

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7607590号
(P7607590)

(45)発行日 令和6年12月27日(2024.12.27)

(24)登録日 令和6年12月19日(2024.12.19)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113 Z Z N A
C 0 7 K	14/07 (2006.01)	C 0 7 K	14/07
請求項の数 11 (全57頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-569042(P2021-569042)	(73)特許権者	517303085
(86)(22)出願日	令和2年5月21日(2020.5.21)		アルジェニクス ビービー
(65)公表番号	特表2022-533705(P2022-533705 A)		ベルギー 9 0 5 2 ヘント インダスト
(43)公表日	令和4年7月25日(2022.7.25)	(74)代理人	リエパーク ズウィジナルデ 7
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/064234		100097456
(87)国際公開番号	WO2020/234432	(72)発明者	弁理士 石川 徹
(87)国際公開日	令和2年11月26日(2020.11.26)		クリストフ ブランシェット
審査請求日	令和5年5月19日(2023.5.19)	(72)発明者	ベルギー王国 9 0 5 2 ヘント インダ
(31)優先権主張番号	1907153.9		ストリエパーク ズウィジナルデ 7
(32)優先日	令和1年5月21日(2019.5.21)	(72)発明者	ケビン ブディング
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		オランダ王国 3 4 5 1 エックスジェイ
		(72)発明者	フルーテン セクレタリス パースティ
			グラーン 1 2
			エリック ハック
			オランダ王国 1 1 1 1 ビービー ディエ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 異常タンパク質性ニューロパチーを治療する方法において使用するための補体系のアンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
対象の異常タンパク性ニューロパチーを治療するのに使用するための、可変重鎖（VH）ドメイン及び可変軽鎖（VL）ドメインを含む抗C2抗体又は抗原結合断片を含有する、医薬組成物であって、
該VHドメインが、配列番号8のアミノ酸配列を含むか又はこれからなり、かつ
該VLドメインが、配列番号9のアミノ酸配列を含むか又はこれからなり、
該抗体又は抗原結合断片が、C2のC2bドメインに結合し、かつ
該異常タンパク性ニューロパチーが、多巣性運動ニューロパチー（MMN）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、又はギラン・バレー症候群（GBS）である、前記医薬組成物。

【請求項2】
前記抗C2抗体又は抗原結合断片が、古典補体経路及び/又はレクチン補体経路を阻害する、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】
前記異常タンパク性ニューロパチーが、IgM又はIgG免疫グロブリンの存在によって特徴付けられる、請求項1又は2記載の医薬組成物。

【請求項4】
前記異常タンパク性ニューロパチーが、自己抗体の存在によって特徴付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記異常タンパク性ニューロパチーが、神経抗原に対する自己抗体の存在によって特徴付けられる、請求項 1～4 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記神経抗原が、ガングリオシド又はミエリン関連糖タンパク質 (MAG) である、請求項 5 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記ガングリオシドが、GM1、GM1b、GD1a、GD1b、GD3、GT1a、GT1b、及びGQ1bから選択される、請求項 6 記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記ガングリオシドが、GM1である、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記異常タンパク性ニューロパチーが、MMNである、請求項 1～8 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記抗体又は抗原結合断片が、ヒトIgG重鎖定常ドメインを含む、請求項 1～9 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記抗体又はその抗原結合断片が、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1～10 のいずれか一項記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、補体系のアンタゴニストを用いて異常タンパク性ニューロパチーを治療する方法に関する。該アンタゴニストは、補体因子C5の上流の補体系を遮断又は阻害する。治療し得る異常タンパク性ニューロパチーとしては、特に、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、及びギラン・バレー症候群(GBS)が挙げられる。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

補体系は、微生物侵入者及び損傷細胞を生物体から排除する抗体及び食細胞の能力を増強(補完)する自然免疫系の重要な側面である。それゆえ、補体は、感染に対する必要不可欠な防御線を形成する。

【0003】

感染に対する応答は、宿主に対するリスクを防ぐのに十分に迅速かつ包括的であるが、健康な細胞に対する損傷を回避するのに十分に選択的でなければならない。補体は、通常、30を上回る可溶性及び細胞表面発現タンパク質の段階的かつ厳密に調節されたカスケード系を利用することにより、この微妙なバランスを達成する。補体因子は、不活性な前駆体タンパク質として血液中を循環する。この系の活性化は、1つの因子がカスケード中のさらに下流の補体タンパク質の特異的なタンパク質分解によって後続の因子を活性化する活性化カスケードを生じさせる。このカスケードは、最終的に、マクロファージ及び白血球を誘引し、活性化するアナフィラトキシンの産生;溶解性膜攻撃複合体(MAC)の形成;並びに食作用及び破壊の標的のオプソニン化をもたらすことができる。

【0004】

補体系の活性化は、3つの経路:古典経路;レクチン経路;及び代替経路を介して生じることができる(図1を参照)。各々の経路は、中心となる補体C3を活性化し、これにより、共通の末端経路の活性化がもたらされ、MACの形成に至る(Muller-Eberhardの文献、Annu Rev Biochem 1988, 57:321)。古典経路は、IgM又はIgGクラスターによって強く始動

10

20

30

40

50

されるので、抗体依存的と呼ばれることが多い。この経路は、通常、六量体C1qが抗体/抗原複合体中に存在するIgG又はIgM分子のFc領域に結合したときに活性化される。結合すると、C1sがC4を切断して、C4a及びC4bを産生する。次に、C2が、表面に結合したC4bに(Mg^{2+} の存在下で)結合して、C4bC2複合体を形成し、その後、これが、活性化されたC1sによって2つの断片:より小さい30kDa断片のC2b及びより大きい70kDa断片のC2aへと切断される。より大きい70kDa断片は、C4bに結合したままで、C4bC2a古典経路C3コンバーターゼを形成する。C3コンバーターゼは、C3をC3a(アナフィラトキシン;炎症を増強する)及びC3bへと切断し、それにより、増幅及び下流エフェクター機能を始動することができる。

【0005】

レクチン経路の活性化は、病原体又は微生物の表面に発現される細菌炭水化物モチーフへのマンノース結合レクチン(MBL)又はフィコリンの結合によって媒介される。MBL結合は、その後、MBL関連セリンプロテイナーゼ-1(MASP-1)及びMASP-2の活性化を刺激し、C4及びC2の切断をもたらし、C4bC2aレクチン経路C3コンバーターゼの生成をもたらす。

【0006】

代替経路は、初期の誘因にかかわらず従事する増幅ループと考えることができる。C3bは、微生物の細胞表面、異物、又は損傷組織上の標的に直接結合する。その後、表面に結合したC3bは、因子Bに結合して、C3bBを形成することができる。この複合体は、因子Dの存在下で、Ba及びBbへと切断される。BbはC3bと関連したままで、C3bBbを形成し、これが代替経路C3コンバーターゼとなる。

【0007】

それゆえ、これら3つの経路は、中心となるC3コンバーターゼで収束する。C3コンバーターゼC4bC2a又はC3bBbは、さらなるC3b分子とともに多量体複合体を形成して、それぞれ、C5コンバーターゼC4bC2aC3b及びC3bBbC3bを生じさせる。これらの酵素は、補体因子C5を優先的に切断して、C5a(アナフィラトキシン;炎症を増強する)及び断片C5bを遊離させる。C5bは、C6及びC7を動員して、これらと関連し;この複合体は、細胞膜に挿入されるようになって、C8と相互作用し;これにより、複数単位のC9分子の結合が誘導されて、C5b-9膜攻撃複合体(MAC)又は可溶性末端補体複合体(TCC)が形成される。MACは、それ自体を細胞膜に挿入することにより孔を形成し、主に、無核細胞(例えば、古い赤血球及びある種のグラム陰性細菌)の細胞溶解をもたらす。しかしながら、有核細胞では、MAC形成が厳密に調節され、その溶解作用は、イオンポンプによって打ち消され得る。さらに、亜溶解性レベルのMACは、宿主細胞の損傷又は活性化を誘導し、炎症促進性メディエータとして作用することができる。カスケードのMAC媒介性効果に加えて、アナフィラトキシンC3a及びC5aは、強力な免疫モジュレーターとして作用し、免疫細胞を活性化の部位に動員する。オプソニンC3b及びC4bも様々な補体受容体に結合し、免疫複合体除去、食作用、又はB細胞応答の刺激を媒介することができる。

【0008】

補体系は、いくつかの補体調節タンパク質によってさらに制御される。これらには、古典経路及びレクチン経路の開始段階を阻害するC1-インヒビター; C3コンバーターゼを解離させる因子H; C4b及びC3bを分解する因子I;並びにMAC形成を阻害する血漿タンパク質ビトロネクチン及びクラスτεリン及び膜タンパク質CD59が含まれる(Sahuらの文献、Immunol Res 1998, 17:109; Campbellらの文献、Annu Rev Immunol 1988, 6:161)。

【0009】

補体は、病原生物に対する必要不可欠な防御線を形成するが、適切に制御されない場合、これらの防御機能は、宿主細胞に不利になり、免疫、炎症、及び退行性状態を誘発し又は悪化させることがある。補体が、自己免疫疾患で又は機能不全調節タンパク質を有する個体で生じるように過剰活性化される場合、それは、多くの器官で重篤な炎症応答を促進する(Noris及びRemuzziの文献、Semin Nephrol 2013, 33(6): 479-492)。全身での補体タンパク質の遍在的発現を考慮すると、補体系は、炎症性疾患、変性疾患、癌、及び移植片拒絶反応などの免疫成分を有する多くの疾患において役割を果たし得ると考えられ

10

20

30

40

50

る。補体系は、アルツハイマー病などの中枢神経系の疾患にも次第に関係があるとされるようになっている(Carpaniniらの文献、Front Immunol 2019, 10:362)。

【0010】

異物又は損傷材料の最初の検出器と免疫応答の下流のオーケストレータの両方としての補体の独特の位置のために、補体は魅力的な治療標的となっている。実際、臨床開発プログラムが1ダースを超える異なる補体標的に対するインヒビターについて最近報告されている。

【0011】

いくつかの可溶性補体インヒビターが生産されている。C1-INH(様々な製造業者)は、現在、遺伝性血管性浮腫の治療に認可されており、敗血症及び虚血-再灌流傷害などの他の障害で評価されているところである。しかしながら、C1-INHは、古典経路とレクチン経路の両方のプロテアーゼ並びに凝固及び接触系の非補体プロテアーゼの始動を遮断する広範なセリンプロテアーゼインヒビターである。対照的に、スチムリマブ(別名BIVV009、旧名TNT009)は、C1sを標的とすることにより古典補体経路を選択的に阻害するように設計されているヒト化モノクローナル抗体であり、溶血性貧血及び寒冷凝集素症の治療における見込みを示している。このカスケードの重要なタンパク質を阻害する他の抗体も開発されている。Annexonは、神経変性障害及び自己免疫障害のためのC1qのレベルで作用するモノクローナル抗体(ANX005)を開発し、一方、Omerosは、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の治療のための臨床的候補として、MASP-2に対するモノクローナル抗体(OMS721)を開発した。

【0012】

補体カスケードの反対側で作用するのは、現在、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)及びaHUSの治療での使用に認可されている抗C5抗体のエクリズマブ(Soliris(登録商標))である。この抗体は、その活性化をC5コンバーターゼによって妨げるC5上の部位に結合し、それにより、C5aの放出及びMACの形成を障害する。抗C5a抗体(IFX-1)、並びに様々な障害の潜在的治療としての見込みを示しているいくつかの小分子C5aR1アンタゴニスト(PMX53; PMX205; CCX186)も評価されている。

【0013】

補体カスケードのC2タンパク質を標的とするための抗体も開発されている。国際特許出願WO2014/189378号には、結合分子、例えば、特異的なC2活性阻害特性を有する抗体が記載されている。そのような結合分子は、様々なヒト疾患、例えば、炎症性疾患又は虚血-再灌流傷害の症状の治療において有用であると記載されている。

【0014】

補体カスケードを標的とする治療剤を開発するための著しい努力にもかかわらず、補体インヒビターの臨床的成功は、依然として限定されている。これは、補体カスケードの複雑な性質が原因である可能性が高い。補体阻害に基づく有効な治療法を開発するために、様々な障害における過剰に活性のある補体活性の役割をより良く理解することが依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0015】

(発明の概要)

本発明者らは、補体因子C5の上流の補体カスケードを標的とすることが、異常タンパク性ニューロパチー、特に、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、及びギラン・バレー症候群(GBS)などのニューロパチーの治療における有効な戦略である可能性が高いことを見出した。異常タンパク性ニューロパチーは、血清中の「パラプロテイン」の存在によって特徴付けられる末梢性ニューロパチーである。パラプロテインは、B-リンパ球又は血漿細胞の異常なクローン性増殖によって比較的過剰に産生される特定のタイプのモノクローナル抗体又は免疫グロブリンである。正常な免疫グロブリン抗体とは異なり、パラプロテインは、通常、感染症と闘うことができない。

【0016】

本明細書で報告及び例示されているように、補体系は、異常タンパク性ニューロパチーの病理において重要な役割を果たす。特に、MMN、CIDP、及びGBSを有する患者由来の血清は、インビトロでのシュワン細胞と運動ニューロンの両方のオプソニン化によって補体を活性化することが見出された。重要なことに、本明細書で提示されている結果は、シュワン細胞及び運動ニューロンが、膜攻撃複合体(MAC)の末端重合を妨げる因子である高レベルの補体調節タンパク質CD59を発現することをさらに示している。これらの結果は、シュワン細胞が補体媒介性溶解に抵抗性であることも示している。まとめると、これは、異常タンパク性ニューロパチーにおいて、補体媒介性溶解からの保護が存在すること、及び観察された病理がMAC非依存的である、すなわち、MACの上流の補体タンパク質によって引き起こされる可能性が高いことを示している。したがって、本発明は、補体因子C5の上流の補体系を標的とすることによる異常タンパク性ニューロパチーの治療を対象としている。

10

【0017】

第一の態様において、本発明は、対象の異常タンパク性ニューロパチーを治療する方法であって、該対象に、補体系のアンタゴニストを投与することを含み、ここで、該アンタゴニストが補体因子C5の上流の補体系を阻害する、方法を提供する。本発明はまた、対象の異常タンパク性ニューロパチーを治療する際に使用するための補体系のアンタゴニストを提供し、ここで、該アンタゴニストは、補体因子C5の上流の補体系を阻害する。

【0018】

ある実施態様において、アンタゴニストは、古典補体経路及び/又はレクチン補体経路を阻害する。

20

【0019】

ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、脱髄性ニューロパチーである。

【0020】

ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、IgM、IgA、又はIgG免疫グロブリンの存在によって特徴付けられる。

【0021】

ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、自己抗体の存在によって特徴付けられる。自己抗体は、IgM、IgA、又はIgGクラスの免疫グロブリンであってもよい。

30

【0022】

ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、神経抗原に対する自己抗体の存在によって特徴付けられる。神経抗原は、ガングリオシドであってもよく、又は神経抗原は、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)であってもよい。神経抗原がガングリオシドである実施態様に関して、ガングリオシドは、GM1、GM1b、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD2、GD3、GT1a、GT1b、GT3、及びGQ1bから選択されてもよい。ある好ましい実施態様において、ガングリオシドは、GM1である。

【0023】

ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは:多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、ギラン・バレー症候群(GBS)、ミラーフィッシャー症候群、急性運動性軸索型ニューロパチー(AMAN)、急性運動感覚性軸索型ニューロパチー(AMSAN)、慢性失調性ニューロパチー-眼筋麻痺-IgMパラプロテイン-寒冷凝集素-ジシアロシル抗体(CANOMAD)症候群、遠位後天性脱髄性対称性(DADS)ニューロパチー、単クローン性ガンマモパシー関連末梢神経障害、抗MAG末梢神経障害、及びPOEMS症候群から選択される。ある好ましい実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、又はギラン・バレー症候群(GBS)である。異常タンパク性ニューロパチーは、好ましくは、多巣性運動ニューロパチー(MMN)である。

40

【0024】

50

ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C3の上流の補体系を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、C1、C1q、C1r、又はC1sを阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C2、C2a、又はC2bを阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C3、C3a、又はC3bを阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C4、C4a、又はC4bを阻害する。

【0025】

ある実施態様において、アンタゴニストは:阻害性RNA種、例えば、siRNAもしくはshRNA;小分子インヒビター;生物学的アンタゴニスト、例えば、阻害性ペプチド又は抗体模倣物、例えば、アフィボディ、アフィリン、アフィチン、アドネクチン、アトリマー、エバシン、DARPin、アンチカリン、アビマー、フィノマー、バーサボディ、もしくはデュオカリン;又は抗体もしくはその抗原結合断片から選択される。

10

【0026】

ある実施態様において、アンタゴニストは:コンプスタチンCp40(Amyndas); PEG-Cp40(Amyndas); AMY-101(Amyndas); AMY-201(Amyndas); APL-1及びAPL-2(Apellis); Cinryze(Shire); CDX-1135(Celldex); APT070 ミロコセプト(MRC); HC3-1496(InCode);ナファモスタット(Torii Pharmaceutical)、並びにワクシニアウイルス補体制御タンパク質(VCP)から選択される。

【0027】

好ましい実施態様において、アンタゴニストは、抗体又はその抗原結合断片、好ましくは、IgG抗体又はその抗原結合断片である。

20

【0028】

ある実施態様において、抗原結合断片は:抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、単鎖抗体(scFv)、F(ab')₂断片、Fab断片、Fd断片、Fv断片、ワンアーム(一価)抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ユニボディ、ドメイン抗体、及びナノボディから選択される。

【0029】

ある実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、補体因子C1、C1q、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、又はC4bに結合する。

【0030】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は:スチムリマブ(Bioverativ); ANX005(Annexon); mAb H17(Elusys Therapeutics);及びTNT003(True North)から選択される。

30

【0031】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、補体因子C2に結合する。ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、補体因子C2のC2bドメインに結合する。

【0032】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含み、ここで、該VH及びVLドメインは、CDR配列:

【化1】

配列番号:2 [EDDHDAFAY]

40

を含むか又はこれからなるHCDR3;

【化2】

配列番号:3 [DINPNYESTGYNQKFKG]

を含むか又はこれからなるHCDR2;

【化3】

配列番号:4 [DYNMD]

を含むか又はこれからなるHCDR1;

50

【化4】

配列番号: 5 [QHSRELPYT]

を含むか又はこれからなるLCDR3;

【化5】

配列番号: 6 [LASNLKS]

を含むか又はこれからなるLCDR2;及び

【化6】

配列番号: 7 [RASKSVRTSGYNYMH]

10

を含むか又はこれからなるLCDR1

を含む。

【0033】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、配列番号8のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号9のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメインを含む。ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、配列番号8のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号9のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメインを含む。

20

【0034】

ある実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、ヒトIgG重鎖定常ドメインを含む。

【0035】

ある実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0036】

ある実施態様において、本方法は、IVIgを対象に投与することをさらに含む。

【0037】

ある実施態様において、本方法は、リツキシマブを対象に投与することをさらに含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0038】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、補体系の古典経路、レクチン経路、及び代替経路に關与する細胞シグナル伝達カスケードを示す模式図である。

【図2】図2は、生きたシュワン細胞(sNF02.2)での様々な膜タンパク質の発現プロファイルを示している。シュワン細胞を、フローサイトメトリー解析を用いて、様々な膜タンパク質、特に、補体カスケードと關連するタンパク質について染色した。7つのグラフは、以下のもの:(A)CD46、(B)CD55、(C)CD59、(D)CD64、(E)CD88、(F)GM1、及び(G)MAGを示している。

40

【図3】図3は、ホスホリパーゼ-C(PL-C)による処理あり又は処理なしのsNF02.2シュワン細胞でのCRPの発現プロファイルを示している。sNF02.2シュワン細胞を様々な濃度のPL-C(1~0.5~0.25U/mL)で処理し、37℃で1時間インキュベートした後、それぞれ、CD46(A)、CD55(B)、及びCD59(C)を検出する抗体で染色した。

【図4】図4は、補体媒介性溶解に対するシュワン細胞(sNF96.2)の抵抗性を示している。図4のグラフの各々は、グラフの左半分「PL-C処理なし」及びグラフの右半分「PL-C処理」を示している。(A)PL-C処理は、GPIアンカーの切断によって、CD59発現とCD55発現の両方の発現を低下させた。膜貫通タンパク質であるCD46の発現は影響を受けなかった(右のy-軸)。PL-Cは、GM1の発現に対しても影響がなかった(左のy-軸、パネルA)。(

50

B)細胞は、C3固定から本質的に保護される。C3固定は、MMN患者血清によるオプソニン化の非存在下で観察され、C3固定は、MMN患者血清によるオプソニン化によってわずかに増加した。PL-C処理細胞は、特に、オプソニン化の後、C3固定の影響をより受けやすかった。ARGX-117はC3固定を阻害したが、ごく一部の阻害だけがオプソニン化及びPL-C処理の後に見られた。これは、おそらく、抗GM1抗体と他のエピトープに対する血清抗体のオプソニン化密度の組合せによるものである。(C)MAC固定を定量したとき、パネルBで見られるのと同様の結果が観察された。(D)シュワン細胞は、補体媒介性細胞溶解から保護された—これは、高レベルCD59発現によるものである。PL-Cで処理していない細胞は、オプソニン化及び補体活性血清とのインキュベーションの後、生存し続けた。PL-C処理後、シュワン細胞を患者由来抗GM1抗体でオプソニン化すると、細胞溶解が観察された。これは、ARGX-117によって、ベースラインにまで阻害された。

10

【図5】図5は、抗HLA mAbによるsNF02.2シュワン細胞での補体C3固定を示している。細胞を増加濃度のW6/32(抗HLA抗体)でオプソニン化した後、HPS(ヒトブール血清)を添加して、補体経路を活性化した。EDTAとTNT009(480 µg/mL)の両方を添加して、補体特異性を評価した。

【図6】図6は、シュワン細胞でのGM1発現及びIgM結合を示している。(A)sNF02.2シュワン細胞をCTbで染色して、フローサイトメトリーを用いて、GM1発現を検出した。(B)MMN患者血清によるオプソニン化の後(網掛け棒)又は補体の活性化なし(白色の棒)の培養sNF02.2シュワン細胞へのIgM結合のフローサイトメトリー検出。

【図7】図7は、sNF02.2シュワン細胞へのMMN患者血清中のIgMの結合を示している。シュワン細胞を様々なGM1力価を含む様々な患者試料でオプソニン化し、全てがsNF02.2細胞とのインキュベーション時にIgM結合を示した。(A)IgM染色のMFI。(B)IgM陽性シュワン細胞のパーセンテージ。

20

【図8】図8は、MMN患者血清によるオプソニン化の後のsNF02.2シュワン細胞でのC3固定の最適化を示している。50,000個のシュワン細胞を96-ウェルプレートに播種し、MMN患者血清でオプソニン化した(1時間、RT)。図8のグラフの各々は、グラフの左半分に「オプソニン化なし」及びグラフの左半分に「オプソニン化あり」を示している。(A)様々なパーセンテージの補体活性血清: 10%(左のグラフ)、5%(真ん中のグラフ)、又は2.5%(右のグラフ)を用いて、補体を活性化した。補体活性血清(黒色の棒)と除去血清(=先にシュワン細胞とともにインキュベートされた補体活性血清)(灰色の棒)を調べた。(B)血清(黒色の棒)と除去血清(明るい灰色の棒)を比較した(A)で示された結果のまとめ。(C)様々なC3検出抗体: C3 FITC(LSBio、クローン6C9)(左のグラフ)、C3-BIO(LSBio、クローン6C9)+ストレプトアビジンAPC(真ん中のグラフ)、又はC3-BIO(ポリクローナルヒツジ抗ヒトC3)+ストレプトアビジンAPC(右のグラフ)を用いたシュワン細胞でのC3固定。細胞を10%血清(黒色の棒)又は5%血清(灰色の棒)のいずれかで活性化した。白色の棒は、EDTA対照を表し、全て予想通りであった。

30

【図9】図9は、シュワン細胞における補体活性化のC2依存性を示している。シュワン細胞を96-ウェルプレートに播種し、MMN患者血清(MMN-005)でオプソニン化し(1時間、RT)、その後、1.11 µg/mLから最大30 µg/mL(生理的濃度)まで増加する濃度のrhC2が補充されたC2除去血清とともにインキュベートした。1時間後(37°C)、C3-BIO(LSBio、クローン6C9)で染色した後、フローサイトメトリーを用いて、C3固定を測定した。

40

【図10】図10は、MMN患者血清でオプソニン化したsNF02.2シュワン細胞でのC3固定のARGX-117による用量依存的阻害を示している。シュワン細胞を96-ウェルプレートに移し(50,000細胞/ウェル)、MMN患者血清でオプソニン化し(1時間、RT)、その後、補体遮断抗体又はEDTAとともにプレインキュベートした5%補体活性血清とともにインキュベートした(20分、RT)。C3固定の検出は、シュワン細胞をC3-BIO(LSBio、クローン6C9)及びストレプトアビジン-APCで染色することにより行った。(A)APCのMFI値によるシュワン細胞でのC3固定。(B)5%血清を0%阻害に設定し、EDTA 10mMを100%阻害として設定して計算したシュワン細胞でのC3固定のパーセンテージ阻害。

【図11】図11は、MMN血清によって誘導された補体活性化後のsNF02.2シュワン細胞

50

によるサイトカイン分泌を示している。シュワン細胞を24-ウェルプレートに播種し、MMN患者血清でオプソニン化し(1時間、RT)、補体活性血清を補体遮断抗体の存在下又は非存在下で添加した。48時間後、上清を回収し、Luminexプラットフォームを用いて、サイトカイン分泌を測定した。3つのグラフは、以下のもの:(A)IL-6、(B)IL-8、及び(C)MCP-1を示している。図11のグラフの各々は、(左から右に)以下の順の棒を示している:刺激なし、IL-1b 10ng/mL、IL-1b 5ng/mL、IL-1b 2.5ng/mL、TNF-a 50ng/mL、TNF-a 25ng/mL、TNF-a 12.5ng/mL、血清のみ、MMN-05のみ、MMN-05+血清、MMN-05+血清MgEGTA、MMN-05+血清ARGX-117、MMN-05+血清TNT009、MMN-05+血清エクリズマブ、MMN-05+血清HI、MMN-73のみ、MMN-73+血清、MMN-73+血清MgEGTA、MMN-73+血清ARGX-117、MMN-73+血清+TNT009、MMN-73+血清エクリズマブ、MMN-73+血清HI。

10

【図12】図12は、MMN患者に存在する抗GM1自己抗体によって誘発される補体事象の提唱メカニズムを示している。

【図13】図13は、固定されたiPSC-MNでの補体調節タンパク質(CRP)を含む膜補体タンパク質の発現を示している。誘導多能性幹細胞由来運動ニューロン(iPSC-MN)を培養し、カバーガラス上で4%PFAを用いて固定した後、発現マーカーについて染色した。MGV=平均グレー値。

【図14】図14は、C3固定のC2依存性を示している。iPSC由来運動ニューロンをC2除去血清でオプソニン化し、増加していく濃度の精製ヒトC2(hC2)で再構成して、C3固定を測定することにより補体活性化を評価した。iPSC-MNを3日間培養した後、固定し、その後、染色して、GM1発現及びC3沈着を検出した。画像を40倍の倍率で解析し、平均グレー値(MGV)を、GM1のみ、C3のみ、又はこの2つの間の比について計算した。

20

【図15】図15は、ARGX-117が他の免疫媒介性ニューロパチーにおいて補体を遮断したことを示している。GBS又はCIPD患者血清を用いて、運動ニューロンをARGX-117(200 µg/mL)の存在下又は非存在下でオプソニン化した。iPSC由来運動ニューロンを12~14日間培養した後、固定し、染色して、GM1発現及びC3沈着を検出した。画像を40倍の倍率で解析し、平均グレー値(MGV)を、GM1のみ、C3のみ、又はこの2つの間の比(C3/GM1)について計算した。図15のグラフの各々は、「血清のみ」(左の棒)、「血清+EDTA」(真ん中の棒)、及び「ARGX-117 200 µg/mL」(右の棒)を比較したものである。

【図16】図16は、MMN患者試料でオプソニン化したiPSC-MNを用いたC3固定に対するIVIgの効果を示している。iPSC由来運動ニューロンを12~14日間培養した後、固定し、その後、GM-1発現及びC3沈着について染色した。2つの異なるIVIgバッチ: GammaQuin及びNanogam(どちらも50mg/mLで使用)を試験した。画像を40倍の倍率で解析し、平均グレー値(MGV)を、GM1のみ、C3のみ、又はこの2つの間の比(C3/GM1)について計算した。図16のグラフの各々は、(左から右に)以下の順の棒を示している:血清のみ、血清+EDTA、GammaQuin ops、GammaQuin ops+comp、GammaQuin comp、Nanogram ops、Nanogram ops+comp、Nanogram comp。

30

【図17】図17は、MMN患者血清によるGM1結合に対するIVIgの抗イディオタイプ効果を示している。ELISAをMMN患者血清のMMN005及びMMN073を用いて実施した。GM1を96-ウェルプレートにコーティングし、50 µg/mLのIVIg(2バッチ: GammaQuin及びNanogam)の添加あり又はなしでMMN患者血清とともにインキュベートした後、抗ヒトIgM抗体を用いて、IgMを検出した。

40

【発明を実施するための形態】

【0039】

(詳細な説明)

(A.定義)

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術的及び科学的用語は全て、本発明が関連する分野の専門家によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。いかなる用語も制限することなく、本明細書で使用される用語の一部のさらなる明確化が以下で提供される。

50

【0040】

「異常タンパク性ニューロパチー」－本明細書で使用される場合、「異常タンパク性ニューロパチー」又は「PPN」という用語は、血清中の均一な免疫グロブリンの存在によって特徴付けられる一連の末梢性ニューロパチーを説明している。均一な免疫グロブリンは、「パラプロテイン」として知られる。血液悪性腫瘍との関連で起こることも起こらないこともあり得るB-リンパ球又は血漿細胞の異常なクローン性増殖は、免疫グロブリンを過剰に産生する。末梢神経系のいくつかの障害は、血液中の過剰量の異常免疫グロブリンの存在と密接に関連している。PPNは、末梢神経での抗体と特定の抗原性標的との相互作用によるか又は免疫グロブリンの沈着によって生じ得る。本発明によって治療し得る例示的な異常タンパク性ニューロパチーとしては、MMN、CIDP、及びGBSが挙げられる。

10

【0041】

「多巣性運動ニューロパチー」－多巣性運動ニューロパチー又はMMNは、100,000個体当たり約0.6の罹患率を有する稀少障害であり、男性は、女性よりも罹患する頻度が高い(2.7:1の比)(Harschnitzらの文献、J Clin Immunol 2014, 34:112-119)。MMNは、四肢の非対称性遠位優位筋力低下によって特徴付けられる慢性免疫媒介性ニューロパチーである。この疾患の顕著な特徴は、多巣性運動伝導ブロックの存在であり、患者は、多くの場合、末梢神経の結節周囲領域において大量に発現されるスフィンゴ糖脂質GM1に対するIgM抗体の高い血清レベルを示す。これらの自己GM1 IgM抗体は、補体活性化特性を有し、疾患重症度の決定因子である(Vlamらの文献、Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2015, 25;2(4))。GM1は、末梢運動神経において大量に発現され、末梢神経の軸索鞘とミエリンの両方に局在する。GM1は、活動電位伝播及び伝導速度の維持に必要ないくつかの重要な機能を有する。最大のGM1発現は、ランビエ絞輪及び隣接するパラノードで見られ、そこでは、GM1がカリウムチャネルを固定し、ナトリウムチャネルをクラスター化して、パラノードの安定化を通してタイトジャンクションを維持する。さらに、GM1は、神経突起生成及びアポトーシスを制御する神経栄養因子の受容体モジュレーターとしても、膜シグナル伝達及び輸送における脂質ラフト中の多分子集合体の一部としても機能する。これらの機能の破壊は、パラノード領域を越える伝導の失敗をもたらす。MMN患者に存在する抗GM1 IgM抗体は、活性化B細胞(血漿細胞)によって産生される;しかしながら、このB細胞活性化のメカニズムは、まだ確立されていない。

20

【0042】

「ギラン・バレー症候群」－ギラン・バレー症候群又はGBSは、100,000個体当たり0.81~1.89症例の発生率を有し、男性は、女性よりも罹患する頻度が高い(3:2の比)(Kieseierらの文献、Nature Reviews, 2018, 4:31)。症例の60~70%において、GBSの最初の症状は、急性感染、通常、上気道感染又は胃腸感染から1~3週間後に現れる。GBSの初期症状は、通常、手足に始まる筋力低下を伴う感覚変化又は疼痛である。これは、多くの場合、腕及び上半身に広がる。軸索に見られる様々なグングリオシドに対する自己抗体は、GBSの特定のサブタイプの診断を助けるのに使用される。例えば、抗GM1及び抗GD1a IgG抗体は、急性運動性軸索型ニューロパチー(AMAN)及び急性運動感覚性軸索型ニューロパチー(AMSAN)に罹患している患者の血清中に見られる。これらの抗体は、ランビエ絞輪に結合し、そこで、該抗体は、ナトリウムチャネルクラスター化に関与する微細構造配列を破壊し、軸索伝導の遅延及び機能喪失をもたらす。或いは、該抗体は、運動神経終末に結合し、シナプス前神経終末の変性を引き起こす。

30

40

【0043】

「慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー」－慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー又はCIDPは、最も一般的な免疫媒介性ニューロパチーであり、100,000個体当たり0.8~8.9症例の範囲の罹患率が報告されている(Kieseierらの文献、Nature Reviews, 2018, 4:31)。男性は、女性よりも罹患する頻度が高い(2:1の比)。CIDPは、GBSと密接に関連しており、これは、該急性疾患の慢性対応物とみなされる。CIDPの最も一般的な症状は、脚、腕、指、及び手の衰弱、しびれ、及びヒリヒリ感である。他の症状としては、疲労、疼痛、バランスの問題、及び歩行能力の障害が挙げられる。CIDPのいくつかの変異型は、ラン

50

ビエ絞輪のタンパク質に対する自己免疫を示す。これらの変異型は、パラノードタンパク質のニューロフェイシン-186、ニューロフェイシン-155、コンタクチン-1、及びcaspr-1に対するIgG4自己抗体を伴う炎症性ニューロパチーの亜群を含む(Querolらの文献、Nat Rev Neurol. 2017, 13(9):533-547)。これらのタンパク質は、ミエリン化軸索のノード、パラノード、及びインターノードへの区画化において極めて重要な役割を果たす。区画化は、活動電位の伝達に関与する電位依存性ナトリウムチャンネルと電位依存性カリウムチャンネルの分離を維持するので、跳躍伝導に必要とされる。これらの領域の破壊は、神経伝導の遅延又は遮断をもたらすことがある。

【0044】

「補体系のアンタゴニスト」—本明細書で使用される場合、「補体系のアンタゴニスト」又は「補体アンタゴニスト」という語句は、補体因子又は補体カスケードの成分の機能を遮断又は阻害し、それにより、補体活性を阻害し又は低下させることができる任意の作用因子を指す。補体系のアンタゴニストは、古典補体経路、レクチン補体経路、代替補体経路、又はこれらの任意の組合せを遮断又は阻害することができる。好ましくは、補体系のアンタゴニストは、これらの経路の両方に共通する補体因子を標的とすることにより、古典補体経路及びレクチン補体経路を阻害する。本明細書に記載される方法による使用のための補体アンタゴニストは、補体因子C5の上流の補体系を阻害する。これは、アンタゴニストが、補体カスケードにおいてC5よりも前の補体経路の任意の成分又は因子を阻害することにより、補体活性を阻害し又は低下させるということ、すなわち、アンタゴニストが、C5を直接を阻害しない又はC5の下流の任意の補体因子を阻害しないということの意味する。例えば、アンタゴニストは、補体因子C1、C2、C3、もしくはC4、又はこれらの任意の組合せの機能を阻害することができる。補体因子の機能を阻害するということは、補体因子が、その上流活性化シグナルの存在下にあるときでも、補体活性化のカスケード全体において、その役割を果たすことができないということの意味する。

【0045】

本発明で使用するためのアンタゴニストは、任意の好適な作用因子の形態を取ることができ、かつ補体因子又は成分の機能を直接的に又は間接的に遮断又は阻害することができる。アンタゴニストは、例えば、siRNA技術によって、標的の発現を下方調節することにより、その標的の機能を阻害することができる。これに関して、好適なアンタゴニストとしては、阻害性RNA種、例えば、siRNA又はshRNAが挙げられる。アンタゴニストは、標的に直接結合することにより、その標的の機能を阻害することができ;例えば、アンタゴニストは、その標的に直接結合し、該標的がカスケード中の次の補体因子を活性化することを妨げることができる。好ましい実施態様において、アンタゴニストは、その標的に特異的である。例えば、C2のアンタゴニストは、他の分子標的と比較して、C2の機能を優先的に阻害する。アンタゴニストは、通常、例えば、補体タンパク質に選択的に結合することによって、その標的と直接相互作用することにより、必要とされるレベルの特異性を達成する。本明細書に記載される方法で使用するためのアンタゴニストとしての役割を果たし得る好適な作用因子としては:小分子インヒビター;並びに阻害性ペプチド、抗体模倣物、例えば、アフィボディ、アフィリン、アフィチン、アドネクチン、アトリマー、エバシン、DARPin、アンチカリン、アビマー、フィノマー、バーサボディ、及びデュオカリンを含む生物学的アンタゴニストが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、本発明で使用するためのアンタゴニストは、抗体又はその抗原結合断片である。

【0046】

「抗体」又は「免疫グロブリン」—本明細書で使用される場合、「免疫グロブリン」という用語は、それが任意の関連性のある特異的免疫反応性を保有するかどうかにかかわらず、2つの重鎖と2つの軽鎖の組合せを有するポリペプチドを含む。「抗体」は、対象となる抗原に対する顕著な既知の特異的免疫反応活性を有するそのような集合体を指す。抗体及び免疫グロブリンは、その間に鎖間共有結合を有する又は有さない軽鎖及び重鎖を含む。脊椎動物系の基本的な免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。

【0047】

「免疫グロブリン」という一般用語は、生化学的に区別することができる5つの異なるクラスの抗体を含む。IgGに関して、免疫グロブリンは、分子量約23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド及び分子量53,000～70,000の2つの同一の重鎖を含む。これら4つの鎖は、ジスルフィド結合によって「Y」字の形状で連結される。この「Y」字の形状では、軽鎖が、「Y」字の口から始まって、可変領域を通して続く重鎖を下支えする。抗体の軽鎖は、カッパ又はラムダ(κ , λ)のいずれかに分類される。各々の重鎖クラスは、カッパ又はラムダ軽鎖のいずれかと結合し得る。一般に、軽鎖及び重鎖は、互いに共有結合しており、2つの重鎖の「テール」部分は、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、B細胞、又は遺伝子改変された宿主細胞のいずれかによって生成されるとき、共有結合的ジスルフィド結合又は非共有結合的結合によって互いに結合する。重鎖において、アミノ酸配列は、Y字の形状のフォーク型端部のN-末端から各々の鎖の下端のC-末端まで続いている。当業者であれば、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロン(γ , μ , α , δ , ϵ)に分類され、その中にいくつかのサブクラス(例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$)があることを認識しているであろう。抗体の「クラス」を、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgD、又はIgEとして決定することが、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などは、十分に特徴付けられており、機能特化を付与することが知られている。これらのクラス及びアイソタイプの各々の修飾形態は、本開示を考慮すると当業者に容易に認識可能であり、したがって、本発明の範囲内にある。

10

20

【0048】

上で示されているように、抗体の可変領域により、抗体は、抗原上のエピトープを選択的に認識し、かつこれに特異的に結合することが可能となる。すなわち、抗体のVLドメイン及びVHドメインが組み合わさって、3次元抗原結合部位を画定する可変領域を形成する。この4鎖抗体構造は、Y字の各々のアームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、VH及びVL鎖の各々の上の3つの相補性決定領域(CDR)によって画定される。

【0049】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、「VHH抗体」又は「重鎖のみの抗体」を包含することも意図される。

30

【0050】

「VHH抗体」－本明細書で使用される場合、「VHH抗体」又は「重鎖のみの抗体」という用語は、ラクダ、リヤマ、及びアルパカを含むラクダ科ファミリーの種によって産生される抗体のタイプを指す。重鎖のみの抗体又はVHH抗体は、2つの重鎖から構成され、軽鎖を欠いている。各々の重鎖は、N-末端に可変ドメインを有し、これらの可変ドメインは、それらを上記の従来のヘテロ四量体抗体の重鎖の可変ドメイン、すなわち、VHドメインと区別するために、「VHH」ドメインと呼ばれる。

【0051】

「可変領域」又は「可変ドメイン」－「可変領域」及び「可変ドメイン」という用語は、本明細書で互換的に使用され、等価な意味を有することが意図される。「可変」という用語は、可変ドメインVH及びVLのある部分が抗体間で配列が広範囲に異なるという事実を指し、その標的抗原に対する各々の特定の抗体の結合及び特異性に関して使用される。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインの全体を通して一様には分布していない。それは、抗原結合部位の部分形成するVLドメイン及びVHドメインの各々の中の「超可変ループ」と呼ばれる3つのセグメントに集中している。Vラムダ軽鎖ドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループは、本明細書において、L1(λ)、L2(λ)、及びL3(λ)と称され、VLドメイン中の残基24～33(9、10、又は11個のアミノ酸残基からなるL1(λ))、49～53(3個の残基からなるL2(λ))、及び90～96(5個の残基からなるL3(λ))を含むものとして定義することができる(Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。Vカッパ軽鎖ドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループは、本明細書において、L1(κ)、

40

50

L2(κ)、及びL3(κ)と称され、VLドメイン中の残基25～33(6、7、8、11、12、又は13個の残基からなるL1(κ))、49～53(3個の残基からなるL2(κ))、及び90～97(6個の残基からなるL3(κ))を含むものとして定義することができる(Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。VHドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループは、本明細書において、H1、H2、及びH3と称され、VHドメイン中の残基25～33(7、8、又は9個の残基からなるH1)、52～56(3又は4個の残基からなるH2)、及び91～105(長さに大きなばらつきがあるH3)を含むものとして定義することができる(Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。

【0052】

別途示されない限り、L1、L2、及びL3という用語は、それぞれ、VLドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループを指し、VカッパアイソタイプとVラムダアイソタイプの両方から得られる超可変ループを包含する。H1、H2、及びH3という用語は、それぞれ、VHドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループを指し、 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 、又は μ を含む、既知の重鎖アイソタイプのいずれかから得られる超可変ループを包含する。

【0053】

超可変ループL1、L2、L3、H1、H2、及びH3は、各々、以下で定義される「相補性決定領域」又は「CDR」の部分を含むことができる。「超可変ループ」及び「相補性決定領域」という用語は、厳密には同義ではないが、それは、超可変ループ(HV)が構造に基づいて定義されるのに対し、相補性決定領域(CDR)は配列可変性に基づいて定義されており(Kabatらの文献、免疫学的対象となるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983)、かつHV及びCDRの境界がいくつかのVH及びVLドメインで異なるからである。

【0054】

VL及びVHドメインのCDRは、通常、以下のアミノ酸:軽鎖可変ドメイン中の残基24～34(LCDR1)、50～56(LCDR2)、及び89～97(LCDR3)、並びに重鎖可変ドメイン中の残基31～35又は31～35b(HCDR1)、50～65(HCDR2)、及び95～102(HCDR3)を含むものとして定義することができる;(Kabatらの文献、免疫学的対象となるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))。したがって、HVは、対応するCDR内に含まれることができ、別途示されない限り、VH及びVLドメインの「超可変ループ」に対する本明細書中の言及は、対応するCDRも包含すると解釈されるべきであり、逆もまた同様である。

【0055】

可変ドメインのより高度に保存された部分は、以下で定義されているように、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、3つの超可変ループによって接続された、主として β -シート形状を取っている4つのFR(それぞれ、FR1、FR2、FR3、及びFR4)を含む。各々の鎖の超可変ループは、FRによりごく接近して結び付けられ、他の鎖由来の超可変ループとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。抗体の構造解析により、配列と相補性決定領域によって形成される結合部位の形状の関係性が明らかになった(Chothiaらの文献、J. Mol. Biol. 227: 799-817(1992)); Tramontanoらの文献、J. Mol. Biol, 215:175-182(1990))。その高度な配列可変性にもかかわらず、これら6つのループのうちの5つは、「カノニカル構造」と呼ばれる、主鎖立体構造の小さいレパートリーのみを採用する。これらの立体構造は、まず第一に、ループの長さにより決定され、第二に、そのパッキング、水素結合、又は通常でない主鎖立体構造を取る能力によって立体構造を決定するループ中及びフレームワーク領域中の特定の位置での重要残基の存在により決定される。

【0056】

「CDR」一本明細書で使用される場合、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続的な抗原結

10

20

30

40

50

合部位を意味する。これらの特定の領域は、Kabatらの文献、J. Biol. Chem. 252, 6609-6616(1977)及びKabatらの文献、免疫学的対象となるタンパク質の配列(Sequences of Protein of Immunological Interest)(1991)、並びにChothiaらの文献、J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)、並びにMacCallumらの文献、J. Mol. Biol. 262:732-745(1996)によって記載されており、ここで、これらの定義は、互いに比較したとき、アミノ酸残基の重複又は部分集合を含む。上で引用された参考文献の各々によって定義されるCDRを包含するアミノ酸残基が比較のために示されている。好ましくは、「CDR」という用語は、配列比較に基づいてKabatにより定義されたCDRである。

表1: CDR定義

【表 1】

	CDR 定義		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹残基の付番はKabatらの文献(上記)の命名体系に従う

²残基の付番はChothiaらの文献(上記)の命名体系に従う

³残基の付番はMacCallumらの文献(上記)の命名体系に従う

【0057】

「フレームワーク領域」—本明細書で使用される「フレームワーク領域」又は「FR領域」という用語は、(例えば、CDRのKabat定義を用いて)可変領域の部分であるが、CDRの部分ではないアミノ酸残基を含む。それゆえ、可変領域フレームワークは、約100～120アミノ酸の長さであるが、CDRの外側のアミノ酸しか含まない。重鎖可変ドメインの具体的な例について、及びKabatらによって定義されるCDRについて、フレームワーク領域1は、アミノ酸1～30を包含する可変領域のドメインに対応し;フレームワーク領域2は、アミノ酸36～49を包含する可変領域のドメインに対応し;フレームワーク領域3は、アミノ酸66～94を包含する可変領域のドメインに対応し、フレームワーク領域4は、アミノ酸103から可変領域の末端までの可変領域のドメインに対応する。軽鎖のフレームワーク領域は、軽鎖可変領域CDRの各々によって同様に隔てられる。同様に、Chothiaら又はMacCallumらによるCDRに定義を用いて、フレームワーク領域境界は、上記のようなそれぞれのCDR末端によって隔てられる。好ましい実施態様において、CDRは、Kabatによって定義されている通りである。

【0058】

天然の抗体において、各々の単量体抗体上に存在する6つのCDRは、抗体が水性環境中でその3次元形状を取る場合に、抗原結合部位を形成するように特異的に配置されている、アミノ酸の短い非連続的な配列である。重及び軽可変ドメインの残りの部分は、アミノ酸配列に関してより低い分子間可変性を示し、フレームワーク領域と呼ばれる。フレームワーク領域は、主としてβ-シート立体配置を取っており、CDRは、β-シート構造に接続し、場合によっては、その部分を形成するループを形成する。したがって、これらのフレームワーク領域は、6つのCDRを鎖間の非共有結合的相互作用によって正しい方向に位置決めさせる足場を形成するように作用する。位置決めされたCDRによって形成される抗原結合部位は、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を規定する。この相補的な表面は、抗体と免疫反応性抗原エピトープとの非共有結合を促進する。CDRの位置は、当業者により容易に同定されることができる。

【0059】

「定常領域」－本明細書で使用される場合、「定常領域」という用語は、可変ドメイン又は可変領域の外側の抗体の部分を目指す。免疫グロブリン軽鎖は、通常は「CL」又は「CL1ドメイン」と呼ばれる、単一ドメイン「定常領域」を有する。このドメインは、VLドメインのC末端にある。免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリンのクラス(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)によって、その定常領域が異なる。重鎖 γ 、 α 、及び δ は、CH1ドメインとCH2ドメインを隔てる可撓性ヒンジ領域とともに、3つの免疫グロブリンドメイン(CH1、CH2、及びCH3と呼ばれる)からなる定常領域を有する。重鎖 μ 及び ϵ は、4つのドメイン(CH1～CH4)からなる定常領域を有する。重鎖の定常ドメインは、VHドメインのC末端に位置する。

10

【0060】

重及び軽免疫グロブリン鎖におけるアミノ酸の付番は、Y字の形状のフォーク型端部のN-末端から各々の鎖の下端のC-末端まで続いている。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の定常ドメインを規定するために、様々な付番方式が使用される。EU付番方式によれば、IgG分子の重鎖定常ドメインは、次のように特定される: CH1－アミノ酸残基118～215; CH2－アミノ酸残基231～340; CH3－アミノ酸残基341～446。Kabat付番方式によれば、IgG分子の重鎖定常ドメインは、次のように特定される: CH1－アミノ酸残基114～223; CH2－アミノ酸残基244～360; CH3－アミノ酸残基361～477。「Fcドメイン」又は「Fc領域」は、通常、CH2及びCH3ドメインを含む重鎖の定常領域の部分画定する。Fc領域は、ヒンジ領域由来のいくつかの残基も含み得る。「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに接続する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、約25残基を含み、可撓性であり、したがって、2つのN-末端抗原結合領域が独立に動くことを可能にする。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン:上部、中央、及び下部のヒンジドメインに細分することができる(Roux K.H.らの文献、J. Immunol. 161:4083-90 1998)。「完全ヒト」ヒンジ領域を含む本発明の抗体は、下の表2に示されるヒンジ領域配列のうちの1つを含有することができる。

20

表2:ヒトヒンジ配列

【表2】

IgG	上部のヒンジ	中央のヒンジ	下部のヒンジ
IgG1	EPKSCDKTHT (配列番号:21)	CPPCP (配列番号:22)	APELLGGP (配列番号:23)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (配列番号:24)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (配列番号:25)	APELLGGP (配列番号:23)
IgG4	ESKYGPP (配列番号:26)	CPSCP (配列番号:27)	APEFLGGP (配列番号:28)
IgG2	ERK (配列番号:29)	CCVECPPPCP (配列番号:30)	APPVAGP (配列番号:31)

30

40

【0061】

「断片」－「断片」又は「抗原結合断片」という用語は、インタクトな又は完全な抗体又は抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基を含む抗体又は抗体鎖の部分(part)又は部分(portion)を目指す。「抗原結合性断片」という用語は、抗原に結合するか、又は抗原結合をインタクトな抗体と(すなわち、それらが由来したインタクトな抗体と)競合する免疫グロブリン又は抗体のポリペプチド断片を目指す。本明細書で使用される場合、抗体分子の「断片」という用語は、抗体の抗原結合断片、例えば、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、単鎖抗体(scFv)、F(ab')₂断片、Fab断片、Fd断片、Fv断片、ワンアーム(一価)抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、又はそのような抗原結合断片の組合せ、アセンブリ、もしくはコンジュゲーションによって形成される任意の抗原結合分

50

子を含む。本明細書で使用される「抗原結合断片」という用語は、ユニボディ、ドメイン抗体、及びナノボディからなる群から選択される抗体断片を包含することがさらに意図される。断片は、例えば、インタクトなもしくは完全な抗体もしくは抗体鎖の化学的もしくは酵素的処理によるか、又は組換え手段によって得ることができる。

【0062】

「特異性」及び「多重特異性抗体」－本明細書に記載される方法において使用するための抗体は、補体系内の標的抗原に結合する。抗体は、その標的抗原に「特異的に結合する」ことが好ましく、ここで、「特異的に結合する」という用語は、所与の標的、例えば、C1、C2、C3、又はC4と優先的に免疫反応する任意の抗体の能力を指す。抗体は、単一特異的であり、特定の標的に特異的に結合する1以上の結合部位を含有することができる。抗体は、「多重特異性抗体」フォーマット、例えば、二重特異性抗体へと組み込むことができ、ここで、多重特異性抗体は、2以上の標的抗原に結合する。多重特異性を達成するために、「多重特異性抗体」は、通常、異なるVH-VL対を有する重鎖及び軽鎖ポリペプチドの異なる組合せ又は対合を含むように人為作製される。多重特異性、特に、二重特異性抗体は、ネイティブな抗体、例えば、Fc領域にコンジュゲートされた異なる特異性のFabアームを有するY字形の抗体の全体的な立体構造を取るようにならされる。或いは、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体は、非ネイティブな立体構造を取るようにならされる。例えば、この場合、異なる特異性を有する可変ドメイン又は可変ドメイン対は、Fc領域の反対の末端に位置付けられる。

【0063】

「修飾抗体」－本明細書で使用される場合、「修飾抗体」という用語は、天然ではないように改変されている合形成態の抗体、例えば、少なくとも2つの重鎖部分を含むが、2つの完全な重鎖を含まない抗体(例えば、ドメイン欠失抗体又はミニボディ); 2以上の異なる抗原に又は単一の抗原上の異なるエピトープに結合するように改変された多重特異的形態の抗体(例えば、二重特異性、三重特異性など); scFv分子に接続された重鎖分子などを含む。scFv分子は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。さらに、「修飾抗体」という用語は、多価形態の抗体(例えば、3コピー以上の同じ抗原に結合する三価、四価などの抗体)が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施態様において、本発明の修飾抗体は、CH2ドメインを欠く少なくとも1つの重鎖部分及び受容体リガンド対の1つのメンバーの結合部分を含むポリペプチドの結合ドメインを含む融合タンパク質である。

【0064】

「ヒト化置換」－本明細書で使用される場合、「ヒト化置換」という用語は、抗体のVH又はVLドメイン中の特定の位置に存在するアミノ酸残基が参照ヒトVH又はVLドメイン中の等価な位置に生じるアミノ酸残基と置き換えられるアミノ酸置換を指す。参照ヒトVH又はVLドメインは、ヒト生殖系列によってコードされるVH又はVLドメインであってもよい。ヒト化置換は、本明細書で定義される抗体のフレームワーク領域及び/又はCDR中で行われてもよい。

【0065】

「ヒト化バリエーション」－本明細書で使用される場合、「ヒト化バリエーション」又は「ヒト化抗体」という用語は、参照抗体と比較して1以上の「ヒト化置換」を含有するバリエーション抗体を指し、ここで、該参照抗体の部分(例えば、少なくとも1つのCDRを含有するVHドメイン及び/もしくはVLドメイン又はその部分)は、非ヒト種に由来するアミノ酸を有し、該「ヒト化置換」は、非ヒト種に由来するアミノ酸配列内で生じる。

【0066】

「生殖系列化バリエーション」－「生殖系列化バリエーション」又は「生殖系列化抗体」という用語は、「ヒト化置換」が抗体のVH又はVLドメイン中の特定の位置に存在する1以上のアミノ酸残基とヒト生殖系列によってコードされる参照ヒトVH又はVLドメイン中の等価な位置に生じるアミノ酸残基との置換をもたらす「ヒト化バリエーション」を具体的に指すために本明細書で使用される。任意の所与の「生殖系列化バリエーション」について、生殖系列化

バリエーションへと置換される置換アミノ酸残基は、ヒト生殖系列によってコードされる単一のVH又はVLドメインから独占的に又は優先的に取得されることが一般的である。「ヒト化バリエーション」及び「生殖系列化バリエーション」という用語は、多くの場合、互換的に使用される。ラクダ科動物由来(例えば、ラマ由来)VH又はVLドメインへの1以上の「ヒト化置換」の導入は、ラクダ科動物(ラマ)由来VH又はVLドメインの「ヒト化バリエーション」の産生をもたらす。置換されるアミノ酸残基が優先的に又は独占的にヒト生殖系列によってコードされる単一のVH又はVLドメイン配列に由来する場合、ラクダ科動物(ラマ)由来VH又はVLドメインの「ヒト生殖系列化バリエーション」という結果になり得る。

【0067】

「親和性バリエーション」—本明細書で使用される場合、「親和性バリエーション」という用語は、参照抗体と比較してアミノ酸配列の1以上の変化を示すバリエーション抗体を指し、ここで、該親和性バリエーションは、参照抗体と比較して標的抗原に対する改変された親和性を示す。例えば、親和性バリエーションは、参照抗体と比較したとき、標的抗原に対する変化した親和性を示す。好ましくは、親和性バリエーションは、参照抗体と比較したとき、標的抗原に対する改善された親和性を示す。親和性バリエーションは、通常、参照抗体と比較したとき、CDR中のアミノ酸配列の1以上の変化を示す。そのような置換は、CDR中の所与の位置に存在するもとのアミノ酸と、天然のアミノ酸残基又は非天然のアミノ酸残基であり得る異なるアミノ酸残基との置換をもたらすことができる。アミノ酸置換は、保存的であっても非保存的であってもよい。

【0068】

「対象」—本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、哺乳動物、好ましくは、ヒトを指す。対象は、男性又は女性のいずれかであり得る。対象は、異常タンパク性ニューロパチーと一致する1以上の症状を示し得る。ある実施態様において、対象は、患者であってもよく、ここで、患者は、異常タンパク性ニューロパチーの治療のための医療を受けている及び/又は異常タンパク性ニューロパチーの治療のための医療を積極的に求めている個体である。

【0069】

(B.治療方法)

本発明は、異常タンパク性ニューロパチーを治療する方法を提供する。本方法は、対象への補体系のアンタゴニストの投与を伴い、ここで、該アンタゴニストは、補体因子C5の上流の補体系を阻害する。本発明はまた、異常タンパク性ニューロパチーの治療において使用するための補体系のアンタゴニストを提供するものであり、ここで、該アンタゴニストは、補体因子C5の上流の補体系を阻害する。

【0070】

異常タンパク性ニューロパチーは、本明細書の別所に定義されており、血清中の均一な免疫グロブリン又は「パラプロテイン」の存在によって特徴付けられる末梢性ニューロパチーのクラスを含む。末梢ニューロパチーは、運動、感覚、又は血管運動神経線維が影響を受ける末梢神経の疾患又は変性状態である。特に興味深いのは、末梢神経の免疫媒介性損傷によって引き起こされる末梢神経障害のクラスを表す、免疫媒介性ニューロパチーである。一般に、免疫媒介性末梢性ニューロパチーは、進行性筋力低下によって特徴付けられ、多くの場合、疼痛及びしびれなどの感覚障害を伴う。これらの障害は、ミエリンの構成要素又はランビエ絞輪にあるタンパク質に結合する血清中の自己反応性抗体によって引き起こされると推測される。これらの障害の一般的な特徴は、血液神経障害(BNB)が損なわれ、自己抗体、補体成分、及び炎症細胞が神経の内膜に接近することが可能になることである。このBNBの崩壊は、VEGF、TNF α 、及びIL1- β などの循環サイトカイン並びにT細胞から分泌されるメタロプロテアーゼによって誘発されると考えられる。神経に侵入すると、自己抗体は、それぞれ、ミエリン上に又は軸索間の接合部に存在するミエリン関連糖タンパク質(MAG)又はガングリオシドなどの神経抗原に結合することができる。本明細書の別所に説明されているように、抗体/抗原免疫複合体の形成は、C1qの動員によって補体系の古典経路を始動することができる。

【0071】

異常タンパク性ニューロパチーは、血清中の過剰な免疫グロブリンによって特徴付けられる免疫媒介性ニューロパチー群である。PPNは、多くの場合、自己抗体の存在を伴う。このクラスのニューロパチーに対する既存の治療戦略は、現在、静脈内免疫グロブリン(IV Ig)、プラズマフェレーシス(血漿交換)、コルチコステロイド、アザチオプリン、リツキシマブ、クロランブシル、フルダラビン、メルファランなどを含む(Rison及びBeydounの文献、BMC Neurology.(2016) 16:13を参照)。

【0072】

本明細書で報告されているように、様々な異常タンパク性ニューロパチーを有する患者の血清中に存在する免疫グロブリンは、補体を活性化することができ、これは、PPN患者で見られる病理における補体媒介性組織損傷の役割を裏付けるものである。しかしながら、多巣性運動ニューロパチー(MMN)の治療においてエクリズマブ(Soliris(商標)ー抗C5抗体)を試験した以前の臨床研究は、有効性を示さなかった(Fitzpatrickらの文献、J Peripheral Nerv Syst, 2011, 16(2):84-91)。

【0073】

重要なことに、本発明者らは、シュワン細胞と運動ニューロンの両方がMAC媒介性溶解から細胞を保護するタンパク質である補体調節タンパク質CD59を上方調節することを示した。この観察は、C5の上流の補体カスケードの要素がPPN病理においてより重要な役割を果たすことを示している。これは、以前にエクリズマブで見られた有効性の欠如を十分に説明し得る。理論によって束縛されることを望むものではないが、異常タンパク性ニューロパチーにおける補体活性化は、シュワン細胞及び運動ニューロンで発現されることが分かっているC3aRの活性化を通じて、サイトカイン及び/又はケモカインの放出を誘導すると考えられる。MCP-1などのケモカインは、炎症細胞を誘引し、それにより、神経学的損傷を促進する際に役割を果たし得る。

【0074】

本発明は、補体因子C5の上流の補体活性を標的とすることにより、PPNの治療を改善しようとするものである。

【0075】

本明細書に記載される方法に従って治療されることになるニューロパチーには、「異常タンパク性ニューロパチー」として分類される全ての末梢性ニューロパチーが含まれる。これには、急性障害と慢性障害の両方が含まれる。異常タンパク性ニューロパチーは、ミエリン及び/又は軸索が損傷を受けるかどうかによって、脱髄性もしくは軸索性、又はこれらの組合せに分類することができる。ある実施態様において、治療されることになるニューロパチーは、軸索性ニューロパチーである。ある実施態様において、治療されることになるニューロパチーは、脱髄性ニューロパチー、例えば、慢性脱髄性ニューロパチーである。

【0076】

異常タンパク性ニューロパチーは、多くの場合、自己抗体の存在によって特徴付けられる。それゆえ、ある実施態様において、本明細書に記載される方法に従って治療されることになるニューロパチーは、自己抗体の存在によって特徴付けられる。神経抗原を認識する高力価の血清自己抗体は、末梢性の感覚、運動、及び感覚運動ニューロパチーのいくつかの形態において生じる。該抗体は、多くの場合、糖脂質、糖タンパク質、及びグリコサミノグリカンを含むグリコシル化細胞表面分子と反応するが、細胞内タンパク質に対する抗体も記載されている。抗体特異性と臨床症状の間でいくつかの相関があり、ニューロパチーが該抗体によって引き起こされることが示唆される。典型的には、IgM又はIgGアイソタイプの自己抗体は、本明細書の別所に記載されているように、末梢神経の補体系の古典経路を活性化することができる。自己抗体及び補体の末梢神経への接近は、血液神経障壁(BNB)の崩壊後に可能になる。ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、高力価の自己抗体によって特徴付けられる。ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、IgG、IgM、又はIgA自己抗体の存在によって特徴付けられる。

【0077】

ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、神経抗原に対する自己抗体の存在によって特徴付けられる。ある実施態様において、神経抗原は、ランビエ絞輪にあるタンパク質である。他の実施態様において、神経抗原は、ミエリン鞘にあるタンパク質である。ミエリン関連糖タンパク質(MAG)は、末梢及び中枢神経系ミエリンの構成成分である。MAGに対する高力価IgM抗体は、感覚運動脱髄性末梢神経障害と関連している。MAG抗体は、通常、IgM単クローン性タンパク質の存在と関連している。ある実施態様において、神経抗原は、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)である。

【0078】

ガングリオシドは、神経系の膜構成要素に広く分布するスフィンゴ糖脂質群である。ある実施態様において、神経抗原は、ガングリオシドである。ニューロパチー関連自己抗体によって最もよく認識されるガングリオシドは、GM1、GD1a、GD1b、及びGQ1bである。ある実施態様において、ガングリオシドは、GM1、GM1b、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD2、GD3、GT1a、GT1b、GT3、及びGQ1bから選択される。好ましい実施態様において、ガングリオシドは、GM1である。個々の患者は、単一のガングリオシドに対する又は複数のガングリオシドに対する抗体を保有し得る。したがって、ある実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、1以上の神経抗原に対する自己抗体の存在によって特徴付けられる。ある実施態様において、末梢神経障害は、1以上のガングリオシドに対する自己抗体の存在によって特徴付けられる。ある実施態様において、神経抗原は、傍絞輪部タンパク質である。ある実施態様において、神経抗原は、コンタクチン1、NF155、NF186、及びNF140から選択される傍絞輪部タンパク質であり得る。様々な末梢性ニューロパチーと関連することが知られている自己抗体は、下の表3に記載されている。例えば、傍絞輪部タンパク質に対するIgG4自己抗体は、CIDPを有する患者で同定されている。通常IgMアイソタイプのGM1抗体の検出は、筋力低下及び萎縮によって特徴付けられる多巣性運動ニューロパチー及び下位運動ニューロパチーと関連している。GM1 IgMは、モノクローナルIgMパラプロテインとして又はポリクローナルIgMとして存在し得る。

表3.末梢性ニューロパチーにおける自己抗体

【表3】

疾患	抗原	抗体アイソタイプ
GBS 亜型		
AMAN	GM1, GM1b, GD1a	IgG
AMSAN	GM1, GD1a	IgG
ミラー・フィッシャー症候群	GQ1b, GT1a	IgG
CIDP (及び亜型)	MAG, コンタクチン1, NF155, NF186, NF140	IgG4
CANOMAD	GD3, GD1b, GT1b, GQ1b	IgM
DADS	MAG	IgM
MMN	GM1	IgM
抗MAGニューロパチー	MAG	IgM
POEMS	不明	IgG/IgA

【0079】

本明細書に記載される方法に従って治療されることになる特定の異常タンパク性ニューロパチーは、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、ギラン・バレー症候群(GBS)、ミラー・フィッシャー症候群、急性運動性軸索型ニューロパチー(AMAN)、急性運動感覚性軸索型ニューロパチー(AMSAN)、慢性失調性ニューロパチー-眼筋麻痺-IgMパラプロテイン-寒冷凝集素-ジシアロシル抗体(CANOMAD)症候

群、遠位後天性脱髄性対称性(DADS)ニューロパチー、単クローン性ガンマモパシー関連末梢神経障害、抗MAG末梢神経障害、及びPOEMS症候群から選択され得る。ある好ましい実施態様において、異常タンパク性ニューロパチーは、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、ギラン・バレー症候群(GBS)から選択される。本明細書に記載される方法は、多巣性運動ニューロパチー(MMN)の治療に特に好ましい。

【0080】

本明細書に記載される方法は、それを必要としている対象の異常タンパク性ニューロパチーを治療するためのものである。対象は、好ましくは、ヒト対象である。対象は、患者であってもよく、ここで、患者は、異常タンパク性ニューロパチーの治療のための医療を受けている及び/又は異常タンパク性ニューロパチーの治療のための医療を積極的に求めている個体である。治療されることになる対象は、典型的には、限定されないが、しびれの緩やかな始まり;脚及び腕へと上に向かって広がり得る足又は手のチクチクする痛み又はヒリヒリ感;鋭い突き刺すような痛み、ズキズキする痛み、凍てつくような痛み、又は灼けつくような痛み;触れられた時の極度の感受性;協調の欠如及び転倒;単収縮及び筋肉攣縮;筋肉の菲薄化(萎縮);筋力低下又は麻痺を含む、異常タンパク性ニューロパチーと一致する1以上の症状を示す。治療されることになる対象は、任意の標準的な評価基準によって、異常タンパク性ニューロパチーを有すると以前に診断されたことがあってもよい。対象は、血清中の過剰な免疫グロブリンに基づいて特定されたことがあるか又は以前に診断されたことがあってもよい。その代わりに又はそれに加えて、対象は、1以上の神経抗原に対する自己抗体を保有していてもよい。

【0081】

治療されることになる対象は、異常タンパク性ニューロパチーの治療を既に受けていてもよく、又は異常タンパク性ニューロパチーの治療を以前に受けたことがあってもよい。いくつかの実施態様において、対象は、IVIgを以前に受けたことがあるか、又はIVIgを受けているところである。他の実施態様において、対象は、リツキシマブを以前に受けたことがあるか、又はリツキシマブを受けているところである。いくつかの実施態様において、対象は、血漿交換を受けたことがあるか、又は血漿交換を受けているところである。対象は、以前の治療に対して応答しなかったことがあってもよく、又はその症状が悪化してしまうような以前の治療に対する耐性を獲得したことがあってもよい。

【0082】

本明細書に記載される治療の方法は、PPNと関連する1以上の症状の完全な又は部分的な回復をもたらすことができる。能力の改善は、PPN治療を評価するのに好適な任意の標準的な評価基準を用いて測定することができる。

【0083】

本発明の方法は、異常タンパク性ニューロパチーの治療のための1以上の追加の治療剤の投与を含むことができる。1以上の追加の治療剤は、組合せ療法として、補体アンタゴニストと同時に投与することができる。或いは、1以上の追加の薬剤は、補体アンタゴニストの投与の前又は後に投与することができる、すなわち、薬剤は、連続的に投与される。本発明の方法に従って投与され得る追加の治療剤としては、IVIg、リツキシマブ、コルチコステロイド、アザチオプリン、クロランブシル、フルダラビン、メルファラン、シクロホスファミド/プレドニゾン、メルファラン、ガバペンチン、プレガバリン、バルプロエート、デキストロメトルフアン、トラマドール、デュロキセチン、アミトリプチン、及びベンラファキシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

(C.補体アンタゴニスト)

本明細書に提示される結果は、補体カスケードの最終段階、特に、MAC媒介性溶解がPPNの病理において重要な役割を果たすことができないことを示している。これは、シュワン細胞及び運動ニューロンがMAC媒介性溶解を防ぐ高レベルの補体調節タンパク質CD59を発現するからである。それゆえ、本明細書に記載される異常タンパク性ニューロパチー

と関連する補体関連病理は、C5の上流の因子によって、例えば、C3aRによって媒介され得るということになる。それゆえ、本発明は、C5の上流の補体経路を阻害することにより、異常タンパク性ニューロパチーを治療する方法を提供する。

【0085】

本方法は、対象に補体系のアンタゴニストを投与することを含み、ここで、該アンタゴニストは、補体因子C5の上流の補体系を阻害する。補体因子C5の上流の補体系を阻害するアンタゴニストは、補体因子C5それ自体、又は組み合わせさせて、膜攻撃複合体を形成する下流の因子(C6、C7、C8、C9)のいずれかを直接的には阻害しない。実際、補体因子C5の上流の補体系を阻害するアンタゴニストは、補体因子C5よりも前の補体カスケードの因子又は構成要素を標的とする。C5の上流の補体因子には、C1、C2、C4、及びC3が含まれる。したがって、ある実施態様において、アンタゴニストは、C1、C2、C4、及びC3のうちのいずれか1つの機能を阻害することにより、補体系を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、又はC4bのうちのいずれか1つの機能を阻害することにより、補体系を阻害する。

10

【0086】

ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C3の上流の補体系を阻害する。C3の上流の補体因子には、C1、C4、及びC2が含まれる。したがって、ある実施態様において、アンタゴニストは、C1、C2、及びC4のうちのいずれか1つの機能を阻害することにより、補体系を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C4、C4a、又はC4bのうちのいずれか1つの機能を阻害することにより、補体系を阻害する。

20

【0087】

古典補体経路の開始因子は、補体因子C1である。それゆえ、いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C1を阻害する。他の実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C1q、C1r、又はC1sを阻害する。補体因子C1で補体カスケードを阻害することにより、C1特異的標的であるC4及びC2の切断を防止し又は低下させること、並びに補体系の古典経路を介する補体の活性化を特異的に阻害することが可能になる。C1の阻害は、オプソニンC4bの沈着を低下させ、それにより、食作用及び破壊に向けた細胞の標的化を低下させることができる。さらに、C1の阻害は、C3コンバーターC4bC2aの形成を防止し又は低下させることができる。C4及びC2は、レクチン経路を介してMASP酵素によって切断することもできる;しかしながら、C3コンバーターの総レベルは、補体因子C1を標的とすることにより、顕著に阻害することもできる。

30

【0088】

ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C4を阻害する。他の実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C4a又はC4bを阻害する。補体因子C4を標的とすることにより、C3コンバーターC4bC2aの形成を防止すること、及び補体系の古典経路とレクチン経路の両方を介する補体活性化を阻害することが可能になる。

【0089】

ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C2を阻害する。他の実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C2a又はC2bを阻害する。C2の阻害も、C3コンバーターの形成を防止し又は低下させ、それにより、アナフィラトキシンC3a及びオプソニンC3b並びにC2の下流の他の補体活性化産物の沈着を低下させることができる。C2のアンタゴニストは、C2aを直接阻害し、C3コンバーターの形成を防止することができる。或いは、アンタゴニストは、C2bを阻害し、表面結合C4bへのC2の初期結合を防止することができる。C2bのアンタゴニストは、C4bへのC2aの結合を無傷のままにしておくことができる。それにもかかわらず、C2活性は、C2bのアンタゴニストによって顕著に阻害され得る。

40

【0090】

ある実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C3を阻害する。他の実施態様において、アンタゴニストは、補体因子C3a又はC3bを阻害する。C3の阻害は、C5コンバーター

50

ぜC3bBbC3bの形成を防止し又は低下させ、それにより、アナフィラトキシンC5a及びMAC生成因子C5bの沈着を低下させることができる。

【0091】

アンタゴニストが補体系を阻害する補体カスケード中の地点に応じて、アンタゴニストは、古典補体経路、レクチン補体経路、代替補体経路、又はこれらの経路の組合せを阻害することができる。ある実施態様において、アンタゴニストは、古典補体経路及びレクチン補体経路を阻害するが、代替補体経路に影響を及ぼさない。C2及びC4を標的とするアンタゴニストは、古典経路及びレクチン補体経路を阻害する一方、代替経路を無傷のままにしておくことができる。場合によっては、この重要な自然免疫系の武器が完全には障害を受けないように、補体経路の1つを無傷のままにしておくことが有益である可能性がある。その代わりに又はそれに加えて、アンタゴニストは、治療効果を達成するために、補体活性の部分阻害をもたらすことしか必要としない可能性がある。

【0092】

本明細書に記載される治療方法において使用するためのアンタゴニストは、補体活性を阻害し又は低下させるために、補体因子C5の上流の補体系の因子又は構成要素を阻害する。本明細書で報告されているように、MAC複合体の形成に先行する補体因子の活性を阻害するために、C5の上流の補体カスケードを標的とすることが有益である。本明細書に記載される方法に従って使用するためのアンタゴニストは、生物学的に活性のある補体由来ペプチド、例えば、C4a、C4b、C3a、C3b、及びC5aの生成を阻害することにより、補体活性を低下させ又は阻害することができる。アンタゴニストは、少なくとも一部は、細胞及び組織に対する補体由来ペプチドの損傷効果を防止することができる。補体系のアンタゴニストは、アナフィラトキシンの沈着を低下させることにより、オプソニンの沈着を低下させることにより、サイトカイン及び/又はケモカインの産生又は分泌を低下させることにより、食作用を低下させることにより、免疫細胞の動員を低下させることにより、並びにこれらの任意の組合せにより、補体活性を阻害し又は低下させることができる。ある実施態様において、補体系のアンタゴニストは、アナフィラトキシンの沈着を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、C3a又はC5aの沈着を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、オプソニンの沈着を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、C3b又はC4bの沈着を阻害する。ある実施態様において、アンタゴニストは、炎症性サイトカイン及び/又はケモカインの産生及び/又は分泌を阻害する。いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、MCP-1の産生及び/又は分泌を阻害する。

【0093】

本発明で使用するためのアンタゴニストは、補体因子の機能を阻害し、それにより、補体活性を阻害し又は低下させることができる任意の薬剤であり得る。本明細書の別所に記載されているように、本方法で使用するためのアンタゴニストは、その標的に対する特異性を示すことが好ましい。この特異性は、通常、その標的に直接結合し、かつ該標的の機能を阻害するアンタゴニストによって達成される。

【0094】

いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、阻害性RNA種、例えば、siRNA又はshRNA;小分子インヒビター;阻害性ペプチド、抗体模倣物、例えば、アフィボディ、アフィリン、アフィチン、アドネクチン、アトリマー、エバシン、DARPin、アンチカリン、アビマー、フィノマー、バーサボディ、及びデュオカリンを含む、生物学的アンタゴニスト;抗体及びその抗原結合断片;から選択される。

【0095】

好ましい実施態様において、アンタゴニストは、抗体又はその抗原結合断片である。ある実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、補体因子C1、C1q、C1s、C1r、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、又はC4bに結合する。ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、補体因子C1、C1q、C1s、C1r、C2、C2a、C2b、C4、C4a、又はC4bに結合する。好ましい実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2、好ましくは、C2bに結合する。

【0096】

本明細書に記載される方法で使用するための抗体及び抗原結合断片は、ヒトへの治療的使用が意図されており、それゆえ、通常、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMタイプのもので、多くはIgGタイプのものであり、この場合、これは、4つのサブクラスIgG1、IgG2a及びb、IgG3、又はIgG4のいずれかに属することができる。好ましい実施態様において、抗体は、IgG抗体、任意に、IgG1抗体である。抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)であることができ、ただし、これらは、その標的に対する適切な免疫学的特異性を示す。モノクローナル抗体が好ましいが、それは、これが極めて特異的であり、単一の抗原性部位に対するものであるからである。

【0097】

本明細書に記載される抗原結合断片は、典型的には、全長抗体の一部、通常、その抗原結合又は可変ドメインを含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、二重特異性Fab'、及びFv断片、直鎖状抗体、単鎖抗体分子、単鎖可変断片(scFv)、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる(引用により本明細書中に組み込まれる、Holliger及びHudsonの文献(2005) Nature Biotechnol. 23:1126-36を参照)。

【0098】

本明細書に記載される方法に従って使用するための抗体又は抗原結合断片は、高いヒト相同性を示すことができる。高いヒト相同性を有するそのような抗体分子としては、ヒト生殖系列配列に対する十分に高い%配列同一性を示すネイティブな非ヒト抗体のVH及びVLドメインを含む抗体を挙げることができる。ある実施態様において、抗体分子は、非ヒト抗体のヒト化又は生殖系列化バリエーションである。

【0099】

非限定的な実施態様において、抗体は、CH1ドメイン及び/又はCLドメイン(それぞれ、重鎖及び軽鎖由来)を含むことができ、そのアミノ酸配列は、完全に又は実質的にヒトのものである。ヒトへの治療的使用が意図される抗体分子について、抗体の定常領域全体又は少なくともその一部が完全に又は実質的にヒトのアミノ酸配列を有することが典型的である。それゆえ、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及びCLドメイン(及び存在する場合、CH4ドメイン)のうちの1つもしくは複数又は任意の組合せは、そのアミノ酸配列に関して完全に又は実質的にヒトのものであり得る。CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及び/又はCLドメイン(及び/又は存在する場合、CH4ドメイン)は、ヒト抗体、好ましくは、ヒトIgG抗体、より好ましくは、亜型IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のヒトIgG1抗体に由来するものであり得る。

【0100】

有利には、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及びCLドメイン(及び存在する場合、CH4ドメイン)は全て、完全に又は実質的にヒトのアミノ酸配列を有することができる。ヒト化もしくはキメラ抗体、又は抗体断片の定常領域との関連において、「実質的にヒトの」という用語は、ヒト定常領域と少なくとも90%、又は少なくとも92%、又は少なくとも95%、又は少なくとも97%、又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を指す。これに関連した「ヒトアミノ酸配列」という用語は、再配列され、かつ体細胞突然変異した生殖系列の遺伝子を含む、ヒト免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を指す。

【0101】

一実施態様において、抗体又は抗体断片は、該抗体又は抗体分子の血清半減期を増大させるように設計された1以上の突然変異を含むヒトFcドメインを含む。そのような最適化努力は、インビボでの抗体循環を向上させることを目指している。半減期に影響を及ぼすヒトIgG Fcドメインの突然変異の例としては、His433Lys+Asn434Phe(NHance); Arg435His; Asn434Ala; Met252Tyr+Ser254Thr+Thr256Glu(YTE); Met428Leu+Asn434Ser(LS); Thr252Leu+Thr253Ser+Thr254Phe(LSF); Glu294delta+Thr307Pro+Asn434Tyr(C6A-66); Thr256Asn+Ala378Val+Ser383Asn+Asn434Tyr(C6A-78);及びGlu294delta(del)が挙げられる。補体インヒビターの血清半減期に応じ

10

20

30

40

50

て、それを単一用量として投与してもよく、又はそれを、次の投与と投与の間を1日～1カ月の間隔にした複数用量として投与してもよい。

【0102】

別の実施態様において、Fcドメインは、Fcドメインのエフェクター機能を障害するように設計された1以上の突然変異を含み得る。そのような突然変異は、当業者に周知である。ヒトIgG1の場合、抗体は、そのエフェクター機能を無効化又は障害するように修飾されているヒトFcドメインを含み得る。そのようなFcドメイン突然変異は、通常、位置234、235、236、237、297、318、320、又は322の重鎖定常領域由来の少なくとも1つのアミノ酸を変化させ、それにより、抗原に対する結合を保持しながら、エフェクター機能の改変を引き起こすことを含む。エフェクターを障害するヒトIgG Fcドメインの突然変異の例としては、Leu234Ala+Leu235Ala(LALAと称される); Leu234Ala+Leu235Ala+Pro329Gly(LALA-PGと称される); IgG4中のSer228Pro+Leu235Glu; Pro331Ser+Leu234Glu+Leu235Phe;及びPro331Ser+Leu234Ala+Leu235Alaが挙げられる。

10

【0103】

補体因子C1を阻害する本発明で使用するのに好適なアンタゴニストの例としては、Cinryze(Shire)、スチムリマブー別名、TNT009及びBIV009(Bioverativ)、TNT003(True North)、ANX005(Annexon)、並びにナファモスタット(Torii Pharmaceutical)が挙げられる。

【0104】

補体因子C3を阻害する本発明で使用するのに好適なアンタゴニストの例としては、コンプスタチンCp40(Amyndas)、PEG-Cp40(Amyndas)、AMY-101(Amyndas)、AMY-201(Amyndas)、APL-1及びAPL-2(Apellis)、CDX-1135(Celldex)、APT070ミロコセプト(MRC)、HC3-1496(InCode)、ヒト化モノクローナル抗体H17(Elusys Therapeutics)、又はワクシニアウイルス補体制御タンパク質(VCP)が挙げられる。

20

【0105】

(D.抗C2抗体及び抗原結合断片)

本明細書に記載される治療方法で使用するのための特に好ましい補体アンタゴニストは、補体因子C2を阻害するものである。好ましい実施態様において、治療において使用するための補体アンタゴニストは、C2に結合する抗体又はその抗原結合断片である。本明細書に記載される方法で使用するのための好適な抗C2抗体及び抗原結合断片には、その内容が本明細書中に完全に組み込まれる国際特許出願WO2014/189378号で同定されている抗体及び抗原結合断片が含まれる。

30

【0106】

C2は、補体活性化の古典経路及びレクチン経路に関与する90～100kDaの糖タンパク質である。上記の通り、C2は、古典経路のC1sによるか又はレクチン経路の活性化MASP2によって活性化させることができる。C2は、表面に結合したC4bに(Mg^{2+} の存在下で)結合して、C4bC2複合体を形成し、その後、これは、活性化C1s又はMASP2によって切断されて、2つの断片: C4bに結合したままで、C3-コンバーターC4bC2aを形成するより大きい70kDa断片C2a及び流体相に放出されるより小さい30kDaのN-末端断片C2bになる。ひとたび活性化されて、C4bに結合すると、C2aは、それぞれ、C3及びC5を切断することができるC3及びC5コンバーターゼの触媒サブユニットを構成する。

40

【0107】

ヒトC2のアミノ酸配列は公知であり(GenBankアクセッション番号NM_000063)、下の配列番号1に示されている。

ヒトC2のアミノ酸配列(配列番号1):

50

【化 7】

MGPLMVLFCLFLYPGLADSAPSCPQNVNISGGTFTLSHGWAPGSLLTYSCPQGLYPSPASRLC
KSSGQWQTPGATRSLKAVCKPVRCPAPVSFENGIYTPRLGSYPVGGNVSFECEDGFILRGSP
VRQCRPNGMWDGETAVCDNGAGHCPNPGISLGAVRTGFRFGHGDKVRYRCSSNLVLTGSSE
RECQGNVWVSGTEPICRQPYSYDFPEDVAPALGTSFSHMLGATNPTQKTKESSLGRKIQIRSG
HLNLYLLDCSQSVSENDFLIFKESASLMVDRIFSFEINVSVAITFASEPKVLSVLNDNSRDMTE
VISSLENANYKDHENGTTNTYAALNSVYLMNMNQMRLLGMETMAWQEIRHAIILLTDGKSNMG
GSPKTAVDHIREILNINQKRNDYLDIYAIGVGKLDVDWRELNELGSKKDGERHAFILQDTKALHGV
FEHMLDVSKLTDITICGVGNMSANASDQERTPWHTIKPKSQETCRGALISDQWVLTAAHCFRD
GNDHSLWRVNVGDPKSQWGKEFLIEKAVISPGFDVFAKKNQGILEFYGDDIALLLKLAQVKVMST
HARPICLPCTMEANLALRRPQGSTCRDHENELLNKQSVPAHFVALNGSKLNINLKMGEVWTSCA
EVVSQEKTMFPNLTDVREVVTQFLCSGTQEDESPCKGESGGAVFLERRFRFFQVGLVSWGL
YNPCLGSADKNSRKRAPRSKVPPPRDFHINLFRMQPWLRQHLGDVLNLFPL

10

【0108】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2bに結合し、かつ可変重鎖(VH)ドメイン及び可変軽鎖(VL)ドメインを含み、ここで、該VH及びVLドメインは、CDR配列:

—

20

【化 8】

配列番号: 2 [EDDHDAFAY]

を含むか又はこれからなるHCDR3;

—

【化 9】

配列番号: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG]

を含むか又はこれからなるHCDR2;

—

30

【化 10】

配列番号: 4 [DYNMD]

を含むか又はこれからなるHCDR1;

—

【化 11】

配列番号: 5 [QHSRELPYT]

を含むか又はこれからなるLCDR3;

—

40

【化 12】

配列番号: 6 [LASNLKS]

を含むか又はこれからなるLCDR2;及び

—

【化 13】

配列番号: 7 [RASKSVRTSGYNYMH]

を含むか又はこれからなるLCDR1

を含む。

50

【0109】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2bに結合し、かつ配列番号8と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%同一の配列を含むか又は該配列からなる可変重鎖(VH)ドメイン及び配列番号9と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%同一の配列を含むか又は該配列からなる可変軽鎖(VL)ドメインを含む。ある実施態様において、C2bに結合する抗体又は抗原結合断片は、配列番号8を含むか又は配列番号8からなる可変重鎖ドメイン(VHドメイン)及び配列番号9を含むか又は配列番号9からなる可変軽鎖ドメイン(VLドメイン)を含む。

【0110】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2bに結合し、かつ可変重鎖(VH)ドメイン及び可変軽鎖(VL)ドメインを含み、ここで、該VHドメインは、配列番号8と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%同一の配列を含むかもしくは該配列からなり、VLドメインは、CDR配列:

【化14】

配列番号: 5 [QHSRELPTY]

を含むか又はこれからなるLCDR3;

【化15】

配列番号: 6 [LASNLKS]

を含むか又はこれからなるLCDR2;及び

【化16】

配列番号: 7 [RASKSVRTSGYNYMH]

を含むか又はこれからなるLCDR1

を含む。

【0111】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2bに結合し、かつ可変重鎖(VH)ドメイン及び可変軽鎖(VL)ドメインを含み、ここで、該VHドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含むかしくは該配列からなり、VLドメインは、CDR配列:

【化17】

配列番号: 5 [QHSRELPTY]

を含むか又はこれからなるLCDR3;

【化18】

配列番号: 6 [LASNLKS]

を含むか又はこれからなるLCDR2;及び

【化19】

配列番号: 7 [RASKSVRTSGYNYMH]

を含むか又はこれからなるLCDR1

を含む。

【0112】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2bに結合し、かつ可変重鎖(VH)ドメイン及び可変軽鎖(VL)ドメインを含み、ここで、該VHドメインは、CDR配列:

【化20】

配列番号: 2 [EDDHDAFAY]

10

20

30

40

50

を含むか又はこれからなるHCDR3;
【化21】

配列番号: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG]

を含むか又はこれからなるHCDR2;
【化22】

配列番号: 4 [DYNMD]

を含むか又はこれからなるHCDR1

を含み、かつVLドメインは、配列番号9と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%同一の配列を含むか又は該配列からなる。

【0113】

ある実施態様において、抗体又は抗原結合断片は、C2bに結合し、かつ可変重鎖(VH)ドメイン及び可変軽鎖(VL)ドメインを含み、ここで、該VHドメインは、CDR配列:

【化23】

配列番号: 2 [EDDHDAFAY]

を含むか又はこれからなるHCDR3;
【化24】

配列番号: 3 [DINPNYESTGYNQKFKG]

を含むか又はこれからなるHCDR2;
【化25】

配列番号: 4 [DYNMD]

を含むか又はこれからなるHCDR1

を含み、かつVLドメインは、配列番号9のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。

【0114】

抗体又は抗原結合断片のドメインが参照配列に対する特定のパーセンテージ配列同一性によって規定される実施態様について、VH及び/又はVLドメインは、参照配列中に存在するCDR配列と同一のCDR配列を保持していてもよく、その結果、変異は、フレームワーク領域内にのみ存在する。

表4 VH及びVLドメイン配列

【表4】

可変ドメイン	配列	配列番号:
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWI GDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR EDDHDAFAYWGQGTLLTVSS	8
VL	DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKPGQPP KLLIYLASNLKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAATYYCQHSRELP YTFGQGGTKLEIK	9

【0115】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒト抗体、特に、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及び/又はCH3ドメインを含む。ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG1のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、C

H2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつCH2ドメイン中の置換L234A及びL235Aを含み、ここで、該位置は、EU付番に従って規定されている。その代わりに又はそれに加えて、抗C2b抗体は、ヒトIgG1のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつCH3ドメイン中の置換H433K及びN434Fを含み、ここで、該位置は、EU付番に従って規定されている。EU付番は、Edelman, G.M.らの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 78-85(1969);及びKabatらの文献、「免疫学的対象となるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」所収、U.S. Dept. Health and Human Services, 第5版、1991に記載されているFc領域についての慣例を指す。

【0116】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む。ある実施態様において、該抗体は、ヒトIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつヒンジドメイン中の置換S228Pを含む。

【0117】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつCH3ドメイン中の置換L445Pを含む。

【0118】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつヒンジドメイン中の置換S228PとCH3ドメイン中の置換L445Pの両方を含む。

【0119】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつCH3ドメイン中の置換H433K及びN434Fを含む。

【0120】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG4のCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、かつヒンジドメイン中の置換S228P並びにCH3ドメイン中の置換H433K及びN434Fを含む。

【0121】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、ヒトIgG重鎖定常ドメインを含む。ある実施態様において、重鎖定常ドメインは、ヒトIgG1重鎖定常ドメインを含む。ある実施態様において、重鎖定常ドメインは、ヒトIgG1重鎖定常ドメインからなる。ある実施態様において、重鎖定常ドメインは、配列番号10もしくは11に示されたアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるヒトIgG1重鎖定常ドメインを含む。

【0122】

ある実施態様において、重鎖定常ドメインは、ヒトIgG4重鎖定常ドメインを含む。ある実施態様において、重鎖定常ドメインは、ヒトIgG4重鎖定常ドメインからなる。ある実施態様において、重鎖定常ドメインは、配列番号12、13、もしくは14のいずれか1つに示されたアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるヒトIgG4重鎖定常ドメインを含む。

【0123】

重鎖定常ドメインは、下の表5に示されている。

表5 重鎖定常ドメイン

10

20

30

40

50

【表 5】

ID	配列	配列番号：
ヒト IgG1 (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
ヒト IgG1 LALA NHance (ARGX- 117)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	11
ヒト IgG4 (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
ヒト IgG4 S228P L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	13
ヒト IgG4 S228P NHance L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK	14

【0124】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する軽鎖、及び以下のもの：

- (i) 配列番号15に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖；
- (ii) 配列番号16に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖；
- (iii) 配列番号17に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくと

も97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖;
 (iv) 配列番号18に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖;及び
 (v) 配列番号19に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖
 から選択される重鎖を含むか又は該軽鎖及び該重鎖からなる。

【0125】

ある実施態様において、抗C2b抗体は、配列番号20のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号15～19から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【0126】

好ましい実施態様において、抗C2b抗体は、配列番号20のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号16のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【0127】

重鎖及び軽鎖配列は、下の表6に示されている。

表6 重鎖及び軽鎖

【表6】

ID	配列	配列番号:
ヒト IgG1 (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDDHD AFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	15
ヒト IgG1 LALA NHance (ARGX-117)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDDHD AFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	16
ヒト IgG4 (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDDHD AFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV	17

10

20

30

40

50

	VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
ヒト IgG4 S228P L445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDDHD AFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	18
ヒト IgG4 S228P NHance L445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDDHD AFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK	19
軽鎖 (ARGX- 117)	DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKPGQPPKLLI YLASNLKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAATYYCQHSRELPTYFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPV TKSFNRGEC	20

【 0 1 2 8 】

好ましい実施態様において、抗C2b抗体は、モノクローナルIgG抗体である。

【 0 1 2 9 】

抗体の重鎖及び/又は軽鎖が参照配列に対する特定のパーセンテージ配列同一性によって規定される実施態様について、該重鎖及び/又は軽鎖は、参照配列中に存在するものと同じのCDR配列を保持していてもよく、その結果、変異は、CDR領域の外側にのみ存在する。

【 0 1 3 0 】

本出願において別途明記されない限り、2つのアミノ酸配列間の%配列同一性は、最適な様式で整列されたこれら2つの配列を比較することにより決定することができ、ここで、比較されることになるアミノ酸配列は、これら2つの配列間の最適なアラインメントのために参照配列に関して付加又は欠失を含むことができる。同一性のパーセンテージは、アミノ酸残基が2つの配列間で同一である同一の位置の数を決定し、この同一の位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、これら2つの配列間の同一性のパーセンテージを得るために、得られた結果に100を掛けることにより計算される。例えば、BLASTプログラム「BLAST 2配列」を使用することが可能であり(Tatusovaらの文献、「Blast 2配列－タンパク質及びヌクレオチド配列を比較するための新しいツール(Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences)」、FEMS Micro

10

20

30

40

50

biol Lett. 174:247-250)、使用されるパラメータは、デフォルトで与えられるものであり(特に、パラメータについて、「オープンギャップペナルティ」：5及び「伸張ギャップペナルティ」：2;選択されるマトリクスは、例えば、このプログラムによって提案されたマトリクス「BLOSUM 62」である)、比較されることになる2つの配列間の同一性のパーセンテージは、このプログラムによって直接計算される。

【0131】

抗C2抗体をFc領域内で修飾して、新生児受容体FcRn、好ましくは、ヒトFcRnに対する結合親和性を増大させることができる。結合親和性の増大は、酸性pH(例えば、約およそpH 5.5~およそpH 6.0)で測定可能であり得る。結合親和性の増大は、中性pH(例えば、およそpH 6.9~およそpH 7.4)でも測定可能であり得る。「結合親和性の増大」により、未修飾のFc領域の結合親和性と比べたFcRnに対する結合親和性の増大を意味する。典型的には、未修飾のFc領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4の野生型アミノ酸配列を保有する。そのような実施態様において、修飾されたFc領域を有する抗体分子のFcRnに対する結合親和性の増大は、FcRn、好ましくは、ヒトFcRnに対する野生型IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4の結合親和性と比べて測定される。

【0132】

(E. 医薬組成物)

本明細書に記載される治療方法において使用するためのアンタゴニスト、特に、抗体及び抗原結合断片は、対象への投与のための医薬組成物として製剤化することができる。

【0133】

医薬組成物は、従来の技法、例えば、(レミントン:調剤の科学及び実践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)、第19版、Gennaro編、Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1995)に開示されている技法に従って、医薬として許容し得る担体又は希釈剤並びに任意の他の公知のアジュバント及び賦形剤とともに製剤化することができる。「医薬として許容し得る担体」という用語は、本質的に無毒である担体又は賦形剤に関する。そのような賦形剤の例には、生理食塩水、リンガー溶液、ブドウ糖溶液、及びハanks溶液があるが、これらに限定されない。固定油及びオレイン酸エチルなどの非水性賦形剤を使用することもできる。

【0134】

医薬組成物は、典型的には、製造及び保管の条件下で滅菌性であり、かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高薬物濃度に好適な他の秩序ある構造として製剤化することができる。医薬組成物中で利用され得る好適な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、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)、及びそれらの好適な混合物、オリブオイルなどの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、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、分散剤の場合、必要とされる粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。

【0135】

医薬組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュバントを含有することもできる。微生物の存在の予防は、滅菌手順と様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの包含の両方によって保証することができる。また、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、グリセロール、又は塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物中に含めることが望ましい場合もある。医薬として許容し得る抗酸化剤、例えば、(1)水溶性抗酸化剤、例えば、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、亜硫酸ナトリウムなど、(2)油溶性抗酸化剤、例えば、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、 α -トコフェロールなど;及び(3)金属キレート剤、例えば、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、リン酸などを含めることもできる。

【0136】

医薬組成物は、任意の好適な投与様式によって投与することができる。例えば、投与は、非経口的なもの、好ましくは、静脈内(i.v.)又は皮下(s.c.)注射又は注入によるものであってもよい。本明細書で使用される「非経口投与」及び「非経口投与される」という語句は、通常は注射による、経腸及び局所投与以外の投与様式を意味し、限定されないが、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節包内、眼窩内、心内、皮内、経気管、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内注射及び注入を含む。

【0137】

(引用による組込み)

様々な刊行物が前述の説明において及び以下の実施例の全体を通じて引用されており、これらは各々、引用により完全に本明細書中に組み込まれる。

【実施例】

【0138】

(実施例)

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照して、さらに理解されるであろう。

【0139】

(実施例1 生きたシュワン細胞を用いる多巣性運動ニューロパチー(MMN)のインビトロモデルにおける補体阻害)

シュワン細胞は、末梢神経系の軸索にらせん状に巻き付いて、ミエリン鞘を形成するミエリン分泌グリア細胞である。これらの細胞は、タンパク質GM1によって軸索に付着させられる。その最も重要な機能は、ニューロンの跳躍伝導を増大させるための軸索の髄鞘形成であるが、それらは、ニューロンの生存及びシグナル伝達も助ける。これらの細胞の機能不全は、シグナル伝達の減少をもたらす脱髄を引き起こす。したがって、シュワン細胞は、MMNのようないくつかの脱髄障害と関連している。ヒトシュワン細胞株-sNF02.2が存在しており、これは、ある患者の悪性末梢神経鞘腫と診断された肺転移から得られた。該細胞は、シュワン細胞マーカーS100及びp75について陽性のクローン性形態を示す均一なシュワン細胞様集団を形成するまで、原発性腫瘍材料を培養下で数多く継代することによって樹立された。ATCC(登録商標)から購入したこの細胞株を本明細書に記載される実験で使用した。

【0140】

(A.方法)

(1.1 シュワン細胞を培養するためのプロトコル)

sNF02.2(ATCC(登録商標) CRL-2885(商標))又はsNF96.2(ATCC(著作権) CRL-2884)シュワン細胞を、100U/mLのペニシリン、100µg/mLのストレプトマイシンを備え、かつ10%FCSが補充されたDMEM培地中、37°C、5%CO₂で培養した。週に2回、コンフルエンスが>80%に達していたら、細胞を継代するか又は実験で使用した。培地を廃棄し、細胞を10mlのPBSで洗浄した。細胞を解離させるために、3mL(T75)又は5mL(T175)のAccutase細胞剥離溶液(eBioscience(商標)、Thermo Fischer Scientific;カタログ番号00-455-56)を添加し、細胞を37°Cで5分間又は細胞が完全に剥離するまでインキュベートした。その後、培養培地(T75に7mL及びT175に10mL)を添加し、細胞を15mLチューブに移した後、遠心分離した(125×g、10分)。ペレットを5mlの培養培地に再懸濁させ、生細胞と死細胞を識別するために、トリパンブルーを用いて計数した。次に、細胞を所望の濃度に調整し、培養フラスコに播種するか(T75中10mL、T175中20mL)又はFACS実験で使用した。

【0141】

(1.2 シュワン細胞を染色するためのプロトコル)

細胞を上記の通りに培養し、計数後、50,000個の細胞をv-底プレートに移した。細胞をFACSバッファー(PBS 1%BSA 0.01%アジ化ナトリウム)中で1回洗浄し、FACSバッファーに希釈したそれぞれの抗体で、氷上、暗所で45分間染色した(FACS染色抗体については、表7を参照)。必要な場合、100µLのFACSバッファーを添加することにより、細胞を

10

20

30

40

50

1回洗浄し、その後、 $125 \times g$ で5分間遠心分離した。次に、細胞を二次抗体とともに、氷上、暗所で45分間インキュベートした。インキュベーション後、 $100 \mu\text{L}$ のFACSバッファを添加し、細胞を遠心分離した($125 \times g$ で5分)。最後に、細胞ペレットを $100 \mu\text{L}$ のFACSバッファに再懸濁させ、FACS Canto II及び付随するソフトウェアを用いて解析した。

表7 FACS染色抗体

【表7】

抗体	標識/ 蛍光色素	会社	カタログ番号	クローン
CD46	FITC	BD	555949	E4.3
マウス IgG2a	FITC	BioLegend	400207	MOPC-173
CD55	FITC	BioLegend	311306	JS11
マウス IgG1	FITC	BD	556028	
CD59	APC	eBioscience	17-0596	OV9A2
マウス IgG1	APC	Biolegend	400119	MOPC-21
CD64	AF647	Sony	2125060	10.1
マウス IgG1	AF647	Biolegend	400155	MOPC-21
CD88 (C3aR)	PE	Biolegend	345804	hC3aRZ8
マウス IgG2b	PE	BD	555058	37-35
マウス IgG2b	PE	BD	559529	MCP-11
コレラ毒素Bサブユニット	AF488	Thermofisher	C34775	
ウサギ抗 MAG		Thermofisher	PA5-49646	
ヤギ抗ウサギ	AF488	Life technologies	A11070	
ウサギ抗 RBC		LSBio	LS-C347937	
C3	ビオチン	LSBio	LS-C62849	6C9
C3	FITC	LSBio	LS-C62855	6C9
抗ヒト IgM F(ab)'2	FITC	SouthernBiotech	2022-02	
CD46	APC	Thermofisher	A15711	MEM-258
CD55	APC	Biolegend	311312	JS11
CD35	Alexa Fluor ^(登録商標) 647	BD	565329	E11
CD11b	APC	Invitrogen	17-0118-42	ICRF44
CD11c	APC	BD	333144	
C3aR	APC	Biolegend	345805	hC3aRZ8
C5aR	FITC	GeneTex	GTX75734	P12/1
ストレプトアビジン	APC	eBioscience	17-4317-82	

【0142】

(1.3 生きたシュワン細胞に対する補体活性化アッセイ)

補体活性化を評価するとき、50,000個の細胞を96-ウェルv-底プレートに移した後、VB++に希釈した $20 \mu\text{L}$ のそれぞれのオブソニン化薬剤でオブソニン化した(1時間、RT)。次に、 $100 \mu\text{L}$ のVB++を添加し、試料を遠心分離した($125 \times g$ で5分)。次に、上清を廃棄し、細胞を $100 \mu\text{L}$ の補体活性血清(EDTA、MgEDTA、又はAbとともにRTで15分間ブレインキュベートしたもの)とともに 37°C で1時間インキュベートした。次に、細胞を $125 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を廃棄した。その後、補体活性化についての染色を上記の染色プロトコルに従って実施した。

【0143】

(1.4 サイトカイン分泌アッセイ)

sNF02.2細胞を上記の通りに培養した。Accutase処理及び計数の後、細胞を、 1mL のsNF02.2培養培地中、10,000細胞/ウェルの密度で24-ウェルプレートに移した。2日後、培養培地を廃棄し、細胞を、VB++中1:50の希釈の $100 \mu\text{L}$ の熱非同動化MMN患者血清で、RTで1時間オブソニン化した。次に、 $100 \mu\text{L}$ の15%補体活性血清(MgEGTA又は抗体とともにRTで15分間ブレインキュベートしたもの)をオブソニン化した細胞に添加し、その後、 37°C で1時間インキュベートした。その後、 $300 \mu\text{L}$ の培養培地を細胞に添加し、その結果、 $500 \mu\text{L}$ の最終容量/ウェルが得られた。24時間及び48時間後、 $200 \mu\text{L}$ の上清を、ユトレヒト大学医療センター(University Medical Centre in Utrecht)(MC Utrecht)の複数の中核施設による施設内解析のために回収した。

【0144】

(B.結果)

(1.5 生きたシュワン細胞による補体受容体の発現)

シュワン細胞を用いてMMN生物学を調べるために、補体調節因子の発現を評価した。それゆえ、sNF02.2シュワン細胞を培養し、発現マーカーのFACS染色を行った。結果は、図2に示されており、かつ下の表8にまとめられている。

表8: sNF02.2シュワン細胞上での補体調節タンパク質の発現

【表8】

名前	マーカー	シュワン細胞
MCP	CD46	++
DAF	CD55	++
プロテクチン	CD59	+++
CR1	CD35	-
C5aR	CD88	-
C3aR		+
GM1		++
MAG		+
FcyRI	CD64	++

10

【0145】

これらの結果は、補体調節タンパク質(CD46、CD55、及びCD59)は、末端経路の重要な調節因子CD59の高発現を伴って、シュワン細胞で発現されることを明らかにしている。シュワン細胞での高CD59発現により、補体媒介性溶解は、MACの形成が阻害されるため、これらの細胞で制限されることが示唆される。実際、炎症は、細胞シグナル伝達を通じて神経区画で誘導される。また、シュワン細胞は、食細胞クリアランスに参与するFcγ受容体1(CD64)の発現を示した。シュワン細胞でのCR1発現が髄鞘形成開始とともに起こり、これらの培養sNF02.2シュワン細胞がミエリンを欠くので、CR1(CD35)の検出は認められなかった(Terenghi Fらの文献、Neurology, 2004, 62: 666-668)。C3aRのみが低発現を示し、C5aRは存在しなかった。結論として、シュワン細胞は、CD59を高発現しており、神経区画内の炎症を誘発する亜溶解性のMAC形成を示唆している。

20

【0146】

補体媒介性溶解に対するシュワン細胞上の補体調節タンパク質(CRP)の感受性を調べるために、sNF02.2細胞を、CD59を含むグリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質を切り離す様々な濃度のホスホリパーゼ-C(PL-C)で処理した(Fitzpatrick A、Mann Cらの文献、J Peripher Nerv Syst, 2011, 16(2): 84-91)。結果は、図3に示されており、両方のCRPの発現レベルがPL-C処理によって減少したので、CD55とCD59の両方が補体媒介性溶解に感受性があることを示している。

30

【0147】

(1.6 補体媒介性細胞溶解に対するシュワン細胞の抵抗性)

先の実験により、シュワン細胞(sNF92.2及びsNF02.2)でのCD59及びCD55の高発現が示された。この発現の機能的な意味合いを調べるために、CD59及びCD55を有する又は有さないsNF96.2シュワン細胞上への抗GM1媒介性のC3及びMAC固定を評価した。また、細胞生存に対する補体活性化の効果を調べた。このために、シュワン細胞を培養し、さらなる実験解析のためにv-底プレートに移した。CD59及びCD55などのGPI結合タンパク質を細胞表面から除去するために、ホスホリパーゼC(PL-C)による処理が一般に使用される。実際、PL-C処理は、CD46及びGM1の表面発現が影響を受けない状態にしながら、CD59及びCD55の除去をもたらした(図4A)。C3及びMAC固定に対する感受性に対するPL-C処理の効果を評価するために、シュワン細胞を、抗GM1抗体を含有するMMN患者血清、又は対照としてのベロナール緩衝液(VB)でオプソニン化した(RTで1時間)。次に、細胞を5%補体活性血清又は480 µg/mlのARGX-117とともに37℃で1時間ブレインキュベートした5%補体活性血清とともにインキュベートした。最後に、それぞれ、C3及びMACに対

40

50

するビオチン標識抗体を用いて、C3及びMAC固定を検出し、APCコンジュゲートストレプトアビジンにより染色した。結果は、図4Aに示されており、これにより、C3固定が、非PL-C処理シュワン細胞におけるVBのみによるオプソニン化と比較して、MMN-05血清によるオプソニン化の後にわずかに増大したことが明らかにされている。しかしながら、ARGX-117は、両方の条件においてC3固定を完全に阻害した。VB対照における古典経路媒介性補体活性化は、おそらくは、補体活性血清中に存在する抗体(例えば、抗HLA抗体)によって引き起こされる。PL-C処理によって、C3固定の増大が観察され、ARGX-117は、PL-C処理細胞上でMMN-005血清によって誘導されるC3固定を、完全にではないが、確かに阻害した(図4B)。この条件では、高いオプソニン化密度がGM1に対するIgM抗体及び非GM1標的に対するIgM/IgG抗体によって予想及び到達され、mCRPの欠如が原因で強い補体活性化において調節する。同様の観察は、MAC固定についても見られ、この場合、未処理の細胞は、低レベルのMAC固定を示し、これもMMN-005血清によるオプソニン化の後にわずかに増大した。PL-C処理は、MMN-005血清によるオプソニン化の後にMAC固定の増大をもたらした、これは、ARGX-117によって阻害された(図4C)。最後に、補体媒介性細胞傷害性(CDC)の誘導を評価するために、生存率を、アネキシン-Vと組み合わせた7AADで染色することにより測定し、二重陽性細胞を後期アポトーシス/死とみなした。正常レベルの補体調節タンパク質を発現する細胞を使用すると、MMN-005血清によるオプソニン化の後でさえ、CDCは検出されなかった。しかしながら、PL-C処理は、MMN-05オプソニン化細胞におけるアポトーシスを増大させ、ARGX-117の添加は、補体媒介性溶解からの完全な保護をもたらした(図4D)。結論として、シュワン細胞は、CD59及びCD55の高い発現レベルのために、補体媒介性溶解から本質的に保護される。mCRPの非存在下では、ARGX-117によって(一部)予防することができるCDCが検出された。

【0148】

(1.7 シュワン細胞を用いる補体活性化の検出)

生きたシュワン細胞での補体活性化を調べるために、細胞を96-ウェルV-底プレート(50,000細胞/ウェル)に移し、抗HLA抗体(W6/32 - BioLegend;カタログ番号311402)で、RTで30分間オプソニン化した。次に、補体活性血清(EDTA、MgEGTA、又はTNT009のいずれかとともにRTで15分間プレインキュベートしたもの)を5%血清の最終濃度で細胞に添加した。1時間のインキュベーションの後(37℃)、細胞を96-ウェルV-底プレートに移し、染色(45分、氷)後、C3固定を測定した。結果は、図5に示されている。

【0149】

これらの結果は、5%HPS(ヒトブール血清)による補体の活性化後のC3固定を示している。さらに、EDTA(10mM)又はTNT009(480mg/mL)の添加後、C3固定が基本レベルにまで減少したので、C3固定は補体特異的であった。さらに、C3は、MgEDTAの存在下でも遮断され、それが、主に代替補体経路を介して生じるということを否定した。注目すべきことに、C3固定は、W6/32によるオプソニン化とは無関係であった。

【0150】

(1.8 培養シュワン細胞に対するMMN患者由来自己抗体の結合)

IgM抗GM1抗体の病原性を決定する前に、これらの抗体のインビトロでのヒトシュワン細胞への結合を調べた。このために、sNF02.2シュワン細胞を培養し、96-ウェル丸底プレート(50,000細胞/ウェル)中の50µLのsNF02.2培養培地に移した。次に、細胞をコレラ毒素B-AF488で染色して、GM1発現を検出した。図6Aに示されている結果は、インビトロ培養したヒトsNF02.2シュワン細胞がGM1を発現することを示している。さらに、MMN患者血清(GM1に対する自己抗体を含有する)とのインキュベーションは、より高い抗GM1発現をもたらした、より重要なことに、シュワン細胞へのIgM結合は、MMN患者血清によるオプソニン化の後に検出された(図6B)。広範囲のIgM抗GM1抗体力価を有するMMN患者の様々な血清を調べ、全てがシュワン細胞へのIgM結合を示した。さらに、シュワン細胞でのIgM結合の力価効果を調べた全ての患者血清について検出した(図7)。

【0151】

次に、シュワン細胞での患者IgM抗GM1抗体の補体活性化能力を評価した。このために

、ヒトsNF02.2シュワン細胞を96-ウェルv-底プレート(50,000細胞/ウェル)に移し、MMN患者血清でオプソニン化した(1時間、RT)。次に、補体活性血清を添加した後(1時間、37°C)、FITCコンジュゲート抗体を用いて、C3を検出した。

【0152】

最初は、使用された抗体によるC3検出が不十分なため、限られたC3固定しか観察されなかった。それゆえ、C3検出を高めるために及びバックグラウンドの補体活性化を低下させるために、様々なアプローチを使用した。まず、様々なパーセンテージの補体活性血清を試験し(10%、5%、及び2.5%)、200 µg/mLの抗C5 mAb(1時間、37°C)とともにブレインキュベートして、末端補体経路活性化を妨げ、それにより、sNF02.2シュワン細胞の溶解を妨げた。補体バックグラウンドを低下させるために、除去血清(=シュワン細胞上で、4°Cで4×10分間インキュベートして、血清内の抗体を除去した補体活性血清)を使用する条件も試験した。

【0153】

図8A及び8Bに示されている結果は、補体活性血清(黒色の棒)と除去血清(灰色の棒)の間で差異がないことを示しており、血清中に依然として存在する抗体が、補体活性化、したがって、C3固定に寄与しなかったことを示唆している。EDTA(白色の棒)を対照として使用した。しかしながら、オプソニン化なしとオプソニン化ありのウィンドウが最大であったので、5%補体活性血清の使用は最適であると思われる。次に、様々な抗C3抗体を、検出ウィンドウを増大させるために試験した。結果は、図8Cに示されている。これにより、シュワン細胞でのC3固定を検出するビオチン化抗C3(LSBio、クローン6C9)を用いて、10%~25%ウィンドウの改善が示された。

【0154】

したがって、シュワン細胞でのC3固定の最適な検出は、補体活性血清を5%の最終濃度で、かつLSBio製のビオチン化抗C3検出抗体(クローン6C9)とともに使用したときに観察された。結論として、C3固定は、MMN患者血清によるオプソニン化の後のシュワン細胞で検出される。これにより、MMN患者血清中に存在するIgM抗GM1抗体が古典補体経路を活性化することができることが示された。

【0155】

(1.9 C2依存性)

MMNの発病における補体因子C2の重要性を確認するために、C2依存性を評価した。sNF02.2シュワン細胞をMMN患者血清でオプソニン化し、増加していく濃度の組換えヒトC2、rhC2(U-protein express;カタログ番号: C001、1987)で再構成されたC2除去血清(Complement Technology;カタログ番号A312)に供して、C3固定を評価した。結果は、図9に示されている。これにより、C2除去血清のみで比較的高い平均蛍光強度(MFI)値が得られ—MFIシグナルがEDTA対照と比較してより高く、小さい実験ウィンドウが得られることが明らかになった。それにもかかわらず、30 µg/mLのrhC2で再構成された血清は、シュワン細胞でのC3固定を回復させ、正常レベルにまで戻した。さらに、C3固定は、生理的C2レベルの20~40%に相当する約5~10 µg/mLのrhC2で回復した。これらの結果は、低レベルのC2がC3固定も補体活性化ももたらさないことを示している。

【0156】

(1.10 sNF02.2シュワン細胞でのC3固定の阻害におけるARGX-117の効力)

補体因子に対する様々な阻害性モノクローナル抗体が作製されており、そのうちのいくつかは、臨床用途で認可されている。例えば、TNT009(BIVV009)は、古典補体経路を特異的に遮断する抗C1sヒト化抗体であり(Jager U, D'Saらの文献、Blood, 2019, 133(9): 893-901)、一方、OMS646は、MASP-2を標的とし、それにより、レクチン経路を遮断する。エクリズマブはC5を阻害し、それにより、3つ全ての経路によって誘導されるMAC沈着を遮断する(Brodsky R, Young Nらの文献、Blood, 2018, 111: 1840-1847)。

【0157】

ARGX-117は、C2を標的とするモノクローナル抗体であり、古典経路及びレクチン経路を阻害する一方、代替経路を無傷のままにするので、独特である。上の結果は、MMN患者

由来の血清中のIgM抗GM1自己抗体がsNF02.2シュワン細胞に特異的に結合することができることを示している。さらに、この自己抗体は、補体カスケードを活性化し、シュワン細胞でのC3固定をもたらすことができる。この抗体の治療能力を評価するために、MMN血清によって媒介されるC3固定に対するARGX-117の効果を検討した。このために、シュワン細胞を培養し、v-底プレート(50,000細胞/ウェル)に移し、MMN患者血清でオプソニン化し(1時間、RT)、その後、補体遮断抗体又はEDTAとともにプレインキュベートされた(20分、RT)5%補体活性血清とともにインキュベートした。シュワン細胞をC3-BIO(LS Bio、クローン6C9)及びストレプトアビジン-APCで染色することにより、C3固定の検出を実施した。結果は、図10に示されている。

【0158】

これらの結果は、C3固定がARGX-117とTNT009の両方によって用量依存的に阻害されることを明らかにした。しかしながら、両方の抗体の阻害は、EDTA対照には届かなかった。TNT009は、最大53 µg/mLまでC3固定を遮断することができたが、同程度遮断するのにより高濃度のARGX-117が必要であった(160 µg/mL)。重要なことに、抗C5は、細胞に添加されず、これは、以前に、C3固定を検出することができるよう末端補体経路を遮断するために行われた。驚くべきことに、細胞は溶解されず、細胞が、おそらくは、シュワン細胞でのCD59の高発現のために、補体媒介性溶解から本質的に保護されることを意味する。結論として、ARGX-117は、シュワン細胞でのC3固定を用量依存的に遮断することができ、これらの細胞は、補体媒介性溶解から本質的に保護される。

【0159】

(1.11 サイトカイン分泌アッセイ)

MMN患者における神経損傷の起源に関する病態生理を解明するために、補体媒介性サイトカイン産生を測定した。シュワン細胞を24-ウェルプレートに播種し(10,000細胞/ウェル)、MMN患者血清でオプソニン化し(1時間、RT)、補体活性血清を補体遮断抗体の存在下又は非存在下で添加した。48時間後、上清を回収し、Luminexプラットフォームを用いてサイトカイン分泌を測定した。結果は、図11に示されており、IL1-β又はTNF-αによるシュワン細胞の刺激がIL-6、IL-8、及びMCP-1の分泌の増加をもたらすことを示している。MMN患者血清では、IL-6の上昇もIL-8の上昇も観察されなかった。それにもかかわらず、MMN患者血清とともにインキュベートされた細胞におけるMCP-1レベルは、対照と比べて2倍増加した(図11C)。この増加は、ARGX-117又はTNT009を添加によって遮断することができたが、エクリズマブは、MCP-1分泌を一部しか遮断することができなかった。

【0160】

MCP-1は、炎症性免疫細胞、単球、及びマクロファージの感染部位への動員において役割を果たし、神経変性によって特徴付けられる神経炎症プロセスを含む、いくつかの疾患の発病にも関与する。例えば、MCP-1の循環レベルは、GBS進行時に増大する(Orlikowskiらの文献、J of neuroimmunol, 2003, 134(118-27))。結論として、MCP-1は、MMN患者血清によるオプソニン化及びその後の補体活性化の後に、sNF02.2シュワン細胞によって産生される。ARGX-117は、MCP-1産生を遮断することができた。

【0161】

(C. 結論)

sNF02.2シュワン細胞を用いて、補体系の調節を評価した。データにより、シュワン細胞が高レベルの補体調節タンパク質CD46、CD55、及びCD59を発現することが示されている。さらに、MMN患者由来のIgM抗GM1抗体が古典補体経路を活性化すること、及びC3固定が検討されたMMNモデル系でC2の存在に依存するということが示された。ARGX-117は、抗GM1抗体で感作されたsNF02.2細胞で補体活性化を効率的に遮断した。

【0162】

これらの結果は、抗GM1自己抗体によって誘発される補体事象がMMN患者における病理に寄与する新しいメカニズムを示唆している。これは、図12で模式的に示されている。IgM抗GM1自己抗体は、古典補体経路を活性化するが、シュワン細胞でのCD59の高発現

10

20

30

40

50

のために、溶解性MACは形成されない。それゆえ、直接的な補体依存性細胞傷害性(CDC)は、この条件下で神経損傷に寄与する可能性の低いメカニズムである。しかしながら、垂溶解性MAC複合体形成は、炎症性メディエータの産生及び分泌を誘導し得る細胞活性化を引き起こすと記載されている。本研究において、sNF02.2細胞によるケモカインMCP-1の補体依存的産生が観察された。抗C5であるエクリズマブは、試験された2つのMMN血清のうちの1つでMCP-1分泌を阻害することができなかった。これは、sNF02.2細胞によるMCP-1分泌が垂溶解性MAC形成の上流のメカニズムによって誘発されることを示唆している。

【0163】

抗GM1抗体による補体活性化は、C3aRを介するサイトカイン及び/又はケモカインの放出を誘導する可能性が高く、これは、これらの細胞で発現されることが分かった。これらのケモカイン、例えば、MCP-1は、炎症細胞の誘引において役割を果たし、さらなる神経機能不全及び損傷をもたらし得る。ここで、シュワン細胞での抗GM1抗体による補体活性化は、MCP-1分泌をもたらし、これは、ARGX-117によって阻害され、この抗体の考えられる治療メカニズムを示唆している。結論として、MMN患者における神経破壊及び脱髄の病態生理は、MAC形成の上流で起こるように思われ、これにより、MACの上流の補体カスケードの構成要素がこの疾患を治療するための興味深い治療標的になる。ARGX-117は、C2補体タンパク質を標的とし、したがって、この適応症を治療するための好適な分子の例となる。

【0164】

(実施例2 固定されたシュワン細胞を用いる多巣性運動ニューロパチー(MMN)のインビトロモデルにおける補体阻害)

(A.方法)

(2.1 カバーガラス上でシュワン細胞を培養及び固定するためのプロトコル)

シュワン細胞を、100U/mLのペニシリン、100µg/mLのストレプトマイシンを備え、かつ10%FCSが補充されたDMEM培地中、37°C、5%CO₂で培養した。週に2回、コンフルエンスが>80%に達したとき、細胞を継代するか又は実験で使用した。培地を廃棄し、細胞を10mlのPBSで洗浄した。細胞を解離させるために、3mL(T75)又は5mL(T175)のAccutase細胞剥離溶液を添加し、細胞を37°Cで5分間又は細胞が完全に剥離するまでインキュベートした。その後、培養培地(T75に7mL及びT175に10mL)を添加し、細胞を15mLチューブに移した後、遠心分離した(125×g、10分)。ペレットを5mlの培養培地に再懸濁させ、生細胞と死細胞を識別するために、トリパンブルーを用いて計数した。次に、細胞を所望の濃度に調整し、培養フラスコに播種するか(T75中10mL、T175中20mL)又は24-ウェルプレート中に置かれたカバーガラス上に播種した。

【0165】

(2.2 ARGX-117のインビトロ評価のためのプロトコル)

sNF02.2シュワン細胞を、カバーガラス上、37°C、5%CO₂で3日間培養した。細胞を4%PFA(4°Cで10分)を用いて固定し、500µLのPBSで1回洗浄し、カバーガラスを24-ウェルプレートから取り出した。非特異的染色を最小限に抑えるために、細胞を100µLのNH₄Clを用いてRTで5分間クエンチングし、100µLのPBSで1回洗浄し、その後、100µLのPBS+2%BSAで、RTで2時間ブロッキングした。100µLのPBSで洗浄した後、細胞を、PBS+2%BSAに1:50希釈した熱非働化MMN患者血清とともに下向きにして60分間インキュベートした。次に、細胞を1回洗浄し(500µLのPBS+2%BSA)、15%補体活性血清(補体遮断抗体とのプレインキュベーションあり/なし)とともに、下向きにしてRTで30分間インキュベートし、1回洗浄した(100µLのPBS+2%BSA)。その後、細胞を100µLの一次抗体(PBS+2%BSAに希釈)で染色し、下向きにしてインキュベートした後(1時間、RT、暗所)、100µLのPBS+2%BSA中で洗浄した。次に、細胞を、100µLのストレプトアビジン-APC(PBS+2%BSAに1:100希釈)とともに、下向きにしてRT、暗所で1時間インキュベートし、その後、100µLのPBSで1回及び100µLのMilliQ水で1回洗浄した。ティッシュの上でカバーガラスを乾燥させた後、DAPIを含む7µLのProLong(商標) Dia

mond Antifade Mountantをカバーガラス上にピペッティングし、4℃で一晩乾燥させた後、マニキュア液で固定した。Colibri LED付きのZeiss Z1顕微鏡を以下の設定で用いて、細胞を解析した：40倍の倍率、25%LED、Alexa Fluor(商標)488チャンネルの場合は400ms、APCチャンネルの場合は100ms、及びDAPIチャンネルの場合は50ms。染色に使用された抗体は、下の表9に示されている。

表9 染色抗体

【表9】

抗体	標識/ 蛍光色素	会社	カタログ番号	相似比
ポリクローナルヤギ抗 ヒトC4	ビオチン	MyBioSource	MBS560216	1:100
ポリクローナルヒツジ 抗ヒトC3 ⁽¹⁾	ビオチン	MyBioSource	MBS560642	1:100
抗C5b-9 ⁽²⁾	ビオチン	Novus Bio	NBP2-23494	1:500
ストレプトアビジン	APC	ThermoFisher eBioscience(商標)	17-4317-82	1:100
コレラ毒素サブユニットB	Alexa Fluor(商標)488	ThermoFisher	C34775	1:500
抗ヒトC3クローン9	ビオチン	Sanquin	MW1830	1:100
抗ヒトC3クローン28	ビオチン	Sanquin	MW1860	1:100
ヤギ抗ヒトIgMμ- 鎖	ビオチン	Sigma Aldrich	B1265	1:300
CD46	APC	ThermoFisher	A157711	1:50
CD55	APC	BioLegend	311312	1:25
CD59	APC	Life technologies	17-0596-42	1:50
ヤギ抗マウス IgG	AF647	Invitrogen	A21235	1:400
GM1	AF488	Invitrogen	C34775	1:500

(1)ヒトC3aとC3bの両方と反応する

(2)抗C5b-9クローンaE11は、TCCに取り込まれたときにC9上に露出するネオエピトープに対するものである。

【0166】

(B.結果)

固定されたシュワン細胞を用いて行われた実験について、生きたシュワン細胞を用いて上の実施例1で報告されたものと非常によく似た結果が観察された。

【0167】

(2.3 補体受容体の発現)

sNF02.2シュワン細胞を培養し、カバーガラス上に固定した後、発現マーカーについて染色した。結果は、下の表10に示されており、これにより、全ての補体調節タンパク質がシュワン細胞で発現されることが明らかになっている。CD59が高発現されており、CD59は末端経路の重要な調節因子であるので、運動ニューロンがMAC媒介性溶解から保護されることが示唆される。CD46、CD55、及びC3aRは、シュワン細胞での中等度の発現を示し、一方、C5aRは、シュワン細胞の細胞体で高発現されていた。CD35、CD11b、及びCD11cは全て、シュワン細胞に存在しなかった。

表10 固定されたシュワン細胞での補体調節タンパク質の発現

10

20

30

40

50

【表 10】

マーカー	名前	シュワン細胞 (固定)
CD46	MCP	++
CD55	DAF	++
CD59	プロテクチン	+++
CD35	CR1	-
CD88	C5aR	++
C3aR		+
GM1		++
CD11b	CR3	-
CD11c	CR4	-

10

【0168】

(2.4 固定されたシュワン細胞へのMMN患者由来自己抗体の結合)

固定されたシュワン細胞へのMMN患者由来自己抗体の結合を調べ、上の実施例1.8で報告されているものと同様の結果が観察された。

【0169】

sNF02.2シュワン細胞を1mLのsNF02.2培養培地中のカバーガラス上で3日間培養し(50,000細胞/カバーガラス)、その後、4%PFAで固定した。次に、カバーガラスをPBS中で洗浄し、NH₄Cl₄でクエンチングし(5分、RT)、その後、PBS-2%BSAで2時間ブロッキングした。GM1発現を検出するために、コレラ毒素B-Alexa488による染色を行った。結果は、インビトロ培養したヒトsNF0.2.2シュワン細胞だけでなく、神経芽腫由来マウスN2a細胞もGM1を発現することを示した。

20

【0170】

MMN患者血清とのインキュベーションは、IgM染色と共局在する顕著な抗GM1染色を生じさせた。広範囲のIgM抗GM1抗体力価を有するMMN患者の様々な血清を調べ、全てがシュワン細胞へのIgM結合を示した。さらに、過剰量の可溶性非標識コレラ毒素がMMN血清由来IgM抗体の結合を妨害したので、ヒトシュワン細胞へのIgM抗体の結合は、GM-1特異的であった。100 µg/mLの非標識コレラ毒素とのプレインキュベーションは、コレラ毒素とGM1ガングリオシドに対する抗GM1抗体との間の結合の競合により、シュワン細胞への抗GM1抗体結合を効率的に妨げた。

30

【0171】

シュワン細胞に対する患者IgM抗GM1抗体の補体活性化能力を評価した。このために、ヒトシュワン細胞をMMN患者由来の熱非働化血清(自己反応性IgM抗GM1抗体を含む)及び外部からの補体供給源として機能するHPS(ヒトプール血清)とともにインキュベートした。特異的抗体を用いて、補体因子の沈着、例えば、C4及びC3形成を決定した。結果は、C4固定がシュワン細胞で検出され得ることを示し、これは、抗GM1力価と相関していた。しかしながら、高IgM抗GM1力価は、必ずしも高いC4沈着と関連するとは限らなかった。

【0172】

C3の検出を評価し、カバーガラスを様々な抗C3抗体で染色した。その後、様々なMMN患者血清でオプソニン化したシュワン細胞は、これらの細胞でのC3固定を示した。しかしながら、高抗IgM GM1力価は、必ずしも高いC3沈着と相関するとは限らなかった。EDTA対照は全て、陰性であった。

40

【0173】

下の表11は、様々なMMN患者試料の様々な補体因子発現レベルをまとめたものである。
表11:様々なMMN患者試料のC3及びC4固定

50

【表 1 1】

患者	抗IgM GM1力価*	C3 固定	C4 固定
MMN-005	1:800	高	高
MMN-014	1:0	低	低
MMN-017	1:800	低	低
MMN-024	1:6400	中/高	高
MMN-035	1:100	低/中	低
MMN-042	1:1600	中	高
MMN-052	1:25600	低	低/中
MMN-073	1:25600	中/高	高

10

*GM1 ELISAに基づいて決定された

【0 1 7 4】

結論として、C4及びC3固定を、MMN患者血清によるオプソニン化の後に、固定されたシュワン細胞で検出した。これは、MMN患者由来のIgM抗GM1抗体が古典補体経路を活性化することができることを示している。

【0 1 7 5】

(2.5 C2依存性)

MMNの発病における補体因子C2の重要性を確認するために、C2依存性を評価した。それゆえ、シュワン細胞をC2除去血清でオプソニン化し、増加していく濃度の精製ヒトC2(hC2)で再構成して、C3形成を評価した。結果は、C2除去血清ではC3固定がないことを明らかにした。しかしながら、C2の添加により、濃度依存的な様式でC3固定が回復した。興味深いことに、C3固定を遮断するために、C2の完全な遮断は必要なく; 4.58 µg/mLのhC2(生理的レベルの約20%)で、ほとんどC3形成を示さなかった。

20

【0 1 7 6】

まとめると、C3固定は、C2の存在に依存的であった。古典補体経路を遮断し、それにより、シュワン細胞でのC3形成を妨げるために、C2の完全な阻害は必要でなかった。

【0 1 7 7】

(2.6 固定されたシュワン細胞に対するARGX-117の効力)

シュワン細胞をカバーガラス上で3日間培養した後、固定した。その後、細胞を洗浄し、クエンチングし、ブロッキングし、その後、患者血清でオプソニン化した。その後、細胞を、様々な補体遮断抗体又はIVIgの存在下又は非存在下、補体活性血清とともにRTで20分間インキュベートした。最後に、細胞を染色し、40倍の倍率を用いてイメージングした。

30

【0 1 7 8】

シュワン細胞でのC4固定は、TNT009(200 µg/mL)及び12.5mg/mLのIVIg処理によって阻害された。

【0 1 7 9】

C3阻害がどちらも200 µg/mLで使用されたARGX-117及びTNT009で観察されたのに対し、予期した通り、エクリズマブでもOMS646でも、効果が見られなかった。12.5mg/mLの濃度のIVIgのみが、シュワン細胞でのC3固定の部分阻害を示した。したがって、高濃度(200 µg/mL)の補体阻害性抗体は、MMNのこのインビトロ疾患モデル系でC4及びC3固定を遮断することができた。

40

【0 1 8 0】

抗補体抗体の示差効果を決定するために、力価測定を行い、下流の補体事象を解析した。固定されたシュワン細胞をMMN患者血清でオプソニン化し、15 µg/mLから始めて、最大480 µg/mLまで増加していく濃度の補体遮断抗体(TNT009、エクリズマブ、及びARGX-117)の存在下で、補体を活性化した。エクリズマブはC3の下流を阻害するので、結果は、エクリズマブによるC3固定に対する阻害効果を示さなかった。ARGX-117は、約30 µg/mLの濃度までC3固定の完全な阻害を示した。

50

【0181】

(C.結論)

ヒトC2bを標的とするARGX-117の補体阻害効果を、固定されたシュワン細胞を使用し、それにより、MMNの病態生理を模倣するインビトロモデルで評価した。データは、シュワン細胞が、高レベルの補体調節タンパク質CD46、CD55、及びCD59を発現したことを示している。さらに、MMN患者由来のIgM抗GM1抗体が古典補体経路を活性化すること及びC3固定がMMNモデル系ではC2の存在に依存することが示された。ARGX-117は、補体活性化を効率的に遮断し、エクリズマブとTNT009の両方よりも優れていた。

【0182】

(実施例3 誘導多能性幹細胞(iPSC)を用いる多巣性運動ニューロパチー(MMN)のインビトロモデルにおける補体阻害)

(A.方法)

(3.1 iPSCからの脊髄運動ニューロンの分化のためのプロトコル)

誘導多能性幹細胞(iPSC)由来の運動ニューロン様細胞(MN)を、文献(Harschnitz 0らの文献、J Clin Immunol. 2014, Jul;34 Suppl 1:S112-9)に記載されているように、かつDepartment of Neurology, UMCU, The NetherlandsのL van der Pol博士及び共同研究者らと提携して調製した。簡潔に述べると、ヒト線維芽細胞を、施設内審査委員会によって承認されたプロトコルの下で、健常個体由来の皮膚生検から取得した。これらの細胞を、10%胎仔ウシ血清及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンが補充されたDMEM GlutaMAXを含有するマウス胚性線維芽細胞(MEF)培地中、37℃、5%CO₂で培養した。細胞を、以下のプロトコルに従って、最初の5回の継代以内にリプログラミングした。ヒト線維芽細胞をウェル当たり10,000細胞の密度で6-ウェルディッシュにプレーティングし、MEF培地中で24時間培養した。その後、MEF培地、4mg/mLの臭化ヘキサジメトリン、並びにOct4、Klf4、Sox2、及びc-Mycを発現するレンチウイルスベクターを含有する混合物中で、ウイルスによる形質導入を行った。24時間のインキュベーションの後、細胞をPBS、pH 7.4で3回洗浄し、MEF培地中でさらに5日間培養した。その後、細胞をトリプシン-EDTAとともにインキュベートし、0.1%ゼラチンが予めコーティングされ、かつMEF中に放射線照射MEFのコンフルエントな層を含有する10cmディッシュに移した。培養培地を、DMEM-F12、ノックアウト血清代替物、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸、β-メルカプトエタノール、及び20ng/mLの組換えヒト線維芽細胞成長因子-ベシックを含有するヒト胚性幹細胞(huES)培地に交換した。3～6週間後、さらなる拡大及び特徴解析のために、iPSCのコロニーを手作業で拾った。iPSCをhuES培地中で維持し、4～6回の継代の後に凍結保存し、液体窒素中で保存した。iPSCをhuES培地中の放射線照射MEF上で培養し、手作業で継代した。iPSCのフィーダー培養をGeltrex上で行い、mTeSR1培地中で維持した。フィーダーフリー培養したiPSCを、Accutaseを用いて酵素的に継代した。

【0183】

(3.2 ARGX-117のインビトロ評価のためのプロトコル)

iPSCを、カバーガラス上、37℃、5%CO₂で、MNの方向に12～14日間培養した。次に、4%PFAを用いてiPSC-MNを固定し(4℃で10分)、500μLのPBSで3回洗浄し、カバーガラスを24-ウェルプレートから取り出した。非特異的染色を最小限に抑えるために、及び固定剤を中和するために、細胞を100μLの50mM NH₄Clを用いてRTで5分間クエンチングし、PBSで1回洗浄し(洗浄工程は全て、カバーガラスを浸漬させることによる)、その後、100μLのPBS+2%BSAで、RTで2時間ブロッキングした。PBSで洗浄した後、細胞を、PBS+2%BSAに1:50希釈した熱非働化MMN患者血清とともに、下向きにして60分間インキュベートした。次に、細胞をPBS中で1回洗浄し、15%補体活性血清(補体遮断抗体とのプレインキュベーションあり/なし)とともに、下向きにしてRTで30分間インキュベートし、PBS中で1回洗浄した。その後、細胞を100μLの一次抗体(PBS+2%BSAに希釈)で染色し、下向きにしてインキュベートした後(1時間、RT、暗所)、PBS中で洗浄した。次に、細胞を、100μLのストレプトアビジン-APC(PBS+2%BSAに1:100希釈)とと

もに、下向きにしてRT、暗所で1時間インキュベートし、その後、PBSで1回及びMilliQ水で1回洗浄した(同じく、カバーガラスを浸漬させる)。ティッシュの上でカバーガラスを乾燥させた後、DAPIを含む7 μ LのProLong(商標) Diamond Antifade Mountantを対物ガラス上にピペティングし、カバーガラスを下向きにして液滴上に置き、RTで一晩乾燥させた後、マニキュア液で固定した。Colibri LED付きのZeiss Z1顕微鏡を以下の設定で用いて、細胞を解析した:(別途示されない場合)40倍又は20倍の倍率(実験に合わせる)、25%LED、Alexa Fluor(商標)488チャンネルの場合は400ms、APCチャンネルの場合は100ms、及びDAPIチャンネルの場合は50ms。カバーガラス全体にわたって条件毎に4枚の写真を撮影した。写真は全て、陽性対照及び陰性対照に対して正規化し、ZEN 2012ソフトウェアを用いて、単一及び合成チャンネルで非圧縮8ビットTIFF形式にエクスポートした。各々の単一チャンネルの平均グレー値をImageJ(Fiji)で計算した。比をMicrosoft Excel 2010で計算し、GraphPad Prism 7を用いて可視化した。染色に使用された抗体は、下の表12に示されている。

表12 染色抗体

【表12】

抗体	標識/ 蛍光色素	会社	カタログ番号	相似比
ポリクローナルヤギ抗ヒトC4	ビオチン	MyBioSource	MBS560216	1:100
ポリクローナルヒツジ抗ヒトC3 ⁽¹⁾	ビオチン	MyBioSource	MBS560642	1:100
抗C5b-9 ⁽²⁾	ビオチン	Novus Bio	NBP2-23494	1:500
ストレプトアビジン	APC	ThermoFisher eBioscience(商標)	17-4317-82	1:100
コレラ毒素サブユニットB	Alexa Fluor(商標)488	ThermoFisher	C34775	1:500
抗ヒトC3クローン9	ビオチン	Sanquin	MW1830	1:100
抗ヒトC3クローン28	ビオチン	Sanquin	MW1860	1:100
ヤギ抗ヒトIgM μ 鎖	ビオチン	Sigma Aldrich	B1265	1:300
CD46	APC	ThermoFisher	A15711	1:50
CD55	APC	BioLegend	311312	1:50
CD59	APC	Life technologies	17-0596-42	1:50
ヤギ抗マウス IgG	AF647	Invitrogen	A21235	1:400
GM1	AF488	Invitrogen	C34775	1:500
CD35	APC	BD	565329	1:50
CD11b	APC	Invitrogen	17-0118-42	1:50
CD11c	APC	BD	333144	1:50
C3aR	APC	Biolegend	345805	1:50
C5aR	FITC	GeneTex	GTX75734	1:50
ポリクローナルウサギ抗ヒトIgM		Dako	A0425	1:1000
ポリブタ抗ウサギ Ig	HRP	Dako	P0217	1:10000

(1)ヒトC3aとC3bの両方と反応する

(2)抗C5b-9クローンaE11は、TCCに取り込まれたときにC9上に露出するネオエピトープに対するものである。

【0184】

(3.3 ELISAを用いてGM1を決定するためのプロトコル)

NUNC maxisorpプレートを、メタノール中、GM1(5 μ g/mL)でコーティングした。メタノールを層流キャビネット内で+/-2,5時間蒸発させた。その後、ウェルを200 μ Lの1%BSA-PBSで、RTで2時間ブロッキングした。MMN患者血清を1%BSA-PBS(いずれもIVIgとともにプレインキュベートしたもの)に希釈し、100 μ Lを各々のウェルに添加し、その後、4°CでO/Nインキュベーションした。次に、プレートをPBSで6回洗浄し、その後、ヒトIgMを検出する一次抗体とともに1%BSA-PBS中で(RTで1時間)インキュベートした。P

BSによる6回の洗浄工程の後、ウェルを100 μ LのHRPコンジュゲート二次抗体とともにRTで1時間インキュベートした。PBSによる6回の洗浄工程の後、TMBを添加し、塩酸を用いて、反応を停止させた。プレートを、BioRad ELISAリーダーを用いて、415nmで解析した。

【0185】

(B.結果)

現在、MMNの動物モデルが利用できないので、MMN患者の抗GM1 IgM抗体の病原性を調べるために、MMNのインビトロモデルを開発した。簡潔に述べると、ヒト誘導多能性幹細胞を線維芽細胞から作製し、上記のように運動ニューロンへと分化させた。次に、これらの運動ニューロンを、パラホルムアルデヒド(PFA)を用いてカバーガラス上で固定し、NH₄Clでクエンチングした。その後、抗GM1 IgM自己抗体を含有するMMN患者血清を用いて、細胞を1時間オプソニン化し、これらの自己抗体のGM1への結合を可能にした。洗浄後、補体遮断抗体の存在下又は非存在下でヒトプール血清(HPS)を用いて、補体を30分間活性化した。最後に、細胞を補体因子に対する抗体で染色して、補体活性を評価した。これらの試験の結果は、以下に記載されている。

【0186】

(3.4 iPSC由来運動ニューロンでの補体受容体の発現)

MMNの病態生理における補体の役割をより良く理解するために、補体調節タンパク質及び補体受容体の発現をiPSC-MNで評価した。それゆえ、iPSC-MNを培養し、4%PFAを用いてカバーガラス上で固定した後、発現マーカーについて染色した。結果は、表13及び図13に示されている。

表13 iPSC-MN上での補体調節タンパク質の発現

【表13】

マーカー	名前	iPSC 由来運動ニューロン
CD46	MCP	++
CD55	DAF	++
CD59	プロテクチン	+++
CD35	CR1	+
CD88	C5aR	++
C3aR		++
GM1		+++
CD11b		-
CD11c		-

【0187】

これらの結果は、補体調節タンパク質(CD46、CD55、及びCD59)が全て固定された運動ニューロンで発現されることを明らかにしている。CD59は高発現しており、運動ニューロンがMAC媒介性溶解から保護されることを示唆している。CD46及びCD55は、細胞体に局在する中等度の発現を示した。C3RとC5Rはどちらも、運動ニューロンで発現し、C5aRは、細胞体でのみ発現し、神経突起では発現しない。CD11bとCD11cがどちらも存在しなかった一方で、CD35発現は低かった。

【0188】

(3.5 iPSC-MNへのMMN患者由来自己抗体の結合)

iPSC-MNへのIgM抗GM1抗体の結合をインビトロで調べた。このために、iPSC-MNを1200 μ Lの培養hMN培地中のカバーガラス上で12~14日間培養し(80,000~150,000細胞/13mmカバーガラス)、その後、4%PFAで固定した。次に、カバーガラスをPBS中で洗浄し、NH₄Cl₄でクエンチングし(5分、RT)、その後、PBS-2%BSAで2時間ブロッキン

グした。GM1発現を検出するために、コレラ毒素B-Alexa 488による染色を行った。結果は、iPSCに由来する運動ニューロンがGM1を発現し、MMN患者血清とのインキュベーションがIgM染色と共局在する顕著な抗GM1染色をもたらすことを示した。

【0189】

iPSC由来運動ニューロンでの患者IgM抗GM1抗体の補体活性化能力も評価した。このために、ヒトiPSC由来運動ニューロンをMMN患者由来の熱非働化血清(自己反応性IgM抗GM1抗体を含有)及び外部からの補体供給源として機能するHPSとともにインキュベートした。特異的抗体を用いて、C4及びC3などの補体因子の沈着を決定した。結果は、C4及びC3固定がiPSC-MNで検出され得ることを示した。しかしながら、高い抗IgM GM1力価は、高いC3沈着と必ずしも相関するとは限らなかった。結論として、C4及びC3固定は、MMN患者血清によるオプソニン化の後、固定されたiPSC-MNで検出された。これは、MMN患者由来のIgM抗GM1抗体が古典補体経路を活性化することができることを示している。

【0190】

(3.6 C2依存性)

MMNの発病における補体因子C2の重要性を確認するために、C2依存性を評価した。iPSC由来運動ニューロンをC2除去血清でオプソニン化し、増加していく濃度の精製ヒトC2(hC2)で再構成して、C3固定を測定することにより補体活性化を評価した。結果は、図14示されており、C2除去血清ではC3固定がないことを明らかにした。しかしながら、C2の添加により、濃度依存的な様式でC3固定が回復した。さらに、ARGX-117は、生理的量のhC2で再構成されたC2除去血清でC3固定を完全に阻害した。

【0191】

まとめると、C3固定は、C2の存在に依存的である。これは、hC2の存在下でC3固定を阻害するARGX-117の能力によって示される。古典補体経路を遮断し、C3形成を妨げるために、C2の完全な阻害は必要ないように思われる。

【0192】

(3.7 固定されたiPSC-MNでの補体固定を妨げるARGX-117の効力)

上の第1.9節に記載されているように、補体因子に対する様々な阻害性モノクローナル抗体が作製されており、そのうちのいくつかは、臨床応用が認可されている。これらの阻害性抗体の効果を固定されたiPSC-MNで調べた。このために、iPSC-MNをカバーガラス上で12~14日間培養した後、固定した。その後、細胞を洗浄し、クエンチングし、ブロッキングし、患者血清でオプソニン化した。その後、細胞を、様々な補体遮断抗体の存在下又は非存在下、補体活性血清とともにRTで20分間インキュベートした。最後に、細胞を染色し、40倍又は20倍の倍率を用いてイメージングした。

【0193】

予想通り、運動ニューロンでのC4固定は、TNT009(200 µg/mL)によって阻害され、他のmAbによっては阻害されなかった。

【0194】

C3阻害がどちらも200 µg/mLで使用されたARGX-117及びTNT009で観察されたのに対し、同じ濃度で使用されたエクリズマブ、OMS646、及びリツキシマブでは、効果が見られなかった。したがって、C2を遮断する高濃度(200 µg/mL)のARGX-117がMMNのこのインビトロ疾患モデル系で下流のC3固定を遮断することができた。

【0195】

抗補体抗体の示差効果を決定するために、力価測定を行い、下流の補体事象を解析した。固定されたiPSC由来運動ニューロンをMMN患者血清でオプソニン化した。3 µg/mLから始めて、最大200 µg/mLまで増加していく濃度の補体遮断抗体(TNT009、OMS646、及びARGX-117)とともにプレインキュベートした後、iPSC-MNに添加した。OMS646は、レクチン経路を阻害するので、結果は、OMS646によるC3固定に対する阻害効果を示さなかった。ARGX-117は、約12 µg/mLの濃度までC3固定の完全な阻害を示した。同じ結果は、TNT009で得られ、その場合、C3沈着も12 µg/mLまで遮断された。したがって、ARGX-117及びTNT009は、MMN患者血清でオプソニン化したiPSC由来運動ニューロ

ンでのC3固定の固定において同等にうまく機能した。

【0196】

(3.8 他の免疫媒介性ニューロパチーにおけるARGX-117による補体阻害)

自己免疫性末梢性ニューロパチーは、疾患重症度の運動及び/又は感覚症状によって特徴付けられる稀少かつ身体に障害を引き起こす臨床的に不均一な疾患群を表す。MMNにおいて、これらは、GM1を標的とする特異的なIgM抗体によって媒介される自己免疫反応性の直接の証拠である。最も一般的な障害としての慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(CIDP)及び最も急性の障害としてのギラン・バレー症候群(GBS)を含む、他の免疫媒介性ニューロパチーが同定されている。他の免疫媒介性ニューロパチーに対するARGX-117の治療効果を評価するために、上記のインビトロモデルを使用した。しかしながら、MMN患者血清でiPSC由来運動ニューロンをオプソニン化する代わりに、それぞれ、GBS及びCIDP患者由来の血清を使用した。結果は、図15に示されている。これにより、両方の患者血清中に存在する自己抗体は、運動ニューロンでのC3固定として測定される、補体を活性化することができ、これは、200 µg/mLのARGX-117の添加によって遮断されることが明らかになった。したがって、MMNに加えて、ARGX-117も、他の免疫媒介性ニューロパチーの疾患モデルで補体を遮断した。

【0197】

(3.9 インビトロMMNアッセイを用いた補体阻害に対するIVIgの効果)

IVIgは、様々な自己免疫疾患の治療に使用されることが多い生物学的薬剤である。MMNにおいて、IVIgは、FDAが承認した第一選択治療である。いくつかのメカニズムが、病原性免疫グロブリンの直接的な中和、FcR遮断、及びいくつかの免疫細胞の調節を含むIVIgによる免疫調節に関与している。IVIg中に存在するIgGがC3に結合し、それにより、C3を血清から除去し、末端補体経路を妨げるので、IVIgは、補体活性化の阻害にも作用する(Terenghi Fらの文献、Neurology, 2004, 62: 666-668; Fitzpatrick A, Mann Cらの文献、J Peripher Nerv Syst, 2011, 16(2): 84-91)。MMNにおいて、IVIgは、抗GM1-GM1複合体の病理学的沈着を低下させることが示されている(Bhatheja K, Fieldの文献、J. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(12):1995)。MMNの標準治療はIVIgである；しかしながら、この治療は、長期間にわたって投与される場合、有効ではない。それゆえ、iPSC由来運動ニューロンを使用するインビトロMMNモデルを用いて、IVIgの補体阻害効果を調べた。このために、iPSC由来運動ニューロンをカバーガラス上で培養し、固定し、MMN患者血清でオプソニン化した後、補体活性血清を添加して、補体カスケードを活性化した。2種類のIVIg(GammaQuin及びNanogam)を試験し、IVIg治療の様々なアプローチも同様に評価した。まず、50mg/mLのIVIgをオプソニン化工程で添加し、この場合、IVIgは、運動ニューロンでのC3固定を遮断することができなかった。次に、それぞれ、オプソニン化及び補体活性化の間に、又は補体活性化の間にのみ、IVIgの添加を行った。どちらもC3固定の減少をもたらし、GammaQuinは、Nanogamと比較して、補体阻害に対する最も強い効果を示した(図16を参照)。

【0198】

IVIgの抗イディオタイプ効果を評価するために、MMN患者血清を用いてGM1に対する競合ELISAを行った。結果は、図17に示されており、これは、このアッセイでのGM1結合についてIVIgの競合効果がなかったことを示している。まとめると、IVIg治療は、補体活性化工程で添加されたときにC3固定を遮断し、IVIgがC3を血清から除去することが確認された。しかしながら、IVIgは、イディオタイプ抗体には効果がなかった。

【0199】

(C.結論)

iPSC由来運動ニューロンを使用し、それにより、MMNの起こり得る病態生理を模倣することにより、ヒトC2bを標的とするARGX-117の補体阻害性効果をインビトロモデルで評価した。データは、この系の運動ニューロンが補体調節タンパク質を発現し、CD59の発現が最大であったことを示している。さらに、MMN患者由来のIgM抗GM1抗体が古典補体経路を活性化すること、及びC3沈着がC2の存在に依存的であることが示された。AR

GX-117は、MMN患者における補体活性化だけでなく、CIDP及びGBS患者試料における補体活性化も効率的に遮断した。さらに、IVIgは、補体活性化工程で補体を遮断しただけであり、抗イディオタイプ抗体に対する効果がなかった。

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様1)

対象の異常タンパク性ニューロパチーを治療する方法であって、該対象に、補体系のアンタゴニストを投与することを含み、ここで、該アンタゴニストが補体因子C5の上流の補体系を阻害する、前記方法。

(態様2)

前記アンタゴニストが古典補体経路及び/又はレクチン補体経路を阻害する、態様1記載の方法。

(態様3)

前記異常タンパク性ニューロパチーが脱髄性ニューロパチーである、態様1又は態様2記載の方法。

(態様4)

前記異常タンパク性ニューロパチーが、IgM、IgA、又はIgG免疫グロブリンの存在によって特徴付けられる、態様1～3のいずれか一項記載の方法。

(態様5)

前記異常タンパク性ニューロパチーが自己抗体の存在によって特徴付けられる、態様1～4のいずれか一項記載の方法。

(態様6)

前記異常タンパク性ニューロパチーが、神経抗原に対する自己抗体の存在によって特徴付けられる、態様1～5のいずれか一項記載の方法。

(態様7)

前記神経抗原がガングリオシド又はミエリン関連糖タンパク質(MAG)である、態様6記載の方法。

(態様8)

前記ガングリオシドが、GM1、GM1b、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD2、GD3、GT1a、GT1b、GT3、及びGQ1bから選択される、態様7記載の方法。

(態様9)

前記ガングリオシドがGM1である、態様8記載の方法。

(態様10)

前記異常タンパク性ニューロパチーが:多巣性運動ニューロパチー(MMN)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、ギラン・バレー症候群(GBS)、ミラーフィッシャー症候群、急性運動性軸索型ニューロパチー(AMAN)、急性運動感覚性軸索型ニューロパチー(AMSAN)、慢性失調性ニューロパチー-眼筋麻痺-IgMパラプロテイン-寒冷凝集素-ジシアロシル抗体(CANOMAD)症候群、遠位後天性脱髄性対称性(DADS)ニューロパチー、単クローン性ガンモパシー関連末梢神経障害、抗MAG末梢神経障害、及びPOEMS症候群から選択される、態様1～9のいずれか一項記載の方法。

(態様11)

前記異常タンパク性ニューロパチーが、MMN、CIDP、又はGBSである、態様10記載の方法。

(態様12)

前記異常タンパク性ニューロパチーがMMNである、態様10記載の方法。

(態様13)

前記アンタゴニストが補体因子C3の上流の補体系を阻害する、態様1～12のいずれか一項記載の方法。

(態様14)

前記アンタゴニストが、C1、C1q、C1r、又はC1sを阻害する、態様1～13のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

(態様 15)

前記アンタゴニストが、補体因子C2、C2a、又はC2bを阻害する、態様1～13のいずれか一項記載の方法。

(態様 16)

前記アンタゴニストが、補体因子C3、C3a、又はC3bを阻害する、態様1～12のいずれか一項記載の方法。

(態様 17)

前記アンタゴニストが、補体因子C4、C4a、又はC4bを阻害する、態様1～13のいずれか一項記載の方法。

(態様 18)

前記アンタゴニストが:阻害性RNA種、例えば、siRNAもしくはshRNA;小分子インヒビター;生物学的アンタゴニスト、例えば、阻害性ペプチドもしくは抗体模倣物、例えば、アフイボディ、アフイリン、アフイチン、アドネクチン、アトリマー、エバシン、DARPin、アンチカリン、アビマー、フィノマー、パーサボディ、もしくはデュオカリン;又は抗体もしくはその抗原結合断片から選択される、態様1～17のいずれか一項記載の方法。

(態様 19)

前記アンタゴニストが:コンプスタチンCp40(Amyndas); PEG-Cp40(Amyndas); AMY-101(Amyndas); AMY-201(Amyndas); APL-1及びAPL-2(Apellis); Cinryze(Shire); CDX-1135(Celldex); APT070ミロコセプト(MRC); HC3-1496(InCode);ナファモスタット(Torii Pharmaceutical);並びにワクシニアウイルス補体制御タンパク質(VCP)から選択される、態様1～18のいずれか一項記載の方法。

(態様 20)

前記アンタゴニストが抗体又はその抗原結合断片である、態様1～17のいずれか一項記載の方法。

(態様 21)

前記抗体がIgG抗体である、態様20記載の方法。

(態様 22)

前記抗原結合断片が:抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、単鎖抗体(scFv)、F(ab')₂断片、Fab断片、Fd断片、Fv断片、ワンアーム(一価)抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ユニボディ、ドメイン抗体、及びナノボディから選択される、態様20記載の方法。

(態様 23)

前記抗体又はその抗原結合断片が、補体因子C1、C1q、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、又はC4bに結合する、態様20～22のいずれか一項記載の方法。

(態様 24)

前記抗体又はその抗原結合断片が:スチムリマブBIV009/TNT009(Bioverativ); ANX005(Annexon); mAb H17(Elusys Therapeutics);及びTNT003(True North)から選択される、態様23記載の方法。

(態様 25)

前記抗体又は抗原結合断片が補体因子C2に結合する、態様20～22のいずれか一項記載の方法。

(態様 26)

前記抗体又は抗原結合断片が補体因子C2のC2bドメインに結合する、態様25記載の方法。

(態様 27)

前記抗体又は抗原結合断片が可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含み、ここで、該VH及びVLドメインがCDR配列:

- ー配列番号2を含むか又は配列番号2からなるHCDR3;
- ー配列番号3を含むか又は配列番号3からなるHCDR2;
- ー配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;

10

20

30

40

50

ー配列番号5を含むか又は配列番号5からなるLCDR3;
ー配列番号6を含むか又は配列番号6からなるLCDR2;及び
ー配列番号7を含むか又は配列番号7からなるLCDR1
を含む、態様26記載の方法。

(態様28)

前記抗体又は抗原結合断片が可変重鎖(VH)ドメイン及び可変軽鎖(VL)ドメインを含み、
ここで、該VHドメインが配列番号8のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなり
、該VLドメインがCDR配列:

ー配列番号5を含むか又は配列番号5からなるLCDR3;
ー配列番号6を含むか又は配列番号6からなるLCDR2;及び
ー配列番号7を含むか又は配列番号7からなるLCDR1
を含む、態様27記載の方法。

(態様29)

前記抗体又は抗原結合断片が、配列番号8のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも70
%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン及び配
列番号9のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を
含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメインを含む、態様27又は態様28記載の方法。

(態様30)

前記抗体又は抗原結合断片が、配列番号8のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列か
らなるVHドメイン及び配列番号9のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVL
ドメインを含む、態様29記載の方法。

(態様31)

前記抗体又は抗原結合断片がヒトIgG重鎖定常ドメインを含む、態様27～30のいずれか
一項記載の方法。

(態様32)

前記抗体又はその抗原結合断片が、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号
20のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様25～27のいずれか一項記載の方法。

(態様33)

IVIgを前記対象に投与することをさらに含む、態様1～32のいずれか一項記載の方法。

(態様34)

リツキシマブを前記対象に投与することをさらに含む、態様1～33のいずれか一項記載
の方法。

(態様35)

対象の異常タンパク性ニューロパチーを治療する際に使用するための補体系のアンタゴ
ニストであって、該アンタゴニストが補体因子C5の上流の補体系を阻害する、前記補体系
のアンタゴニスト。

10

20

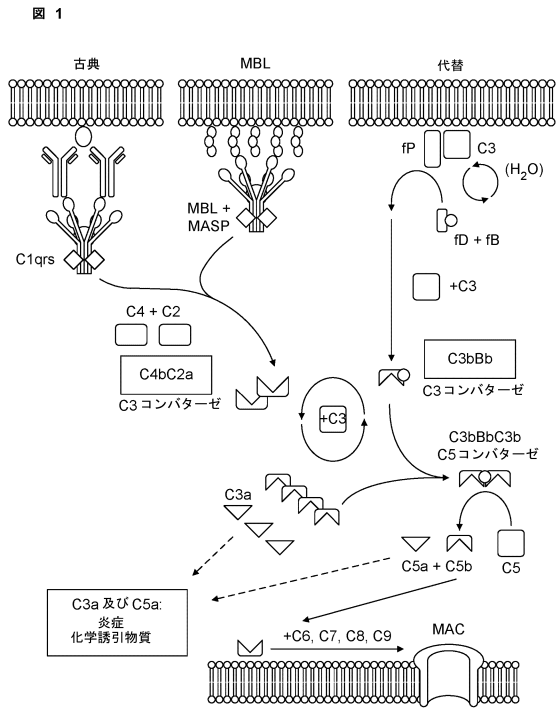
30

40

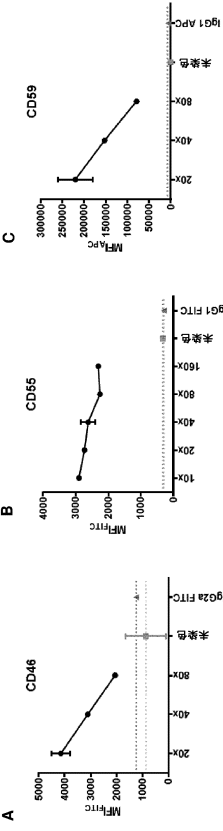
50

【図面】

【図 1】

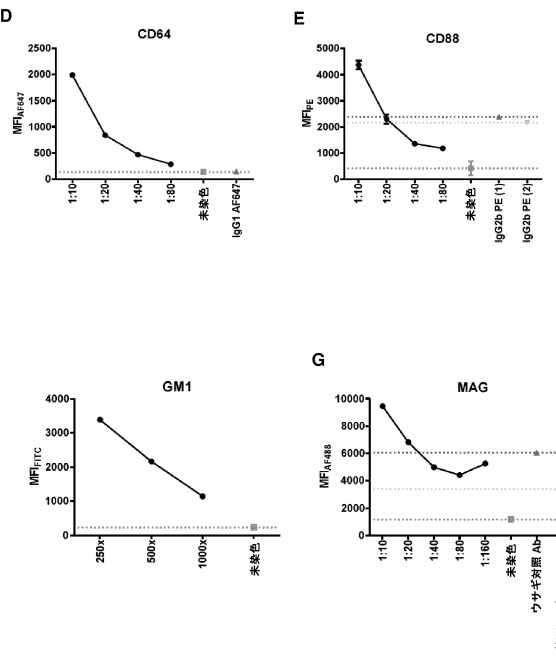


【図 2 A - C】



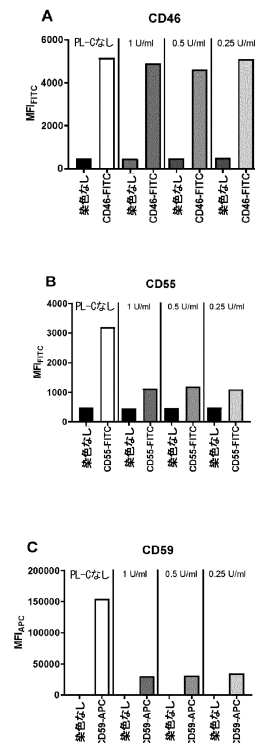
【図 2 D - G】

図 2 (続き)



【図 3】

図 3



10

20

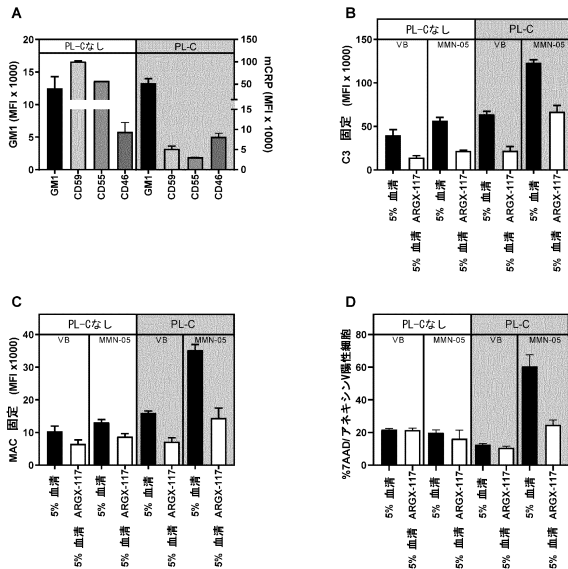
30

40

50

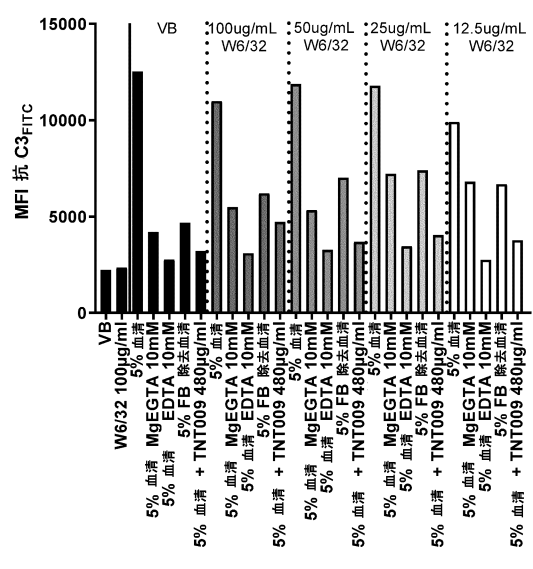
【図 4】

図 4



【図 5】

図 5

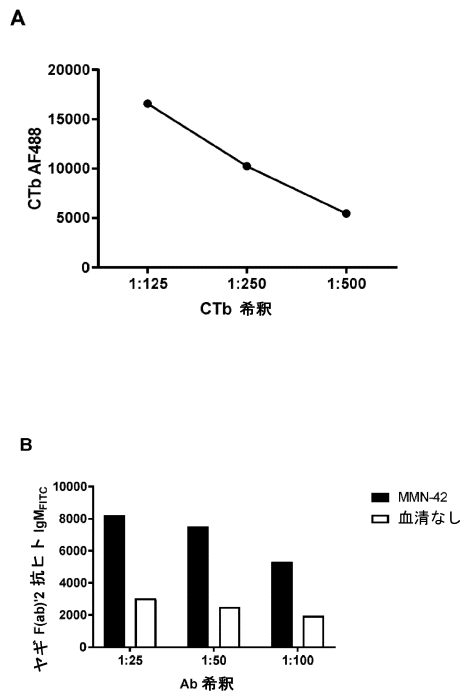


10

20

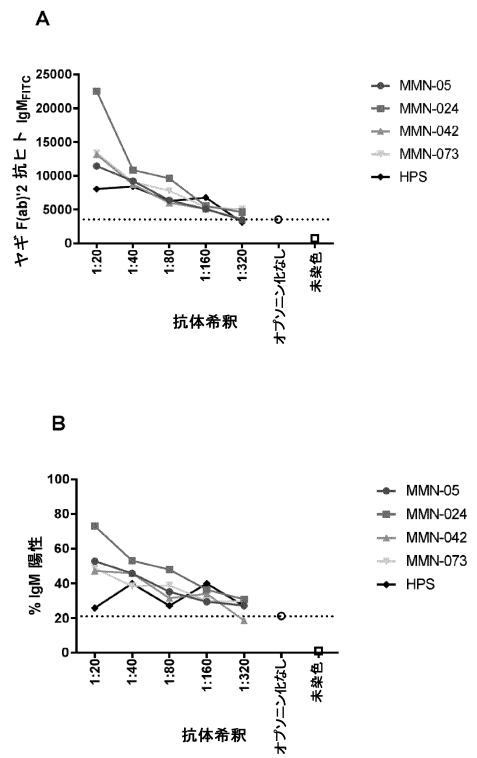
【図 6】

図 6



【図 7】

図 7



30

40

50

【図 8 A】

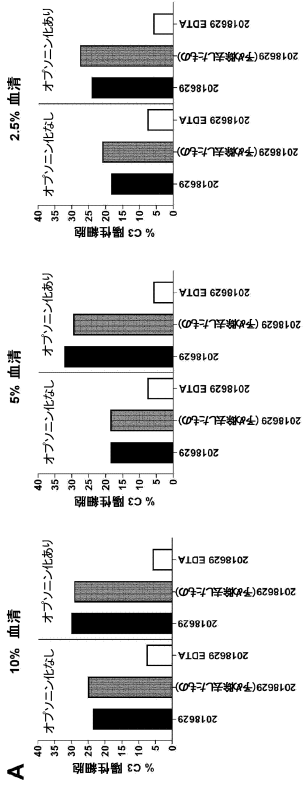


図 8

【図 8 C】

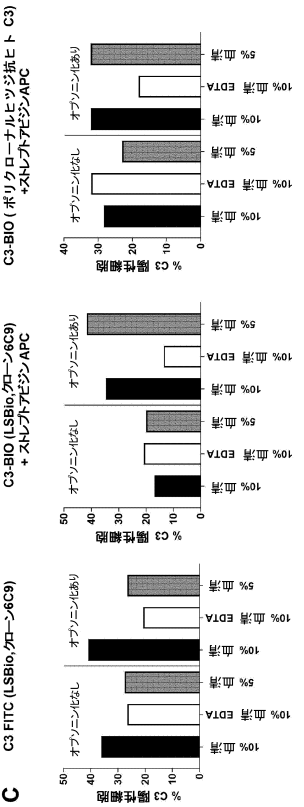


図 8 (続き)

【図 8 B】

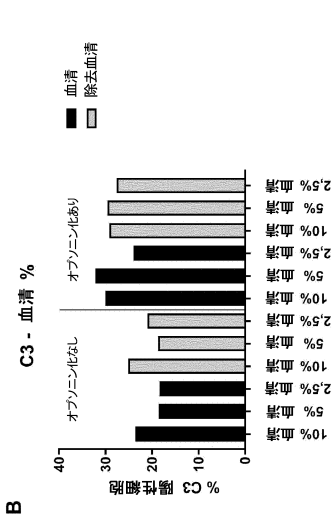
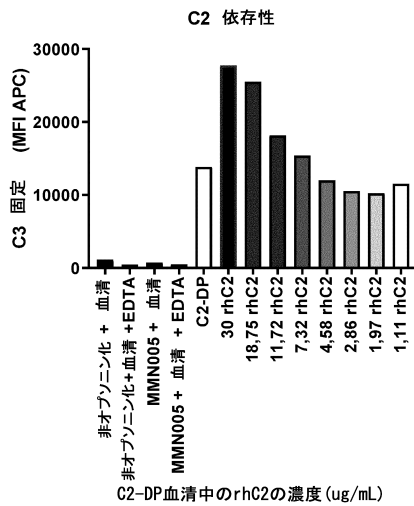


図 8 (続き)

【図 9】

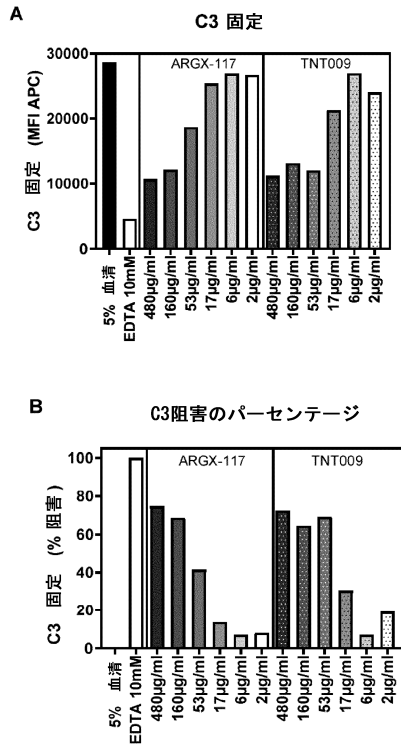
図 9



C2-DP血清中のrhC2の濃度 (ug/mL)

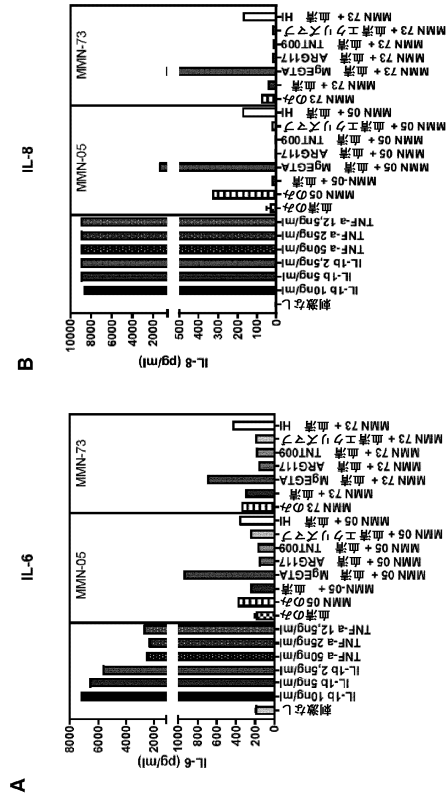
【図 10】

図 10



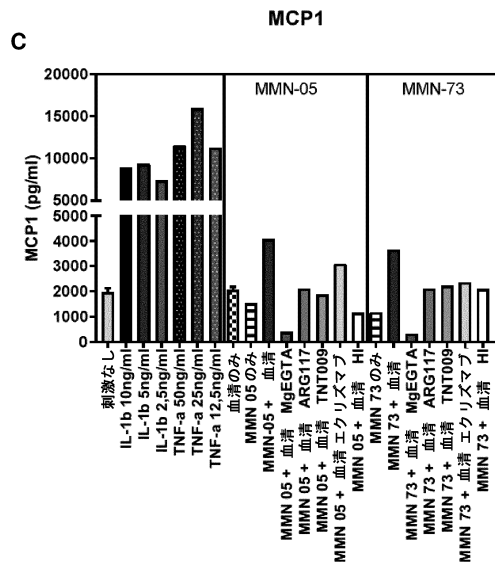
【図 11 A - B】

図 11



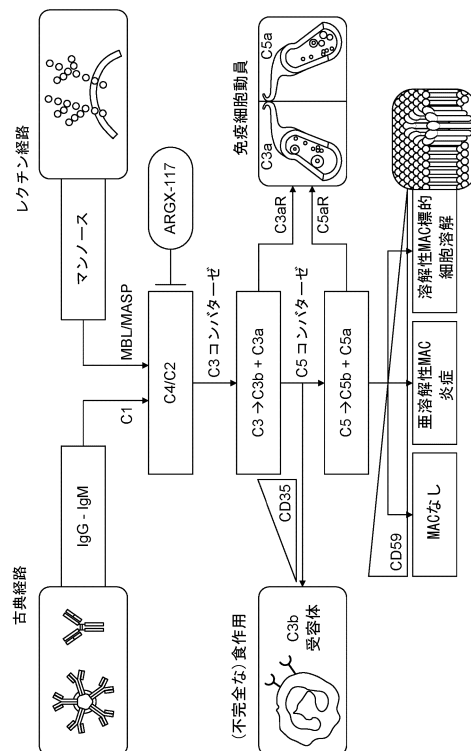
【図 11 C】

図 11 (続き)



【図 12】

図 12



10

20

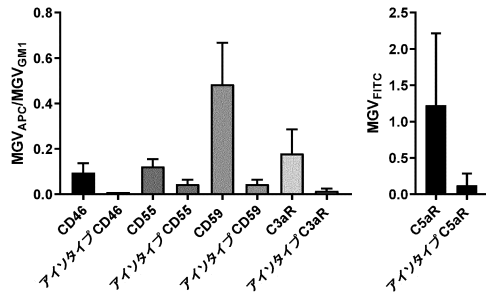
30

40

50

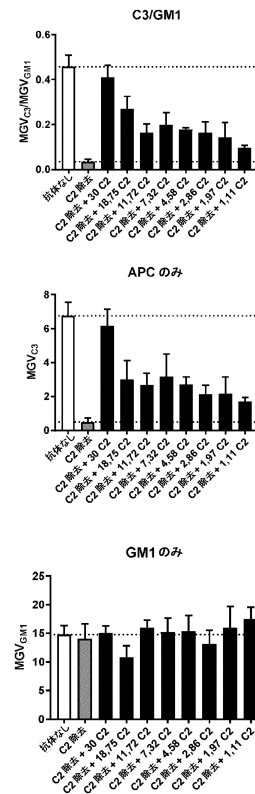
【図 13】

図 13



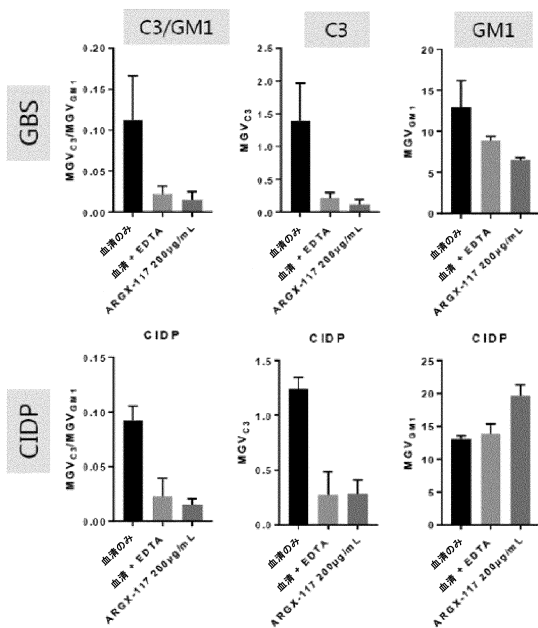
【図 14】

図 14



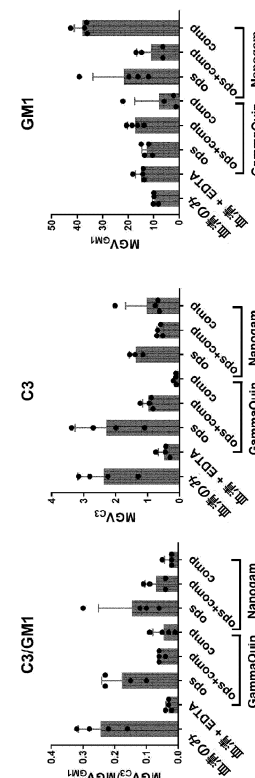
【図 15】

図 15



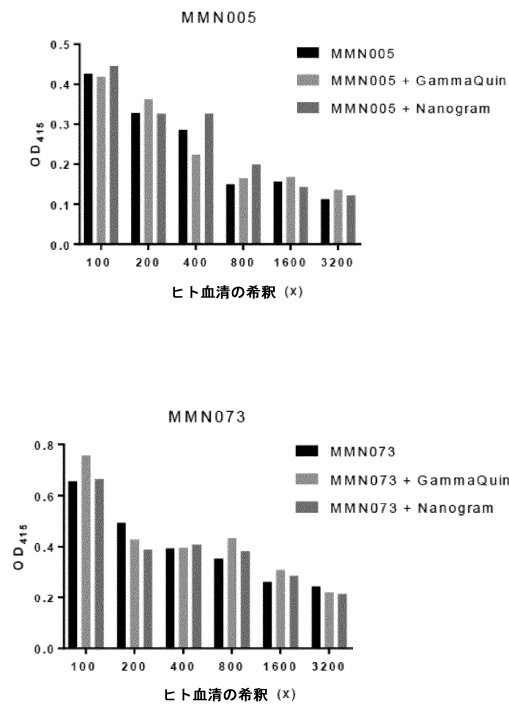
【図 16】

図 16



【図 17】

図 17



10

20

【配列表】

0007607590000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 0 7 K	7/64	(2006.01)	C 0 7 K	7/64
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00

メン パウルス エムティンククウェーグ 4 0

(72)発明者 カレン サイレンス

ベルギー王国 9 0 5 2 ヘント インダストリエパーク ズウィジナルデ 7

(72)発明者 インジ バン デ ウォール

ベルギー王国 9 0 5 2 ヘント インダストリエパーク ズウィジナルデ 7

(72)発明者 ルド バン デール ポル

オランダ王国 3 8 1 8 ジェイエイチ アメルスフォールト ハイシウスラーン 1 6

(72)発明者 ピーター ポロス

オランダ王国 3 5 2 2 イーアール ユトレヒト ベルケルシュトラート 6 4

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 2 0 3 1 3 (J P, A)

米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 0 4 1 5 6 (U S, A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 8 9 9 2 2 (W O, A 1)

CLINICAL IMMUNOLOGY, 2015年09月, VOL:161, NR:2, PAGE(S):225-240

JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 2008年12月15日, VOL:205, NR:1-2, PAGE(S):101-104

JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 2010年12月15日, VOL:229, NR:1-2, PAGE(S):256-262

ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS, 2016年03月02日, VOL:4, NR:23, PAGE(S):1-16

ANONYMOUS, ARGEX ANNOUNCES EXPANSION OF ITS PIPELINE WITH ADDITION OF COMPLEMENT-TARGETED 以下備考, [ONLINE], 2018年03月22日, PAGE(S):1-3, <https://www.globenewswire.com/news-release/2018/03/22/1444011/0/en/argenx-announces-expansion-of-its-pipeline-with-addition-of-complement-targeted-ARGX-117-for-treatment-of-severe-autoimmune-diseases.html?print=1>, ARGX-117 FOR TREATMENT OF SEVERE AUTOIMMUNE DISEASES

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C 0 7 K 1 6 /

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

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