREM-1シグナル伝達活性を中和するPGLYRP1モノクローナル抗体が同定されている。これらの分子を同定するために用いる方法により、PGLYRP1抗体を同定するために用いる常套的な方法に対する独特の利点をもたらされ、これは、PGLYRP1を中和するための市販の抗体がないことによって証明される。

10

【 0 2 6 5 】

(実施例13)

PGLYRP1抗体はTREM-1特異的シグナルを遮断する

PGLYRP1ハイブリドマクローンについて配列決定し、組換えによってhIgG4抗体として発現させた。これらのうちの2つであるmAb0182(1F36由来)(配列番号15および16)およびmAb0184(1F105由来)(配列番号23および24)は、実施例13に記載のBWZ/hTREM-1レポーター細胞アッセイにおいて再試験した。これらの抗PGLYRP1抗体は、BWZ/hTREM-1レポーター細胞アッセイにおいてTREM-1応答を用量依存的に遮断する。

【 0 2 6 6 】

【表 3】

20

BWZ.36/hTREM-1 応答、Beta Glo RLU						
抗体	アイソタイプ		182		184	
<u>ug/ml</u>	<u>平均</u>	<u>SD</u>	<u>平均</u>	<u>SD</u>	<u>平均</u>	<u>SD</u>
0	74636	10004	74636	10004	74636	10004
0,16	70289	13018	81858	3336	60738	5449
0,31	68555	5585	73382	650	59830	2837
0,63	68105	11547	73831	7818	51198	397
1,25	71797	8545	63280	1663	46447	708
2,5	69207	5004	51675	1270	42062	1953
5	76951	901	33641	842	36194	1461
10	83930	8962	20655	1080	25239	407
20	74555	511	11852	464	21333	115
40	72296	8228	7696	306	15693	1861

30

40

【 0 2 6 7 】

この実施例では、図6C～Gに示されている市販のPGLYRP1に対する抗体とは対照的に、本明細書で開示されているPGLYRP1抗体は、BWZ/hTREM-1レポーター細胞アッセイにおいてTREM-1特異的シグナルを遮断することができることが示される。

【 0 2 6 8 】

(実施例14)

PGLYRP1によって刺激されたM2マクロファージからのTNF-アルファ放出

単球をM2マクロファージに分化させ、PGLYRP1複合体を用いて刺激した。PGLYRP1を対象とする抗体(10 μg/ml)mAb -0182およびmAb -0184は、TNF-アルファ放出をより減少させる

50

ことができる。実施例10に記載の通りM2マクロファージを分化させた。試験する抗体を成長培地中4×濃度で調製し、50マイクロリットル/ウェルを加えた。バイオアッセイを開始する最後のステップとして、上記の通り調製したM2マクロファージ細胞を100マイクロリットル/ウェル加えた。PGLYRP1モノクローナル抗体(mAb0182およびmAb0184)を、M2マクロファージに対する中和活性について試験した。2連の(特に断りのない限り)試験ウェルを以下の条件下で試験した:刺激を加えない、7.5ng/mlのPGLYRP1のみ、3μg/mlのPGN-BS(Cat番号tlrl-pgnbs、Invivogen San Diego、CA、USA)のみ(6連)、PGLYRP1とPGN-BS(6連)、および、40μg/mlから0.31μg/mlの間の濃度で2倍希釈して力価決定したPGLYRP1抗体またはhIgG4アイソタイプ対照抗体の存在下でPGLYRP1とPGN-BS。

【0269】

【表4】

	ドナー1 TNF-α, pg/ml		ドナー2 TNF-α, pg/ml	
	平均	SD	平均	SD
以下を伴う M2 マクロファージ:				
添加なし	108	42	68	16
PGLYRP1	167	98	89	33
PGN	424	105	635	156
PGLYRP1+PGN	1660	198	2168	210
PGLYRP1+PGN+アイソタイプ	1726	182	2483	251
PGLYRP1+PGN+mAb 0182	1322	173	2014	107
PGLYRP1+PGN+mAb 0184	1207	168	1948	173

【0270】

この実施例では、TREM-1リガンドであるPGLYRP1が、2つの異なるドナー由来のM2マクロファージからのTNFα放出をさらに増加させることができること、および本明細書で開示されている抗体がそのようなTNFα放出を減少させることができることが例示されている。したがって、これらのPGLYRP1抗体はTREM-1アンタゴニストとして潜在的に有用である。

【0271】

(実施例15)

TREM-1とPGLYRP1関連分子との間の結合相互作用の調査により、特異性が確認される。

TREM-1が、PGNの存在下でPGLYRP1に結合し、TREM-1を活性化することができることが特定されたので、本発明者らは、TREM-1が他のPGLYRPファミリーメンバーに結合することができるかどうかを決定することに着手する。PGLYRP1を、N末端にII型受容体であるMDL-1に由来する細胞内(IC)ドメインおよび膜貫通(TM)ドメインを付加することによって細胞膜に人工的に係留した。後者の構築物はII型PGLYRP1を示した(図8)。II型1.0(配列番号37)では、ネイティブなMDL-1受容体TMの荷電アミノ酸が維持されており、このタンパク質の効率的な発現はDAP12の同時発現に左右される。II型2.0 PGLYRP1構築物(配列番号38)では、荷電したTM残基は中性アミノ酸に置換されており(リシンからロイシンへ)、これにより、タンパク質を例えばDAP12とは独立して発現させることが可能になり、また、DYKDDDDK(配列番号39)のエピトープタグが付加されている。全長hPGLYRP2(配列番号40)、hPGLYRP3(配列番号41)、およびhPGLYRP4(配列番号42)、cDNAを、上記のPGLYRP1について利用したII型2.0 MDL1 N末端のN末端融合を用いて、膜係留タンパク質として合成した。cDNAを、改変したpTT5発現プラスミドベクター(Zhang Jら、Protein Expression and Purification

10

20

30

40

50

、65巻、2009年5月1日発行、77～8頁)にサブクローニングし、実施例8に記載の通り、HEK 293-6E細胞、並行して空ベクター陰性対照(偽)にトランスフェクトした。細胞を、以下のプローブの表面結合および細胞内結合の両方について、フローサイトメトリーによってアッセイした:ヤギ抗ヒトPGLYRP1(PGRPS)(Cat番号AF2590、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA);Mab抗ヒトPGLYRP2(PGRP-L)(Cat番号MAB0755、Abnova、Walnut、CA、USA);Mab抗ヒトPGLYRP3(PGRP-1a)(Cat番号MAB0068、Abnova、Walnut、CA、USA);Mab抗ヒトPGLYRP3(PGRP-1a)(Cat番号ab13901、Abcam、Cambridge MA、USA);ウサギ抗ヒトPGLYRP3(PGRP-1a)(Cat番号18082-1-AP、タンパク質 Tech、Chicago IL、USA);ヤギ抗ヒトPGLYRP4-ビオチン(PGRP-1b)(Cat番号BAF3018、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA);ヤギ抗マウスPGLYRP1(PGRPS)(Cat番号AF2696、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA);huTREM-1.Fc二量体(C0099);huTREML1.Fc二量体(C0246);huTREML2.Fc二量体(C0247);huTREM2.Fc二量体(C0248);結合プロトコールを以下の通り、細胞内染色についてはcytofix/perm緩衝液(Cat番号51.2090KZ、BD Biosciences、San Jose CA、USA)、または表面染色については2%FBS/PBSを使用して行った。細胞ペレットを96ウェル丸底プレート(160,000細胞/mlで開始)中、cytofix/perm緩衝液200  $\mu$ lに22  $^{\circ}$ Cで15分間再懸濁させ、1  $\times$  PermWash緩衝液(DiH<sub>2</sub>O中10  $\times$  希釈)200  $\mu$ lで2回洗浄し、1  $\times$  PermWash緩衝液中5  $\mu$ g/mlまで希釈したプローブ50  $\mu$ lを用いて染色し、4  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、次いで、細胞を1  $\times$  PermWash緩衝液200  $\mu$ lで洗浄し、二次プローブを1  $\times$  PermWash緩衝液50  $\mu$ lに加え、細胞を4  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、1  $\times$  PermWash緩衝液200  $\mu$ lで2回洗浄し、ペレットを1:1 PBS希釈したCytoFix(BD:554655、San Jose、CA)50  $\mu$ l中に再懸濁させ、22  $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし、PBS/2%FBS 150  $\mu$ lを加え、300gで5分間遠心分離し、PBS/2%FBS 200  $\mu$ lで1回洗浄し、PBS/2%FBS 100  $\mu$ lに再懸濁させた。LSRII(BD、San Jose CA、USA)でFACSを用いて結合を解析した。

【 0 2 7 2 】

下記の表に要約されている通り、TREM-1プローブは排他的にhPGLYRP1に結合し、PGLYRP 2、PGLYRP3またはPGLYRP4に結合するhTREMファミリーメンバーは検出されなかった。

【 0 2 7 3 】

【表 5】

	偽	Ⅱ型 PGLYRP1	Ⅱ型 PGLYRP2	Ⅱ型 PGLYRP3	Ⅱ型 PGLYRP4	Ⅱ型 PGLYRP 3+4	Ⅱ型 muPGLYR P1
抗 huPGLYRP1 (R&D, AF2590)	-	++++	-	-	++	+	++++
抗 huPGLYRP2 (Abnova, MAB07755)	-	-	++++	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP3 (Abnova, MAB0068)	-	-	-	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP3 (Abcam, ab13901)	-	-	-	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP3 (Proteintech, 18082-1-AP)	-	-	-	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP4 (R&D, BAF3018)	-	++++	-	-	++++	++++	n/d
抗 muPGLYRP1 (R&D, AF2696)	-	++++	n/d	n/d	n/d	n/d	++++
huTrem1.Fc (C0099)	-	++++	-	-	-	-	-
huTremL1.Fc (C0246)	-	-	-	-	-	-	-
huTremL2.Fc (C0247)	-	-	-	-	-	-	n/d
huTrem2.Fc (C0248)	-	-	-	-	-	-	n/d

## 【 0 2 7 4 】

ヒト膜係留PGLYRP1、PGLYRP2、PGLYRP3およびPGLYRP4をHEK293において一過性に発現させ、ファミリーメンバー間の新しい相互作用を同定するための社内および商業的な可溶性受容体および抗体の両方で探索した。結合スコアを、「n/d」、「-」、「+」または「+++」と表した。スコアは、プローブ染色と陰性対照染色の平均蛍光強度(MFI)の比率であり、「-」は<1の比率と等しく、「++++」は>30のスコアを示し、「++」はおおよそ10~15を示し、「+」は2~5を示し、統計的有意差を伴う(p<0.05)。当業者は、このスコアリングをそれぞれ陰性、強陽性または弱陽性と特徴付けることができる。

## 【 0 2 7 5 】

TREM-1はPGLYRP1とのみ結合し、他のPGLYRPメンバーのいずれとも結合せず、逆もまた

10

20

30

40

50

同じであり、PGLYRP1はTREM-1とのみ相互作用し、他のTREMメンバーのいずれとも相互作用しない。

【0276】

(実施例16)

TREM-1リガンドはRA滑液試料に存在する

関節リウマチは、活性化された顆粒球が重要な役割を果たす中手指節関節(MCP)の炎症を特徴とする。PGLYRP1をELISAによってアッセイし、RA患者9人のMCP関節から抜き取った滑液由来のBWZ/hTREM-1レポーター細胞アッセイにおいて試験した。市販の滑液(Asterand、Detroit MI、USA)を解凍し、ボルテックスし、ELISA緩衝液中に段階的に希釈し、PGLYRP1アッセイに製造者のガイドラインに従って(Promega、Madison WI、USA)供した。患者9人のうち4人がPGLYRP1レベルの上昇を示した。

【0277】

【表6】

RA SF ドナー	PGLYRP1, ng/ml	
	平均	SD
1	14	5
2	8	1
3	213	44
4	229	58
5	135	49
6	47	4
7	39	13
8	116	33
9	32	1

【0278】

その後、RA滑液試料をTREMリガンド活性について実施例2に記載の通りBWZレポーターアッセイにおいてアッセイした。簡単に述べると、滑液を解凍し、ボルテックスし、段階的に希釈し、ポリクローナルPGLYRP1抗体(Cat番号AF2590、Promega、Madison WI、USA)または陰性対照ポリクローナルを添加して、10 µg/mlのPGNECndi(Invivogen、San Diego、CA、USA)を伴って、または伴わずに2連でアッセイした。プラスチックに接着したモノクローナルTREM-1抗体およびアイソタイプ抗体(R&D Systems、Minneapolis MN、USA)がそれぞれ陽性対照および陰性対照としての機能を果たした。図7には、関節リウマチ患者由来の滑液がどのようにPGLYRP1依存的にBWZ/hTREM-1レポーター細胞アッセイのトリガーとなることができるかの例が例示されている。

【0279】

(実施例17)

PGLYRP1: TREM 1相互作用の同定および特徴付けにおいて有用な哺乳動物の発現ベクターのアセンブリ

A.) pJSV002 hTREM-1-G4S x 3-hTREM-1/Fc6mut(配列番号9)の構築

ヒトIgG1のFc受容体結合性欠損型を、可変ドメインおよび定常1(CH1)ドメインを含むヒトIgG1の最初の215アミノ酸を排除し、ヒンジドメイン、定常2ドメインおよび定常3ドメ

イン内に以下のアミノ酸置換を行うことによって築いた:(E216G、C220S、L234A、L235E、G237A、A330S、P331S)。この構築物は、Fc受容体との結合を調節するために6つの突然変異を行ったので、ApaI制限クローニング部位を創出するために7番目の突然変異(E216G)を組み入れたが、Fc6mutと名付けた。これらの突然変異をpJSV002(改変pTT5、Zhang Jら Protein Expression and Purification、65巻、2009年5月1日発行、77~8頁)内に築き、Fc6mutの受容体5'の細胞外ドメインをEcoRI/ApaI断片としてクローニングすることを可能にした。5'EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列、CD33リーダー配列、その後に、間にKpnI制限部位および3回繰り返されるグリシン-グリシン-グリシン-セリンスペーサー(G4S×3)を有するヒトTREM-1の細胞外ドメイン(aa17~200)、その後にヒトTREM-1の細胞外ドメイン(aa17~200)の追加的なコピーおよびFc6mutの上流のクローニングを可能にするためのApaI部位を有するcDNAを合成した。この合成されたDNAをEcoRIおよびApaIで切断し、同じくEcoRI/ApaI消化を用いて調製したpJSV002 Fc6mutにライゲーションした。このライゲーション物をDH10B大腸菌に電気穿孔で導入し、アンピシリン寒天プレートにプレーティングした。個々のクローンをLB+アンピシリン培養物2ml中で一晩成長させ、ミニプレップし、その後、EcoRI/ApaIを用いて制限スクリーニングして、適切な1219塩基対の挿入を有するクローンを見つけた。正確なクローンについて配列決定し、正確なクローンの1つ(#519)を、追加的なDNAをビッグプレップ(big prep)によって調製するために選択した。

#### 【0280】

##### B.)hTREM-1-COMP-SBP38×2-6His(配列番号10)の構築

五量体TREM ECD分子を創出するために、pJSV002発現ベクターにおいてC末端のエピトープタグを創出した。軟骨オリゴマータンパク質(COMP)の3'末端をコードする合成cDNAを、C末端6×Hisドメインの前のストレプトアビジン結合タンパク質ドメイン(SBP)の2つのコピーと融合し、受容体の細胞外ドメインをこの断片の5'にEcoRI/KpnI断片としてクローニングできるようにpJSV002内に築いた。その後、EcoRI制限部位、その後にGCCACCコザック配列およびC末端KpnI部位を伴うヒトTREM-1の細胞外ドメインを含有するhTREMcdDNAを合成した。このEcoRI/KpnI断片を上記のpJSV002 COMP-SBP38×2-6Hisベクターにライゲーションした。このライゲーション物をDH10B大腸菌(Life Technologies、Carlsbad CA、USA)に電気穿孔で導入し、アンピシリン寒天プレートにプレーティングした。個々のクローンを、LB+アンピシリン培養物2ml中で一晩成長させ、ミニプレップし、その後、EcoRI/KpnIを用いて制限スクリーニングして適切な616bpの挿入を有するクローンを見つけた。正確なクローンについて配列決定し、正確なクローンの1つである#525を、追加的なDNAをビッグプレップによって調製するために選択した。全長cDNAは配列番号10として列挙されている。

#### 【0281】

##### C.)pJSV002 hCD83-G4S×3-hCD83/Fc6mut(配列番号11)の構築

hCD83四量体は、以前に、広範囲の細胞株に対して試験した際にFACS解析によって結合性が低いことが示されており、したがって、実施例3において概説されているIPMS実験に対する優れた陰性対照になる。この分子を創出するために、5'EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列、CD33リーダー配列、その後に、間にKpnI制限部位および3回繰り返されるグリシン-グリシン-グリシン-セリンスペーサー(G4S×3)を有するヒトCD83の細胞外ドメイン、その後に、ヒトCD83の細胞外ドメインの追加的なコピーを有するcDNAを合成した。次いで、このcDNAを上記のpJSV002発現ベクターに、hFc6mutの上流にクローニングした。生じた成熟タンパク質は、配列番号6として列挙されており、EcoRIとApaIの間のタンデムなCD83細胞外ドメインcDNA配列は配列番号11として示されている。

#### 【0282】

##### D.)pJSV002 NCOMP-hDCIR(配列番号12)の構築

実施例5において使用したhTREM-1-COMP五量体に対する陰性対照としてhDCIR-COMPを使用した。以下のエレメントを有するpJSV002に基づく発現プラスミドを創出した: 6×HISタグ、その後に、2型受容体の細胞外ドメインをこの断片の3'にBglII/BamHI断片としてクローニングし、五量体可溶性受容体として発現させることができるように軟骨オリゴマー



タンパク質 (COMP) の3'末端と融合したストレプトアビジン結合タンパク質ドメイン (SBP) の2つのコピー。合成cDNA鋳型からPCR断片を増幅して、5'末端および3'末端にそれぞれBglII末端およびBamHI末端を有するDNA断片を生成した。この断片をBglII制限酵素およびBamHI制限酵素を用いて切断し、その後バンド精製した。生じた断片を、予めBglIIおよびBamHIを用いて切断したpJSV002 NCOMPにライゲーションした。ライゲーション物をDH10B大腸菌に電気穿孔で導入し、アンピシリン選択寒天にプレーティングした。クローンを選び取り、ミニプレップし、EcoRIおよびBamHIを用いてスクリーニングし、適切な1.137kBの挿入を有するクローンについて配列決定した。NCOMP-SBPおよびDCIR配列を含む完全なオープンリーディングフレームをコードするcDNAは配列番号12と称され、以前に成熟ペプチド配列配列番号4と称されているものをコードする。

10

## 【 0 2 8 3 】

## E.) pNNC649-hTREM1-hFc6mut二量体の構築

実施例14ではTREM1-Fc二量体を使用して、PGLYRP1との結合を確認し、他のPGLYRPファミリーメンバーとの結合を試験した。pTT5に基づくプラスミド (Zhang Jら、Protein Expression and Purification、65巻、2009年5月1日発行、77～8頁) pNNC649を利用して、受容体の細胞外ドメインをインフレームで、およびFc6mutの5'をクローニングすることを可能にした。hTREM1-Fc6mutを発現させるために、5'EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列およびhCD33リーダー配列、その後にヒトTREM-1の細胞外ドメイン(aa17～200)、その後にKpn1部位を有するcDNAを合成した。このcDNAを、当業者によく知られている制限酵素およびDNAリガーゼ技法を用いてpNNC549にクローニングした。CD33リーダー、hTREM1 ECDおよびFc6mut配列を含む完全なオープンリーディングフレームをコードするcDNAは配列番号43と称され、成熟ペプチド配列配列番号44をコードする。

20

## 【 0 2 8 4 】

## F.) pNNC649-hTREML1-Fc6mut二量体の構築

5'EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列およびhCD33リーダー配列、その後にヒトTREML1の細胞外ドメイン(aa16～162)、その後にKpn1部位を有する合成cDNAを創出した。このcDNAを、当業者によく知られている制限酵素およびDNAリガーゼ技法を用いて上記のpNNC549ベクターにクローニングした。CD33リーダー、hTREML1 ECDおよびFc6mut配列を含む完全なオープンリーディングフレームをコードするcDNAは配列番号45と称され、成熟ペプチド配列配列番号46をコードする。

30

## 【 0 2 8 5 】

## G.) pNNC649-hTREML2-Fc6mut二量体の構築

5'EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列およびhCD33リーダー配列、その後にヒトTREML2の細胞外ドメイン(aa19～268)、その後にKpn1部位を有する合成cDNAを創出した。このcDNAを、当業者によく知られている制限酵素およびDNAリガーゼ技法を用いて上記のpNNC549ベクターにクローニングした。CD33リーダー、hTREML2 ECDおよびFc6mut配列を含む完全なオープンリーディングフレームをコードするcDNAは配列番号47と称され、成熟ペプチド配列配列番号48をコードする。

## 【 0 2 8 6 】

## H.) pNNC649-hTREM2-Fc6mut二量体の構築

5'EcoRI制限部位、GCCACCコザック配列およびhCD33リーダー配列、その後にヒトTREM2の細胞外ドメイン(aa19～174)、その後にKpn1部位を有する合成cDNAを創出した。このcDNAを、当業者によく知られている制限酵素およびDNAリガーゼ技法を用いて上記のpNNC549ベクターにクローニングした。CD33リーダー、hTREM2 ECDおよびFc6mut配列を含む完全なオープンリーディングフレームをコードするcDNAは配列番号49と称され、成熟ペプチド配列配列番号50をコードする。

40

## 【 0 2 8 7 】

## (実施例18)

多量体化PGLYRP1はTREM-1を活性化する

TREM-1の対比構造またはリガンドを結合解析およびIP/MSプロテオミクスによって同定

50

した。その後、リガンドであるPGLYRP1(またはPGRP-S)の同一性を特異的な遮断によって検証した。

#### 【 0 2 8 8 】

興味深いことに、可溶性PGLYRP1がTREM-1に結合することは実証することができるが、PGLYRP1によるTREM-1の活性化には、好中球細胞外トラップ(NET)またはPGNなどの足場作用剤が同時に存在することが必要である。

#### 【 0 2 8 9 】

PGLYRP1のそのような代替物、および多量体化形式がTREM-1に結合し、かつ/またはそれを活性化することができるかを試験するために、細胞関連PGLYRP1タンパク質を設計し、発現させた。2つの概念的に別個のPGLYRP1構築物を試験した。一方では、GPIに係留した配列モチーフをPGLYRP1のC末端に付加した。他方では、PGLYRP1を、N末端にTYPE II受容体MDL-1に由来する細胞内(IC)ドメインおよび膜貫通(TM)ドメインを付加することによって細胞膜に人工的に係留した。後者の構築物はII型PGLYRP1(図8)を示した。II型1.0(配列番号37)では、ネイティブなMDL-1受容体TMの荷電アミノ酸が維持されており、このタンパク質の効率的な発現はDAP12の同時発現に依存する。II型2.0 PGLYRP1構築物(配列番号38)では、荷電したTM残基は中性アミノ酸に置換されており(リシンからロイシンへ)、これにより、タンパク質を例えばDAP12とは独立して発現させることが可能になる。これらの構築物をコードするcDNAをHEK293 6E細胞において一過性に発現させ、トランスフェクトした2日後に細胞を採取し、レポーター細胞株BWZ/hTREM1を刺激するそれらの能力について分析した。II型PGLYRP1トランスフェクタントを、PGNの不在下でBWZ/hTREM1レポーター細胞と共にインキュベートした。18時間後にBetaGlo試薬(Cat番号E4720、Promega、Madison WI, USA)を使用してTREM1活性化を読み取った。II型PGLYRP1を発現しているトランスフェクタントは、PGNの不在下でTREM-1の活性化を、空の発現ベクターをトランスフェクトした対照細胞で見られる活性化の24倍のレベルまで誘導した。対照的に、PGLYRP1のC末端を介して固定化したGPI係留PGLYRP1はいかなるTREM-1活性化も媒介しなかった。膜に結合させ固定化したPGLYRP1タンパク質の細胞表面における発現を、ポリクローナル抗PGLYRP1抗体(AF2590)を使用してフローサイトメトリーによって確認した。II型PGLYRP1およびGPI-PGLYRP1の両方のタンパク質が実際に細胞表面で発現されることが実証された。

#### 【 0 2 9 0 】

#### 【表 7】

構築物	活性倍率
C-GPI PGLYRP1	2.0 ± 0.4 (n=3)
II 型 1.0 PGLYRP1	24 ± 3.3 (n=3)

#### 【 0 2 9 1 】

上記の表には、TREM-1活性の誘導において、C末端GPIアンカーを介して細胞膜表面に結合させたPGLYRP1がN末端部分を介して細胞膜に結合させたII型PGLYRP1タンパク質ほど強力ではないことが示されている。これにより、遊離のC末端PGLYRP1部分がTREM-1を刺激することができることの重要性が例示される。

#### 【 0 2 9 2 】

II型PGLYRP1活性化は、抗PGLYRP1抗体によって特異的に阻害されることがさらに実証された。したがって、ポリクローナル(Cat番号AF2590、R&D Systems、Minneapolis MN, USA)PGLYRP1抗体を高濃度(アッセイ体積100 µl当たり1 µg)で添加することにより、このPGLYRP1に誘導される活性を完全に阻害することができる。

#### 【 0 2 9 3 】

【表 8】

条件	活性
Ⅱ型 1.0 PGLYRP1	100 %
Ⅱ型 1.0 PGLYRP1 + イソ Ab	98 %
Ⅱ型 1.0 PGLYRP1 + AF2590	9.7 %

【 0 2 9 4 】

10

PGLYRP1の最C末端ドメインの配列は、TREM-1受容体を活性化する能力にとって重大であると思われる。いくつかの構築物は一般的な特徴を共有し、したがって、PGLYRP1の最C末端における修飾によりTREM1/BWZレポーター活性の活性化は媒介されないとみられるが、対照的にN末端において修飾された対応する構築物は活性を示す。

【 0 2 9 5 】

【表 9】

構築物	活性
PGLYRP1 ネイティブ	+++
PGLYRP1 N-Flag	+++
PGLYRP1 C-Flag	-
PGLYRP1 N-Fc	+++
PGLYRP1 C-Fc	(+)
Ⅱ型 1.0 PGLYRP1	+++
PGLYRP1 C-GPI	(+)

20

30

【 0 2 9 6 】

これにより、遊離のC末端PGLYRP1部分がTREM-1を刺激することができることの重要性が示される。

【 0 2 9 7 】

解釈および生物学的展望

PGNの存在下でネイティブなPGLYRP1-リガンド、またはその代わりに、PGNの必要性を克服することが実証されている新規のPGLYRP1変異体のいずれかを使用してTREM-1受容体を活性化することができることにより、PGNがTREM-1活性化に必要とされる絶対的な補因子ではないことが明白に実証される。PGN非依存性TREM-1活性化を付与することが実証された種々の分子PGLYRP1形式の一般的な特徴は高密度形式であると思われ、これによりネイティブなリガンドの補因子として作用する際のPGNの主な役割は多量体化のための足場をもたらすことであるという仮説が導かれる。In vivoでは、そのような足場は好中球細胞外トラップ(NET)(Blood 2005年、106: 2551~58頁)、またはヒアルロン酸、バーシカン、アグリカン、デコリン、またはフィブリンなどのプロテオグリカン構造などの他の天然に存在するマトリックス構造によってもたらすことができ、これらは全てPGLYRP1を多量体化するまたは他の方法で提示することができる。

40

【 0 2 9 8 】

これらの所見は、PGLYRP1のC末端部分の修飾により、TREM-1活性化が減少し、今度はこれによりPGLYRP1のC末端部分をPGLYRP1のC末端部分を対象とする抗体などの作用剤で遮断

50

することにより、TREM-1相互作用、およびそれによりTREM-1刺激が減少することを示唆している。

【0299】

(実施例19)

II型PGLYRP1により、関節リウマチ患者由来の滑液組織細胞におけるTNFアルファ放出を誘導することができる。

滑液組織試料をRA患者から人工膝関節全置換の間に得た。単一の滑液組織細胞の懸濁液を、4mg/mlのコラゲナーゼ(Cat番号11088793001、Roche、Mannheim、Germany)および0.1mg/mlのDNA分解酵素(Cat番号11284932001、Roche、Mannheim、Germany)によって37℃で1時間消化することによって単離した。滑液組織細胞(培養培地RPMI(Cat番号: 22400105, Life Technologies、Carlsbad CA、USA)+10%FCS(Cat番号: S0115、Biochrom AG、Berlin、Germany)中、 $1 \times 10^5$ 個/ウェル)を、さまざまな用量の、II型PGLYRP1を一過性にトランスフェクトしたHEK細胞と低酸素条件下で共培養した。24時間インキュベートした後、細胞の上清を採取し、サイトカインをTNFα ELISA(Cat番号: DY210, R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)によって測定した。

【0300】

【表10】

II型 PGLYRP1(トランスフェクトした HEK)/対照 HEK	TNF-α(pg/ml)放出					
	1x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	0
IgG4+II型	121.17	114.08	95.02	54.56	57.87	33.47
IgG4+対照	55.65	63.73	57.99	33.78	36.40	36.32

【0301】

この実施例では、TREM-1リガンドが関節リウマチ患者由来の滑液組織細胞においてTNF-アルファを用量依存的に誘導することができることが示される。

【0302】

(実施例20)

PGLYRP1抗体は、好中球におけるTREM-1に媒介されるシグナルを遮断し、IL-8放出を減少させる

好中球がPGLYRP1を放出することができること、および好中球がTREM-1受容体も発現することが実証されたので、好中球由来のPGLYRP1が自己分泌様式で好中球を刺激することができるかどうかを試験した。単離された好中球をPGN-SA(Cat番号tlrl-pgnsa、Invivogen、SanDiego CA、USA)で刺激し、培養培地中へのIL-8の放出を測定した。PGLYRP1抗体であるmAb0184はPGN-SAに誘導されるIL-8放出を減少させることができた。好中球をヒト健康ドナー全血から実施例3に記載の通り単離し、RPMI/10%FBSに再懸濁させた。細胞を $1.5 \times 10^6$ 細胞/mlでプレーティングし、3連の試験ウェルを以下の条件下で試験した: 刺激を加えない、10 μg/mlのPGN-SAのみ、または4 μg/mlのPGLYRP1抗体またはhIgG4アイソタイプ対照抗体の存在下で10 μg/mlのPGN-SA。試料を37℃、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーターで24時間培養した。次いで、上清を採取し、Bioplex Pro Human Cytokine IL-8 set(Cat番号171-B5008M、BioRad、Hercules CA、USA)を使用してIL-8について分析した。

【0303】

【表 1 1】

以下を用いて刺激した好中球	IL-8, pg/ml	
	平均	SD
添加なし	52	3
PGN-SA	1158	341
PGN-SA + アイソタイプ対照	1195	144
PGN-SA + mAb 0184	449	50

10

## 【0304】

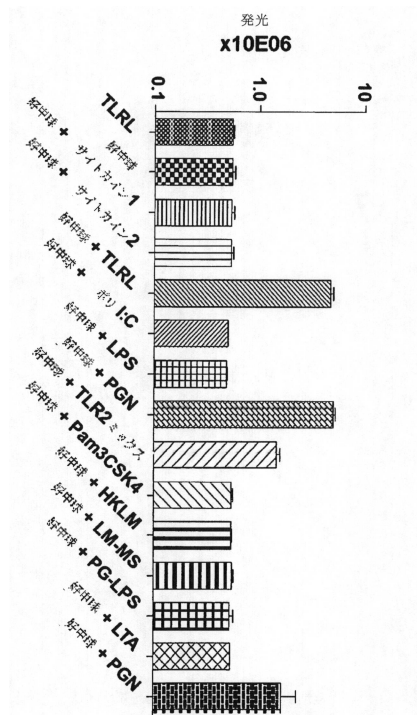
この実施例により、細菌によって得られたPGN-SAを用いた刺激によって誘導される好中球からのIL-8放出は、抗PGLYRP1抗体によって減少させることができることが例示されている。したがって、TREM-1リガンドであるPGLYRP1は好中球の自己分泌刺激薬であり、本明細書に開示されているPGLYRP1抗体は好中球の応答を下方制御することにおいて潜在的に有用である。

20

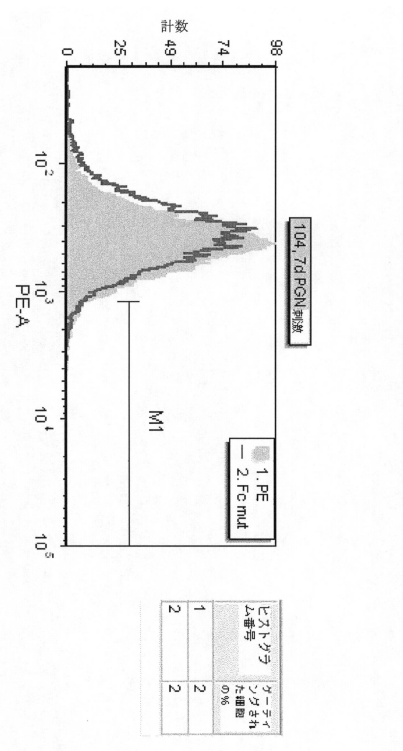
## 【0305】

本明細書では本発明の特定の特徴が例示され、説明されているが、多くの改変、置換、変化および等価物がここで当業者に明らかになる。したがって、添付の実施形態は、本発明の真の主旨の範囲内に入るそのような改変および変化を全て包含することを意図していることが理解されるべきである。

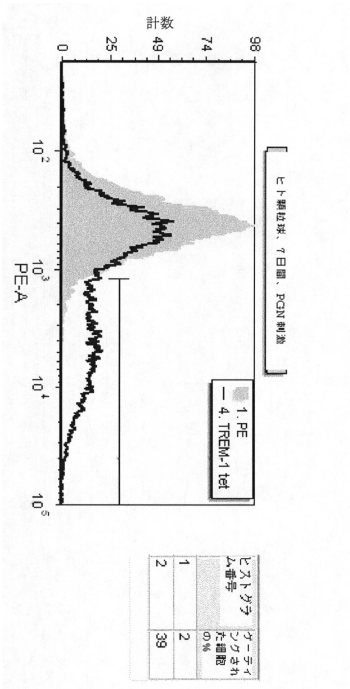
## 【図 1】



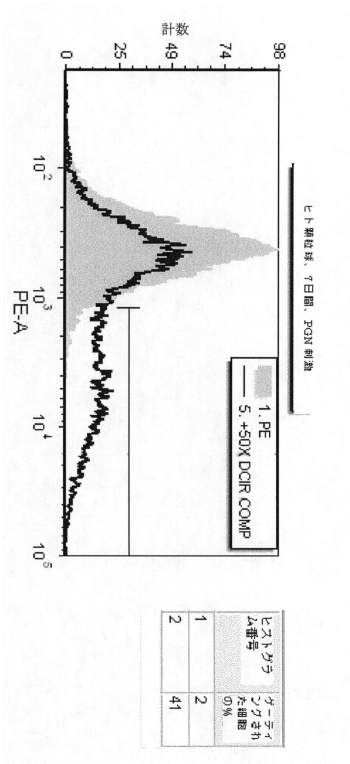
## 【図 2 A】



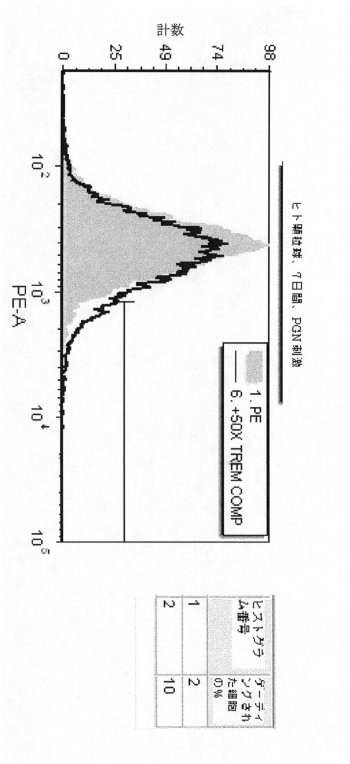
【図 2 B】



【図 2 C】

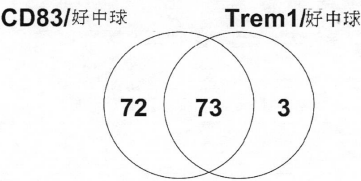


【図 2 D】

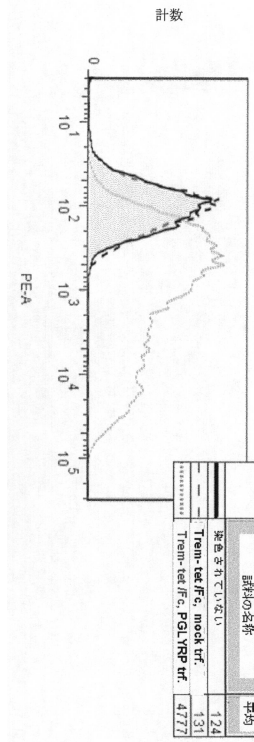


【図 3】

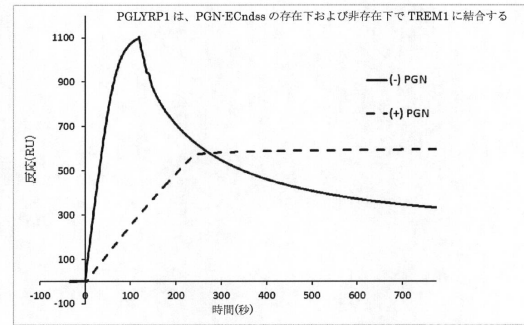
同定されたタンパク質	遺伝子記号	アクセッション番号
骨髄細胞で発現されるトリガー受容体 1 のアイソフォーム 1	Trem1	IP100427321
ペプチドグリカン認識タンパク質 1	PGLYRP1	IP100021085
非受容体 6 型チロシンタンパク質ホスファターゼのアイソフォーム 3	PTPN6	IP100183046



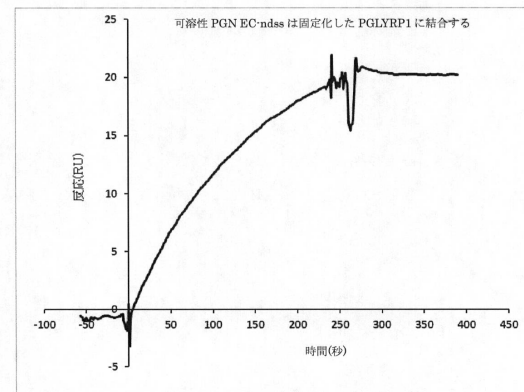
【図 4 A】



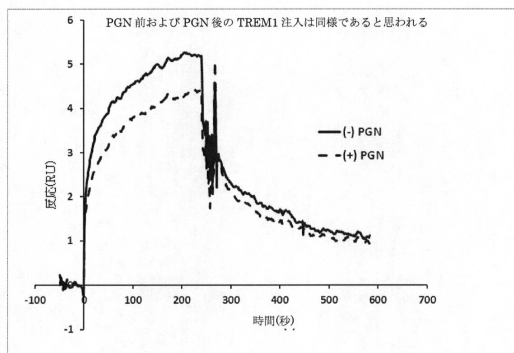
【図 4 B】



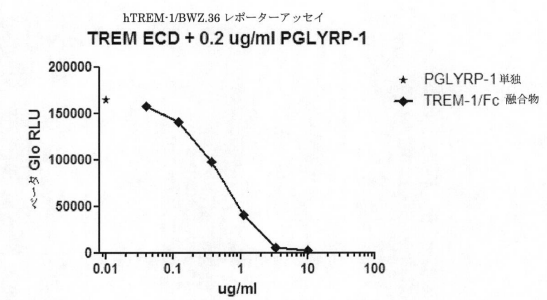
【図 4 C】



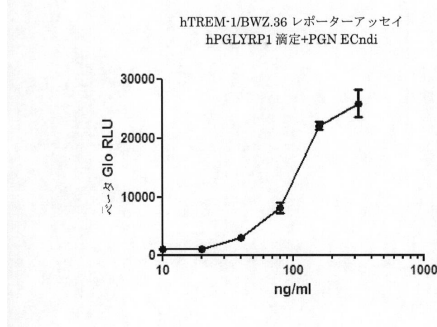
【図 4 D】



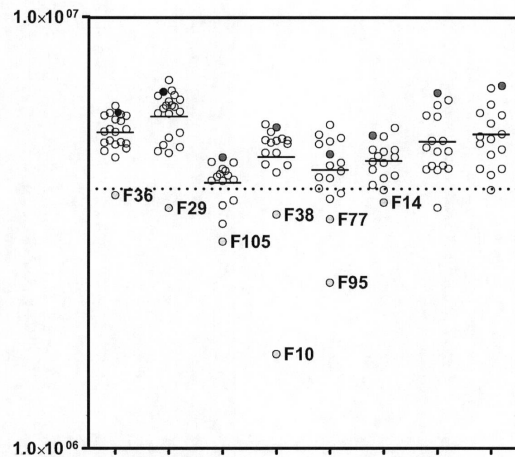
【図 5 B】



【図 5 A】

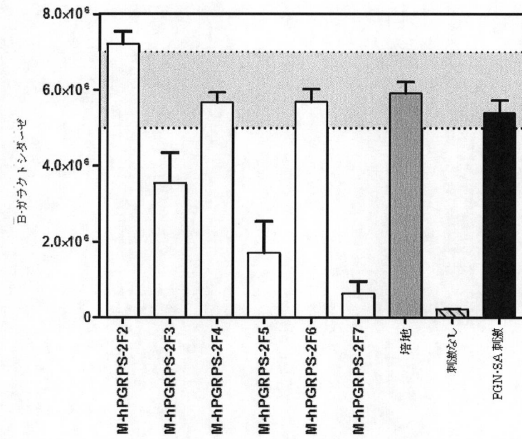


【図 6 A】

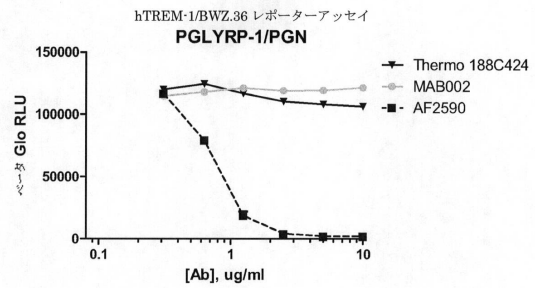


プレート 1-上層  
プレート 2-上層  
プレート 3-上層  
プレート 4-上層  
プレート 5-上層  
プレート 6-上層  
プレート 7-上層  
プレート 8-上層

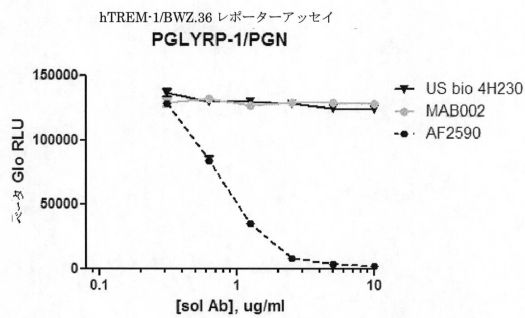
【図 6 B】



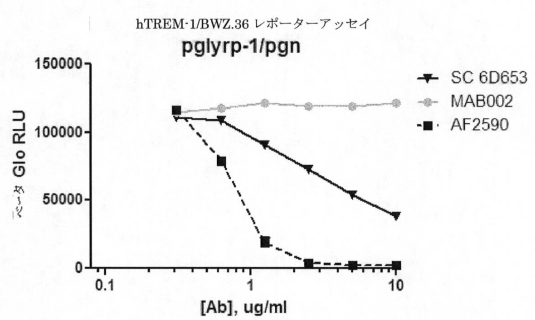
【図 6 C】



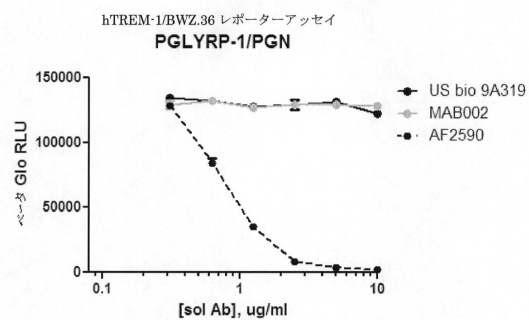
【図 6 D】



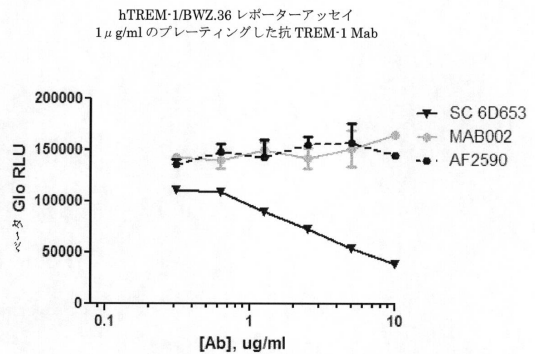
【図 6 F】



【図 6 E】

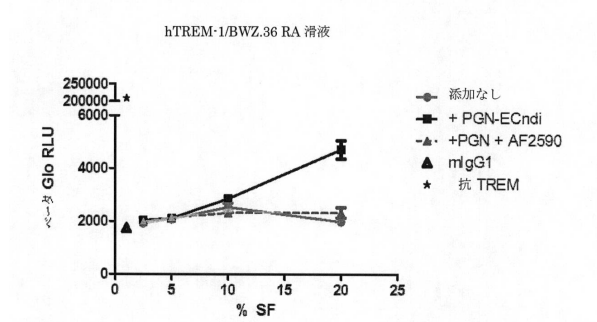


【図 6 G】

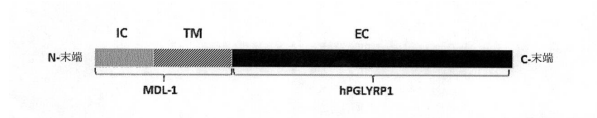




## 【図 7】



## 【図 8】



## 【配列表】

0006400480000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

(31)優先権主張番号 61/672,799

(32)優先日 平成24年7月18日(2012.7.18)

(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 ヴィーベケ・ヴェストフェール・ステンニッケ  
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 クレスティーネ・ブレンデル・レアド  
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 ジョー・クイパー  
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 シャオティン・タン  
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 マーク・ヘイベル  
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 シヴ・アンネグレテ・ヨルト  
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特表2010-534828(JP,A)

Anti-PGRPS antibody[188C424]|GeneTex, [online], [2018年3月29日検索], URL, <http://www.genetex.com/PGRPS-antibody-188C424-GTX13903.html>Human PGLYRP1/PGRP-S Antibody AF2590: R&D Systems, [online], [2018年3月29日検索], URL, [https://www.rndsystems.com/products/human-pglyrp1-pgrp-s-antibody\\_af2590](https://www.rndsystems.com/products/human-pglyrp1-pgrp-s-antibody_af2590)

Infection and Immunity, 2011年, Vol.79, No.2, p.858-866

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

