

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7314310号
(P7314310)

(45)発行日 令和5年7月25日(2023.7.25)

(24)登録日 令和5年7月14日(2023.7.14)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/13 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z
C 0 7 K	1/14 (2006.01)		C 0 7 K	1/14	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)		C 0 7 K	16/18	

請求項の数 35 (全50頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-565942(P2021-565942)
(86)(22)出願日	令和2年5月8日(2020.5.8)
(65)公表番号	特表2022-531698(P2022-531698A)
(43)公表日	令和4年7月8日(2022.7.8)
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/062802
(87)国際公開番号	WO2020/225400
(87)国際公開日	令和2年11月12日(2020.11.12)
審査請求日	令和4年1月4日(2022.1.4)
(31)優先権主張番号	19173454.0
(32)優先日	令和1年5月9日(2019.5.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)

(73)特許権者	503385923 ベーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
(74)代理人	110001508 弁理士法人 津国
(72)発明者	トーマス, レオ ドイツ、55216 インゲルハイム ・アム・ライン、ビンガー・シュトラーゼ 173、ベーリンガー・インゲルハイム・インターナショナル・ゲーエムベーハー、コーポレイト・パテンツ
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 眼又は眼疾患を処置するための抗セマフォリン3A抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 配列番号1(H-CDR1)のアミノ酸配列；配列番号2(H-CDR2)のアミノ酸配列；及び配列番号3(H-CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び
- 配列番号4(L-CDR1)のアミノ酸配列；配列番号5(L-CDR2)のアミノ酸配列；及び配列番号6(L-CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片。

【請求項2】

- 前記抗体又はその抗原結合断片が、
- 配列番号7、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
 - 配列番号11、配列番号12、又は配列番号13のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域
- を含む、請求項1記載の抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3】

- 前記抗体又はその抗原結合断片が、
- 配列番号7、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくと

も 99% 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
 - 配列番号 11、配列番号 12、又は配列番号 13 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域を含み、

- 重鎖可変領域が、配列番号 1 (H - C D R 1) のアミノ酸配列；配列番号 2 (H - C D R 2) のアミノ酸配列；及び配列番号 3 (H - C D R 3) のアミノ酸配列を含み；及び
 - 軽鎖可変領域が、配列番号 4 (L - C D R 1) のアミノ酸配列；配列番号 5 (L - C D R 2) のアミノ酸配列；及び配列番号 6 (L - C D R 3) のアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 4】

前記抗体又はその抗原結合断片が、
 - 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、又は配列番号 10 のアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
 - 配列番号 11、配列番号 12、又は配列番号 13 のアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記抗体又はその抗原結合断片が、
 a . 配列番号 7 及び配列番号 11 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；
 b . 配列番号 8 及び配列番号 11 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；
 c . 配列番号 9 及び配列番号 12 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；又は
 d . 配列番号 10 及び配列番号 13 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 6】

前記抗体又はその抗原結合断片が、
 - 配列番号 14、配列番号 16、配列番号 17、又は配列番号 19 のアミノ酸配列を含んでいる、好ましくはからなる、重鎖；及び
 - 配列番号 15、配列番号 18、又は配列番号 20 のアミノ酸配列を含んでいる、好ましくはからなる、軽鎖を含む、請求項 1 記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 7】

前記抗体又はその抗原結合断片が、
 a . 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖；
 b . 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖；
 c . 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は
 d . 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片と、薬学的に許容される担体とを含んでいる、医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片を含む、セマフォリン 3 A の血管退行作用を阻害するための医薬組成物。

【請求項 10】

50

請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片を含む、網膜の血行再建を改善するための医薬組成物。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片を含む、眼疾患又は網膜疾患の治療又は予防に使用するための医薬組成物。

【請求項 1 2】

前記疾患が、網膜症、虚血性網膜症、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、近視性変性、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、囊胞様黄斑浮腫、あらゆる網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神經症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症、外傷性網膜症、薬剤性網膜脈管障害、網膜新血管新生、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管炎、網膜微小動脈瘤、フックスジストロフィー、黄斑部毛細血管拡張症、アッシャー症候群、及びシユタルガルト病からなる群より選択される、請求項 1 1 記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 3】

前記疾患が、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、虚血性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑浮腫、網膜新血管新生、緑内障、及び脈絡膜新血管新生からなる群より選択される、請求項 1 1 又は 1 2 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

20

前記疾患が、糖尿病性黄斑浮腫及び / 又は糖尿病性黄斑虚血である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

- 前記疾患が、糖尿病性黄斑虚血であり、そして
- 前記抗体又は抗原結合断片が、虚血網膜内の脈管再生（血行再建）を促進し、眼の硝子体領域の病的な新血管新生を予防する、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

- 前記疾患が、糖尿病性黄斑虚血であり、そして
- 前記抗体又は抗原結合断片が、血液網膜閥門の透過性を低下させる、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項記載の医薬組成物。

30

【請求項 1 7】

前記抗体又は抗原結合断片が、セマフォリン 3 A により誘発される血管網膜閥門の透過性、及び / 又はセマフォリン 3 A により誘発される虚血領域からの血管逆行を阻害する、請求項 1 6 記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

非経口投与経路、静脈内投与経路、硝子体内投与経路、又は皮下投与経路によって投与される、請求項 1 0 ~ 1 7 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

硝子体内経路によって投与される、請求項 1 8 記載の医薬組成物。

40

【請求項 2 0】

- 配列番号 1 4 、配列番号 1 6 、配列番号 1 7 、若しくは配列番号 1 9 に示されるような重鎖、又は、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 、若しくは配列番号 1 0 に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び

- 配列番号 1 5 、配列番号 1 8 、若しくは配列番号 2 0 に示されるような軽鎖、又は配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、若しくは配列番号 1 3 に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列

を含んでいる、単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 の単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群を含んでいる発現ベ

50

クター。

【請求項 2 2】

請求項 2_0 記載の単離されたポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド群、又は請求項 2_1 記載の発現ベクターを含んでいる宿主細胞。

【請求項 2 3】

- a . 請求項 2_2 記載の宿主細胞を得る工程；及び
- b . 該宿主細胞を培養する工程

を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を産生するための方法。

【請求項 2 4】

前記抗体又はその抗原結合断片を回収及び精製する工程をさらに含んでいる、請求項 2_3 記載の方法。 10

【請求項 2 5】

セマフォリン 3 A の血管退行作用を阻害するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片の使用。

【請求項 2 6】

網膜の血行再建を改善するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片の使用。

【請求項 2 7】

眼疾患又は網膜疾患の治療又は予防に使用するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載の抗体又は抗原結合断片の使用。

20

【請求項 2 8】

前記疾患が、網膜症、虚血性網膜症、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、近視性変性、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、囊胞様黄斑浮腫、あらゆる網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症、外傷性網膜症、薬剤性網膜脈管障害、網膜新生血管新生、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管炎、網膜微小動脈瘤、フックスジストロフィー、黄斑部毛細血管拡張症、アッシャー症候群、及びシュタルガルト病からなる群より選択される、請求項 2_7 記載の使用。

【請求項 2 9】

30

前記疾患が、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、虚血性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑浮腫、網膜新生血管新生、緑内障、及び脈絡膜新生血管新生からなる群より選択される、請求項 2_7 又は 2_8 記載の使用。

【請求項 3 0】

前記疾患が、糖尿病性黄斑浮腫及び／又は糖尿病性黄斑虚血である、請求項 2_7 ~ 2_9 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 3 1】

- 前記疾患が、糖尿病性黄斑虚血であり、そして

- 前記抗体又は抗原結合断片が、虚血網膜内の脈管再生（血行再建）を促進し、眼の硝子体領域の病的な新血管新生を予防する、請求項 2_7 ~ 2_9 のいずれか一項記載の使用。 40

【請求項 3 2】

- 前記疾患が、糖尿病性黄斑虚血であり、そして

- 前記抗体又は抗原結合断片が、血液網膜閥門の透過性を低下させる、請求項 2_7 ~ 2_9 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 3 3】

前記抗体又は抗原結合断片が、セマフォリン 3 A により誘発される血管網膜閥門の透過性及び／又はセマフォリン 3 A により誘発される虚血領域からの血管退行を阻害する、請求項 3_2 記載の使用。

【請求項 3 4】

50

前記医薬が、非経口投与経路、静脈内投与経路、硝子体内投与経路、又は皮下投与経路によって投与される、請求項 25～33 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 35】

前記医薬が硝子体内経路によって投与される、請求項 34 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般的に、セマフォリン 3 A (Sema3A) に標的化する抗体及びその断片に関する。より具体的には、様々な疾患又は障害の処置のための抗セマフォリン 3 A 抗体及び使用法が開示されている。抗セマフォリン 3 A 抗体を含んでいる医薬組成物及びキットも開示されている。

10

【0002】

発明の背景

虚血性網膜症は、網膜血管系の減少又は機能不全によって特徴付けられ、これにより、血流の減少及び低酸素症が起こる。網膜の虚血により、網膜新血管新生を促進する血管新生促進増殖因子はアップレギュレートされ、これにより盲目に至る可能性がある。しかしながら、通常は血管のない眼領域である硝子体に強力で病的な新血管新生が起こっている場合には、虚血性網膜の血行再建は起こらない。

20

【0003】

これらの異常な新規血管の増殖は、視力に対する脅威の大半を作り出す。なぜなら、それらは漏出する可能性があるか、出血に至る可能性があるか、又は瘢痕に至る可能性があり、これは網膜剥離に終わる可能性があるからである。虚血性網膜症の現在の処置は、病的血管増殖の停止を探索することであるが、その増殖を駆り立てる根本的な虚血には対処していない。さらに、糖尿病性網膜症の標準的な処置は、新規血管の増殖を停止し、中心視野を保存する試みで、網膜の部分のレーザーによる破壊を含む。しかしながら、これらの処置は、幾分不十分である。幾人かの患者は長年、安定な視力を維持することができるが、網膜症を患っている高い比率の患者が、最終的に完全に失明する。

【0004】

結果として、眼疾患又は網膜疾患を効率的に処置するための新規な治療アプローチの必要性は依然として充足されていない。

30

【0005】

発明の要約

セマフォリン 3 A は、当初は軸索ガイダンス分子として同定され、血管経路探索及びネットワーク形成に関与していた、クラス 3 のセマフォリンファミリー (Sema3) に属する、内因的に分泌されるタンパク質である。ニューロフィリン 1 及び 2 (Nrp1 及び Nrp2) 並びに A/D 型プレキシン (Plexins) は、内皮細胞 (EC) 表面上のセマフォリン 3 受容体複合体に結合するリガンド及びそのシグナル伝達サブユニットとして作用する。セマフォリン 3 ファミリーの特別なメンバーとして、セマフォリン 3 A は、最初にニューロフィリン 1 に排他的に結合し、その後、複合体 (Nrps/Plexins) としてのプレキシン A 1～4 に結合する。この受容体複合体では、ニューロフィリン 1 は、結合性成分として作用するが、プレキシン A 1～4 は、シグナル伝達成分として作用する。

40

【0006】

ヒトセマフォリン 3 A は、配列番号 22 に開示されているような、かつ NCB1 参照配列 NP_006071.1 の下で入手可能である、タンパク質である。さらに、ヒトセマフォリン 3 A は、遺伝子 ID : 10371 (NCBI) によってコードされている。

【0007】

腫瘍血管新生及び転移におけるセマフォリン 3 A は、長年研究されてきたが、網膜新血管新生に対するその作用は依然として不明である。本発明者らは、セマフォリン 3 A が、低酸素の網膜神経節細胞によって分泌され、血管反発の合図として作用することを例証し

50

た。セマフォリン3Aは、これらの細胞内の細胞骨格の崩壊を誘導することによって、虚血領域から新生血管を追い払う。理論によって固めたくはないが、本発明者らは、このことが、なぜ虚血領域の血行再建が起こらず、その代わりにセマフォリン3Aのアップレギュレーションにより、硝子体領域への病的な新血管新生が起こるかを説明するだろうと仮説を立てた。

【0008】

セマフォリン3Aは、虚血性/無血管性網膜内の低酸素ニューロンによって分泌され、これにより、網膜の血管再生を阻害し、病的な網膜前の新血管新生を増強する。

【0009】

本発明者らは、セマフォリン3Aに標的化する抗体を開発することによって、この病的状況に対処した。したがって、本発明は、セマフォリン3A、好ましくはヒトセマフォリン3Aに特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

10

【0010】

第一の態様では、本発明は、

- 配列番号1(H-CDR1)のアミノ酸配列；配列番号2(H-CDR2)のアミノ酸配列；及び配列番号3(H-CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び
- 配列番号4(L-CDR1)のアミノ酸配列；配列番号5(L-CDR2)のアミノ酸配列；及び配列番号6(L-CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0011】

20

別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号7、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
- 配列番号11、配列番号12、又は配列番号13のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域を含む、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供し、

ここで、

- 重鎖可変領域が、配列番号1(H-CDR1)のアミノ酸配列；配列番号2(H-CDR2)のアミノ酸配列；及び配列番号3(H-CDR3)のアミノ酸配列を含み；及び
- 軽鎖可変領域が、配列番号4(L-CDR1)のアミノ酸配列；配列番号5(L-CDR2)のアミノ酸配列；及び配列番号6(L-CDR3)のアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号7、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
- 配列番号11、配列番号12、又は配列番号13のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域を含んでいる、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0013】

さらに別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号7、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
- 配列番号11、配列番号12、又は配列番号13のアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域

を含んでいる、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0014】

50

別の実施態様では、本発明は、

- a . 配列番号 7 及び配列番号 11 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；
- b . 配列番号 8 及び配列番号 11 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；
- c . 配列番号 9 及び配列番号 12 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；又は
- d . 配列番号 10 及び配列番号 13 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域

を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【 0 0 1 5 】

さらに別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号 14 、配列番号 16 、配列番号 17 、又は配列番号 19 のアミノ酸配列を含んでいる、好ましくはからなる、重鎖；及び
- 配列番号 15 、配列番号 18 、又は配列番号 20 のアミノ酸配列を含んでいる、好ましくはからなる、軽鎖

を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 6 】

特定の実施態様では、本発明は、

- a . 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖；
- b . 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖；
- c . 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

d . 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片に関する。

20

【 0 0 1 7 】

特定の好ましい実施態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体は、ヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体である。

【 0 0 1 8 】

第二の態様では、本発明は、配列番号 22 に示されるようなヒトセマフォリン 3 A のアミノ酸領域 370 ~ 382 内の少なくとも 1 つのアミノ酸残基に結合する、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【 0 0 1 9 】

1 つの実施態様では、本発明は、配列番号 21 (DSTKDLPPDVITF) に示されるアミノ酸領域内の少なくとも 1 つのアミノ酸残基に結合する、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。好ましい実施態様では、本発明は、配列番号 21 に示されるようなアミノ酸領域に結合する、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 2 0 】

第三の態様では、本発明は、医薬品としての使用のための抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【 0 0 2 1 】

1 つの実施態様では、本発明は、セマフォリン 3 A の血管退行作用を阻害するための、及び / 又は網膜の血行再建を改善するための、抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗原結合断片を提供する。

【 0 0 2 2 】

1 つの実施態様では、本発明は、網膜疾患又は眼疾患の治療又は予防に使用するための、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 2 3 】

第四の態様では、本発明は、網膜症、虚血性網膜症、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加

50

齢黄斑変性、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、近視性変性、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、嚢胞様黄斑浮腫、あらゆる網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症、外傷性網膜症、薬剤性網膜脈管障害、網膜新血管新生、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管炎、網膜微小動脈瘤、フックスジストロフィー、黄斑部毛細血管拡張症、アッシャー症候群、及びシユタルガルト病からなる群より選択される疾患の治療又は予防に使用するための、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0024】

別の実施態様では、本発明は、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、虚血性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑浮腫、網膜新血管新生、緑内障、及び脈絡膜新生血管からなる群より選択される疾患の治療又は予防に使用するための、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。好ましくは、該疾患は、糖尿病性黄斑浮腫及び／又は糖尿病性黄斑虚血である。

10

【0025】

好ましい実施態様では、本発明は、虚血網膜内の脈管再生（血行再建）を促進し、眼の硝子体領域の病的な新血管新生を予防することによる、糖尿病性黄斑虚血の処置に使用するための、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0026】

別の好ましい実施態様では、本発明は、血液網膜閥門の透過性を低下させることによる、糖尿病性黄斑浮腫の処置に使用するための、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0027】

別の好ましい実施態様では、本発明は、セマフォリン3Aにより誘発された血液網膜閥門の透過性、及び／又はセマフォリン3Aにより誘発される虚血領域からの血管退行を阻害するための、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0028】

第五の態様では、本発明は、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片と薬学的に許容される担体とを含んでいる、医薬組成物を提供する。

【0029】

1つの実施態様では、本発明は、抗セマフォリン3A抗体若しくはその抗原結合断片、又は抗セマフォリン3A抗体若しくはその抗原結合断片を含んでいる医薬組成物を提供し、該抗体又はその抗原結合断片は、非経口投与経路、静脈内投与経路、硝子体内投与経路、又は皮下投与経路によって、好ましくは硝子体内経路によって投与される。

30

【0030】

第六の態様では、本発明は、

- 配列番号14、配列番号16、配列番号17、若しくは配列番号19に示されるような重鎖、又は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び

- 配列番号15、配列番号18、若しくは配列番号20に示されるような軽鎖、又は配列番号11、配列番号12、若しくは配列番号13に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列

40

を含んでいる、単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群を提供する。

【0031】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、若しくは配列番号19に示されるような重鎖、又は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び配列番号15、配列番号18、若しくは配列番号20に示されるような軽鎖、又は配列番号11、配列番号12、若しくは配列番号13に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列を含んでいる、単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群を含んでいる発現ベクターを提供する。

50

【 0 0 3 2 】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、若しくは配列番号19に示されるような重鎖、又は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び配列番号15、配列番号18、若しくは配列番号20に示されるような軽鎖、又は配列番号11、配列番号12、若しくは配列番号13に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列を含んでいる、単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群を含んでいるウイルスベクターを提供する。

【 0 0 3 3 】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、若しくは配列番号19に示されるような重鎖、又は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び配列番号15、配列番号18、若しくは配列番号20に示されるような軽鎖、又は配列番号11、配列番号12、若しくは配列番号13に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列を含んでいる、発現ベクター又は単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群を含んでいる、宿主細胞を提供する。

10

【 0 0 3 4 】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、若しくは配列番号19に示されるような重鎖、又は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような軽鎖、又は配列番号11、配列番号12、若しくは配列番号13に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列を含んでいる、発現ベクター又は単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群を含んでいる、宿主細胞を得る工程；及び該宿主細胞を培養する工程を含む、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を産生するための方法を提供する。

20

【 0 0 3 5 】

1つの実施態様では、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を産生するための方法はさらに、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を回収及び精製する工程を含む。

30

【図面の簡単な説明】**【 0 0 3 6 】**

【図1】ヒトの眼におけるセマフォリン3Aの位置の特定。この図は、年齢の一一致した対照（年齢対照）及び糖尿病は有するが眼病態は有さない被験者（糖尿病対照）と比較した、糖尿病性網膜症又は原発性解放隅角緑内障（P O A G）の病歴を有するヒトドナーに由来する予め特定された網膜試料の、ヒトの眼におけるセマフォリン3Aの位置の特定を示す。セマフォリン3Aは、網膜血管の血管壁に見られた。さらに、同定されていないが明確に異なるセマフォリン3Aの蛍光対象物が、網膜神経節細胞層に観察された。

【図2】細胞透過性アッセイにおける有効性。ヒト網膜微小血管内皮細胞におけるフルオレセインイソチオシアネート（F I T C）-デキストランの透過性を、トランスウェルアッセイで測定する。抗T N P抗体は、トリニトロフェノールに対する対照抗体である。抗セマフォリン3A抗体は、本発明に記載の抗体である（クローンI）。組換えヒトセマフォリン3Aに対する有意性が示されている。

40

【図3】ヒト網膜微小血管内皮細胞における細胞骨格の崩壊（Xcelligence）。セマフォリン3A～Fは全て、ヒト網膜内皮細胞において細胞骨格の崩壊を誘発する。本発明の抗体（クローンI）は、セマフォリン3Aに対して特異的であり、セマフォリン3Aにより誘発された崩壊のみを防ぐ。

【図4A】インビボにおける端細胞密度及び無血管領域に対する有効性。（A）及び（C）端細胞密度及び無血管領域を、酸素により誘発された網膜症仔マウスモデルにおいて調べた。動物を7日目から12日目に75%の酸素に曝し、12日目に酸素正常状態に戻した後、1回の硝子体内への抗体の注射を受けた。抗T N P抗体は、トリニトロフェノール

50

に対する対照抗体である。抗セマフォリン3A抗体は、本発明に記載の抗体（クローンI）である。生後17日目に、網膜フラットマウントを準備し、イソレクチンB4で染色し、端細胞の計数及び網膜無血管領域のサイズの決定のために使用した。（B）端細胞密度と無血管領域との間の相関が示されている。

【図4B】インビボにおける端細胞密度及び無血管領域に対する有効性。（A）及び（C）端細胞密度及び無血管領域を、酸素により誘発された網膜症仔マウスモデルにおいて調べた。動物を7日目から12日目に75%の酸素に曝し、12日に酸素正常状態に戻した後、1回の硝子体内への抗体の注射を受けた。抗TNP抗体は、トリニトロフェノールに対する対照抗体である。抗セマフォリン3A抗体は、本発明に記載の抗体（クローンI）である。生後17日目に、網膜フラットマウントを準備し、イソレクチンB4で染色し、端細胞の計数及び網膜無血管領域のサイズの決定のために使用した。（B）端細胞密度と無血管領域との間の相関が示されている。10

【図4C】インビボにおける端細胞密度及び無血管領域に対する有効性。（A）及び（C）端細胞密度及び無血管領域を、酸素により誘発された網膜症仔マウスモデルにおいて調べた。動物を7日目から12日目に75%の酸素に曝し、12日に酸素正常状態に戻した後、1回の硝子体内への抗体の注射を受けた。抗TNP抗体は、トリニトロフェノールに対する対照抗体である。抗セマフォリン3A抗体は、本発明に記載の抗体（クローンI）である。生後17日目に、網膜フラットマウントを準備し、イソレクチンB4で染色し、端細胞の計数及び網膜無血管領域のサイズの決定のために使用した。（B）端細胞密度と無血管領域との間の相関が示されている。20

【0037】

発明の詳細な説明

定義

抗体又は免疫グロブリンの一般構造は、当業者には周知であり、これらの分子は、2本の同一な軽鎖（L）と2本の同一な重鎖（H）から構成される典型的には約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各々の軽鎖は、1本のジスルフィド結合によって重鎖に共有結合で連結されてヘテロ二量体を形成し、ヘテロ二量体の2本の同一な重鎖の間でのジスルフィド共有結合を通してヘテロ四量体分子が形成される。軽鎖と重鎖は互いに1本のジスルフィド結合によって連結されているが、2本の重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンのアイソタイプによって異なる。各々の重鎖及び軽鎖はまた、規則的に配置された鎖内ジスルフィド橋を有する。各々の重鎖は、アミノ末端に可変ドメイン（V_H=重鎖可変ドメイン）、続いて3つ又は4つの定常ドメイン（C_H1、C_H2、C_H3及びC_H4）、並びに、C_H1とC_H2間のヒンジ領域を有する。各々の軽鎖は、アミノ末端可変ドメイン（V_L=軽鎖可変ドメイン）及びカルボキシ末端定常ドメイン（C_L）という2つのドメインを有する。V_Lドメインは、非共有結合的にV_Hドメインと会合し、一方、C_Lドメインは一般的にC_H1ドメインにジスルフィド結合を介して共有結合で連結されている。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の界面を形成すると考えられている（Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663）。

【0038】

可変ドメイン内の特定のドメインが、様々な抗体間で大幅に異なり、すなわち「超可変的」である。これらの超可変ドメインは、その特異的な抗原決定基に対する各々の特定の抗体の結合及び特異性に直接関与している残基を含有している。軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの両方における超可変性は、相補性決定領域（CDR）又は超可変ループ（HVL）として知られる3つのセグメントに集中している。CDRは、Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、アメリカ公衆衛生局、アメリカ国立衛生研究所、ベセスダ、ミズーリ州の配列比較によって規定され、一方、HVLは、Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917に記載のような可変ドメインの3次元構造に従って構造的に規定される。これらの2つの方法により、CDRの同定が僅かに異なる場合、構造による規定が好ましい。Kabatによって定義さ4050

れているように、CDR-L1は、軽鎖可変ドメイン内のおよそ24～34残基に位置し、CDR-L2はおよそ50～56残基に位置し、CDR-L3はおよそ89～97残基に位置し；CDR-H1は、重鎖可変ドメイン内のおよそ31～35残基に位置し、CDR-H2はおよそ50～65残基に位置し、CDR-H3はおよそ95～102残基に位置する。それ故、重鎖及び軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3は、所与の抗体に特異的な独特かつ機能的な特性を規定する。

【0039】

重鎖及び軽鎖の各々の中にある3つのCDRは、フレームワーク領域(FR)によって隔てられ、このフレームワーク領域はより可変性が低い傾向がある配列を含有している。重鎖及び軽鎖の可変ドメインのアミノ末端からカルボキシ末端にかけて、FR及びCDRは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4の順に整列している。FRの主に-シートの立体配置により、各々の鎖内のCDRが互いに並びに他の鎖のCDRと近接する。結果として生じたコンフォメーションは抗原結合部位に寄与するが(Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669を参照)、全てのCDR残基が必ずしも抗原との結合に直接関与しているわけではない。

10

【0040】

FR残基及び免疫グロブリン定常ドメインは、抗原との結合に直接関与していないが、抗原との結合に寄与する、及び/又は、抗体エフェクター機能を媒介する。いくつかのFR残基は少なくとも3つの方法で抗原との結合に対して有意な効果を及ぼすと考えられている：エピトープに非共有結合的に直接結合することによって、1つ以上のCDR残基と相互作用することによって、及び重鎖と軽鎖との間の界面に影響を及ぼすことによって。定常ドメインは、抗原との結合に直接関与していないが、様々な免疫グロブリンのエフェクター機能を媒介し、例えば抗体依存性細胞傷害作用(ADC C)、補体依存性細胞傷害作用(CDC)及び抗体依存性細胞食(ADCP)における抗体の関与を媒介する。

20

【0041】

脊椎動物の免疫グロブリンの軽鎖は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)という2つの明確に異なるクラスの中の1つに割り当てられる。これに対して、哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖は、定常ドメインの配列に従って、5つの主要なクラスの中の1つに割り当てられる：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM。IgG及びIgAはさらにサブクラス(アイソタイプ)に分類される、例えばそれぞれIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂。様々なクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、γ、δ、ε、μ及びμとそれぞれ呼ばれる。天然免疫グロブリンのクラスのサブユニット構造及び3次元立体配置は周知である。

30

【0042】

「抗体」、「抗セマフォリン3A抗体」、「ヒト化抗セマフォリン3A抗体」、及び「変異ヒト化抗セマフォリン3A抗体」という用語は本明細書において最も広い意味で使用され、具体的に、所望の生物学的活性、例えばセマフォリン3Aとの結合を示すモノクローナル抗体(完全長のモノクローナル抗体を含む)、多重特異的抗体(例えば二重特異的抗体)、及び抗体断片、例えば可変ドメイン、及び抗体の他の部分を包含する。

40

【0043】

「モノクローナル抗体」(mAb)という用語は、実質的に相同な抗体集団の抗体を指し；すなわち、その集団内の個々の抗体は、少量で存在する可能性のある天然に起こる突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原決定基、すなわち「エピトープ」に対して指向される。それ故、「モノクローナル」という修飾語は、同一のエピトープに対して指向される実質的に相同な抗体集団を示し、任意の特定の方法による抗体の產生が必要とされると捉えられるものではない。モノクローナル抗体は、例えばハイブリドーマ法(Kohler et al., 1975, Nature 256:495)又は当技術分野において公知である組換えDNA法(例えば米国特許第4,816,567号を参照)、又はClackson et al., 1991, Nature 352: 624-628、及びMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597に記載の技術を使用してファージ抗体ライブラリーを使用

50

して組換え產生されたモノクローナル抗体の単離法をはじめとする、当技術分野において公知である任意の技術又は方法によって作製され得ることが理解されるべきである。

【0044】

キメラ抗体は、ある種（例えば非ヒト哺乳動物、例えばマウス）に由来する抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域と、別の種（例えばヒト）の抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域とからなり、そしてこれは、第一の種（例えばマウス）に由来する抗体の可変領域をコードしているDNA配列を、第二の種（例えばヒト）に由来する抗体の定常領域のDNA配列に連結させ、連結させた配列を含有している発現ベクターを用いて宿主を形質転換して、それがキメラ抗体を產生することを可能とすることによって得ることができる。あるいは、キメラ抗体はまた、重鎖及び/又は軽鎖の1つ以上の領域若しくはドメインが、別の免疫グロブリンのクラス若しくはアイソタイプ由来の、又は共通配列若しくは生殖系列配列由来のモノクローナル抗体体内の対応する配列と同一であるか、相同であるか、又はその変異体であるものであり得る。キメラ抗体は、このような抗体の断片を含んでいてもよい。ただし、該抗体断片は、その親抗体の所望の生物学的活性、例えば同じエピトープへの結合を示す（例えば、米国特許第4,816,567号；及びMorrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855を参照）。

10

【0045】

「抗体断片」、「抗原結合断片」、「抗セマフォリン3A抗体断片」、「ヒト化抗セマフォリン3A抗体断片」、「変異ヒト化抗セマフォリン3A抗体断片」という用語は、完全長の抗セマフォリン3A抗体の一部を指し、ここでの可変領域又は機能的能力、例えば特異的なセマフォリン3Aのエピトープへの結合は保持されている。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、及びscFv-Fc断片、ディアボディ、鎖状抗体、一本鎖抗体、ミニボディ、抗体断片から形成されたディアボディ、及び抗体断片から形成された多重特異的抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0046】

完全長の抗体を、パパイン又はペプシンなどの酵素で処理することにより、有用な抗体断片を作製することができる。パパインによる消化を使用することにより、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一な抗原結合性の抗体断片（各々は1つの抗原結合部位を有する）と残りの「Fc」断片を生成する。Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖のCH₁ドメインも含有している。ペプシンによる処理により、2つの抗原結合部位を有するF(ab')₂断片が生じ、これは依然として抗原と架橋することができる。

30

【0047】

Fab'断片は、CH₁ドメインのC末端における抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む、追加の残基の存在によってFab断片とは異なる。F(ab')₂抗体断片は、ヒンジ領域内のシステイン残基によって連結されたFab'断片の対である。抗体断片の他の化学的結合も公知である。

【0048】

「Fv」断片は、緊密に非共有結合的に会合した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる、完全な抗原認識部位及び結合部位を含有している。この立体配置では、各々の可変ドメインの3つのCDRは相互作用して、V_H-V_L二量体の表面上の抗原結合部位を規定する。要するに、6つのCDRが、抗体に対して抗原結合特異性を付与する。

40

【0049】

「一本鎖Fv」すなわち「scFv」抗体断片は、抗体のV_HドメインとV_Lドメインとを含む一本鎖Fv変異体であり、ここでドメインは、1本のポリペプチド鎖内に存在している。一本鎖Fvは、抗原を認識し結合することができる。scFvポリペプチドはまた場合により、V_HドメインとV_Lドメインの間に位置するポリペプチドリンクーを含有していてもよく、これによりscFvと抗原との結合のために望ましい3次元構造の形成が促進される（例えば、Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York,

50

pp. 269-315 を参照)。

【 0 0 5 0 】

他の認められている抗体断片としては、一対の直列な F d セグメント ($V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}$) を含むことにより一対の抗原結合領域を形成しているものが挙げられる。これらの「鎖状抗体」は、例えば Zapata et al. 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062 に記載のように二重特異的であっても単一特異的であってもよい。

【 0 0 5 1 】

ヒト化抗体又はヒト化抗体断片は、予め決定された抗原に結合することができ、そしてヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有する 1 つ以上の F R と、非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有する 1 つ以上の C D R とを含む、免疫グロブリンアミノ酸配列変異体又はその断片を含む、特殊な種類のキメラ抗体である。「インポート」配列としばしば称されるこの非ヒトアミノ酸配列は、典型的には、「インポート」抗体ドメイン、特に可変ドメインから採用される。一般的には、ヒト化抗体は、ヒト重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインの F R 間に挿入された、非ヒト抗体の少なくとも C D R 又は H V L を含む。

10

【 0 0 5 2 】

本発明は、ヒト生殖系列配列の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインの F R 間に挿入された、マウス抗体又はキメラ抗体に由来する C D R を含有している、特定のヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体を記載する。特定のマウス F R 残基が、ヒト化抗体の機能にとって重要である場合があり、それ故、特定のヒト生殖系列配列の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン残基が、対応するマウス配列の残基と同じになるように改変されることが理解されるだろう。

20

【 0 0 5 3 】

本明細書において使用する「本発明の抗体」及び「本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体」という表現は、本明細書に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を指す。好ましくは、前記表現は、配列番号 1 ($H - C D R 1$) のアミノ酸配列；配列番号 2 ($H - C D R 2$) のアミノ酸配列；及び配列番号 3 ($H - C D R 3$) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び配列番号 4 ($L - C D R 1$) のアミノ酸配列；配列番号 5 ($L - C D R 2$) のアミノ酸配列；及び配列番号 6 ($L - C D R 3$) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる、任意の抗体を指す。

【 0 0 5 4 】

30

1 つの態様では、ヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体は、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメイン（例えば、F a b、F a b'、F (a b') 2、F a b c、及び F v 断片に含有されているような）の実質的に全部を含み、ここでは C D R の全部又は実質的に全部が、非ヒト免疫グロブリンの C D R に相当し、具体的に本明細書において、C D R はマウス配列であり、F R は、ヒト免疫グロブリン共通配列又は生殖系列配列の F R である。別の態様では、ヒト抗セマフォリン 3 A 抗体はまた、免疫グロブリン F c 領域の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含む。通常、抗体は、両方の軽鎖、並びに重鎖の少なくとも可変ドメインを含有するだろう。抗体はまた、適宜、重鎖の C_{H1} 領域、ヒンジ領域、 C_{H2} 領域、 C_{H3} 領域、及び / 又は C_{H4} 領域の 1 つ以上を含み得る。

【 0 0 5 5 】

40

ヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体は、I g M、I g G、I g D、I g A、及び I g E を含むあらゆるクラスの免疫グロブリン、並びに、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及び I g A₂ を含むあらゆるアイソタイプから選択され得る。例えば、定常ドメインは、補体に結合する定常ドメインであってもよく、この場合ヒト化抗体は、細胞傷害活性を示すことが望まれ、アイソタイプは典型的には I g G₁ である。このような細胞傷害活性が望ましくない場合には、定常ドメインは別のアイソタイプ、例えば I g G₂ であってもよい。代替的なヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体は、1 つを超える免疫グロブリンのクラス又はアイソタイプに由来する配列を含み得、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択することは、当技術分野の技能範囲内である。具体的な実施態様では、本発明は、I g G₁ 抗体、より特定すると低減されたエフェクター機能

50

によって特徴付けられる I g G 1 抗体である抗体を提供する。

【 0 0 5 6 】

好ましくは、本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、I g G 1 K O としてフォーマット化されているヒト化抗体である。

【 0 0 5 7 】

ヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体の F R 及び C D R 又は H V L は、親配列に対して正確に対応している必要はない。例えば、インポート C D R 若しくは H V L 、又は共通配列若しくは生殖系列配列の F R 配列における 1 つ以上の残基を、置換、挿入、又は欠失によって改変（例えば突然変異誘発）させてもよく、これにより生じたアミノ酸残基は、いずれかの親配列の対応する位置の元来の残基とはもはや同一ではないが、該抗体はそれにも関わらずセマフォリン 3 A に結合する機能を保持している。このような改変は典型的には大規模ではなく、保存的改変であろう。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも 75% 、より頻繁には少なくとも 90% 、最も頻繁には 95% 超、又は 98% 超、又は 99% 超が、親共通配列又は生殖系列配列の F R 配列及びインポート C D R 配列の残基に相当するだろう。

10

【 0 0 5 8 】

重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間の界面（「 V L - V H 界面」）に影響を及ぼす免疫グロブリン残基は、2つの鎖の互いの近接性又は配向に影響を及ぼす残基である。鎖間相互作用に関与する可能性のある特定の残基としては、 V L 残基 34 、 36 、 38 、 44 、 46 、 87 、 89 、 91 、 96 及び 98 、並びに V H 残基 35 、 37 、 39 、 45 、 47 、 91 、 93 、 95 、 100 、及び 103 が挙げられる（ Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (アメリカ国立衛生研究所、ベセスダ、ミズーリ州、 1987) に示される番号付けシステムを利用）。米国特許第 6,407,213 号はまた、 V L 残基 43 及び 85 、並びに V H 残基 43 及び 60 などの残基も、この相互作用に関与している可能性があると考察している。これらの残基は、ヒト I g G についてのみ示されているが、それらは種間で適用可能である。鎖間相互作用に関与することが合理的に考えて予想される重要な抗体残基が、共通配列の置換のために選択される。

20

【 0 0 5 9 】

「共通配列」及び「共通抗体」という用語は、任意の特定のクラス、アイソタイプ、又はサブユニット構造の全ての免疫グロブリン、例えばヒト免疫グロブリン可変ドメインにおける各々の位置において最も高い頻度で存在するアミノ酸残基を含む、アミノ酸配列を指す。共通配列は、特定の種の又は多くの種の免疫グロブリンに基づき得る。「共通」配列、構造、又は抗体は、特定の実施態様に記載されているような共通ヒト配列を包含すると理解され、任意の特定のクラス、アイソタイプ、又はサブユニット構造の全てのヒト免疫グロブリンにおける各々の位置において最も高い頻度で存在するアミノ酸残基を含む、アミノ酸配列を指す。したがって、共通配列は、1つ以上の公知の免疫グロブリンに存在するアミノ酸を各々の位置において有するアミノ酸配列を含有するが、任意の単一の免疫グロブリンの完全アミノ酸配列を正確に複製していくなくてもよい。可変領域の共通配列は、どの天然に生成された抗体又は免疫グロブリン（ Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest 、第 5 版、アメリカ公衆衛生局、アメリカ国立衛生研究所、ベセスダ、ミズーリ州）及びその変異体からも得られない。重鎖及び軽鎖の共通配列の F R 、及びその変異体は、ヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体の調製のための有用な配列を提供する。例えば、米国特許第 6,037,454 号及び第 6,054,297 号を参照されたい。

30

【 0 0 6 0 】

ヒト生殖系列配列は、ヒト集団に天然に見られる。こうした生殖系列遺伝子の組合せは、抗体の多様性を生じる。抗体の軽鎖についての生殖系列抗体配列は、保存されたヒト生殖系列 又は の v - 遺伝子及び j - 遺伝子に由来する。同様に、重鎖配列は、生殖系列の v - 、 d - 及び j - 遺伝子に由来する（ LeFranc, M-P, and LeFranc, G, “ The Immunoglobulin Facts Book ” Academic Press, 2001 ）。

40

【 0 0 6 1 】

50

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から同定及び分離及び／又は回収されたものである。抗体の天然環境の混入成分は、抗体の診断用途又は治療用途に干渉する可能性のある材料であり、これは酵素、ホルモン、又は他のタンパク質性若しくは非タンパク質性溶質であり得る。1つの態様では、該抗体は、抗体の重量に対して少なくとも95%超まで単離されて精製されるだろう。

【0062】

「抗体の性能」という用語は、抗体による抗原の認識又は抗体のインビオでの有効性に寄与する因子／特性を指す。好ましい実施態様では、それは、網膜細胞内の細胞骨格の崩壊を防ぐ抗体の能力を指す。抗体のアミノ酸配列の変化は、折り畳みなどの抗体の特性に影響を及ぼし得、抗原に抗体が結合する初期速度(k_a)、抗原からの抗体の解離定数(k_d)、抗原に対する抗体の親和性定数(K_d)、抗体のコンフォメーション、タンパク質の安定性、及び抗体の半減期などの、物理的因子に影響を及ぼし得る。

10

【0063】

本明細書において使用する、2つ以上の核酸配列又はポリペプチド配列の脈絡における「同一である」又は「同一率」という用語は、最大の対応率となるように比較しアラインさせた場合に、同じであるか又は特定の比率の同じであるヌクレオチド若しくはアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列又はサブ配列を指す。同一率を決定するために、配列を最適に比較する目的でアラインさせる（例えば、第二のアミノ酸配列又は核酸配列と最適にアラインさせるために、第一のアミノ酸配列又は核酸配列にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸の位置又はヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一の配列内の位置が、第二の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占有されている場合、分子はその位置において同一である。2つの配列間の同一率は配列によって共有される同一な位置の数の関数である（すなわち、同一率% = 同一な位置の数 / 位置（例えば重複している位置）の総数 × 100）。いくつかの実施態様では、比較される2つの配列は、適宜（例えば、比較される配列を超えて伸長した追加の配列を除外する）、ギャップが配列内に導入された後に、同じ長さである。例えば、可変領域配列を比較する場合、リーダー配列及び／又は定常ドメイン配列は考慮されない。2つの配列間の配列比較のために、「対応する」CDRは、両方の配列内の同じ位置のCDRを指す（例えば各配列のCDR-H1）。

20

【0064】

2つの配列間の同一率又は類似率の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つの配列の比較のために使用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877のように改変された、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLAST及びXBLASTプログラムに取り込まれる。BLASTによるヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12を用いて実施され得、これにより関心対象のタンパク質をコードしている核酸に対して相同であるヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTによるタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 3 を用いて実施され得、これにより関心対象のタンパク質に対して相同であるアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップを入れたアラインメントを得るために、ギャップを入れたBLASTを、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載のように利用することができる。あるいは、PSI-Blastを使用することにより、分子間の遠隔関係を検出する反復検索を実施することができる（同上）。BLAST、ギャップを入れたBLAST、及びPSI-Blastプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム（例えばXBLAST及びNBLAST）のデフォルトパラメーターが使用され得る。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, CABIOS (1989) のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である、ALIGNプログラム（バ

30

40

50

ージョン 2 . 0) に取り込まれる。アミノ酸配列の比較のために A L I G N プログラムを利用する場合、P A M 1 2 0 重み残基表、ギャップ長ペナルティ 1 2 、及びギャップペナルティ 4 を使用することができる。配列分析のための追加のアルゴリズムは当技術分野において公知であり、これには、Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5 に記載のような A D V A N C E 及び A D A M ; 並びに Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8 に記載の F A S T A が挙げられる。F A S T A では、k t u p は、検索の感度及び速度を設定する制御オプションである。k t u p = 2 である場合、比較される 2 つの配列内の類似の領域は、アラインさせた残基対を調べることによって発見され ; k t u p = 1 である場合、単一のアラインさせたアミノ酸を調べる。タンパク質配列では k t u p を 2 又は 1 に設定し得、又は D N A 配列では 1 ~ 6 に設定し得る。k t u p が明記されない場合には、タンパク質ではデフォルトは 2 であり、D N A では 6 である。あるいは、タンパク質配列アライメントは、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402 によって記載のように、C L U S T A L W アルゴリズムを使用して実施され得る。

【 0 0 6 5 】

本明細書において使用する「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養液」という表現は、同義語として使用され、全てのこのようない呼称は、その子孫を含む。したがって、「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、初代の対象細胞、及び継代数に関係なくそれから得られた培養液を含む。

【 0 0 6 6 】

処置の目的のための「哺乳動物」という用語は、ヒト、家畜用動物及び農業用動物、及び動物園用動物、スポーツ用動物、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 6 7 】

本明細書において使用する「疾患」又は「障害」は、本明細書に記載のヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体を用いての処置から利点が得られるであろう任意の容態である。これは、哺乳動物において問題の障害の素因となる、そうした病状を含む、慢性及び急性の障害又は疾患を含む。

【 0 0 6 8 】

「硝子体内注射」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片の、患者の硝子体への導入を指す。

【 0 0 6 9 】

「皮下投与」という用語は、動物又はヒト患者の皮膚下への、好ましくは皮膚と根底にある組織との間のポケット内への、薬物貯蔵所からの比較的緩徐で持続的な送達による、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片の導入を指す。皮膚をつまむか、又は皮膚を引き上げて根底にある組織から引き離すことにより、ポケットが作られ得る。

【 0 0 7 0 】

「皮下注入」という用語は、30 分以内、又は 90 分以内を含むがそれに限定されない時間をかけての、動物又はヒト患者の皮膚下への、好ましくは皮膚と根底にある組織との間のポケット内への、薬物貯蔵所からの比較的緩徐で持続的な送達による、薬物の導入を指す。場合により、注入は、動物又はヒト患者の皮膚下に埋め込まれた薬物送達ポンプの皮下埋め込みによって行なわれ得、ここでポンプは、予め決定された時間かけて、例えば 30 分間、90 分間、又は処置計画の長さによぶ時間をかけて、予め決定された量の薬物を送達する。

【 0 0 7 1 】

「皮下ボーラス」という用語は、動物又はヒト患者の皮膚下への薬物の投与を指し、ここでボーラス薬物送達は、約 15 分以内であり；別の態様では、5 分以内であり、さらには別の態様では、60 秒以内である。またさらなる別の態様では、投与は、皮膚と根底にある組織との間のポケット内であり、ここでポケットは、皮膚をつまむか又は皮膚を引き上

10

20

30

40

50

げて根底の組織から引き離すことによって作られ得る。

【 0 0 7 2 】

「治療有効量」という用語は、処置される障害の1つ以上の症状を緩和又は寛解する抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の量を指すために使用される。処置する際に、有益な患者の転帰を有するのはその量である。有効性は、処置しようとする容態に依存して、慣用的な方法で測定され得る。例えば、セマフォリン3Aを発現している細胞によって特徴付けられる、眼／網膜の疾患又は障害において、有効性は、応答率、例えば視力の回復を決定することによって、又は疾患が進行するまでの遅延時間を評価することによって測定され得る。

【 0 0 7 3 】

本明細書において使用する「処置」及び「療法」などという用語は、1つ以上の症状の軽減若しくは緩和、疾患若しくは障害の後退、緩徐化、若しくは停止を含むがこれらに限定されない、あらゆる臨床的に望ましいか又は有益な効果をもたらす、疾患又は障害についての治療的措置並びに予防的又は抑制的措置を含むことを意味する。したがって、例えば、処置という用語は、疾患又は障害の症状の発症前又は発症後の抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の投与を含み、これにより、疾患又は障害の1つ以上の兆候が予防又は除去される。別の例として、この用語は、疾患の臨床徵候後に抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を投与することにより、疾患の症状と戦うことを含む。さらには、発症後及び臨床症状が発生した後の抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の投与は（ここでは、処置により疾患の寛解がもたらされるか否かに関係なく、投与が、疾患又は障害の臨床パラメーターに影響を及ぼす）、本明細書において使用する「処置」又は「療法」を含む。さらに、単独での又は別の治療剤と組み合わせた本発明の組成物が、抗セマフォリン3A抗体組成物又はその抗原結合断片を使用しない場合の症状と比較して、処置される障害の少なくとも1つの症状を軽減又は寛解する限り、結果は、障害の全ての症状が軽減されるか否かに関係なく、根底にある障害の効果的な処置であると判断されるべきである。

【 0 0 7 4 】

「添付文書」という用語は、適応症、使用法、投与法、禁忌、及び／又はこのような治療用製品の使用に関する警告に関する情報を含有している、治療用製品の商業包装に慣例上含まれる説明書を指すために使用される。

【 0 0 7 5 】

本発明の抗体

【 0 0 7 6 】

第一の態様では、本発明は、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片に関する。好ましくは、該抗体は、ヒト化抗セマフォリン3A抗体、より好ましくはヒト化モノクローナル抗セマフォリン3A抗体である。

【 0 0 7 7 】

最初の特徴付けにおいて、セマフォリン3A変異体に標的化する抗体ライブラリーは、マウス抗体のCDRを、ヒトの共通した重鎖及び軽鎖の可変ドメインのFRに配置することによって、及びさらに異なる改変を有するFRを工学操作することによって作製された。

【 0 0 7 8 】

これにより、本明細書に開示されているような、特性の増強された、セマフォリン3Aに対して指向されるヒト化抗体が得られた。本発明の抗体の配列は、以下の表1に示されている。

【 0 0 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1:

名称	アミノ酸配列	配列番号
HCDR1	SYYMS	配列番号 1
HCDR2	TIIKSGGYAY YPDSVKD	配列番号 2
HCDR3	GGQGAMDY	配列番号 3
LCDR1	RASQSIGDYL H	配列番号 4
LCDR2	YASQSISS	配列番号 5
LCDR3	QQGYSFPYT	配列番号 6
VH – 変異体 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWWST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTGTVSS	配列番号 7
VH – 変異体 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPPFS SYYMSWVRQA PGKGLEWWST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTGTVSS	配列番号 8
VH – 変異体 3	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWWST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED	配列番号 9

10

20

30

40

50

VH- 変異体 4	TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSS EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	配列番号 10
VL - 変異体 a	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIISGIPA RFSGSGSGTD FTLTITSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	配列番号 11
VL - 変異体 b	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSIISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	配列番号 12
VL- 変異体 c	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	配列番号 13
重鎖ー クローン I	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSVGHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQCG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	配列番号 14
軽鎖ー クローン I	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIKY ASQSIISGIPA RFSGSGSGTD FTLTITSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	配列番号 15
重鎖ー クローン II	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSVGHTF PAVLQSSGLY	配列番号 16

10

20

30

40

50

	SLSSVVTVPSS LGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	
重鎖ー クローン III	EVQLVESGGGLVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQQ TTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYL PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSS LGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	配列番号 17 10
軽鎖ー クローン III	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	配列番号 18 20
重鎖ー クローン IV	EVQLVESGGGLLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQQ TTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYL PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSS LGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	配列番号 19 30
軽鎖ー クローン IV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	配列番号 20 40

【 0 0 8 0 】

1つの実施態様では、本発明は、

- 配列番号 1 (H - C D R 1) のアミノ酸配列；配列番号 2 (H - C D R 2) のアミノ酸配列；及び配列番号 3 (H - C D R 3) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び
- 配列番号 4 (L - C D R 1) のアミノ酸配列；配列番号 5 (L - C D R 2) のアミノ酸配列；及び配列番号 6 (L - C D R 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 8 1 】

別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、又は配列番号 10 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
 - 配列番号 11、配列番号 12、又は配列番号 13 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域
 を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0082】

別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、又は配列番号 10 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
 - 配列番号 11、配列番号 12、又は配列番号 13 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域
 を含み、
 - 重鎖可変領域が、配列番号 1 (H - C D R 1) のアミノ酸配列；配列番号 2 (H - C D R 2) のアミノ酸配列；及び配列番号 3 (H - C D R 3) のアミノ酸配列を含み；及び
 - 軽鎖可変領域が、配列番号 4 (L - C D R 1) のアミノ酸配列；配列番号 5 (L - C D R 2) のアミノ酸配列；及び配列番号 6 (L - C D R 3) のアミノ酸配列を含む、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

20

【0083】

さらに別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、又は配列番号 10 のアミノ酸配列を含んでいる、重鎖可変領域；及び
 - 配列番号 11、配列番号 12、又は配列番号 13 のアミノ酸配列を含んでいる、軽鎖可変領域
 を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0084】

好みしい実施態様では、本発明は、

- 配列番号 7 及び配列番号 11 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；
 - 配列番号 8 及び配列番号 11 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；
 - 配列番号 9 及び配列番号 12 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；又は
 - 配列番号 10 及び配列番号 13 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでいる、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域
 を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【0085】

さらに別の実施態様では、本発明は、

- 配列番号 14、配列番号 16、配列番号 17、又は配列番号 19 のアミノ酸配列を含んでいる、好みしくはからなる、重鎖；及び
 - 配列番号 15、配列番号 18、又は配列番号 20 のアミノ酸配列を含んでいる、好みしくはからなる、軽鎖
 を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0086】

特定の実施態様では、本発明は、

a . 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖
 、該抗体は「クローン I」と称される；

50

- b . 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖
、該抗体は「クローン I I 」と称される；
c . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖
、該抗体は「クローン I I I 」と称される；又は
d . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖
、該抗体は「クローン I V 」と称される

を含んでいる、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片に関する。

【 0 0 8 7 】

I g G 1 - K O 突然変異体は、F c 領域内に突然変異を導入することによって作製された。エフェクター機能を低下又は阻害する突然変異は、当業者には周知であり、先行技術、例えばWang et al, Protein Cell 2018, 9(1):63-73及びStewart et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2014, 2:29に完全に開示されている。典型的には、F c のエフェクター機能を低下させるためにI g G 1 のF c 領域に導入された突然変異の非制限的なリストとしては、

- L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A ；
- L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 及び N 2 9 7 Q ；
- L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 及び P 3 2 9 G ；又は
- L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 及び D 2 6 5 A

が挙げられ、ここでの残基は、K a b a t のE U インデックスに従って番号が付けられている。

【 0 0 8 8 】

好ましい実施態様では、本発明の抗体は、エフェクター機能を低下させる、2つの突然変異であるL 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A をF c 領域に含む。

【 0 0 8 9 】

本明細書に開示され配列番号 1 ~ 6 に示される C D R は、K a b a t の番号付けに従つて提示され、K a b a t における位置と共に以下の表 2 に要約されている。

【 0 0 9 0 】

【 表 2 】

表2:

CDR	Kabatにおける配列	Kabatにおける位置	配列番号
HCDR1	SYYMS	31-35	1
HCDR2	TIIKSGGYAYYPDSVKD	50-66	2
HCDR3	GGQGAMDY	99-106	3
LCDR1	RASQSIGDYLH	24-34	4
LCDR2	YASQSI S	50-56	5
LCDR3	QQGYSFPYT	89-97	6

【 0 0 9 1 】

本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、高い親和性でヒトセマフォリン 3 A に結合する。この態様に関連した1つの実施態様では、本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、ヒトセマフォリン 3 A に 5 0 pM 未満の K D で結合する。別の実施態様では、本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、実施例 4 に例証されているように、ヒトセマフォリン 3 A に 3 5 pM 未満の K D で結合する。好ましい実施態様では、本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、ヒトセマフォリン 3 A に 3 0 pM 未満の K D で結合する。

【 0 0 9 2 】

本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、カニクイザルセマフォリン 3 A 、マウスセマフォリン 3 A 、ラットセマフォリン 3 A 、及びウサギセマフォリン 3 A にも結合する。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

本発明の抗セマフォリン3A抗体は、セマフォリン3Aにより誘発される網膜細胞内の細胞骨格の崩壊を、100pM未満、好ましくは80pM未満、より好ましくは70pM未満の機能的効力で防ぐ。好ましい実施態様では、本発明の抗セマフォリン3A抗体は、セマフォリン3Aにより誘発される網膜細胞内の細胞骨格の崩壊を、実施例4に例証されているように、69pMの機能的効力で防ぐ。

【 0 0 9 4 】

さらなる態様では、本発明の抗セマフォリン3A抗体は、実施例5に記載のような低い免疫原性リスクを有することが証明された。これは、コンピューターで計算された抗体の免疫原性の予測に依拠する。免疫原性リスクは典型的には、主要な免疫原性に影響する因子である、T細胞エピトープを予測するためのコンピューターアルゴリズムによるなどの、周知の様々な方法によって評価される。

10

【 0 0 9 5 】

関心対象のタンパク質内に存在するT細胞エピトープを含有している配列は、EpiMatrix (EpiVax社によって生産)の名称で入手可能である、コンピューターマトリックスアプローチに基づいたアルゴリズムを使用することによって予測され得る。当業者は、Van Walle et al., Expert Opin Biol Ther. 2007 March; 7(3): 405-18及びJawa and al., Clin Immunol. 2013 Dec; 149(3):534-55を参照し得る。

【 0 0 9 6 】

本発明者らは、本発明の抗体が、先行技術に記述された及び本明細書に記載されたセマフォリン3Aに標的化する他の抗体又は断片よりも有益な特性を示すことを示した。

20

【 0 0 9 7 】

本発明者らは、国際公開公報第2014123186号(カイオム・バイオサイエンス社)に開示されたセマフォリン3Aに標的化する抗体の結合親和性を、本発明の抗体の親和性と比較した。国際公開公報第2014123186号の抗体は、アルツハイマー病の処置に使用するために開示されている。本発明の実施例8は、本発明の抗体が、カイオム・バイオサイエンス社によって開示された先行技術の抗体よりも、ヒトセマフォリン3Aに対してより高い結合親和性を有することが判明したことを示す。

【 0 0 9 8 】

本発明者らはまた、本発明による抗体の特性を、国際公開公報第2017074013号(サムスン社)に開示されているようなscFv断片と比較した。これらの断片は、様々な癌の処置に使用するために開示されている。本発明の実施例9は、本発明の抗体が、国際公開公報第2017074013号によって開示された先行技術の抗体断片よりも、ヒトセマフォリン3Aに対してより高い結合親和性を有することが判明したことを示す。

30

【 0 0 9 9 】

より高い結合親和性は、抗体の硝子体内への注射後のセマフォリン3Aの中和時間を延長し、注射頻度を下げることが可能となる。より高い結合親和性により、さらに、より少ない用量の投与が可能となり、起こり得る副作用を制限する。したがって、本発明の抗体は、先行技術の抗体を上回る、技術的な利点を提供する。改善された結合親和性及び低減された注射頻度は、それを必要とする患者における患者の処置の有効性をかなり寛解する。本発明の抗体はまた、患者にとって価値ある利点、特に改善された薬物のコンプライアンスの遵守を提供する。

40

【 0 1 0 0 】

本発明者らはまた、本発明の抗体、及び本発明の実施例11に記載のようなセマフォリン3Aに標的化する市販の抗体の機能的効力を比較した。本発明者らは、同じ条件下で、本発明の抗体が、セマフォリンによって誘発される網膜細胞の細胞骨格の崩壊を防ぎ(実施例3)、一方、市販の抗体は防がないことを示した(実施例11)。

【 0 1 0 1 】**ヒト化及びアミノ酸配列変異体**

さらに他の変異抗セマフォリン3A抗体及び抗体断片は、配列番号1～6に示される配

50

列の下で同定された C D R セットに基づいて工学操作され得る。前記変異抗セマフォリン 3 A 抗体及び抗体断片における C D R のアミノ酸配列は未変化のままであるが、周辺領域、例えば F R 領域は工学操作されていてもよいことが理解される。抗セマフォリン 3 A 抗体のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化を抗セマフォリン 3 A 抗体の D N A に導入することによって、又はペプチド合成によって調製され得る。このような変異体は、例えば、本明細書の実施例の抗セマフォリン 3 A 抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び / 又は該残基への挿入、及び / 又は該残基の置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組合せを行なうことにより最終構築物に到達し、ただし、最終構築物は所望の特徴を有する。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数又は位置の変化など、ヒト化又は変異抗セマフォリン 3 A 抗体の翻訳後プロセスも変化させ得る。

10

【 0 1 0 2 】

別の種類の抗体のアミノ酸変異体は、抗体の元来のグリコシル化パターンの改変を含む。この文脈における「改変」という用語は、抗体体内に見られる 1 つ以上の糖鎖部分を欠失させること、及び / 又は、抗体体内に以前には存在していなかった 1 つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。

【 0 1 0 3 】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体のアミノ酸配列変異体をコードしている、核酸分子を含む。抗セマフォリン 3 A 抗体のアミノ酸配列変異体をコードしている核酸分子は、当技術分野において公知である様々な方法によって調製される。これらの方法は、天然源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合）、あるいは、抗セマフォリン 3 A 抗体の以前に調製された変異体又は非変異体形のオリゴヌクレオチドにより媒介される（又は部位特異的）突然変異誘発、P C R 突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含むがこれらに限定されない。

20

【 0 1 0 4 】

特定の実施態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体は、抗体断片である。抗体断片の生成のために開発された技術が存在する。断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解的消化を介して得ることができる（例えば、Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117；及びBrennan et al., 1985, Science 229: 81を参照）。あるいは、該断片は、組換え宿主細胞において直接產生されてもよい。例えば、F a b ' - S H 断片は大腸菌（E . c o l i ）から直接回収され得、これを化学結合してF (a b ')₂ 断片を形成することができる（例えば、Carter et al., 1992, Bio/Tech nology 10:163-167参照）。別のアプローチによると、F (a b ')₂ 断片は、組換え宿主細胞培養液から直接単離されてもよい。抗体断片を产生するための他の技術は、当業者には明らかであろう。

30

【 0 1 0 5 】

抗セマフォリン 3 A 抗体及びその抗原結合断片は、修飾を含み得る。

【 0 1 0 6 】

特定の実施態様では、インタクトな抗体よりもむしろ、抗セマフォリン 3 A 抗体断片を使用することが望ましい場合がある。その血清中半減期を延長するために、該抗体断片を修飾することが望ましい場合がある。これは、例えば、サルベージ受容体結合性エピトープを抗体断片に取り込むことによって成し遂げられ得る。1つの方法では、該抗体断片の適切な領域を改変（例えば突然変異）させても、又は、エピトープを、ペプチドタグに取り込み、これを次いで該抗体断片のいずれかの末端に又は中央に、例えば D N A 合成又はペプチド合成によって融合させてもよい。例えば、国際公開公報第 9 6 / 3 2 4 7 8 号参照。

40

【 0 1 0 7 】

他の実施態様では、本発明は、抗セマフォリン 3 A 抗体の共有結合による修飾を含む。共有結合による修飾は、システイン残基、ヒスチジン残基、リジン及びアミノ末端残基、アルギニン残基、チロシン残基、カルボキシル側鎖基（アスパラギン又はグルタミン）、グルタミン及びアスパラギン残基、又はセリン残基、又はトレオニン残基の修飾を含む

50

。別の種類の共有結合による修飾は、グリコシドを抗体に化学的に又は酵素的に結合させる工程を含む。このような修飾は、化学合成によって行なわれても、又は適用可能であれば該抗体の酵素的若しくは化学的切断によって行なわれてもよい。該抗体の他の種類の共有結合による修飾は、該抗体の標的化アミノ酸残基を、選択された側鎖すなわちアミノ末端残基又はカルボキシ末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、分子内に導入され得る。

【0108】

該抗体上に存在するあらゆる糖鎖部分の除去は、化学的に又は酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52によって、及びEdge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131によって記載されている。抗体上の糖鎖部分の酵素による切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350によって記載のような、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【0109】

別の種類の有用な共有結合による修飾は、抗体を、様々な非タンパク質性ポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンに、米国特許第4,640,835号、米国特許第4,496,689号、米国特許第4,301,144号、米国特許第4,670,417号、米国特許第4,791,192号、及び米国特許第4,179,337号の1つ以上に示される方法で連結する工程を含む。

【0110】

エピトープとの結合

第二の態様では、本発明は、特異的な「セマフォリン3A抗原エピトープ」及び「セマフォリン3Aエピトープ」を認識する抗体に関する。特に、本発明の抗体は、配列番号22を有するヒトセマフォリン3Aのエピトープに結合する。

【0111】

1つの態様では、本発明は、配列番号22に示されるようなヒトセマフォリン3Aのアミノ酸領域370～382内の少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0112】

別の態様では、本発明は、配列番号21に結合する抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0113】

配列番号21及び22の配列は以下の表5に示されている。

【0114】

10

20

30

40

50

【表3】

表5

名称	配列	配列番号
セマフォリン3A のエピトープ	DSTKDLPPDV ITF	21
ヒトセマ フォリン3A	NYQNGKNNVPRLKLSYKEMLESNNVITFNGLANSSSYHTFL LDEERSRLYVGAKDHIFSDLVNIKDFQKIVWPVSYTRRDEC KWAGKDILKECANFIKVLKAYNQTHLYACGTGAFHPICTYIEI GHHPEDNIFKLENSHFENGGRGKSPYDPKLLTASLLIDGELYS GTAADFMGRDFAIFRTLGHHPIRTEQHDSRWLNDPKFISA HLISESDNPEDDKVYFFFRENAIDGEHSGKATHARIGQICKN DFGGHRSLVNWKWTTFLKARLICSVPGPNGIDTHFDELQDVF LMNFKDPKNPVYGVFTTSSNIFKGSAVCMSMSDVRRVF LGPYAHRDGPNYQWVPYQGRVPYPRPGTCPSTFGGFDS TKDLPPDVITFARSHPAMYNPVFPMNNRPIVIKTDVNYQFT QIVVDRVDAEDGQYDVMFIGTDVGTVLKVVSIPKETWYDLE EVLLLEEMTVFREPTAISAMELSTKQQQLYIGSTAGVAQLPLH RCDIYGKACAECLARDPYCAWDGSACSRYFPTAKRRTRR QDIRNGDPLTHCSDLHHHDNHGHSPERIIYGVENSSTFLE CSPKSQRALVYWQFQRRNEERKEEIRVDDHIIRTDQGLLR SLQQKDSGNYLCHAVEHGFIQTLLKVTLEVIDTEHLEELLHK DDDGDGSKTKEMSNSMTPSQKVWYRDFMQLINHPNLNTM DEFCEQVWKDRKQRRQRPGHTPGNSNKWKHLQENKKG RNRRRTHEFERAPRSV	10 20 30

【0115】

本明細書において使用する「セマフォリン3A抗原エピトープ」及び「セマフォリン3Aエピトープ」という用語は、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片に結合することのできる、分子（例えばペプチド）又は分子の断片を指す。これらの用語はさらに、例えば、配列番号1～3の重鎖CDR及び配列番号4～6の軽鎖CDRから選択された、軽鎖のCDRと重鎖のCDRの組合せを有する、本発明の抗体又は抗体断片のいずれかによって認識される、セマフォリン3A抗原決定基を含む。

【0116】

セマフォリン3A抗原エピトープは、タンパク質、タンパク質の断片、ペプチドなどに含まれていてもよい。該エピトープは通常、タンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチド模倣体（すなわち、セマフォリン3A抗原の抗体結合特性を模倣した有機化合物）、又はその組合せである。

【0117】

本発明の抗体又は抗体断片は、ヒトセマフォリン3Aの特有のエピトープに結合することが判明している。好ましくは、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片は、配列

番号 22 を有するヒトセマフォリン 3 A の細胞外ドメインのアミノ酸領域 370 ~ 382 内の少なくとも 1 つのアミノ酸残基に結合する。このエピトープは、セマフォリン 3 A と プレキシン A 受容体との界面の近くに位置する。このエピトープに対する抗体の結合は、リガンドであるセマフォリン 3 A と、受容体であるプレキシン A と、共受容体である Nrp1 のシグナル伝達性ハロ受容体複合体の形成を阻害し、これにより、このようなシグナル伝達の生物学的效果の干渉をもたらす。

【 0118 】

エピトープとの結合に関して、「アミノ酸領域 X - Y . . . 内に結合」という語句は、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片が、配列において特定されたアミノ酸領域内の少なくとも 1 つのアミノ酸残基、好ましくは全てのアミノ酸残基に結合することを意味する。

10

【 0119 】

別の態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、又は 100% に結合する。好ましくは、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片は配列番号 22 に結合する。

【 0120 】

治療における使用

第三の態様では、本発明は、医薬品としての使用のための、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片に関する。

20

【 0121 】

1 つの実施態様では、本発明は、セマフォリン A の血管退行作用を阻害するための、及び / 又は網膜の血行再建を改善するための、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0122 】

好ましくは、本発明は、網膜疾患又は眼疾患の治療又は予防に使用するための、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。本発明者らは実際に、セマフォリン 3 A に標的化する抗体を開発し、これは、

- 網膜の血行再建を改善するために、虚血性領域に向けて血管新生を向け直す工程；

- 硝子体領域の病的な新血管新生を予防する工程；及び

- 血液網膜関門の破壊を予防する工程

30

にとって極めて助けになる。

【 0123 】

以前に記述されているように、セマフォリン 3 A は、低酸素性の網膜神経節細胞によって分泌される血管反発の合図である。セマフォリン 3 A は、ニューロフィリン - 1 に結合することによって、内皮細胞上のプレキシン受容体の細胞内シグナル伝達を活性化し、その結果、アクチン線維の解離が起こる。これにより、新規血管の増殖を方向付け、かつ網膜内の虚血領域の血管再生を防ぐ、特殊な内皮細胞である端細胞の糸状仮足内の細胞骨格は崩壊する。本発明者らは、中和性のセマフォリン 3 A 抗体を用いて血管反発作用を調節することは、端細胞の数を増加させ、虚血領域、例えば糖尿病性黄斑虚血を有するヒトにおける病的に拡大した中心窓無血管帯に向けて血管新生を向け直すであろうことを示した。

40

【 0124 】

それ故、第四の態様では、本発明は、網膜症、虚血性網膜症、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、近視性変性、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、囊胞様黄斑浮腫、あらゆる網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症、外傷性網膜症、薬剤性網膜脈管障害、網膜新血管新生、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管炎、網膜微小動脈瘤、フックスジストロフィー、黄斑部毛細血管拡張症、アッシャー症候群、及びシユタルガルト病からなる群より選択される疾患の治療又は予防に使用するための、抗セマフ

50

オリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片に関する。

【 0 1 2 5 】

本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、虚血性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑変性、網膜新血管新生、及び脈絡膜新血管新生を治療又は予防するのに特に有用である。

【 0 1 2 6 】

好ましい実施態様では、前記疾患は糖尿病性黄斑虚血であり、本発明の抗体は、虚血網膜内の血管再生を促進し（血行再建）、眼の硝子体領域の病的な新血管新生を予防する。

【 0 1 2 7 】

別の好ましい実施態様では、前記疾患は糖尿病性黄斑浮腫であり、本発明の抗体は、血液網膜閑門の透過性を低下させる。

【 0 1 2 8 】

別の好ましい実施態様では、本発明は、セマフォリン 3 A により誘発される血液網膜閑門の透過性、及び／又はセマフォリン 3 A により誘発される虚血領域の血管退行を阻害するための、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 1 2 9 】

好ましい態様では、本発明の抗体は、糖尿病性黄斑浮腫（DME）及び／又は糖尿病性黄斑虚血（DM I）の処置に有用である。好ましい実施態様では、本発明の抗体は、DME 及び DM I を患っている患者を処置するのに有用である。好ましくは、本発明の抗体は、15%以上、20%以上、25%以上、より好ましくは30%以上の中心窩無血管帯（FAZ）の拡大によって定義されるような、DM I を処置するために使用される。

【 0 1 3 0 】

第五の態様では、本発明は、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片と薬学的に許容される担体とを含んでいる、医薬組成物を提供する。

【 0 1 3 1 】

抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片は、硝子体内、経口、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内を含む、任意の適切な手段によって投与される。非経口的注入は、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、又は皮下投与を含む。さらに、抗セマフォリン 3 A 抗体は、パルス注入によって、特に漸減用量の抗体を用いて適切に投与される。1つの態様では、投薬は、投与が短時間であるか又は慢性的であるかに一部には依存して、注射によって、最も好ましくは静脈内又は皮下注射によって投与される。好ましくは、抗セマフォリン 3 A 抗体は、眼への硝子体内注射を通して投与される。

【 0 1 3 2 】

疾患の予防又は治療のために、抗体の適切な用量は、上記に定義されているような処置される予定の疾患の種類、疾患の重症度及び経緯、抗体が予防目的で投与されるのか治療目的で投与されるのか、以前の治療、患者の臨床歴、及び抗体に対する応答、及び担当医師の判断などの様々な要因に依存するだろう。該抗体は、患者に一度に又は一連の処置にわたり適切に投与される。

【 0 1 3 3 】

好ましい実施態様では、注射 1 回あたりに適用可能な本発明の抗体の用量範囲は通常、1 mg/眼から 10 mg/眼、好ましくは 1.5 mg/眼から 5 mg/眼、より好ましくは 2 mg/眼から 3 mg/眼、さらにより好ましくは約 2.5 mg/眼である。

【 0 1 3 4 】

「抑制」という用語は本明細書において、「寛解」及び「軽減」と同じ脈絡で、疾患の 1 つ以上の特徴を減らすこと又は減少させることを意味するために使用される。

【 0 1 3 5 】

抗体組成物は、良好な医療行為に沿った方法で製剤化され、用量化され、投与されるだろう。この脈絡において考慮される因子は、処置される具体的な障害、処置される具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与法、投与計画、

10

20

30

40

50

及び医療従事者には公知の他の因子を含む。投与される予定の抗体の「治療有効量」は、このような考察によって支配され、そして、本発明の抗体によって対処される眼疾患又は網膜疾患を予防、寛解、又は治療するのに必要な最少量である。

【0136】

前記抗体は、問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤と共に製剤化される必要はないが、場合によりそれと共に製剤化される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗セマフォリン3A抗体の量、障害又は処理の種類、及び上記に考察されている他の因子に依存する。これらは一般的に、本明細書において以前に使用されたのと同じ用量及び投与経路で、又は今までに使用された用量の約1~99%の用量で使用される。

10

【0137】

別の態様では、本発明はまた、眼科ではない疾患、例えば自己免疫性関節炎、神経障害性疼痛、骨粗鬆症、及び癌などの治療又は予防のために使用するための、抗セマフォリン3A抗体又は抗原結合断片にも関する。

【0138】

処置法

別の態様では、本発明はまた、それを必要とする患者における、眼又は眼疾患を治療又は予防するための任意の方法も包含し、該方法は、本発明の抗セマフォリン3A抗体を投与する工程を含む。

【0139】

好ましくは、本発明は、セマフォリン3Aの血管退行作用を阻害するための、本発明に記載の抗体の使用法に関する。より好ましくは、本発明は、網膜の血行再建を改善するための該方法に関する。

20

【0140】

好ましくは、本発明は、本発明に記載の抗体の薬学的に有効な量を、それを必要とする患者に投与する工程を含む、眼疾患又は網膜疾患を治療又は予防するための方法に関する。好ましくは、該疾患は、網膜症、虚血性網膜症、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑変性、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、近視性変性、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、囊胞様黄斑浮腫、あらゆる網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症、外傷性網膜症、薬剤性網膜脈管障害、網膜新血管新生、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管炎、網膜微小動脈瘤、フックスジストロフィー、黄斑部毛細血管拡張症、アッシャー症候群、及びシュタルガルト病からなる群より選択される。より好ましくは、該疾患は、糖尿病性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症及び非増殖性糖尿病性網膜症を含む）、虚血性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性黄斑虚血、加齢黄斑浮腫、網膜新血管新生、緑内障、及び脈絡膜新血管新生からなる群より選択される。さらに好ましい実施態様では、該疾患は、糖尿病性黄斑浮腫及び/又は糖尿病性黄斑虚血である。

30

【0141】

本明細書に記載の全ての開示されている技術的特色は、前記処置法に適用可能である。

40

【0142】

医薬組成物及びその投与

抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を含んでいる組成物は、眼疾患又は網膜疾患有している又は有するリスクのある被験者に投与され得る。本発明はさらに、眼疾患又は網膜疾患又はセマフォリン3A疾患有することの予防又は治療のための医薬品の製造における、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の使用を提供する。本明細書に記載の全ての開示されている技術的特色は、医薬品の製造における、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の前記使用に適応可能である。本明細書において使用する「被験者」という用語は、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を投与することのできる任意の哺乳動物患者（例えば、ヒト及び非ヒト哺乳動物、例えば靈長類、げっ歯

50

類、及びイヌを含む)を意味する。本明細書に記載の方法を使用した処置を特に目的とした被験者にはヒトが挙げられる。抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片は、単独で投与されても、又は他の組成物と組み合わせて投与されてもよい。

【0143】

様々な送達システムが知られており、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を投与するために使用され得る。導入法としては、硝子体内、点眼液、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口の経路が挙げられるがこれらに限定されない。抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片は、例えば、注入、ボーラス、又は注射によって投与され得、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与されてもよい。投与は全身性であっても、局所性であってもよい。好ましい実施態様では、投与は硝子体内への注射による。このような注射用の製剤は、例えば、プレフィルドシリンジ内に調製され得る。

10

【0144】

抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片は、治療有効量の抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片と1つ以上の薬学的に適合性の成分とを含んでいる医薬組成物として投与されてもよい。

【0145】

典型的な実施態様では、医薬組成物は、ヒトへの静脈内投与又は皮下投与に適応した医薬組成物として、通例の手順に従って製剤化される。典型的には、注射による投与用の組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要であれば、医薬品はまた、安定化剤、及び注射部位における疼痛を和らげるための局所麻酔剤、例えばリグノカインを含んでいてもよい。一般的には、成分は、単位投与剤形で、別々に又は一緒に混合した状態のいずれかで、密封した容器内の、例えば活性薬剤の量を示したアンプル又は小袋内の、例えば凍結乾燥させた乾燥粉末又は無水濃縮物として供給する。医薬品を注入によって投与しようとする場合、医薬等級の滅菌水又は食塩水を含有している点滴ボトルを用いて施薬することができる。医薬品が注射によって投与される場合、滅菌注射用水又は食塩水のアンプルが提供されることにより、成分を投与前に混合することができる。

20

【0146】

さらに、医薬組成物は、(a)凍結乾燥形態の抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片を含有している容器、及び(b)注射用の薬学的に許容される希釈剤(例えば滅菌水)を含有している第二の容器とを含んでいる、医薬品キットとして提供されてもよい。薬学的に許容される希釈剤は、凍結乾燥させた抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の復元又は希釈のために使用され得る。場合によりこのような容器(群)には、医薬品又は生物学的製剤の製造、使用、又は販売を規制する政府当局によって定められた形式での注意書きが付属していてもよく、この注意書きは、ヒトへの投与のための製造、使用、又は販売の当局による認可を反映している。

30

【0147】

眼疾患又は網膜疾患の治療又は予防に有効である、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の量は、標準的な臨床技術によって決定され得る。さらに、インビトロアッセイを場合により使用して、最適な用量範囲を同定するのを助け得る。製剤中に使用される予定の正確な用量は、投与経路、及び障害のステージにも依存し、実施者の判断及び各患者の環境に応じて決定されるべきである。有効な用量は、インビトロ又は動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から外挿されてもよい。

40

【0148】

例えば、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片の毒性及び治療有効性は、細胞培養液又は実験動物において、ED₅₀(集団の50%において治療的に有効な用量)を決定するための標準的な薬学的手順によって決定され得る。大きな治療指数を示す抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片が好ましい。

【0149】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータを、ヒトに使用するための一連の用量を製剤化する際に使用することができる。抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断

50

片の用量は典型的には、殆ど毒性を伴なわないか又は全く毒性を伴なわない E D₅₀ を含む一連の循環中濃度内に存する。用量は、使用される剤形及び使用される投与経路に応じて、この範囲内で変更されてもよい。該方法に使用される任意の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片についての治療有効用量は最初は、細胞培養アッセイから推定され得る。動物モデルにおいて、細胞培養液で決定されたような I C₅₀（すなわち、症状の半数阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環中血漿中濃度範囲を達成する用量を製剤化することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量を正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィー、 E L I S A などによって測定され得る。

【 0 1 5 0 】

10

抗セマフォリン 3 A 抗体の硝子体内注射のために、一般的にはより長い処置間隔が好ましい。その改善された結合親和性及び効力に因り、本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、より長い間隔で投与され得る。

【 0 1 5 1 】

1 つの実施態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体は、6 週間毎に、好ましくは 7 週間毎に、好ましくは 8 週間毎に、好ましくは 9 週間毎に、好ましくは 10 週間毎に、好ましくは 11 週間毎に、より好ましくは 12 週間毎に投与される。さらに好ましい実施態様では、本発明の抗セマフォリン 3 A 抗体は、3 カ月間毎に 1 回投与される。

【 0 1 5 2 】

20

眼に投与することのできる容量は、厳密に制限されているので、抗セマフォリン 3 A 抗体が高い濃度にまで製剤化することができることが非常に重要である。さらに、抗セマフォリン 3 A 抗体の効力は、非常に重要である。なぜなら、強力な抗体は、より少ない用量においてさえもその効果を発揮することができ、それにより、活性及びまた処置間隔を延長することができるからである。

【 0 1 5 3 】

本発明の抗体は、2 0 mg/ml、3 0 mg/ml、4 0 mg/ml、5 0 mg/ml、6 0 mg/ml、7 0 mg/ml、8 0 mg/ml、9 0 mg/ml、又は 1 0 0 mg/ml を含むがこれらに限定されない、非常に高い用量にまで製剤化することができる。好ましくは、本発明の抗体は、約 5 0 mg/ml の液体製剤で製剤化され得る。

【 0 1 5 4 】

30

患者に投与することのできる典型的な用量は、約 2 . 5 mg/ 眼である。このような製剤のために使用され得る典型的な緩衝液の成分としては、例えば、酢酸ナトリウム、 P S 2 0 、及びトレハロース二水和物が挙げられる。

【 0 1 5 5 】

1 つの実施態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体は、1 0 mM のヒスチジン緩衝液、2 4 0 mM のショ糖、0 . 0 2 w/v % のポリソルベート 2 0 (p H 5 . 5) を用いて最終濃度 6 0 mg/ml で製剤化される。

【 0 1 5 6 】

いくつかの実施態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片を含んでいる医薬組成物はさらに、結合剤とコンジュゲートしている又はコンジュゲートしていないのいずれかである治療剤を含んでいてもよい。

40

【 0 1 5 7 】

組合せ投与のための治療処方計画に関して、特定の実施態様では、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片は、治療剤と同時に投与される。別の特定の実施態様では、治療剤は、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片の投与の少なくとも 1 時間から数か月間前又は後に、例えば、抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗原結合断片の投与の少なくとも 1 時間、5 時間、1 2 時間、1 日間、1 週間、1 か月間、又は 3 カ月間前に又は後に投与される。

【 0 1 5 8 】

ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、及び組換え法

50

第六の態様では、本発明は、抗セマフォリン3A抗体をコードしている配列を含む単離されたポリヌクレオチド、ベクター、及び該ポリヌクレオチドを含んでいる宿主細胞、並びに該抗体の產生のための組換え技術を包含する。単離されたポリヌクレオチドは、例えば、完全長モノクローナル抗体、F_{a b}、F_{a b'}、F_(a b')₂、及びF_v断片、ディアボディーズ、鎖状抗体、一本鎖抗体分子、及び抗体断片から形成された多重特異的抗体を含む、任意の所望の形態の抗セマフォリン3A抗体をコードし得る。

【0159】

抗セマフォリン3A抗体又はその断片又はその鎖をコードしている配列を含むポリヌクレオチド(群)を、当技術分野において公知であるような、1つ以上の調節配列又は制御配列に融合させることができ、そして、当技術分野において公知であるような適切な発現ベクター又は宿主細胞に含めることができる。重鎖又は軽鎖の可変ドメインをコードしている各ポリヌクレオチド分子は独立して、ヒト定常ドメインなどの定常ドメインをコードしているポリヌクレオチド配列に融合させることができ、これによりインタクトな抗体の产生が可能となる。あるいは、ポリヌクレオチド又はその一部を互いに融合させてもよく、これにより一本鎖抗体の产生のための鑄型が提供される。

10

【0160】

組換え产生のために、抗体をコードしているポリヌクレオチドを、クローニング用(DNAの増幅)又は発現用の複製ベクターに挿入する。組換え抗体を発現させるのに適した多くのベクターが利用可能である。ベクター成分は一般的には、以下の1つ以上を含むがこれらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー配列、プロモーター、及び転写終結配列。

20

【0161】

抗セマフォリン3A抗体はまた、融合ポリペプチドとして产生されてもよく、ここでは該抗体は、異種ポリペプチド、例えば成熟タンパク質又はポリペプチドのアミノ末端に特定の切断部位を有するシグナル配列又は他のポリペプチドと融合している。選択される異種シグナル配列は、典型的には宿主細胞によって認識及びプロセシング(すなわちシグナルペプチダーゼによって切断)されるものである。抗セマフォリン3A抗体のシグナル配列を認識及びプロセシングしない原核宿主細胞については、該シグナル配列を、原核細胞のシグナル配列に置き換えてよい。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、リボタンパク質、熱安定性エンテロトキシンIIのリーダー配列などであり得る。酵母における分泌のための天然シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼ因子から得られたリーダー配列(サッカロマイセス(Saccharomyces)及びクリベロマイセス(Kluyveromyces)因子リーダー配列を含む)、酸性ホスファターゼ、カンジダ・アルビカンス(C. albicans)グルコアミラーゼ、又は国際公開公報第90/13646号に記載のシグナル配列で置き換えてよい。哺乳動物細胞では、哺乳動物シグナル配列、並びに、ウイルス分泌リーダー配列、例えば単純ヘルペスgDNAシグナル配列を使用してもよい。このような前駆領域についてのDNAは、リーディングフレーム内で、ヒト化抗セマフォリン3A抗体をコードしているDNAに連結されている。

30

【0162】

発現ベクター及びクローニングベクターは、1つ以上の選択された宿主細胞においてベクターが複製することを可能とする核酸配列を含有している。一般的には、クローニングベクターにおけるこの配列は、ベクターが宿主染色体DNAとは独立して複製することを可能とする配列であり、これは複製起点又は自律複製配列を含む。様々な細菌、酵母及びウイルスについてのこのような配列は周知である。プラスミドpBR322に由来する複製起点は大半のグラム陰性細菌に適し、2'-v. プラスミド起点は酵母に適し、様々なウイルス複製起点(サルウイルス(SV)40ポリオーマウイルス、アデノウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、及びウシパピローマウイルス)は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物の発現ベクターには必要とされない(単にSV40起点は、初期プロモーターを含有しているので、それが典型的には使用され得る)。

40

50

【0163】

発現ベクター及びクローニングベクターは、発現の同定を容易にする、選択マーカーをコードする遺伝子を含有していてもよい。典型的な選択マーカー遺伝子は、抗生物質又は他の毒素に対する耐性を付与するタンパク質、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、又はテトラサイクリンをコードし、あるいは、代替的には栄養素要求欠乏を補完し、あるいは、他の代替選択肢では、複合培地中に存在しない特殊な栄養分、例えば、桿菌のためのD-アラニンラセマーゼをコードしている遺伝子を供給する。

【0164】

選択スキームの一例は、宿主細胞の増殖を停止する薬物を利用する。異種遺伝子を用いて成功裡に形質転換されるそうした細胞は、薬剤耐性を付与するタンパク質を產生し、よって、選択処方計画を生き延びる。このような優性選択の例は、ネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシンという薬剤を使用する。哺乳動物細胞のため的一般的な選択マーカーは、ヒト化抗セマフォリン3A抗体をコードしている核酸を取り込む能力のある細胞の同定を可能とする選択マーカー、例えばDHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素)、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII(例えば靈長類のメタロチオネイン遺伝子)、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。DHFR選択遺伝子を用いて形質転換される細胞はまず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトレキサート(Mtx)を含有している培養培地中で全ての形質転換体を培養することによって同定される。野生型DHFRが使用される場合、適切な宿主細胞は、DHFR活性の欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(例えばD G 4 4)である。

10

【0165】

あるいは、抗セマフォリン3A抗体、野生型DHFRタンパク質、及び別の選択マーカー、例えばアミノグリコシド3'-リン酸トランスフェラーゼ(APH)をコードしているDNA配列を用いて形質転換された又は共形質転換された、宿主細胞(特に、内因性DHFRを含有している野生型宿主)は、選択マーカーに対する選択物質、例えばアミノグリコシド系抗生物質、例えばカナマイシン、ネオマイシン、又はG418などを含有している培地中での細胞増殖によって選択され得る。例えば、米国特許第4,965,199号参照。

20

【0166】

組換え产生が、宿主細胞としての酵母細胞において行なわれる場合、酵母プラスミドYRp7に存在するTRP1遺伝子(Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39)を、選択マーカーとして使用することができる。TRP1遺伝子は、トリプトファン中の増殖能を欠失した酵母の突然変異株の選択マーカー、例えばATCC番号44076又はPEP4-1(Jones, 1977, Genetics 85:12)を提供する。よって、酵母宿主細胞ゲノムにおけるtrp1病変の存在は、トリプトファンの非存在下における増殖による、形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2p欠損酵母株、例えばATCC20,622及び38,626は、LEU2遺伝子を有する公知のプラスミドによって補完される。

30

【0167】

さらに、1.6μmの環状プラスミドpKD1に由来するベクターを、クリベロマイセス酵母の形質転換のために使用することができる。あるいは、クリベロマイセス・ラクティスのための、組換え仔ウシキモシンの大規模生産のための発現系が報告された(Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135)。クリベロマイセス工業株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための安定なマルチコピー発現ベクターも開示されている(Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975)。

40

【0168】

発現ベクター及びクローニングベクターは通常、宿主生物によって認識され、かつ抗セマフォリン3A抗体又はそのポリペプチド鎖をコードしている核酸分子に作動可能に連結されている、プロモーターを含有している。原核生物宿主に使用するに適したプロモーターとしては、phoAプロモーター、-ラクタマーゼ、及びラクトースプロモーター系

50

、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(t r p)プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば t a c プロモーターが挙げられる。他の公知の細菌プロモーターも適している。細菌系において使用するためのプロモーターは、ヒト化抗セマフォリン 3 A 抗体をコードしている D N A に作動可能に連結された、シャインダルガーノ(S . D .)配列も含有しているだろう。

【 0 1 6 9 】

多くの真核生物プロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物遺伝子が、転写が開始される部位から約 25 から 30 塩基上流に位置する A T リッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始部位から 70 ~ 80 塩基上流に見られる別の配列は、 C N C A A T 領域であり、ここでの N は任意のヌクレオチドであり得る。大半の真核生物遺伝子の 3' 末端には、 A A T A A A 配列があり、これはコード配列の 3' 末端にポリ A テイルを付加するためのシグナルであり得る。これらの全ての配列は、真核生物発現ベクターに適切に挿入される。

【 0 1 7 0 】

酵母宿主で使用するのに適したプロモーター配列の例としては、 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、 3 - ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

【 0 1 7 1 】

誘導性プロモーターは、増殖条件によって制御される転写というさらなる利点を有する。これらとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ 2 、イソチトクロム C 、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連した誘導酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトースの利用に関する酵素についての酵母プロモーター領域が挙げられる。酵母における発現に使用するのに適したベクター及びプロモーターはさらに、欧州特許第 73,657 号に記載されている。酵母エンハンサーはまた、酵母プロモーターと共に有利には使用される。

【 0 1 7 2 】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの抗セマフォリン 3 A 抗体の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えはアデノウイルス 2)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、 B 型肝炎ウイルス、及びサルウイルス 40 (S V 40)などのウイルスのゲノムから、異種哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター若しくは免疫グロブリンプロモーターから、又は熱ショックプロモーターから得られたプロモーターによって制御され、ただし、このようなプロモーターは、宿主細胞系と適合性である。

【 0 1 7 3 】

S V 40 ウィルスの初期及び後期プロモーターは簡便には、 S V 40 ウィルス複製起点も含有している S V 40 制限酵素断片として得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは簡便には、 H i n d I I I E 制限酵素断片として得られる。哺乳動物宿主においてベクターとしてのウシパピローマウイルスを使用して D N A を発現するための系は、米国特許第 4,419,446 号に開示されている。この系の改変が、米国特許第 4,601,978 号に記載されている。単純ヘルペスウィルスに由来するチミジンキナーゼプロモーターの制御下にあるマウス細胞におけるヒト p - インターフェロン c D N A の発現を開示した、 Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601 も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの末端反復配列もプロモーターとして使用し得る。

【 0 1 7 4 】

組換え発現ベクターにおいて使用され得る別の有用な配列は、エンハンサー配列であり、これは、高等真核細胞による抗セマフォリン 3 A 抗体をコードしている D N A の転写を増加させるために使用される。哺乳動物遺伝子(例えはグロビン、エラスターーゼ、アルブ

10

20

30

40

50

ミン、 - フェトプロテイン、及びインシュリン)に由来する多くのエンハンサー配列が現在公知である。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルスに由来するエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後期側上 (bp 100 ~ 270) にある SV40 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上にあるポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンシング配列の説明については、Yaniv, 1982, Nature 297:17-18も参照されたい。エンハンサーは、ベクターの抗セマフォリン3A抗体をコードしている配列の5'位又は3'位にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターの5'部位に位置する。

【0175】

10

真核宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物に由来する有核細胞)に使用される発現ベクターは、転写終結のために及びmRNAの安定化のために必要とされる配列も含有し得る。このような配列は一般的に、真核細胞又はウイルスのDNA又はcDNAの5'非翻訳領域及び時には3'非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、抗セマフォリン3A抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分において、ポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有している。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開公報第94/11026号及びその中に開示されている発現ベクターを参照されたい。いくつかの実施態様では、抗セマフォリン3A抗体は、CHEF系を使用して発現され得る(例えば、米国特許第5,888,809号参照;その開示は本明細書に参照により組み入れられる)。

【0176】

20

本明細書のベクター内のDNAをクローニング又は発現するのに適した宿主細胞は、上記の原核細胞、酵母、又は高等真核細胞である。この目的に適した原核細胞としては、真正細菌、例えばグラム陰性生物及びグラム陽性生物、例えば、腸内細菌科、例えば大腸菌(*E. coli*)、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えばネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、セラチア属、例えば靈菌(*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えば枯草菌(*B. subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日に公開されたドイツ特許第266,710号に開示のバチルス・リケニフォルミス41)、シュードモナス属、例えば緑膿菌(*P. aeruginosa*)、及びストレプトマイセス属が挙げられる。1つの好ましい*E. coli*クローニング宿主は*E. coli* 294 (ATCC 31,446)であるが、*E. coli* B、*E. coli* X 1776 (ATCC 31,537)、及び*E. coli* W 3110 (ATCC 27,325)などの他の株も適している。これらの例は、制限するものではなくむしろ例示的なものである。

【0177】

30

原核生物の他に、真核微生物、例えば糸状菌又は酵母も、抗セマフォリン3A抗体をコードしているベクターに適したクローニング用又は発現用の宿主である。サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)又は一般的なパン酵母が、低級真核細胞宿主微生物の間で最も一般的に使用されている。しかしながら、多くの他の属、種、及び株が、一般的に入手可能であり、かつ本明細書において有用であり、例えば分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) ;クリベロマイセス宿主、例えば、*K. lactis* (*K. lactis*)、*K. fragilis* (ATCC 12,424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16,045)、*K. wickeramii* (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、*K. drosophilae* (ATCC 36,906)、*K. thermotolerans*、及び*K. marxianus* ;ヤロウイア属(欧州特許第402,226号) ;ピキア・パストリス(欧州特許第183,070号) ;カンジダ属 ;トリコデルマ・リージア(*Trichoderma reesiae*) (欧州特許第244,234号) ;アカパンカビ(*Neurospora crassa*) ;シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*)

40

50

ali) ; 及び糸状菌、例えばニューロスボラ (*Neurospora*) 、ペニシリウム属 (*Penicillium*) 、トリポクラジウム属 (*Tolypocladium*) 及びアスペルギルス属の宿主、例えば偽巣菌コウジ菌 (*A. nidulans*) 及びクロコウジカビ (*A. niger*) である。

【0178】

グリコシル化抗セマフォリン3A抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から得られる。無脊椎動物細胞の例としては、例えば、数多くのバキュロウイルス株及び変異体、並びに、ヨウトガ (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) (蚊)、ヒトスジシカマ (*Aedes albopictus*) (蚊)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) (ショウジョウバエ)、及びボンビクス・モリ (*Bombyx mori*) (カイコ)などの宿主に由来する対応する許容的な昆虫宿主細胞を含む、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。トランスフェクション用の多種多様なウイルス株、例えば、オートグラファ・カルフォルニカ (*Autographa californica*) の核多角体病ウイルス (NPV) のL-1変異体、及びボンビクス・モリのNPVのBm-5株は公共的に入手可能であり、このようなウイルスは、特にヨウトガ細胞のトランスフェクションに使用され得る。

10

【0179】

綿、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物細胞培養液も宿主として利用され得る。

【0180】

本発明の抗セマフォリン3A抗体はまた、ウイルスベクターに取り込まれてもよく、すなわち、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片をコードしているポリヌクレオチドは、ウイルスベクターに導入され、その後、ウイルスを用いた感染後に患者の体内において発現される。

20

【0181】

別の態様では、抗セマフォリン3A抗体の発現は、脊椎動物細胞において行なわれる。培養液(組織培養液)中での脊椎動物細胞の増殖は、通例の手順となっており、技術は広く利用可能である。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されるサル腎臓CV1株 (COS-7、ATCC CRL 1651)、ヒト胚性腎臓株 (293細胞、又は懸濁培養液中の増殖のためにサブクローニングされた293細胞)、(Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)、チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHF R1 (CHO、Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; 例えばDG44)、マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251)、マウス腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2)、イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)、バッファローラット肝細胞 (BRL3A、ATCC CRL 1442)、ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)、ヒト肝細胞 (HePG2、HB8065)、マウス乳腺腫瘍 (MMT060562、ATCC CCL 51)、TR1細胞 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68)、MRC5細胞、FS4細胞、及びヒト肝細胞腫株 (HePG2)である。

30

【0182】

宿主細胞を、抗セマフォリン3A抗体の產生のために上記の発現ベクター又はクローニングベクターを用いて形質転換し、プロモーターを誘導するのに、形質転換体を選択するのに、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するのに適切なように改変されている、慣用的な栄養培地中で培養する。

40

【0183】

本明細書に記載の抗セマフォリン3A抗体を産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養され得る。市販の培地、例えばHam's F10 (シグマアルドリッヂ社、セントルイス、ミズーリ州)、最小必須培地 ((MEM)、シグマアルドリッヂ社) RPMI-1640 (シグマアルドリッヂ社)、及びダルベッコ改変イーグル培地 ((DM

50

EM)、シグマアルドリッヂ社)が、宿主細胞を培養するのに適している。さらに、Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255、米国特許第4,767,704号、米国特許第4,657,866号、米国特許第4,927,762号、米国特許第4,560,655号、米国特許第5,122,469号、国際公開公報第90/103430号、及び国際公開公報第87/00195号の1つ以上に記載の培地のいずれかを、宿主細胞用の培養培地として使用し得る。これらの中のいずれかの培地に、必要に応じて、ホルモン及び/又は他の増殖因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は上皮増殖因子)、塩(例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩)、緩衝液(例えばHEPES)、又クレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えばゲンタマイシン)、微量元素(通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される)、及びグルコース又は等価なエネルギー源が補充されていてもよい。他の補助物質も、当業者には公知であろうよう10な、適切な濃度で含められていてもよい。培養条件、例えば温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞と共に以前に使用されたものであり、当業者には明らかであろう。

【0184】

組換え技術を使用する場合、抗体は、細胞内の周辺質空間で產生されるか、又は直接培地中に分泌されてもよい。抗体が細胞内で產生される場合、該細胞を第一工程として破壊することによりタンパク質を放出し得る。粒子状の破片、すなわち宿主細胞又は溶解した断片のいずれかは、例えば遠心分離又は限外ろ過によって除去され得る。Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167は、E.coliの周辺質空間に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。簡潔に言えば、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)の存在下で約30分間かけて解凍する。細胞片は、遠心分離によって除去され得る。抗体が培地に分泌される場合、このような発現系の上清は一般的にまず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばアミコン又はミリポアペリコン超ろ過ユニットを使用して濃縮される。プロテアーゼ阻害剤、例えばPMSFなどを、前記のいずれかの工程に含めて、タンパク質の分解を阻害し得、抗生物質を含めることにより、外来の混入物質の増殖を防ぎ得る。様々な方法を使用して、宿主細胞から抗体を単離することができる。

【0185】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを使用して精製され得、アフィニティクロマトグラフィーが典型的な精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適切性は、抗体に存在する、任意の免疫グロブリンのFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト1、2、又は4の重鎖に基づいている、抗体を精製することができる(例えば、Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13参照)。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト

3に推奨される(例えばGuss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575参照)。アフィニティリガンドが付着するマトリックスは、殆どの場合、アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。力学的に安定なマトリックス、例えば制御された細孔ガラス又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンは、アガロースで達成され得るよりも、速い流速及び短い処理時間を可能とする。抗体がCH₃ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)レジン(J.T.Baker社、フィリップスバーグ、NJ州)が、精製に有用である。タンパク質の精製のための他の技術、例えばイオン交換カラムでの分画、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカクロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂上のセファロース(商標)クロマトグラフィー(例えばポリアスパラギン酸カラム)、等電点電気泳動、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈降法も、回収しようとする抗体に応じて利用可能である。

【0186】

あらゆる事前の精製工程(群)の後に、関心対象の抗体と混入物質とを含んでいる混合物を、典型的には低塩濃度(例えば約0~0.25Mの塩)で実施される、約2.5~4

10

20

30

40

50

.5のpHの溶出緩衝液を使用した、低いpHの疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけ得る。

【0187】

また、本明細書に定義されているような、低い、中程度の、及び高いストリンジエンシーコード下で、セマフォリン3A抗体又は抗体断片をコードする単離されたポリヌクレオチド配列（群）によって示されるヌクレオチド配列の全部又は一部（例えば可変領域をコードしている部分）にハイブリダイズする核酸も含まれる。ハイブリダイズしている核酸のハイブリダイズしている部分は典型的には、少なくとも15（例えば20、25、30、又は50）ヌクレオチド長である。ハイブリダイズしている核酸のハイブリダイズしている部分は、抗セマフォリン3Aポリペプチド（例えば重鎖又は軽鎖の可変領域）をコードしている核酸の一部若しくは全部の配列又はその相補体に対して、少なくとも80%、例えば少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%同一である。本明細書に記載の種類のハイブリダイズする核酸は、例えば、クローニング用のプローブ、プライマー、例えばPCRプライマー、又は診断用プローブとして使用され得る。10

【0188】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、若しくは配列番号19に示されるような重鎖、又は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、若しくは配列番号10に示されるような重鎖可変領域をコードしている配列；及び配列番号15、配列番号18、若しくは配列番号20に示されるような軽鎖、又は配列番号11、配列番号12、若しくは配列番号13に示されるような軽鎖可変領域をコードしている配列を含んでいる、単離されたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド群に関する。20

【0189】

前記の抗セマフォリン3A抗体及び抗体断片において、CDRをコードしている核酸配列は未変化のままであるが（それらがコードするアミノ酸に関して未変化、コドン縮重に因るDNA配列の等価体も可能である）、周辺領域、例えばFR領域は工学操作されていてもよい。

【0190】

製品

別の態様では、上記の障害の処置に有用な材料を含有している製品が含まれる。製品は、容器とラベルを含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリング、及び試験管が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、容態を処置するのに有効な組成物を保持し、無菌アクセスポートを有し得る。例えば、容器は、輸液バッグ、又は皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであり得る。該組成物中の活性薬剤は、抗セマフォリン3A抗体又はその抗原結合断片である。容器上の又は容器に付いたラベルは、該組成物が選択された容態の処置に使用されること示す。製品はさらに、薬学的に許容される緩衝液、例えばリン酸緩衝食塩水、リンガーリー液、及びデキストロース溶液を含んでいる第二の容器を含み得る。それはさらに、業者及びユーザーの見地から望ましい他の材料、例えば他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリング、及び使用説明書を含む添付文書も含み得る。30

【0191】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明され、この実施例は本発明の範囲を制限するためのものではない。

【0192】

実施例

実施例1：糖尿病性黄斑浮腫及び増殖性糖尿病性網膜症の患者の硝子体におけるセマフォリン3Aのアップレギュレーション

糖尿病性網膜症の病歴を有するヒトドナーに由来する試料の網膜におけるセマフォリン3Aの発現を、免疫組織化学的検査によって調べた。免疫染色プロトコールは、以下の通りであった：

1. スライドを解凍し、試料を室温（RT）で30分間風乾させる；

10

20

30

40

50

2. パップペンで囲むように線を引き、乾燥させる；
3. 1% SDS 中、室温で 5 分間かけて抗原を賦活する；
4. PBS でスライドを 5 分間かけて 3 回洗浄する；
5. 1% ウシ血清アルブミン / 0.3% トリトン × 100 / PBS 溶液（遮断用溶液）中で室温で 30 分間かけて切片を遮断する；
6. ウサギ抗セマフォリン 3a（アブカム社、ab23393）の第一抗体を遮断用溶液で 1:200 に希釈する。スライド上の切片を室温で一晩インキュベートする；
7. 5 分間かけて PBS でスライドを 3 回灌ぐ；
8. DAPI / 0.3% トリトン × 100 / PBS 溶液中 1:400 の希釈率のロバ抗ウサギ Allexafluor 546（インビトロジェン社、A10040）と共に 2 回目の抗体のインキュベーションを行なう。スライド上の切片を室温で 3 時間インキュベートする；
9. 5 分間、PBS で 3~5 回スライドを灌ぐ；
10. アクアマウント（Aquamount）封入剤を用いて切片にカバーガラスを被せ、風乾させる；
11. 40 倍の拡大率で切片を画像撮影し、強度を等級付けする。

【0193】

それぞれのヒトドナーあたり 3 つの切片のセットを、セマフォリン 3A について免疫染色した。これらの各領域におけるセマフォリン 3A の標識は、この特殊な仕事のために事前に訓練された観察者らによって、5 段階等級スキーム（0 = 全く検出されず、1 = 低い強度、僅かなスポット、2 = 中程度の強度、いくつかのスポット、3 = 明るい強度、幅広い染色、及び 4 = 非常に明るい強度、豊富な検出）を使用して独立的に評価された。観察者は、眼ドナーの健康状態を知らなかった。網膜内のセマフォリン 3A は、網膜血管の血管系壁に結合していた。網膜血管系及び網膜実質におけるセマフォリン 3A の発現は、眼病態を有さない糖尿病と比較して、糖尿病性黄斑浮腫を有する患者において増加していた（図 1）。

【0194】

実施例 2：細胞透過性アッセイにおける有効性

経細胞透過性は、ヒト網膜微小血管内皮細胞（HRMEC）の単層における FITC - デキストランの透過によって測定された。

【0195】

簡潔に言えば、インビトロでの内皮透過性は、ミリポア社のキット（「インビトロでの血管透過性アッセイ」カタログ番号 ECM642）及びヒト網膜微小血管内皮細胞（HRMEC）を使用して測定された。アッセイキットは、セルカルチャーワークスを有する 96 ウェルのレシーバープレートを提供する。インサートは、1 μm の細孔を含有し、I 型ラット尾コラーゲンでコーティングされている。HRMEC を、25000 個の細胞 / ウェルの密度でインサート上に播種し、細胞を 3 日間かけて増殖させて単層とした。細胞を、組換え VEGF - A、セマフォリン 3A 並びに本発明に記載の抗体で一晩かけて処理した。キット内に提供される高分子量 FITC - デキストラン溶液をインサートに加え、蛍光分子が内皮細胞の単層を通過できるようにした。インビトロでの透過性は、485 nm / 535 nm（励起及び吸収）におけるレシーバープレートウェルの溶液の蛍光を測定することによって決定された。

【0196】

本発明者らは、本発明に記載の例示的な抗体：クローン I を試験した。該抗体は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0197】

本発明に記載の抗セマフォリン 3A 抗体は、セマフォリン 3A によって誘発される透過性を完全に阻害したが、VEGF - A によって誘発された透過性は阻害しなかった（図 2）。重要なことには、セマフォリン 3A の透過性作用は、VEGF - A とは独立している。TNF に対して指向される対照抗体の使用は、該効果が、本発明の抗体による、セマフォリン 3A の特異的な標的化に起因することを確認する。

10

20

30

40

50

【0198】

実施例3：細胞アッセイにおける細胞骨格崩壊の測定

本発明に記載の例示的な抗体（クローンI）の細胞内活性は、XCELLigenceシステム（ACEAバイオサイエンシーズ社によって市販されているような、リアルタイム細胞分析機器）を使用して、ヒト網膜微小血管内皮細胞（HRMEC）における細胞骨格の崩壊の測定によって評価された。該システムは、細胞性インピーダンスを介して、細胞の付着及びコンフルエンス状態を測定する。HRMECは、クラス3のセマフォリンホロ受容体の成分である、ニューロフィリン-1（Nr p1）及びプレキシンを内因的に発現する。この受容体複合体への結合によって、セマフォリンは、内皮におけるF-アクチン線維の崩壊を誘発する。この機能的アッセイにおいて、ヒト網膜微小血管内皮細胞のコンフルエントな層への組換えセマフォリン3Aタンパク質の添加は、細胞性インピーダンスの減少として測定される、細胞骨格の崩壊及びそれに続く細胞の縮みに起因する細胞性インピーダンスを低下させる。

【0199】

簡潔に言えば、E-Plates Viewを、接着因子でコーティングした。細胞を、20000個の細胞/ウェルの密度で播種し、その後、XCELLigence機器内で、その通常の増殖条件下で一晩かけて増殖させて単層とした。

【0200】

本発明の組合せに記載の抗セマフォリン3A抗体を含む及び含まないセマフォリン3A（又は他のクラス3のセマフォリン）を、3mMのCaCl₂の存在下で加えた。細胞指数は、物質の添加前の時点に対して正規化された。計算は、刺激から5時間後に行なわれた。

【0201】

セマフォリン3Aによって誘発される細胞骨格の崩壊は、本発明に記載の抗セマフォリン3A抗体によって完全に防ぐことができる。他の試験されたセマフォリン（B、C、E及びF）によって誘発された細胞骨格の崩壊は、本発明に記載の抗セマフォリン3Aによって防ぐことができず、このことは、セマフォリン3Aに対する本発明の抗体のその特異性を確認する（図3）。

【0202】

実施例4：親和性及び細胞の効力

A) 親和性

この実験のためのランニング緩衝液及び全ての希釈液（特記されている場合を除く）は、0.01%Tween20を含むPBS-T-EDTA[100μlの100%Tween20を2LのPBS-T-EDTAに加えて、0.01%の最終濃度のTween20を作製した]で作製された。GLMセンサーチップを、製造業者の推奨に従って、正規化し、前もって条件を整えた。センサーチップを、30μl/分の流速で水平方向のEDC/s-NHS（スルホN-ヒドロキシスクシニミド）の等価混合物を用いて300秒間かけて活性化し、30μl/分の流速で水平方向のヒトFab結合物質（10mMの酢酸塩（pH5.0）中10μg/ml）を用いて300秒間かけて固定し、その結果、表面上に約6739~7414RUのヒトFab結合物質が得られた。センサーチップを、30μl/分の流速で水平方向の1Mエタノールアミン塩酸塩を用いて300秒間かけて不活化した。センサーチップを、水平方向に1回、垂直方向に1回、100μl/分の流速で18秒間の10mMグリシン（pH2.1）を用いて安定化させた。

【0203】

本発明者らは、本発明に記載の例示的な抗体（クローンI）を試験した。該抗体（0.5μg/ml）は、25μl/分の流速でヒトFab結合物質表面上に垂直に300秒間かけて捕捉され、その結果、約180RUの捕捉レベルが得られた。基線は、40μl/分の流速で水平にPBS-T-EDTAを60秒間かけて注入することによって安定化させた。分析物を、40μl/分の流速で捕捉された抗体上に垂直に600秒間かけて注入し、720秒間かけて解離させた。分析物の濃度は、0nM、0.625nM、1.25nM、2.

5 nM、5 nM、及び10 nMであった。表面は、水平に1回、垂直に1回、100 µl/分の流速で10 mMのグリシン(pH 2.1)を18秒間かけて注入することによって再生された。PBS-T-EDTAを、25 µl/分の流速で垂直に1回60秒間かけて注入した。

【0204】

スポット間(センサー表面との相互作用)及びプランク(0.01% Tween 20を含むPBS-T-EDTA又は0nMの分析物)を生データから差し引いた。その後、センサーグラムを全体的に、1:1のラングミュア結合に当てはめ、結合速度(k_a)、解離速度(k_d)、及び親和性(K_D)の数値がもたらされた。

【0205】

B) 細胞の効力

細胞骨格崩壊アッセイにおける機能的効力の決定のために、セマフォリン3A濃度反応曲線を、IC50シフト実験のような、漸増濃度の抗体と組み合わせた。ガッダムのシルトプロットを実施して、pA2値を計算した(セマフォリン3Aの濃度反応曲線を2倍だけシフトさせるに必要とされる抗体の濃度の負の対数)。効力(pM)は、=効力(10; -x)としてpA2値から計算された。

【0206】

結果は、以下の表6に要約されている。

【0207】

【表4】

表6:

分子	親和性(K_d) [pM]					細胞骨格崩壊アッセイにおける機能の拮抗作用(A_2) [pM] ヒト
	ヒト	カニクイ ザル	マウス	ラット	ウサギ	
本発明の抗体 (クローンI)	29	28	27	27	42	69

【0208】

実施例5: 本発明の抗体の免疫原性の評価

本発明者らは、本発明に記載の例示的抗体、すなわちクローンIの予測される免疫原性を評価した。該抗体は、それぞれ配列番号14及び配列番号15のアミノ酸配列を含んでいる重鎖及び軽鎖を含む。

【0209】

この目的のために、本発明者らは、T細胞エピトープを予測するためにコンピューター計算ツールを使用した(EpiVax社によって開発されたEpiMatrix)。

【0210】

多くのヒト抗体単離株の配列をスクリーニングすることによって、EpiVaxは、制御能を有すると考えられる、いくつかの高度に保存されたHLAリガンドを同定した。実験のエビデンスは、これらの多くのペプチドが事実、大半の被験者において活発に免疫寛容原性であることを示唆する。これらの高度に保存され、制御性で、雑多なT細胞エピトープは現在、制御性T細胞エピトープとして知られている(De Groot et al. Blood. 2008 Oct 15;112(8):3303-11)。ヒト化抗体に含有されているネオエピトープの免疫原性は、有意な数の制御性T細胞エピトープの存在下で効果的に制御され得る。

【0211】

10

20

30

40

50

抗体免疫原性分析の目的のために、Epivaxは、制御性T細胞エピトープにより調整されるEpimatrixスコア、及び対応する治療薬に対する抗体応答の予測を展開した。制御性T細胞エピトープにより調整されるEpimatrixスコアを計算するために、制御性T細胞エピトープのスコアは、Epimatrixタンパク質スコアから推論される。制御性T細胞エピトープにより調整されるスコアは、23個の市販の抗体のセットについて観察された臨床免疫応答と良好に相関することが示された(De Groot et al. Clin Immunol. 2009 May;131(2):189-201)。

【0212】

Epimatrix尺度に関する結果は、以下の表7に要約されている。

【0213】

【表5】

10

表7:

分子	重鎖(ヒト%)		Epivax (VH)	Epivax (Vκ)	軽鎖(ヒト%)	
	FR	V遺伝子			FR	V遺伝子
本発明の抗体 (クローンI)	97	91	-27.27	-21.79	98	88

20

【0214】

本発明の抗体の配列は、Epimatrix尺度の一番低いスコアを取り、このことは、本発明の抗体が、免疫原性に関して非常に少ない能力を有することを示す。該Epimatrix尺度は当業者には周知であり、Mufarrege et al. Clin Immunol. 2017 Mar;176:31-41の刊行物の図2にとりわけ見出され得る。

【0215】

実施例6：インビボにおける細胞密度及び無血管領域に対する有効性(酸素誘発網膜症OIR(oxygen-induced retinopathy)モデル)

虚血性無血管領域の血行再建に対する、本発明に記載の例示的抗体(クローンI)の効果は、酸素誘発網膜症(OIR)マウスモデルにおいて調べられた。C57BL/6Jマウスの同腹仔を、生後7日目から生後12日目まで75%酸素の雰囲気に曝した。これにより、中心網膜において血管が退行し、無血管領域が形成される。正常酸素状態に戻した後、この領域は虚血性となる。仔は、生後12日目にイソフルランを用いた麻酔下でそれぞれの眼に0.5μlの溶液中10μgの抗体の1回の硝子体内注射を受ける。生後17日目に、動物を殺し、眼の核を除去した。眼をホルマリンで固定し、網膜フラットマウントが調製され、ここでは網膜血管がイソレクチンB4で染色される。端細胞の数(新規血管の形成を開始する特殊な内皮細胞)は、全網膜に沿って無血管前面において計数される(網膜の血管新生化された末梢領域と無血管中心領域との間の境界)。

30

【0216】

端細胞は、糸状仮足拡張を示すその特殊な形態によって同定された。分析のために、端細胞の数を、無血管前面の長さに対して正規化する。無血管領域のサイズは、共焦点顕微鏡及び画像分析ソフトウェアを使用して決定される。

40

【0217】

本発明の抗セマフォリン3A抗体は、マウスOIRモデルにおいて端細胞の密度を増加させる(図4)。さらに、それは、無血管領域の減少を示す。端細胞密度と、無血管領域のサイズとの間には負の相関があり、このことは、2つのパラメーターが機序的に依存していることを示す。TNFに対して指向される対照抗体の使用は、効果が、本発明の抗体によるセマフォリン3Aの特異的な標的化に起因することを確認する。

【0218】

要するに、本発明の抗セマフォリン3A抗体は、酸素誘発網膜症の動物モデルにおいて

50

、虚血性無血管領域のサイズを減少させ、このことは、糖尿病性黄斑虚血の処置における有益な効果を示す。

【0219】

実施例7：ウサギの眼における抗セマフォリン3A抗体とアバスチンの $t_{1/2}$ の比較。

結果は、以下の表8に要約されている。

【0220】

【表6】

表8：

計算された $t_{1/2}$ (日数)			
	本発明の抗体(クローンI)		アバスチン
	0~14日間	全て	
硝子体	5.1	3.9	4.4
網膜	6.1	4.1	4.8
房水	4.7	3.3	4.5

【0221】

計算された半減期は、硝子体、網膜、及び房水においてそれぞれ3.9日間、4.1日間、及び3.3日間であった。これらの半減期は、臨床使用された組換えヒト化モノクローナルIgG1抗体のアバスチン（抗VEGF抗体、ベバシズマブ、Bakri et al., Ophthalmology, 2007）について文献に報告されているものと類似し、これはまた、本発明者らによって実験的に確認された。これらの結果は、予想された通りであった。なぜなら、完全長IgGの硝子体内クリアランスは主にその分子サイズに依存し、この分子サイズは、本発明の抗体及びアバスチンにおいて類似している。それ故、ヒトPK（本発明の抗体及びアバスチンの眼における半減期を含む）は、類似していると予想される。報告されたヒトの眼におけるアバスチンの半減期は、9.73 ± 1.48日間である（Hutton-Smith, 2016）。

【0222】

実施例8：本発明の抗体とカイオム抗体との間の結合親和性の比較

比較目的のために、本発明者らは、以下の特色を有する、国際公開公報第2014123186号（カイオム・バイオサイエンス社）に開示されているセマフォリン3Aに対して指向されるヒト化抗体を開発した：

- 重鎖は、国際公開公報第2014123186号の配列番号11に示されている通りであり、

- 軽鎖は、国際公開公報第2014123186号の配列番号12に示されている通りである。

【0223】

本発明者らは、この抗体の2つの形態を開発した：

- 以下において「カイオム抗体A」と称される、IgG1KOFc上にフォーマット化されたもの、及び

- 以下において「カイオム抗体B」と称される、IgG1KO-FcRnヌル上にフォーマット化されたもの。

【0224】

高い表面密度の抗ヒトFab抗体（GEヘルスケア社）を、バイオラッド社の製造業者のマニュアルに従って、直接的なアミンカップリングを介して、GLMチップ（バイオラッド社）上の6つの水平チャンネル上に固定した。

【0225】

本発明の抗体（クローンI）及びカイオム抗体は、動的結合アッセイのために、抗ヒトFab抗体の表面上の6個中5個の垂直チャネル上に、最小の表面密度で捕捉された。ヒトセマフォリン3Aは、PBS-T-EDTA緩衝液（バイオラッド社）中で100、5

10

20

30

40

50

0、25、12.5、10、6.25、5、2.5、1.25、0.625、及び0nMの濃度で調製された。PBS-T-EDTA緩衝液の注入を、動的データ分析のための二重参照として使用した。ヒトセマフォリン3A溶液及びPBS-T-EDTA緩衝液のそれを、6つの水平チャネル上に40μL/分の流速で同時に10分間注入し、その後、2時間の解離相が続いた。表面は、100μl/分の流速の10mMのグリシン塩酸塩(pH 2.1)(GEヘルスケア社)の18秒間の注入、続いて、25μL/分の流速での60秒間のPBS-T-EDTAの注入によって再生された。結合センサーグラムを1:1のラングミュアモデルに当てはめて、結合速度、解離速度、及び親和性を計算した。

【0226】

ヒトセマフォリン3Aに結合している、本発明の抗体及びカイオム抗体の動態及び親和性のデータは、以下の表9に列挙されている。

【0227】

【表7】

表9:

試料名	ヒトセマフォリン3Aに対するK _D
カイオム抗体A	56.4 nM
カイオム抗体B	55.9 nM
本発明の抗体(クローンI)	32.0 pM

10

20

【0228】

結論

結果は、本発明の抗体が、国際公開公報第2014123186号(カイオム・バイオサイエンス社)に開示されている先行技術の抗体よりも、ヒトセマフォリン3Aに対する優れた結合親和性を有することが判明したことを示す。

【0229】

実施例9:本発明の抗体とサムスン社のscFvとの間の結合親和性の比較

国際公開公報第2017074013号(サムスン社)に開示されているようなscFv断片が比較されている。

【0230】

比較目的のために、本発明者らは、以下の表10に開示されている特色を有する、3つの開示されているscFv断片(「サムスン社のscFv」)を開発した。

30

【0231】

【表8】

表10:

抗体名	配列	国際公開公報 第2017074013号に 示されているような配列番号
サムスン社のscFv 1	重鎖	19
	軽鎖	20
サムスン社のscFv 2	重鎖	21
	軽鎖	22
サムスン社のscFv 3	重鎖	23
	軽鎖	24

40

【0232】

高い表面密度の抗HIS抗体(GEヘルスケア社)が、バイオラッド社の製造業者のマニュアルに従って、直接的なアミンカップリングを介して、GLMチップ(バイオラッド社)上の6つの水平チャネル上に固定された。サムスン社のscFv抗体が、動的結合ア

50

ツセイのために、抗 H i s 抗体表面上の 6 個中 5 個の垂直チャネル上に最小の表面密度で捕捉された。ヒトセマフォリン 3 A は、P B S - T - E D T A 緩衝液（バイオラッド社）中で 1 0 0 、 5 0 、 2 5 、 1 2 . 5 、 1 0 、 6 . 2 5 、 5 、 2 . 5 、 1 . 2 5 、 0 . 6 2 5 、及び 0 nM の濃度で調製された。P B S - T - E D T A 緩衝液の注入を、動的データ分析のための二重参照として使用した。ヒトセマフォリン 3 A 溶液及び P B S - T - E D T A 緩衝液のそれを、6 つの水平チャネル上に 4 0 μ L/分の流速で同時に 1 0 分間注入し、その後、1 時間の解離相が続いた。表面は、1 0 0 μ L/分の流速の 1 0 mM のグリシン塩酸塩（pH 2 . 1 ）（G E ヘルスケア社）の 1 8 秒間の注入、続いて、2 5 μ L/分の流速での 6 0 秒間の P B S - T - E D T A の注入によって再生された。結合センサーグラムを 1 : 1 のラングミュアモデルに当てはめて、結合速度、解離速度、及び親和性を計算した。

【 0 2 3 3 】

ヒトセマフォリン 3 A （クローン I ）に対する本発明の抗体の結合は、類似した方法で実施されたが、ヤギ抗ヒト I g G （インビトロジェン社）を使用して、本発明の抗体を捕捉した。カニクイザル、マウス、ラット、又はウサギのセマフォリン 3 A に対する本発明の抗体及びサムスン社の scFv の結合も、同じ方法を使用して行なわれた。

【 0 2 3 4 】

本発明の抗体及びサムスン社の scFv の動態及び親和性のデータは、以下の表 1 1 に列挙されている。

【 0 2 3 5 】

【表 9】

表11:

抗体名	ヒトのセマフォリン 3 A に対する K_D (pM)	カニクイザルのセマフォリン 3 A に対する K_D (pM)	マウスのセマフォリン 3 A に対する K_D (pM)	ラットのセマフォリン 3 A に対する K_D (pM)	ウサギのセマフォリン 3 A に対する K_D (pM)
サムスン社の scFv 1	359	89.0	105	< 20	112
サムスン社の scFv 2	359	118	117	< 20	122
サムスン社の scFv 3	296	68.0	88.8	< 20	59.5
本発明の抗体（クローン I ）	34.7	35.0	35.0	23.5	40.1

【 0 2 3 6 】

結論

本発明の抗体は、国際公開公報第 2 0 1 7 0 7 4 0 1 3 号に開示されているような 3 つのサムスン社の scFv よりも、ヒト、カニクイザル、マウス、又はウサギのセマフォリン 3 A に対してより高い結合親和性を有する。

【 0 2 3 7 】

実施例 1 0 : 本発明に記載の 2 つの抗体の親和性の比較

本発明者らは、配列番号 1 ~ 6 に示されるような C D R を有する 2 つの抗体を開発した。2 つの抗体は、F c 領域が以下の点において異なる：

- ・一方の抗体は、L 2 3 4 A と L 2 3 5 A の組合せを含む（抗体 A ）、そして
- ・他方の抗体は、突然変異 H 4 3 5 A を含む（抗体 B ）

（前記の残基は、K a b a t の E U インデックスに従って番号付けされている）。

【 0 2 3 8 】

配列番号 1 ~ 6 に示されるような C D R を有するヒトセマフォリン 3 A に対する、両方

10

20

30

40

50

の抗体の結合親和性において統計学的な差は全く示されなかった。それ故、ヒトセマフォリン3Aに対する親和性は、本発明に記載のセマフォリン3Aに対して指向される抗体において維持されている。

【0239】

実施例11：セマフォリン3Aに対して指向される市販の抗体の効力

比較のために、本発明者らは、セマフォリン3Aに標的化する市販の抗体の細胞活性を試験した。該抗体は、参考文献「Anti-Human SEMA3A Therapeutic Antibody, Humanized（カタログ番号：T A B - 5 5 6 C L）」の下でクリエイティブ・バイオラボ社によって市販されている。前記の市販の抗体は、以下において「クリエイティブ・バイオラボ社の抗体」と称されるだろう。

10

【0240】

クリエイティブ・バイオラボ社の抗体の細胞活性は、実施例3に開示されているのと同じプロトコールを用いた、ヒト網膜微小血管内皮細胞（H R M E C）における細胞骨格崩壊の測定によって評価された。効力の計算及び決定は、刺激から5時間後に行なわれた。

【0241】

これらの条件下で、クリエイティブ・バイオラボ社の抗体は、セマフォリン3Aによって誘発された細胞骨格崩壊に対して全く活性を示さなかった。セマフォリン3Aによって誘発された細胞骨格崩壊は実際に、クリエイティブ・バイオラボ社の抗体によって防ぐことはできなかった。

【0242】

それ故、クリエイティブ・バイオラボ社の抗体は、セマフォリン3Aによって誘発された網膜細胞内の細胞骨格崩壊を防がず、一方、同じ条件下では本発明の抗体は防ぐことが判明した。このことは、本発明の抗体の驚くべき意外な効果を確認する。

20

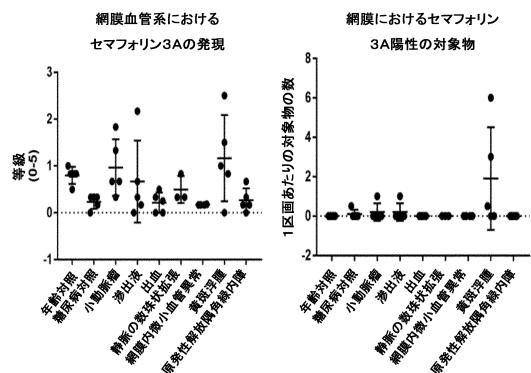
30

40

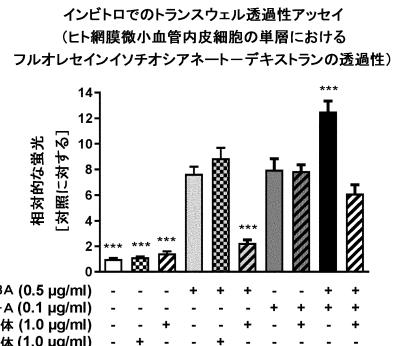
50

【四面】

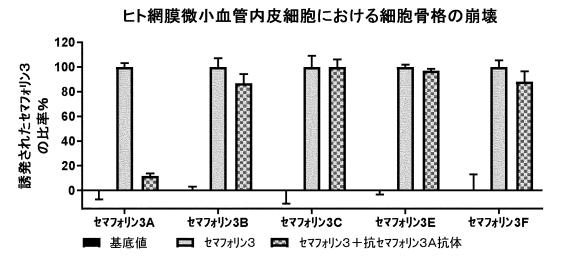
【図1】



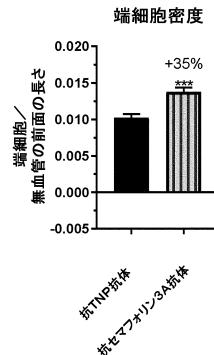
【 図 2 】



〔 図 3 〕



【図4A】



10

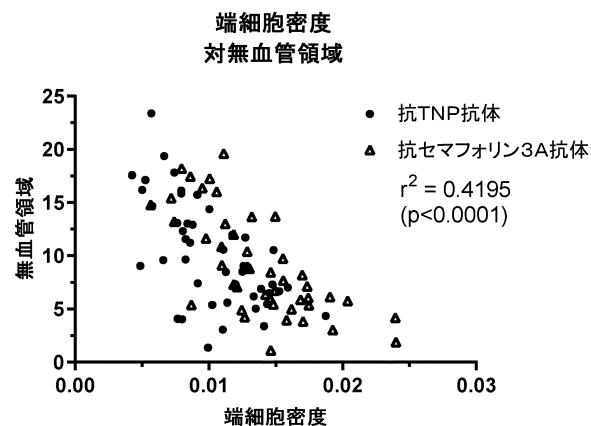
20

30

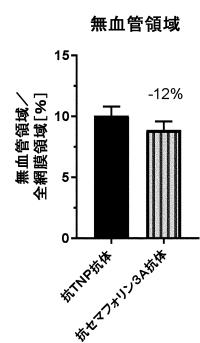
40

50

【図 4 B】



【図 4 C】



【配列表】

0007314310000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
C 12 P 21/08 (2006.01)	C 12 P 21/08
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21
C 12 N 5/00 (2006.01)	C 12 N 5/00
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395
A 61 P 27/02 (2006.01)	A 61 P 27/02

(72)発明者 バレット,レイチェル・レベッカ

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー、アイピー・リーガル

(72)発明者 ボバット,クリスティン・ラウラ

アメリカ合衆国、ペンシルベニア 18901、ドイルスタウン、ウッドクレスト・レーン 138

(72)発明者 ガネサン,ラクマー

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー・アイピー・リーガル

(72)発明者 グプタ,プリヤンカー

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー、アイピー・リーガル

(72)発明者 ハン,フェイ

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー、アイピー・リーガル

(72)発明者 リウ,ドンメイ

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー、アイピー・リーガル

(72)発明者 プレストル,ユルゲン

ドイツ国、55216 イングルハイム・アム・ライン、ビンガー・シュトラーセ 173、ベーリンガー・イングルハイム・インターナショナル・ゲーエムベーハー、コーポレイト・パテンツ

(72)発明者 シン,サンジャヤ

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー・アイピー・リーガル

(72)発明者 ヴェンカタラマニ,サティヤデヴィ

アメリカ合衆国、ペンシルベニア 19422、ブルー・ベル、フォーンビュー・サークル 597

(72)発明者 ウー,ヘレン・ハイシャ

アメリカ合衆国、コネチカット 06877-0368、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900、ピー・オー・ボックス 368、シー／オー・ベーリンガー・イングルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション、ブイピー、アイピー・リーガル

(72)発明者 ジッペル,ニナ

ドイツ国、55216 イングルハイム・アム・ライン、ビンガー・シュトラーセ 173、ベーリンガー・イングルハイム・インターナショナル・ゲーエムベーハー、コーポレイト・パテンツ

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特開2016-065066 (JP, A)

特表2017-527616 (JP, A)

国際公開第2014/123186 (WO, A1)

特表2019-500889 (JP, A)

特表2016-516003 (JP, A)

Am J Physiol Cell Physiol, 2009, Vol. 297, pp. C238-C252

J.Biol.Chem., 2002, Vol. 277, No. 51, pp. 49799-49807

International Immunology, 2015, Vol. 27, No. 9, pp. 459-466

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 N

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

U n i P r o t / G e n e S e q