(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-530990
(P2024-530990A)
(43)公表日　令和6年8月27日(2024.8.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｂ０６３
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*9/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全45頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-513439(P2024-513439)
(86)(22)出願日　令和4年8月30日(2022.8.30)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月28日(2024.2.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/075639
(87)国際公開番号　WO2023/034778
(87)国際公開日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(31)優先権主張番号　63/238,657
(32)優先日　令和3年8月30日(2021.8.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/324,784
(32)優先日　令和4年3月29日(2022.3.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　520018277
ニュークリアス・セラピューティクス・ピーティーワイ・リミテッド
オーストラリア・ヴィクトリア・３２０５・サウス・メルボルン・アルバート・ロード・１００・レベル・４・ライディン・フライアー内
(71)出願人　511042706
イェール・ユニヴァーシティー
アメリカ合衆国・コネチカット・０６５１１・ニュー・ヘイヴン・トゥー・ホイットニー・アヴェニュー・（番地なし）
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　治療方法

(57)【要約】
本開示は、特に、炎症性疾患及びそれに起因する合併症の状況における細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質の治療的及び予防的適用に関する。

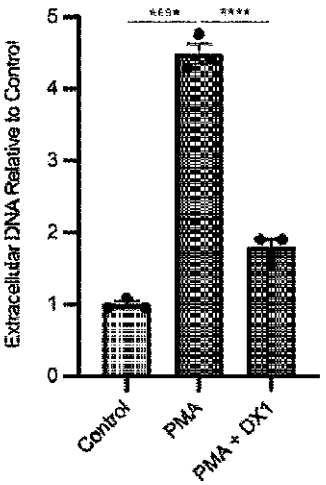


FIGURE 4

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における炎症性疾患を治療する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、前記細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、培養条件下で好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する、前記方法。
【請求項２】
対象における好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する方法であって、前記方法が、前記対象に、有効量の細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、前記細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、培養条件下でＮＥＴ形成を阻害する、前記方法。
【請求項３】
前記対象が、炎症性疾患を有する、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、自己免疫疾患を有する対象又は動物に由来する自己抗体であり、好ましくは、前記自己抗体が、全身性エリテマトーデスを有する対象又はその動物モデルに由来する、請求項１－３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記自己抗体が、３Ｅ１０又はそのヒト化形態である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記結合タンパク質が、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有するV_L、又はそれらのヒト化形態を含む、請求項１－４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記結合タンパク質が、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むV_H及び配列番号８に示されるV_L、又はそれらのヒト化形態を含む、請求項１－６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記ヒト化形態が、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、請求項６又は７に記載の方法。
【請求項９】
前記ヒト化形態が、配列番号１８～２１のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２２～２５のうちのいずれか１つに示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８～２１のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２２～２５のうちのいずれか１つに示されるＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、請求項６－８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記結合タンパク質が、核透過性である、請求項１－９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記結合タンパク質が、好中球又は好中球様細胞の核からのＤＮＡの放出を阻害する、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】

前記結合タンパク質が、ｄｉ－ｓｃＦｖである、請求項１－１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記結合タンパク質が、配列番号１７、配列番号２６、又は配列番号２７のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むリンカーを含む、請求項１－１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記結合タンパク質が、無傷の抗体である、請求項１－１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記炎症性疾患が、嚢胞性線維症、虚血、心血管疾患、歯周炎、線維症、掻痒症、皮膚の炎症、乾癬、多発性硬化症、関節リウマチ、変形性関節症、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、Ｉ型又はＩＩ型糖尿病、糖尿病性腎症、喘息、炎症性肝損傷、炎症性糸球体損傷、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、刺激性接触性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、シェーグレン症候群、角結膜炎、ブドウ膜炎、血管炎、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、急性又は慢性の特発性炎症性関節炎、筋炎、脱髄性疾患、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺疾患、間質性腎炎、慢性活動性肝炎、痛風、代謝性疾患、肥満に関連する炎症、敗血症性関節炎、無菌性関節炎、播種性血管内凝固（ＤＩＣ）、アルツハイマー病からなる群から選択される、請求項１、２、又は３－１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記炎症性疾患が、肺炎、好中球性喘息、好中球媒介性アナフィラキシー、炎症性肺損傷、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、又はコロナウイルス疾患１９（ＣＯＶＩＤ－１９）からなる群から選択される、請求項１、２、又は３－１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記炎症性疾患が、血管炎、好ましくは、ＡＮＣＡ関連血管炎である、請求項１、２、又は３－１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記炎症性疾患が、急性呼吸窮迫症候群である、請求項１、２、又は３－１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記対象が、血栓症若しくは塞栓症を有するか、又は血栓症若しくは塞栓症を発症するリスクがある、請求項１、２、又は３－１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記血栓症が、静脈又は動脈血栓症である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記塞栓症が、肺塞栓症である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
前記炎症性疾患が、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）である、請求項１、２、又は３－１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記炎症性疾患が、ライノウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、又はコロナウイルスなどのウイルス感染によって引き起こされ、好ましくは、前記ウイルス感染が、コロナウイルスによって引き起こされる、請求項１、２、又は３－１４、又は２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記コロナウイルスが、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、又は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】

培養条件が、炎症性刺激物質を含む培養培地中で好中球様ＰＬＢ－９８５細胞又は好中球を培養することを含む、請求項１－２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記炎症性刺激物質が、ＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを引き起こす、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記炎症性刺激物質が、ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）又はリポ多糖（ＬＰＳ）である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
前記炎症性刺激物質が、ＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓを引き起こす、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
前記炎症性刺激物質が、カルシウムイオノフォアイオノマイシン（ＩＭ）である、請求項２５に記載の方法。
【請求項３０】
培養条件下でのＮＥＴ形成の前記阻害が、
１）ＮＥＴにおける細胞死及び細胞外ＤＮＡのレベル、及び／又は
２）前記炎症性刺激物質を伴う培養後の好中球様細胞からのＤＮＡ放出の低減のうちの１つ又は両方に基づいて決定される、請求項２５－２９のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、特に、炎症性疾患及びそれに起因する合併症の状況における細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質の治療的及び予防的適用に関する。
【背景技術】
【０００２】
活性化された好中球は、免疫応答並びに炎症性疾患及び自己免疫疾患の病態生理学に寄与する好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）を形成する。ヒストンのクロマチン脱凝縮及びシトルリン化は、ＮＥＴｏｓｉｓにおいて重要な事象であり、ＤＮＡ損傷応答は、このプロセスに寄与する。ＮＥＴは、自然免疫を促進し、急性呼吸窮迫症候群及びＣＯＶＩＤ－１９などの炎症性疾患、血栓性疾患、自己免疫、嚢胞性線維症、並びに潜在的な悪性腫瘍を含む複数の疾患プロセスに寄与する。ＮＥＴが媒介する病態生理学の機序は、上皮細胞及び内皮細胞に対する損傷作用から、ＤＮＡ及び自己抗原放出を介した炎症及び自己免疫応答の促進までの範囲にわたる。ＮＥＴ形成を調節する方法は臨床的に興味深いことであり、ＮＥＴ－ＤＮＡの溶解を促進するか、又はＮＥＴ形成を防止するためのＤＮａｓｅＩ又はヒストンシトルリン化の阻害剤の全身投与が報告されている。ＮＥＴがどのように形成されるかの理解の進歩にもかかわらず、ＮＥＴｏｓｉｓを標的とする効果的な治療介入はまだ出現していない。
【０００３】
したがって、ＮＥＴｏｓｉｓを阻害し、関連する病理を治療するための新しい組成物及び方法が必要とされている。
【発明の概要】
【０００４】
自己抗体などの核透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質及びＤＸ１などのその誘導体が、ＮＯＸ依存性及び非依存性ＤＮＡ放出及びＮＥＴ形成の両方を阻害することが発見された。自己抗体が、ヒストンＨ３のシトルリン化を妨げない一方、細胞内でその保持を引き起こすことも特定された。これらの知見は、ＮＥＴｏｓｉｓを抑制し、したがって、炎症性疾患の発症を治療及び／又は阻害するための戦略において核透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が好中球生物学の調節因子として使用できるというコンセプトを確立するものである。
【０００５】

したがって、一例では、本開示は、対象における炎症性疾患を治療する方法であって、方法が、対象に、有効量の細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、培養条件下で好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する、方法を包含する。

【０００６】

予防的適用もまた企図される。したがって、別の例では、本開示は、対象における好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する方法であって、方法が、対象に、有効量の細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、培養条件下でＮＥＴ形成を阻害する、方法を包含する。一例では、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、ＮＯＸ依存性ＮＥＴ形成を阻害する。一例では、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、ＮＯＸ非依存性ＮＥＴ形成を阻害する。別の例では、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、ＮＯＸ依存性及びＮＯＸ非依存性ＮＥＴ形成の両方を阻害する。別の例では、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、ヒストンのシトルリン化に影響を及ぼさない。

【０００７】

一例では、本開示の方法は、炎症性疾患を有する対象に対して実施される。

【０００８】

一例では、投与される細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、自己免疫疾患を有する対象又は動物に由来する自己抗体であり、好ましくは、自己抗体が、全身性エリテマトーデスを有する対象又はその動物モデルに由来する。一例では、自己抗体は、３Ｅ１０又はそのヒト化形態である。

【０００９】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有するV_L、又はそれらのヒト化形態を含む。別の例では、結合タンパク質は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むV_H及び配列番号８に示されるV_L、又はそれらのヒト化形態を含む。一例では、それらのヒト化形態は、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。別の例では、ヒト化形態は、配列番号１８～２１のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２２～２５のうちのいずれか１つに示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８～２１のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２２～２５のうちのいずれか１つに示されるＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【００１０】

一例では、結合タンパク質は、

（ｉ）単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）、

（ｉｉ）二量体ｓｃＦｖ（ｄｉ－ｓｃＦｖ）、

（ｉｉｉ）三量体ｓｃＦｖ（ｔｒｉ－ｓｃＦｖ）、

（ｉｖ）抗体の定常領域、Ｆｃ、又は重鎖定常ドメインＣＨ２及び／又はＣＨ３に連結された（ｉ）、（ｉｉ）、又は（ｉｉｉ）のうちのいずれか１つ、

（ｖ）ダイアボディ、

（ｖｉ）トリアボディ、

（ｖｉｉ）テトラボディ、

（ｖｉｉｉ）Ｆａｂ、
（ｉｘ）Ｆ（ａｂ’）２、
（ｘ）Ｆｖ、
（ｘｉ）抗体の定常領域、Ｆｃ、又は重鎖定常ドメインＣＨ２及び／又はＣＨ３に連結された（ｖ）～（ｘ）のうちのいずれか１つ、あるいは、
（ｖｉｉｉ）無傷の抗体である。

【００１１】

別の例では、結合タンパク質は、核透過性である。一例では、核透過性結合タンパク質は、細胞核からのＤＮＡの放出を阻害する。例えば、結合タンパク質は、好中球及び／又は好中球様細胞の核からのＤＮＡの放出を阻害し得る。

【００１２】

別の例では、結合タンパク質は、ｄｉ－ｓｃＦｖである。一例では、ｄｉ－ｓｃＦｖのV_H及びV_Lは、配列番号１７に示される配列を含むリンカーによって分離されている。別の例では、複数のｓｃＦｖは、リンカーによって分離されている。この例では、リンカーは、配列番号２６又は２７に示される配列を含み得る。したがって、本開示の結合分子は、配列番号１７、配列番号２６、又は配列番号２７のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むリンカーを含み得る。

【００１３】

一例では、結合タンパク質は、無傷の抗体である。

【００１４】

一例では、炎症性疾患は、嚢胞性線維症、虚血、心血管疾患、歯周炎、線維症、掻痒症、皮膚の炎症、乾癬、多発性硬化症、関節リウマチ、変形性関節症、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、Ｉ型又はＩＩ型糖尿病、糖尿病性腎症、喘息、炎症性肝損傷、炎症性糸球体損傷、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、刺激性接触性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、シェーグレン症候群、角結膜炎、ブドウ膜炎、血管炎、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、急性又は慢性の特発性炎症性関節炎、筋炎、脱髄性疾患、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺疾患、間質性腎炎、慢性活動性肝炎、痛風、代謝性疾患、肥満に関連する炎症、敗血症性関節炎、無菌性関節炎、播種性血管内凝固（ＤＩＣ）、アルツハイマー病からなる群から選択される。

【００１５】

別の例では、炎症性疾患は、肺炎、好中球性喘息、好中球媒介性アナフィラキシー、炎症性肺損傷、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）からなる群から選択される。

【００１６】

一例では、対象は、炎症性疾患に続発する敗血症を有する。一例では、対象の炎症は、細菌感染によって引き起こされる。一例では、炎症性障害は、細菌性髄膜炎である。

【００１７】

別の例では、炎症性疾患は、関節炎である。一例では、関節炎は、関節リウマチである。一例では、関節炎は、敗血症性関節炎である。

【００１８】

一例では、対象は、血栓症若しくは塞栓症を有するか、又は血栓症若しくは塞栓症を発症するリスクがある。別の例では、血栓症は、静脈又は動脈血栓症である。別の例では、塞栓症は、肺塞栓症である。

【００１９】

別の例では、炎症性疾患は、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）である。別の例では、炎症性疾患は、ライノウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、又はコロナウイルスなどのウイルス感染によって引き起こされる。一例では、ウイルス感染は、コロナウイルスによって引き起こされる。一例では、コロナウイルスは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、又は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）である。特定の例において、炎症性疾患は、コロナウイルス疾患１９（ＣＯＶＩ

Ｄ－１９）である。
【００２０】
一例では、炎症性疾患は、血管炎である。例えば、血管炎は、ＡＮＣＡ関連血管炎であり得る。
【００２１】
一例では、本開示の培養条件は、炎症性刺激物質を含む培養培地中で好中球様ＰＬＢ－９８５細胞又は好中球を培養することを含む。一例では、炎症性刺激物質は、ＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを活性化するか（ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）又はリポ多糖（ＬＰＳ）など）、又はＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓを活性化する（カルシウムイオノフォアイオノマイシン（ＩＭ）など）。したがって、一例では、炎症性刺激物質は、ＰＭＡ又はＬＰＳであり得る。別の例では、炎症性刺激物質は、ＩＭであり得る。
【００２２】
一例では、培養条件下でのＮＥＴ形成の阻害は、以下のうちの１つ又は両方に基づいて決定される：
１）ＮＥＴにおける細胞死及び細胞外ＤＮＡのレベル、及び／又は、
２）炎症性刺激物質を伴う培養後の好中球様細胞又は好中球からのＤＮＡ又はＮＥＴ放出の低減。
【００２３】
別の例では、本開示は、対象における炎症性疾患を治療する方法であって、方法が、対象に、有効量の細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する、方法に関する。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】ＤＸ１は、ＰＬＢ－９８５細胞を透過する。対照又は５μＭのＤＸ１で１時間処理された細胞を洗浄し、固定し、免疫染色してＤＸ１を検出した。細胞へのＤＸ１による浸透を実証する代表的な画像を示す。暗色染色は、シグナルのアルカリホスファターゼに基づく検出を表す。バー：２５μｍ。
【図２Ａ】ＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色は、ＤＸ１が、ＰＭＡで刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞によるクロマチンの脱凝縮及びＤＮＡの放出を阻害するという結論を支持する。ＰＭＡ±１０μＭのＤＸ１での１時間前処理での刺激後の分化ＰＬＢ－９８５細胞におけるクロマチン脱凝縮を、ＤＡＰＩ染色によって可視化した。左側のパネル：ＰＭＡ刺激後に脱凝縮したＤＡＰＩ染色を有する対照細胞。右側のパネル：ＰＭＡ刺激後に凝縮したＤＡＰＩシグナルを保持するＤＸ１処理された細胞。バー：２５μｍ。
【図２Ｂ】ＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色は、ＤＸ１が、ＰＭＡで刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞によるクロマチンの脱凝縮及びＤＮＡの放出を阻害するという結論を支持する。ＰＭＡ刺激後の脱凝縮したＤＡＰＩ染色を有する分化ＰＬＢ－９８５細胞のパーセンテージの定量。ＰＭＡで処理された対照細胞は、ＤＸ１で前処理された細胞の３７．８±３．８％と比較して、ＰＭＡでの刺激後、細胞の６７．５±２．３％において、脱凝縮したＤＡＰＩ染色を示した（Ｎ＝２）。
【図２Ｃ】ＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色は、ＤＸ１が、ＰＭＡで刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞によるクロマチンの脱凝縮及びＤＮＡの放出を阻害するという結論を支持する。ＰＭＡ±１０μＭのＤＸ１での１時間前処理での刺激後の分化ＰＬＢ－９８５細胞によるＤＮＡ放出を、非透過性ＤＮＡ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎの添加によって可視化した。代表的な画像が示される。バー：２５μｍ。
【図２Ｄ】ＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色は、ＤＸ１が、ＰＭＡで刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞によるクロマチンの脱凝縮及びＤＮＡの放出を阻害するという結論を支持する。ＰＭＡ±１０μＭのＤＸ１での１時間前処理で刺激された分化ＰＬ

Ｂ－９８５細胞を含有するウェル中のＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎシグナルをプレートリーダーによって定量した。ＤＸ１での前処理は、ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎシグナルを、対照に対して０．４０±０．０１に低減させ（＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、Ｎ＝３）、ＤＸ１に媒介されるＤＮＡ放出の阻害と一致する。

【図３】（Ａ及びＢ）分化ＰＬＢ－９８５は、予想どおり、ＰＭＡ及びＰＡＤ４阻害剤に応答する。（Ａ）分化ＰＬＢ－９８５細胞は、予想されるＮＥＴｏｓｉｓ応答と一致して、ＰＭＡによって刺激された場合、ＤＮＡを放出する。未分化及び好中球様ＰＬＢ－９８５細胞の対照又はＰＭＡでの処理後のウェルに付着するＤＮＡの濃度を分光光度法によって決定した。分化したが未分化ではないＰＬＢ－９８５細胞は、ＰＭＡでの刺激後に有意に多くの量の放出された／接着したＤＮＡを産生した。（Ｎ＝３）（Ｂ）ＧＳＫ４８４は、ＰＭＡによる刺激後、分化ＰＬＢ－９８５細胞によるＤＮＡ放出を阻害する。分化ＰＬＢ－９８５細胞を、ＰＭＡでの刺激前の１時間、対照又はＰＡＤ４阻害剤ＧＳＫ４８４（Ｇ１、Ｇ１０、Ｇ１５０：１、１０、又は５０μＭのＧＳＫ４８４）で処理し、続いて、分光光度法によってウェルに付着したＤＮＡの測定を行った。ＧＳＫ４８４で処理された細胞は、予想どおり、ＰＭＡに応答したＤＮＡ放出の用量依存的阻害を示した。（Ｎ＝２）。

【図４】ＤＸ１は、ＰＭＡで刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞からのＤＮＡの放出を阻害する。対照緩衝液又はＤＸ１で処理された分化ＰＬＢ－９８５細胞を、ＰＭＡの添加によって未刺激又は刺激のままにし、続いて、分光光度法によって接着したＤＮＡの測定を行った。対照細胞のＰＭＡ刺激は、未刺激対照細胞に対して、放出された／接着したＤＮＡの量を４．５０±０．１４に増加させた（＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、Ｎ＝３）。ＰＭＡに対する応答は、未刺激対照細胞に対して、ＤＸ１で処置された細胞においてＤＮＡ含有量１．８０±０．１１で阻害された（＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１、Ｎ＝３）。

【図５】（Ａ及びＢ）ＤＸ１は、分化ＰＬＢ－９８５細胞におけるヒストンＨ３のシトルリン化を阻害しない。分化ＰＬＢ－９８５細胞を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で１時間前処理し、続いてＰＭＡで刺激した。細胞内容物を単離し、Ｈ３Ｃｉｔのウエスタンブロットによって分析した。代表的なクロップドブロットを（Ａ）に示し、アクチンに対して正規化されたＨ３Ｃｉｔバンド強度の定量を（Ｂ）に示す。ＰＭＡの添加は、刺激されていない細胞に対して、Ｈ３Ｃｉｔ含有量を０．６４±０．０６（Ｎ＝２）に低減させるようであり、ＮＥＴｏｓｉｓにおけるＨ３Ｃｉｔ放出を反映している可能性が高い。ＤＸ１での前処理は、Ｈ３のシトルリン化の任意の明らかな低減をもたらさなかったが、むしろ、刺激されていない細胞に対して、細胞内Ｈ３Ｃｉｔ含有量を１．４６±０．２０に増加させた可能性がある（Ｎ＝３）。これらのデータは、ＤＸ１によるＮＥＴ放出の阻害と一致する。

【図６】（Ａ及びＢ）ＤＸ１は、マウス好中球におけるＮＥＴｏｓｉｓを刺激しない。（Ａ）マウス好中球を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理し、ＮＥＴ形成を、ＤＡＰＩ及びＮＥＴマーカーＭＰＯ、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４の免疫染色によって可視化した。代表的な画像が示される。（Ｂ）対照及びＤＸ１で処理された細胞において可視化されたＮＥＴのパーセンテージは、それぞれ、３．５％±１．０及び４．０％±１．５（Ｐ＝０．７９、Ｎ＝４）であった。これらの結果は、ＤＸ１がマウス好中球におけるＮＥＴｏｓｉｓを刺激しないことを実証する。

【図７】（Ａ及びＢ）ＤＸ１は、ＰＭＡで刺激されたマウス好中球におけるＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを阻害する。（Ａ）マウス好中球を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理し、続いて、ＰＭＡの添加によるＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓの刺激を行った。ＮＥＴ形成を、ＮＥＴマーカーＭＰＯ、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４の免疫染色によって可視化した。代表的な画像が示される。（Ｂ）対照及びＤＸ１で処理された細胞において可視化されたＮＥＴのパーセンテージは、３６．３％±１１．１及び８．３％±２．７（＊Ｐ＝０．０５、Ｎ＝４）であった。これらの結果は、ＤＸ１が、ＰＭＡで処理されたマウス好中球におけるＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを阻害することを実証する。

【図８】（Ａ及びＢ）ＤＸ１は、カルシウムイオノフォアＩＭで刺激されたマウス好中球におけるＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓを阻害する。（Ａ）マウス好中球を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理し、続いて、カルシウムイオノフォアＩＭの添加によるＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓの刺激を行った。ＮＥＴ形成を、ＮＥＴマーカーＭＰＯ、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４の免疫染色によって可視化した。代表的な画像が示される。（Ｂ）対照及びＤＸ１で処理された細胞において可視化されたＮＥＴのパーセンテージは、１５．５％±３．１及び２．３％±０．８（＊Ｐ＜０．０１、Ｎ＝４）であった。これらの結果は、ＤＸ１が、ＩＭで処理されたマウス好中球におけるＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓを阻害することを実証する。

【図９】ＡＮＣＡ血管炎の２０日間マウスモデルにおけるＤＸ１の影響を試験する実験の図。

【図１０】（Ａ～Ｄ）ＤＸ１は、ＡＮＣＡ血管炎の２０日間マウスモデルにおける腎臓損傷及び免疫浸潤を有意に低減させる。マウスを図９に示すように処置した。糸球体部分壊死、マクロファージ、好中球、及びＣＤ４＋Ｔ細胞を、対照及びＭＰＯ免疫化マウスにおいて評価し、その後、１用量又は２用量のＤＸ１を用いて、又は用いずに処理した。ＭＰＯで免疫化され、ＤＸ１で処置されたマウスは、ＭＰＯで免疫され、対照で処置されたマウスと比較して、糸球体炎症の徴候の全ての量を有意に低減させた。これらの知見は、ＤＸ１が炎症性疾患、この場合はＡＮＣＡ血管炎に関連する損傷をインビボで抑制することを実証する。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

配列の一覧

配列番号１－マウス３Ｅ１０の重鎖ＣＤＲ１
配列番号２－マウス３Ｅ１０の重鎖ＣＤＲ２
配列番号３－マウス３Ｅ１０の重鎖ＣＤＲ３
配列番号４－マウス３Ｅ１０の軽鎖ＣＤＲ１
配列番号５－マウス３Ｅ１０の軽鎖ＣＤＲ２
配列番号６－マウス３Ｅ１０の軽鎖ＣＤＲ３
配列番号７－マウス３Ｅ１０のV_H鎖
配列番号８－マウス３Ｅ１０のV_L鎖
配列番号９－ヒト化抗体ＤＸ１／ＤＸ３、ＶＨ＿１、及びＶＨ＿２の重鎖ＣＤＲ１
配列番号１０－ヒト化抗体ＶＨ＿３ｍの重鎖ＣＤＲ１
配列番号１１－ヒト化抗体ＤＸ１／ＤＸ３、ＶＨ＿１、及びＶＨ＿２の重鎖ＣＤＲ２
配列番号１２－ヒト化抗体ＶＨ＿３ｍの重鎖ＣＤＲ２
配列番号１３－ヒト化抗体ＤＸ１／ＤＸ３、ＶＨ＿１、ＶＨ＿２及びＶＨ＿３ｍの重鎖ＣＤＲ３
配列番号１４－ヒト化抗体ＤＸ１／ＤＸ３、ＶＨ＿１及びＶＨ＿２の軽鎖ＣＤＲ１
配列番号１５－ヒト化抗体ＶＨ＿３ｍの軽鎖ＣＤＲ１
配列番号１６－ヒト化抗体ＤＸ１／ＤＸ３、ＶＨ＿１、ＶＨ＿２及びＶＨ＿３ｍの軽鎖ＣＤＲ２
配列番号１７－ヒト化抗体ＤＸ１／ＤＸ３　ＶＨ＿１、ＶＨ＿２及びＶＨ＿３ｍの軽鎖ＣＤＲ３
配列番号１８－ヒト化抗体（ＤＸ１／ＤＸ３）のV_H鎖
配列番号１９－ヒト化抗体ＶＨ＿１のV_H鎖
配列番号２０－ヒト化抗体ＶＨ＿２のV_H鎖
配列番号２１－ヒト化抗体ＶＨ＿３ｍのV_H鎖
配列番号２２－ヒト化抗体（ＤＸ１／ＤＸ３）のV_L鎖
配列番号２３－ヒト化抗体ＶＨ＿１のV_L鎖
配列番号２４－ヒト化抗体ＶＨ＿２のV_L鎖
配列番号２５－ヒト化抗体ＶＨ＿３ｍのV_L鎖

配列番号２６－リンカー配列１
配列番号２７－リンカー配列２
配列番号２８－ヒンジ配列
配列番号２９－シグナル配列
配列番号３０－５Ｃ６のＶ$_H$鎖
配列番号３１－５Ｃ６の重鎖ＣＤＲ１
配列番号３２－５Ｃ６の重鎖ＣＤＲ２
配列番号３３－５Ｃ６の重鎖ＣＤＲ３
配列番号３４－５Ｃ６のＶ$_L$鎖
配列番号３５－５Ｃ６の軽鎖ＣＤＲ１
配列番号３６－５Ｃ６の軽鎖ＣＤＲ２
配列番号３７－５Ｃ６の軽鎖ＣＤＲ３
配列番号３８－ＤＸ１配列
配列番号３９－ＤＸ３配列
配列番号４０－３Ｅ１０の代替重鎖ＣＤＲ１

【００２６】

発明の詳細な説明

一般的な技術及び選択された定義

別途特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者（例えば、分子生物学、生化学、抗体、単鎖断片可変などの抗体断片、及び臨床研究の分野における）によって一般に理解されるものと同じ意味を有するように解釈されることとする。

【００２７】

「細胞透過性」という用語は、本開示の文脈において、生きている哺乳動物細胞の細胞質内に輸送され、好ましくは、ＤＮＡ（例えば、一本鎖及び／又は二本鎖ＤＮＡ）に結合する抗ＤＮＡ結合タンパク質を指すために使用される。一例では、細胞透過性結合タンパク質はまた、細胞核を透過する。したがって、本開示の結合タンパク質は、細胞核内に局在し、ＤＮＡに結合し得る（すなわち、それらは核透過性である）。そのような結合タンパク質は、細胞内に透過することができるが、細胞質内で隔離されたままである抗体とは区別される。

【００２８】

「抗ＤＮＡ結合タンパク質」という用語は、本開示の文脈において、ＤＮＡに結合することができる抗体を指すために使用される。

【００２９】

「結合タンパク質」という用語は、本開示の文脈において、特定の抗原と免疫学的に反応するヒト又はヒト化免疫グロブリン分子を指すために使用され、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方を含む。「結合タンパク質」という用語にはまた、抗原結合能力を有する断片（例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ａｎｄ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，１９９４－１９９５（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ．）、Ｋｕｂｙ，Ｊ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，３rd Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９８）に論述されるＦａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ、Ｆｖ、及びｒＩｇＧ）を含む抗体の抗原結合形態が含まれる。この用語はまた、組換え単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）、並びにその二価（ｄｉ－ｓｃＦｖ）及び三価（ｔｒｉ－ｓｃＦＶ）形態を指すためにも使用される。「抗体」という用語にはまた、ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディも含まれる。

【００３０】

本明細書で使用される結合タンパク質という用語は、二重特異性分子などの抗体を含む結合タンパク質を包含する。例えば、結合タンパク質は、抗体などの上記の免疫グロブリン、及びＦｖなどの上記参照の断片を含み得る。

【００３１】

抗体の「抗原結合断片」は、無傷の抗体の１つ以上の可変領域を含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖ断片、ダイアボディ、抗体断片から形成された直鎖状抗体及び単鎖抗体分子が挙げられる。例えば、「抗原結合断片」という用語は、組換え単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）、並びにその二価（ｄｉ－ｓｃＦｖ）及び三価（ｔｒｉ－ｓｃＦＶ）形態を指すために使用され得る。一例では、結合タンパク質は、抗原結合断片である。そのような断片は、当技術分野で知られている様々な方法を介して産生され得る。

【００３２】

「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリンドメインを含む、抗ＤＮＡ結合タンパク質などの本開示の結合タンパク質を含むと理解されるであろう。例示的な免疫グロブリンは、抗体である。「免疫グロブリン」という用語によって包含されるさらなるタンパク質としては、ドメイン抗体、ラクダ科抗体、及び軟骨魚類由来の抗体（すなわち、免疫グロブリン新抗原受容体（ＩｇＮＡＲ））が含まれる。概して、ラクダ科抗体及びＩｇＮＡＲは、V_Hを含むが、V_Lを欠き、多くの場合、重鎖免疫グロブリンと称される。

【００３３】

「全長抗体」、「無傷の抗体」、又は「全抗体」という用語は、抗体の抗原結合断片とは対照的に、その実質的に無傷の形態にある抗体を指すために互換的に使用される。特に、全抗体は、重鎖及び軽鎖を有するものを含む。一例では、全抗体は、Ｆｃ領域を含む。定常ドメインは、野生型配列の定常ドメイン（例えば、ヒト野生型配列の定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列バリアントであり得る。一例では、抗体は、ＩｇＧである。

【００３４】

本明細書で使用される場合、「可変領域」は、抗原に特異的に結合し、例えば、ＣＤＲのアミノ酸配列、すなわち、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３、並びにフレームワーク領域（ＦＲ）を含む、本明細書で定義される抗体の軽鎖及び／又は重鎖の部分を指す。例えば、可変領域は、３つのＣＤＲとともに３つ又は４つのＦＲ（例えば、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及び任意選択でＦＲ４）を含む。V_Hとは重鎖の可変領域を指す。V_Lとは軽鎖の可変領域を指す。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」という用語（同義語ＣＤＲ、すなわち、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）は、その存在が特異的抗原結合に主要な寄与因子である抗体可変領域のアミノ酸残基を指す。各可変領域は、典型的には、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３として特定される３つのＣＤＲ領域を有する。一例では、ＣＤＲ及びＦＲに割り当てられたアミノ酸位置は、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９８７ ａｎｄ １９９１（本明細書では「Ｋａｂａｔ番号付けシステム」又は「Ｋａｂａｔ」とも称される）に従って定義される。

【００３６】

可変ドメインの補正又は代替の番号付けシステムを含む他の規則としては、ＩＭＧＴ（Ｌｅｆｒａｎｃ，ｅｔ ａｌ（２００３），Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７：５５－７７）、Ｃｈｏｔｈｉａ（Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ，Ｌｅｓｋ ＡＭ（１９８７），Ｊ Ｍａｌ Ｂｉｏｌ １９６：９０１－９１７、Ｃｈｏｔｈｉａ，ｅｔ ａｌ．（１９８９），Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３）、及びＡＨｏ（Ｈｏｎｅｇｇｅｒ Ａ，Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ａ（２００１）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３０９：６５７－６７０）が挙げられる。便宜上、本開示の抗体の例はまた、ＩＭＧＴに従って標識される場合もある。

【００３７】

「フレームワーク領域」（同義語ＦＲ）は、ＣＤＲ残基以外のこれらの可変ドメイン残基である。

【００３８】

本明細書で使用される「定常領域」という用語は、可変領域以外の抗体の重鎖又は軽鎖の一部分を指す。重鎖では、定常領域は、概して、複数の定常ドメインと、ヒンジ領域と、を含み、例えば、ＩｇＧ定常領域は、以下の連結された構成要素、定常重鎖C_H1、リンカー、C_H2、及びC_H3を含む。重鎖では、定常領域は、Ｆｃを含む。軽鎖において、定常領域は、概して、１つの定常ドメイン（ＣＬ１）を含む。

【００３９】

「結晶化可能な断片」又は「Ｆｃ」又は「Ｆｃ領域」又は「Ｆｃ部分」という用語（本明細書で互換的に使用され得る）は、少なくとも１つの定常ドメインを含み、概して（必ずしもそうではないが）グリコシル化され、１つ以上のＦｃ受容体及び／又は補体カスケードの構成要素に結合可能な抗体の領域を指す。重鎖定常領域は、α、δ、ε、γ、又はμの５つのアイソタイプのうちのいずれかから選択され得る。例示的な重鎖定常領域は、ガンマ１（ＩｇＧ１）、ガンマ２（ＩｇＧ２）、及びガンマ３（ＩｇＧ３）、又はそれらのハイブリッドである。

【００４０】

「定常ドメイン」は、同じタイプ、例えば、ＩｇＧ又はＩｇＭ又はＩｇＥの抗体／抗体において配列が非常に類似している抗体内のドメインである。抗体の定常領域は、概して、複数の定常ドメインを含み、例えば、γ、α、又はδ重鎖の定常領域は、２つの定常ドメインを含む。

【００４１】

「コンジュゲートされた」という用語は、本開示の文脈において、別の化合物、例えば、治療用化合物又は診断用化合物にコンジュゲートされている本開示の結合タンパク質を指すために使用される。したがって、一例では、本開示の結合タンパク質は「コンジュゲート」されている。コンジュゲーションの性質は、それが培養条件下で好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する結合タンパク質の能力を維持する限り、特に限定されない。

【００４２】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列同一性最大パーセントを得るため配列をアラインメントし、必要な場合はギャップを導入した後の、配列同一性の部分として任意の保存的置換を考慮に入れない、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当該技術分野で実施する技術内である様々な方法で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成され得る。当業者は、比較される配列の完全長にわたる最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするために適切なパラメータを決定し得る。

【００４３】

本明細書で使用される場合、結合タンパク質及び抗原の相互作用に関して「結合する」という用語は、相互作用が抗原上の特定の構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存することを意味する。例えば、結合タンパク質は、概して、抗原ではなく特定の抗原構造を認識して結合する。例えば、結合タンパク質がエピトープ「Ａ」に結合する場合、標識された「Ａ」及び結合タンパク質を含有する反応において、エピトープ「Ａ」（又は遊離、標識されていない「Ａ」）を含有する分子の存在は、結合タンパク質に結合された標識された「Ａ」の量を低減させる。

【００４４】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」という用語は、結合タンパク質とＤＮＡとの間の結合相互作用が、結合タンパク質によるＤＮＡの検出に依存していることを意味すると解釈されることとする。したがって、結合タンパク質は、他の分子の混合物又は生物中に存在する場合でさえも、ＤＮＡに対して優先的な結合又は認識を行う。

【００４５】

一例では、結合タンパク質は、代替的な抗原又は細胞とよりも、ＤＮＡと、より頻繁に、より迅速に、より長い持続時間で、及び／又はより高い親和性で反応又は会合する。また、この定義を読み取ることにより、例えば、ＤＮＡに特異的に結合する結合タンパク質は、第２の抗原に特異的に結合しても、しなくてもよいと理解される。したがって、「特異的結合」は、別の抗原の排他的結合又は検出不可能な結合を必ずしも必要としない。「特異的に結合する」という用語は、本明細書における「選択的に結合する」と互換的に使用され得る。概して、本明細書での結合への言及は、特異的結合を意味し、各用語は、他の用語を明示的に支持するものと理解されるものとする。特異的結合を決定するための方法は、当業者には明らかであろう。例えば、本開示の結合タンパク質を、ＤＮＡ又は代替抗原と接触させる。次いで、ＤＮＡ又は代替抗原への結合タンパク質の結合が測定され、代替抗原ではなくＤＮＡと上に記載されるように結合する結合タンパク質は、ＤＮＡと特異的に結合するとみなされる。

【００４６】

本開示による結合タンパク質及びそれを含む組成物は、炎症性疾患などの様々な適応症を治療するために対象に投与され得る。「対象」、「患者」、又は「個体」などの用語は、本開示において、文脈において互換的に使用され得る用語である。一例では、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、イヌ若しくはネコなどのコンパニオンアニマル、又はウマ若しくはウシなどの家畜動物であり得る。一例では、対象は、ヒトである。例えば、対象は、成人であり得る。別の例では、対象は、子供であり得る。別の例では、対象は、青年であり得る。一例では、対象は、炎症性疾患を有する。例えば、対象は、嚢胞性線維症などの遺伝性疾患、又は多発性硬化症などの根底にある炎症性構成要素を有する神経学的障害を有し得る。

【００４７】

一例では、対象は、がんを有しない。一例では、対象は、狼瘡を有しない。

【００４８】

一例では、対象は、血栓症若しくは塞栓症を有するか、又は血栓症若しくは塞栓症を発症するリスクがある。この例では、本開示の方法は、血栓症又は塞栓症の治療又は予防を包含し得る。

【００４９】

「血栓症」という用語は、血栓又は血餅の形成を指すために本明細書で使用される。一例では、血栓症は、血栓が動脈に発生する「動脈血栓症」である。このような血栓は、心臓又は脳などの主要な器官への血流を妨げる可能性があるため、対象にとって特に危険である。一例では、血栓症は、血栓が静脈に発生する「静脈血栓症」である。

【００５０】

「肺塞栓症」という用語は、血流を介して体内の他の場所から移動した物質による肺における動脈の閉塞を指すために本明細書で使用される。

【００５１】

本開示に従って治療される対象は、炎症性疾患を示す症状を有し得る。例示的な症状としては、疲労、呼吸困難、息切れ、運動不能又は運動能力低下、血液又は粘液の有無にかかわらない咳、息を吸ったり吐いたりするときの痛み、喘鳴、胸の圧迫感、原因不明の体重減少、及び筋骨格系疼痛が挙げられ得る。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、臨床的病理の経過中に治療されている個体又は細胞の自然経過を改変するように設計された臨床的介入を指す。治療の望ましい効果には、疾患進行の速度の減少、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。例えば、疾患に関連する１つ以上の症状が軽減又は排除される場合、個体は、成功裏に「治療」される。一例では、治療は、対象における炎症マーカーの低減によって特徴付けられる。加えて、「治療」という用語には、緩和的治療、すなわち、疾患、病的状態、又は障害の治癒ではなく、症状の緩和のために設計された治療、予防的治療、すなわち、関連する疾患、病的状態、又は障害の発症を最小限に抑えるか、又は部分的に

、若しくは完全に阻害するように指向された治療、及び補助的治療、すなわち、関連する疾患、病的状態、又は障害の改善に指向された別の特定の療法を補足するために用いられる治療が含まれる。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「予防」という用語は、個体における疾患の発生又は再発に関して予防を提供することを含む。個体は、疾患又は疾患再発の素因があるか、又は発症するリスクがある可能性があるが、まだ疾患又は再発と診断されていない。

【００５４】

一例では、本開示の方法は、対象における疾患の進行又は疾患の合併症を阻害する。一例では、本開示の方法は、炎症性疾患の進行又は重症度を阻害する。一例では、本開示の方法は、対象におけるＮＥＴ形成を阻害する。この例では、ＮＥＴ形成は、本明細書に開示の結合タンパク質を投与する前の未治療の対象又は対象におけるＮＥＴ形成のレベルに対して、低減し得る。

【００５５】

「有効量」は、所望の治療、予防、診断、又はその他の有益な結果を達成するために必要な投薬及び期間で少なくとも有効な量を指す。有効量は、１回以上の投与で提供され得る。本開示のいくつかの例では、「有効量」という用語は、以下に記載の疾患又は状態の治療を達成するために必要な量を意味する。有効量は、治療される疾患又は状態に応じて、また、体重、年齢、人種的背景、性別、健康及び／又は身体状態、並びに治療される対象に関する他の要因に応じて変化し得る。典型的には、有効量は、医師による日常的な試験及び実験を介して決定され得る比較的広い範囲（例えば、「投薬量」範囲）内に収まる。有効量は、単回用量で、又は治療期間にわたって１回又は数回繰り返される用量で投与され得る。任意の特定の患者の特定の用量レベルは、用いられる特定の抗体の活性、年齢、体重、全般的な健康、性別、食事、投与時間、投与経路、及び排泄速度、薬物組み合わせ、並びに療法を受けている特定の疾患の重症度を含む様々な因子に依存することが理解される。

【００５６】

「治療有効量」は、特定の障害（例えば、炎症性疾患）の測定可能な改善を達成するために必要な最小限の濃度以上である。本明細書における治療有効量はまた、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、並びに個体において所望の応答を誘発する抗体の能力などの因子に応じて変化し得る。治療有効量はまた、結合タンパク質の任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に有益な効果が勝る量である。炎症性疾患の場合、治療有効量の結合タンパク質は、疾患症状、疾患進行を阻害し得（すなわち、ある程度遅くし、いくつかの例では停止させる）、かつ／又は治療されている炎症性疾患に関連する症状のうちの１つ以上をある程度緩和し得る。炎症性疾患の場合、インビボでの有効性は、例えば、生存期間、疾患進行までの時間（ＴＴＰ）、応答速度（ＲＲ）、応答期間、及び／又は生活の質を評価することによって測定され得る。

【００５７】

本開示の結合タンパク質は、好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する。一例では、本明細書に開示の結合タンパク質の好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する能力は、培養条件下で決定される。「培養条件」という用語は、培養中の増殖する細胞を指すために使用される。一例では、培養条件とは、好中球又はＰＬＢ－９８５、ＨＬ－６０細胞（例えば、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２４０、又はそのサブクローン）、ＮＢ４などの好中球様細胞などの細胞培養中の細胞の集団を指す。一例では、培養条件は、細胞の培養増殖集団を指す。一例では、培養条件は、細胞の活発に分裂する集団を指す。そのような細胞は、一例では、指数関数的増殖期にあり得る。一例では、培養条件は、ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）又はリポ多糖（ＬＰＳ）などのＮＥＴ形成の刺激物質とともに細胞を培養することを含む。ＮＥＴ形成の他の例示的な刺激物質としては、Ａ２３１８７（Ａ２３）又はイノマイシンなどのカルシウムイオノフォアが挙げられる。一例では、刺激物質は、ＮＯＸ依存性ＮＥＴ形成を促進する。別の例では、刺激物質

は、ＮＯＸ非依存性ＮＥＴ形成を促進する。一例では、培養条件は、３００ｎＭのＰＭＡとともに４．５時間細胞を培養することを含む。別の例では、培養条件は、カルシウムイオノフォア（イオノマイシン、ＩＭ、例えば、４μＭ）とともに細胞を培養することを含む。

【００５８】

ＮＥＴ形成はまた、培養条件下で測定され得る。一例では、ＮＥＴ形成を表す特定のマーカーのレベルは、細胞培養培地の試料を採取し、試料中のマーカーのレベルを測定することによって決定され得る。別の例では、特定のマーカーのレベルは、細胞の試料を採取し、細胞溶解物中のマーカーのレベルを測定することによって決定され得る。当業者は、分泌マーカーが、培養培地を試料採取することによって測定され得るが、一方で、表面上又は培養された細胞（複数可）内に発現されるマーカーが、細胞溶解物の試料を評価することによって測定され得ることを理解するであろう。一例では、試料は、細胞が指数関数的増殖期にあるときに採取される。一例では、試料は、培養中、少なくとも２日後に採取される。別の例では、特定のマーカーのレベルは、培養条件下で細胞を視覚的に評価することによって決定され得る。一例では、ＮＥＴ形成のマーカーは、ＮＥＴにおける細胞死及び細胞外ＤＮＡのレベルである。別の例では、ＮＥＴ形成のマーカーは、炎症性刺激物質を伴う培養後の好中球様細胞からのＤＮＡ放出である。この例では、ＮＥＴ形成の阻害は、炎症性刺激物質を伴う培養後の好中球様細胞からのＤＮＡ放出の低減によって特徴付けられる。ＮＥＴ形成の様々なマーカーは、当該技術分野において既知である。例としては、循環細胞遊離ＤＮＡ、ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）、シトルリン化ヒストン３（Ｈ３Ｃｉｔ）、及び好中球エラスターゼ（ＮＥ）が挙げられる。一例では、ＮＯＸ依存性及び／又はＮＯＸ非依存性ＮＥＴ形成の両方を阻害する細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質の能力は、ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）又はイオノマイシン（ＩＭ）のいずれかでの好中球刺激後に評価され得る。

【００５９】

一例では、本開示の結合タンパク質は、培養条件下で、好中球様細胞からのシトルリン化ヒストンＨ３（Ｈ３Ｃｉｔ）の放出を阻害する。ウエスタンブロットなどの培養条件下でのＨ３Ｃｉｔのレベルを決定するための様々な方法が利用可能である。一例では、本開示の結合タンパク質は、投与後に対象におけるＨ３Ｃｉｔの血清レベルを変化させる。この例では、本開示の結合タンパク質を対象に投与し、その後、血清試料を取得し、試料中のＨ３Ｃｉｔレベルを対象からのＨ３Ｃｉｔのベースラインレベルと比較して、Ｈ３Ｃｉｔレベルが変化したかどうかを決定する。

【００６０】

細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質

本開示は、培養条件下で好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する抗ＤＮＡ結合タンパク質に関する。「好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）」という用語は、本開示の文脈において、ヒストン及び多数の粒状タンパク質で装飾された細胞外クロマチンを含む組成物を指すために使用される。一例では、ＮＥＴ構成要素は、核及び／又はミトコンドリアＤＮＡの足場の間で混合される。「ＮＥＴ形成」及び「ＮＥＴｏｓｉｓ」は、本開示の文脈において、ＮＥＴの活性放出に至る細胞事象の順序を説明するために使用される。一例では、このプロセスは、調節された好中球細胞死によって特徴付けられる。

【００６１】

一例では、抗ＤＮＡ結合タンパク質はまた、細胞透過性である。したがって、本開示は、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質の使用を企図する。一例では、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質はまた、核透過性である。換言すれば、結合タンパク質は、細胞の細胞質に隔離されたままではなく、細胞の核に入り、ＤＮＡに結合することができる。この例では、抗ＤＮＡ結合タンパク質は、核透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質と称され得る。一例では、核透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、細胞核からのＤＮＡの放出を阻害する。例えば、核透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、好中球及び／又は好中球様細胞の核からのＤＮＡの放出を阻害し得る。一例では、細胞核からのＤＮＡ放出の阻害は、培養条件下で決定さ

れる。

【００６２】

一例では、結合タンパク質は、自己免疫疾患を有する対象又は動物に由来する自己抗体である。一例では、自己抗体は、全身性エリテマトーデスを有する対象、又はその動物モデルに由来する。本明細書で使用される「由来する（ｄｅｒｉｖｅｄ）」という用語は、以下で論じられる方法などの組換え技術を使用して産生される本開示の抗体の組換え形態を包含する。例えば、全身性エリテマトーデスを有する対象又はその動物モデル由来の自己抗体をコードする核酸配列を組換え系に提供して、抗体の組換え形態を産生し得る。一例では、自己抗体は、ＤＮＡに結合する。一例では、自己抗体は、細胞透過性である。抗ＤＮＡ自己抗体の例は、当該技術分野で既知である（Ｈａｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．，４：１５７ｒａｌ４２、Ｎｏｂｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．，７５：２２８５－２２９１、Ｎｏｂｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．，１２：４２９－３４）。一例では、自己抗体は、３Ｅ１０（すなわち、配列番号７を含むＶＨ及び配列番号８を含むＶＬを有する抗体）又はそのヒト化形態である。

【００６３】

一例では、本開示による抗ＤＮＡ結合タンパク質は、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有する重鎖可変領域（V_H）、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有する軽鎖可変領域（V_L）、又はそれらのヒト化形態を含む。したがって、一例では、本開示は、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有する重鎖可変領域（V_H）、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有する軽鎖可変領域（V_L）、又はそれらのヒト化形態を含む、結合タンパク質を包含する。一例では、当該結合タンパク質は、ＤＮＡへの結合に対して、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有する重鎖可変領域（V_H）、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有する軽鎖可変領域（V_L）、又はそれらのヒト化形態を含む、結合タンパク質と競合する。これらの例では、V_HＣＤＲ１は、むしろ、配列番号４０を含み得る。

【００６４】

一例では、結合タンパク質は、ＤＮＡ修復を阻害する。ＤＮＡ修復の阻害は、ＤＮＡを修復する細胞の能力を測定する前に、細胞をＤＮＡ損傷剤及び結合タンパク質と接触させることによってインビトロで評価され得る。一例では、細胞は、がん細胞である。一例では、ＤＮＡ修復の阻害は、損傷した細胞におけるアポトーシスのレベルに基づいて評価される。

【００６５】

抗体又はその断片などの本開示の結合タンパク質は、それらがＮＥＴ形成を阻害し得るという点で特に有用である。したがって、一例では、本開示は、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有する重鎖可変領域（V_H）、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有する軽鎖可変領域（V_L）、又はそれらのヒト化形態を含む、抗体又はその断片を包含し、抗体又はその断片は、培養条件下での好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する。一例では、V_HＣＤＲ１は、むしろ配列番号４０を含み得る。

【００６６】

本開示はまた、上記の例のヒト化形態及びＣＤＲバリアントを包含する。したがって、別の例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣ

ＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【００６７】

別の例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号９に示されるＣＤＲ１、配列番号１１に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１４に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号９に示されるＣＤＲ１、配列番号１１に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１４に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。別の例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号９に示されるＣＤＲ１、配列番号１１に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１４に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$を含む。

【００６８】

別の例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。上記の例では、ＣＤＲは、少なくとも１つのアミノ酸置換に対する対象である。別の例では、ＣＤＲは、少なくとも２つのアミノ酸置換に対する対象である。別の例では、ＣＤＲは、少なくとも３つのアミノ酸置換に対する対象である。一例では、置換（複数可）は、ＣＤＲ１にある。別の例では、置換（複数可）は、ＶＨ　ＣＤＲ１にある。別の例では、置換（複数可）は、ＶＬ　ＣＤＲ２にある。別の例では、置換（複数可）は、ＶＨ　ＣＤＲ２にある。

【００６９】

別の例では、抗体又はその断片は、配列番号６に示されるＣＤＲ１、配列番号７に示されるＣＤＲ２、及び配列番号８に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、又はそのヒト化形態を含む。

【００７０】

一例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号１８～２１のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２～２５のうちのいずれか１つに示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８～２１のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２～２５のうちのいずれか１つに示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【００７１】

一例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。一例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$及び配列番号２２に示されるＶ$_L$を含む。

【００７２】

一例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を

含むＶ$_H$、及び配列番号２３に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２３に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【００７３】

一例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２４に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２４に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【００７４】

一例では、抗体又はその断片のヒト化形態は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２５に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２５に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【００７５】

好適な抗ＤＮＡ結合タンパク質の他の例は、当該技術分野で既知である（Ｚａｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５４：１９８７－１９９４、Ｇｕ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１：６９９９－７００６、Ｎｏｂｌｅ ｅｔ ａｌ（２０１４）Ｓｃｉ Ｒｅｐ．，４：５９５８、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ２４３９ハイブリドーマ、ＷＯ２０１９／０１８４２６）。一例では、抗体は、抗グアノシン抗体ではない。

【００７６】

一例では、抗ＤＮＡ結合タンパク質は、細胞透過性抗ＤＮＡ Ｆｖなどの断片であり得る。一例では、Ｆｖは、ｓｃＦｖである。一例では、断片は、抗原結合ドメインを有し、抗原結合ドメインは、ＤＮＡに結合するか、又は特異的に結合する。例えば、Ｆｖは、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_L$を有する抗体と同じエピトープに結合し得る。別の例では、Ｆｖは、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_L$を有する抗体と同じエピトープに結合し得る。別の例では、Ｆｖは、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２３に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_L$を有する抗体と同じエピトープに結合し得る。別の例では、Ｆｖは、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_L$を有する抗体と同じエピトープに結合し得る。別の例では、Ｆｖは、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_L$を有する抗体と同じエピトープに結合し得る。一例では、Ｆｖは、ｓｃＦｖである。

【００７７】

一例では、Ｆｖは、リンカーを含む。それらの設計のための様々な好適なリンカー及び方法は、以前に記載されている（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、ＷＯ１９９４／０１２５２０、及び米国特許第４，７０４，６９２号）。一例では、Ｆｖは、グリシン－セリン（ＧＳ）リンカーを含む。一例では、Ｆｖは、配列番号２６に示される配列を含むリンカーを含む。

【００７８】

一例では、ＦｖのＶ$_H$及びＶ$_L$は、単一のポリペプチド鎖にあり得る。別の例では、Ｆｖは、Ｆｃ領域を欠いている。例えば、Ｆｖは、単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）、二量体ｓｃＦｖ（ｄｉ－ｓｃＦｖ）、三量体ｓｃＦｖ（ｔｒｉ－ｓｃＦｖ）であり得る。一例では、Ｆｖは、ｓｃＦｖである。一例では、Ｆｖは、ｄｉ－ｓｃＦｖである。複数のｓｃＦｖは、リンカーにより分離されていてもよい。一例では、リンカーは、配列番号２７に示される配列を含む。

【００７９】

したがって、一例では、結合タンパク質は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８

に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２２に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｓｃＦｖであり得る。

【００８０】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２３に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２３に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｓｃＦｖであり得る。

【００８１】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２４に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２４に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｓｃＦｖであり得る。

【００８２】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２５に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２５に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｓｃＦｖであり得る。

【００８３】

したがって、別の例では、結合タンパク質は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２２に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２２に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｄｉ－ｓｃＦＶであり得る。

【００８４】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２３に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２３に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｄｉ－ｓｃＦｖであり得る。

【００８５】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２４に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２４に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｄｉ－ｓｃＦｖであり得る。

【００８６】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２５に示されるV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２５に示されるV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアント、並びに配列番号２７に示される配列を含むｓｃＦｖを分離するリンカーを含むｄｉ－ｓｃＦｖであり得る。

【００８７】

別の例では、結合タンパク質は、配列番号３８に示されるアミノ酸配列を含むｄｉ－ｓｃＦｖである。

【００８８】

一例では、Ｆｖは、ｔｒｉ－ｓｃＦｖである。

【００８９】
別の例では、ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、又はｔｒｉ－ｓｃＦｖは、抗体の定常領域、Ｆｃ、又は重鎖定常ドメインC_H2及び／又はC_H3に連結され得る。一例では、ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、又はｔｒｉ－ｓｃＦｖは、ヒンジ領域によって、抗体の定常領域、Ｆｃ、又は重鎖定常ドメインC_H2及び／又はC_H3に連結される。一例では、ヒンジ領域は、配列番号２８に示される配列を含む。
【００９０】
一例では、結合タンパク質は、抗原結合ドメインを有するｄｉ－ｓｃＦｖであり、抗原結合ドメインは、ＤＮＡに結合するか、又は特異的に結合する。
【００９１】
別の例では、結合タンパク質のV_H及びV_Lは、別個のポリペプチド鎖にある。例えば、結合タンパク質は、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$であり得る。別の例では、結合タンパク質は、別個のポリペプチド鎖にV_H及びV_Lを含むＦｖであり得る。これらの例では、結合タンパク質は、抗体の定常領域、Ｆｃ、又は重鎖定常ドメインC_H2及び／又はC_H3に連結され得る。別の例では、結合タンパク質は、無傷の抗体であり得る。したがって、一例では、本開示は、抗原結合ドメインを有する抗体を包含し、抗原結合ドメインは、ＤＮＡに結合するか、又は特異的に結合する。例えば、抗体は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。別の例では、抗体は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２２に示されるアミノ酸配列を含むV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２２に示されるＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。
【００９２】
別の例では、抗体は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２３に示されるアミノ酸配列を含むV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２３に示されるＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。
【００９３】
別の例では、抗体は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含むV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２４に示されるＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。
【００９４】
別の例では、抗体は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含むV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２５に示されるＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。
【００９５】
別の例では、抗体は、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有するV_L、又はそれらのヒト化形態を含む、無傷の抗体である。一例では、抗体は、キメラ抗体である。一例では、V_HＣＤＲ１は、むしろ配列番号４０を含み得る。
【００９６】
別の例では、抗体は、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶＬ、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号９若しくは配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１１若しくは配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶＨ、

並びに配列番号１４若しくは配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶＬを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。抗体のＣ$_H$１及びＣ$_H$２ドメインは、ヒンジ領域によって連結され得る。一例では、ヒンジ領域は、配列番号２８に示される配列を含む。

【００９７】

別の例では、抗体は、配列番号９に示されるＣＤＲ１、配列番号１１に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１４に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号９に示されるＣＤＲ１、配列番号１１に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１４に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。

【００９８】

別の例では、抗体は、配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１０に示されるＣＤＲ１、配列番号１２に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_H$、並びに配列番号１５に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。

【００９９】

一例では、抗体は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２２に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。

【０１００】

一例では、抗体は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２３に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２３に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。

【０１０１】

一例では、抗体は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２４に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２４に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。

【０１０２】

一例では、抗体は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２５に示されるＶ$_L$、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶ$_H$、及び配列番号２５に示されるＶ$_L$を含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む、無傷の抗体である。

【０１０３】

一例では、抗体は、配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含む無傷の抗体である。

【０１０４】

当技術分野で知られているように、抗体は、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭなどの異なるアイソタイプで生じ得る。一例では、本開示によって包含される抗体は、ＩｇＧである。

【０１０５】

一例では、結合タンパク質は、核酸分解抗体などの「核酸分解結合タンパク質」である

。これらの結合タンパク質は、ＲＮＡ又はＤＮＡなどの核酸の切断をもたらし、かつ触媒し得る。核酸分解結合タンパク質は、ＤＮＡ又はＲＮＡを認識し、それらと相互作用して、ＤＮＡ又はＲＮＡとの接触領域で、又はそれの近くでヌクレオチド－ヌクレオチド連結の切断をもたらし得る。したがって、ある特定の例では、本開示の結合タンパク質は、「核酸分解」活性を有し得る。「核酸分解」という用語は、この文脈では、例えば、加水分解によって、核酸間のヌクレオチド－ヌクレオチド連結を切断し得る結合タンパク質を指すために使用される。一例では、結合タンパク質は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を有するV_H、及び配列番号３４に示されるアミノ酸配列を有するV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を有するV_H、及び配列番号３４に示されるアミノ酸配列を有するV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。一例では、抗体は、配列番号３１に示されるＣＤＲ１、配列番号３２に示されるＣＤＲ２、配列番号３３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号３５に示されるＣＤＲ１、配列番号３６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号３７に示されるＣＤＲ３を有するV_L、又はＤＮＡへの結合に対して、配列番号３１に示されるＣＤＲ１、配列番号３２に示されるＣＤＲ２、配列番号３３に示されるＣＤＲ３を有するV_H、並びに配列番号３５に示されるＣＤＲ１、配列番号３６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号３７に示されるＣＤＲ３を有するV_Lを含む抗体と競合するそれらのバリアントを含む。

【０１０６】

核酸分解抗体の例は、Ｎｏｂｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｓｃｉ　Ｒｅｐ－Ｕｋ．，４：５９５８に開示されている。

【０１０７】

別の例では、本開示の結合タンパク質は、ＤＮＡの分解を促進することなくＤＮＡに結合し得る。

【０１０８】

一例では、抗体は、モノクローナルである。モノクローナル抗体は、本開示によって企図される抗体の一例示的な形態である。「モノクローナル抗体」又は「ＭＡｂ」という用語は、同じ抗原（複数可）に対して、例えば、抗原内の同じエピトープに対して結合することができる均質な抗体集団を指す。この用語は、抗体の供給源又は抗体を作製する方式に関して限定されるようには意図されていない。

【０１０９】

一例では、本開示によって包含される抗体は、「ヒト化」され得る。一例では、ＣＤＲは、ヒト化される。「ヒト化抗体」は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する免疫グロブリン分子である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲの残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が含まれる。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、持ち込まれたＣＤＲ又はフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。概して、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ＣＤＲ領域の全て又は実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク（ＦＲ）領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。一例では、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分を含むであろう（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２－５２５（１９８６）、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２９（１９８８）、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２））。一例では、本開示の抗体は、対象の脳にペイロードを送達するために用いられる。

【０１１０】

結合タンパク質は、当該技術分野で既知の様々な方法を使用して、ＤＮＡへの結合に対

して参照結合タンパク質と競合するそれらの能力によって特定され得る。例えば、本開示の抗ＤＮＡ結合タンパク質は、確立された手順を使用してビオチンとコンジュゲートされる（Ｈｏｆｍａｎｎ Ｋ，ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２１：９７８－８４）。次に、ＤＮＡへのビオチン化抗体の結合と競合する能力によって、候補結合タンパク質を評価する。ビオチン化抗体のＤＮＡへの結合は、標識された結合タンパク質上のビオチンに結合するフルオレセイン標識ストレプトアビジンの添加によって評価され得る。次いで、蛍光染色を定量し、結合タンパク質（複数可）の競合効果を、候補競合物の非存在下で得られた蛍光レベルに対するパーセンテージとして表す。他の例では、親和性測定を使用して、候補結合タンパク質の競合効果を決定する。親和性測定値は、抗体反応の標準的な方法論、例えば、イムノアッセイ、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）（Ｒｉｃｈ ａｎｄ Ｍｙｓｚｋａ Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １１：５４，２０００、Ｅｎｇｌｅｂｉｅｎｎｅ Ａｎａｌｙｓｔ．１２３：１５９９，１９９８）、等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）、又は当該技術分野で既知の他の動態相互作用アッセイによって決定され得る。一例では、定数は、表面プラズモン共鳴アッセイを使用する、例えば、固定化されたＤＮＡを用いるＢＩＡｃｏｒｅ表面プラズモン共鳴（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を使用することによって測定される。例示的なＳＰＲ方法は、米国特許第Ｎｏ．７，２２９，６１９号に記載されている。

【０１１１】

抗体断片

単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片

当業者は、ｓｃＦｖが、単一のポリペプチド鎖内のV_H及びV_L領域、並びにｓｃＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする（すなわち、単一のポリペプチド鎖のV_H及びV_Lが互いに会合してＦｖを形成するための）V_HとV_Lとの間のポリペプチドリンカーを含むことを認識するであろう。単鎖可変断片は、完全抗体分子に見出される定常Ｆｃ領域を欠くため、免疫原性が低くなり得る。例示的なリンカーは、１２個を超えるアミノ酸残基を含み、$(Gly_4Ser)_3$は、ｓｃＦｖに対してより好ましいリンカーのうちの１つである。好適なリンカーの別の例は、配列番号２６に提供される。

【０１１２】

本開示はまた、単一のシステイン残基が、V_HのＦＲ及びV_LのＦＲ、並びにジスルフィド結合によって結合されたシステイン残基に導入されて安定したＦｖをもたらす、ジスルフィド安定化Ｆｖ（又はｄｉＦｖ又はｄｓＦｖ）も企図する。

【０１１３】

別の例では、本開示は、二量体ｓｃＦｖ（ｄｉ－ｓｃＦＶ）、すなわち、非共有結合若しくは共有結合によって、例えば、ロイシンジッパードメイン（例えば、Ｆｏｓ又はＪｕｎに由来する）によって連結された２つのｓｃＦｖ分子を含むタンパク質、又は三量体ｓｃＦＶ（ｔｒｉ－ｓｃＦｖ）を包含する。別の例では、２つのｓｃＦｖは、例えば、米国公開出願第２００６０２６３３６７号に記載のような、ｓｃＦｖの両方が形成され、抗原に結合することを可能にするのに十分な長さのペプチドリンカーによって連結される。例示的なリンカーは、配列番号２７に提供される。

【０１１４】

ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ

いくつかの例では、本開示の抗原結合断片は、ＷＯ９８／０４４００１及び／又はＷＯ９４／００７９２１に記載のものなどの、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、又は高次タンパク質複合体であるか、又はダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、又は高次タンパク質複合体を含む。

【０１１５】

例えば、ダイアボディは、２つの会合したポリペプチド鎖を含むタンパク質であり、各ポリペプチド鎖は、構造V_L-X-V_H又はV_H-X-V_Lを含み、Ｘは、単一ポリペプチド鎖内のV_H及びV_Lが会合する（又はＦｖを形成する）ことを可能にするには不十分な残基を含むリンカーであるか、又は存在せず、一方のポリペプチド鎖のV_Hは、他方の

ポリペプチド鎖のV_Lに結合して、抗原結合部位を形成する、すなわち、１つ以上の抗原に特異的に結合することができるＦｖ分子を形成する。V_L及びV_Hは、各ポリペプチド鎖において同じであり得るか、又はV_L及びV_Hは、二重特異性ダイアボディを形成するために、各ポリペプチド鎖において異なり得る（すなわち、異なる特異性を有する２つのＦｖを含む）。

【０１１６】

他の抗体及び抗体断片

本開示によって包含される抗体の他の例としては、

（ｉ）米国特許第５，７３１，１６８号に記載の「鍵及び鍵穴」二重特異性タンパク質、

（ｉｉ）例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に記載のヘテロコンジュゲートタンパク質、

（ｉｉｉ）例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に記載の化学的クロスリンカーを使用して産生されたヘテロコンジュゲートタンパク質、及び

（ｉｖ）Fab_3（例えば、ＥＰ１９９３０３０２８９４に記載のような）が挙げられる。

【０１１７】

結合タンパク質産生

組換え発現

一例では、結合タンパク質は、組換え型である。

【０１１８】

抗体又はその断片などの組換え結合タンパク質の場合、それをコードする核酸を発現ベクターにクローニングし得、次いで、これは、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又はサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胚性腎臓（ＨＥＫ）細胞、若しくは他の方法では免疫グロブリン若しくは抗体タンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの哺乳動物細胞などの宿主細胞にトランスフェクションされる。

【０１１９】

好適な分子クローニング技術は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｉｔｏｒｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８、現在までの全ての最新情報を含む）又はＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）に記載されている。幅広い種類のクローニング及びインビトロ増幅の方法が組換え核酸の構築に好適である。組換え抗体を産生する方法もまた当技術分野で既知である。米国特許第４，８１６，５６７号又は米国特許第５，５３０，１０１号を参照されたい。

【０１２０】

単離後、核酸は、更なるクローニング（ＤＮＡの増幅）のため、又は無細胞系若しくは細胞内で発現させるために、発現構築物又は発現ベクター内のプロモーターと作動可能に連結される。したがって、本開示の別の例は、本開示の結合タンパク質をコードする単離された核酸及び１つ以上の追加のヌクレオチド配列を含む発現構築物を提供する。好適には、発現構築物は、当該技術分野で理解されるように、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、酵母、又は細菌人工染色体の形態であるか、又はプラスミド、バクテリオファージ、コスミド、酵母、又は細菌人工染色体の遺伝的構成要素を含む。発現構築物は、細菌又は他の宿主細胞における単離された核酸の維持及び増殖、組換えＤＮＡ技術による操作、及び／又は本開示の結合タンパク質をコードする核酸の発現に好適であり得る。

【０１２１】

細胞内での発現のための多くのベクターが利用可能である。ベクター構成要素は、概して、シグナル配列（例えば、配列番号２９）、結合タンパク質をコードする配列（例えば、本明細書に提供されるアミノ酸配列情報に由来する）、エンハンサー要素、プロモータ

ー、及び転写終結配列のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。例示的なシグナル配列としては、原核生物分泌シグナル（例えば、ｐｅｌＢ、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐ、又は熱安定性エンテロトキシンＩＩ）、酵母分泌シグナル（例えば、インベルターゼリーダー、α因子リーダー、又は酸性ホスファターゼリーダー）、又は哺乳動物分泌シグナル（例えば、単純ヘルペスｇＤシグナル）が挙げられる。

【０１２２】

哺乳動物細胞において活性な例示的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス前初期プロモーター（ＣＭＶ－ＩＥ）、ヒト伸長因子１－αプロモーター（ＥＦ１）、小核ＲＮＡプロモーター（Ｕ１ａ及びＵ１ｂ）、α－ミオシン重鎖プロモーター、サルウイルス４０プロモーター（ＳＶ４０）、ラウス肉腫ウイルスプロモーター（ＲＳＶ）、アデノウイルス主要後期プロモーター、βアクチンプロモーター、ＣＭＶエンハンサー／βアクチンプロモーターを含むハイブリッド制御エレメント、若しくは免疫グロブリン若しくは抗体プロモーター又はその活性断片が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）、ヒト胚性腎臓株（２９３細胞又は懸濁培養下での増殖のためにサブクローニングされた２９３細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１０）、又はチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）である。

【０１２３】

例えば、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、及びＳ．ｐｏｍｂｅを含む群から選択される酵母細胞などの酵母細胞における発現に好適な代表的なプロモーターには、ＡＤＨ１プロモーター、ＧＡＬ１プロモーター、ＧＡＬ４プロモーター、ＣＵＰ１プロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ｎｍｔプロモーター、ＲＰＲ１プロモーター、又はＴＥＦ１プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２４】

発現のために単離された核酸又はそれを含む発現構築物を細胞に導入するための手段は当業者に既知である。所与の細胞のために使用される技術は、既知の成功した技術に依存する。組換えＤＮＡを細胞内に導入するための手段としては、とりわけ、マイクロインジェクション、ＤＥＡＥ－デキストランによって媒介される形質移入、リポフェクタミン（Ｇｉｂｃｏ、ＭＤ，ＵＳＡ）及び／又はセルフェクチン（Ｇｉｂｃｏ，ＭＤ，ＵＳＡ）の使用によるなど、リポソームによって媒介される形質移入、ＰＥＧ媒介ＤＮＡ取込み、エレクトロポレーション、及びＤＮＡコーティングされたタングステン又は金の粒子（Ａｇｒａｃｅｔｕｓ　Ｉｎｃ．、ＷＩ，ＵＳＡ）の使用によるなどの微粒子衝撃が挙げられる。

【０１２５】

結合タンパク質の産生に使用される宿主細胞は、使用される細胞型に応じて様々な培地で培養され得る。Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭｌ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、及びダルベッコ改変イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）などの市販の培地は、哺乳動物細胞の培養に好適である。本明細書で論じられる他の細胞タイプを培養するための培地は、当技術分野で知られている。

【０１２６】

当業者は、前述の説明から、本開示が、本開示の結合タンパク質をコードする単離された核酸も提供することを理解するであろう。

【０１２７】

本開示はまた、プロモーターに作動可能に連結された本開示の単離された核酸を含む発現構築物を提供する。一例では、発現構築物は、発現ベクターである。

【０１２８】

一例では、本開示の発現構築物は、プロモーターに作動可能に連結されたポリペプチド（例えば、V_Hを含む）をコードする核酸、及びプロモーターに作動可能に連結された別のポリペプチド（例えば、V_Lを含む）をコードする核酸を含む。

【０１２９】

本開示はまた、本開示による発現構築物を含む宿主細胞を提供する。

【０１３０】

本開示はまた、本開示の結合タンパク質を発現する単離された細胞、又は結合タンパク質を発現するように遺伝子改変された組換え細胞を提供する。

【０１３１】

本開示による抗体を精製するための方法は、当該技術分野で既知であり、及び／又はＷＯ２０１９／０１８４２６などの刊行物に記載されている。

【０１３２】

組成物

本開示は、対象に投与するための医薬組成物を含む。例示的な組成物は、上記の結合タンパク質のうちの１つ以上を含む。

【０１３３】

組成物はまた、結合タンパク質の投与のための薬学的に許容される担体又はアジュバントを含有し得る。いくつかの実施形態では、担体は、ヒトにおける使用に対して薬学的に許容される。担体又はアジュバントは、それ自体が、組成物を受ける個体に有害な抗体の産生を誘導してはならず、毒性であってはならない。好適な担体は、タンパク質、ポリペプチド、リポソーム、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、及び不活性ウイルス粒子などの、大きく、ゆっくり代謝される巨大分子であり得る。

【０１３４】

薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩及び硫酸塩などの鉱酸塩、又は酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、及び安息香酸塩などの有機酸塩が使用され得る。

【０１３５】

治療組成物中の薬学的に許容される担体は、更に、水、生理食塩水、グリセロール、及びエタノールなどの液体を含有し得る。更に、湿潤剤又は乳化剤又はｐＨ緩衝物質などの補助物質がそのような組成物中に存在し得る。

【０１３６】

本明細書に開示される主題の組成物は、組成物の調製及び投与を容易にするための担体を更に含み得る。マイクロカプセル、例えば、マイクロスフィア又はナノスフィア（Ｍａｎｏｍｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　５４：５４０８－５４１３、Ｓａｌｔｚｍａｎ　＆　Ｆｕｎｇ（１９９７）Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ　２６：２０９－２３０）、グリコサミノグリカン（米国特許第６，１０６，８６６号）、脂肪酸（米国特許第５，９９４，３９２号）、脂肪エマルション（米国特許第５，６５１，９９１号）、脂質又は脂質誘導体（米国特許第５，７８６，３８７号）、コラーゲン（米国特許第５，９２２，３５６号）、多糖類又はその誘導体（米国特許第５，６８８，９３１号）、ナノ懸濁液（米国特許第５，８５８，４１０号）、ポリマーミセル又はコンジュゲート（Ｇｏｌｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　５７：１４４７－１４５１及び米国特許第４，５５１，４８２号、同第５，７１４，１６６号、同第５，５１０，１０３号、同第５，４９０，８４０号、及び同第５，８５５，９００号）、及びポリソーム（米国特許第５，９２２，５４５号）を含むが、これらに限定されない任意の好適な送達ビヒクル又は担体が使用され得る。

【０１３７】

本発明の組成物は、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を含み得る。好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、殺菌性抗生物質、及び製剤を対象とするレシピエントの体液と等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性の等張滅菌注射溶液、並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量又は複数回用量の容器、例えば、密封されたアンプル及びバイアルで提供され得、使用直前に注射用の、滅菌液体担体、例えば、水の添加のみを必要とする凍結又はフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保管され得る。いくつかの例示的な成分は、０．１～１０ｍｇ／ｍｌ、

約２．０ｍｇ／ｍｌの範囲のＳＤＳ、及び／又は１０～１００ｍｇ／ｍｌ、いくつかの実施形態では約３０ｍｇ／ｍｌの範囲のマンニトール又は別の糖、及び／又はリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）である。対象とする製剤の種類を考慮して、当該技術分野で慣用的な任意の他の薬剤が使用され得る。いくつかの例では、担体は、薬学的に許容される。いくつかの例では、担体は、ヒトにおける使用に対して薬学的に許容される。

【０１３８】

本開示の組成物は、５．５～８．５、好ましくは６～８、及びより好ましくは約７のｐＨを有し得る。ｐＨは、緩衝液の使用によって維持され得る。組成物は、無菌及び／又はパイロジェンフリーであり得る。組成物は、ヒトに関して等張であり得る。本明細書に開示される主題の組成物は、密閉された容器に供給され得る。

【０１３９】

組成物は、本明細書に記載される有効量の１つ以上の結合タンパク質を含み得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、所望の疾患若しくは状態を治療、改善、若しくは予防するのに、又は検出可能な治療効果を示すのに十分な量を含み得る。例えば、いくつかの例では、組成物は、培養条件下で、又はそれを必要とする対象において、例えば、対照と比較して、好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成又はＮＥＴｏｓｉｓを低減するための有効量の１つ以上の結合タンパク質を含む。いくつかの例では、組成物は、疾患又は障害の１つ以上の症状を低減又は予防するための有効量で、好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成又はＮＥＴｏｓｉｓを低減するための有効量の１つ以上の結合タンパク質を含む。

【０１４０】

本開示の結合タンパク質及びそれを含む組成物は、投与方法に応じて様々な単位剤形で投与され得る。抗体又は断片医薬組成物などの典型的な結合タンパク質の投薬量は、当業者に周知である。そのような投薬量は、典型的には、本来、推奨値であり、特定の治療状況又は患者の忍容性に応じて調整される。これを達成するための適切な量の結合タンパク質は、「治療有効用量」として定義される。この使用に有効な投薬スケジュール及び量、すなわち「投薬レジメン」は、疾患又は状態の段階、疾患又は状態の重症度、患者の健康の一般的な状態、患者の身体状態、年齢、医薬製剤、及び活性剤の濃度などを含む様々な因子に依存する。患者の投薬量レジメンを計算する際に、投与様式も考慮される。投薬量レジメンはまた、薬物動態、すなわち、医薬組成物の吸収速度、生物学的利用能、代謝、クリアランスなども考慮に入れる必要がある。例えば、最新のＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ；Ｅｇｌｅｔｏｎ，Ｐｅｐｔｉｄｅｓ　１８：１４３１－１４３９，１９９７、Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：１５２７－１５３３，１９９０を参照されたい。

【０１４１】

投与経路には、注射、皮下、筋肉内、関節内、静脈内、動脈内が含まれるが、これらに限定されない。一例では、結合タンパク質は、静脈内投与を介して送達される。別の例では、結合タンパク質は、皮下投与を介して送達される。別の例では、結合タンパク質は、注射を介して送達される。別の例では、結合タンパク質は、注入を介して送達される。別の例では、結合タンパク質は、関節内注射を介して関節空間に送達される。別の例では、結合タンパク質は、関節内注射を介して関節炎性関節に送達される。

【０１４２】

組成物は、単回用量治療で、又は複数回用量治療で、対象の年齢、体重、及び状態、使用される特定の結合タンパク質製剤、及び投与経路に適切なスケジュール及び期間にわたって投与され得る。

【０１４３】

治療、診断、又は監視される状態

本開示の方法は、様々な炎症性疾患の治療、予防、画像化、及び診断を包含する。本明細書で使用される場合、「炎症性疾患」という用語は、ＮＥＴ形成又はＮＥＴｏｓｉｓに関連する疾患を包含するように解釈される必要がある。一例では、疾患は、ＮＥＴ形成又はＮＥＴｏｓｉｓの増加に関連している。例示的な炎症性疾患としては、嚢胞性線維症、虚血、心血管疾患、歯周炎、線維症、掻痒症、皮膚の炎症、乾癬、多発性硬化症、関節リ

ウマチ、変形性関節症、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、Ｉ型又はＩＩ型糖尿病、糖尿病性腎症、喘息、炎症性肝損傷、炎症性糸球体損傷、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、刺激性接触性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、シェーグレン症候群、角結膜炎、ブドウ膜炎、血管炎、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、急性又は慢性の特発性炎症性関節炎、筋炎、脱髄性疾患、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺疾患、間質性腎炎、慢性活動性肝炎、痛風、代謝性疾患、肥満に関連する炎症、創傷治癒の遅れ、外傷、敗血症、敗血症性関節、敗血症性関節炎、無菌性関節炎が挙げられる。

【０１４４】

例えば、炎症性障害は、創傷治癒の遅延であり得る。一例では、創傷治癒の遅延は、糖尿病に続発する。代謝性疾患の例としては、糖尿病及び肥満が挙げられる。

【０１４５】

一例では、炎症性疾患は、自己免疫疾患である。自己免疫疾患の例としては、ループス、関節リウマチ、及びＡＮＣＡ関連血管炎（ＡＡＶ）が挙げられる。一例では、炎症性疾患は、血管炎である。例えば、炎症性疾患は、ＡＮＣＡ関連血管炎（ＡＡＶ）であり得る。ＡＡＶは、多系統自己免疫性小血管炎の群の包括的な用語である。ＡＡＶ疾患には、顕微鏡的多発血管炎、多発血管炎を伴う肉芽腫症（ＧＰＡ、以前は「ウェゲナー肉芽腫症」）、及び多発血管炎を伴う好酸球性肉芽腫症（ＥＧＰＡ、以前は「チャーグ・ストラウス症候群」）が含まれる。一例では、血管炎の治療は、部分壊死の低減によって特徴付けられる。例えば、部分壊死を伴う糸球体のパーセンテージが、治療後に低減する。一例では、血管炎の治療は、糸球体浸潤の低減によって特徴付けられる。一例では、糸球体マクロファージレベルが、治療後に減少する。別の例では、糸球体好中球レベルが、治療後に減少する。

【０１４６】

別の例では、炎症性疾患は、肺炎、好中球性喘息、好中球媒介性アナフィラキシー、炎症性肺損傷、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）からなる群から選択される。

【０１４７】

別の例では、炎症性疾患は、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）である。一例では、ＡＲＤＳは、中等度又は重度である。

【０１４８】

別の例では、炎症性疾患は、ライノウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、又はコロナウイルスなどのウイルス感染によって引き起こされる。一例では、ウイルス感染は、コロナウイルスによって引き起こされる。一例では、コロナウイルスは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、又は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）である。

【０１４９】

特定の例において、炎症性疾患は、コロナウイルス疾患１９（ＣＯＶＩＤ－１９）である。

【０１５０】

一例では、炎症性疾患は、移植片対宿主疾患である。一例では、炎症性疾患は、線維症である。例としては、肺及び腎臓の線維症が挙げられる。

【０１５１】

一例では、炎症性疾患は、糸球体腎炎である。

【０１５２】

一例では、炎症性疾患は、敗血症である。

【０１５３】

一例では、炎症性疾患は、敗血症性又は無菌性関節炎である。

【０１５４】

一例では、炎症性疾患は、びまん性血管内凝固（ＤＩＣ）である。

【０１５５】

一例では、炎症性疾患は、血栓症又は静脈塞栓症、播種性血管内凝固、虚血／再灌流傷害、心筋梗塞、又は脳卒中などの血栓炎症性疾患である。

【０１５６】

一例では、炎症性疾患は、神経変性障害である。例えば、炎症性疾患は、多発性硬化症であり得る。一例では、炎症性疾患は、アルツハイマー病である。

【０１５７】

治療方法及び予防方法

本開示の結合タンパク質がＮＥＴ形成を阻害することができることを示す知見を考慮して、様々な治療及び予防用途が想定される。一例では、本開示は、本明細書に記載の結合タンパク質又は組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、治療方法又は予防方法を包含する。一例では、対象は、炎症性疾患を有する。

【０１５８】

したがって、一例では、本開示は、本明細書に開示の結合タンパク質又は組成物を対象に投与することを含む、対象における炎症性疾患を治療する方法を提供する。

【０１５９】

一例では、本開示は、対象における炎症性疾患を治療する方法であって、配列番号１に示されるＣＤＲ１、配列番号２に示されるＣＤＲ２、配列番号３に示されるＣＤＲ３を有するＶＨ、並びに配列番号４に示されるＣＤＲ１、配列番号５に示されるＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるＣＤＲ３を有するＶＬ、又はそれらのヒト化形態を含む、結合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。一例では、V_HＣＤＲ１は、むしろ配列番号４０を含み得る。例えば、方法は、配列番号９に示されるＣＤＲ１、配列番号１１に示されるＣＤＲ２、配列番号１３に示されるＣＤＲ３を有するＶＨ、並びに配列番号１４に示されるＣＤＲ１、配列番号１６に示されるＣＤＲ２、及び配列番号１７に示されるＣＤＲ３を有するＶＬを含む、結合タンパク質を投与することを含み得る。

【０１６０】

別の例では、本開示は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号２２に示されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む結合タンパク質を投与することを含む、対象における炎症性疾患を治療する方法を提供する。

【０１６１】

別の例では、本開示は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号８に示されるＶＬ、又はそれらのヒト化形態を含む結合タンパク質を投与することを含む、対象における炎症性疾患を治療する方法を提供する。

【０１６２】

別の例では、治療は、本明細書に開示の核酸分解結合タンパク質を投与することを含む。

【０１６３】

本開示の予防方法は、対象におけるＮＥＴ形成を防止するため、又は対象におけるＮＥＴ形成を低減するために、対象に、本明細書に開示の細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを包含する。一例では、対象は、炎症性疾患を有する。別の例では、対象は、炎症性疾患を発症するリスクがある。例えば、対象は、炎症性疾患から寛解しているか、又はＮＥＴｏｓｉｓを引き起こすと予想される傷害若しくは感染若しくは曝露をこうむっていてもよい。したがって、一例では、本開示は、対象における好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を防止する方法であって、方法が、対象に、本明細書に開示の結合タンパク質を投与することを含み、結合タンパク質が、培養条件下でのＮＥＴ形成を阻害する、方法を包含する。別の例では、本開示は、対象における好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する方法であって、方法が、対象に、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、培養条件下でＮＥＴ形成を阻害する、方法を包含する。

【０１６４】

一例では、本開示による治療される対象は、血栓症又は塞栓症の増加したリスクを有す

る。例えば、対象の炎症性障害は、血栓症又は塞栓症のリスクを増加させ得る。別の例では、対象は、血栓症又は塞栓症のリスクを増加させるウイルスに感染している。例えば、対象は、コロナウイルス感染症を有し得る。

【０１６５】

別の例では、本開示は、対象における炎症性疾患を治療するための医薬品の製造における、本明細書に開示の結合タンパク質又は組成物の使用を提供する。

【０１６６】

ＮＥＴによる血栓症又は塞栓症の形成の寄与を考慮して、別の例では、本開示の方法は、本明細書に開示の結合タンパク質を投与することによるこれらの事象の治療又は予防を包含する。一例では、本開示の方法は、対象における血栓症又は塞栓症を治療又は予防する方法であって、方法が、対象に、細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与することを含み、細胞透過性抗ＤＮＡ抗体が、培養条件下で好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）形成を阻害する、方法を包含する。別の例では、本開示の結合タンパク質は、血栓症又は塞栓症のリスクを低減するために予防的に対象に投与され得る。

【実施例】

【０１６７】

実施例１－ＤＸ１は、ＰＬＢ－９８５細胞を透過する

単離されたマウス又はヒト好中球を用いる作業は、それらの短い機能的寿命のために困難であり、顆粒球分化ＨＬ－６０及びそれらのサブクローンＰＬＢ－９８５ヒト急性骨髄性白血病細胞は、ＮＥＴｏｓｉｓ研究のための単離された好中球に対する信頼できる代替物を提供する。核透過性抗ＤＮＡ自己抗体３Ｅ１０及びその誘導体ＤＸ１は、標的細胞を透過するためにヌクレオシドトランスポーターＥＮＴ２の発現を必要とする。ＨＬ－６０細胞におけるＥＮＴ２の発現は以前に報告されており、ＤＸ１は、培養物中でＰＬＢ－９８５細胞の約１００％に浸透することが確認された（図１）。

【０１６８】

実施例２－ＤＸ１は、好中球様細胞によるＮＥＴ形成を阻害する

ＰＭＡで処理された好中球は、ＮＡＤＰＨオキシダーゼ（ＮＯＸ）媒介の活性酸素種（ＲＯＳ）の産生によって引き起こされるカスケードを受け、最終的にはＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを介したＮＥＴの放出をもたらす。分化ＰＬＢ－９８５／ＨＬ－６０細胞は、好中球の活性を反映し、ＤＮＡを脱凝縮し、ＮＥＴを放出することによってＰＭＡ刺激に応答し、それらのクロマチン脱凝縮は、ＤＡＰＩ染色によって可視化され得る。分化ＰＬＢ－９８５細胞を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で１時間処理し、続いて、ＰＭＡを添加し、その後、ＤＡＰＩ染色によってクロマチン状態を可視化した。クロマチン脱凝縮を示唆する拡散したＤＡＰＩ染色は、対照細胞の６７．５±１．６％、及びＤＸ１で前処理された細胞の３７．８±２．７％（Ｎ＝２）で観察された（図２Ａ、Ｂ）。

【０１６９】

ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎは、ＮＥＴｏｓｉｓで放出されるＤＮＡの可視化を促進する非透過性蛍光ＤＮＡ染色である。対照又は１０μＭのＤＸ１で処理し、ＰＭＡで刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞をＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎに曝露し、蛍光顕微鏡下で蛍光を可視化し、プレートリーダーによって定量した。ＤＸ１は、得られたＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎシグナルを有意に低減し、蛍光は、対照に対して、０．４０±０．０１に低減した（Ｐ＜０．０００１、Ｎ＝３）（図２Ｃ、２Ｄ）。この結果は、ＤＸ１によって媒介されるＤＮＡ放出の阻害と一致する。

【０１７０】

図２Ｃ、２ＤのＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色研究の結果は、分化ＰＬＢ－９８５細胞によるクロマチン脱凝縮及びＤＮＡ放出のＤＸ１媒介阻害と一致する。この効果を更に探査するために、ＤＮＡ－タンパク質放出を、ＰＭＡ刺激後の分化ＰＬＢ－９８５細胞によって、細胞培養におけるＮＥＴ－ＤＮＡの単離及び定量のための前述のプロトコルを使用して、分光光度法によるウェルに付着したＤＮＡ－タンパク質複合体を

再懸濁及び定量することによって、測定した。このアッセイは、ＮＥＴにおいて放出されたＤＮＡ－タンパク質複合体がウェルに少なくとも部分的に付着する一方で、無傷の細胞が、大部分が懸濁液中に留まるという概念に基づく。この区別は、細胞培養上清の吸引による付着性ＮＥＴ－ＤＮＡからの無傷の細胞の分離、続いて、付着性ＤＮＡ－タンパク質複合体の再懸濁及び分光光度法による定量を可能にする。

【０１７１】

このアッセイにおいて、未分化及び分化ＰＬＢ－９８５細胞のＰＭＡに対する応答の違いを確認するために、対照研究を実施した。未分化及び分化ＰＬＢ－９８５細胞を、対照又は３００ｎＭのＰＭＡで処理し、続いて、分光光度法によってウェルに付着した予想されるＮＥＴ－ＤＮＡを定量した。対照及びＰＭＡ刺激された未分化ＰＬＢ－９８５細胞は、ＰＭＡに対する未分化細胞による応答の予想される非存在と一致して、それぞれ、０．７３±０．０３及び０．９３±０．１２ｎｇ／μＬ（Ｐ＝０．１２、Ｎ＝３）の同様のＤＮＡ濃度をもたらした。対照的に、対照及びＰＭＡ刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞は、ＰＭＡに応答するＤＮＡの予想される放出と一致する、０．８３±０．０３及び４．４０±０．２７ｎｇ／μＬ（Ｐ＝０．００２、Ｎ＝３）のＤＮＡ濃度をもたらした（図３Ａ）。これらの知見は、分化ＰＬＢ－９８５細胞が、報告された分光光度法によって測定可能なＰＭＡに対する応答を伴う顆粒球様挙動を示したという結論を支持する。更に、ＰＭＡで処理された未分化ＰＬＢ－９８５細胞によるＤＮＡ放出に明らかな増加がないため、測定されたＤＮＡ濃度に対して非特異的ＰＭＡ毒性による大きな寄与はないといえる。

【０１７２】

次に、ＰＭＡによって刺激された分化ＰＬＢ－９８５細胞によるＤＮＡ放出に対する既知のＮＥＴｏｓｉｓ阻害剤の効果を検出するためのこのアッセイの能力を検証した。ヒストンシトルリン化を触媒するペプチジルアルギニンデイミナーゼ４（ＰＡＤ４）の活性は、顆粒球ＮＥＴｏｓｉｓにとって重要であり、小分子選択的ＰＡＤ４阻害剤ＧＳＫ４８４は、以前に、ＮＥＴ放出を阻害することが示されている。分化ＰＬＢ－９８５細胞を、０～５０μＭのＧＳＫ４８４で１時間処理した後、ＰＭＡで刺激し、続いて、分光光度法によって接着ＤＮＡを定量した。ＧＳＫ４８４は、分化ＰＬＢ－９８５細胞におけるＮＥＴｏｓｉｓの抑制と一致して、用量依存的に細胞外ＤＮＡを低減させた（図３Ｂ）。

【０１７３】

未分化及び分化ＰＬＢ－９８５細胞のＰＭＡに対する応答の違い、並びに既知のＰＡＤ４阻害剤ＧＳＫ４８４によって媒介されるＰＭＡに対する応答の観察された阻害は、分化ＰＬＢ－９８５細胞におけるＮＥＴｏｓｉｓに対するＤＸ１の効果を評価する際のＤＮＡ分光光度測定アッセイの使用を支持した。分化ＰＬＢ－９８５細胞を、対照緩衝液又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で１時間処理し、続いてＰＭＡの添加による刺激を行い、その後、上述の分光光度法によってＤＮＡ放出を定量した。結果は、対照培地で処理された未刺激細胞で得られたＤＮＡ含有量に対して表された。ＰＭＡ刺激は、相対ＤＮＡ含有量を４．５０±０．１４（Ｐ＜０．０００１、Ｎ＝３）に増加させたが、ＤＸ１は、ＤＮＡ放出の増加を１．８０±０．１１（Ｐ＜０．０００１、Ｎ＝３）に抑制した（図４）。これらの結果は、ＤＸ１によるＮＥＴｏｓｉｓの阻害、並びに上記のＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎアッセイの知見と一致する。

【０１７４】

実施例３－ＤＸ１は、好中球様細胞においてＨ３のシトルリン化を低減しない

ＰＡＤ４によるヒストンシトルリン化は、選択的ＰＡＤ４阻害剤ＧＳＫ４８４の標的となるＮＥＴｏｓｉｓにおける重要なステップである。対照又は１０μＭのＤＸ１で１時間処理された分化ＰＬＢ－９８５細胞を、ＰＭＡによって刺激し、細胞内容物を単離し、アクチンに対する正規化でウエスタンブロットによってＨ３Ｃｉｔ含有量について分析した。ＰＭＡでの対照細胞の刺激は、未刺激細胞に対してＨ３Ｃｉｔ含有量が０．６４±０．０６に低減することと関連しており、ＮＥＴ形成の過程におけるＨ３Ｃｉｔの放出と一致していた。対照的に、ＤＸ１で処理された細胞は、未刺激細胞に対してＨ３Ｃｉｔ含有量が１．４６±０．２０までの明らかな増加を示し（図５Ａ、５Ｂ）、ＤＸ１によるＮＥＴ

放出の阻害によるＨ３Ｃｉｔの細胞内への保持を示している可能性がある。これらのデータは、ＤＸ１がＨ３のシトルリン化を妨害せず、むしろＮＥＴ及びそれらに関連するＨ３Ｃｉｔ内容物の放出を阻害することを示す。

【０１７５】

実施例４－ＤＸ１は、マウス好中球においてＮＥＴｏｓｉｓを引き起こさない

チオグリコレート処置されたマウスから得られ、２０ウェルプレート上に直接播種された好中球を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理し、次いで、４時間観察し、その後、細胞を固定し、ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）、Ｈ３Ｃｉｔ、及びペプチジルアルギニンデイミナーゼ４（ＰＡＤ４）を含むＮＥＴのマーカーについて免疫染色した。１００個の細胞当たりの放出されたＮＥＴのパーセンテージを、共焦点顕微鏡上での可視化によって決定し、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）によって分析した。対照又はＤＸ１で処理された未刺激好中球では、ＮＥＴはほとんど観察されなかった（それぞれ、３．５％±１．０及び４．０％±１．５、Ｐ＝０．７９、Ｎ＝４）（図６Ａ、６Ｂ）。

【０１７６】

実施例５－ＤＸ１は、マウス好中球におけるＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを阻害する

チオグリコレート処置されたマウスから得られ、２０ウェルプレート上に直接播種された好中球を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理し、次いで、ＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを誘導するためにＰＭＡで４時間刺激し、その後、細胞を固定し、ＭＰＯ、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４を含むＮＥＴのマーカーについて免疫染色した。１００個の細胞当たりの放出されたＮＥＴのパーセンテージを、共焦点蛍光顕微鏡上での可視化によって決定し、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）によって分析した。ＰＭＡ刺激は、対照好中球の３６．３％±１１．１においてＮＥＴをもたらしたが、ＤＸ１処理された好中球のわずか８．３％±２．７であった（Ｐ＝０．０５、Ｎ＝４）（図７Ａ、７Ｂ）。これらの結果は、マウス好中球において、ＰＭＡによって媒介されるＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓの阻害を実証する。

【０１７７】

実施例６－ＤＸ１は、マウス好中球におけるＮＯＸ依存性ＮＥＴｏｓｉｓを阻害する

チオグリコレート処置されたマウスから得られ、２０ウェルプレート上に直接播種された好中球を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理し、次いで、ＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓを誘導するためにカルシウムイオノフォア（イオノマイシン、ＩＭ）で４時間刺激し、その後、細胞を固定し、ＭＰＯ、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４を含むＮＥＴのマーカーについて免疫染色した。１００個の細胞当たりの放出されたＮＥＴのパーセンテージを、共焦点蛍光顕微鏡上での可視化によって決定し、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）によって分析した。ＩＭ刺激は、対照好中球の１５．５％±３．１においてＮＥＴをもたらしたが、ＤＸ１処理された好中球においてはわずか２．３％±０．８であった（Ｐ＜０．０１、Ｎ＝４）（図８Ａ、８Ｂ）。これらの結果は、マウス好中球において、ＩＭによって媒介されるＮＯＸ非依存性ＮＥＴｏｓｉｓの阻害を実証する。

【０１７８】

実施例７－ＤＸ１は、ＡＮＣＡ関連血管炎における糸球体炎症及び病理を有意に低減する

上記のように、ＮＥＴは、特に、炎症性疾患の状況において、複数の疾患プロセスの病態生理学に寄与する。ＤＸ１などの細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が、好中球及び好中球様細胞を透過し、ＮＥＴ形成を抑制し得ることを示す上記データを考慮して、これらの知見の機能的意味は、血管炎の動物モデルにおいて確認された（図９に要約される）。図１０Ａ～１０Ｄに示されるように、ＤＸ１は、ＤＸ１を摂取したＭＰＯ免疫化マウスにおいて、糸球体炎症及び病理を顕著に低減させた。ＤＸ１は、炎症及び病理を、Ｏｖａ対照に対応するレベルまで低減させた。これらのデータは、特に、炎症性疾患の治療の状況において、ＮＥＴ形成を阻害するためにＤＸ１などの抗ＤＮＡ結合タンパク質を投与する可能性の更なる証拠を提供する。

【０１７９】

ＮＥＴｏｓｉｓに関与するＭＰＯ酵素もまた、抗ＭＰＯ自己抗体を発症する患者の疾患の原因であるため、ＤＸ１などの細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質の使用は、ＡＮＣＡ血管炎の状況において特に興味深い。したがって、この疾患において、ＤＸ１などの細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質は、疾患進行の管理が含まれる予防及び治療に使用され得る。

【０１８０】

要約

上記のデータは、ＤＸ１などの細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質が好中球及び好中球様細胞を透過し、ＮＥＴ形成を阻害し得ることを示している。

【０１８１】

ＮＥＴは、外傷、自己免疫、遺伝性疾患、及びがんを含む複数の疾患プロセスの病態生理学に寄与するため、本知見は、これらの結合タンパク質に新しい次元を追加する。実際、ＮＥＴ形成を調節する方法は、すでに臨床的に興味深いことであり、ＮＥＴ－ＤＮＡの溶解を促進するか、又はＮＥＴ形成を防止するためのＤＮａｓｅＩ又はヒストンシトルリン化の阻害剤の全身投与が報告されている（Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）ＳｃｉＴｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．，８：３６１ｒａ１３８、Ｐｅｒｄｏｍｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１９）Ｎａｔ　Ｃｏｍｍ．，１０：１３２２）。

【０１８２】

したがって、本知見は、ＮＥＴ形成（ＮＥＴｏｓｉｓ）の抑制が必要とされる非悪性状態の治療及び予防の両方において、ＤＸ１などの細胞透過性抗ＤＮＡ結合タンパク質の可能性を実証する。

【０１８３】

ＮＥＴはまた、がん及び転移に寄与する。したがって、本知見は、がん及び／又は転移性疾患の治療及び／又は予防において、これらの分子に新しい次元を追加する。

【０１８４】

方法

試薬及びＰＬＢ－９８５細胞

３Ｅ１０誘導体ＤＸ１（ＰＡＴ－ＤＸ１、Ｐａｔｒｙｓ　Ｌｔｄ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）（配列（配列番号３８）を有するｄｉ－ｓｃＦｖ）を生成し、前述のように精製した（Ｒａｔｔｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．４９６：８５８－８６４、Ｃｏｌｂｕｒｎ　ａｎｄ　Ｇｒｅｅｎ（２００６）Ｃｌｉｎ　Ｃｈｉｍ　Ａｃｔａ．３７０：９－１６）。ＧＳＫ４８４（＃ＳＭＬ１６５８）は、ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から得た。ＰＬＢ－９８５細胞は、ＨＬ－６０ヒト急性骨髄性白血病細胞のサブクローンであり、Ｌｅｉｂｎｉｚ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ＤＳＭＺ－Ｇｅｒｍａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ　ＧｍｂＨ（Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）との物質移転契約によって得られ、受領の１ヶ月以内に使用された。細胞を、３７℃、５％のＣＯ２で、ＲＰＭＩ＋１０％のＦＢＳ中で増殖させ、１．３％のＤＭＳＯを増殖培地に６日間添加することによって、顆粒球様細胞に分化させた。別段の指定されない限り、他の全ての材料及び試薬は、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）から入手した。

【０１８５】

細胞透過アッセイ

Ｓｈｉ－ｆｉｘカバースリップ（Ｓｈｉｋｈａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｋｈｕｍａｌｔａｒ，Ｌａｌｉｔｐｕｒ，Ｎｅｐａｌ）上の培養されたＰＬＢ－９８５細胞を、対照培地又は５μＭのＤＸ１を含む培地で１時間処理し、次いで、洗浄し、１００％冷却エタノールで固定した。細胞内のＤＸ１の存在を、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）組換えタンパク質Ｌ（１：１０００）（＃２１１８９、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、タンパク質Ｌポリクローナル抗体（１：１０００）（＃ＰＡ１－７２０６６、Ｔｈｅｒｍｏ

Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、及びヤギ抗トリＩｇＹ（Ｈ＋Ｌ）アルカリホスファターゼ二次抗体（１：１０００）（＃ＰＡ１－２８７９９、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）とのインキュベーションによって評価した。アルカリホスファターゼ媒介シグナルの発生は、明視野顕微鏡下で可視化された（ＥＶＯＳ　ＦＬ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

【０１８６】

分化ＰＬＢ－９８５細胞におけるクロマチン脱凝縮の可視化

分化ＰＬＢ－９８５細胞を、５×１０^{4}細胞／ウェルで、１２ウェルプレート中のＳｈｉ－ｆｉｘカバースリップ上に播種した。細胞を、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で１時間処理し、その後、２時間、３００ｎＭのＰＭＡの添加によって細胞を刺激した。細胞をエタノールで固定し、続いてＤＡＰＩを添加し、蛍光顕微鏡（ＥＶＯＳ　ＦＬ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によってクロマチン脱凝縮を可視化した。ＰＭＡ刺激に対する予想される応答を示した細胞のパーセンテージを、処置条件ごとに少なくとも１５０個の細胞において、全細胞及び可視化されたＤＡＰＩシグナルの脱凝縮を伴う細胞の数を計数することによって測定した。

【０１８７】

ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色による細胞外ＤＮＡの可視化及び定量

分化ＰＬＢ－９８５細胞を、黒色壁の９６ウェルプレート中で５×１０^{4}細胞／ウェルで培養し、対照緩衝液又は１０μＭのＤＸ１とともに１時間インキュベーションした。次いで、２時間、３００ｎＭのＰＭＡの添加によって細胞を刺激した。細胞外ＤＮＡの検出を容易にするために、ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（５μＭ）を添加した。ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎの蛍光を、蛍光顕微鏡（ＥＶＯＳ　ＦＬ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって可視化し、蛍光強度をプレートリーダーによって、４８５ｎｍ及び５２７ｎｍの励起及び発光波長で測定した。

【０１８８】

分光光度法によるＰＭＡでの刺激後の分化ＰＬＢ－９８５細胞によって放出されたＤＮＡの定量

分化ＰＬＢ－９８５細胞を、１２ウェルプレート中に８×１０^{5}細胞／ウェルで播種し、対照緩衝液又は１０μＭのＤＸ１を含有する緩衝液とともに１時間インキュベーションした。次いで、４時間、３００ｎＭのＰＭＡの添加によって細胞を刺激した（刺激時間は、ＤＡＰＩ及びＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ染色並びにウエスタンブロット実験と比較して４時間に延長され、ＤＮＡ－タンパク質複合体のウェルへの付着のためのより多くの時間を可能にした）。上清を吸引し、ウェルをＰＢＳで一度穏やかに洗浄した。ウェルに付着した残留内容物をＰＢＳに抽出し、ＤＮＡ含有量を、製造業者の指示に従ってＮａｎｏｄｒｏｐ　Ｌｉｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して分光光度法によって決定した。

【０１８９】

Ｈ３Ｃｉｔウエスタンブロット

１２ウェルプレート中の８×１０^{5}細胞／ウェルの分化ＰＬＢ－９８５細胞を、対照緩衝液又は１０μＭのＤＸ１を含有する緩衝液とともに１時間インキュベーションし、次いで、２時間、３００ｎＭのＰＭＡの添加によって刺激した。細胞を遠心分離によって単離し、ＲＩＰＡ緩衝液中に溶解し、抗Ｈ３Ｃｉｔ一次（＃ＡＢ５１０３、ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ，ＵＳＡ）及びヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート二次抗体を１：５０００で（＃ＡＢ２０５７１８、ａｂｃａｍ）使用して、ウエスタンブロットによってＨ３Ｃｉｔ含有量を決定した。アクチン担持対照に対して正規化されたＨ３ＣｉｔバンドＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）によって決定された。

【０１９０】

マウス好中球及びＮＥＴｏｓｉｓの可視化

全てのマウス実験は、Ｍｏｎａｓｈ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙの動物倫理委員会によって承認されたプロトコルに従って実施された。好中球を、１０週齢の４％のチオグリコレー

トで刺激された雄のＣ５７ＢＬ／６マウスの腹腔から回収した（Ｎ＝８）。２０ウェルプレート中に２×１０^{5}細胞／ウェルで播種した好中球を、３０分間静置し、次いで、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理した。ＮＥＴｏｓｉｓを、４時間、ＰＭＡ（４０μｇ／ｍＬ）又はＩＭ（４μＭ、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＶＩＣ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）の添加によって刺激した。細胞を、一晩、過ヨウ素酸リジンパラホルムアルデヒド（ＰＬＰ）中で固定し、ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ、＃ＡＦ３６６７ Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＭＮ，ＵＳＡ）、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４（＃ＡＢ１２８０８６、ａｂｃａｍ）を含むＮＥＴのマーカーに対して免疫染色し、ＤＡＰＩ ＰｒｏＬｏｎｇ（商標）Ｇｏｌｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に入れ、ＮＥＴを、Ｎｉｋｏｎ Ｔｉ－Ｅ倒立顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ Ｉｓｎｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｉｎｃ、Ｍｅｌｖｉｌｌｅ，ＮＹ，ＵＳＡ）を備えた共焦点蛍光顕微鏡によって可視化した。４０５、４８８、及び５６１、並びに６４７ｎｍレーザーを使用して、ＤＡＰＩ、Ａｌｅｘａ４８８、Ａｌｅｘａ５９４、並びにＡｌｅｘａ６４７を特異的に励起した。各処理条件において形成されたＮＥＴのパーセンテージを、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）を使用して決定した。

【０１９１】

統計学

統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ、バージョン９．２で実施した。Ｐ値は、２つの群を比較した場合、両側スチューデントのｔ検定、及び複数の群の場合、テューキーの多重比較検定を伴う一元配置ＡＮＯＶＡによって決定された。Ｐ≦０．０５を有意とみなした。図中の誤差バーは、平均値の標準誤差（ＳＥＭ）を表す。反復の数は、図に示される。

【０１９２】

マウス好中球及びＮＥＴｏｓｉｓの可視化

好中球を、前述のように、４％のチオグリコレートで刺激されたマウス（Ｎ＝８）の腹腔から回収した（２４）。２０ウェルプレート中に２×１０^{5}細胞／ウェルで播種した好中球を、３０分間静置し、次いで、対照培地又は１０μＭのＤＸ１を含有する培地で３０分間処理した。ＮＥＴｏｓｉｓを、４時間、ＰＭＡ（４０μｇ／ｍＬ）又はイオノマイシン（ＩＭ）（４μＭ、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＶＩＣ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）の添加によって刺激した。細胞を、一晩、過ヨウ素酸リジンパラホルムアルデヒド（ＰＬＰ）中で固定し、ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ、＃ＡＦ３６６７ Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＭＮ，ＵＳＡ）、Ｈ３Ｃｉｔ、及びＰＡＤ４（＃ＡＢ１２８０８６、Ａｂｃａｍ）を含むＮＥＴのマーカーに対して免疫染色し、ＤＡＰＩ Ｐｒｏｌｏｎｇ Ｇｏｌｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）に入れ、ＮＥＴを、共焦点顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ Ｔｉ－Ｅ倒立顕微鏡、４０５、４８８、及び５６１ｎｍ ６４７ｎｍのレーザーを使用して、ＤＡＰＩ、Ａｌｅｘａ４８８、Ａｌｅｘａ５９４、及びＡｌｅｘａ６４７を特異的に励起した）によって可視化した。各処理条件において形成されたＮＥＴのパーセンテージを、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）を使用して決定した。

【０１９３】

ＡＮＣＡ関連血管炎のマウスモデル

図９に示されるように、マウスを０及び７日目にＭＰＯ＋ＦＣＡで免疫化し、続いて、１６日目に抗ＧＢＭ及び／又はＤＸ１を投与した。２用量のＤＸ１を摂取したマウスは、１８日目に第２の用量を摂取した。マウスを、２０日目に評価のために処分した。

【０１９４】

マウスを以下の４つの群に分けた：Ｏｖａ対照（ｎ＝４）、ＭＰＯ免疫化 ＤＸ１での処置なし（ｎ＝８）、ＭＰＯ免疫化及び２５ｍｇ／ｋｇで１用量のＤＸ１（ｎ＝８）、並びにＭＰＯ免疫化、２５ｍｇ／ｋｇで２用量のＤＸ１。

【０１９５】

当業者であれば、広範に説明される本発明の趣旨又は範囲から逸脱することなく、多くの変形及び／又は修正が特定の実施形態に示される本開示に行われ得ることを理解するで

あろう。したがって、本実施形態は、全ての点で例示的であり、限定的ではないとみなされるべきである。

【０１９６】

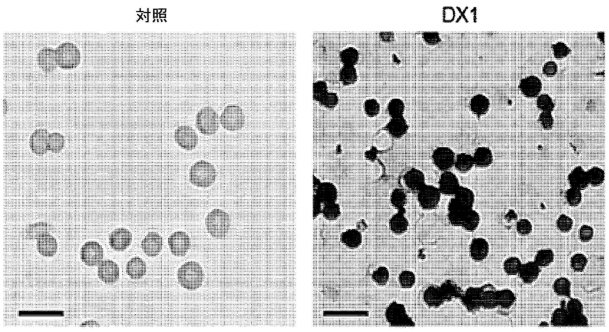
本出願は、２０２１年８月３０日に出願された米国仮特許出願第６３／２３８，６５７号及び２０２２年３月２９日に出願された第６３／３２４，７８４号の優先権を主張し、その開示は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０１９７】

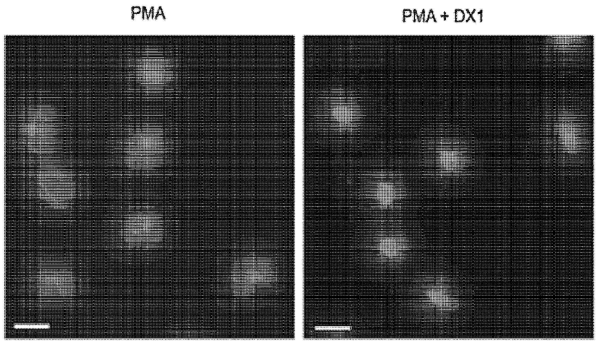
上で論じられた全ての出版物は、その全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれている文書、行為、材料、デバイス、物品などのいかなる論述も、単に本開示の文脈を提供する目的のものである。これらの事項のいずれか又は全ては、本出願の各請求項の優先日前に存在していた本開示に関連する分野における先行技術の基礎の一部分を形成するか、又は共通の一般的知識であったことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【図面】

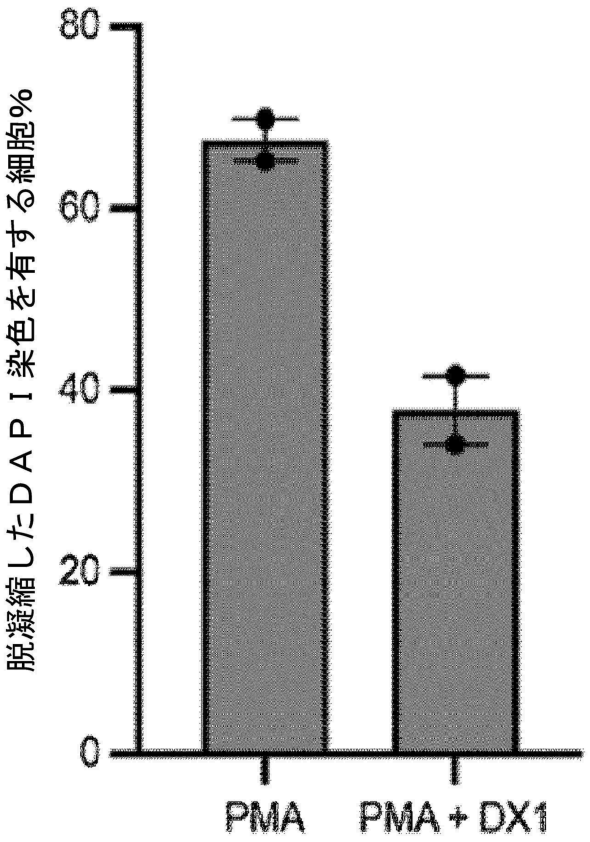
【図１】



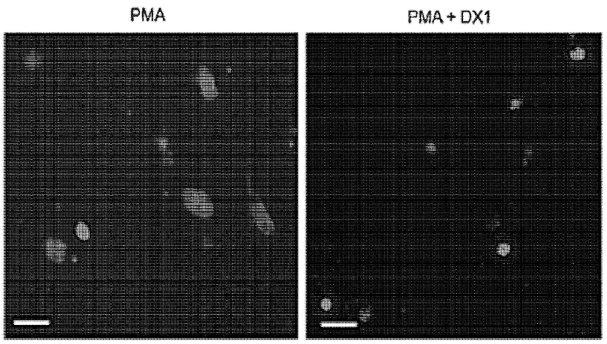
【図２Ａ】



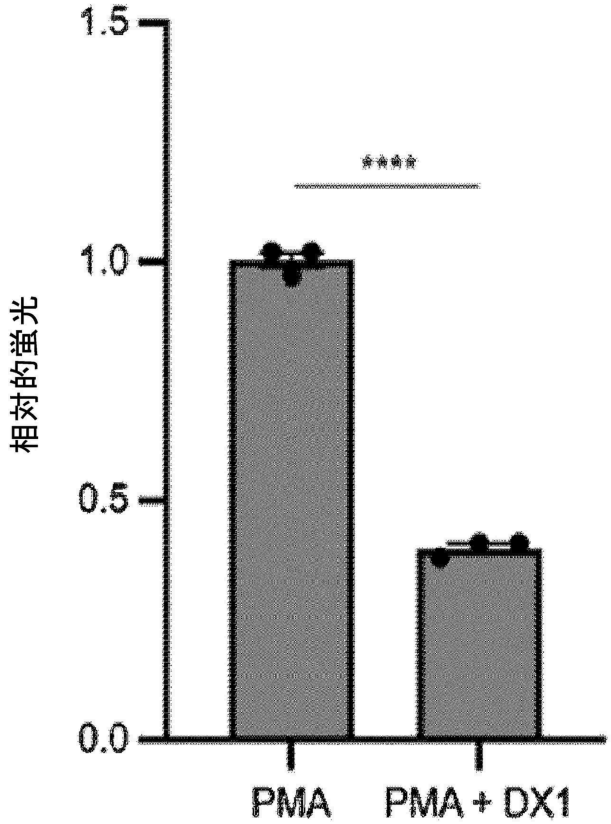
【図２Ｂ】



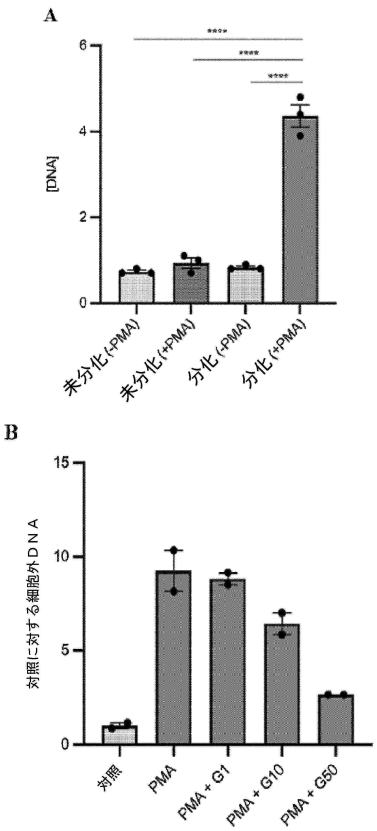
【図２Ｃ】



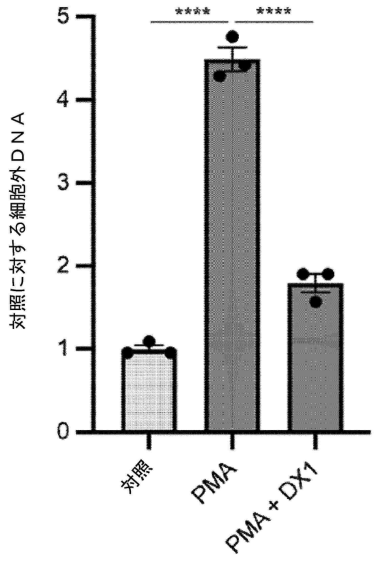
【図２Ｄ】



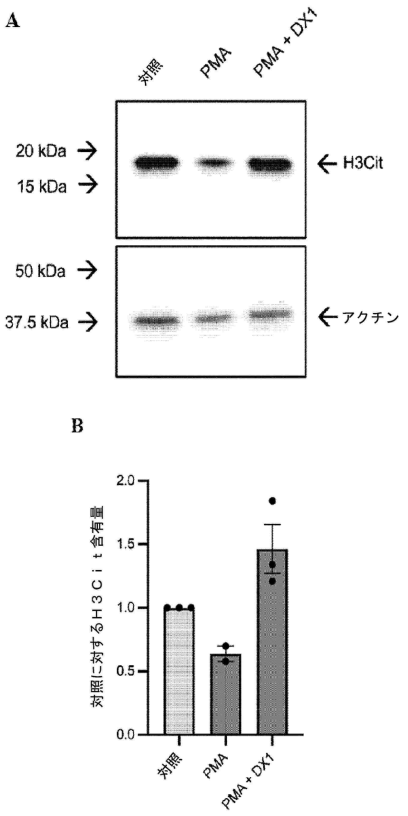
【図３】



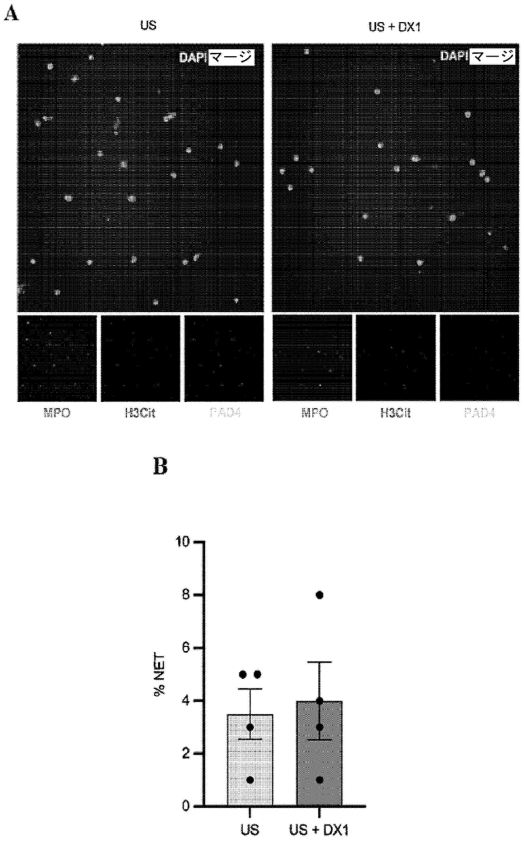
【図４】


****
****
対照に対する細胞外ＤＮＡ
0
1
2
3
4
5
対照
PMA
PMA + DX1

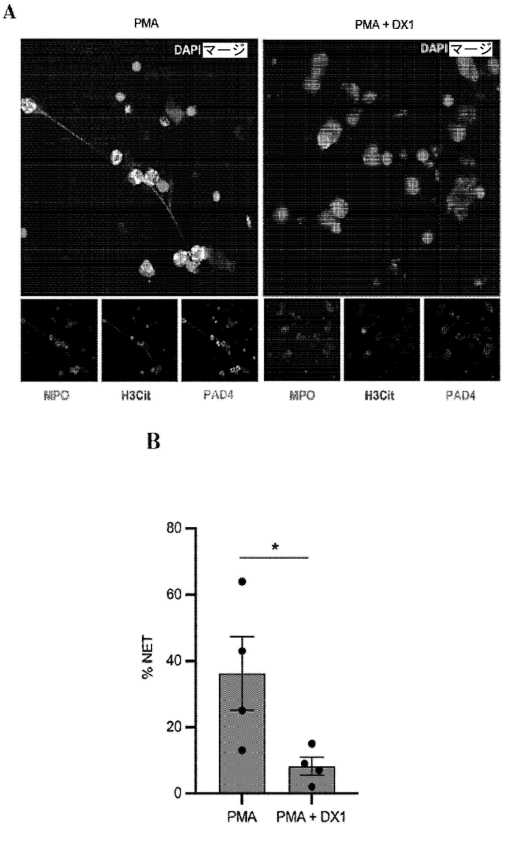
【図５】


A
対照
PMA
PMA + DX1
20 kDa
15 kDa
H3Cit
50 kDa
37.5 kDa
アクチン
B
対照に対するＨ３Ｃｉｔ含有量
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
対照
PMA
PMA + DX1

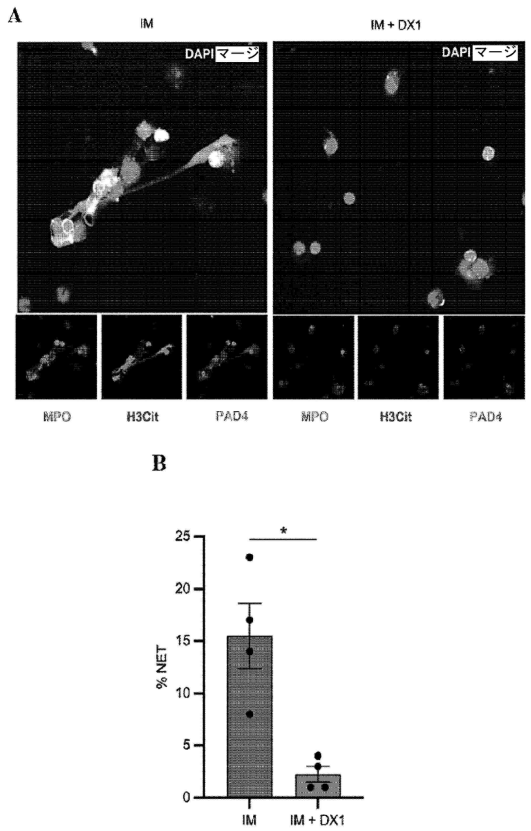
【図６】


A
US
US + DX1
DAPI
マージ
MPO
H3Cit
PAD4
B
% NET
0
2
4
6
8
10
US
US + DX1

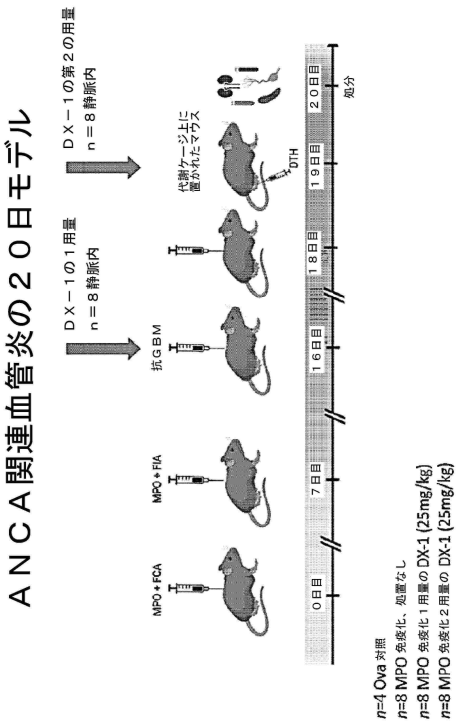
【図７】


A
PMA
PMA + DX1
DAPI
マージ
MPO
H3Cit
PAD4
B
% NET
0
20
40
60
80
*
PMA
PMA + DX1

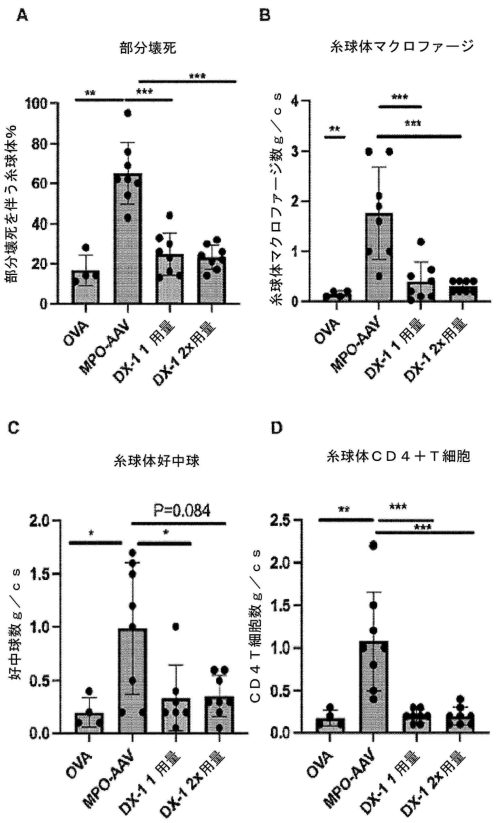
【図８】


A
IM
IM + DX1
DAPI マージ
MPO
H3Cit
PAD4
B
% NET
IM
IM + DX1

【図９】


ＡＮＣＡ関連血管炎の２０日モデル
ＤＸ－１の第２の用量
ｎ＝８静脈内
ＤＸ－１の１用量
ｎ＝８静脈内
抗ＧＢＭ
MPO＋FIA
MPO＋FCA
代謝ケージ上に置かれたマウス
DTH
0日目
7日目
16日目
18日目
19日目
20日目
処分
n=4 Ova 対照
n=8 MPO 免疫化、処置なし
n=8 MPO 免疫化 1 用量の DX-1 (25mg/kg)
n=8 MPO 免疫化 2 用量の DX-1 (25mg/kg)

【図１０】


A
部分壊死
部分壊死を伴う糸球体%
B
糸球体マクロファージ
糸球体マクロファージ数ｇ／ｃｓ
C
糸球体好中球
好中球数ｇ／ｃｓ
P=0.084
D
糸球体ＣＤ４＋Ｔ細胞
ＣＤ４Ｔ細胞数ｇ／ｃｓ
OVA
MPO-AAV
DX-1 1 用量
DX-1 2x用量

【配列表】
20245309900000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/75639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C07K 16/18, A61K 38/00 (2022.01)
ADD. C12N 15/11 (2022.01)
CPC - INV. C07K 16/18, C07K 16/44
ADD. C12N 15/11, C12N 15/117, A61K 39/3955
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHIRIVI et al. "Therapeutic ACPA inhibits NET formation: a potential therapy for neutrophil-mediated inflammatory diseases" Cellular & Molecular Immunology, 20 March 2020, Vol. 18, pp.1528-1544; abstract, pg 1533, col 1, para 2, pg 1533, col 2, para 3	1-5
Y	US 2014/0050723 A1 (HANSEN et al.) 20 February 2014 (20.02.2014) Claim 1, Claim 7, Claim 16, Claim 17, Claim 18	1-5
X.P	CHEN et al. "Inhibition of NETosis by a Nuclear-Penetrating Anti-DNA Autoantibody" ImmunoHorizons, 01 June 2022, Vol. 6, pp. 356-365; whole doc.	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 October 2022	NOV 22 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/75639

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as fi led.

   b. ☐ furnished subsequent to the international fi ling date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/75639

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*1/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/02		
Ａ６１Ｐ	*17/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/04		
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ	*5/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*21/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/14		
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04		
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ	*11/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06		
Ａ６１Ｐ	*37/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16		
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*21/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ	*19/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ	*3/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/06		
Ａ６１Ｐ	*3/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00		
Ａ６１Ｐ	*31/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/04		
Ａ６１Ｐ	*7/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/10		
Ａ６１Ｐ	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/02		
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		
Ａ６１Ｐ	*31/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ｃ０７Ｋ	*16/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/16		
Ｃ０７Ｋ	*16/46*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｃ１２Ｎ	*5/0787*	*(2010.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/18	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｑ	*1/02*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0787		
			Ｃ１２Ｑ	1/02		
			Ｃ１２Ｎ	15/13		

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

弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　ジェームス・エー・キャンベル
オーストラリア・ヴィクトリア・３２０５・サウス・メルボルン・アルバート・ロード・１００・レベル・４・ライディン・フライアー内
(72)発明者　ヴァレンティーナ・ドゥブリェヴィッチ
オーストラリア・ヴィクトリア・３２０５・サウス・メルボルン・アルバート・ロード・１００・レベル・４・ライディン・フライアー内
(72)発明者　ジェームズ・イー・ハンセン
アメリカ合衆国・コネチカット・０６５１０・ニュー・ヘブン・トゥー・ホイットニー・アヴェニュー内
(72)発明者　シャオヨン・チェン

アメリカ合衆国・コネチカット・０６５１０・ニュー・ヘブン・トゥー・ホイットニー・アヴェニュー内
(72)発明者　ベネデット・ジェー・カファリ
アメリカ合衆国・コネチカット・０６５１０・ニュー・ヘブン・トゥー・ホイットニー・アヴェニュー内
(72)発明者　アヌパマ・シラリ
アメリカ合衆国・コネチカット・０６５１０・ニュー・ヘブン・トゥー・ホイットニー・アヴェニュー内
(72)発明者　ジアンビン・ジョウ
アメリカ合衆国・コネチカット・０６５１０・ニュー・ヘブン・トゥー・ホイットニー・アヴェニュー内

Ｆターム（参考）　4B063　QA05 QQ08 QQ42 QR32 QR77
4B065　AA90X AA90Y AA94X AA94Y CA23 CA46
4C085　AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE01
4H045　AA30 CA40 DA75 EA20