

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6979397号
(P6979397)

(45) 発行日 令和3年12月15日 (2021.12.15)

(24) 登録日 令和3年11月17日 (2021.11.17)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/28	Z N A
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 39/395	N
A61P 25/28	(2006.01)	A61P 25/28	
A61P 21/02	(2006.01)	A61P 21/02	
C12N 15/13	(2006.01)	C12N 15/13	

請求項の数 19 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-501182 (P2018-501182)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月12日 (2016.7.12)
 (65) 公表番号 特表2018-529635 (P2018-529635A)
 (43) 公表日 平成30年10月11日 (2018.10.11)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2016/066516
 (87) 國際公開番号 WO2017/009327
 (87) 國際公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
 審査請求日 令和1年7月8日 (2019.7.8)
 (31) 優先権主張番号 1512215.3
 (32) 優先日 平成27年7月13日 (2015.7.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)

(73) 特許権者 591143065
 ハー・ルンドベック・アクチエゼルスカベ
 ット
 デンマーク国, 2500 バルビー, オッ
 ティリアベエイ, 9
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100141195
 弁理士 西澤 恵美子

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ソルチリンに結合し、プログラニュリンの結合を阻害する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 170 に定義されるソルチリンの D 領域に特異的に結合することができ、それによってソルチリンへのプログラニュリン (P G R N) の結合を阻害または減少するモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

以下の抗体 (3) ~ (21) からなる群から選択される、抗体またはその抗原結合フラグメント：

以下により特徴付けられる抗体 (3) :

- a . 配列番号 17 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 18 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 19 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 20 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 21 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 22 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 ;

10

以下により特徴付けられる抗体 (4) :

- a . 配列番号 25 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 26 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 27 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 28 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 29 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および

20

f . 配列番号 3 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

以下により特徴付けられる抗体 (5) :

- a . 配列番号 3 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 3 4 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 3 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 3 7 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 3 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

以下により特徴付けられる抗体 (6) :

- a . 配列番号 4 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 4 2 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 4 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 4 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 4 5 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 4 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

以下により特徴付けられる抗体 (7) :

- a . 配列番号 4 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 5 0 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 5 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 5 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 5 3 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 5 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

20

以下により特徴付けられる抗体 (8) :

- a . 配列番号 5 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 5 8 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 5 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 6 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 6 1 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 6 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

以下により特徴付けられる抗体 (9) :

30

- a . 配列番号 6 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 6 6 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 6 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 6 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 6 9 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 7 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

以下により特徴付けられる抗体 (10) :

- a . 配列番号 7 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 7 4 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 7 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 7 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 7 7 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 7 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

40

以下により特徴付けられる抗体 (11) :

- a . 配列番号 8 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 8 2 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 8 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 8 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 8 5 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 8 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

50

以下により特徴付けられる抗体(12) :

- a . 配列番号89を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号90を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号91を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号92を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号93を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号94を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

以下により特徴付けられる抗体(13) :

- a . 配列番号97を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号98を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号99を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号100を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号101を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号102を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

10

以下により特徴付けられる抗体(14) :

- a . 配列番号105を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号106を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号107を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号108を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号109を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号110を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

20

以下により特徴付けられる抗体(15) :

- a . 配列番号113を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号114を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号115を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号116を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号117を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号118を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

以下により特徴付けられる抗体(16) :

- a . 配列番号121を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号122を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号123を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号124を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号125を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号126を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

30

以下により特徴付けられる抗体(17) :

- a . 配列番号129を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号130を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号131を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号132を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号133を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号134を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

40

以下により特徴付けられる抗体(18) :

- a . 配列番号137を含む軽鎖可変領域L-CDR1 ;
- b . 配列番号138を含む軽鎖可変領域L-CDR2 ;
- c . 配列番号139を含む軽鎖可変領域L-CDR3 ;
- d . 配列番号140を含む重鎖可変領域H-CDR1 ;
- e . 配列番号141を含む重鎖可変領域H-CDR2 ; および
- f . 配列番号142を含む重鎖可変領域H-CDR3 、

以下により特徴付けられる抗体(19) :

50

- a . 配列番号 1 4 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 4 6 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 4 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 4 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 4 9 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 5 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、

以下により特徴付けられる抗体 (20) :

- a . 配列番号 1 5 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 5 4 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 5 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 5 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 5 7 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 5 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 、または

以下により特徴付けられる抗体 (21) :

- a . 配列番号 1 6 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 6 2 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 6 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 6 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 6 5 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 6 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3 。

10

20

【請求項 2】

前記抗体がさらに以下により特徴付けられる、請求項 1 に記載の抗体 :

前記抗体 (3) が、配列番号 2 4 を含む重鎖可変領域および配列番号 2 3 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (4) が、配列番号 3 2 を含む重鎖可変領域および配列番号 3 1 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (5) が、配列番号 4 0 を含む重鎖可変領域および配列番号 3 9 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (6) が、配列番号 4 8 を含む重鎖可変領域および配列番号 4 7 を含む軽鎖可変領域を含む、

30

前記抗体 (7) が、配列番号 5 6 を含む重鎖可変領域および配列番号 5 5 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (8) が、配列番号 6 4 を含む重鎖可変領域および配列番号 6 3 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (9) が、配列番号 7 2 を含む重鎖可変領域および配列番号 7 1 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (10) が、配列番号 8 0 を含む重鎖可変領域および配列番号 7 9 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (11) が、配列番号 8 8 を含む重鎖可変領域および配列番号 8 7 を含む軽鎖可変領域を含む、

40

前記抗体 (12) が、配列番号 9 6 を含む重鎖可変領域および配列番号 9 5 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (13) が、配列番号 1 0 4 を含む重鎖可変領域および配列番号 1 0 3 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (14) が、配列番号 1 1 2 を含む重鎖可変領域および配列番号 1 1 1 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (15) が、配列番号 1 2 0 を含む重鎖可変領域および配列番号 1 1 9 を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体 (16) が、配列番号 1 2 8 を含む重鎖可変領域および配列番号 1 2 7 を含む軽鎖可変領域を含む、

50

前記抗体(17)が、配列番号136を含む重鎖可変領域および配列番号135を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体(18)が、配列番号144を含む重鎖可変領域および配列番号143を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体(19)が、配列番号152を含む重鎖可変領域および配列番号151を含む軽鎖可変領域を含む、

前記抗体(20)が、配列番号160を含む重鎖可変領域および配列番号159を含む軽鎖可変領域を含む、または

前記抗体(21)が、配列番号168を含む重鎖可変領域および配列番号167を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【請求項3】

患者の脳内の減少したPGRNレベルに関連する疾患を治療するための、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】

請求項1または2に記載の抗体および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項5】

患者の脳内の減少したPGRNレベルに関連する疾患を治療するための、請求項1または2に記載の抗体および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項6】

前記疾患が、前頭側頭認知症；筋萎縮性側索硬化症；またはアルツハイマー病などのTAR-DNA結合タンパク質-43タンパク質症である、請求項5に記載の医薬組成物。

20

【請求項7】

前記治療が、少なくとも2週間の慢性的投与を含む、請求項5または6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記治療が、少なくとも1か月間の慢性的投与を含む、請求項5または6に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記治療が、少なくとも6か月間の慢性的投与を含む、請求項5または6に記載の医薬組成物。

30

【請求項10】

前記治療が、少なくとも1年間の慢性的投与を含む、請求項5または6に記載の医薬組成物。

【請求項11】

患者の脳内の減少したPGRNレベルに関連する疾患を治療するための医薬を製造するための、請求項1または2に記載の抗体の使用。

【請求項12】

患者の脳内の減少したPGRNレベルに関連する疾患を治療するための医薬を製造するための、請求項4に記載の医薬組成物の使用。

【請求項13】

前記疾患が、前頭側頭認知症；筋萎縮性側索硬化症；またはアルツハイマー病などのTAR-DNA結合タンパク質-43タンパク質症である、請求項11または12に記載の使用。

40

【請求項14】

前記治療が、少なくとも2週間の慢性的投与を含む、請求項11または12に記載の使用。

【請求項15】

前記治療が、少なくとも1か月間の慢性的投与を含む、請求項11または12に記載の使用。

【請求項16】

50

前記治療が、少なくとも 6 か月間の慢性的投与を含む、請求項 1 1 または 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 7】

前記治療が、少なくとも 1 年間の慢性的投与を含む、請求項 1 1 または 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 8】

請求項 1 または 2 に記載の抗体または請求項 4 に記載の医薬組成物を含むキット。

【請求項 1 9】

ヒト細胞株、非ヒト哺乳動物細胞株、昆虫、酵母または細菌細胞株などの細胞株において生産または製造された、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、不十分なレベルのプログラニュリン (P G R N) を修正するのに有用なモノクローナル抗ソルチリン抗体に関する。特に、これらの抗体は、前頭側頭認知症 (F T D) および筋萎縮性側索硬化症 (A L S) の治療に使用され得る。さらに、モノクローナル抗体はまた、アルツハイマー病 (A D) などの神経変性疾患を治療するのに有用であり得ることが予測される。

【0 0 0 2】

配列表の参照 :

20

本出願は、米国特許法施行規則 (3 7 C . F . R .) 第 1 . 8 2 1 条に従う 1 つまたは複数の配列表 (以下参照) を含み、これは、コンピュータ可読媒体 (ファイル名 : 0 9 9 3 _ S T 2 5 . t x t 、 2 0 1 6 年 6 月 2 2 日に作成され、 1 4 4 k B のサイズを有する) で開示され、このファイルは、全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0 0 0 3】

ソルチリンは、プロニューロトロフィンのアポトーシス促進効果を仲介し、ニューロトロフィン受容体の輸送およびソーティングを仲介することが報告されている受容体である (N y k j a e r e t a l , 2 0 1 2 , T r e n d s N e u r o s c i . 2 0 1 2 ; 3 5 (4) : 2 6 1 - 7 0 ; G l e r u p e t a l , H a n d b E x p P h a r m a c o l , 2 0 1 4 ; 2 2 0 : 1 6 5 - 8 9 、 C a r l o e t a l , J M o l M e d (B e r l) . 2 0 1 4 S e p ; 9 2 (9) : 9 0 5 - 1 1) 。ニューロテンシンを含むいくつかのソルチリンリガンドが同定されており、ニューロテンシンに対する高親和性結合部位が、X 線結晶構造解析によって、ソルチリン分子中の プロペラトンネルの内部にあることが突き止められた (Q u i s t g a a r d e t a l , N a t S t r u c t M o l B i o l . 2 0 0 9 J a n ; 1 6 (1) : 9 6 - 8 ; Q u i s t g a a r d e t a l , P r o t e i n S c i . 2 0 1 4 , S e p ; 2 3 (9) : 1 2 9 1 - 3 0 0) 。さらに最近では、ソルチリンは、成長因子プログラニュリンの高親和性受容体として機能することが示された (P G R N 、 H u e t a l . N e u r o n . 2 0 1 0 N o v 1 8 ; 6 8 (4) : 6 5 4 - 6 7) 。

30

ソルチリンは、プロニューロトロフィンのアポトーシス促進効果を仲介し、ニューロトロフィン受容体の輸送およびソーティングを仲介することが報告されている受容体である (N y k j a e r e t a l , 2 0 1 2 , T r e n d s N e u r o s c i . 2 0 1 2 ; 3 5 (4) : 2 6 1 - 7 0 ; G l e r u p e t a l , H a n d b E x p P h a r m a c o l , 2 0 1 4 ; 2 2 0 : 1 6 5 - 8 9 、 C a r l o e t a l , J M o l M e d (B e r l) . 2 0 1 4 S e p ; 9 2 (9) : 9 0 5 - 1 1) 。ニューロテンシンを含むいくつかのソルチリンリガンドが同定されており、ニューロテンシンに対する高親和性結合部位が、X 線結晶構造解析によって、ソルチリン分子中の プロペラトンネルの内部にあることが突き止められた (Q u i s t g a a r d e t a l , N a t S t r u c t M o l B i o l . 2 0 0 9 J a n ; 1 6 (1) : 9 6 - 8 ; Q u i s t g a a r d e t a l , P r o t e i n S c i . 2 0 1 4 , S e p ; 2 3 (9) : 1 2 9 1 - 3 0 0) 。さらに最近では、ソルチリンは、成長因子プログラニュリンの高親和性受容体として機能することが示された (P G R N 、 H u e t a l . N e u r o n . 2 0 1 0 N o v 1 8 ; 6 8 (4) : 6 5 4 - 6 7) 。

40

【0 0 0 4】

P G R N ((プロエピセリン、グラニュリン - エピセリン前駆体、P C 細胞誘導成長因子、アクログラニン)) は、抗炎症性および神経栄養性作用を有する分泌型グリコシル化タンパク質である (最近の報告については、 N g u y e n , T r e n d s E n d o c r i n o l M e t a b . 2 0 1 3 D e c ; 2 4 (1 2) : 5 9 7 - 6 0 6 を参照) 。 P G R N は、グラニュリンへとタンパク質分解的に切断されるが、 P G R N およびグラニュリンの生理学的役割ならびにこれらの受容体の特性に関して、まだ分かっていないことがある。 P G R N は、細胞周期調節および細胞運動性 (H e , Z . & B a t e m a n , A . , J . M o l . M e d . 5 7 : 6 0 0 - 6 1 2 (2 0 0 3) ; M o n a m i , G . , e t a l . , C a n c e r R e s . (5 (5 : 7 1 0 3 - 7 1 1 0 (2 0 0 6)) 50

、創傷修復、炎症 (Zhu, J., et al., *Cell* 777: 867-878 (2002))、血管内皮成長因子 (VEGF) などの成長因子の誘導 (Tangkeangsirisin, W. & Serrero, G., *Carcinogenesis* 25. 1587-1592 (2004))、および腫瘍発生 (He, Z. & Bateman, A., *J. Mol. Med.* 81: 600-612 (2003)、Monami, G., et al., *Cancer Res.* 55: 7103-7110 (2006) ; Serrero, G., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 505: 409-413 (2003)、Lu, R. & Serrero, G., *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 98: 142-147 (2001) ; Liau, L M., et al., *Cancer Res.* 60: 1353-1360 (2000))
10 を含むいくつかの細胞機能に関与している。PGRNは、TNF受容体に結合することが報告されている (Tang, W. et al., *Science* 2011, 332 (6028): 478-84) が、この観察は、他の者によっても試みられた (Chen, et al., *J. Neurosci.* 2013, 33 (21): 9202-9213)。

【0005】

ソルチリンへのPGRNの結合は、ニューロテンシン部位にマッピングされ、ニューロテンシンと同様に、PGRNのC末端ドメインのみを介して仲介されることが報告されており (Zheng et al., *PLoS One*. 2011; 6 (6): e21023 ; Lee et al., *Hum Mol Genet.* 2013)、したがって、ニューロテンシンは、PGRNおよび他のリガンドとのソルチリンの相互作用をブロックすることが示された。結合すると直ぐに、ソルチリンは、PGRNのリソソームクリアランスを仲介し、それによって、細胞外PGRNレベルを調節する (Hu et al. 2010)。したがって、ソルチリンのノックダウンまたは過剰発現が、細胞培養物中の細胞外PGRNレベルを調節することが示され (Carrasquillo et al., *Am J Hum Genet.* 2010 Dec 10; 87 (6): 890-7)、マウスにおいて、ソルチリン欠乏は、PGRNレベルを増加させ、PGRN+/-マウスにおける血漿および脳PGRNレベルを回復させることが報告された (Hu et al. 2010)。興味深いことに、ソルチリンに近い一塩基ヌクレオチド多型 (SNP) が、血漿PGRNの減少およびソルチリンmRNAレベルの増加に関連していた (Carrasquillo et al., *Am J Hum Genet.* 2010 Dec 10; 87 (6): 890-7)。これらの観察は、ソルチリンが、細胞外PGRNの主要調節因子であることを示唆している。
20

【0006】

PGRNは、前頭側頭認知症 (FTD)、行動および意味の変化によって特徴付けられる進行性認知症、ならびに前頭側頭葉変性症 (FTLD) およびTAR DNA結合タンパク質-43 (TDP-43) またはタウ封入体を含有する神経封入体に関連付けられている (Baker et al., 2006, *Nature*. 2006 Aug 24; 442 (7105): 916-9 ; Cruts et al., *Nature* 442: 920-924 (2006) ; Am J Hum Genet. 2010 Dec 10; 87 (6): 890-7、Met al., *Trends in Genetics* 24: 186-194 (2008))。散発性および家族性FTDの事例の大部分は、ALSと同様にTDP-43病変を示し (約50%)、FTD-TDP43およびALSは、共通の病理および遺伝因子および症状のいくつかの重複のため、疾患スペクトラムを成すものと一部の人々に見なされている (Ito, D. *Neurology*. 2011 Oct 25; 77 (17): 1636-43 ; Boxer AL et al., *Alzheimer's Dement.* 2013 Mar; 9 (2): 176-88 ; Rademakers et al., *Nat Rev Neurol.* 2012 August; 8 (8): 423-434)。FTDに使用可能な疾患修飾治療選択肢はない。TDP-43病変を有する前頭側頭認知症患者の一部は、PGRNハプロ不全をもたらすグラニュリン遺伝子 (GRN) の機能喪失突然変異を有する。これまで、グラニュリン遺伝子の69の異
30
40
50

なる突然変異（全て、P G R N レベルおよび／または機能の低下をもたらす）が、F T D と関連付けられ、血漿および脳中の増加する細胞外 P G R N が、疾患過程を抑え得るものと考えられる。

【0007】

P G R N 突然変異はまた、アルツハイマー病（A D）と関連付けられており（S h e n g et al. , 2014 , Gene . 2014 Jun 1 ; 542 (2) : 141 - 5 ; B r o u w e r s et al. , 2008 , Neurology . 2008 Aug 26 ; 71 (9) : 656 - 64 ）、これは、P G R N 欠乏が、A D 発症に重要な役割を果たし得ることを示唆している。さらに、マウス A D モデルにおける P G R N の神経保護的効果が観察されており（M i n a m i et al. , 2014 , Nat Med . 2014 Oct ; 20 (10) : 1157 - 64 ）、これは、P G R N の増強が、A D およびおそらく他の神経変性疾患に有益であり得るという考えに裏付けを与える。10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本出願は、細胞モデルおよびマウスにおいて P G R N を調節し得る抗ヒソルチリン抗体の生成および同定を記載している。それらの抗体は、ソルチリンにおける、既に報告されたプログラニュリン結合部位、いわゆるニューロテンシン部位と離れた領域に意外にも結合し、さらに、ソルチリン - P G R N 相互作用を阻害し、それによって、細胞外 P G R N を増加させることが可能である。20

【0009】

本発明者らは、6つのソルチリン結合領域を規定し、最も有効な抗体が、ある領域（「領域D」）に結合することを意外にも確認した。P G R N は、神経保護および抗炎症性効果を有するため、本発明者らの発見は、ソルチリンを標的にするこのような抗体が、F T D / F T L D を含む様々な神経変性疾患に有益な効果を有する可能性が高いことを示す。これらの患者のサブグループは、ハプロ不全をもたらす、P G R N をコードする遺伝子の突然変異を有する。したがって、ソルチリン抗体は、P G R N レベルがT D P 4 3 の機能および病変（A L S およびA D を含む）に影響を与える他のT D P - 4 3 タンパク質症および疾患に罹患している患者に同様の治療効果を与える可能性が高い。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の発明者らは、ソルチリンへのP G R N の結合を阻害することができ、配列番号170で定義される「D領域」と示される新規なソルチリン領域に意外にも結合するモノクローナル抗体を生成した。本発明者らによって同定された、いくつかの抗体は、D領域抗体と類似した特性を有し、実験的根拠により、それらもD領域内に結合することが示され、それらの抗体は、本明細書においてD+抗体と呼ばれる。したがって、一態様において、本発明は、このような抗体、このような抗体を含む組成物および／またはキット、ならびにその方法および使用に関する。

【0011】

本発明は、患者の脳内の減少したP G R N レベルに関連する疾患を予防または治療する方法であって、有効投与量の、ソルチリンのD領域に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する工程を含む方法にも関する。これらの疾患としては、特に、F T D 、A L S およびT D P 4 3 タンパク質症（A D など）が挙げられる。40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ソルチリン領域結合に基づいたヒト抗体の領域割り当ての作製、P G R N 結合およびP G R N レベルおよび抗体間のクロスブロッキングに対する影響の概略を提供する。

ソルチリン結合抗体を選択し、配列がタンパク質の選択された領域内のテトラオドンソルチリン配列に対応していたシャッフル構築物への結合に基づいて領域A～Eに割り当った（実施例1、図2）。（H T R F 分析によって測定した際に）ソルチリン - P G R N 50

結合を阻害した 20 の抗体を選択した（実施例 10、図 5 および図 6 を参照）。これらの抗体のうちの 15 が D 領域抗体であった一方、3 つが D + 抗体であった（図 6）。その後のクロスブロッキング分析は、18 の D 領域および D + 抗体（D + 抗体は、シャッフル構築物に対する、D 領域抗体と異なる結合パターンを有する。それにもかかわらず、D + 抗体は、上に概説される結合領域 A ~ E に確実に割り当てられ得ないが、D 領域抗体と類似した機能特性（細胞アッセイなど）を共有していた）が全て、互いにクロスブロックしたことを示し、これは、それらが同じソルチリン領域と相互作用したことを裏付ける（実施例 9、図 7）。他の領域クラスのソルチリン抗体を、H T R F ソルチリン - P G R N 結合アッセイにおいて試験した場合、41 の抗体のうちの 2 つのみが、阻害効果を示した。これらの 2 つの抗体のうちの一方が、D および D + とクロスブロックしたが、非典型的なシャッフル構築物結合パターンを有していた一方（それが h B 0 1 ~ 0 5 領域に結合したこと）を除いて D と類似していた）、他方の抗体は、P G R N - ソルチリン結合を阻害した他方の抗体とクロスブロックせず、したがって、これは、それが別のソルチリン領域に結合するという結論を裏付ける。これらの観察は、D 領域によって画定されるソルチリン中の領域への抗体結合が、ソルチリン - P G R N 結合を阻害する可能性を有することを示す。19 のクロスブロッキング抗体（そのうちの 18 が D 領域および D + 抗体である）が、細胞アッセイにおいて細胞外 P G R N を増加させた（実施例 13、図 10 および図 11）。これらの抗体のうちの 3 つを、インビボで試験したところ、血漿 P G R N を増加させることが分かった（図 13、実施例 15）。図 1 におけるボックスは、抗体の選択における工程を示す。A ~ E は、それぞれのソルチリン結合抗体を、実施例 1 および配列番号 171 ~ 179 に記載されるようにシャッフル構築物に基づいて割り当てた領域を指す。「その他」は、1 つの領域に割り当てることができず、A 領域と B 領域との間の境界で結合し得る抗体を指す。T e t は、テトラオドン - ソルチリンにも結合する抗体を指す。示されるヒト抗体に加えて、一連のマウス抗ヒトソルチリン抗体を生成し、同様に特性評価した。これらの抗体のうちの 2 つが、D 領域に割り当てられ、ヒト D 領域および D + 抗体とクロスブロックし、ソルチリン - P G R N 結合を阻害し、細胞外 P G R N を増加させることが示された（図 4 を参照）。

【図 2】ソルチリンシャッフル構築物への結合に基づいた抗体の領域割り当てを示す。パネル A は、実施例 1 に記載されているように抗体の領域割り当てに使用されるシャッフル構築物の線形図を示す。アミノ酸残基をテトラオドンソルチリン配列（黒色で示される）（配列番号 173）に由来する対応するアミノ酸に交換したヒトソルチリン配列（配列番号 169）（灰色で示される部分）に基づいて、ソルチリンシャッフル構築物を生成した（実施例 1 ~ 3）。パネル B は、A において線形に示されるシャッフル構築物の予測される構造を示す。暗色の残基は、シャッフル構築物における対応するテトラオドン配列に変更された残基を示す。パネル C は、それぞれ D 領域および E 領域クラスに割り当てられた抗体の結合パターンを示す。「+」は、所与のシャッフル構築物への結合を示し、「-」は、結合がないことを示す。異なるシャッフル構築物への結合パターンに基づいて、抗体を領域に割り当てた。得られる抗体領域クラスは、A ~ E によって示される。示される D および E 領域抗体では、「+」によって示されるように両方がヒト配列に結合し（全て灰色）、「-」によって示されるようにいずれもテトラオドン配列に結合しない（全て黒色）が、E 領域抗体は、h B 4 5 6 7 8 シャッフル構築物に結合した一方、D 領域抗体は、結合せず、パネル A に示されるように結合の局在化をもたらした。D 領域抗体については、以下のシャッフル領域への結合が観察された：h s o r t、h B 0 6 - 1 0、B 1 2 3 9 0。抗体は、h B 0 1 - 0 5、B 4 5 6 7 8、t e t に結合しなかった。D + 抗体については、以下のシャッフル領域への結合が観察された：h s o r t、B 1 2 3 9 0。抗体は、h B 0 1 - 0 5、h B 0 6 - 1 0、B 4 5 6 7 8、t e t に結合しなかった。F 結合パターンは、h B 0 6 - 1 0 への結合が D + 抗体について観察されなかつことを除いて、D 結合パターンに類似していた。抗体は、2 つを除いて、完全テトラオドンソルチリンタンパク質に結合しなかった。テトラオドン配列に結合することができる 2 つの抗体が、「t e t」と示された。「その他」は、1 つの領域に割り当てることができなか

った抗体を指す。

【図3】ヒトD領域およびD+抗体の結合親和性を示す。実施例8に記載されるようにOctet 384RED(EC50, ng/ml)を用いたバイオレイヤー干渉法によるソルチリンシャッフル構築物に対する結合親和性。シェーディングなしは、0.1~10ng/mlのEC50を示し、薄い灰色のシェーディングは、EC50>10ng/mlを示し、灰色のシェーディングは、結合なし(NB)を示す。領域割り当ては、図2に示される結合パターンに基づいて行った。シャッフル構築物は、図2に示され、配列は、配列番号171~179に示される。mAb = モノクローナル抗体。

【図4】実施例8に記載されるようにOctet 384RED(EC50, ng/ml)を用いたバイオレイヤー干渉法によって得られるソルチリンシャッフル構築物に対するマウス抗ヒト抗体の結合親和性を示す。シェーディングなしは、結合を示し、灰色のシェーディングは、結合なし(NB)を示す。結合パターンに基づいた領域割り当てが、図2に示される。

【図5】ソルチリンPGRN結合に対するソルチリン抗体の効果を示す。D領域ソルチリンヒトモノクローナル(humAb)抗体45(黒丸)は、結合を妨げなかった対照ソルチリンE領域抗体(黒三角)およびIgG対照、IgG1-b12(白三角)と対照的に、ソルチリンへのPGRN結合を防いだ。抗体の結合を、均一性時間分解蛍光(HTRF)(実施例10)を用いたソルチリンへのPGRN結合の移動を測定することによって決定した。抗体の用量反応評価を、3倍希釈曲線において50pM~1μMをカバーする10の濃度で行った。半数阻害濃度(IC50)値を、XLfit 4(IDBS, UK)においてS字形濃度反応(可変の傾き)を用いた非線形回帰によって計算した。

【図6】図5に示される均一性時間分解蛍光(HTRF)分析によって決定されるソルチリン-PGRN結合に対する抗体の効果の概要。合計で62個の抗体を試験した-15個のD領域抗体および3個のD+抗体が、ソルチリン-PGRN結合を阻害することが分かり、IC50値を決定した。2つのさらなる抗体(Eおよび他の領域)について、阻害効果が観察された。全ての残りの抗体は、試験において陰性であった。^{*}抗体は、用量反応曲線に適合するには弱すぎる。1μMにおける6%の阻害。^{**}対照(ctr1)抗体は、用量反応曲線に適合するには弱すぎる。1μMにおける37%の阻害。これらの観察は、それらのD領域またはD+割り当てによって特徴付けられるソルチリン抗体が、PGRNへのソルチリンの結合を直接阻害し、ソルチリン-PGRN結合を阻害することが可能であることを示す。

【図7】抗体間のクロスブロッキングを示す。ヒト抗体およびマウス抗体を全て、単一の実験において試験し、ここで、各抗体が、ヒト野生型(WT)ソルチリンに結合された(図7)。続いて、全ての他の抗体を、予め形成されたソルチリン:抗体複合体への結合について試験した(実施例9)。(HTRF PGRN-ソルチリンアッセイにおけるそれらの効果に基づいて、選択された15個のD領域および3個のD+ヒト抗体(図5および図6)および2個のマウスD領域抗体は全て、ヒトWTソルチリンへの互いの結合を阻害した。抗体は、1つのクロスブロッキングA領域抗体、1つの不明な領域割り当てを有する抗体(「その他」)およびD+抗体548についての部分的なブロックを除いて、他の領域クラスに指定された抗体(表中でそれぞれAbA1-x, AbE1-xおよびAbtectと番号付けられた抗体を認識するA領域、E領域およびテトラオドンについて示されるように)とクロスブロックしなかった。これらのデータは、HTRFアッセイにおいてソルチリン-PGRN結合を阻害することが可能なD領域およびD+抗体が全て、ソルチリンにおいて同じ領域と相互作用することを裏付ける。同じかまたは異なる領域(図2に示されるシャッフル構築物への結合に基づいた領域)からのソルチリン抗体間のクロスブロッキングを、抗体-ソルチリン結合の阻害を分析することによって決定した。ソルチリン-ECDF-Hisへの抗体の結合を、Octet 384RED(実施例9)を用いたバイオレイヤー干渉法によって測定した。左列は、一次(固定化)抗体を示し、上行は、二次抗体(固定化抗体に対して試験される抗体)を示す。ソルチリン-ECDF-Hisへの一次および二次抗体の両方の結合は、0.1より高い反応値をもたらし、両方の抗

10

20

30

40

50

体が、タンパク質の異なる領域に結合していたことを示し得る。0.1未満の反応値は、二次抗体の結合がないことおよび固定化(一次)抗体による有効なクロスブロッキングを示し、これは、両方の抗体が、ソルチリンの同じ領域に結合することを示唆する。

【図8】ソルチリンへの選択的小分子リガンドAF38469の結合に対するD領域およびD+ソルチリン抗体の効果を示す。AF38469の結合部位は、ニューロテンシンの結合部位に類似していることが示され、X線結晶構造解析によって特性評価された(Sc
hroeder et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Jan 1; 24(1): 177-80)。PGRNは、同じ部位に結合することが報告されており(Le et al. *Hum Mol Genet*. 2013)、D領域、およびD+にそれぞれ結合する抗体45および68は、ソルチリンへのAF38469の結合を阻害しなかった。このデータは、これらの抗体が、AF38469の結合部位と異なる、ソルチリンの結合部位を有することを示唆する。したがって、抗体45および68は、ソルチリンにおけるこれまでに推定されたPGRN結合部位と異なる結合部位を介してPGRN-ソルチリン結合を阻害する。

【図9】PGRNの細胞結合およびエンドサイトーシスに対する抗体45および68の効果(実施例12)。抗体45および68は、ソルチリン過剰発現細胞によるPGRNの結合および/またはエンドサイトーシスを阻害した。ニューロテンシン(NT、10uM)の添加が、予想通り減少された蛍光に反映されるようにPGRNの結合またはエンドサイトーシスを同様に減少させた一方、アイソタイプ対照抗体B12は、PGRN蛍光レベルに影響を与えたかった。試験される抗体(100nM)を、4時間にわたる組み換えPGRNの添加の30分前にS18細胞に加えた。次に、細胞を固定し、PGRNについて染色し、Cellomicsによって分析した。PGRN蛍光を、細胞当たりの平均蛍光として測定した。データは、平均±SDとして示される。データを、一元配置Anova、続いてダネットの分析によって分析し、全ての群をPGRNと比較した。*p<0.05; **p<0.01。

【図10】ソルチリン過剰発現HEK細胞(S18)の培養物からの培地におけるELISAによって推定される細胞外PGRNレベル。ソルチリンD領域(45、811)およびD+(68)抗体は、PGRNレベルを増加させ、ソルチリンリガンドニューロテンシンの同様の効果が観察された一方、対照抗体B12は効果を有さなかった。これらの観察は、D領域およびD+ソルチリン抗体が、PGRNのソルチリンに仲介されるクリアランスを阻害し、それによって、細胞外PGRNを増加させることができたことを示す。全ての抗体を100nMで試験した。ニューロテンシンを10uMで試験した。PGRNレベルを対照に対して正規化した。データは、平均±SDとして示される。データを、一元配置Anova、続いてダネットの分析によって分析し、全ての群を対照(CTRL)と比較した。*p<0.05; **p<0.01(実施例13)。

【図11】実施例13に記載されるようにELISAによって測定されるヒトソルチリン過剰発現HEK細胞における細胞外PGRNに対する抗体の効果を示す。全ての選択されたD領域抗体および3個の選択されたD+抗体が、細胞外PGRNを増加させた。PGRNレベルを上記と同じように分析した。PGRNレベルを非処理の対照に対して正規化し、%で示す。2つの抗体が、マウスにおいてヒトソルチリン(1F2F4および5E1F6)に対して誘導され、残りがヒト抗体である。Ab=モノクローナル抗体。

【図12】(上側および下側パネル)は、神経分化iPSC細胞における細胞外PGRNに対するソルチリン抗体の効果を示す(実施例14)。ソルチリンD領域抗体45およびD+抗体68は、PGRNレベルを増加させた一方、対照抗体B12および抗HELは効果を有さなかった。神経分化iPSC細胞を、96ウェルプレートへと平板培養した。1週間後、抗体を細胞に加えた。細胞からの培地を、48時間または96時間の時点で収集し、ヒトPGRN ELISA(Enzo Life Sciences)によって分析し、試料を製造業者の指示にしたがって分析した。ソルチリンヒト抗体45および68は、両方の時点で培地におけるPGRNレベルを増加させた。対照アイソタイプ抗体B12および抗He1(陰性対照)は、細胞外PGRNを変化させなかった。データは、平均

10

20

30

40

50

\pm S Dとして示される。データを、一元配置Anova、続いてダネットの分析によって分析した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (実施例14)。

【図13】(パネルA～C)は、ソルチリンヒト抗体で処理されたヒトソルチリン発現ノックイン(KI)マウスにおける血漿PGRNレベルを示す(実施例15)。ソルチリン抗体45が、血漿PGRNレベルを増加させた一方、対照抗体は効果を有さなかった。

経時的試験: PG RNの増加した血漿中レベルが、抗体45(D領域)の注入後に観察された。マウスに、10mg/kgの用量で皮下に(s.c.)45(n=5)または対照(n=3)抗体を注入した。各群を、異なる時点での殺処分した。対照抗体(抗He1)で処理されたマウスでは、血漿PGRNの変化がなかった一方、45で処理されたマウスでは、PGRNレベルの漸増があった。効果は、24～48時間の間にピークになるように見え、4～7日目までに徐々に減少した。B 亜慢性試験: マウスを、10mg/kgの45および対照抗体(抗He1)で週に2回処理した。試料を、週に1回、頸の血液から採取した。血漿PGRNは、1週目の時点での高く、対照抗体(n=20)で処理された動物と比較して、試験全体を通してほぼ同じレベルのままであった。C 用量反応試験: 異なる用量(4つの用量: 0.1、0.4、2および10mg/kg)のソルチリン(45)および対照抗体(抗He1)を注入し、マウスを2日目に殺処分した。血漿PGRNは、45(10および2mg/kg)で処理されたマウスにおいて高かった。より低い用量(0.4および0.1mg/kg)は、血漿PGRNに対する効果がなかった。データは、平均 \pm S Dとして示される。データを、二元配置Anova、続いてボンフェローニ分析によって分析した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (実施例15)。

【図14】予測されるソルチリン構造に与えられる、ソルチリンシャッフル構築物に基づいたソルチリン領域の図を提供する。この領域は、ヒト配列からテトラオドン配列への選択されたアミノ酸残基の変化が、その領域クラスの抗体に対する結合を阻害したソルチリンタンパク質の部分である。矢印は、ニューロテンシンおよびPGRNの報告される高親和性結合部位を示す(Quistgaard Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan; 16(1): 96-8, Lee et al, Hum Mol Genet. 2013)。

【図15a-15b】図15a(パネル1～6)および15b(パネル1～3)は、抗体45、68および811の立体配座エピトープをカバーする代表的なペプチドを示す。示されるペプチドの全ては、ペプチド115～125を除いて、0.5Dより大きい交換からの保護を示す。ペプチド115～125は、抗体45、68または811の存在によって影響されず、それによって、立体配座結合エピトープの一部でないペプチドの例である(実施例16)。

【図16a-16b】図16a(パネル1～6)および16b(パネル1～3)は、抗体30の立体配座エピトープをカバーする代表的なペプチドを示す。示されるペプチドの全ては、ペプチド563～572、ペプチド646～656およびペプチド704～714を除いて、0.5Dより大きい交換からの保護を示す。これらの3つのペプチドは、抗体30の存在によって影響されず、それによって、立体配座結合の一部でないペプチドの例である(実施例16)。

【図17】微小透析の手順についての図を示す。

【図18a】経時変化: 自由行動hSORT1マウスの海馬におけるPRGNのレベルに対する、微小透析実験の24時間前の抗体45またはPBSの全身投与(50mg/kg、10ml/kg、皮下(s.c.))の経時的な(24時間)効果を示す(実施例17)。

【図18b】プールされた24時間透析の結果: プッシュプル微小透析によって評価した際の、それぞれ3.3 \pm 0.3ng/mlおよび1.1 \pm 0.1ng/mlのmab#45-およびPBSで処理されたマウスにおける、自由行動hSORT1マウスの海馬における基底PRGNを示す(実施例17)。

【図18c】動物をmab#45(n=10)またはPBS(n=8)で処理した1日後

10

20

30

40

50

に、24時間の間に2時間置きに測定された自由行動h S O R T 1マウスの海馬におけるP R G N レベル（平均±S E M）を示す表を示す（実施例17）。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書において使用される際、「ソルチリン」という用語は、ソルチリンタンパク質（例えばQ 9 9 5 2 3、1および2としてU n i P r o tにおいて同定される）と同義である。ソルチリンのアミノ酸の番号付けは、以下に示されるように配列番号169に対して示され、M e tは、アミノ酸1である：

【化1】

10
MERPWGAADG LSRWPHGLGL LLLLQLLPPS TLSQDRLDAP PPPAAPLPRW
SGPIGVSWGL RAAAAGGAFP RGGRWRRSAP GEDEECGRVR DFVAKLANNT
HQHVFDDL RG SVSLSWVGDS TG VILVLTTF HVPLVIMTFG QSKLYRSEDY
GKNFKDITDL INNTFIRTEF GMAIGPENSG KVVLTAEVSG GSRGGRIFRS
SDFAKNFVQT DLPFHPLTQM MYSPQNSDYL LALSTENGLW VSKNFGGKWE
EIHKAVCLAK WGSDNTIFFT TYANGSCKAD LGALELWRTS DLGKSFKTIG
VKIYSFGLGG RFLFASVMAD KDTTRRIHVS TDQGDTWSMA QLPSVGQEKF
YSILAANDDM VFMHVDEPGD TGFGTIFTSD DRGIVYSKSL DRHLYTTG
ETDFTNVTSL RG VYITSVLS EDNSIQTMIT FDQGGRWTHL RKPENSECDA
TAKNKNECSL HIHASYSISQ KLNVPMAPLS EPNAVGVIA HGSVGDAISV
MVPDVYISDD GGYSWTKMLE GPHYYTILDS GGIIVAIIEHS SRPINVIKFS
TDEGQCWQTY TFTRDPIYFT GLASEPGARS MNISIWFTE SFLTSQWVSY
TIDFKDILER NCEEKDYTIW LAHSTDPEDY EDGCILGYKE QFLRLRKSSV
CQNGRDYVVT KQPSICLCSL EDFLCDGFYY RPENDSKCVE QPELKGDLE
FCLYGREEHL TTNGYRKIPG DKCQGGVNPV REVKDLKKKC TSNFLSPEKQ
30
NSKSNSVPII LAIVGLMLVT VVAGVLIVKK YVCGGRFLVH RYSVLQQHAE
ANGVDGVDAL DTASHTNKSG YHDDSDEDLLE

【0014】

本明細書において使用される際、「D領域」という用語は、以下に示される配列番号170：

【化2】

40
HYYTILDGG IIVAI EHSSR PINVIKFSTD EGQCWQTYTF TRDPIYFTGL
ASEPGARSMN ISIWGFTESF LTSQWVSYTI DFKDILER

におけるアミノ酸からなるソルチリンの領域（配列番号169の残基523～610に対応する）を指すことが意図される。

【0015】

D領域抗体については、以下のシャッフル領域への結合が観察された：h s o r t、h B 0 6 - 1 0、B 1 2 3 9 0。抗体は、h B 0 1 - 0 5、B 4 5 6 7 8、t e tに結合しなかった。D+抗体については、以下のシャッフル領域への結合が観察された：h s o r t、B 1 2 3 9 0。抗体は、h B 0 1 - 0 5、h B 0 6 - 1 0、B 4 5 6 7 8、t e tに結合しなかった。「D+」と呼ばれる抗体については、h B 0 6 - 1 0への結合がD+抗体では観察されなかったことを除いて、「D」領域抗体と同様の結合パターンが観察され

た。シャッフル構築物への異なる結合パターンにもかかわらず、D+抗体は、D領域抗体と機能特性（細胞アッセイなど）を共有していた。

【0016】

特定のDおよびD+結合抗体は、配列番号185、186または187に定義される特定の領域に結合する。したがって、本発明は、特定の実施形態において、配列番号170のD領域配列に、およびその配列番号185、186または187領域内に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。結合することによって、これらの抗体または抗原結合フラグメントは、PGRNレベルに影響を与え、したがって、FTD、ALSおよびADなどの、PGRNに関連する疾患を治療するのに使用され得る。

【0017】

本発明のDおよびD+抗体の結合をさらに分析することによって、隣接する領域（A領域）への部分的な結合が、抗体のいくつかについて同定された。この領域は、配列番号180および以下：

【化3】

SAPGEDEECG RVRDFVAKLA NNTHQHVFDD LRGSVSLSWV GDSTGVILVL
TTFHVPIVIM TFGQSKLYRS EDYGKNFKDI TDLINNTFIR TEFGMAIGPE
NSGKVVLTAE VSGGSRGGRRI FRSSDFAKNF VQTDLPFHPL TQMMYSPQNS
DYLLALSTEN GLWVSKNFQGG KWEEIHK

に示されるように、配列番号169のアミノ酸78～254に対応する。この領域には、「A領域」という用語が与えられた。

【0018】

したがって、特定の実施形態において、本発明は、上記および配列番号170、185、186または187に定義されるD領域に結合し、配列番号180において同定されるA領域に対する親和性をさらに有する抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。A領域内では、特定の抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号181、182、183または184において同定されるA領域アミノ酸に対する親和性を有する。

【0019】

PGRN（プロエピセリン、グラニュリン-エピセリン前駆体、PC細胞誘導成長因子、アクログラニン）は、前駆体PGRNからタンパク質分解的に切断され得る、6～25kDaの範囲のより小さいグラニュリンモチーフの7.5の反復を有する68.5kDa分泌型糖タンパク質をコードする（He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81: 600-612 (2003)）。非神経細胞において、PGRNは、細胞周期調節および細胞運動性（He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57: 600-612 (2003); Monami, G., et al., Cancer Res. (55: 7103-7110 (2006))、創傷修復、炎症（Zhu, J., et al., Cell 777: 867-878 (2002)）、血管内皮成長因子（VEGF）などの成長因子の誘導（Tangkeangsinsin, W. & Serrero, G., Carcinogenesis 25: 1587-1592 (2004)）、および腫瘍発生（He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81: 600-612 (2003)、Monami, G., et al., Cancer Res. (55: 7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun. 505: 409-413 (2003)、Lu, R. & Serrero, G., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 98: 142-147 (2001); Liau, L. M., et al., Cancer Res. 60: 1353-1360 (2000)）などの様々な事象に関連付けられている。

【0020】

PGRN突然変異は、ハプロ不全をもたらし（Baker, M., et al., Nat

10

20

30

40

50

ure 442:916-919 (2006); Cruts, M., et al., *Nature* 442:920-924 (2006)）、家族性FTDの事例のほぼ50%に存在することが知られており、PGRN突然変異は、FTDの主な遺伝的要因とされている（Cruts, M. & Van Broeckhoven, C, *Trends Genet.* 24:186-194 (2008); Le Ber, I., et al., *Brain* 129:3051-3065 (2006)）。PGRN突然変異の機能喪失ヘテロ接合特性は、健常個体において、PGRN発現が、FTDの発症から健常個体を保護するのに、用量依存的な重要な役割を果たすことを示唆する。

【0021】

本発明の文脈における「抗体」（Ab）という用語は、分子（「抗原」）のエピトープに結合する能力を有する、免疫グロブリン分子、または本発明のある実施形態によれば、免疫グロブリン分子のフラグメントを指す。天然抗体は、典型的に、通常、少なくとも2つの重（H）鎖および少なくとも2つの軽（L）鎖から構成される四量体を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてVHと略記される）および、3つの領域（CH1、CH2およびCH3）から構成される重鎖定常領域から構成される。重鎖は、IgG（IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4サブタイプ）、IgA（IgA1およびIgA2サブタイプ）、IgMおよびIgEを含む任意のアイソタイプのものであり得る。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてVLと略記される）および軽鎖定常領域（CL）から構成される。軽鎖は、鎖および鎖を含む。重鎖および軽鎖可変領域が、典型的に、抗原認識に関与する一方、重鎖および軽鎖定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1の成分（C1q）を含む、宿主組織または宿主因子への免疫グロブリンの結合を仲介し得る。VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」（FR）と呼ばれるより保存される配列の領域が散在する「相補性決定領域」と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分され得る。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4で配置される3つのCDR領域および4つのFR領域から構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合領域を含有する。特に関連があるのは、自然界に存在し得るものと異なる物理的環境中で存在するように「単離され」ているか、またはアミノ酸配列中の天然抗体と異なるように修飾された抗体およびそれらの抗原結合フラグメントである。

【0022】

「エピトープ」という用語は、抗体への特異的結合が可能な抗原決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面基（surface grouping）からなり、通常、特定の三次元構造特性、ならびに特定の電荷特性を有する。立体配座エピトープおよび線状エピトープは、後者ではなく、前者への結合が、変性溶媒の存在下で常に失われる点で区別される。エピトープは、特異的抗原結合ペプチドによって有効に遮断されるアミノ酸残基（言い換えると、アミノ酸残基は、特異的抗原結合ペプチドのフットプリント内にある）などの、結合に直接関与するアミノ酸残基および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基を含み得る。

【0023】

本明細書において使用される際、「抗体の抗原結合フラグメント」という用語は、エピトープに結合することが可能な抗体のフラグメント、部分、領域（region）または領域（domain）（それがどのように産生されるかにかかわらず（例えば、切断により、組み換えにより、合成的になど））を意味し、したがって、「抗原結合」という用語は、例えば、「抗体の抗原結合フラグメント」が「抗体のエピトープ結合フラグメント」と同じであることが意図されるように、「エピトープ結合」と同じことを意味することが意図される。抗原結合フラグメントは、このような抗体のCDR領域の1、2、3、4、5または6つ全てを含有してもよく、このようなエピトープに結合することが可能であるが、このような抗体のものと異なるこのようないエピトープに対して特異性、親和性または選択性を示し得る。しかしながら、好ましくは、抗原結合フラグメントは、このような抗

10

20

30

40

50

体の C D R 領域の 6 つ全てを含有するであろう。抗体の抗原結合フラグメントは、単一のポリペプチド鎖（例えば、s c F v ）の一部であるか、もしくはそれを含んでもよく、またはアミノ末端およびカルボキシル末端（例えば、二重特異性抗体、F a b フラグメント、F a b ₂ フラグメントなど）をそれぞれ有する 2 つ以上のポリペプチド鎖の一部であるか、もしくはそれを含んでもよい。抗原結合能力を示す抗体のフラグメントは、例えば、無傷の抗体のプロテアーゼ切断によって得られる。より好ましくは、F v フラグメントの 2 つの領域、V L およびV H が、別個の遺伝子によって天然にコードされるが、またはこのような遺伝子配列をコードするポリヌクレオチド（例えば、それらのコード c D N A ）が、V L およびV H 領域が結合して一価抗原結合分子を形成する単一のタンパク質鎖（単一鎖 F v (s c F v) として知られている；例えば、B i r d et al. , (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 ; および H u s t o n et al. (1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U . S . A .) 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3 を参照）としてそれらが作製されるのを可能にするフレキシブルリンカーによって、組み換え方法を用いて結合され得る。あるいは、単一のポリペプチド鎖のV L およびV H 領域が一緒に結合するのを可能にするには短すぎるフレキシブルリンカー（例えば、約 9 個未満の残基）を用いることによって、二重特異性抗体（b i s p e c i f i c a n t i b o d y ）、二重特異性抗体（d i a b o d y ）、または同様の分子（2 つのこのようなポリペプチド鎖が一緒に結合して、二価抗原結合分子を形成する）を形成することができる（二重特異性抗体の説明については、例えば P N A S U S A 9 0 (1 4) , 6 4 4 4 - 8 (1 9 9 3) を参照）。本発明の範囲内に包含される抗原結合フラグメントの例としては、(i) F a b ' または F a b フラグメント、V L 、V H 、C L およびC H 1 領域からなる一価フラグメント、または国際公開第 2 0 0 7 0 5 9 7 8 2 号パンフレットに記載されている一価抗体；(i i) F (a b ') 2 フラグメント、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された 2 つの F a b フラグメントを含む二価フラグメント；(i i i) V H およびC H 1 領域から本質的になる F d フラグメント；(i v) V L およびV H 領域から本質的になる F v フラグメント、(v) V H 領域から本質的になり、ドメイン抗体（H o l t et al. ; T r e n d s B i o t e c h n o l . 2 0 0 3 N o v ; 2 i (1 1) : 4 8 4 - 9 0 ）とも呼ばれる d A b フラグメント（W a r d et al. , N a t u r e 3 4 1 , 5 4 4 - 5 4 6 (1 9 8 9) ）；(v i) ラクダ科動物（c a m e l i d ）またはナノボディ（R e v e t s et al. ; E x p e r t O p i n B i o l T h e r . 2 0 0 5 J a n ; 5 (1) : 1 1 1 - 2 4 ）および(v i i) 単離された相補性決定領域（C D R ）が挙げられる。さらに、F v フラグメントの 2 つの領域、V L およびV H が、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、V L およびV H 領域が組み合わされて、一価分子を形成する単一のタンパク質鎖（単一鎖抗体または単一鎖 F v (s c F v) として知られている、例えば B i r d et al. , S c i e n c e 2 4 2 , 4 2 3 - 4 2 6 (1 9 8 8) および H u s t o n et al. , P N A S U S A 8 5 , 5 8 7 9 - 5 8 8 3 (1 9 8 8) を参照）としてそれらが作製されるのを可能にする合成リンカーによって、組み換え方法を用いて結合され得る。本発明の文脈におけるこれらのおよび他の有用な抗体フラグメントは、本明細書においてさらに説明される。抗体という用語は、特に規定されない限り、キメラ抗体およびヒト化抗体などの抗体様ポリペプチド、ならびに酵素的切断、ペプチド合成、および組み換え技術などの任意の公知の技術によって提供される、抗原（抗原結合フラグメント）に結合する能力を保持する抗体フラグメントも含むことも理解されるべきである。生成される抗体は、任意のアイソタイプを有し得る。本明細書において使用される際、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス（例えば I g G 1 、I g G 2 、I g G 3 または I g G 4 ）を指す。このような抗体フラグメントは、当業者に公知の従来の技術を用いて得られ；所望のエピトープに結合することが可能な好適なフラグメントは、無傷の抗体と同じように有用性について容易にスクリーニングされ得る。

「二重特異性抗体」という用語は、それぞれ独立した標的を標的にする2つの独立した抗原結合フラグメントを含有する抗体を指す。これらの標的は、異なるタンパク質上に存在するエピトープ、または同じ標的上に存在する異なるエピトープであり得る。二重特異性抗体分子は、親単一特異性二価抗体分子のH Cの定常領域における補償的アミノ酸改変を用いて作製され得る。得られるヘテロ二量体抗体は、2つの異なる親単一特異性抗体から与えられる1つのF abを含有する。F c領域におけるアミノ酸改変は、時間を経ても安定した二重特異性を有するヘテロ二量体抗体の向上した安定性をもたらす (R idg way et al., Protein Engineering 9, 617 - 621 (1996)、Gunasekaran et al., JBC 285, 19637 - 1 (2010)、Moore et al., MAbs 3:6 546 - 557 (2011)、Strop et al., JMB 420, 204 - 219 (2012)、Metz et al., Protein Engineering 25:10 571 - 580 (2012)、Labrijn et al., PNAS 110:113, 5145 - 5150 (2013)、Spreter Von Kreudenstein et al., MAbs 5:5 646 - 654 (2013))。二重特異性抗体は、S c F v融合を用いて生成される分子も含み得る。次に、2つの単一特異性s c f vは、独立して、単一の二重特異性分子を生成するために安定したヘテロ二量体を形成することが可能なF c領域に結合される (Mabry et al., PEDS 23:3 115 - 127 (2010))。二重特異性分子は、二重の結合能を有する。

【0025】

10

「抗ソルチリン抗体」または「ソルチリン抗体」(記載される文脈に応じて、本明細書において同義的に使用される)は、ソルチリン、特に、ソルチリンD領域、配列番号170に特異的に結合する抗体その抗原結合フラグメントである。ソルチリンD領域に結合する抗ソルチリン抗体は、通常、22nM以下、例えば22nM ~ 1nM、10nM ~ 1nMまたは5nM ~ 1nMで親和性 (IC50) を有するD領域(例えば配列番号185、186または187)内の3、4、5、6または7連続アミノ酸の立体配座エピトープまたは線状エピトープに結合するであろう。ある実施形態によれば、抗ソルチリン抗体は、A領域(配列番号180、181、182、183または184)にも結合し得るが、それらの主な生物学的機能は、D領域への結合によって達成されるものと考えられることが強調される。

20

【0026】

30

同定される結合部位は、例えばソルチリンへの選択的小分子リガンドAF38469の結合を有して示されるようにかなり独特である。AF38469の結合部位は、ニューロテンシンの結合部位に類似していることが示され、X線結晶構造解析によって特性評価された (Schroeder et al. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1; 24 (1): 177 - 80)。PGRNは、同じ部位に結合することが報告されている (Lee et al. Hum Mol Genet. 2013)。D領域、およびD+にそれぞれ結合する抗体45および68は、ソルチリンへのAF38469の結合を阻害しなかった。このデータは、これらの抗体が、AF38469およびニューロテンシンの結合部位と異なる、ソルチリンの結合部位を有することを示唆する。したがって、特定の実施形態において、本発明は、ソルチリンに特異的に結合し、ソルチリンへのPGRNの結合を阻害することが可能であるが、結合が、ソルチリンへのニューロテンシンまたはAF38469の結合を阻害しないかまたは実質的に阻害しない、抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。これは、例えば、シンチレーション近接アッセイ (SPA) を用いて、ソルチリンへの結合の移動を用いて示され得る(実施例11)。この発見を説明する1つの方法は、抗体、またはその抗原結合フラグメントが、ソルチリンの表面領域に結合している一方、ニューロテンシンのような小分子が、結合ポケットの内部に結合していることであり得る。

40

【0027】

本明細書において使用される際の「ヒト抗体」という用語(「humAb」または「H

50

u M a b」と略記され得る)は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列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を含み得る(例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異によって、または遺伝子再構成中に、または体細胞突然変異によって誘発される突然変異)。

【0028】

本明細書において使用される際の「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を指す。従来のモノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、2つ以上のF a b 領域から構成され得、それによって、2つ以上の標的に対する特異性を高める。「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、任意の特定の産生方法(例えば、組み換え、トランスジェニック、ハイブリドーマなど)によって限定されることは意図されていない。

【0029】

本発明の抗体、およびそのソルチリン抗原結合フラグメントは、好ましくは、ヒトまたは、例えばマウス抗体(1 F 2、5 E 1と示される)であり、特に治療目的に用いられる場合、「ヒト化」される。「ヒト化」という用語は、一般に組み換え技術を用いて調製される、非ヒト種に由来する免疫グロブリンから得られる抗原結合部位、およびヒト免疫グロブリンの構造および/または配列に基づいた残りの免疫グロブリン構造を有する分子を指す。抗原結合部位は、ヒト定常領域に融合された完全な非ヒト抗体可変領域、またはヒト可変領域の適切なヒトフレームワーク領域に移植されたこのような可変領域の相補性決定領域(C D R)のみのいずれかを含み得る。このようなヒト化分子のフレームワーク残基は、野生型(例えば、完全ヒト)であってもよく、またはそれらは、配列がヒト化のための基盤として機能したヒト抗体に見られない1つまたは複数のアミノ酸置換を含むように修飾され得る。ヒト化は、分子の定常領域がヒト個体における免疫原として働く可能性を低下させるかまたはなくすが、外来(foreign)可変領域に対する免疫応答の可能性は残る(LoBuglio, A. F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 86: 4220-4224)。別の手法は、ヒト由来の定常領域を提供することだけでなく、可変領域を改変して、それらをヒト型にできる限り近くなるように再形成することにも焦点を当てている。重鎖および軽鎖の両方の可変領域が、該当する抗原に対する応答が異なり、結合能を決定する3つの相補性決定領域(C D R)を含み、これらの相補性決定領域(C D R)には、所与の種において比較的保存され、かつC D Rの足場を提供すると考えられる4つのフレームワーク領域(F R)が隣接することが知られている。非ヒト抗体が、特定の抗原に対して調製される場合、可変領域は、非ヒト抗体に由来するC D Rを、改変されるヒト抗体中に存在するF Rに移植することによって、「再形成」または「ヒト化」され得る。様々な抗体に対するこの手法の適用は、Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53: 851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332: 323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239: 1534-1536; Ketleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", Protein Engineering 4: 773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "C

10

20

30

40

50

o n s t r u c t i o n O f R e s h a p e d H u m a n A n t i b o d i e s
W i t h H I V - N e u t r a l i z i n g A c t i v i t y ” , H u m a n A
n t i b o d i e s H y b r i d o m a 2 : 1 2 4 - 1 3 4 ; G o r m a n , S . D
. e t a l . (1 9 9 1) “ R e s h a p i n g A T h e r a p e u t i c C D
4 A n t i b o d y ” , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U . S . A .) 8
8 : 4 1 8 1 - 4 1 8 5 ; T e m p e s t , P . R . e t a l . (1 9 9 1) “ R e s
h a p i n g A H u m a n M o n o c l o n a l A n t i b o d y T o I n
h i b i t H u m a n R e s p i r a t o r y S y n c y t i a l V i r u s
I n f e c t i o n i n v i v o ” , B i o / T e c h n o l o g y 9 : 2 6 6 -
2 7 1 ; C o , M . S . e t a l . (1 9 9 1) “ H u m a n i z e d A n t i b o
d i e s F o r A n t i v i r a l T h e r a p y ” , P r o c . N a t l . A c
a d . S c i . (U . S . A .) 8 8 : 2 8 6 9 - 2 8 7 3 ; C a r t e r , P . e t
a l . (1 9 9 2) “ H u m a n i z a t i o n O f A n A n t i - p 1 8 5 h e
r 2 A n t i b o d y F o r H u m a n C a n c e r T h e r a p y ” , P r
o c . N a t l . A c a d . S c i . (U . S . A .) 8 9 : 4 2 8 5 - 4 2 8 9 ; お
よび C o , M . S . e t a l . (1 9 9 2) “ C h i m e r i c A n d H u m a n i
z e d A n t i b o d i e s W i t h S p e c i f i c i t y F o r T h e
C D 3 3 A n t i g e n ” , J . I m m u n o l . 1 4 8 : 1 1 4 9 - 1 1 5 4 によ
て報告されている。ある実施形態において、ヒト化抗体は、全ての C D R 配列（例えば、
マウス抗体に由来する全ての 6 つの C D R を含むヒト化マウス抗体）を保存する。他の実
施形態において、ヒト化抗体は、元の抗体に対して改変された 1 つまたは複数の C D R (1
つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、 5 つ、 6 つ) を有し、これらは、元の抗体からの 1 つまたは複
数の C D R 「に由来する」 1 つまたは複数の C D R とも呼ばれる。抗原をヒト化する能
力は周知である（例えば、米国特許第 5,225,539 号明細書；同第 5,530,101 号明細書；
同第 5,585,089 号明細書；同第 5,859,205 号明細書；同第 6,407,213 号明細書；同第
6,881,557 号明細書を参照）。 20

【 0 0 3 0 】

「抗体「 X X 」という用語は、そのそれぞれの配列番号によって定義される軽鎖、軽鎖可
変領域、または軽鎖可変領域 C D R 1 ~ 3 、およびそのそれぞれの配列番号によって定
義される重鎖、重鎖可変領域、または重鎖可変領域 C D R 1 ~ 3 を含むかまたはそれから
なる抗体、またはその抗原結合フラグメント（例えば抗体「 5 E 1 」）を示すことが意図
される。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、それらの配
列番号によって定義されて含まれるそれらの全重鎖可変領域およびそれらの配列番号によ
つて定義されるそれらの軽鎖可変領域によって定義される。 30

【 0 0 3 1 】

この領域中のアミノ酸残基の番号付けは、 I M G T (登録商標) 、国際 I m M u n o G
e n e T i c s 情報システム (登録商標) または、 K a b a t , E . A . , W u , T . T
. , P e r r y , H . M . , G o t t e s m a n n , K . S . & F o e l l e r , C .
(1 9 9 1) . S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o
g i c a l I n t e r e s t , 5 t h e d i t . , N I H P u b l i c a t i o n
n o . 9 1 - 3 2 4 2 、米国保健福祉省 (U . S . D e p a r t m e n t o f H e
a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s) ; C h o t h i a , C . & L e s
k , A . M . (1 9 8 7) . C a n o n i c a l s t r u c t u r e s F o r T h e
H y p e r v a r i a b l e d o m a i n s O f I m m u n o g l o b l i n
s . J . M o l . B i o l . 1 9 6 , 9 0 1 - 9 1 7 にしたがって行われる。 40

【 0 0 3 2 】

本明細書において使用される際、抗体またはその抗原結合フラグメントは、別のエピト
ープと比べてそのエピトープと、より高頻度で、より迅速に、より長い期間および / または
より高い親和性または結合活性で反応または会合する場合、別の分子（すなわち、エピ
トープ）の領域に「特異的に」結合するといわれる。一実施形態において、本発明の抗体
50

、またはその抗原結合フラグメントは、別の分子よりその標的（ソルチリン）に少なくとも10倍強く；好ましくは、少なくとも50倍強く、より好ましくは、少なくとも100倍強く結合する。好ましくは、抗体、またはその抗原結合フラグメントは、生理学的条件下で、例えば、生体内で結合する。したがって、「ソルチリンに特異的に結合する」とは、このような特異性および／またはこのような条件下でソルチリンに結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントの能力を包含する。このような結合を決定するのに好適な方法が、当業者に公知であり、例示的な方法が、添付の実施例に記載されている。本明細書において使用される際、所定の抗原への抗体の結合の文脈における「結合」という用語は、典型的に、抗原をリガンドとしておよび抗体を検体として用いてBIAcore（登録商標）3000またはT200機器のいずれかにおいて例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって決定した際の約 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M以下、例えば約 10^{-9} M以下のKDに対応する親和性での結合を指し、所定の抗原または密接に関連している抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）への結合に対するその親和性より少なくとも10倍低い、例えば少なくとも100倍低い、例えば少なくとも1,000倍低い、例えば少なくとも10,000倍低い、例えば少なくとも100,000倍低いKDに対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性がより低くなる量は、抗体のKDに依存するため、抗体のKDが非常に低い（すなわち、抗体が非常に特異的である）場合、抗原に対する親和性が、非特異的抗原に対する親和性より低くなる量は、少なくとも10,000倍であり得る。特に、本発明は、例えば、Octet 384RED（実施例8）を用いたバイオレイヤー干渉法によって決定されるとき、22nM以下、例えば22nM～1nM、10nM～1nMまたは5nM～1nMに対応する結合親和性を示す抗ソルチリン抗体に関する。10 20

【0033】

本発明の特定の実施形態において、本発明は、ソルチリンへの結合についてhumAb抗体45またはhumAb抗体68と競合することが可能な抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。別の実施形態において、本発明は、配列番号170に定義されるソルチリンのD領域への結合について抗体45と競合することが可能な抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。このような競合的な結合の阻害は、当該技術分野において周知のアッセイおよび方法を用いて、例えば固定化ヒトソルチリンとともにBIAcore（登録商標）チップを用いて、試験される抗体ポリペプチドを用いておよび用いずに对照抗体（抗体「45」または「68」など）とともにインキュベートして決定され得る。あるいは、ペアワイスマッピング手法が使用され得、この手法では、対照抗体（抗体「45」または「68」など）が、BIAcore（登録商標）チップの表面に固定され、ヒトソルチリン抗原が固定化抗体に結合され、次に、二次抗体がヒトソルチリンに対する同時結合能力について試験される（開示内容が参照により本明細書に援用される‘BIAcore（登録商標）Assay Handbook’, GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012を参照）。30

【0034】

本明細書において使用される際の「kd」（秒 -1 または $1/\text{秒}$ ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。前記値は、koff値とも呼ばれる。40

【0035】

本明細書において使用される際の「ka」（M $-1 \times \text{秒}^{-1}$ または $1/\text{M秒}$ ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の結合速度定数を指す。

【0036】

本明細書において使用される際の「KD」（M）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指し、kdをkaで除算することによって得られる。

【0037】

本明細書において使用される際の「KA」（M -1 または $1/\text{M}$ ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の結合平衡定数を指し、kaをkdで除算することによって得られる。50

【0038】

一実施形態において、本発明は、以下の特性：

(i) 0.5 ~ 10 nM、例えば1 ~ 5 nMまたは1 ~ 2 nMのソルチリンに対する結合親和性(K_D)；

(ii) ソルチリンへのPGRN結合を減少させ、および/または阻害する能力；

(iii) ソルチリン発現細胞によってPGRNのクリアランスを減少させ、および/または阻害する能力；

(iv) ソルチリン発現細胞によってPGRNのエンドサイトーシスを減少させ、および/または阻害する能力；

(v) ヒト-ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中のPGRNの量および/または濃度を増加させる能力 10

の1つまたは複数を示す抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0039】

「ソルチリンへのPGRN結合を減少させ、および/または阻害する能力」という用語は、実施例10に開示される時間分解蛍光アッセイ(HTFR)を用いて、50 nM未満であるが、好ましくは、10 nM ~ 0.2 nMのIC50でPGRNへの結合を阻害する能力を有する抗体を含む。

【0040】

「ソルチリン発現細胞によってPGRNのクリアランスを減少させ、および/または阻害する能力」という用語は、実施例13に開示されるELISAアッセイによって測定した際に、少なくとも25%、例えば25% ~ 500%、25% ~ 400%または25% ~ 200%だけ培地中のPGRNの濃度を増加させる能力を含む。 20

【0041】

「ソルチリン発現細胞によってPGRNのエンドサイトーシスを減少させ、および/または阻害する能力」は、実施例12に開示されるセロミクスベースのアッセイによって測定した際に少なくとも10%であるが、好ましくは、20 ~ 100%だけPGRNの細胞内濃度を減少させる能力を含む。

【0042】

「ヒト-ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中のPGRNの量および/または濃度を増加させる能力」は、実施例15に開示されるELISAアッセイによって測定した際に少なくとも25%であるが、好ましくは、50 ~ 500パーセントだけ血漿中のPGRNの濃度を増加させる能力を含む。 30

【0043】

脳内のPGRNを増加させる能力がまた、例えば微小透析によって測定され得ることが想定される。したがって、「脳内のPGRNの量および/または濃度を増加させる能力」とは、微小透析によって測定した際に少なくとも25%であるが、好ましくは、50 ~ 500パーセントだけ脳内のPGRNの濃度を増加させる能力を含む。

【0044】

いくつかの抗体において、CDRのごく一部、すなわち、SDRと呼ばれる、結合に必要とされるCDR残基のサブセットが、ヒト化抗体において結合を保持するのに必要とされる。関連するエピトープに接触せず、SDR中ないCDR残基が、過去の研究に基づいて(例えばCDR H2中の残基H60 ~ H65は、必要とされないことが多い)、Chothia超可変ループの外側にあるKabat CDRの領域から(Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins", J. Mol. Biol. 196: 901-917を参照)、分子モデリングによっておよび/または実験により、またはGonzales, N. R. et al. (40

2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", Mol. Immunol. 41: 863-872に記載されるように特定され得る。1つまたは複数のドナーカードリ残基が存在しないかまたは全ドナーカードリが省略される位置におけるこのようなヒト化抗体において、この位置を占めるアミノ酸は、受容体抗体配列において(カバット番号付けによって)対応する位置を占めるアミノ酸であり得る。含まれるCDR中のドナーアミノ酸に対する受容体のこのような置換の数は、競合する考慮事項のバランスを反映する。このような置換は、ヒト化抗体中のマウスアミノ酸の数を減少させ、結果として、潜在的な免疫原性を低下させるのに潜在的に有利である。しかしながら、置換は、親和性の変化も引き起こすことがあり、親和性の著しい低下は回避されるのが好ましい。CDR内の置換の位置および置換するアミノ酸も、実験により選択され得る。

【0045】

CDR残基の単一のアミノ酸改変が、機能的結合の喪失をもたらし得るということ(Rudikoff, S. et al. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-binding Specificity", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6): 1979-1983)は、別の機能的CDR配列を系統的に同定するための手段を提供する。このような変異体CDRを得るための1つの好ましい方法において、CDRをコードするポリヌクレオチドが突然変異を起こされて(例えばランダム突然変異によって、または部位特異的方法(例えば、突然変異遺伝子座をコードするプライマーによるポリメラーゼ連鎖媒介性增幅)によって)、置換アミノ酸残基を有するCDRを生成する。元の(機能的)CDR配列中の関連する残基の同一性を、置換される(非機能的)変異体CDR配列の同一性と比較することによって、その置換についてのBLOSUM62.ij置換スコアが特定され得る。BLOSUMシステムは、信頼できるアラインメントについて配列のデータベースを分析することによって作成されるアミノ酸置換のマトリックスを提供する(Eddy, S. R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", Nature Biotech. 22(8): 1035-1036; Henikoff, J. G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 2264-2268; Altschul, S. F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", J. Mol. Biol. 219, 555-565。現在、最先端のBLOSUMデータベースは、BLOSUM62データベース(BLOSUM62.ij)である。表1は、BLOSUM62.ij置換スコアを示す(スコアが高くなるほど、置換がより保存的になり、ひいては置換が機能に影響を与えない可能性が高くなる)。得られるCDRを含む抗原結合フラグメントが、ソルチリンに結合できない場合、例えば、BLOSUM62.ij置換スコアは、不十分に保存的であると見なされ、より高い置換スコアを有する新たな置換候補が選択され、生成される。したがって、例えば、元の残基がグルタミン酸塩(E)であり、非機能的置換残基がヒスチジン(H)である場合、BLOSUM62.ij置換スコアは0であり、より保存的な変化(アスパラギン酸塩、アスパラギン、グルタミン、またはリジンなどへの)が好ましい。

【0046】

【表1】

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	-4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	-5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	-5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3	
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	-5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+1	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

【0047】

したがって、本発明は、改良されたCDRを同定するためのランダム突然変異の使用を想定している。本発明の文脈において、保存的置換は、以下の3つの表の1つまたは複数に反映されているアミノ酸の種類の範囲内の置換によって定義され得る。

【0048】

【表2】

保存的置換のためのアミノ酸残基クラス:

表2

酸性残基	Asp (D)およびGlu (E)
塩基性残基	Lys (K)、Arg (R)、およびHis (H)
親水性非荷電性残基	Ser (S)、Thr (T)、Asn (N)、およびGln (Q)
脂肪族非荷電性残基	Cly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、およびIle (I)
非極性非荷電性残基	Cys (C)、Met (M)、およびPro (P)
芳香族残基	Phe (F)、Tyr (Y)、およびTrp (W)

【0049】

10

20

30

40

【表3】

別の保存的アミノ酸残基置換クラス:

表3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

10

【0050】

【表4】

アミノ酸残基の別の物理的および機能的分類:

表4	
アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V および M
シクロアルケニル結合残基	F, H, W および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W および Y
負荷電残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S および T
正荷電残基	H, K および R
小型残基	A, C, D, G, N, P, S, T および V
非常に小型の残基	A, G および S
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P および T
可撓性残基	Q, T, K, S, G, P, D, E および R

20

30

【0051】

より保存的な置換基 (substitution grouping) としては、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、およびアスパラギン - グルタミンが挙げられる。

【0052】

アミノ酸のさらなる基は、例えば、Creighton (1984) Proteins: Structure and Molecular Properties (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company に記載されている原理を用いて配合され得る。

40

【0053】

ファージディスプレイ技術が、CDR親和性を増加させる（または低下させる）のに代わりに使用され得る。親和性成熟と呼ばれるこの技術は、突然変異または「CDRウォーキング (walking)」を用い、再選択 (re-selection) は、標的抗原またはその抗原性の抗原結合フラグメントを使用して、初期抗体または親抗体と比較した際に、抗原に対するより高い（またはより低い）親和性で結合するCDRを有する抗体を同定する（例えばGlasner et al. (1992) J. Immunology 149: 3903を参照）。単一のスクレオチドではなくコドン全体の突然変異誘発は、

50

アミノ酸突然変異の半ランダム化レパートリーをもたらす。変異体クローニングのプールからなるライブラリーが構築され得、変異体クローニングのそれぞれが、単一のCDR中の単一のアミノ酸改変により異なり、各CDR残基に対して各可能なアミノ酸置換を提示する変異体を含む。抗原に対する増加した（または低下した）結合親和性を有する突然変異体は、固定化突然変異体を標識抗原と接触させることによってスクリーニングされ得る。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング方法が、抗原に対する増加したまたは低下した親和性を有する突然変異体抗体を同定するのに使用され得る（例えば、ELISA）（Wu et al. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 95: 6037; Yelton et al., 1995, J. Immunology 155: 1994を参照）。軽鎖をランダム化するCDRウォーキングが、使用され得る（Schier et al., 1996, J. Mol. Bio. 263: 551を参照）。

【0054】

このような親和性成熟を達成するための方法は、例えば：Krause, J. C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", MBio. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C. T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas", Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functional Landscapes", J. Mol. Biol. 401(1): 84-96; Montgomery, D. L. et al. (2009) "Affinity Maturation and Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41", MAbs 1(5): 462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fab's With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth", Virology 393(1): 112-119; 最後に、W. J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions", J. Mol. Biol. 388(3): 541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development", Methods Mol. Biol. 525: 353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification", Mol. Immunol. 46(1): 1-50

35-144；およびBardeiras, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105 (26) : 9029-9034に記載されている。

【0055】

したがって、包含される抗体またはそれらの抗原結合フラグメントのCDR変異体の配列は、置換によって；例えば置換される4つのアミノ酸残基、3つのアミノ酸残基、2つのアミノ酸残基または1つのアミノ酸残基によって、親抗体のCDRの配列と異なり得る。本発明の一実施形態によれば、CDR領域中のアミノ酸が、以下の3つの表において定義されるように、保存的置換で置換され得ることがさらに想定される。

10

【0056】

「トランスジェニック非ヒト動物」という用語は、1つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖導入遺伝子または導入染色体(trans-chromosome)（動物の天然ゲノムDNAへと統合されるかまたは非統合のいずれか）を含み、完全ヒト抗体を発現することが可能なゲノムを有する非ヒト動物を指す。例えば、トランスジェニックマウスは、マウスが、ソルチリン抗原および/またはソルチリンを発現する細胞で免疫されるときにヒト抗ソルチリン抗体を産生するように、ヒト軽鎖導入遺伝子およびヒト重鎖導入遺伝子またはヒト重鎖導入染色体のいずれかを有し得る。ヒト重鎖導入遺伝子は、トランスジェニックマウス、例えばHuMAbマウス(HCo7またはHCo12マウスなど)の場合と同様に、マウスの染色体DNAへと統合され得、またはヒト重鎖導入遺伝子は、国際公開第02/43478号パンフレットに記載されるように、導入染色体KMマウスの場合と同様に、染色体過剰に(extra-chromosomal)維持され得る。このようなトランスジェニックおよび導入染色体マウス(本明細書においてまとめて「トランスジェニックマウス」と呼ばれる)は、V-D-J組み換えおよびアイソタイプスイッチングを行うことによって、所与の抗原(IgG, IgA, IgM, IgDおよび/またはIgEなど)に対するヒトモノクローナル抗体の複数のアイソタイプを産生することが可能である。

20

【0057】

トランスジェニック、非ヒト動物も、特定の抗体をコードする遺伝子を導入することによって、例えば動物の乳汁中で発現される遺伝子間を作動可能に連結することによって、特定の抗原に対する抗体の産生に使用され得る。

30

【0058】

本明細書において使用される際の「治療(treatment)」または「治療すること(treatment)」という用語は、疾患または障害の進行または重症度を改善し、遅らせ、軽減し、または抑制すること、またはこのような疾患または障害の1つまたは複数の症状または副作用を改善し、遅らせ、軽減し、または抑制することを意味する。本発明の趣旨では、「治療」または「治療すること」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るために手法をさらに意味し、ここで、「有益なまたは所望の臨床結果」としては、限定はされないが、部分的であるかまたは全体的であるか、検出可能かまたは検出不可能かにかかわらず、症状の軽減、障害または疾患の程度の減少、安定した(すなわち、悪化していない)疾患または障害状態、疾患または障害状態の進行の遅延または緩徐化、疾患または障害状態の改善または緩和、および疾患または障害の寛解が挙げられる。

40

【0059】

「有効量」は、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントに適用される場合、意図される生物学的效果または所望の治療結果(限定はされないが臨床結果を含む)を達成するのに、必要な投与量および期間にわたる、十分な量を指す。「治療的に有効な量」という語句は、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントに適用される場合、障害もしくは疾患の状態の進行、または障害もしくは疾患の症状の進行を改善し、緩和し、安定させ、抑制し、遅らせ、軽減し、または遅延させるのに十分な、抗体、またはその抗原結合フラグメントの量を表すことが意図される。一実施形態において、本発明の方法は、他の化

50

合物と組み合わせた、抗体、またはその抗原結合フラグメントの投与を提供する。このような場合、「有効量」は、意図される生物学的效果を引き起こすのに十分な組合せの量である。

【0060】

本発明の抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびに抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメントが個体における所望の応答を引き起こす能力などの要因に応じて変化し得る。治療的に有効な量はまた、抗体または抗体部分の何らかの毒性または有害作用を、治療的に有益な効果が上回る量である。

【0061】

抗体は、好ましくは、ヒトまたはヒト化抗体である。

【0062】

この領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、IMGT(登録商標)、国際IMMunoG e n e T i c s情報システム(登録商標)または、Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immuno logical Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242、米国保健福祉省(U. S. Department of Health and Human Services); Chothia, C. & Lessk, A. M. (1987). Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917にしたがう。

【0063】

抗体5E1:

したがって、本発明は、

- (a) 配列番号1のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1;
- (b) 配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2;
- (c) 配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3;
- (d) 配列番号4のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1;
- (e) 配列番号5のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2; および
- (f) 配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0064】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号8の重鎖可変領域および配列番号7の軽鎖可変領域を含むかまたはそれなり得る。

【0065】

抗体1F2:

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1;
- (b) 配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2;
- (c) 配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3;
- (d) 配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1;
- (e) 配列番号13のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2; および
- (f) 配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0066】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号16の重鎖可変領域および配列番号15の軽鎖可変領域を含むかまたはそれなり得る。

【0067】

抗体068:

10

20

30

40

50

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1；
- (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2；
- (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3；
- (d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1；
- (e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2；および
- (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0068】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 24 の重鎖可変領域および配列番号 23 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。 10

【0069】

抗体 1320：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1；
- (b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2；
- (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3；
- (d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1；
- (e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2；および
- (f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0070】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 31 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。 20

【0071】

抗体 93-05：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 33 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1；
- (b) 配列番号 34 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2；
- (c) 配列番号 35 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3；
- (d) 配列番号 36 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1；
- (e) 配列番号 37 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2；および
- (f) 配列番号 38 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0072】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 40 の重鎖可変領域および配列番号 39 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。 30

【0073】

抗体 93-01：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 41 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1；
- (b) 配列番号 42 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2；
- (c) 配列番号 43 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3；
- (d) 配列番号 44 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1；
- (e) 配列番号 45 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2；および
- (f) 配列番号 46 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0074】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 48 の重鎖可変領域および配列番号 47 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。 40

【0075】

抗体924：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号49のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号50のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号51のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号52のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号53のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号54のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

10

【0076】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号56の重鎖可変領域および配列番号55の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0077】

抗体1276：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号57のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号58のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号59のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号60のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号61のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号62のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

20

【0078】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号64の重鎖可変領域および配列番号63の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0079】

抗体849：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号65のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号66のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号67のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号68のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号69のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号70のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

30

【0080】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号72の重鎖可変領域および配列番号71の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0081】

40

抗体531-02：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号73のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号74のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号75のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号76のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号77のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号78のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0082】

50

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 8 0 の重鎖可変領域および配列番号 7 9 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【 0 0 8 3 】

抗体 5 4 8 - 0 1 :

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 8 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 8 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 8 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

10

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【 0 0 8 4 】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 8 8 の重鎖可変領域および配列番号 8 7 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【 0 0 8 5 】

抗体 5 4 8 - 0 2 :

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 9 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 9 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 9 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 9 3 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 9 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

20

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【 0 0 8 6 】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 9 6 の重鎖可変領域および配列番号 9 5 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【 0 0 8 7 】

抗体 1 2 8 9 - 0 2 :

30

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【 0 0 8 8 】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 1 0 4 の重鎖可変領域および配列番号 1 0 3 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

40

【 0 0 8 9 】

抗体 8 1 1 - 0 2 :

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ;
- (b) 配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ;
- (c) 配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ;
- (d) 配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 ;
- (e) 配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 ; および
- (f) 配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3

50

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0090】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号112の重鎖可変領域および配列番号111の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0091】

抗体566-01：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号113のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号114のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号115のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号116のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号117のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号118のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0092】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号120の重鎖可変領域および配列番号119の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0093】

抗体562：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号121のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号122のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号123のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号124のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号125のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号126のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0094】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号128の重鎖可変領域および配列番号127の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0095】

抗体193：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号129のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号130のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号131のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号132のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；
- (e) 配列番号133のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2；および
- (f) 配列番号134のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0096】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号136の重鎖可変領域および配列番号135の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0097】

抗体88：

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号137のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1；
- (b) 配列番号138のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2；
- (c) 配列番号139のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3；
- (d) 配列番号140のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1；

10

20

30

40

50

(e) 配列番号 141 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 ; および
 (f) 配列番号 142 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3
 を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0098】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 144 の重鎖可変領域および配列番号 143 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0099】

抗体 045 :

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 145 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1 ;
- (b) 配列番号 146 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 ;
- (c) 配列番号 147 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3 ;
- (d) 配列番号 148 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1 ;
- (e) 配列番号 149 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 ; および
- (f) 配列番号 150 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0100】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 152 の重鎖可変領域および配列番号 151 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0101】

抗体 044 :

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 153 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1 ;
- (b) 配列番号 154 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 ;
- (c) 配列番号 155 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3 ;
- (d) 配列番号 156 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1 ;
- (e) 配列番号 157 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 ; および
- (f) 配列番号 158 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0102】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 160 の重鎖可変領域および配列番号 159 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0103】

抗体 002 :

別の実施形態によれば、本発明は、

- (a) 配列番号 161 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1 ;
- (b) 配列番号 162 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 ;
- (c) 配列番号 163 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3 ;
- (d) 配列番号 164 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1 ;
- (e) 配列番号 165 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 ; および
- (f) 配列番号 166 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

を含むかまたはそれからなる抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0104】

好ましくは、モノクローナル抗体は、配列番号 168 の重鎖可変領域および配列番号 167 の軽鎖可変領域を含むかまたはそれからなり得る。

【0105】

上述される抗体は、一実施形態によれば、前記 CDR1、CDR2、および / または CDR3 (VH および / または VL) 配列からの、4つ以下のアミノ酸差、または 3つ以下のアミノ酸差、または 2つ以下のアミノ酸差、または 1つ以下のアミノ酸差を有する変異体をさらに含み得る。

10

20

30

40

50

【0106】

さらに、抗体は、薬学的に許容できる担体と一緒に組成物中にあり得る。本発明の抗体は、治療に使用され得る。特に、本発明の抗体は、FTDまたはALSまたはTDP43タンパク質症（アルツハイマー病（AD）など）を治療するのに使用され得る。

【0107】

本発明によって想定される治療は、長期であってもよく、患者は、少なくとも2週間、例えば少なくとも1ヶ月間、6ヶ月間、1年間またはそれ以上治療され得る。

【0108】

本発明の抗体は、例えば、Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975) によって最初に記載されているハイブリドーマ方法によって產生されるモノクローナル抗体であってもよく、または組み換えDNAもしくは他の方法によって產生されるモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体はまた、例えば、Clarkson et al., *Nature* 352, 624 - 628 (1991) およびMarks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581 - 597 (1991) に記載されている技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。モノクローナル抗体は、任意の好適な源から得られる。したがって、例えば、モノクローナル抗体は、例えば、表面において抗原を発現する細胞、または該当する抗原をコードする核酸の形態で、該当する抗原で免疫されたマウスから得られるマウス脾臓Bリンパ球細胞から調製されるハイブリドーマから得られる。モノクローナル抗体はまた、免疫されたヒトまたは非ヒト哺乳動物（ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、靈長類など）の抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得られる。

【0109】

一実施形態において、本発明の抗体は、ヒト抗体である。ソルチリンに対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を有するトランスジェニックまたは染色体導入マウスを用いて生成され得る。このようなトランスジェニックおよび染色体導入マウスは、本明細書においてそれぞれHuMAbマウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスを含む。

【0110】

HuMAbマウスは、内因性 μ およびK鎖遺伝子座を不活性化する標的突然変異と一緒に、再配列されていないヒト重鎖可変および定常（ μ およびY）ならびに軽鎖可変および定常（）鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座（minilocus）を含む（Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856 - 859 (1994)）。したがって、マウスは、マウスIgMまたはKの減少した発現を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子が、クラススイッチおよび体細胞突然変異を起こして、高親和性ヒトIgG、kモノクローナル抗体を生成する（Lonberg, N. et al. (1994)、上記参照；Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49 - 101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65 - 93 (1995) およびHarding, F. and Lonberg, N., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764 536 - 546 (1995) に概説されている）。HuMAbマウスの作製は、Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287 - 6295 (1992)、Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647 - 656 (1993)、Tuaililon et al., *J. Immunol.* 152, 2912 - 2920 (1994)、Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579 - 591 (1994)、Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845 - 851 (1996) に詳細に記載されている。米国特許第5,545,806号明細書、米国特許第5,569,825号明細書、米国特許第5,625,126号明細書、米国特許第5,633,50

425号明細書、米国特許第5,789,650号明細書、米国特許第5,877,397号明細書、米国特許第5,661,016号明細書、米国特許第5,814,318号明細書、米国特許第5,874,299号明細書、米国特許第5,770,429号明細書、米国特許第5,545,807号明細書、国際公開第98/24884号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第93/1227号パンフレット、国際公開第92/22645号パンフレット、国際公開第92/03918号パンフレットおよび国際公開第01/09187号パンフレットも参照されたい。

【0111】

HCo7、HCo12、HCo17およびHCo20マウスは、それらの内因性軽鎖()遺伝子におけるJKD破壊(Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されているように)、それらの内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊(国際公開第01/14424号パンフレットの実施例1に記載されているように)、およびKC05ヒト軽鎖導入遺伝子(Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されているように)を有する。さらに、HCo7マウスは、HCo7ヒト重鎖導入遺伝子(米国特許第5,770,429号明細書に記載されているように)を有し、HCo12マウスは、HCo12ヒト重鎖導入遺伝子(国際公開第01/14424号パンフレットの実施例2に記載されているように)を有し、HCo17マウスは、HCo17ヒト重鎖導入遺伝子(国際公開第01/09187号パンフレットの実施例2に記載されているように)を有し、HCo20マウスは、HCo20ヒト重鎖導入遺伝子を有する。得られるマウスは、内因性マウス重鎖および軽鎖遺伝子座の破壊のためにバックグラウンドのホモ接合体においてヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子を発現する。

【0112】

KMマウス株において、内因性マウス軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されているようにホモ接合的に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、国際公開第01/09187号パンフレットの実施例1に記載されているようにホモ接合的に破壊されている。このマウス株は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されているように、ヒト軽鎖導入遺伝子、KC05を保有する。このマウス株は、国際公開第02/43478号パンフレットに記載されているように、染色体14フラグメントhCF(SC20)から構成されるヒト重鎖導入染色体も保有する。HCo12-Balb/c、HCo17-Balb/cおよびHCo20-Balb/cマウスは、国際公開第09/097006号パンフレットに記載されているように、HCo12、HCo17およびHCo20を、KC05[J/K](Balb)に交差させることによって生成され得る。

【0113】

KMマウス株において、内因性マウス軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されているようにホモ接合的に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、国際公開第01/09187号パンフレットの実施例1に記載されているようにホモ接合的に破壊されている。このマウス株は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されているように、ヒト軽鎖導入遺伝子、KC05を保有する。このマウス株は、国際公開第02/43478号パンフレットに記載されているように、染色体14抗原結合フラグメントhCF(SC20)から構成されるヒト重鎖導入染色体も保有する。

【0114】

これらのトランスジェニックマウスに由来する脾細胞は、周知の技術にしたがって、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを生成するのに使用され得る。本発明のヒトモノクローナルもしくはポリクローナル抗体、または他の種に由来する本発明の抗体はまた、該当する免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列についてトランスジェニックな別の

10

20

30

40

50

非ヒト哺乳動物または植物の生成、および回収可能な形態での抗体の產生によって遺伝子導入的に生成され得る。哺乳動物におけるトランスジェニック產生に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁中で產生され、それから回収され得る。例えば米国特許第5,827,690号明細書、米国特許第5,756,687号明細書、米国特許第5,750,172号明細書および米国特許第5,741,957号明細書を参照されたい。

【0115】

本発明の抗体は、任意のアイソタイプのものであり得る。アイソタイプの選択は、典型的に、ADC誘導などの所望のエフェクター機能によって導かれる。例示的なアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4である。ヒト軽鎖定常領域、またはのいずれかが使用され得る。必要に応じて、本発明の抗ソルチリン抗体のクラスは、公知の方法によってスイッチされ得る。例えば、元はIgMであった本発明の抗体は、本発明のIgG抗体にクラススイッチされ得る。さらに、クラススイッチ技術は、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に変換するのに使用され得る。したがって、本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療的使用のために、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgEまたはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変更され得る。一実施形態において、本発明の抗体は、IgG1抗体、例えばIgG1、kである。抗体は、そのアミノ酸配列が、他のアイソタイプと比べてそのアイソタイプに最も相同意識性が高い場合、特定のアイソタイプのものであるといわれる。

【0116】

一実施形態において、本発明の抗体は、完全長抗体、好ましくは、IgG抗体、特に、IgG1、k抗体である。別の実施形態において、本発明の抗体は、抗体抗原結合フラグメントまたは一本鎖抗体である。

【0117】

抗体およびその抗原結合フラグメントは、例えば従来の技術を用いた抗原結合断片化によって得られ、抗原結合フラグメントは、全抗体について本明細書に記載されるのと同じように有用性についてスクリーニングされ得る。例えば、F(ab')2抗原結合フラグメントは、抗体をペプシンで処理することによって生成され得る。得られるF(ab')2抗原結合フラグメントは、ジスルフィド架橋を還元するように処理されて、Fab'抗原結合フラグメントを生成し得る。Fab'抗原結合フラグメントはIgG抗体をペプシンで処理することによって得られ；Fab'抗原結合フラグメントは、IgG抗体のペプシン消化により得られる。F(ab')2抗原結合フラグメントはまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合により、以下に記載されるFab'を結合することによって生成され得る。Fab'抗原結合フラグメントは、F(ab')2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる抗体抗原結合フラグメントである。Fab'-抗原結合フラグメントは、F(ab')2抗原結合フラグメントを、ジチオスレイトールなどの還元剤で処理することによって得られる。抗体抗原結合フラグメントはまた、組み換え細胞におけるこのような抗原結合フラグメントをコードする核酸の発現によって生成され得る（例えばEvans et al. , J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)を参照）。例えば、F(ab')2抗原結合フラグメントの一部をコードするキメラ遺伝子は、このような切断された抗体抗原結合フラグメント分子を生成するために、H鎖のCH1領域およびヒンジ領域をコードするDNA配列、続いて翻訳停止コドンを含み得る。

【0118】

一実施形態において、抗ソルチリン抗体は、一価抗体、好ましくは、ヒンジ領域の欠失を有する国際公開第2007059782号パンフレット（その全体が参考により本明細書に援用される）に記載されている一価抗体である。したがって、一実施形態において、抗体は、一価抗体であり、前記抗ソルチリン抗体は、i)前記一価抗体の軽鎖をコードする核酸構築物を提供する工程であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗ソルチ

10

20

30

40

50

ン抗体のV L領域をコードするヌクレオチド配列およびI gの定常C L領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、選択された抗原特異的抗体のV L領域をコードする前記ヌクレオチド配列およびI gのC L領域をコードする前記ヌクレオチド配列が、作動可能に一緒に連結され、I g G 1サブタイプの場合、C L領域をコードするヌクレオチド配列は、ポリクローナルヒトI g Gの存在下でまたは動物もしくはヒトに投与されるとき、C L領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとともにジスルフィド結合または共有結合を形成することが可能なアミノ酸をC L領域が含まないように修飾されている工程と；i i)前記一価抗体の重鎖をコードする核酸構築物を提供する工程であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗体のV H領域をコードするヌクレオチド配列およびヒトI gの定常C H領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、C H領域をコードするヌクレオチド配列は、ヒンジ領域に対応する領域および、I gサブタイプによって必要とされるように、C H 3領域などのC H領域の他の領域が、ポリクローナルヒトI g Gの存在下でまたは動物ヒトに投与されるとき、ヒトI gのC H領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとともに、ジスルフィド結合または共有結合または安定した非共有重鎖間結合の形成に関するアミノ酸残基を含まないように修飾されており、選択された抗原特異的抗体のV H領域をコードする前記ヌクレオチド配列および前記I gのC H領域をコードする前記ヌクレオチド配列が、作動可能に一緒に連結される工程と；i i i)前記一価抗体を生成するために細胞発現系を提供する工程と；i v)(i i i)の細胞発現系の細胞内で(i)および(i i)の核酸構築物を共発現することによって、前記一価抗体を生成する工程とを含む方法によって構築される。

【0119】

同様に、一実施形態において、抗ソルチリン抗体は、

(i) 本明細書に記載される本発明の抗体の可変領域または前記領域の抗原結合部分、および

(i i)免疫グロブリンのC H領域またはC H 2およびC H 3領域を含むその領域を含む一価抗体であり、ここで、C H領域またはその領域は、ヒンジ領域に対応する領域および、免疫グロブリンがI g G 4サブタイプでない場合、C H 3領域などのC H領域の他の領域が、ポリクローナルヒトI g Gの存在下で、同一のC H領域とともにジスルフィド結合を形成するか、または同一のC H領域とともに他の共有結合または安定した非共有重鎖間結合を形成することが可能なアミノ酸残基を含まないように修飾されている。

【0120】

さらなる実施形態において、一価抗体の重鎖は、ヒンジ領域全体が欠失しているように修飾されている。

【0121】

別のさらなる実施形態において、前記一価抗体の配列は、それがN結合型グリコシル化のための受容体部位を含まないように修飾されている。

【0122】

本発明は、抗ソルチリン結合領域（例えば、抗ソルチリンモノクローナル抗体のソルチリン結合領域）が、2つ以上のエピトープを標的にする二価または多価二重特異性骨格の一部である「二重特異性抗体」も含む（例えば、第2のエピトープは、二重特異性抗体が、血液脳関門などの生物学的障壁を越える改良されたトランスサイトーシスを示し得るように、活性な輸送受容体のエピトープを含み得る）。したがって、別のさらなる実施形態において、抗ソルチリン抗体の一価F a bは、異なるタンパク質を標的にするさらなるF a bまたはs c f vに結合されて、二重特異性抗体を生成し得る。二重特異性抗体は、二重機能、例えば抗ソルチリン結合領域によって与えられる治療機能、および血液脳関門などの生物学的障壁を越える輸送を促進するために受容体分子に結合し得る輸送機能を有し得る。

【0123】

本発明の抗体、およびその抗原結合フラグメントは、一本鎖抗体も含む。一本鎖抗体は、重鎖および軽鎖F v領域が結合されたペプチドである。一実施形態において、本発明は

10

20

30

40

50

、本発明の抗ソルチリン抗体の Fv における重鎖および軽鎖が、ペプチド一本鎖において（典型的に、約 10、12、15 つまたはそれ以上のアミノ酸残基の）フレキシブルペプチドリンカーと結合される一本鎖 Fv (scFv) を提供する。このような抗体を产生する方法が、例えば米国特許第 4,946,778 号明細書、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)、Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)、Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) および McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) に記載されている。一本鎖抗体は、単一の VH および VL のみが使用される場合、一価であり、2 つの VH および VL が使用される場合、二価であり、または 3 つ以上の VH および VL が使用される場合、多価であり得る。

【0124】

本明細書に記載される抗体およびその抗原結合フラグメントは、任意の好適な数の修飾アミノ酸の包含および / またはこのような共役置換基との結合によって修飾され得る。これに関する適合性は、一般に、非誘導体化親抗ソルチリン抗体に関連するソルチリン選択性および / またはソルチリン特異性を少なくとも実質的に保持する能力によって決定される。1 つまたは複数の修飾アミノ酸の包含は、例えば、ポリペプチド血清半減期を増加させ、ポリペプチド抗原性を低下させ、またはポリペプチド貯蔵安定性を増加させるのに有利であり得る。アミノ酸は、例えば、組み換え産生の際に翻訳と同時に (co-translationally) もしくは翻訳後に (post-translationally) 修飾されるか（例えば、哺乳類細胞における発現の際の N-X-S/T モチーフにおける N 結合型グリコシル化）または合成手段によって修飾される。修飾アミノ酸の非限定的な例としては、グリコシル化アミノ酸、硫酸化アミノ酸、ブレニル化（例えば、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化）アミノ酸、アセチル化アミノ酸、アシル化アミノ酸、PEG 化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、カルボキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸などが挙げられる。アミノ酸の修飾の当業者の指針となるのに十分な言及は、文献全体を通して十分にある。例のプロトコルが、Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJ に見られる。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG 化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分にコンジュゲートされたアミノ酸、または有機誘導化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択され得る。

【0125】

本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントはまた、例えばそれらの血中半減期を増加させるために、ポリマーへの共有結合によって化学修飾され得る。例示的なポリマー、およびそれらをペプチドに結合するための方法が、例えば米国特許第 4,766,106 号明細書、米国特許第 4,179,337 号明細書、米国特許第 4,495,285 号明細書および米国特許第 4,609,546 号明細書に示されている。さらなる例示的なポリマーとしては、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール (PEG)（例えば、約 1,000 ~ 約 40,000、例えば約 2,000 ~ 約 20,000、例えば、約 3,000 ~ 12,000 g/mol の分子量を有する PEG）が挙げられる。

【0126】

本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントは、診断法においてまたは画像診断用リガンドとしてさらに使用され得る。

【0127】

一実施形態において、1 つまたは複数の放射性標識アミノ酸を含む本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントが提供される。放射性標識抗ソルチリン抗体は、診断および治療目的の両方に使用され得る（放射性標識分子への結合は、別の考えられる特徴である）

。このような標識の非限定的な例としては、限定はされないが、ビスマス(^{213}Bi)、炭素(^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C)、クロム(^{51}Cr)、コバルト(^{57}Co 、 ^{60}Co)、銅(^{64}Cu)、ジスプロシウム(^{165}Dy)、エルビウム(^{169}Er)、フッ素(^{18}F)、ガドリニウム(^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム(^{68}Ge)、金(^{198}Au)、ホルミウム(^{166}Ho)、水素(^3H)、インジウム(^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{113}In 、 ^{115}In)、ヨウ素(^{121}I 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、イリジウム(^{192}Ir)、鉄(^{59}Fe)、クリプトン(^{81}Kr)、ランタン(^{140}La)、ルテチウム(^{177}Lu)、マンガン(^{54}Mn)、モリブデン(^{99}Mo)、窒素(^{13}N 、 ^{15}N)、酸素(^{16}O)、パラジウム(^{103}Pd)、リン(^{32}P)、カリウム(^{42}K)、プラセオジム(^{142}Pr)、プロメチウム(^{149}Pm)、レニウム(^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム(^{105}Rh)、ルビジウム(^{81}Rb 、 ^{82}Rb)、ルテニウム(^{82}Ru 、 ^{97}Ru)、サマリウム(^{153}Sm)、スカンジウム(^{47}Sc)、セレン(^{75}Se)、ナトリウム(^{24}Na)、ストロンチウム(^{85}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{92}Sr)、硫黄(^{35}S)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Tl)、スズ(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、キセノン(^{133}Xe)、イッテルビウム(^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Yb)、イットリウム(^{90}Y)および亜鉛(^{65}Zn)が挙げられる。放射性標識アミノ酸および関連するペプチド誘導体を調製するための方法は、当該技術分野において公知である(例えはJung hans et al., Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))ならびに米国特許第4,681,581号明細書、米国特許第4,735,210号明細書、米国特許第5,101,827号明細書、米国特許第5,102,990号明細書(米国再発行特許第35,500号明細書)、米国特許第5,648,471号明細書および米国特許第5,697,902号明細書を参照。例えは、放射性同位体が、クロラミンT法によって結合され得る(Lindgren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzilate As An Intermediate", Nucl. Med. Biol. 25 (7): 659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", J. Med. Chem. 36 (9): 1255-1261; Rea, D. W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors", Cancer Res. 50 (3 Suppl.): 857s-861s)。

【0128】

本発明は、蛍光標識(希土類キレート(例えは、ユウロピウムキレート)など)、フルオレセイン型標識(例えは、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン)、ローダミン型標識(例えは、ALEXA FLUOR(登録商標)568(Invitrogen)、TAMRA(登録商標)またはダンシルクロリド)、VI VOTAG 680 XL FLUOROCHROME(商標)(Perkin Elmer)、フィコエリトリン;ウンベリフェロン、Lissamine;シアニン;フィコエリトリン、Texas Red、BODIPY FL-SE(登録商標)(Invitrogen)またはそれらの類似体(これらは全て、光学的検出に好適である)を用いて検出可能に標識される抗ソルチリン抗体およびその抗原結合フラグメントも提供する

10

20

30

30

40

50

。化学発光標識が、用いられてもよい（例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリン）。このような診断および検出はまた、本発明の診断用分子を、限定はされないが、様々な酵素、限定はされないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む酵素を含む検出可能な物質に、または限定はされないが、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子族複合体に結合することによって行われ得る。

【0129】

化学発光標識が、用いられてもよい（例えば、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリン）。このような診断および検出はまた、本発明の診断用分子を、限定はされないが、様々な酵素、限定はされないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む酵素を含む検出可能な物質に、または限定はされないが、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子族複合体に結合することによって行われ得る。常磁性標識も用いられ得、好ましくは、ポジトロン放出型断層撮影法（PET）または単一光子放射コンピュータ断層撮影法（SPECT）を用いて検出される。このような常磁性標識としては、限定はされないが、アルミニウム（Al）、バリウム（Ba）、カルシウム（Ca）、セリウム（Ce）、ジスプロシウム（Dy）、エルビウム（Er）、ユウロピウム（Eu）、ガドリニウム（Gd）、ホルミウム（Ho）、イリジウム（Ir）、リチウム（Li）、マグネシウム（Mg）、マンガン（Mn）、モリブデン（M）、ネオジム（Nd）、オスミウム（Os）、酸素（O）、パラジウム（Pd）、白金（Pt）、ロジウム（Rh）、ルテニウム（Ru）、サマリウム（Sm）、ナトリウム（Na）、ストロンチウム（Sr）、テルビウム（Tb）、ツリウム（Tm）、スズ（Sn）、チタン（Ti）、タングステン（W）、およびジルコニウム（Zr）、特に、 Co^{+2} 、 Cr^{+2} 、 Cr^{+3} 、 Cu^{+2} 、 Fe^{+2} 、 Fe^{+3} 、 Ga^{+3} 、 Mn^{+3} 、 Ni^{+2} 、 Ti^{+3} 、 V^{+3} 、および V^{+4} の常磁性イオン、様々なポジトロン放出型断層撮影法を用いたポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンを含有する化合物が挙げられる。

【0130】

したがって、一実施形態において、本発明の抗ソルチリン抗体またはそのソルチリン結合フラグメントは、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、放射性同位体標識または酵素標識で標識され得る。フラグメントの標識抗体は、被験体の脳における前記ソルチリンの存在または量を検出または測定するのに使用され得る。この方法は、前記ソルチリンに結合された抗ソルチリン抗体またはソルチリン結合フラグメントのインビボイメージングの検出または測定を含んでもよく、このようなソルチリンに結合された前記抗ソルチリン抗体またはソルチリン結合フラグメントのエクスビボイメージングを含み得る。

【0131】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントの1つまたは複数のポリペプチド鎖をコードする発現ベクターに関する。このような発現ベクターは、本発明の抗体および抗原結合フラグメントの組み換え産生に使用され得る。

【0132】

本発明の文脈における発現ベクターは、染色体ベクター、非染色体ベクター、および合成核酸ベクター（好適な組の発現制御要素を含む核酸配列）を含む、任意の好適なDNAまたはRNAベクターであり得る。このようなベクターの例としては、SV40の誘導体、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組合せに由来するベクター、およびウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターが挙げられる。一実施形態において、抗ソルチリン抗体コード核酸は、例えば、線形発現要素（linear expression element）（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 12, 355-59 (1997)に記載されているように）、圧縮（compacted）核酸ベクター（例えば米国特許第6,077,835号明細書および/または国際公開第00/70087号パンフレットに記載されているように）、pBR322、pUC 19/18、また

10

20

30

40

50

はpUC 118/119、「ミッジ(midge)」最小サイズ核酸ベクターなどのプラスミドベクター(例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800(2001)に記載されているように)を含む裸のDNAまたはRNAベクターにおいて、またはCaPO₄沈殿構築物などの沈殿核酸ベクター構築物(例えば、国際公開第00/46147号パンフレット、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55(1986)、Wigler et al., Cell 14, 725(1978)、およびCorarao and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603(1981)に記載されているように)として含まれる。このような核酸ベクターおよびその使用法は、当該技術分野において周知である(例えば米国特許第5,589,466号明細書および米国特許第5,973,972号明細書を参照)。10

【0133】

一実施形態において、ベクターは、細菌細胞における抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメントの発現に好適である。このようなベクターの例としては、Blue Script(Stratagene)、pINベクター(Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509(1989)、pETベクター(Novagen, Madison, WI)など)などの発現ベクターが挙げられる。

【0134】

発現ベクターは、さらにまたは代わりに、酵母系における発現に好適なベクターであり得る。酵母系における発現に好適な任意のベクターが用いられてもよい。好適なベクターとしては、例えば、因子、アルコールオキシダーゼおよびPGHなどの構成的または誘導性プロモータを含むベクターが挙げられる(F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience New York(1987)、Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544(1987)、Mattanovich, D. et al. Methods Mol. Biol. 824, 329-358(2012)、Celik, E. et al. Biotechnol. Adv. 30(5), 1108-1118(2012)、Li, P. et al. Appl. Biochem. Biotechnol. 142(2), 105-124(2007)、Boeer, E. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77(3), 513-523(2007)、van der Vaart, J. M. Methods Mol. Biol. 178, 359-366(2002)、およびHolliger, P. Methods Mol. Biol. 178, 349-357(2002)に概説されている)。2030

【0135】

本発明の発現ベクターにおいて、抗ソルチリン抗体コード核酸は、任意の好適なプロモータ、エンハンサー、および他の発現促進要素を含むかまたはそれらと結合され得る。このような要素の例としては、強力な発現プロモータ(例えば、ヒトCMV IEプロモータ/エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモータ)、有効なポリ(A)終止配列、大腸菌(E. coli)におけるプラスミド産物の複製起点、選択可能なマーカーとしての抗生物質抵抗性遺伝子、および/または好都合なクローニング部位(例えば、ポリリンカー)が挙げられる。核酸は、CMV IEなどの構成的プロモータとは対照的に誘導性プロモータも含み得る(当業者は、このような用語が、実際に、特定の条件下における遺伝子発現の程度の記述語であることを認識するであろう)。40

【0136】

さらに他の態様において、本発明は、本明細書に定義される本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントまたは本明細書に定義される本発明の二重特異性分子を産生するトランسفエクトーマ(transfectoma)などの、組み換え真核生物または原核50

生物宿主細胞に関する。宿主細胞の例としては、酵母、細菌、および哺乳類細胞（C H O またはH E K 細胞など）が挙げられる。例えば、一実施形態において、本発明は、本発明の抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメントの発現のための配列コードを含む細胞ゲノムに安定に組み込まれた核酸を含む細胞を提供する。別の実施形態において、本発明は、本発明の抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメントの発現のための配列コードを含む、プラスミド、コスミド、ファージミド、または線形発現要素などの、融合されていない核酸を含む細胞を提供する。

【 0 1 3 7 】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗ソルチリン抗体を產生するための方法であって、a) 本明細書において上述されるように本発明のハイブリドーマまたは宿主細胞を培養する工程と、b) 培地から本発明の抗体を精製する工程とを含む方法に関する。 10

【 0 1 3 8 】

一実施形態において、本発明は、調製物であって、このような用語が本明細書において使用される際、本明細書に定義される抗ソルチリン抗体を含み、ソルチリンに結合することが可能でないかまたは調製物の抗ソルチリン機能性を実質的に変更しない自然発生する抗体を実質的に含まない調製物に関する。したがって、このような調製物は、自然発生する血清、またはこのような血清の精製誘導体を包含せず、抗ソルチリン抗体と、調製物の抗ソルチリン抗体の機能性を変更しない別の抗体との混合物を含み、ここで、このような機能性は、

- (i) ソルチリンに対する結合親和性 (K_D) ；
- (i i) ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する能力；
- (i i i) ソルチリン発現細胞によって P G R N のクリアランスを減少させ、および / または阻害する能力；
- (i v) ソルチリン発現細胞によって P G R N のエンドサイトーシスを減少させ、および / または阻害する能力；
- (v) ヒト - ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力；脳内の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力および / または

(v i) 慢性的に投与されるときの、前頭側頭認知症 (F T D) および / または筋萎縮性側索硬化症 (A L S) の治療を提供する能力 30

である。

【 0 1 3 9 】

本発明は、特に、天然抗ソルチリン抗体の構造と比べてそのアミノ酸配列の構造変化を（その C D R 、可変領域、フレームワーク残基および / または定常領域のいずれかに）有するこのような抗ソルチリン抗体の調製物であって、前記構造変化により、抗ソルチリン抗体モノクローナル抗体が、前記天然抗ソルチリン抗体によって示される機能性と比べて著しく変化した機能性（すなわち、機能性の 20 % 超の相違、40 % 超の相違、60 % 超の相違、80 % 超の相違、100 % 超の相違、150 % 超の相違、2 倍超の相違、4 倍超の相違、5 倍超の相違、または 10 倍超の相違）を示し；ここで、このような機能性は：

- (i) ソルチリンに対する結合親和性 (K_D) ；
- (i i) ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する能力；
- (i i i) ソルチリン発現細胞によって P G R N のクリアランスを減少させ、および / または阻害する能力；
- (i v) ソルチリン発現細胞によって P G R N のエンドサイトーシスを減少させ、および / または阻害する能力；
- (v) ヒト - ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力；
- (v i) 脳内の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力および / または
- (v i i) 慢性的に投与されるときの、前頭側頭認知症 (F T D) 、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) および / またはアルツハイマー病 (A D) の治療を提供する能力 50

であり、特に、このような変化した機能性が構造変化の結果であり、したがってそれと切り離すことができない調製物に関する。

【0140】

自然発生する抗体を「実質的に含まない」という用語は、このような調製物におけるこのような自然発生する抗体の、または調製物のソルチリン結合特性を実質的に変更しないこのような調製物におけるある濃度のこのような自然発生する抗体の包含の完全な非存在を指す。抗体は、それが自然発生する対応物を有さないか、またはそれを自然に伴う成分から分離もしくは精製されている場合、「単離」されているといわれる。

【0141】

「自然発生する抗体」という用語は、それがこのような調製物に関する場合、生きたヒトまたは他の動物内で、それらの免疫系の機能の自然な結果として誘発される抗体（自然発生する自己抗体を含む）を指す。

【0142】

したがって、本発明の調製物は、抗ソルチリン抗体、およびソルチリンによって保有されないエピトープに結合することが可能な意図的に加えられるさらなる抗体を含有するこのような調製物を除外せず、実際は明確にそれを包含する。このような調製物は、特に、調製物が、前頭側頭認知症（FTD）および／または筋萎縮性側索硬化症（ALS）を治療する際に向上した有効性を示すその実施形態を含む。

【0143】

本発明のその抗原結合フラグメントの抗体は、様々な細胞株、例えばヒト細胞株、非ヒト哺乳動物細胞株、および昆虫細胞株、例えばCHO細胞株、HEK細胞株、BHK-21細胞株、マウス細胞株（骨髄腫細胞株など）、線維肉腫細胞株、PER.C6細胞株、HKB-11細胞株、CAP細胞株およびHuH-7ヒト細胞株において生産され得る（内容が参照により本明細書に援用される、Dumont et al, 2015, Crit Rev Biotechnol. Sep 18: 1-13.）。

【0144】

さらに他の態様において、本発明は、

(i) 本明細書に定義される抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメント、または調製物であって、このような用語が本明細書において定義される際、このような抗ソルチリン抗体またはその抗原結合フラグメントを含む調製物、および

(ii) 薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物に関する。

【0145】

医薬組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013に開示されているものなどの従来の技術にしたがって、薬学的に許容できる担体または希釈剤ならびに任意の他の公知の補助剤および賦形剤とともに製剤化され得る。

【0146】

薬学的に許容できる担体または希釈剤ならびに任意の他の公知の補助剤および賦形剤は、本発明の選択された化合物および選択された投与方法に好適であるべきである。医薬組成物の担体および他の成分のための適合性は、本発明の選択された化合物または医薬組成物の所望の生物学的特性に対する大きな悪影響がないことに基づいて決定される（例えば、エピトープ結合に対するそれほど大きくない影響（10%以下の相対的阻害、5%以下の相対的阻害など））。

【0147】

本発明の医薬組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、洗浄剤（例えば、Tween-20またはTween-80などの非イオン性洗浄剤）、安定剤（例えば、糖またはタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、組織固定剤、可溶化剤、および／または医薬組成物に含めるのに好適な他の材料も含み得る。希釈剤は、組合せの生物学的活性に影響を与

10

20

30

40

50

えないように選択される。このような希釈剤の例は、蒸留水、リン酸緩衝生理食塩水、リソゲル液、デキストロース溶液、およびハンクス溶液である。さらに、医薬組成物または製剤は、他の担体、または非毒性の、非治療的、非免疫原性安定剤なども含み得る。組成物は、タンパク質、キトサンのような多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（例えば、ラテックス機能化（*l a t e x f u n c t i o n a l i z e d*）セファロース、アガロース、セルロースなど）、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）などの、大型のゆっくりと代謝される高分子も含み得る。

【0148】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、特定の患者、組成物、および投与方法に対する所望の治療反応を達成するのに有効な活性成分の量を得るように変化され得る。選択された投与量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物の活性、またはそのアミド、投与経路、投与時期、用いられる特定の化合物の排せつ速度、治療期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬剤、化合物および／または材料、治療される患者の年齢、性別、体重、病態、全体的な健康および過去の病歴、ならびに医療分野において周知の同様の要因を含む様々な薬物動態学的要因に応じて決まる。

10

【0149】

医薬組成物は、予防的および／または治療的処置のための非経口、局所、経口または経鼻手段を含む、任意の好適な経路および方法によって投与され得る。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、非経口的に投与される。本明細書において使用される際の「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、通常、注射による、腸内および局所投与以外の投与方法を意味し、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内注射および注入を含む。インビボおよびインビトロで本発明の化合物を投与するさらなる好適な経路が、当該技術分野において周知であり、当業者によって選択され得る。一実施形態において、その医薬組成物は、静脈内または皮下注射または注入によって投与される。

20

【0150】

薬学的に許容できる担体としては、本発明の化合物と生理学的に適合性の、あらゆる好適な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが挙げられる。

30

【0151】

本発明の医薬組成物に用いられ得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物、オリーブ油、トウモロコシ油、ピーナッツ油、綿実油、およびゴマ油などの植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントガムおよび注射可能な有機酸エステル（オレイン酸エチルなど）、および／または様々な緩衝液が挙げられる。他の担体が、医薬品分野において周知である。

40

【0152】

薬学的に許容できる担体は、滅菌注射用溶液または分散体の即時調製用の滅菌水溶液または分散体および滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において公知である。従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用が想定される。

【0153】

適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散体の場合、所要の粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。

【0154】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる酸化防止剤、例えば（1）水溶性酸化防止剤（アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、

50

亜硫酸ナトリウムなど) ; (2) 油溶性酸化防止剤(パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、-トコフェロールなど) ; および(3) 金属キレート剤(クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸など)も含み得る。

【0155】

本発明の医薬組成物は、組成物中に糖類、ポリアルコール(マンニトール、ソルビトール、グリセロールなど)または塩化ナトリウムなどの等張剤も含み得る。

【0156】

本発明の医薬組成物は、医薬組成物の保存可能期間または有効性を向上させ得る、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、防腐剤または緩衝液などの、選択された投与経路に適切な1つまたは複数の補助剤も含有し得る。本発明の化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達システムを含む、制御放出製剤などの速放性から化合物を保護する担体とともに調製され得る。このような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、生分解性、生体適合性ポリマー(エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など)を単独またはワックスまたは当該技術分野において周知の他の材料とともに含み得る。このような製剤の調製のための方法は、一般に、当業者に公知である。例えば、*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0157】

一実施形態において、本発明の化合物は、インビボでの適切な分配を確実にするように製剤化され得る。非経口投与用の薬学的に許容できる担体は、滅菌注射用溶液または分散体の即時調製用の滅菌水溶液または分散体および滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において公知である。従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用が想定される。補助的な活性化合物も、組成物に組み込まれ得る。

【0158】

注射用の医薬組成物は、典型的に、製造および貯蔵の条件下で、滅菌性かつ安定性でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または高い薬剤濃度に好適な他の規則構造として製剤化され得る。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの好適な混合物、植物油(オリーブ油など)、および注射可能な有機酸エステル(オレイン酸エチルなど)を含有する、水性または非水性溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散体の場合、所要の粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール(グリセロール、マンニトール、ソルビトールなど)、または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収が、抗体の吸収を遅らせる物質、例えば、一ステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。滅菌注射用溶液は、例えば上に列挙されるような成分の1つまたは組合せを含む適切な溶媒中に所要量の活性化合物を組み込むこと、必要に応じて、その後の滅菌精密ろ過によって調製され得る。一般に、分散体は、塩基性分散媒および例えば上に列挙される成分からの所要の他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、予め滅菌ろ過されたそれらの溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

【0159】

滅菌注射用溶液は、上に列挙されるような成分の1つまたは組合せを含む適切な溶媒中に所要量の活性化合物を組み込むこと、必要に応じて、その後の滅菌精密ろ過によって調

10

20

30

40

50

製され得る。一般に、分散体は、塩基性分散媒および上に列挙される成分からの所要の他の成分を含む滅菌ビヒクリル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、予め滅菌ろ過されたそれらの溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

【0160】

治療の上記の方法および本明細書に記載される使用における投与計画は、最適な望ましい反応(例えば、治療反応)を提供するように調整される。例えば、単回ボーラスが投与されてもよく、いくつかの分割量が、時間をかけて投与されてもよく、または用量が、治療状況の要件によって示されるように比例的に減少または増加されてもよい。非経口組成物は、投与のしやすさおよび投与の均一性のために単位剤形で製剤化され得る。本明細書において使用される際の単位剤形は、治療される被験体のための統一された投与量として適した物理的に別個の単位を指し；各単位は、所要の医薬担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算された所定の量の活性化合物を含有する。本発明の単位剤形の仕様は、(a)活性化合物の独自の特性および得られる具体的な治療効果、ならびに(b)個体における敏感性(sensitivity)の治療のためのこのような活性化合物の配合の技術分野に固有の制限に左右され、それらに直接依存する。

【0161】

抗ソルチリン抗体の有効投与量および投与計画は、治療される疾患または病態に応じて決まり、当業者によって決定され得る。治療的に有効な量の本発明の抗体の例示的な非限定的な範囲は、約0.1～10mg/kg/体重、例えば約0.1～5mg/kg/体重、例えば約0.1～2mg/kg/体重、例えば約0.1～1mg/kg/体重、例えば約0.15、約0.2、約0.5、約1、約1.5または約2mg/kg/体重である。

【0162】

当該技術分野において通常の技能を有する医師または獣医は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医は、医薬組成物に用いられる抗ソルチリン抗体の用量を、所望の治療効果を得るために必要とされるより少ないレベルから開始し、所望の効果が得られるまで投与量を徐々に増加し得る。一般に、本発明の組成物の好適な1日用量は、治療効果を生じるのに有効な最低用量である化合物の量であろう。このような有効用量は、一般に、上述される要因に応じて決まる。投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であり得、例えば標的の部位の近位で投与され得る。必要に応じて、医薬組成物の有効1日用量は、任意選択的に単位剤形で、1日を通して適切な間隔で別々に投与される2回、3回、4回、5回、6回またはそれ以上の分割用量として投与され得る。本発明の化合物は、単独で投与されることが可能であるが、上述されるように医薬組成物として化合物を投与するのが好ましい。

【0163】

本発明の標識抗体またはその抗原結合フラグメントは、疾患または障害を検出、診断、または監視するために、診断目的で使用され得る。本発明は、限定はされないが、FTD、ALSまたはTDP43タンパク質症(アルツハイマー病(AD)などの)を含む、神経変性または認知疾患または障害の検出または診断を提供し、(a)ソルチリンに特異的に結合する1つまたは複数の抗体を用いて、被験体の細胞または組織試料内のピログルタミルAフラグメントの存在を測定する工程と；(b)抗原のレベルを、制御レベル、例えば正常な組織試料におけるレベルと比較し、それによって、抗原の制御レベルと比較した、抗原の測定レベルの増加が、疾患または障害を示すか、または疾患または障害の重症度を示す工程とを含む。

【0164】

本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントは、当該技術分野において周知の免疫組織化学法を用いて、生物学的試料内のソルチリンまたはソルチリンの抗原結合フラグメントを測定するのに使用され得る。タンパク質を検出するのに有用な他の抗体ベースの方法としては、酵素結合免疫測定法(ELISA)および放射免疫測定法アッセイ(RIA)

10

20

30

40

50

およびメソスケールディスカバリープラットフォーム (mesoscale discov ery platform) ベースのアッセイ (MSD) などの免疫測定法が挙げられる。好適な抗体標識が、このようなキットおよび方法に使用され得、当該技術分野において公知の標識としては、酵素標識 (アルカリホスファターゼおよびグルコースオキシダーゼなど) ; 放射性同位体標識 (ヨウ素 (^{125}I 、 ^{131}I) 、炭素 (^{14}C) 、硫黄 (^{35}S) 、トリチウム (^{3}H) 、インジウム (^{121}In) 、およびテクネチウム (^{99}mTc) など) ; および発光標識 (ルミノールおよびルシフェラーゼなど) ; および蛍光標識 (フルオレセインおよびローダミンなど) が挙げられる。

【0165】

標識抗ソルチリン抗体またはそれらのソルチリン結合フラグメントの存在は、診断目的で、インピボで検出され得る。一実施形態において、診断は、a) 有効量のこのような標識分子を被験体に投与する工程；b) 投与後、所定の時間間隔にわたって待機して、標識分子を、A 堆積の部位（もしあれば）で濃縮させ、非結合標識分子が、バックグラウンドレベルになるまで除去されるのを可能にする工程；c) バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd) バックグラウンドレベルを超える標識分子の検出が、被験体が疾患または障害に罹患していることを示すか、または疾患または障害の重症度を示すように、被験体中の標識分子を検出する工程を含む。このような実施形態によれば、分子は、当業者に公知の特定のイメージングシステムを用いた検出に好適なイメージング部分で標識される。バックグラウンドレベルは、検出された標識抗体の量を、特定のイメージングシステムのために予め決定された標準値と比較することを含む、当該技術分野において公知の様々な方法によって決定され得る。本発明の診断法に使用され得る方法およびシステムとしては、限定はされないが、コンピュータ断層撮影法 (CT) 、ポジトロン放出型断層撮影法 (PET) などの全身スキャン、磁気共鳴画像法 (MRI) 、および超音波検査法が挙げられる。

【0166】

さらなる態様において、本発明は、医療に使用するための、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0167】

さらなる態様において、本発明は、患者の脳内の減少した PGDN レベルに関連する疾患を治療するのに使用するための、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0168】

さらなる態様において、本発明は、患者の脳内の減少した PGDN レベルに関連する疾患を治療するための薬剤の製造における、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントの使用に関する。

【0169】

さらなる態様において、本発明は、患者の脳内の減少した PGDN レベルに関連する疾患を予防または治療する方法であって、有効投与量の、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントを投与する工程を含む方法に関する。

【0170】

本発明のそれらの態様の使用および方法において、疾患は、FTD；ALS；またはTDP43タンパク質症 (ADなど) であるのが好ましい。

【0171】

好ましくは、本発明のそれらの態様の使用および方法において、治療は、長期であり、好ましくは、少なくとも 2 週間、例えば少なくとも 1 ヶ月間、6 ヶ月間、1 年間またはそれ以上にわたる。

【0172】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントを含むキットを提供する。

【0173】

10

20

30

40

50

【表5】

表5- 抗体配列

Ab 5E1		
配列番号	1	5E1 CDR1 軽鎖
配列番号	2	5E1 CDR2 軽鎖
配列番号	3	5E1 CDR3 軽鎖
配列番号	4	5E1 CDR1 重鎖
配列番号	5	5E1 CDR2 重鎖
配列番号	6	5E1 CDR3 重鎖
配列番号	7	5E1 VL
配列番号	8	5E1 VH
Ab 1F2		10
配列番号	9	1F2 CDR1 軽鎖
配列番号	10	1F2 CDR2 軽鎖
配列番号	11	1F2 CDR3 軽鎖
配列番号	12	1F2 CDR1 重鎖
配列番号	13	1F2 CDR2 重鎖
配列番号	14	1F2 CDR3 重鎖
配列番号	15	1F2 VL
配列番号	16	1F2 VH
Ab 068		20
配列番号	17	068 CDR1 軽鎖
配列番号	18	068 CDR2 軽鎖
配列番号	19	068 CDR3 軽鎖
配列番号	20	068 CDR1 重鎖
配列番号	21	068 CDR2 重鎖
配列番号	22	068 CDR3 重鎖
配列番号	23	068 VL
配列番号	24	068 VH
Ab 1320		30
配列番号	25	1320 CDR1 軽鎖
配列番号	26	1320 CDR2 軽鎖
配列番号	27	1320 CDR3 軽鎖
配列番号	28	1320 CDR1 重鎖
配列番号	29	1320 CDR2 重鎖
配列番号	30	1320 CDR3 重鎖
配列番号	31	1320 VL
配列番号	32	1320 VH
Ab 93-05		40
配列番号	33	93-05 CDR1 軽鎖
配列番号	34	93-05 CDR2 軽鎖
配列番号	35	93-05 CDR3 軽鎖
配列番号	36	93-05 CDR1 重鎖
配列番号	37	93-05 CDR2 重鎖

【0174】

【表 6】

配列番号	38	93-05 CDR3 重鎖	
配列番号	39	93-05 VL	
配列番号	40	93-05 VH	
Ab 93-01			10
配列番号	41	93-01 CDR1 軽鎖	
配列番号	42	93-01 CDR2 軽鎖	
配列番号	43	93-01 CDR3 軽鎖	
配列番号	44	93-01 CDR1 重鎖	
配列番号	45	93-01 CDR2 重鎖	
配列番号	46	93-01 CDR3 重鎖	
配列番号	47	93-01 VL	
配列番号	48	93-01 VH	
Ab 924			20
配列番号	49	924 CDR1 軽鎖	
配列番号	50	924 CDR2 軽鎖	
配列番号	51	924 CDR3 軽鎖	
配列番号	52	924 CDR1 重鎖	
配列番号	53	924 CDR2 重鎖	
配列番号	54	924 CDR3 重鎖	
配列番号	55	924 VL	
配列番号	56	924 VH	
Ab 1276			30
配列番号	57	1276 CDR1 軽鎖	
配列番号	58	1276 CDR2 軽鎖	
配列番号	59	1276 CDR3 軽鎖	
配列番号	60	1276 CDR1 重鎖	
配列番号	61	1276 CDR2 重鎖	
配列番号	62	1276 CDR3 重鎖	
配列番号	63	1276 VL	
配列番号	64	1276 VH	
Ab 849			40
配列番号	65	849 CDR1 軽鎖	
配列番号	66	849 CDR2 軽鎖	
配列番号	67	849 CDR3 軽鎖	
配列番号	68	849 CDR1 重鎖	
配列番号	69	849 CDR2 重鎖	
配列番号	70	849 CDR3 重鎖	
配列番号	71	849 VL	
配列番号	72	849 VH	
Ab 531-02			
配列番号	73	531-02 CDR1 軽鎖	
配列番号	74	531-02 CDR2 軽鎖	
配列番号	75	531-02 CDR3 軽鎖	

【0175】

【表 7】

配列番号	76	531-02 CDR1 重鎖	
配列番号	77	531-02 CDR2 重鎖	
配列番号	78	531-02 CDR3 重鎖	
配列番号	79	531-02 VL	
配列番号	80	531-02 VH	
Ab 548-01			
配列番号	81	548-01 CDR1 軽鎖	
配列番号	82	548-01 CDR2 軽鎖	10
配列番号	83	548-01 CDR3 軽鎖	
配列番号	84	548-01 CDR1 重鎖	
配列番号	85	548-01 CDR2 重鎖	
配列番号	86	548-01 CDR3 重鎖	
配列番号	87	548-01 VL	
配列番号	88	548-01 VH	
Ab 548-02			
配列番号	89	548-02 CDR1 軽鎖	
配列番号	90	548-02 CDR2 軽鎖	
配列番号	91	548-02 CDR3 軽鎖	20
配列番号	92	548-02 CDR1 重鎖	
配列番号	93	548-02 CDR2 重鎖	
配列番号	94	548-02 CDR3 重鎖	
配列番号	95	548-02 VL	
配列番号	96	548-02 VH	
Ab1289-02			
配列番号	97	1289-02 CDR1 軽鎖	
配列番号	98	1289-02 CDR2 軽鎖	
配列番号	99	1289-02 CDR3 軽鎖	
配列番号	100	1289-02 CDR1 重鎖	30
配列番号	101	1289-02 CDR2 重鎖	
配列番号	102	1289-02 CDR3 重鎖	
配列番号	103	1289-02 VL	
配列番号	104	1289-02 VH	
Ab 811-02			
配列番号	105	811-02 CDR1 軽鎖	
配列番号	106	811-02 CDR2 軽鎖	
配列番号	107	811-02 CDR3 軽鎖	
配列番号	108	811-02 CDR1 重鎖	40
配列番号	109	811-02 CDR2 重鎖	
配列番号	110	811-02 CDR3 重鎖	
配列番号	111	811-02 VL	
配列番号	112	811-02 VH	
Ab 566-01			
配列番号	113	566-01 CDR1 軽鎖	

【 0 1 7 6 】

【表 8】

配列番号	114	566-01 CDR2 軽鎖	
配列番号	115	566-01 CDR3 軽鎖	
配列番号	116	566-01 CDR1 重鎖	
配列番号	117	566-01 CDR2 重鎖	
配列番号	118	566-01 CDR3 重鎖	
配列番号	119	566-01 VL	
配列番号	120	566-01 VH	
Ab 562			10
配列番号	121	562 CDR1 軽鎖	
配列番号	122	562 CDR2 軽鎖	
配列番号	123	562 CDR3 軽鎖	
配列番号	124	562 CDR1 重鎖	
配列番号	125	562 CDR2 重鎖	
配列番号	126	562 CDR3 重鎖	
配列番号	127	562 VL	
配列番号	128	562 VH	
Ab 193			20
配列番号	129	193 CDR1 軽鎖	
配列番号	130	193 CDR2 軽鎖	
配列番号	131	193 CDR3 軽鎖	
配列番号	132	193 CDR1 重鎖	
配列番号	133	193 CDR2 重鎖	
配列番号	134	193 CDR3 重鎖	
配列番号	135	193 VL	
配列番号	136	193 VH	
Ab 88			30
配列番号	137	88 CDR1 軽鎖	
配列番号	138	88 CDR2 軽鎖	
配列番号	139	88 CDR3 軽鎖	
配列番号	140	88 CDR1 重鎖	
配列番号	141	88 CDR2 重鎖	
配列番号	142	88 CDR3 重鎖	
配列番号	143	88 VL	
配列番号	144	88 VH	
Ab 045			40
配列番号	145	045 CDR1 軽鎖	
配列番号	146	045 CDR2 軽鎖	
配列番号	147	045 CDR3 軽鎖	
配列番号	148	045 CDR1 重鎖	
配列番号	149	045 CDR2 重鎖	
配列番号	150	045 CDR3 重鎖	
配列番号	151	045 VL	
配列番号	152	045 VH	

【表9】

Ab 044		
配列番号	153	044 CDR1 軽鎖
配列番号	154	044 CDR2 軽鎖
配列番号	155	044 CDR3 軽鎖
配列番号	156	044 CDR1 重鎖
配列番号	157	044 CDR2 重鎖
配列番号	158	044 CDR3 重鎖
配列番号	159	044 VL
配列番号	160	044 VH
Ab 002		10
配列番号	161	002 CDR1 軽鎖
配列番号	162	002 CDR2 軽鎖
配列番号	163	002 CDR3 軽鎖
配列番号	164	002 CDR1 重鎖
配列番号	165	002 CDR2 重鎖
配列番号	166	002 CDR3 重鎖
配列番号	167	002 VL
配列番号	168	002 VH
		20
配列番号	169	完全ヒトソルチリン配列アイソフォーム 1
配列番号	170	本発明によって同定される「D 領域」
配列番号	171	ソルチリン「hSORTECDBAP」
配列番号	172	ソルチリン SORTECDBAP_hBACK
配列番号	173	ソルチリン SORTECDBAP_tetra
配列番号	174	ソルチリン SORTECDBAP_hB01-05
配列番号	175	ソルチリン SORTECDBAP_hRIM
配列番号	176	ソルチリン SORTECDBAP_hB06-10
配列番号	177	ソルチリン SORTECDBAP_hB12390
配列番号	178	ソルチリン SORTECDBAP_hB45678
配列番号	179	ソルチリン SORTECD_HIS
配列番号	180	本発明によって同定される「A 領域」
配列番号	181	A 領域 109~114
配列番号	182	A 領域 126~153
配列番号	183	A 領域 126~144
配列番号	184	A 領域 154~159
配列番号	185	D 領域 570~572
配列番号	186	D 領域 588~597
配列番号	187	D 領域 593~597
配列番号	188	HDX に使用される配列
		30
		40

【0178】

以前に公開されたようである文献の本明細書における列挙または説明は、文献が従来技術の一部であるかまたは普通の一般知識であることの確認として必ずしも解釈されるものではない。

【0179】

実施形態

本文および実施例から明らかであろうように、本発明はさらに、以下の実施形態に関する

る。

【0180】

1. ソルチリンに特異的に結合し、ソルチリンへの P G R N の結合を阻害することが可能な抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0181】

2. 抗体が、無傷の抗体を含むかまたはそれからなる、実施形態 1 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0182】

3. 抗原結合フラグメントが、F v フラグメント（例えば一本鎖 F v またはジスルフィド結合 F v ）；F a b 様フラグメント（例えば F a b フラグメントまたは F (a b ') 2 フラグメント）；およびドメイン抗体（例えば単一の V H 可変領域または V L 可変領域）からなる群から選択される抗原結合フラグメントを含むかまたはそれからなる、実施形態 1 または 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0183】

4. 抗体が、サブタイプ I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 または I g G 4 の抗体からなる群から選択される、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0184】

5. 前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 170 に定義されるソルチリンの D 領域に特異的に結合する、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0185】

6. 前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 170 に定義されるソルチリンの D 領域の少なくとも 3 連続アミノ酸、例えば 4 、 5 、 6 または 7 連続アミノ酸に特異的に結合する、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0186】

7. 抗体または抗原結合フラグメントが、以下の特性：

(i) 0.5 ~ 10 nM 、例えば 1 ~ 5 nM または 1 ~ 2 nM のソルチリンに対する結合親和性 (K D) 、

(i i) ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する能力；

(i i i) ソルチリン発現細胞によって P G R N のクリアランスを減少させ、および / または阻害する能力；

(i v) ソルチリン発現細胞によって P G R N のエンドサイトーシスを減少させ、および / または阻害する能力；

(v) ヒト - ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力

の 1 つまたは複数を示す、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0187】

8. ソルチリンへの P G R N 結合を減少させる抗体またはそのフラグメントの能力が、ソルチリンへの P G R N 結合を 10 % 以上だけ；例えば、 20 % 以上だけ；または 30 % 以上だけ減少させることを含む、実施形態 7 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0188】

9. ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する前記抗体またはそのフラグメント、抗体またはそのフラグメントの能力が、 22 nM 以下、例えば 22 nM ~ 1 nM 、または 10 nM ~ 1 nM 、または 5 nM ~ 1 nM の I C 50 で、ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害することを含む、実施形態 7 または 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0189】

10

20

30

40

50

10. ヒトまたはヒト化抗体である、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0190】

11. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるCDR1～3軽鎖の1つまたは複数を含む軽鎖可変領域、または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0191】

12. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるCDR1～3軽鎖を含む軽鎖可変領域を含む、実施形態11に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。 10

【0192】

13. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるアミノ酸配列VLを含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域を含む、実施形態11または12に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0193】

14. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるVLのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖を含む、実施形態11～13のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0194】

15. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙される1つまたは複数のCDR1～3重鎖、または4つ以下のアミノ酸差、または3つ以下のアミノ酸差、または2つ以下のアミノ酸差、または1つ以下のアミノ酸差を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。 20

【0195】

16. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるCDR1～3重鎖を含む重鎖可変領域を含む、実施形態15に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0196】

17. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるVHのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域を含む、実施形態15または16に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。 30

【0197】

18. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるアミノ酸配列VLを含むかまたはそれからなる重鎖を含む、実施形態15～17のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0198】

19. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるVLのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域、および表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるVHのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域を含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0199】

20. 表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるVLのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖、および表5に定義される抗体のそれぞれについて列挙されるVHのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖を含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。 40

【0200】

21. 前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、ソルチリンへの結合について、実施形態20に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントと競合する、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0201】

22. 抗体または抗原結合フラグメントが、Fc領域を含む、いずれかの先行する実施 50

形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0202】

23. 抗体または抗原結合フラグメントが、生体内半減期を増加させるための部分をさらに含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0203】

24. 生体内半減期を増加させるための部分が、ポリエチレンジリコール(PEG)、ヒト血清アルブミン、グリコシル化基、脂肪酸およびデキストランからなる群から選択される、実施形態22に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0204】

25. 抗体または抗原結合フラグメントが、検出可能な部分をさらに含む、いずれかの先行する実施形態に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0205】

26. 検出可能な部分が、蛍光標識；化学発光標識；常磁性標識；放射性同位体標識；または酵素標識からなる群から選択される、実施形態25に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【0206】

27. 検出可能な部分が、放射性同位体を含むかまたはそれからなる、実施形態25または26に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0207】

28. 放射性同位体が、^{99m}Tc、¹¹¹In、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷²As、⁸⁹Zr、¹²³Iおよび²⁰¹Tlからなる群から選択される、実施形態26または27に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0208】

29. 検出可能な部分が、常磁性同位体を含むかまたはそれからなる、実施形態25に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0209】

30. 常磁性同位体が、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶²Dy、⁵²Crおよび⁵⁶Feからなる群から選択される、実施形態29に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0210】

31. 検出可能な部分が、SPECT、PET、MRI、光学または超音波イメージングなどのイメージング技術によって検出可能である、実施形態25～30のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0211】

32. 検出可能な部分が、結合部分を介して、間接的に抗体またはその抗原結合フラグメントに結合される、実施形態25～31のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0212】

33. 結合部分が、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10,四酢酸(DOTA)の誘導体、デフェロキサミン(DFO)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)の誘導体、S-2-(4-イソチオシアナトベンジル)-1,4,7-トリアザシクロノナン-1,4,7-三酢酸(NOTA)の誘導体および1,4,8,11-テトラアザシクロドデカン-1,4,8,11-四酢酸(TETA)の誘導体からなる群から選択される、実施形態32に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0213】

34. 実施形態1～33のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸分子。

【0214】

35. 分子がcDNA分子である、実施形態34に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

【0215】

36. 実施形態34または35に記載の核酸分子を含むベクター。

【0216】

37. 実施形態34～36のいずれかに記載の核酸分子を含む組み換え宿主細胞。

【0217】

38. 実施形態1～33のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメントを产生するための方法であって、コードされた抗体またはその抗原結合フラグメントの発現を可能にする条件下で、実施形態37に記載の宿主細胞を培養する工程を含む方法。

【0218】

39. 先行する実施形態のいずれか1つに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む調製物であって、前記調製物が、ソルチリンに結合することが可能でないかまたは調製物の抗ソルチリン機能性を実質的に変更しない自然発生する抗体を実質的に含まず、前記機能性が、

(i) ソルチリンに対する結合親和性 (K_D) ;

(ii) ソルチリンへのPGRN結合を減少させ、および/または阻害する能力；

(iii) ソルチリン発現細胞によってPGRNのクリアランスを減少させ、および/または阻害する能力；

(iv) ソルチリン発現細胞によってPGRNのエンドサイトーシスを減少させ、および/または阻害する能力；

(v) ヒト-ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中のPGRNの量および/または濃度を増加させる能力；および/または

(vi) 慢性的に投与されるときの、前頭側頭認知症 (FTD) および/または筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療を提供する能力

からなる群から選択される調製物。

【0219】

40. 先行する実施形態のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む調製物であって、前記モノクローナル抗体が、天然抗ソルチリン抗体の構造と比べて、そのアミノ酸配列の構造変化を有し、前記構造変化により、前記モノクローナル抗体が、前記天然抗ソルチリン抗体によって示される機能性と比べて変化した機能性を示し、前記機能性が、

(i) ソルチリンに対する結合親和性 (K_D) ;

(ii) ソルチリンへのPGRN結合を減少させ、および/または阻害する能力；

(iii) ソルチリン発現細胞によってPGRNのクリアランスを減少させ、および/または阻害する能力；

(iv) ソルチリン発現細胞によってPGRNのエンドサイトーシスを減少させ、および/または阻害する能力；

(v) ヒト-ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中のPGRNの量および/または濃度を増加させる能力；および/または

(vi) 慢性的に投与されるときの、前頭側頭認知症 (FTD) および/または筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療を提供する能力

である調製物。

【0220】

41. 実施形態1～33のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または実施形態39～40のいずれか1つに記載の調製物、および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【0221】

42. 医療に使用するための、実施形態1～33のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または実施形態39～40のいずれか1つに記載の調製物。

【0222】

43. 患者の脳内の減少したPGRNレベルに関連する疾患を予防および/または治療

10

20

30

40

50

するのに使用するための、実施形態 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または実施形態 3 9 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の調製物。

【 0 2 2 3 】

4 4 . 患者の脳内の減少した P G R N レベルに関連する疾患を予防および / または治療するための薬剤の製造における、実施形態 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または実施形態 3 9 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の調製物の使用。

【 0 2 2 4 】

4 5 . 疾患が、 F T D ; A L S ; T D P 4 3 タンパク質症 (A D など) からなる群から選択される、実施形態 4 3 に記載の使用のための抗体、またはその抗原結合フラグメント、または実施形態 4 4 に記載の使用。

【 0 2 2 5 】

4 6 . 患者の脳内の減少した P G R N レベルに関連する疾患を予防または治療する方法であって、有効投与量の、実施形態 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、実施形態 3 9 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の調製物、または実施形態 4 1 に記載の医薬組成物を投与する工程を含む方法。

【 0 2 2 6 】

4 7 . 疾患が、 F T D ; A L S ; または T D P 4 3 タンパク質症 (A D など) からなる群から選択される、実施形態 4 3 に記載の使用のための抗体、またはその抗原結合フラグメント、または実施形態 4 4 に記載の使用、または実施形態 4 6 に記載の方法。

【 0 2 2 7 】

4 8 . 治療が長期である、実施形態 4 6 または 4 7 に記載の使用のための抗体、またはその抗原結合フラグメント；または使用；または方法。

【 0 2 2 8 】

4 9 . 長期治療が、少なくとも 2 週間、例えば少なくとも 1 ヶ月間、 6 ヶ月間、 1 年間またはそれ以上にわたる、実施形態 4 8 に記載の使用のための抗体、またはその抗原結合フラグメント；または使用；または方法。

【 0 2 2 9 】

5 0 . ソルチリンに特異的に結合し、ソルチリンへの P G R N の結合を阻害することが可能であるが、結合が、ソルチリンへのニューロテンシンまたは A F 3 8 4 6 9 の結合を阻害しないかまたは実質的に阻害しない、実施形態 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、実施形態 3 9 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の調製物、または実施形態 4 1 に記載の医薬組成物。

【 0 2 3 0 】

5 1 . 実施形態 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、実施形態 3 9 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の調製物、または実施形態 4 1 に記載の医薬組成物を含むキット。

【 0 2 3 1 】

これより、本発明の特定の態様を実施する好ましい非限定的な実施例が、添付の図を参考して説明される。

【実施例】

【 0 2 3 2 】

実施例 1 ~ 3 は、ソルチリン構築物の生成を説明する

実施例 1 は、シャッフル構築物を開示する。実施例 2 は、ソルチリン構築物の発現を開示する。実施例 3 は、ソルチリン構築物の精製を開示する。

【 0 2 3 3 】

実施例 4 ~ 7 は、ソルチリン抗体の生成を説明する

実施例 4 は、免疫化およびハイブリドーマを開示する。実施例 5 は、配列分析を開示する。実施例 6 は、抗体の精製を開示する。実施例 7 は、マウス抗体の生成を開示する。

【 0 2 3 4 】

10

20

30

40

50

実施例 8 ~ 17 は、ソルチリン抗体の特性評価を説明する

実施例 8 は、ソルチリンへの結合を開示する。実施例 9 は、ソルチリン抗体のクロスプロッキング能力を開示する。実施例 10 は、H T R F P G R N - ソルチリン結合を開示する。実施例 11 は、N T S 結合を開示する。実施例 12 は、細胞 P G R N 結合およびエンドサイトーシスを開示する。実施例 13 は、細胞外 P G R N レベルを開示する。実施例 14 は、i P S C P G R N レベルを開示する。実施例 15 は、血漿 P G R N レベルを開示する。実施例 16 は、H D X によるエピトープマッピングを開示する。実施例 17 は、脳内の P G R N の微小透析を開示する。

【 0 2 3 5 】

実施例 1

10

ハイブリドーマスクリーニングプロセスおよび抗体のパネルの多様化の両方に使用するために、いわゆる「シャッフル構築物」を設計し、構築し、產生し、ヒトソルチリンおよび著しく低い配列相同性を有する遠縁の種（テトラオドン）の両方に由来するアミノ酸配列を含有する一連のキメラソルチリン分子を作製した。特定のキメラ構築物への抗体の結合の喪失を除いて、これらのキメラ構築物のソルチリン構造全体および機能性が保持され得るという原理は、特定の交換された領域の結合の改善を示すであろう。可溶性細胞外領域（E C D、a a 1 - 7 5 5）構築物を、B A P タグ（ビオチンアクセプタペプチド）のいずれかで標識し、ビオチンリガーゼまたはH i s タグの共発現によってタンパク質の「インピトロ」ビオチン化を可能にして、容易な精製を可能にした。以下のタンパク質をコードする発現ベクターを調製した：S O R T - E C D B A P、S O R T - E C D B A P - h B 0 1 - 0 5、S O R T - E C D B A P - h B 0 6 - 1 0、S O R T - E C D B A P - h B 1 2 3 9 0、S O R T - E C D B A P - h B 4 5 6 7 8、S O R T - E C D B A P - t e t r a、S O R T、S O R T - t e t r a。

20

【 0 2 3 6 】

ソルチリン配列は、配列番号 1 6 9 ~ 1 8 0 において見られ、図 2 は、ソルチリンシャッフル構築物への結合に基づいた抗体の領域割り当ての概略図を示す。

【 0 2 3 7 】

実施例 2

抗体の発現の場合、実施例 4、5 および 6 に記載されるような、適切な重鎖および軽鎖ベクターを、H E K - 2 9 3 F 細胞において共発現させた。

30

【 0 2 3 8 】

実施例 3 : H i s タグ化ソルチリンの精製

S O R T E C D H i s を、H E K - 2 9 3 F 細胞において発現させた。タンパク質中のH i s - タグは、固定化金属親和性クロマトグラフィーによる精製を可能にする。このプロセスにおいて、N i N T A S u p e r f l o w C a r t r i d g e (Q i a g e n) を、5 0 m M のN A H ₂ P O ₄、3 0 0 m M のN a C l および1 0 m M のイミダゾールp H 8 . 0 で平衡化する。カラムに、1 分間の滞留時間で、H i s タグ化タンパク質を充填する。カラムを、5 0 m M のN A H ₂ P O ₄、3 0 0 m M のN a C l および2 0 m M のイミダゾールp H 8 . 0 で洗浄する。タンパク質を、5 0 m M のN A H ₂ P O ₄、3 0 0 m M のN a C l および2 5 0 m M のイミダゾールp H 8 . 0 で溶離する。続いて、タンパク質を、1 0 . 0 0 0 m w c o のカットオフを有するS l i d e - A - L y z e r (T h e r m o S c i e n t i f i c) を用いてP B S へと透析する。透析の後、タンパク質を、0 . 2 ミクロンのS F C A フィルタ (T h e r m o S c i e n t i f i c) を用いて滅菌ろ過する。

40

【 0 2 3 9 】

H E K 2 9 3 細胞を、ヒト野生型（W T ）ソルチリン発現ベクターでトランスフェクトすることによって、S 1 8 - H E K 細胞株を生成した。安定したトランスフェクトされた細胞が、選択薬剤の存在下における通過後に得られた。個々のクローンを、希釈クローンングによって選択した。クローンを、Q P C R を用いて、ソルチリンm R N A 発現について特性評価した。次に、最も高い発現クローンを、抗ソルチリンポリクローナル抗体（ボ

50

リクローナルヤギソルチリンビオチン化Ab、Cat. No: BAF2934 (R&D Systems) を用いてFACS (Guava, Millipore) によって分析して、ソルチリンの表面発現レベルを決定した。

【0240】

実施例4

A - トランスジェニックマウスの免疫化手順

抗体HuMabソルチリンは、HuMabマウス株HCo12、HCo17、HCo20、HCo12-BALB/c、HCo17-BALB/cおよびHCo20-BALB/c (ヒトモノクローナル抗体; Medarex Inc., San Jose, CA, USA) の免疫化から得られた。これらのマウスは、マウス免疫グロブリン (Ig) 重鎖およびマウス 軽鎖をダブルノックアウトされ、これは、完全マウスの抗体の発現を実質的に不活性化する。様々なマウス株を、ヒトIg重鎖およびヒトIg 軽鎖遺伝子座の挿入によってトランスジェニックにし、これは、ヒトVH (重鎖の可変領域) およびVL (軽鎖の可変領域) 遺伝子の数が異なる。HCo12-BALB/cマウスは、KCo5-BALB/c (軽鎖トランスジェニック) マウスとの異種交配によって得られた。

【0241】

48匹のマウスを、14日間の間隔を空けて、20 µgのSORT ECDH1s (配列番号179) で腹腔内に (IP) および同じタンパク質で皮下に (SC、尾基底に) 交互に免疫した。4回のIPおよび4回のSCで、最大で8回の免疫化を行った。

【0242】

1つのプロトコルにおいて、第1の免疫化を、完全フロイントアジュvant (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中のSORT ECDH1sで行い、次の免疫化を不完全フロイントアジュvant (IFA) 中で行った。第2のプロトコルは、全ての免疫化工程における補助剤としてSASを使用した。血清抗体価が十分であることが分かった (1/50以下の血清の希釈物が、少なくとも2回連続の、隔週のスクリーニング事象において、抗原特異的スクリーニングアッセイにおいて陽性であることが分かった) とき、マウスに、融合の4および3日前に、100 µLのPBS中の10 µgのSORT ECDH1sタンパク質を静脈内に (IV) 2回さらに投与した (boost)。

【0243】

B - HuMabハイブリドーマ - 生成

上に定義されるような十分な抗原特異的抗体価発現を有するHuMabマウスを殺処分し、腹部大動脈および大静脈に隣接する脾臓およびリンパ節を採取した。マウス骨髄腫細胞株との脾細胞およびリンパ節細胞の融合は、基本的に製造業者の指示にしたがって、CEF 50 Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA) を用いた電気融合によって行った。融合細胞を、HyQ mADC-F-Mab (Perbio) 中の10%のFetal Clone I Bovine血清 (Perbio)、1 mMのピルビン酸ナトリウム (Cambrex)、0.5 U/mLのペニシリン、0.5 U/mLのストレプトマイシン (Cambrex)、50 µMの2-メルカプトエタノール (Invitrogen)、600 ng/mLのインターロイキン6 (IL-6) (Strathmann)、1 × HAT (Sigma) および0.5 mg/mLのカナマイシン (Invitrogen) を含有する融合培地に播種した。10日後、上清を収集し、細胞を、HyQ mADC-F-Mab 中の10%のFetal Clone I Bovine血清、0.5 U/mLのペニシリン、0.5 U/mLのストレプトマイシン、600 ng/mLのIL-6 および1 × proHT (Cambrex) を含有する収集培地で洗浄した。ハイブリドーマ培養物の上清を、一次スクリーニングアッセイおよびSORT ECD BAP (配列番号171)、SORT ECD BAPh B06-10 (配列番号176)、SORT ECD BAPh B12390 (配列番号177) に結合されたストレプトアビジンビーズによってスクリーニングして、ハイブリドーマ産生ヒト (またはキメラ) 抗ソルチリン抗体を検出し

10

20

30

40

50

た。最も良好な一次ウェルからのハイブリドーマ細胞を、40%のCloneMedia (Genetix, Hampshire, UK) および60%のHyQ 2×完全培地 (Hyclone, Waltham, USA) から作製された半固体培地に播種した。各一次ウェルについて、Genetix黒色6ウェルプレートのウェルを播種した。各ウェルから、ClonePix system (Genetix) を用いて25個のサブクローンを採取した。サブクローンを収集培地中に採取した。7日後、サブクローンの上清を、ソルチリン特異的ヒトIgG結合について再度スクリーニングし、ヒトIgG濃度を、Octet 384red (ForteBio, Menlo Park, USA) を用いて測定した。各一次ウェルから、最も良好なサブクローンを選択し、600ng/mLのIL-6、0.5U/mLのペニシリン、0.5U/mLのストレプトマイシンおよび1×proHTのみを含有する展開培地 (expansion medium) 中で展開させた。このサブクローンを、1つの96ウェルプレートウェルから1つの24ウェルプレートウェルへ、4つの24ウェルプレートウェルへ、6つの6ウェルプレートウェルへと展開させた。このプロセスによって得られたクローンを、初代クローン (PC) と表した。

【0244】

本発明の抗ソルチリンHuMab抗体を同定し、配列分析を行った。

【0245】

実施例5：ソルチリン特異的HuMab可変領域の配列分析および発現ベクターにおけるクローニング

製造業者の指示にしたがって、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて、全RNAを、0.2~5×106個のハイブリドーマ細胞から調製し、5'-RACE-相補的DNA (cDNA) を、100ngの全RNAから調製した。VHおよびVLコード領域を、PCRによって増幅させ、ライゲーション非依存クローニング (Aslanidis, C. and P. J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74) によって、p33G1f およびp33 発現ベクター (ヒトIgG1 / 定常領域コード配列を含む) 中で、フレーム内で、直接クローニングした。各抗体について、16個のVLクローンおよび16個のVHクローンをシーケンシングした。適切なオープンリーディングフレーム (ORF) を有するクローンを、さらなる研究および発現のために選択した。重鎖および軽鎖の全ての組合せのベクターを、293fectionを用いて、Freestyle TM 293-F細胞中で一時的に共発現させた。

【0246】

得られた配列は、本明細書において配列表 (配列番号1~168) に示される。CDR配列は、公開されている指針にしたがって定義された。

【0247】

実施例6：抗体の精製

培養物の上清を、0.2μmのデッドエンドフィルタ上でろ過し、5mLのタンパク質Aカラム (rProtein A FF, Amersham Bioscience) に充填し、0.1Mのクエン酸-NaOH、pH3で溶離した。溶出液を、2Mのトリス-HCl、pH9で直ちに中和し、12.6mMのNaH₂PO₄、140mMのNaCl、pH7.4 (B.Braun) に対してO/N (一晩) 透析した。透析の後、試料を、0.2μmのデッドエンドフィルタ上で滅菌ろ過した。純度をSDS-PAGEによって決定し、濃度を比濁法および280nmでの吸光度によって測定した。精製された抗体を分割し、-80で貯蔵した。解凍してから、精製された抗体アリコートを4に保持した。質量分析法を行って、ハイブリドーマによって発現される抗体重鎖および軽鎖の分子量を特定した。

【0248】

実施例7：マウス抗体 (1F2および5E1) の生成

免疫原

キメラ免疫原hソルチリン-Fc、(配列番号169からのヒトソルチリンAA (78

- 756)) および配列番号 169 からのヒト IgG1 - Fc AA (104 - 330) をコードする合成遺伝子を、pcDNA3.1へとクローニングし、*In vitro* 製の freestyle システムを用いた発現に使用した。抗原を、ヒト抗体について上述される抗体精製のための標準的な手順を用いたタンパク質 - A 親和性クロマトグラフィーによって、細胞培養物上清から精製した。

【0249】

ハイブリドーマ生成

hソルチリン - Fc を免疫原として使用し、5匹のBALB/cマウスを免疫した。十分な免疫応答を有するマウスを、細胞融合およびハイブリドーマ生成のために選択した。ハイブリドーマ上清を、コーティング抗原としてhソルチリン - ECD を用いたELISA 10 によってスクリーニングした。9個の親クローンから得られた合計で18個のハイブリドーマ細胞株を生成した。

【0250】

発現

ハイブリドーマを、完全増殖培地、10%のFBS + 抗生物質を含むDME M 中で最初に増殖させ、続いて、発現実験のためのCDハイブリドーマ培地 (*In vitro* 15) に適応させた。

【0251】

精製

マウスモノクローナル抗体を、供給業者 (GE healthcare) によって推奨される標準的な手順にしたがって、タンパク質 - Gセファロースによってハイブリドーマ細胞培養物上清から精製した。 20

【0252】

実施例8：ソルチリンの組み換え細胞外領域に対するソルチリン特異的HuMab およびマウス抗体の親和性

ソルチリンへの抗ソルチリンHuMab抗体の結合反応速度を、Octet 384 RED (ForteBio, Menlo Park, USA) を用いて決定した。2 μg / ml のHuMab溶液を、試料希釈剤 (ForteBio, art. No. 18 - 5028) 中での希釈によって作製した。Prot Aセンサー (ForteBio, art. no. 18 - 0004) を、少なくとも600秒間にわたってキネティクス緩衝液 (kinetics buffer) (PBS中1:10の試料希釈剤) で予め湿らせた。続いて、センサーを、600秒間にわたってHuMab溶液で固定した。ベースライン反応は、120秒間にわたってキネティクス緩衝液に浸漬することによって得られた。SORT ECD構築物の会合が、1000秒間のインキュベーション中に行われた。この後、100秒間にわたるキネティクス緩衝液中での解離が続いた。解離の後、センサーを再生し (10 mMのグリシンpH 1.0) 、5秒間にわたって3回中和した (キネティクス緩衝液)。全てのHuMabを、4つの濃度のSORT ECD構築物 (1.0, 5, 2.5 および 1.25 μg / ml) を用いて分析した。76.8 kDa の分子量を、SORT ECD His 40 に使用した。データを、グローバルフルフィット (global full fit) を用いて、ForteBio Analysis 6.4 ソフトウェアと適合させた。結果が図3および図4に示される。

【0253】

実施例9：抗ソルチリンHuMabの抗体クロスプロック

抗体クロスプロック試験を、Octet 384 RED (ForteBio, Menlo Park, USA) を用いて行った。2 μg / ml のHuMab抗体溶液を、試料希釈剤 (ForteBio, art. No. 18 - 5028) 中での希釈によって作製した。アミン反応性センサー (ForteBio, art. no. 18 - 0008) を、HuMabの固定化に使用した。アミン反応性センサーへのカップリングの前に、HuMabを、MES pH 6.0 緩衝液 (18 - 5027) 中で希釈した。カップリングを、30 および 1000 rpm で、以下のとおりに行った：アミン反応性センサーを、PBS中 50

で予め湿らせ、続いて、300秒間にわたって（製造業者の指示にしたがって）E D C / N H S (F o r t e B i o . A r t . n o . 1 8 - 1 0 3 3 / 1 8 - 1 0 3 4) 活性化溶液で活性化した。活性化センサーを、600秒間、H u M a b で固定化した。固定化センサーを、エタノールアミンとの残っているアミン反応性のためにクエンチした (F o r t e B i o , c a t n o . 1 8 - 1 0 3 9) 。クエンチの後、センサーを、使用するまで P B S 中に入れた。クロスブロック分析は、30 および 1 0 0 0 r p m でベースライン反応を設定することから開始する。ベースライン反応は、120秒間にわたって試料希釈剤に浸漬することによって得られた。S O R T E C D H i s の会合は、300秒間にわたって行われ、その直後に、300秒間にわたって H u M a b の会合が行われた。H u M a b の会合の後、センサーを再生し (1 0 m M のグリシン pH 1 . 0) 、5秒間にわたって 3 回中和した（試料希釈剤）。データを、F o r t e B i o A n a l y s i s 6 . 4 ソフトウェアを用いて処理した。

【 0 2 5 4 】

抗体を、異なるソルチリンシャッフル構築物（図 2、図 3 および図 4 ）についてのそれらの結合プロファイルに基づいて分類した。領域 D (および領域 F) からの全ての抗体が、ヒト野生型ソルチリン E C D における同じ領域に結合することを確認するために、野生型ヒトソルチリン E C D への互いの結合をブロックするそれらの能力を、O c t e t 3 8 4 r e d を用いたクロスブロッキング試験において特性評価した。例えば、同じ領域からの抗体を試験したとき、一次抗体は、二次抗体の結合をブロックし、逆も同様であった。一方、異なる領域からの抗体を試験したとき、1つのみの領域が一次抗体によってブロックされ、残りの領域は、二次抗体が結合するのに利用されるため、クロスブロッキングはなかった。図 7 は、全ての D 領域および D + 抗体が、互いにクロスブロックすることを示し、これは、シャッフル構築物に基づいた領域 D および D + に対する抗体の分類を裏付ける。さらに、これらのデータはまた、キメラソルチリン構築物が、天然のヒト野生型ソルチリン E C D との類似性を保持することを裏付ける。

【 0 2 5 5 】

実施例 1 0 : 抗ソルチリン抗体の存在下におけるソルチリン - P G R N リガンド結合の特性評価

抗体の I C 5 0 値を、均一性時間分解蛍光 (H T R F 、 C i s B i o) アッセイを用いて、ソルチリンへの P G R N 結合の移動を測定することによって決定した（図 5 および図 6 を参照）。

【 0 2 5 6 】

実験を、G r e i n e r 3 8 4 ウエルの、白色の小容量マイクロタイプレート (7 8 4 0 7 5 、 G r e i n e r) において、20 μ l の総体積のアッセイ緩衝液 (5 0 m M のホスフェート、p H 7 . 0 、 0 . 1 % の B S A) 中で行った。

【 0 2 5 7 】

抗体を、5 0 n M の H I S タグ化ソルチリン E C D および 4 n M の P G R N (S U L U 2 0 1 1 0 9 2 4) とともに、室温で 1 5 分間ブレインキュベートしてから、コンジュゲート緩衝液 (5 0 m M のホスフェート、p H 7 . 0 、 0 . 8 m M の K F 、 0 . 1 % の B S A) 中で希釈された 7 n M の抗 H I S - d 2 および 0 . 7 n M の抗 P G R N - E u クリプテート (C i s b i o) を加えた。20 μ M のニューロテンシンを、陽性対照として使用し、緩衝液中の D M S O を、陰性対照として使用した。

【 0 2 5 8 】

アッセイプレートを、室温で 6 0 分間および 4 で一晩インキュベートしてから、プレートを E n V i s i o n リーダー (P e r k i n E l m e r) において読み取った。

【 0 2 5 9 】

非標識ニューロテンシンおよび D M S O ブランクを、それぞれアッセイ設備のための陽性および陰性対照として使用した。抗体の用量反応評価を、3 倍希釈曲線において 1 μ M ~ 5 0 p M の 1 0 の濃度を用いて行った。

【 0 2 6 0 】

10

20

30

40

50

半数阻害濃度 (IC50) を、XL fit 4 (IDBS, UK) においてS字形濃度反応 (可変の傾き) を用いた非線形回帰によって計算した (図5および6)。

【0261】

実施例11：抗ソルチリン抗体の存在下におけるソルチリン-ニューロテンシン結合の特性評価

ソルチリン特異的化合物AF38469 (Schroeder et al, Biolog Med Chem Lett. 2014 Jan 1; 24 (1) : 177-80, 2014) のIC50を、シンチレーション近接アッセイ (SPA) を用いて、ソルチリンへの³H-ニューロテンシン結合の移動を測定することによって決定した。

【0262】

実験を、384ウェルの乳白色のOptiplate (6007299, Perkin Elmer) において40 μlの総体積のアッセイ緩衝液 (50 mMのHEPES、pH 7.4、100 mMのNaCl、2 mMのCaCl₂、0.1%のBSA、0.1%のTween-20) 中で行った。

【0263】

150 nMのHISタグ化ソルチリンを、1 μMのソルチリン特異的抗体 (IgG1-6003-045またはIgG1-6003-068) を用いてもしくは用いずに、またはヒトIgG1アイソタイプ対照を用いて室温で15分間プレインキュベートしてから、タンパク質溶液を、濃度系列50 μM ~ 2.5 nMでAF38469を含むウェルに加えた。混合物を、振とう器中で、室温で15分間インキュベートしてから、5 nMの³H-ニューロテンシンおよびNi-キレートイメージングビーズ (RPNQ0266, Perkin Elmer) を加えた。アッセイを、同じ条件下で、さらに60分間インキュベートした。

【0264】

6時間後、プレートを、ViewLux (360秒の露光時間) において読みとった。非標識ニューロテンシンおよびDMSOブランクを、それぞれ陽性および陰性対照として使用した。

【0265】

AF38469についての用量反応評価を、3倍希釈曲線において50 μM ~ 2.5 nMの10の濃度で行った。半数阻害濃度 (IC50) を、XL fit 4 (IDBS, UK) においてS字形濃度反応 (可変の傾き) を用いた非線形回帰によって計算した。結果が、図8において見られる。

【0266】

実施例12：抗ソルチリン抗体の存在下における細胞の表面へのソルチリン-PGRNリガンド結合の特性評価

ソルチリンで一過性にトランスフェクトした細胞および安定した細胞株S18-HEK細胞 (ヒトソルチリン過剰発現HEK細胞) の両方を、このアッセイに使用した。細胞をトリプシン処理し、96ウェルプレートにおいてウェル当たり42,000個の細胞の密度で平板培養した。一過性にトランスフェクトした細胞の場合、細胞を、96ウェルプレートにおけるトランスフェクションの24時間後に平板培養した。翌日、培地を完全に交換し、培地中で希釈された試験化合物を、30分間にわたって細胞に加えてから、4時間にわたってPGRNを加えた。試験の最後に (4.5時間後) 、細胞を固定し、PGRNについて染色した。全ての染色されたプレートを、Cellomics Array Scan (Thermo Fischer) によって分析し、PGRN/細胞/ウェルの平均染色強度を、分析に使用した。

【0267】

アッセイに使用されるPGRNを、HEK 293細胞内のPGRN発現プラスミドの一過性トランスフェクションの後、培地から採取した。PGRNレベルを、PGRN-ELISAキット (R&D) を用いて測定した。

【0268】

10

20

30

40

50

細胞に加えられた P G R N は、容易に結合され、取り込まれ、これは、ソルチリンでトランسفェクトしたウェルにおける増加した蛍光シグナルをもたらす。ニューロテンシンの添加は、P G R N へのソルチリン結合を防ぎ、P G R N 蛍光強度は、対照レベルと同様であり、これは、P G R N が、ニューロテンシンの存在下で、結合されず、取り込まれなかつたことを示す。

【 0 2 6 9 】

ソルチリン H u m A b (4 5 および 6 8) は両方とも、ニューロテンシンと同様の有効性で P G R N の取り込みをブロックした。アイソタイプ対照抗体、B 1 2 は、P G R N インドサイトーシスまたは結合に対する効果を全く与えなかつた。結果が、図 9 において見られる。

10

【 0 2 7 0 】

実施例 1 3 : 細胞外 P G R N レベルに対する抗体の効果

H E K 2 9 3 細胞および S 1 8 - H E K 細胞は両方とも、刺激なしで、P G R N を連続して培地中に分泌することが分かった。

【 0 2 7 1 】

抗体および対照の薬剤を、S 1 8 - H E K 細胞に加えて、P G R N に対する効果を評価した。ニューロテンシン、公知のペプチドソルチリンリガンド、またはヒト抗体、4 5 、6 8 および 8 1 1 の、S 1 8 - H E K 細胞への添加は、細胞培地における P G R N を増加させた。ソルチリンヒト抗体の 2 つ (4 5 および 6 8) が、P G R N レベルをそれぞれ 2 0 2 % および 2 0 1 % に高め、ニューロテンシンと同様の効果を与えた。抗体 8 1 1 は、対照 B 1 2 と比較して、培地中で P G R N を 1 4 6 % に増加させ、アイソタイプ対照抗体を、全ての試験において陰性対照として使用し、これは、P G R N レベルに対する効果を全く示さなかつた。これらの観察は、試験されるソルチリン抗体が、P G R N のソルチリンに仲介される内在化を阻害し、それによって、細胞外 P G R N を増加させることを示す。

20

【 0 2 7 2 】

1 日目に、S 1 8 - H E K 細胞を、9 6 ウェルプレートに播種した。2 4 時間後、培地を、培地単独 (対照) または試験化合物が補充された培地と完全に交換した。特に規定されない限り、全ての化合物を 1 0 u M で、および抗体を 1 0 0 n M で試験した。培地を 3 日目に収集し、P G R N E L I S A (R & D) を用いて分析した。細胞生存性を、C e 1 1 T i t e r G l o (P r o M e g a) によって評価して、化合物の細胞傷害効果を評価した。培地中の P G R N レベルを、E L I S A によって分析し、値を対照ウェルに対して正規化した。結果が、図 1 0 において見られる。

30

【 0 2 7 3 】

実施例 1 4 : i P S C 中の細胞外 P G R N についての E L I S A アッセイ

誘導された多能性幹細胞 (i P S C) を、他で記載されるように (R a s m u s s e n et al . , S t e m C e l l R e p o r t s . 2 0 1 4 S e p 9 ; 3 (3) : 4 0 4 - 1 3 .) ヒト線維芽細胞 (1 8 歳の男性の正常なヒト皮膚線維芽細胞 ; L o n z a) の非統合的 (n o n - i n t e g r a t i v e) 再プログラミングによって生成した。N H D F K 1 _ s h p 5 3 系統を、これらの試験に使用した。i P S C を、m T E S R 培地中で最初に生成し、続いて、P l u r i p r o (C e l l G u i d a n c e S y s t e m) において単層中で培養した。ポリ - L - オルニチン / ラミニン被覆皿上で細胞を再度平板培養し、それらを、5 0 0 n g / m L の脳 (n o g g i n) および 1 0 μ M の S B 4 3 1 5 4 2 とともに N 3 培地 (R A 、0 . 5 m M の G l u t a M A X 、0 . 5 & N E A 、5 0 μ M の 2 - メルカプトエタノールおよび 2 . 5 m g / m L のインスリソインとともに 0 . 5 % の N 2 、1 % の B 2 7 が補充された、5 0 % の D M E M / F 1 2 + 5 0 % の N e u r o b a s a l 培地) 中で培養することによって、神経分化を 0 日目に開始させた。培地を、毎日新しくした。脳 / S B 4 3 1 5 4 2 誘導の 1 1 日後、細胞を、d i s p a s e で分割し、N 3 培地中でポリ - L - オルニチン / ラミニンにおいて再度平板培養した。その時点から、N 3 培地を、2 ~ 3 日ごとに新しくし、細胞を、a c c u t a s

40

50

eを用いて、ほぼ10～14日ごとに分割した。

【0274】

神経分化iPSC細胞を、96ウェルプレートへと平板培養した。1週間後、抗体を細胞に加えた。細胞からの培地を、48時間または96時間の時点で収集し、ヒトPGRN ELISA (Enzo Life sciences) によって分析し、製造業者の指示にしたがって試料を分析した。

【0275】

試験されるソルチリンヒト抗体(45および68)は、48時間および96時間で、培地中の可変のレベルで、PGRNレベルを増加させた。B12および抗He1は、対照アイソタイプ抗体(陰性対照)である。データは、平均±SDとして示される。データを、
10
一元配置ANOVA、続いてダネットの分析によって分析した。^{*}p < 0.05; ^{**}p < 0.01。結果が、図12において見られる。

【0276】

実施例15

血漿中のPGRNレベルに対する抗体の効果を分析するために、ヒト化ソルチリンK1マウスに、単回または複数回注入(10mg/kg)のソルチリン抗体またはアイソタイプ対照を、皮下注入によって与えた。動物に麻酔をかけ、投与後の様々な時点で殺処分し、血漿PGRNレベルをELISAによって決定した。

【0277】

A. 経時的試験：マウスを、抗体(ソルチリンhumabまたは対照ab)で処理し、様々な時点で殺処分した。対照抗体(抗He1)で処理されたマウスは、血漿PGRNの変化を示さなかった一方、ソルチリンhumab45で処理されたマウスでは、PGRNレベルの増加があり、これは、24～48時間の間にピークになるように見え、次に、4日前後から徐々に減少した。PGRNレベルは、7日目にまだ高かった。

20

【0278】

B. 亜慢性試験：経時的試験からのデータに基づいて、ソルチリンK1マウスに、亜慢性試験の間(4週間)安定した抗体レベルを維持するために、ソルチリンヒト抗体45またはアイソタイプ対照抗体のいずれかを10mg/kgで皮下に(s.c)週に2回投与した。血液試料を、試験の開始時および週に1回収集して、血漿PGRNの変化を追跡した。試験の開始時の血漿PGRNレベルは、動物の両方の群で同様であった。より高いレベルの血漿PGRNが、ソルチリン抗体45で処理されたマウスにおいて、1週目から見られ、試験全体を通して高いままであった。対照abで処理されたマウスは、血漿PGRNの増加を全く示さず、ベースラインレベル(0週目)に保たれた。

30

【0279】

C. 用量反応試験：異なる用量(4つの用量：10、2、0.4および0.1mg/kg)のソルチリン(45)および対照抗体(抗He1)を注入し、マウスを2日目に殺処分した。血漿PGRNは、ソルチリンhumabで処理されたマウスにおいて10mg/kgおよび2mg/kgで高く、より低い用量は、血漿PGRNに対する効果を与えず、これは、血漿PGRNレベルに対するソルチリン抗体の用量依存的効果を明らかに示す。対照抗体で処理されたマウスは、PGRNレベルの変化を全く示さなかった。

40

【0280】

マウスに、0.4mlのAvertin IPで麻酔をかけ、心臓の血液を収集し、500ulのKEDTAバイアルに移した。試料を、4°Cで15分間にわたって3600Gで遠心分離するまで氷上に保持した。血漿を、micronicバイアルにピペットで取り、-20°Cで凍結させた。試料中のPGRNを、製造業者の指示にしたがって、PGRN ELISAキット(Adipogen)を用いて測定した。結果が、図13において見られる。

【0281】

実施例16：水素/重水素交換、続いて質量分析法によるプログラニュリン-ソルチリン相互作用を標的にする抗体のエピトープマッピング

50

水素 / 重水素交換、続いて質量分析法 (H D X - M S) において、タンパク質中の骨格アミド水素の交換速度が測定される。これによって、プロリン残基を除く全タンパク質骨格の立体配座動態を調べることが可能である。交換反応の速度は、骨格アミドの水素結合状態およびより低い程度に溶媒露出度 (s o l v e n t a c c e s s i b i l i t y) によって決定される。例えばリガンドの存在によって引き起こされるこれらの 2 つのパラメータのわずかな変化が、重水素取り込みの変化として観察され得る。

【 0 2 8 2 】

重水素取り込みの変化を亜局在化する (s u b - l o c a l i z e) ために、タンパク質は、酸安定性プロテアーゼ (例えばペプシン) で処理され、これは、典型的に 10 ~ 15 のアミノ酸の局所領域を生成する。リガンドの存在下で摂動を示す領域が、結合界面に直接関与され、または結合事象によってアロステリックに影響される。

10

【 0 2 8 3 】

抗体のエピトープマッピング

ソルチリン (配列番号 1 8 8) の細胞外領域の重水素取り込みを、 m A b 4 5 、 m A b 6 8 、 m A b 8 1 1 および D 領域に結合しない m A b 3 0 と示される抗体の非存在下および存在下で測定した。測定を定常状態条件下で行うのを確実にするために、複合体を 25 で 15 分間平衡化してから、交換反応を開始させた。交換反応を、重水素化緩衝液 (9 9 % の D 2 O 、 2 0 m M のトリス、 1 5 0 m M の N a C l 、 p D r e a d = 7 . 6) 中へのタンパク質試料の 1 : 9 (v / v) の希釈によって開始させた。様々な時点 (1 5 秒、 1 分、 1 0 分、 1 時間および 8 時間) の後、交換反応を、氷冷クエンチ緩衝液 (2 M のグリシン、 0 . 8 M のトリス - (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 、 p H = 2 . 3) による 1 : 1 (v / v) の希釈によってクエンチし、それによって、 p H を 2 . 4 6 に低下させた。クエンチされた試料を、直ぐに - 8 0 ° の冷凍庫の中に入れ、分析するまで貯蔵した。完全に重水素化された対照試料を、重水素化変性緩衝液 (6 M の塩化グアニジウム、 9 9 % の D 2 O 、 2 0 m M のトリス、 1 5 0 m M の N a C l 、 p D r e a d = 7 . 6) 中へのソルチリン試料の 1 : 9 (v / v) の希釈によって調製し、続いて、 25 で 1 6 時間インキュベートしてから、それらをクエンチし、上述されるように処理した。

20

【 0 2 8 4 】

クエンチされた試料を解凍し、家庭で充填される (h o m e - p a c k e d) ペプシンカラム (6 0 μ L の内部体積、 T h e r m o S c i e n t i f i c I n c . から入手したペプシンビーズ) を備えた冷却された (0) 逆相 U P L C - H D X - システム (W a t e r s I n c . , U S A) に注入した。ここで、重水素化タンパク質試料を、 20 でオンラインペプシン消化に供し、得られた消化性ペプチドを、逆相 U P L C によって分離した。ペプチドを、質量分析計 (S y n a p t G 2 質量分析計、 W a t e r s I n c . , U K) 中へのエレクトロスプレーイオン化によってイオン化し、ここで、ペプチドを、最終的な質量決定の前にイオン移動度によってさらに分離した。

30

【 0 2 8 5 】

データ非依存 (M S e) およびデータ依存収集の組合せを用いたタンデム質量分析法によって、完全に還元された非重水素化試料においてペプチドの同定を行った。

40

【 0 2 8 6 】

データ分析

ペプチドの同定

収集された質量スペクトルは、 G F P に対して補正されたロックマス (l o c k m a s s) であり、前駆体およびフラグメントイオンを局所タンパク質データベースに適合させる P L G S 3 . 0 において分析された。全てのペプチドの同定を、手動で注意深く評価した。

【 0 2 8 7 】

重水素取り込みの決定：収集された質量スペクトルは、 G F P に対して補正されたロックマスであり、ソフトウェア D y n a m X 3 . 0 (W a t e r s I n c . , U S A)

50

を用いて、抗体の非存在下または存在下でソルチリンの全てのペプチドについての重水素取り込みを決定した。

【0288】

0.5Dより大きい交換からの保護が、抗体の存在下で観察された場合、ペプチドは、結合エピトープの一部であるとみなされた。

【0289】

【表10】

表1-HDX-MSによって同定される立体配座エピトープの表

抗体	配列番号169に対するHDX-MSによるエピトープマッピング				
45	109-114	126-153		570-572	588-597
68	109-114	126-144	154-159	570-572	593-597
811-02	109-114	126-144			593-597

10

【0290】

実施例17：覚醒自由行動動物の脳におけるプログラニュリンレベルを評価するための微小透析

プッシュプル微小透析方法を用いて、覚醒および自由行動マウスに由来する脳ISFプログラニュリン(PRGN)を評価した。マウスを、制御された温度(22±1.5)および湿度条件(55~65%)において単一の小屋に収容し、12:12時間の明/暗サイクル(06:00hで照明をオンにする)で飼育した。食物および水は自由に摂取可能であった。この試験を、ヒトソルチリンノックイン(hSORT1)マウス(22週齢)の海馬において行った。海馬における微小透析を可能にするために、マウスにイソフルランで麻酔をかけ、大脳内ガイドカニューレ(CMA)を、脳内に定位に埋め込み、PaxinosおよびFranklin 2001の図解にしたがって、微小透析プローブを海馬内で位置決めた(プローブ先端の配置:ブレグマの3.1mm後方および2.8mm側方、および硬膜に対して1.3mm)。アクリルセメントを、ガイドカニューレの固定に使用した。カニューレの埋め込みの後、マウスを、透析前の7日間にわたって外科手術から回復させた。外科手術の日を含む最初の5日間、動物は、疼痛を有し、抗生物質処理を与えられた(RimadylおよびNoromox Prolongatum)。微小透析実験の開始の24時間前に、かん流液を管から引き出すことによって、プローブからのかん流液損失を防ぐために、蠕動ポンプをさらに出口管に連結した。かん流緩衝液として、25%のウシアルブミン画分V(Sigma)を、使用当日に人工CSF(aCSF;mM単位:147NaCl、2.7KCl、1.2CaCl₂、0.85MgCl₂)で0.2%に希釈し、0.1μmの膜に通してろ過した。ポンプの実際の流量を、プローブを連結させずに測定した。試料管を、所与の期間にわたって試料採取する前および後に秤量し、流量を計算した。次に、ポンプを、1μL/分の一定流量を有するように設定した。120分のサンプリング計画を、実験期間を通して使用し、12の試料(12時間の収集)を収集した(手順については、図17)。実験の最後に、血液を動物から採取し、動物をかん流させ、脳を収集した。透析液、血漿および脳を、ELISAによるPRGNの決定まで-80で貯蔵した。

20

【0291】

24時間の間の2時間置きのPRGNレベルの測定が、図17に示される。di透析液の収集開始の24時間後を除く全ての期間で、PRGNレベルは、PBSで処理された動物からのものと比較したとき、増加したmab #45で処理された動物において有意に増加される(図18a)。PRGNレベルは、海馬へのプローブ挿入の4時間後から16時間後まで、時間が経過しても安定している。第1の透析液において、PRGNは、おそらく海馬へのプローブ挿入により高い。PRGNレベルは、おそらくプローブ膜の詰まりにより、プローブ挿入の18時間後/20時間後以上で減少していることが推測され、そ

30

40

50

れは両方の群において起こった（他のプッシュプル試験において以前に観察された）。

【0292】

各動物および次にプールされた全ての動物についての、抗体またはビヒクル処理の24時間後の12の透析試料の平均±SEMを、ベースラインとして取った（図18b）。mab #45およびPBSで処理された動物間の差を、対応のないt検定を用いて分析した。mab #45で処理された動物におけるPRGNの基底レベルは、PBSで処理された動物からのものと比較したとき、有意に増加された（p < 0.001、F10.0、DFn、9 Dfd 7; 3.3 ± 0.3 ng/ml、n = 10 対 1.1 ± 0.1 ng/ml、n = 8）（図18b）。

10

本発明は以下の態様も含み得る。

【1】

ソルチリンに特異的に結合し、ソルチリンへのPRGNの結合を阻害するかまたは減少させることが可能な抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【2】

前記抗原結合フラグメントが、Fvフラグメント（例えば一本鎖Fvまたはジスルフィド結合Fv）；Fab様フラグメント（例えばFabフラグメント、Fab'フラグメントまたはFab(ab)2フラグメント）；およびドメイン抗体（例えば単一のVH可変領域またはVL可変領域）からなる群から選択される、請求項1に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

20

【3】

前記抗体が、無傷の抗体からなる、請求項1または2に記載の抗体。

【4】

前記抗体が、サブタイプIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の抗体からなる群から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【5】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号170によって定義されるソルチリンのD領域に結合する、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

30

【6】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号185、186または187のいずれか1つによって定義されるソルチリンのD領域に結合する、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【7】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号180によって定義されるソルチリンのA領域にさらに結合する、請求項5または6に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【8】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号181、182、183または184のいずれか1つによって定義されるソルチリンのA領域にさらに結合する、請求項5または6に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

40

【9】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号170によって定義されるソルチリンのD領域内の、少なくとも3連続アミノ酸、例えば4、5、6または7連続アミノ酸に結合する、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【10】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、以下の特性：

a. 0.5～10nM、例えば1～5nMまたは1～2nMの、ソルチリンに対する結

50

合親和性 (K D) ;

- b . ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する能力 ;
- c . ソルチリン発現細胞によって P G R N のクリアランスを減少させ、および / または阻害する能力 ;
- d . ソルチリン発現細胞によって P G R N のエンドサイトーシスを減少させ、および / または阻害する能力 ;
- e . 脳内の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力、および / または濃度を増加させる能力
- f . ヒト - ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力

の 1 つまたは複数を示す、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

10

[1 1]

ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する前記抗体またはその抗原結合フラグメントの前記能力が、時間分解蛍光アッセイ (H T F R) を用いて、 50 n M 未満であるが、好ましくは、 10 n M ~ 0 . 2 n M の I C 50 におけるものである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[1 2]

ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する前記抗体またはその抗原結合フラグメントの前記能力が、 22 n M 以下、例えば 22 n M ~ 1 n M 、または 10 n M ~ 1 n M 、または 5 n M ~ 1 n M の I C 50 で、ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

20

[1 3]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、ヒト、ヒト化、組み換えまたはキメラ抗体である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[1 4]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 2 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 3 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 5 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 6 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

30

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[1 5]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 8 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1 4 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

40

[1 6]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 7 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 4 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[1 7]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 1 5 および 1 6 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 1 4 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[1 8]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 0 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;

50

- c . 配列番号 1 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 3 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[1 9]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 6 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 0]

10

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 5 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 1]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 1 9 および 2 0 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 1 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 2]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 1 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 8 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 2 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 2 1 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 2 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[2 3]

20

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 2 4 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 2 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 4]

30

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 2 3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 2 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 5]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 2 3 および 2 4 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 2 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 6]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 2 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 2 6 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 2 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 2 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 2 9 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 3 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[2 7]

40

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 3 2 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 2 6 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[2 8]

50

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号31を含む軽鎖可変領域を含む、請求項26に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[29]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項27および28に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項26に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[30]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号33を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号34を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号35を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号36を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号37を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号38を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[31]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号40を含む重鎖可変領域を含む、請求項30に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[32]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号39を含む軽鎖可変領域を含む、請求項30に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[33]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項31および32に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項30に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[34]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号41を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号42を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号43を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号44を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号45を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号46を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[35]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号48を含む重鎖可変領域を含む、請求項34に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[36]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号47を含む軽鎖可変領域を含む、請求項34に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[37]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項35および36に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項34に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[38]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号49を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号50を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;

10

20

30

40

50

- c . 配列番号 5 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 5 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 5 3 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 5 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[3 9]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 5 6 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 3 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[4 0]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 5 5 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 3 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[4 1]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 3 9 および 4 0 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 3 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[4 2]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 5 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 5 8 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 5 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 6 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 6 1 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 6 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[4 3]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 6 4 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 4 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[4 4]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 6 3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 4 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[4 5]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 4 3 および 4 4 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 4 2 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[4 6]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 6 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 6 6 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 6 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 6 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 6 9 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 7 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[4 7]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 7 2 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 4 6 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[4 8]

10

20

30

40

50

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号71を含む軽鎖可変領域を含む、請求項46に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[49]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項47および48に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項46に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[50]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号73を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号74を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号75を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号76を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号77を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号78を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[51]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号80を含む重鎖可変領域を含む、請求項50に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[52]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号79を含む軽鎖可変領域を含む、請求項50に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[53]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項51および52に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項50に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[54]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号81を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号82を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号83を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号84を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号85を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号86を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[55]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号88を含む重鎖可変領域を含む、請求項54に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[56]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号87を含む軽鎖可変領域を含む、請求項54に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[57]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項55および56に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項54に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[58]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号89を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号90を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;

10

20

30

40

50

- c . 配列番号 9 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 9 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 9 3 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 9 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[5 9]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 9 6 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 5 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 0]

10

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 9 5 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 5 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 1]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 5 9 および 6 0 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 5 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 2]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 9 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 9 8 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 9 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 0 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 0 1 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 0 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[6 3]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 0 4 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 6 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 4]

20

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 0 3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 5]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 6 3 および 6 4 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 6 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 6]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 1 0 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 0 6 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 0 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 0 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 0 9 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 1 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[6 7]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 1 2 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 6 6 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[6 8]

40

50

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号111を含む軽鎖可変領域を含む、請求項66に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[69]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項67および68に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項66に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[70]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号113を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号114を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号115を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号116を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号117を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号118を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[71]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号120を含む重鎖可変領域を含む、請求項70に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[72]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号119を含む軽鎖可変領域を含む、請求項70に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[73]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項71および72に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項70に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[74]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号121を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号122を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号123を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号124を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号125を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号126を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[75]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号128を含む重鎖可変領域を含む、請求項74に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[76]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号127を含む軽鎖可変領域を含む、請求項74に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[77]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項75および76に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項74に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[78]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号129を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号130を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;

10

20

30

40

50

- c . 配列番号 1 3 1 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 3 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 3 3 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 3 4 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[7 9]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 3 6 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 7 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 0]

10

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 3 5 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 7 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 1]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 7 9 および 8 0 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 7 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 2]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 1 3 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 3 8 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 3 9 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 4 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 4 1 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 4 2 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[8 3]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 4 4 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 8 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 4]

20

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 4 3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 8 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 5]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項 8 3 および 8 4 に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項 8 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 6]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号 1 4 5 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 1 ;
- b . 配列番号 1 4 6 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 2 ;
- c . 配列番号 1 4 7 を含む軽鎖可変領域 L - C D R 3 ;
- d . 配列番号 1 4 8 を含む重鎖可変領域 H - C D R 1 ;
- e . 配列番号 1 4 9 を含む重鎖可変領域 H - C D R 2 ; および
- f . 配列番号 1 5 0 を含む重鎖可変領域 H - C D R 3

を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント

。

[8 7]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 1 5 2 を含む重鎖可変領域を含む、請求項 8 6 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[8 8]

40

50

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号151を含む軽鎖可変領域を含む、請求項86に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[89]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項87および88に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項86に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[90]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号153を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号154を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号155を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号156を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号157を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号158を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[91]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号160を含む重鎖可変領域を含む、請求項90に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[92]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号159を含む軽鎖可変領域を含む、請求項90に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[93]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項91および92に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項90に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[94]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

- a . 配列番号161を含む軽鎖可変領域L - CDR1 ;
- b . 配列番号162を含む軽鎖可変領域L - CDR2 ;
- c . 配列番号163を含む軽鎖可変領域L - CDR3 ;
- d . 配列番号164を含む重鎖可変領域H - CDR1 ;
- e . 配列番号165を含む重鎖可変領域H - CDR2 ; および
- f . 配列番号166を含む重鎖可変領域H - CDR3

を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[95]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号168を含む重鎖可変領域を含む、請求項94に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[96]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号167を含む軽鎖可変領域を含む、請求項94に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[97]

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、請求項95および96に記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む、請求項94に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[98]

請求項1～97のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む調製物であって、前記調製物が、ソルチリンに結合することが可能でないかまたは前記調製物の抗ソルチリン機能性を実質的に変更しない自然発生する抗体を実質的に含まず、前記

10

20

30

40

50

機能性が、

(i) ソルチリンに対する結合親和性 (K_D) ;
 (ii) ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する能力 ;
 (iii) ソルチリン発現細胞によって P G R N のクリアランスを減少させ、および / または阻害する能力 ;
 (iv) ソルチリン発現細胞によって P G R N のエンドサイトーシスを減少させ、および / または阻害する能力 ;
 (v) ヒト - ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力 ;
 (vi) 脳内の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力および / または 10
 (vii) 慢性的に投与されるときの、前頭側頭認知症 (F T D) 、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) またはアルツハイマー病 (A D) の治療を提供する能力
 からなる群から選択される調製物。

[99]

請求項 1 ~ 98 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む調製物であって、前記モノクローナル抗体が、天然抗ソルチリン抗体の構造と比べて、そのアミノ酸配列の構造変化を有し、前記構造変化により、前記モノクローナ

ル抗体が、前記天然抗ソルチリン抗体によって示される機能性と比べて変化した機能性を示し、前記機能性が、 20

(i) ソルチリンに対する結合親和性 (K_D) ;
 (ii) ソルチリンへの P G R N 結合を減少させ、および / または阻害する能力 ;
 (iii) ソルチリン発現細胞によって P G R N のクリアランスを減少させ、および / または阻害する能力 ;
 (iv) ソルチリン発現細胞によって P G R N のエンドサイトーシスを減少させ、および / または阻害する能力 ;
 (v) ヒト - ソルチリン発現ノックインマウスにおいて血漿中の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力 ;
 (vi) 脳内の P G R N の量および / または濃度を増加させる能力、または 30
 (vii) 慢性的に投与されるときの、前頭側頭認知症 (F T D) 、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) および / またはアルツハイマー病 (A D) の治療を提供する能力
 からなる群から選択される調製物。

[100]

請求項 1 ~ 97 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 98 ~ 99 のいずれか一項に記載の調製物、および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

[101]

医療に使用するための、請求項 1 ~ 97 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 98 ~ 99 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 100 に記載の医薬組成物。 40

[102]

患者の脳内の減少した P G R N レベルに関連する疾患を治療するのに使用するための、請求項 1 ~ 97 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 98 ~ 99 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 100 に記載の医薬組成物。

[103]

患者の脳内の減少した P G R N レベルに関連する疾患を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 97 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 98 ~ 99 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 100 に記載の医薬組成物の使用。 50

[1 0 4]

患者の脳内の減少した P G R N レベルに関連する疾患を予防または治療する方法であつて、有効投与量の、請求項 1 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 9 8 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 1 0 0 に記載の医薬組成物を投与する工程を含む方法。

[1 0 5]

前記疾患が、F T D ; A L S ; または T D P 4 3 タンパク質症 (A D など) である、請求項 1 0 2 に記載の使用のための抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 1 0 3 に記載の使用、または請求項 1 0 4 に記載の方法。

[1 0 6]

10

前記治療が長期であり、好ましくは、少なくとも 2 週間、例えば少なくとも 1 か月間、または少なくとも 6 か月間、または少なくとも 1 年間にわたる、請求項 1 0 2 に記載の使用のための抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 1 0 3 に記載の使用、または請求項 1 0 4 に記載の方法。

[1 0 7]

請求項 1 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または請求項 9 8 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の調製物、または請求項 1 0 0 に記載の医薬組成物を含むキット。

[1 0 8]

20

ヒト細胞株、非ヒト哺乳動物細胞株、昆虫、酵母または細菌細胞株などの細胞株において生産または製造された、請求項 1 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

[1 0 9]

C H O 細胞株、H E K 細胞株、B H K - 2 1 細胞株、マウス細胞株 (骨髄腫細胞株など) 、線維肉腫細胞株、P E R . C 6 細胞株、H K B - 1 1 細胞株、C A P 細胞株および H u H - 7 ヒト細胞株において生産される、請求項 1 0 8 に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【図1】

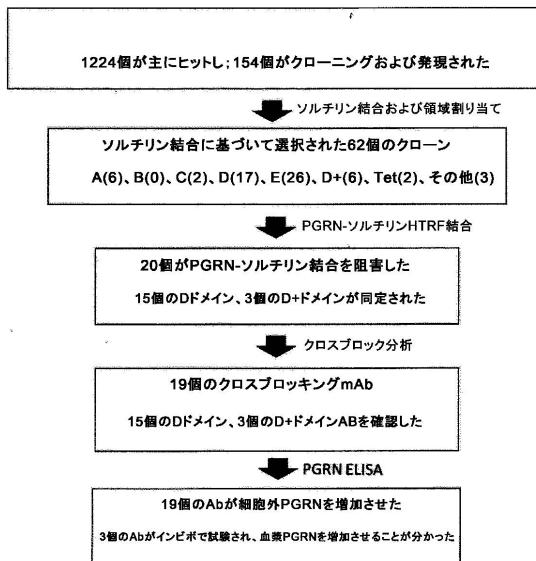


図1

【図2】

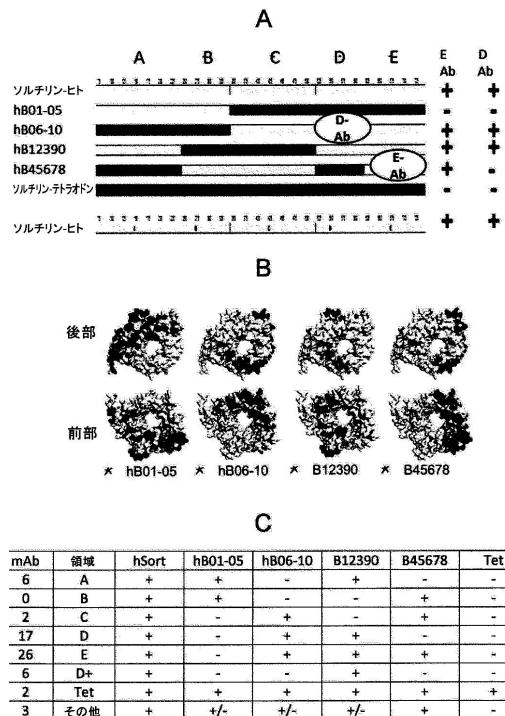


図2

【図3】

mAb	領域	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
002	D	2,40	NB	43,30	2,44	NB	NB
044	D	1,38	NB	21,20	1,03	NB	NB
045	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
68	D+	1,80	NB	NB	1,87	NB	NB
088	D	2,49	NB	9,55	1,57	NB	NB
093-01	D	3,47	NB	44,53	2,13	NB	NB
093-05	D	2,88	NB	43,24	1,78	NB	NB
193	D	2,07	NB	5,57	0,83	NB	NB
531	D+	5,50	NB	NB	2,29	NB	NB
548	D+	4,49	NB	NB	3,36	NB	NB
562	D	2,23	NB	24,56	1,34	NB	NB
566	D	2,93	NB	42,55	2,12	NB	NB
811	D	1,81	NB	8,00	1,08	NB	NB
849	D	1,01	NB	17,08	0,78	NB	NB
924	D	6,76	NB	20,01	3,83	NB	NB
1276	D	2,24	NB	8,78	0,93	NB	NB
1289	D	1,62	NB	15,23	0,96	NB	NB
1320	D	19,14	NB	55,43	12,32	NB	NB

+	EC50 0.1-10 ng/ml
+	EC50 >10 ng/ml
NB	結合なし

図3

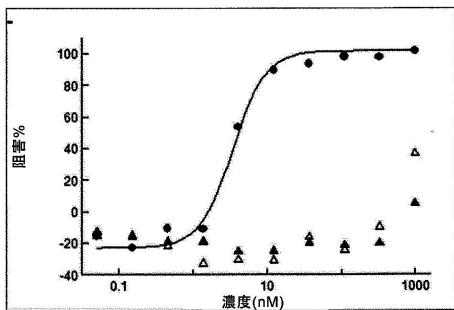
【図4】

mAb	領域	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
1F2F4	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
5E1F6	D	1,14	NB	0,72	0,59	NB	NB

+	結合
NB	結合なし

図4

【図5】



* 抗体は、用量反応曲線に適合するには弱すぎる。1μMにおける6%の阻害

** 対照抗体は、用量反応曲線に適合するには弱すぎる。1μMにおける37%の阻害

【図6】

Ab	最高濃度 (nM)	最高濃度での阻害%	IC50 (nM)	領域
IgG1-6003-002	500	91	4,3	D
IgG1-6003-044	1000	101	3,4	D
IgG1-6003-045	1000	102	3,9	D
IgG1-6003-068	1000	92	22	D+
IgG1-6003-088	1000	96	2,5	D
IgG1-6003-093-L01	1000	82	13	D
IgG1-6003-093-L05	1000	95	35	D
IgG1-6003-193	1000	93	1,8	D
IgG1-6003-531	1000	102	2,5	D+
IgG1-6003-548	600	87	11	D+
IgG1-6003-562	1000	100	5,8	D
IgG1-6003-566	1000	100	2,6	D
IgG1-6003-811	1000	102	4,4	D
IgG1-6003-849	1000	101	3,8	D
IgG1-6003-924	1000	100	3,3	D
IgG1-6003-1276	1000	108	2,5	D
IgG1-6003-1289	800	98	3,0	D
IgG1-6003-1320	900	75	32	D
IgG1-B12	1000	37	-	-

図6

図5

【図7-1】

領域	抗体	D	D+	D+	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
領域	抗体	548	531	002	044	045	088	193	562	566	811	878	1289	849					
D	548	0.04	0.01	0.00	0.04	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01	0.03					
D+	531	0.02	0.00	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01				
D	002	0.00	-0.02	-0.02	0.00	0.02	-0.02	-0.02	0.03	-0.02	-0.01	-0.02	-0.01	0.03					
D	044	0.02	0.00	-0.01	0.00	0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.00	0.01				
D	045	0.02	0.00	0.00	0.01	0.03	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01				
D	088	0.02	-0.01	-0.01	0.02	0.02	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.01	0.01				
D	153	0.03	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02				
D	562	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01				
D	566	0.00	-0.02	-0.04	-0.01	-0.01	-0.03	-0.03	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	-0.03				
D	811	-0.01	-0.02	-0.01	0.00	0.01	-0.01	-0.02	-0.02	-0.09	-0.02	-0.01	-0.02	-0.01	-0.02				
D	878	0.00	-0.01	-0.02	-0.01	0.00	-0.02	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01				
D	1289	-0.01	-0.02	-0.01	-0.01	0.00	-0.03	-0.03	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	-0.02				
D	849	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.01	-0.00	-0.02	-0.01	-0.01				
D	1276	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.08				
D	924	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01				
D	093-L01	0.01	0.00	-0.01	0.02	0.03	0.00	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00				
D	093-L05	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.01	-0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01				
D	5E1F6	0.02	0.01	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02				
D	1F2F4	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.00				
D+	058	-0.01	0.00	-0.01	-0.02	-0.01	0.00	-0.02	0.00	-0.01	0.00	-0.02	0.00	-0.01	-0.01				
D	1320	-0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01	-0.01				

図7

【図7-2】

領域	抗体	1276	924	093-L01	093-L05	5E1F6	1F2F4	068	1320	A1
D	抗体	D	D	D	D	D	D	D	D	A
D+	548	0.02	0.01	0.04	0.04	0.01	0.02	0.00	0.00	0.04
D+	531	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00	0.07
D	002	0.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.07	0.00	0.02	0.57
D	044	0.01	0.01	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00	0.01	0.49
D	045	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.00	0.01	0.52
D	088	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.77
D	193	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.04	0.42
D	562	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.23
D	566	-0.03	-0.01	0.01	0.00	-0.02	-0.01	-0.04	0.01	0.58
D	811	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.77
D	1289	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	0.00	0.00	0.45
D	849	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.73
D	1276	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.70
D	924	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.52
D	093-L01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.65
D	093-L05	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.03	0.62
D	5E1F6	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.39
D	1F2F4	0.00	0.04	-0.01	0.01	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.41
D+	068	-0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.52
D	1320	-0.01	0.00	0.04	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.00	0.19

図7(継続)

【図 7 - 3】

領域	抗体	AbE1	AbE2	AbE3	AbE4	AbE5	AbE6	AbE7	AbE8
D+	548	0.01	0.03	0.22	0.26	0.27	0.22	0.08	0.01
D+	531	0.28	0.60	0.83	0.92	0.83	0.87	0.69	0.51
D	002	0.25	0.52	0.74	0.70	0.79	0.78	0.67	0.42
D	044	0.18	0.42	0.64	0.73	0.68	0.68	0.56	0.32
D	045	0.23	0.47	0.67	0.72	0.72	0.70	0.60	0.36
D	088	0.42	0.79	1.00	1.19	1.13	1.09	0.96	0.64
D	193	0.19	0.38	0.54	0.57	0.52	0.53	0.45	0.27
D	562	b	0.23	0.39	0.36	0.33	0.33	0.24	0.13
D	566	0.25	0.55	0.77	0.88	0.87	0.79	0.60	0.35
D	811	0.42	0.79	1.02	1.17	1.13	1.09	0.97	0.65
D	1289	0.18	0.43	0.66	0.67	0.63	0.64	0.47	0.29
D	849	0.37	0.74	0.96	1.11	1.08	1.04	0.90	0.58
D	1276	0.39	0.74	0.83	1.03	1.00	0.97	0.83	0.57
D	924	0.25	0.50	0.66	0.67	0.68	0.66	0.52	0.33
D	093-L01	0.31	0.64	0.82	0.93	0.92	0.87	0.78	0.49
D	093-L05	0.29	0.58	0.80	0.89	0.88	0.84	0.69	0.45
D	5E1F6	0.19	0.39	0.62	0.57	0.59	0.54	0.40	0.27
D	1F2F4	0.16	0.38	0.60	0.63	0.62	0.58	0.44	0.26
D+	068	0.26	0.58	0.80	0.94	0.94	0.89	0.80	0.43
D	1320	b	b	0.22	0.28	0.28	0.29	0.17	b

図7(続き)

【図 8】

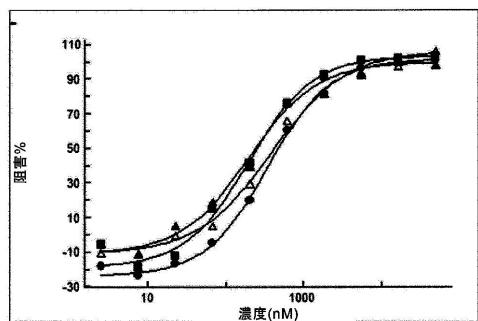


図8

【図 9】

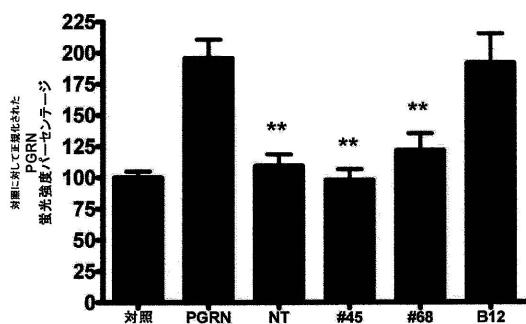


図9

【図 10】

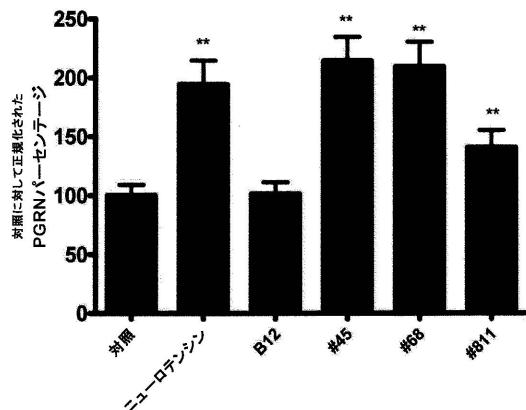


図10

【図 11】

Ab No	PGRN %	Ab No	PGRN %
002	142	849	149
044	166	1276	163
045	202	924	125
088	121	093-L01	116
193	207	093-L05	140
562	139	1320	114
566	139	1F2F4	282
811	146	5E1F6	177
1289	117		
548	139	68	201
531	140		

図11

【図12】

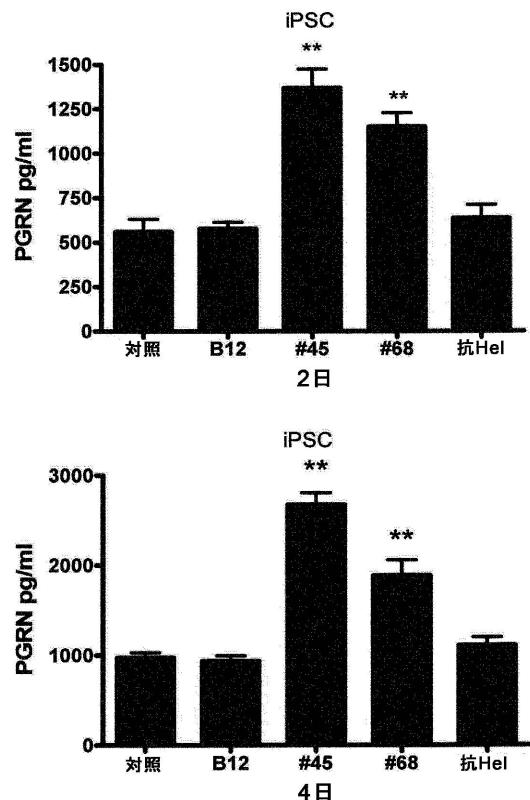


図12

【図13-1】

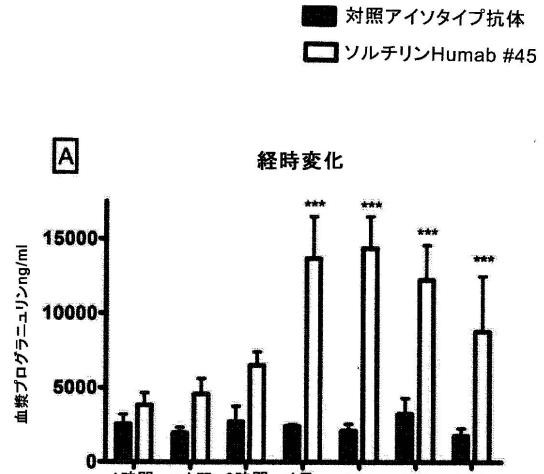


図13 a

【図13-2】

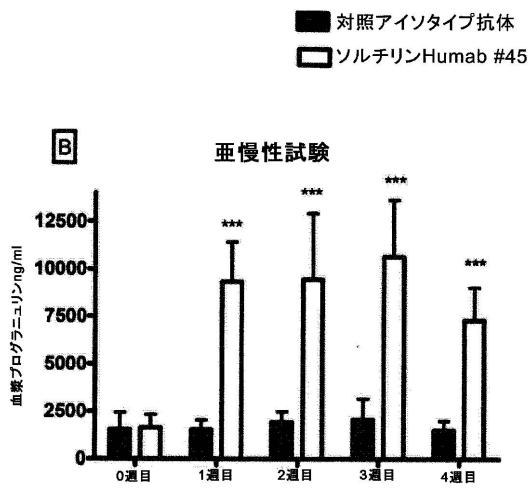


図13 b

【図13-3】

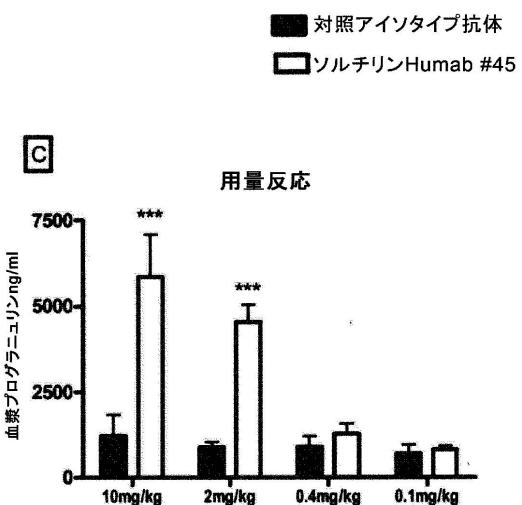


図13 c

【図14】

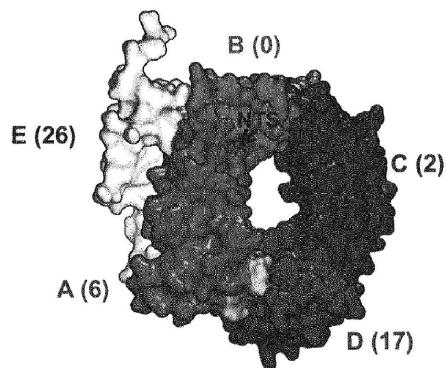
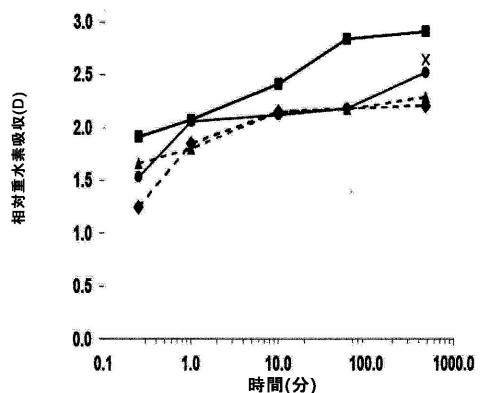


図14

【図15-1】

109-114 RGSVSL



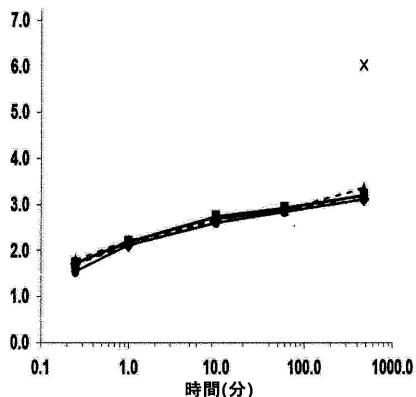
→ソルチリン →ソルチリン+mAb45 →ソルチリン+mAb68 →ソルチリン+mAb811 →ソルチリン+mAb811*90%の対照試料

図15 a (1)

【図15-2】

115-125 SWVG DSTGVIL

相対重水素吸収(D)



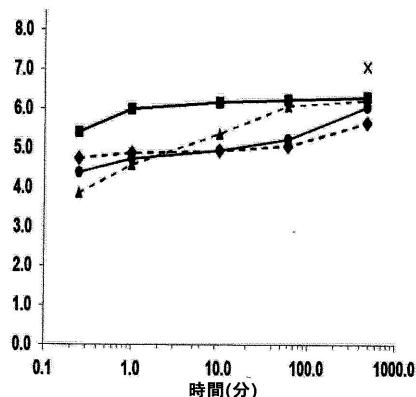
→ソルチリン →ソルチリン+mAb45 →ソルチリン+mAb68 →ソルチリン+mAb811 →ソルチリン+mAb811*90%の対照試料

図15 a (2)

【図15-3】

126-138 VLTTFHVPLVIMT

相対重水素吸収(D)

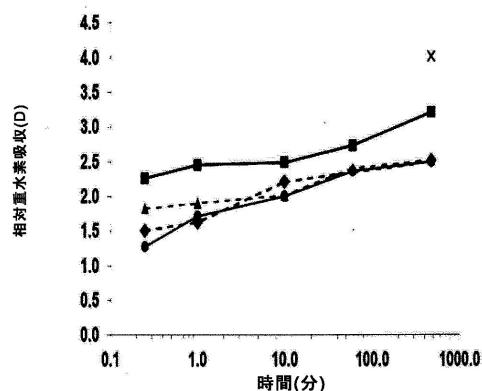


→ソルチリン →ソルチリン+mAb45 →ソルチリン+mAb68 →ソルチリン+mAb811 →ソルチリン+mAb811*90%の対照試料

図15 a (3)

【図15-4】

137-144 MTFGQSKL

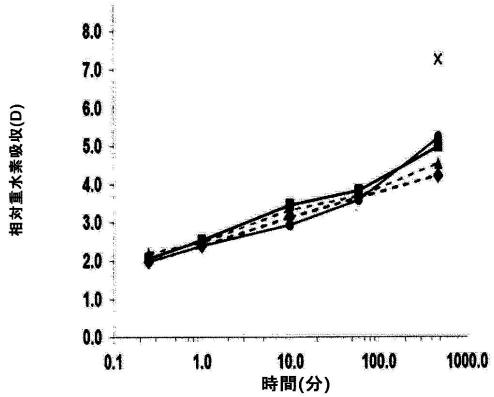


→ソルチリン ←ソルチリン+mAb45 ←ソルチリン+mAb68 × ソルチリン+mAb811 * 90%の対照試料

図15 a (4)

【図15-5】

145-159 YRSEDYGKNFKDITD

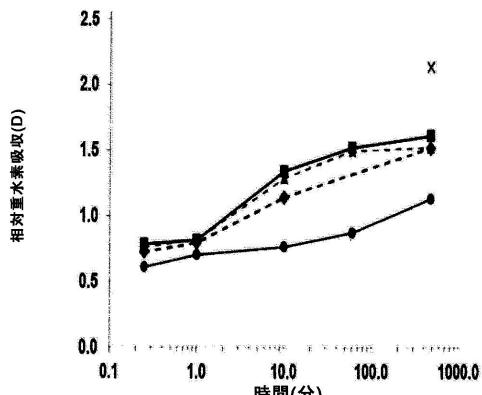


→ソルチリン ←ソルチリン+mAb45 ←ソルチリン+mAb68 × ソルチリン+mAb811 * 90%の対照試料

図15 a (5)

【図15-6】

154-159 FKDITD

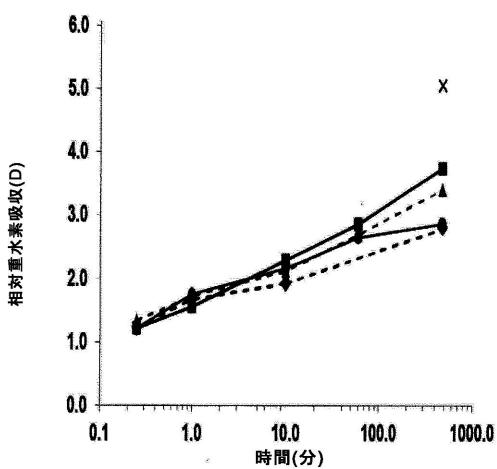


→ソルチリン ←ソルチリン+mAb45 ←ソルチリン+mAb68 × ソルチリン+mAb811 * 90%の対照試料

図15 a (6)

【図15-7】

562-572 FTRDPIYFTGL

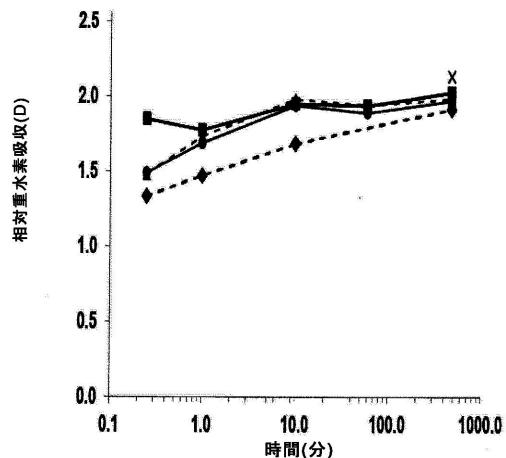


→ソルチリン ←ソルチリン+mAb45 ←ソルチリン+mAb68 × ソルチリン+mAb811 * 90%の対照試料

図15 b (1)

【図15-8】

588-592 FTESF

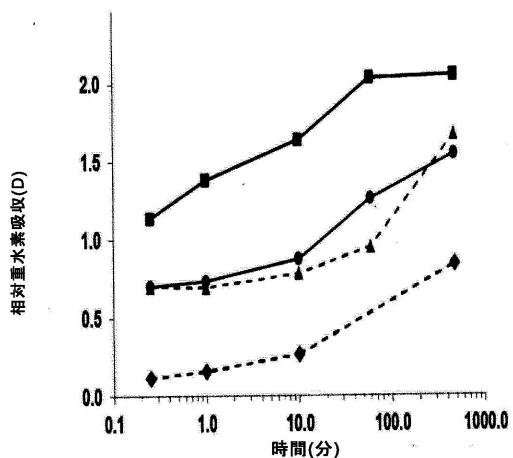


→ソルチリン ←+ソルチリン+mAb45 ←ソルチリン+mAb68 × ソルチリン+mAb811 × 90%の対照試料

図15b(2)

【図15-9】

593-597 LTSQW

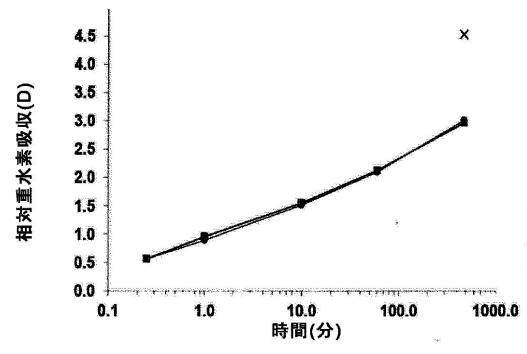


→ソルチリン ←+ソルチリン+mAb45 ←ソルチリン+mAb68 × ソルチリン+mAb811

図15b(3)

【図16-1】

563-572 TRDPYFTGL

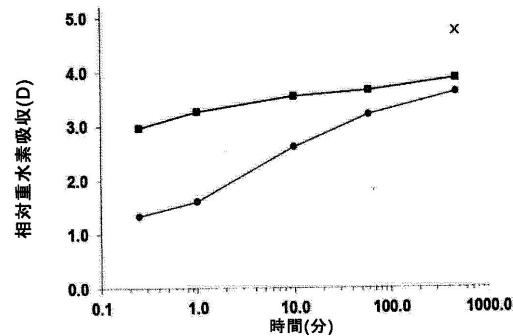


→ソルチリン ←+ソルチリン+mAb30

図16a(1)

【図16-2】

617-629 YTILWAHSTDPED

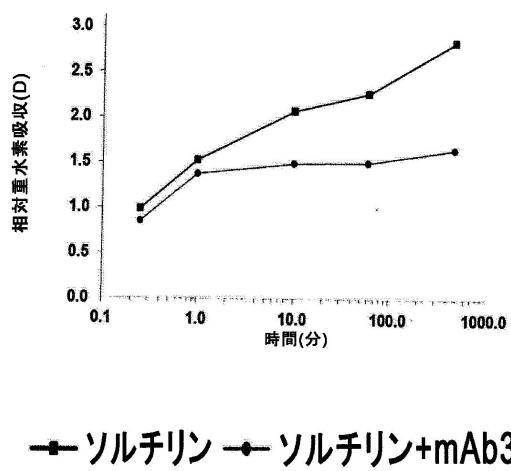


→ソルチリン ←+ソルチリン+mAb30

図16a(2)

【図16-3】

630-637 YEDGCILG

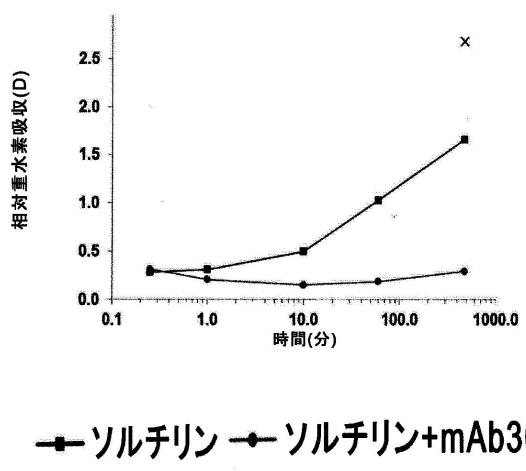


—■—ソルチリン —●—ソルチリン+mAb30

図16 a (3)

【図16-4】

637-642 GYKEQF

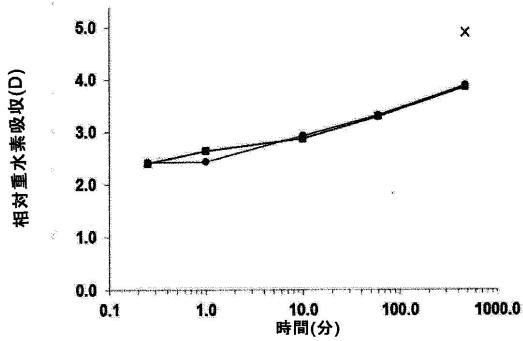


—■—ソルチリン —●—ソルチリン+mAb30

図16 a (4)

【図16-5】

646-656 RKSSVCQNGRD

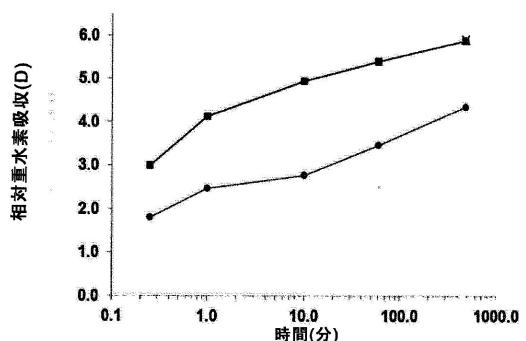


—■—ソルチリン —●—ソルチリン+mAb30

図16 a (5)

【図16-6】

657-667 YVVTQPSICL

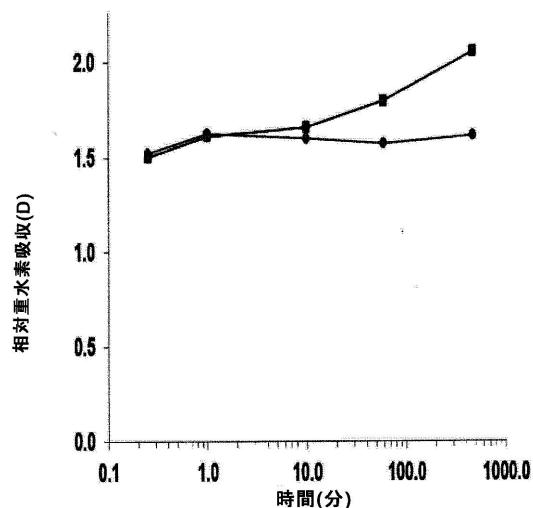


—■—ソルチリン —●—ソルチリン+mAb30

図16 a (6)

【図16-7】

668-672 CSLED

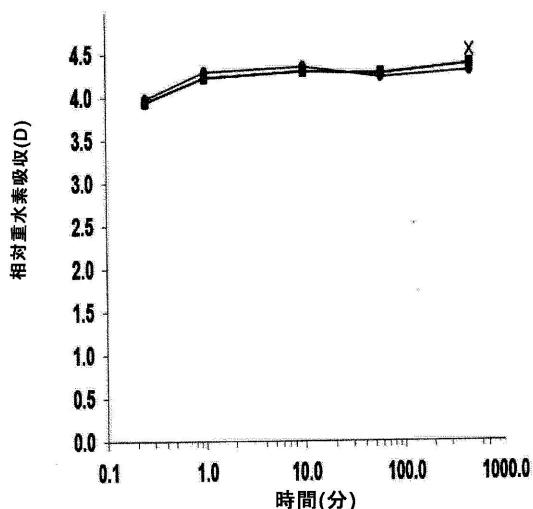


—ソルチリン—♦ソルチリン+mAb30

図16b(1)

【図16-8】

704-714 YGREEHLTTNG

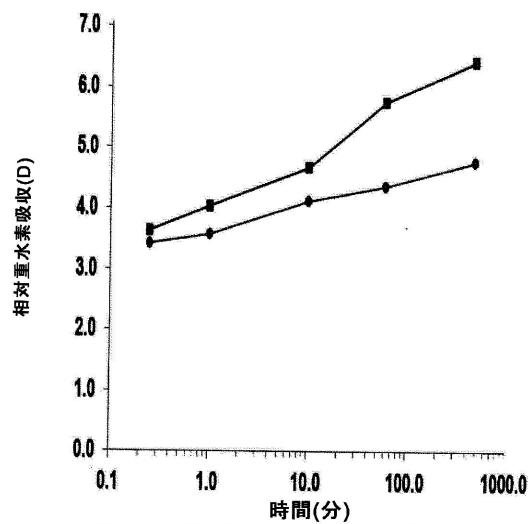


—■ソルチリン—♦ソルチリン+mAb30

図16b(2)

【図16-9】

715-728 YRKIPGDKCQGGVN



—■ソルチリン—♦ソルチリン+mAb30

図16b(3)

【図17】

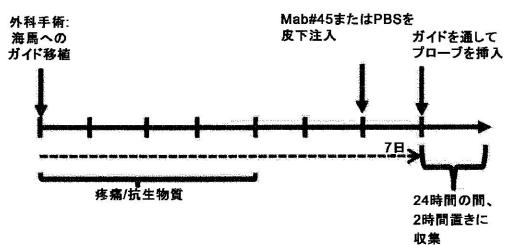
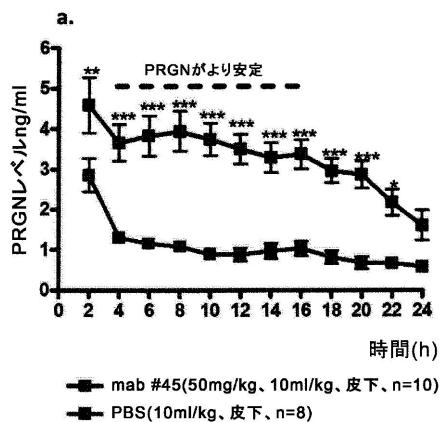


図17

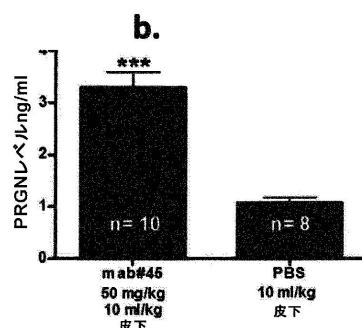
【図18-1】



データ:平均±SEM; *p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、mab#45対PBS、二元配置ANOVA、続いてボンフェローニ事後検定

図18a

【図18-2】



投与の24→48時間後
データ:平均±SEM; ***p<0.001、mab#45対PBS、t検定

図18b

【図18-3】

時間(h)	mab#45			PBS		
	Y	SEM	N	Y	SEM	N
2	4.587163	0.684416	10	2.854475	0.411770	8
4	3.654225	0.453960	10	1.303813	0.129774	8
6	3.826151	0.499164	10	1.157348	0.103958	8
8	3.941664	0.495235	10	1.084373	0.102409	8
10	3.744573	0.396738	10	0.889935	0.139000	8
12	3.498750	0.369875	10	0.880561	0.161299	8
14	3.287708	0.362766	10	0.966836	0.190743	8
16	3.372367	0.365127	10	1.031850	0.180413	8
18	2.962828	0.298671	10	0.817940	0.158949	8
20	2.868518	0.343551	10	0.681344	0.153457	8
22	2.173472	0.322407	10	0.673761	0.122029	8
24	1.604464	0.377046	10	0.583756	0.123556	8

図18c

【配列表】

<0006979397000001.app>

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- | | | | | |
|--------|-------|-----------|--------|-------|
| 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 | 5/10 | (2006.01) | C 12 N | 5/10 |
| C 12 P | 21/08 | (2006.01) | C 12 P | 21/08 |
- (72)発明者 ピールマン ローン, ラース, ク里斯チャン
デンマーク国 2500 バルビー, オッティリアベイ 9 ハー・ルンドベック・アクチエゼ
ルスカベット
- (72)発明者 マリク, イブラヒム, ジヨン
デンマーク国 2500 バルビー, オッティリアベイ 9 ハー・ルンドベック・アクチエゼ
ルスカベット
- (72)発明者 スタヴェンハーゲン, ジェフリー, ビー
デンマーク国 2500 バルビー, オッティリアベイ 9 ハー・ルンドベック・アクチエゼ
ルスカベット
- (72)発明者 クリステンセン, セーレン
デンマーク国 2500 バルビー, オッティリアベイ 9 ハー・ルンドベック・アクチエゼ
ルスカベット
- (72)発明者 エグブジャーグ, ジャン
デンマーク国 2500 バルビー, オッティリアベイ 9 ハー・ルンドベック・アクチエゼ
ルスカベット
- (72)発明者 ジェリッツエン, アーノウト
オランダ国 エヌエル シーエム 3584 ユトレヒト, イエールラーン 60 ゲンマブ ベ
ー. フェー.
- (72)発明者 ヴァン デン ブリンク, エドワード
オランダ国 エヌエル シーエム 3584 ユトレヒト, イエールラーン 60 ゲンマブ ベ
ー. フェー.
- (72)発明者 パレン, ポール
オランダ国 エヌエル シーエム 3584 ユトレヒト, イエールラーン 60 ゲンマブ ベ
ー. フェー.
- (72)発明者 デ ジヨン, ロブ
オランダ国 エヌエル シーエム 3584 ユトレヒト, イエールラーン 60 ゲンマブ ベ
ー. フェー.

審査官 林 康子

- (56)参考文献 國際公開第2010/022175 (WO, A1)
BD Transduction Laboratories, Technical Data Sheet, Purified Mouse Anti-Neurotensin Receptor 3, Material Number: 612100, (2008)
Life Sciences, (2012), Vol.91, pp.1177-1186
Neurobiology of Aging, (2013), Vol.34, pp.2541-2547
Human Molecular Genetics, (2014), Vol.23, No.6, pp.1467-1478
MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, 2015年12月, VOL:34, NR:6,
PAGE(S):390 - 395, <http://dx.doi.org/10.1089/mab.2015.0042>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 K	16 / 28
C 12 N	15 / 13

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)