

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-520825

(P2021-520825A)

(43) 公表日 令和3年8月26日 (2021.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 124 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-556304 (P2020-556304)	(71) 出願人	517303085
(86) (22) 出願日	平成31年4月12日 (2019.4.12)		アルゲン-エックス ビービービーエー
(85) 翻訳文提出日	令和2年11月27日 (2020.11.27)		ベルギー ビー-9052, スウィジナ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/059570		アルデ, インダストリエパーク スウィ
(87) 国際公開番号	W02019/197675		ジナルデ 7
(87) 国際公開日	令和1年10月17日 (2019.10.17)	(71) 出願人	518275408
(31) 優先権主張番号	1806099.6		ブイアイビー ブイゼットダブリュー
(32) 優先日	平成30年4月13日 (2018.4.13)		ベルギー国, 9052 ヘント, レイフィ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		セストラート 120
(31) 優先権主張番号	1901648.4		
(32) 優先日	平成31年2月6日 (2019.2.6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ガレクチン-10抗体

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質ガレクチン-10、特に、ヒトガレクチン-10に結合するアンタゴニスト、特に、抗体及びその抗原結合断片に関する。ガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10の結晶化を中断させ、それゆえ、その病理がシャルコー・ライデン結晶 (CLC) の形成／存在に関連している疾患及び疾病を予防及び治療する方法において有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガレクチン-10に結合するアンタゴニストであって、該アンタゴニストがガレクチン-10のエピトープに結合し、それにより、ガレクチン-10の結晶充填界面を遮蔽する、前記アンタゴニスト。

【請求項 2】

可溶性ガレクチン-10に結合したときに、ガレクチン-10の結晶化を阻害し、かつ/又は結晶性ガレクチン-10に結合したときに、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進する、請求項1記載のアンタゴニスト。

【請求項 3】

可溶性ガレクチン-10に結合したときに、ガレクチン-10の結晶化を阻害する、ガレクチン-10に結合するアンタゴニスト。

【請求項 4】

結晶性ガレクチン-10に結合したときに、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進する、ガレクチン-10に結合するアンタゴニスト。

【請求項 5】

前記アンタゴニストが、前記ガレクチン-10の結晶充填界面由来の1以上のアミノ酸を含むガレクチン-10のエピトープに結合する、請求項1～4のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 6】

ヒトガレクチン-10に結合する、請求項1～5のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 7】

前記アンタゴニストが、Ser2、Leu3、Leu4、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Ala12、Ser13、Thr16、Thr42、Glu43、Met44、Lys45、Asp49、Ile50、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Leu96、Pro97、Asp98、Lys99、Gln101、Met103、Gly106、Gln107、Ser108、Ser109、Tyr110、Thr111、Asp113、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Ala120、Gln125、Thr133、Lys134、Phe135、Asn136、Val137、Ser138、Tyr139、Leu140、及びLys141:からなる群から選択される1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合し、ここで、該残基が配列番号141を参照して特定される、請求項1～6のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 8】

前記アンタゴニストが、Tyr69を含むエピトープ又はTyr69に隣接するアミノ酸を含むエピトープに結合する、請求項1～7のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 9】

前記アンタゴニストが、アミノ酸Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、His114、Arg115、Ile116、Lys117、及びAla120を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する、請求項1～8のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 10】

前記アンタゴニストが、アミノ酸Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、Ala120、及びLys122を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する、請求項1～8のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 11】

前記エピトープがGln74及びAsp98をさらに含む、請求項10記載のアンタゴニスト。

【請求項 12】

前記アンタゴニストが、前記ガレクチン-10の結晶充填界面由来のアミノ酸からなるエピトープに結合する、請求項1～9のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 13】

前記アンタゴニストが、ガレクチン-10の二量体化界面由来の1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する、請求項1～11のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 14】

前記アンタゴニストが、Pro5、Pro7、Leu27、Ala28、Cys29、Leu31、Asn32、Glu33、Pro34、Tyr35、Gln37、His41、Glu46、Glu47、Gln55、Arg60、Arg61、Arg67、Trp72、Gln75、Trp127、Arg128、及びAsp129:からなる群から選択される1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する、請求項13記載のアンタゴニスト。

【請求項 15】

前記アンタゴニストが、Glu33、Gly59、Arg60、及びLys79を含むエピトープに結合する、請求項1～6のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 16】

前記エピトープが、Leu31、Glu33、Gly59、Arg60、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、及びGln84を含むか又はこれらからなる、請求項15記載のアンタゴニスト。 10

【請求項 17】

前記エピトープが、Gln74、Gln75、及びGlu77をさらに含む、請求項15記載のアンタゴニスト。

【請求項 18】

前記エピトープが、Glu33、Gly59、Arg60、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、及びSer109を含むか又はこれらからなる、請求項17記載のアンタゴニスト。

【請求項 19】

前記エピトープが、Glu33、Gly59、Arg60、Trp72、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、Gln84、及びSer109を含むか又はこれらからなる、請求項17記載のアンタゴニスト。 20

【請求項 20】

前記エピトープが、Glu33、Gly59、Arg60、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、Phe83、Gln84を含むか又はこれらからなる、請求項17記載のアンタゴニスト。

【請求項 21】

前記アンタゴニストが、Thr42、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、及びAla120を含むか又はこれらからなるエピトープに結合する、請求項1～6のいずれか一項記載のアンタゴニスト。 30

【請求項 22】

前記アンタゴニストが、Glu43、Asp49、Glu68、Tyr69、Lys73、Asp98、Asp113、His114、Arg115、Lys117、Glu119、及びAla120を含むか又はこれらからなるエピトープに結合する、請求項1～6のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 23】

前記アンタゴニストが、Asp49、Glu68、Tyr69、Lys73、Gln74、Asp98、Asp113、His114、Arg115、Ile116、及びLys117を含むか又はこれらからなるエピトープに結合する、請求項1～6のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 24】

前記アンタゴニストが、Ser2、Leu3、Leu4、Pro5、Pro7、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Lys23、Arg25、Met44、Gly86、Gln87、Glu88、Phe89、Glu90、Asn105、Gln125、Thr133、Lys134、及びPhe135を含むか又はこれらからなるエピトープに結合する、請求項1～6のいずれか一項記載のアンタゴニスト。 40

【請求項 25】

前記アンタゴニストが、小分子;阻害性ポリペプチド;抗体又はその抗原結合断片;並びにアフィボディ、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、及びデュオカリンから選択される抗体模倣物:からなる群から選択される、請求項1～24のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 26】

50

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、請求項1～24のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 27】

前記抗体が、免疫グロブリン、好ましくは、IgGである、請求項26記載のアンタゴニスト。

【請求項 28】

前記アンタゴニストがVHH抗体である、請求項26記載のアンタゴニスト。

【請求項 29】

前記抗体が非ヒト抗体のヒト化又は生殖系列化変異体である、請求項26～28のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 30】

前記非ヒト抗体がラクダ科動物由来である、請求項29記載のアンタゴニスト。

【請求項 31】

前記抗体が、ヒトIgG、好ましくは、IgG1のCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、及び/又はCH3ドメインを含む、請求項26～30のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 32】

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もしくはVH H);単鎖抗体(scFv); F(ab')₂断片; Fab断片; Fd断片; Fv断片; 単腕(一価)抗体; ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、又はそのような抗原結合断片の組合せ、会合、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子:からなる群から選択される、請求項26～31のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 33】

前記抗原結合断片がFab断片である、請求項32記載のアンタゴニスト。

【請求項 34】

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、

(i) 配列番号3を含むか又は配列番号3からなるHCDR3; 配列番号2を含むか又は配列番号2からなるHCDR2; 配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1; 配列番号58を含むか又は配列番号58からなるLCDR3; 配列番号57を含むか又は配列番号57からなるLCDR2; 配列番号56を含むか又は配列番号56からなるLCDR1;

(ii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3; 配列番号5を含むか又は配列番号5からなるHCDR2; 配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1; 配列番号61を含むか又は配列番号61からなるLCDR3; 配列番号60を含むか又は配列番号60からなるLCDR2; 配列番号59を含むか又は配列番号59からなるLCDR1;

(iii) 配列番号9を含むか又は配列番号9からなるHCDR3; 配列番号8を含むか又は配列番号8からなるHCDR2; 配列番号7を含むか又は配列番号7からなるHCDR1; 配列番号64を含むか又は配列番号64からなるLCDR3; 配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2; 配列番号62を含むか又は配列番号62からなるLCDR1;

(iv) 配列番号12を含むか又は配列番号12からなるHCDR3; 配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2; 配列番号10を含むか又は配列番号10からなるHCDR1; 配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3; 配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2; 配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;

(v) 配列番号15を含むか又は配列番号15からなるHCDR3; 配列番号14を含むか又は配列番号14からなるHCDR2; 配列番号13を含むか又は配列番号13からなるHCDR1; 配列番号70を含むか又は配列番号70からなるLCDR3; 配列番号69を含むか又は配列番号69からなるLCDR2; 配列番号68を含むか又は配列番号68からなるLCDR1;

(vi) 配列番号18を含むか又は配列番号18からなるHCDR3; 配列番号17を含むか又は配列番号17からなるHCDR2; 配列番号16を含むか又は配列番号16からなるHCDR1; 配列番号72を含むか又は配列番号72からなるLCDR3; 配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2; 配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;

- (vii) 配列番号20を含むか又は配列番号20からなるHCDR3;配列番号19を含むか又は配列番号19からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号75を含むか又は配列番号75からなるLCDR3;配列番号74を含むか又は配列番号74からなるLCDR2;配列番号73を含むか又は配列番号73からなるLCDR1;
- (viii) 配列番号23を含むか又は配列番号23からなるHCDR3;配列番号22を含むか又は配列番号22からなるHCDR2;配列番号21を含むか又は配列番号21からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;
- (ix) 配列番号25を含むか又は配列番号25からなるHCDR3;配列番号24を含むか又は配列番号24からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号78を含むか又は配列番号78からなるLCDR3;配列番号77を含むか又は配列番号77からなるLCDR2;配列番号76を含むか又は配列番号76からなるLCDR1;
- (x) 配列番号28を含むか又は配列番号28からなるHCDR3;配列番号27を含むか又は配列番号27からなるHCDR2;配列番号26を含むか又は配列番号26からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号79を含むか又は配列番号79からなるLCDR1;
- (xi) 配列番号31を含むか又は配列番号31からなるHCDR3;配列番号30を含むか又は配列番号30からなるHCDR2;配列番号29を含むか又は配列番号29からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;
- (xii) 配列番号33を含むか又は配列番号33からなるHCDR3;配列番号32を含むか又は配列番号32からなるHCDR2;配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1;配列番号84を含むか又は配列番号84からなるLCDR3;配列番号83を含むか又は配列番号83からなるLCDR2;配列番号82を含むか又は配列番号82からなるLCDR1;
- (xiii) 配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号35を含むか又は配列番号35からなるHCDR2;配列番号34を含むか又は配列番号34からなるHCDR1;配列番号87を含むか又は配列番号87からなるLCDR3;配列番号86を含むか又は配列番号86からなるLCDR2;配列番号85を含むか又は配列番号85からなるLCDR1;
- (xiv) 配列番号38を含むか又は配列番号38からなるHCDR3;配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2;配列番号37を含むか又は配列番号37からなるHCDR1;配列番号78を含むか又は配列番号78からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号88を含むか又は配列番号88からなるLCDR1;
- (xv) 配列番号41を含むか又は配列番号41からなるHCDR3;配列番号40を含むか又は配列番号40からなるHCDR2;配列番号39を含むか又は配列番号39からなるHCDR1;配列番号91を含むか又は配列番号91からなるLCDR3;配列番号90を含むか又は配列番号90からなるLCDR2;配列番号89を含むか又は配列番号89からなるLCDR1;
- (xvi) 配列番号43を含むか又は配列番号43からなるHCDR3;配列番号42を含むか又は配列番号42からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号94を含むか又は配列番号94からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号92を含むか又は配列番号92からなるLCDR1;
- (xvii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3;配列番号44を含むか又は配列番号44からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号97を含むか又は配列番号97からなるLCDR3;配列番号96を含むか又は配列番号96からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;
- (xviii) 配列番号47を含むか又は配列番号47からなるHCDR3;配列番号46を含むか又は配列番号46からなるHCDR2;配列番号45を含むか又は配列番号45からなるHCDR1;配列番号94を含むか又は配列番号94からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;
- (xix) 配列番号50を含むか又は配列番号50からなるHCDR3;配列番号49を含むか又は配列番号49からなるHCDR2;配列番号48を含むか又は配列番号48からなるHCDR1;配列番号96を含む

か又は配列番号96からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;

(xx)配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号52を含むか又は配列番号52からなるHCDR2;配列番号51を含むか又は配列番号51からなるHCDR1;配列番号98を含むか又は配列番号98からなるLCDR3;配列番号97を含むか又は配列番号97からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;及び

(xxi)配列番号55を含むか又は配列番号55からなるHCDR3;配列番号54を含むか又は配列番号54からなるHCDR2;配列番号53を含むか又は配列番号53からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む、請求項26~33のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 35】

前記抗体又はその抗原結合断片が、以下のもの:

(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号100のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号102のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii)配列番号103のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号104のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv)配列番号105のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号106のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v)配列番号107のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号108のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi)配列番号109のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号110のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vii)配列番号111のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号112のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(viii)配列番号113のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号114のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ix)配列番号115のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号116のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(x)配列番号117のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号118のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xi)配列番号119のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号120のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xii)配列番号121のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号122のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

10

20

30

40

50

- (xiii) 配列番号123のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号124のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xiv) 配列番号125のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号126のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xv) 配列番号127のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号128のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xvi) 配列番号129のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号130のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xvii) 配列番号131のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号132のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xviii) 配列番号133のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号134のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xix) 配列番号135のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号136のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;
- (xx) 配列番号137のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号138のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに
- (xxi) 配列番号139のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号140のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列
- から選択される重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)の組合せを含む、請求項26~34のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項36】

- 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、
- (i) 配列番号162を含むか又は配列番号162からなるHCDR3;配列番号161を含むか又は配列番号161からなるHCDR2;配列番号160を含むか又は配列番号160からなるHCDR1;配列番号179を含むか又は配列番号179からなるLCDR3;配列番号178を含むか又は配列番号178からなるLCDR2;配列番号177を含むか又は配列番号177からなるLCDR1;
- (ii) 配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号182を含むか又は配列番号182からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;
- (iii) 配列番号168を含むか又は配列番号168からなるHCDR3;配列番号167を含むか又は配列番号167からなるHCDR2;配列番号166を含むか又は配列番号166からなるHCDR1;配列番号185を含むか又は配列番号185からなるLCDR3;配列番号184を含むか又は配列番号184からなるLCDR2;配列番号183を含むか又は配列番号183からなるLCDR1;
- (iv) 配列番号171を含むか又は配列番号171からなるHCDR3;配列番号170を含むか又は配列番号170からなるHCDR2;配列番号169を含むか又は配列番号169からなるHCDR1;配列番号187を含むか又は配列番号187からなるLCDR3;配列番号186を含むか又は配列番号186からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;
- (v) 配列番号174を含むか又は配列番号174からなるHCDR3;配列番号173を含むか又は配列番号173からなるHCDR2;配列番号172を含むか又は配列番号172からなるHCDR1;配列番号189を

含むか又は配列番号189からなるLCDR3;配列番号188を含むか又は配列番号188からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(vi)配列番号176を含むか又は配列番号176からなるHCDR3;配列番号175を含むか又は配列番号175からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号192を含むか又は配列番号192からなるLCDR3;配列番号191を含むか又は配列番号191からなるLCDR2;配列番号190を含むか又は配列番号190からなるLCDR1;及び

(vii)配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号193を含むか又は配列番号193からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む、請求項26～33のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 37】

前記抗体又はその抗原結合断片が、以下のもの:

(i)配列番号194のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号195のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii)配列番号196のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号197のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii)配列番号198のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号199のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv)配列番号200のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号201のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v)配列番号202のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号203のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi)配列番号204のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号205のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに

(vii)配列番号206のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号207のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列

から選択される重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)の組合せを含む、請求項36記載のアンタゴニスト。

【請求項 38】

前記抗体が、

(i)配列番号210を含むか又は配列番号210からなるCDR3;配列番号209を含むか又は配列番号209からなるCDR2;配列番号208を含むか又は配列番号208からなるCDR1;

(ii)配列番号213を含むか又は配列番号213からなるCDR3;配列番号212を含むか又は配列番号212からなるCDR2;配列番号211を含むか又は配列番号211からなるCDR1;

(iii)配列番号216を含むか又は配列番号216からなるCDR3;配列番号215を含むか又は配列番号215からなるCDR2;配列番号214を含むか又は配列番号214からなるCDR1;

(iv)配列番号219を含むか又は配列番号219からなるCDR3;配列番号218を含むか又は配列番号218からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1;

(v)配列番号222を含むか又は配列番号222からなるCDR3;配列番号221を含むか又は配列番号221からなるCDR2;配列番号220を含むか又は配列番号220からなるCDR1;

(vi)配列番号225を含むか又は配列番号225からなるCDR3;配列番号224を含むか又は配列番号

号224からなるCDR2;配列番号223を含むか又は配列番号223からなるCDR1;
 (vii) 配列番号228を含むか又は配列番号228からなるCDR3;配列番号227を含むか又は配列番号227からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
 (viii) 配列番号231を含むか又は配列番号231からなるCDR3;配列番号230を含むか又は配列番号230からなるCDR2;配列番号229を含むか又は配列番号229からなるCDR1;
 (ix) 配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3;配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
 (x) 配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3;配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
 (xi) 配列番号238を含むか又は配列番号238からなるCDR3;配列番号237を含むか又は配列番号237からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
 (xii) 配列番号241を含むか又は配列番号241からなるCDR3;配列番号240を含むか又は配列番号240からなるCDR2;配列番号239を含むか又は配列番号239からなるCDR1;
 (xiii) 配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3;配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
 (xiv) 配列番号244を含むか又は配列番号244からなるCDR3;配列番号243を含むか又は配列番号243からなるCDR2;配列番号242を含むか又は配列番号242からなるCDR1;
 (xv) 配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3;配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
 (xvi) 配列番号247を含むか又は配列番号247からなるCDR3;配列番号246を含むか又は配列番号246からなるCDR2;配列番号245を含むか又は配列番号245からなるCDR1;及び
 (xvii) 配列番号249を含むか又は配列番号249からなるCDR3;配列番号248を含むか又は配列番号248からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1
 :からなる群から選択されるCDR配列を含むVHHドメインを含む、請求項26~33のいずれか一項記載のアンタゴニスト。

【請求項 39】

前記VHHドメインが、配列番号250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、もしくは266のいずれか1つによって表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか或いは該アミノ酸配列からなる、請求項38記載のアンタゴニスト。

【請求項 40】

ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該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、

(i) 配列番号3を含むか又は配列番号3からなるHCDR3;配列番号2を含むか又は配列番号2からなるHCDR2;配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1;配列番号58を含むか又は配列番号58からなるLCDR3;配列番号57を含むか又は配列番号57からなるLCDR2;配列番号56を含むか又は配列番号56からなるLCDR1;
 (ii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3;配列番号5を含むか又は配列番号5からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号61を含むか又は配列番号61からなるLCDR3;配列番号60を含むか又は配列番号60からなるLCDR2;配列番号59を含むか又は配列番号59からなるLCDR1;
 (iii) 配列番号9を含むか又は配列番号9からなるHCDR3;配列番号8を含むか又は配列番号8からなるHCDR2;配列番号7を含むか又は配列番号7からなるHCDR1;配列番号64を含むか又は配列番号64からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号62を含むか又は配列番号62からなるLCDR1;
 (iv) 配列番号12を含むか又は配列番号12からなるHCDR3;配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2;配列番号10を含むか又は配列番号10からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;

- (v) 配列番号15を含むか又は配列番号15からなるHCDR3;配列番号14を含むか又は配列番号14からなるHCDR2;配列番号13を含むか又は配列番号13からなるHCDR1;配列番号70を含むか又は配列番号70からなるLCDR3;配列番号69を含むか又は配列番号69からなるLCDR2;配列番号68を含むか又は配列番号68からなるLCDR1;
- (vi) 配列番号18を含むか又は配列番号18からなるHCDR3;配列番号17を含むか又は配列番号17からなるHCDR2;配列番号16を含むか又は配列番号16からなるHCDR1;配列番号72を含むか又は配列番号72からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;
- (vii) 配列番号20を含むか又は配列番号20からなるHCDR3;配列番号19を含むか又は配列番号19からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号75を含むか又は配列番号75からなるLCDR3;配列番号74を含むか又は配列番号74からなるLCDR2;配列番号73を含むか又は配列番号73からなるLCDR1;
- (viii) 配列番号23を含むか又は配列番号23からなるHCDR3;配列番号22を含むか又は配列番号22からなるHCDR2;配列番号21を含むか又は配列番号21からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;
- (ix) 配列番号25を含むか又は配列番号25からなるHCDR3;配列番号24を含むか又は配列番号24からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号78を含むか又は配列番号78からなるLCDR3;配列番号77を含むか又は配列番号77からなるLCDR2;配列番号76を含むか又は配列番号76からなるLCDR1;
- (x) 配列番号28を含むか又は配列番号28からなるHCDR3;配列番号27を含むか又は配列番号27からなるHCDR2;配列番号26を含むか又は配列番号26からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号79を含むか又は配列番号79からなるLCDR1;
- (xi) 配列番号31を含むか又は配列番号31からなるHCDR3;配列番号30を含むか又は配列番号30からなるHCDR2;配列番号29を含むか又は配列番号29からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;
- (xii) 配列番号33を含むか又は配列番号33からなるHCDR3;配列番号32を含むか又は配列番号32からなるHCDR2;配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1;配列番号84を含むか又は配列番号84からなるLCDR3;配列番号83を含むか又は配列番号83からなるLCDR2;配列番号82を含むか又は配列番号82からなるLCDR1;
- (xiii) 配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号35を含むか又は配列番号35からなるHCDR2;配列番号34を含むか又は配列番号34からなるHCDR1;配列番号87を含むか又は配列番号87からなるLCDR3;配列番号86を含むか又は配列番号86からなるLCDR2;配列番号85を含むか又は配列番号85からなるLCDR1;
- (xiv) 配列番号38を含むか又は配列番号38からなるHCDR3;配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2;配列番号37を含むか又は配列番号37からなるHCDR1;配列番号78を含むか又は配列番号78からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号88を含むか又は配列番号88からなるLCDR1;
- (xv) 配列番号41を含むか又は配列番号41からなるHCDR3;配列番号40を含むか又は配列番号40からなるHCDR2;配列番号39を含むか又は配列番号39からなるHCDR1;配列番号91を含むか又は配列番号91からなるLCDR3;配列番号90を含むか又は配列番号90からなるLCDR2;配列番号89を含むか又は配列番号89からなるLCDR1;
- (xvi) 配列番号43を含むか又は配列番号43からなるHCDR3;配列番号42を含むか又は配列番号42からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号94を含むか又は配列番号94からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号92を含むか又は配列番号92からなるLCDR1;
- (xvii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3;配列番号44を含むか又は配列番号44からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号97を含むか又

10

20

30

40

50

は配列番号97からなるLCDR3;配列番号96を含むか又は配列番号96からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;

(xviii) 配列番号47を含むか又は配列番号47からなるHCDR3;配列番号46を含むか又は配列番号46からなるHCDR2;配列番号45を含むか又は配列番号45からなるHCDR1;配列番号94を含むか又は配列番号94からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;

(xix) 配列番号50を含むか又は配列番号50からなるHCDR3;配列番号49を含むか又は配列番号49からなるHCDR2;配列番号48を含むか又は配列番号48からなるHCDR1;配列番号96を含むか又は配列番号96からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;

(xx) 配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号52を含むか又は配列番号52からなるHCDR2;配列番号51を含むか又は配列番号51からなるHCDR1;配列番号98を含むか又は配列番号98からなるLCDR3;配列番号97を含むか又は配列番号97からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;及び

(xxi) 配列番号55を含むか又は配列番号55からなるHCDR3;配列番号54を含むか又は配列番号54からなるHCDR2;配列番号53を含むか又は配列番号53からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 41】

ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該抗体又はその抗原結合断片が、以下のもの:

(i) 配列番号99のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号100のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii) 配列番号101のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号102のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii) 配列番号103のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号104のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv) 配列番号105のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号106のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v) 配列番号107のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号108のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi) 配列番号109のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号110のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vii) 配列番号111のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号112のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(viii) 配列番号113のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号114のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ix) 配列番号115のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号116のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(x) 配列番号117のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、

10

20

30

40

50

もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号118のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xi) 配列番号119のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号120のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xii) 配列番号121のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号122のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xiii) 配列番号123のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号124のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xiv) 配列番号125のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号126のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xv) 配列番号127のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号128のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xvi) 配列番号129のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号130のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xvii) 配列番号131のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号132のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xviii) 配列番号133のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号134のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xix) 配列番号135のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号136のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xx) 配列番号137のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号138のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに

(xxi) 配列番号139のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号140のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列

から選択される重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)の組合せを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

【請求項42】

ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該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、

(i) 配列番号162を含むか又は配列番号162からなるHCDR3;配列番号161を含むか又は配列番号161からなるHCDR2;配列番号160を含むか又は配列番号160からなるHCDR1;配列番号179を含むか又は配列番号179からなるLCDR3;配列番号178を含むか又は配列番号178からなるLCDR2;配列番号177を含むか又は配列番号177からなるLCDR1;

(ii) 配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号182を含むか又は配列番号182からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(iii) 配列番号168を含むか又は配列番号168からなるHCDR3;配列番号167を含むか又は配列

10

20

30

40

50

番号167からなるHCDR2;配列番号166を含むか又は配列番号166からなるHCDR1;配列番号185を含むか又は配列番号185からなるLCDR3;配列番号184を含むか又は配列番号184からなるLCDR2;配列番号183を含むか又は配列番号183からなるLCDR1;

(iv)配列番号171を含むか又は配列番号171からなるHCDR3;配列番号170を含むか又は配列番号170からなるHCDR2;配列番号169を含むか又は配列番号169からなるHCDR1;配列番号187を含むか又は配列番号187からなるLCDR3;配列番号186を含むか又は配列番号186からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(v)配列番号174を含むか又は配列番号174からなるHCDR3;配列番号173を含むか又は配列番号173からなるHCDR2;配列番号172を含むか又は配列番号172からなるHCDR1;配列番号189を含むか又は配列番号189からなるLCDR3;配列番号188を含むか又は配列番号188からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(vi)配列番号176を含むか又は配列番号176からなるHCDR3;配列番号175を含むか又は配列番号175からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号192を含むか又は配列番号192からなるLCDR3;配列番号191を含むか又は配列番号191からなるLCDR2;配列番号190を含むか又は配列番号190からなるLCDR1;及び

(vii)配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号193を含むか又は配列番号193からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4 3】

ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該抗体又はその抗原結合断片が、以下のもの:

(i)配列番号194のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号195のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii)配列番号196のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号197のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii)配列番号198のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号199のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv)配列番号200のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号201のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v)配列番号202のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号203のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi)配列番号204のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号205のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに

(vii)配列番号206のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号207のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列

から選択される重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)の組合せを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4 4】

ガレクチン-10に結合する抗体であって、該抗体が、

(i)配列番号210を含むか又は配列番号210からなるCDR3;配列番号209を含むか又は配列番号209からなるCDR2;配列番号208を含むか又は配列番号208からなるCDR1;

(ii) 配列番号213を含むか又は配列番号213からなるCDR3;配列番号212を含むか又は配列番号212からなるCDR2;配列番号211を含むか又は配列番号211からなるCDR1;
(iii) 配列番号216を含むか又は配列番号216からなるCDR3;配列番号215を含むか又は配列番号215からなるCDR2;配列番号214を含むか又は配列番号214からなるCDR1;
(iv) 配列番号219を含むか又は配列番号219からなるCDR3;配列番号218を含むか又は配列番号218からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1;
(v) 配列番号222を含むか又は配列番号222からなるCDR3;配列番号221を含むか又は配列番号221からなるCDR2;配列番号220を含むか又は配列番号220からなるCDR1;
(vi) 配列番号225を含むか又は配列番号225からなるCDR3;配列番号224を含むか又は配列番号224からなるCDR2;配列番号223を含むか又は配列番号223からなるCDR1;
(vii) 配列番号228を含むか又は配列番号228からなるCDR3;配列番号227を含むか又は配列番号227からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(viii) 配列番号231を含むか又は配列番号231からなるCDR3;配列番号230を含むか又は配列番号230からなるCDR2;配列番号229を含むか又は配列番号229からなるCDR1;
(ix) 配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3;配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(x) 配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3;配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(xi) 配列番号238を含むか又は配列番号238からなるCDR3;配列番号237を含むか又は配列番号237からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(xii) 配列番号241を含むか又は配列番号241からなるCDR3;配列番号240を含むか又は配列番号240からなるCDR2;配列番号239を含むか又は配列番号239からなるCDR1;
(xiii) 配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3;配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(xiv) 配列番号244を含むか又は配列番号244からなるCDR3;配列番号243を含むか又は配列番号243からなるCDR2;配列番号242を含むか又は配列番号242からなるCDR1;
(xv) 配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3;配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(xvi) 配列番号247を含むか又は配列番号247からなるCDR3;配列番号246を含むか又は配列番号246からなるCDR2;配列番号245を含むか又は配列番号245からなるCDR1;及び
(xvii) 配列番号249を含むか又は配列番号249からなるCDR3;配列番号248を含むか又は配列番号248からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1
:からなる群から選択されるCDR配列を含むVHHドメインを含む、前記抗体。

【請求項 4 5】

ガレクチン-10に結合する抗体であって、該抗体がVHHドメインを含み、かつ該VHHドメインが、配列番号250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、もしくは266のいずれか1つによって表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか或いは該アミノ酸配列からなる、前記抗体。

【請求項 4 6】

請求項34～45のいずれか一項記載の抗体又は抗原結合断片と同じエピトープに結合する、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4 7】

請求項34～45のいずれか記載の抗体もしくは抗原結合断片又はそのVH、VL、もしくはVHドメインをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4 8】

宿主細胞又は無細胞発現系における前記抗体、抗原結合断片、可変重鎖ドメイン、可変軽鎖ドメイン、又はVHHドメインの発現を可能にする調節性配列に機能的に連結された、請求項47記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 4 9】

請求項48記載の発現ベクターを含有する宿主細胞又は無細胞発現系。

【請求項50】

請求項1～39のいずれか一項記載のアンタゴニスト又は請求項40～46のいずれか一項記載の抗体もしくは抗原結合断片及び少なくとも1つの医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項51】

医薬として使用するための、請求項1～39のいずれか一項記載のアンタゴニスト、請求項40～46のいずれか一項記載の抗体もしくは抗原結合断片、又は請求項50に記載の医薬組成物。

【請求項52】

10

それを必要としている対象を治療する方法であって、該方法が、該対象に、請求項1～9のいずれか一項記載のアンタゴニスト、請求項40～46のいずれか一項記載の抗体もしくは抗原結合断片、又は請求項50に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項53】

前記アンタゴニスト、抗体もしくは抗原結合断片、又は医薬組成物が、ガレクチン-10結晶の存在又は形成と関連する疾患又は疾病を予防又は治療するために投与される、請求項52記載の方法。

【請求項54】

前記アンタゴニスト、抗体もしくは抗原結合断片、又は医薬組成物が、喘息;慢性副鼻腔炎;セリアック病;蠕虫感染症;消化管好酸球性炎症;嚢胞性線維症(CF);アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA);チャージ・ストラウス血管炎;慢性好酸球性肺炎;及び急性骨髄性白血病:からなる群から選択される疾患又は疾病を予防又は治療するために投与される、請求項52又は請求項53記載の方法。

20

【請求項55】

前記疾患又は疾病が喘息である、請求項54記載の方法。

【請求項56】

患者から得られた試料中のガレクチン-10の検出のための、請求項1～39のいずれか一項記載のアンタゴニスト又は請求項40～46のいずれか一項記載の抗体もしくは抗原結合断片の使用。

30

【請求項57】

前記患者試料が粘液試料又は喀痰試料である、請求項56記載の使用。

【請求項58】

請求項1～39のいずれか一項記載のアンタゴニスト又は請求項40～46のいずれか一項記載の抗体もしくは抗原結合断片を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、タンパク質ガレクチン-10、特に、ヒトガレクチン-10に結合するアンタゴニスト、特に、抗体及びその抗原結合断片に関する。ガレクチン-10アンタゴニスト、特に、本発明の抗体及び抗原結合断片は、ガレクチン-10の結晶化を中断させ、それゆえ、その病理がシャルコー・ライデン結晶(CLC)の形成/存在に関連している疾患及び疾病を予防及び治療する方法において有用である。

40

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

シャルコー・ライデン結晶(CLC)は、1853年に最初に記載されたものであり、アレルギー性喘息及び寄生虫感染症を含む特定の疾病を有する患者に見られる微細な無色の結晶である。CLCは、多くの場合、好酸球性炎症応答と関連するヒト組織及び分泌物で観察され

50

る。喘息及び寄生虫感染症に加えて、これらの結晶は、癌、例えば、骨髄性白血病を有する患者に見られる。構造上、CLCは、20～40 μmの長さ及び2～4 μmの幅を有する細胞外六角両錐型結晶として蓄積する。これらの結晶を形成するタンパク質は、ガレクチン-10として同定されている。

【0003】

ガレクチン-10(別名、シャルコー・ライデン結晶タンパク質)は、骨髄で、主に、好酸球によって大量に発現される小さい(16.5kDa)、疎水性のグリカン-結合タンパク質である(Chuaらの文献(2012) PLoS One. 7(8): e42549)。ガレクチン-10は、比較的程度は低いが、好塩基球及びFoxp3陽性Tregによっても産生される(Kubachらの文献(2007) Blood 110(5): 1550-8)。このタンパク質は、最も豊富にある好酸球成分のうちの1つであり、全細胞タンパク質の7%～10%に相当する。ガレクチン-10はヒトにしか見られず、これは、分泌ペプチドシグナル及び膜貫通ドメインを欠き、かつ特定の条件下で、非古典的かつ新規のアポクリン機構によって分泌される。

【0004】

好酸球性障害を有する患者由来の組織におけるCLCの出現を示すたくさんの報告にもかかわらず、一般的な見方は、これらの結晶が好酸球消滅のマーカーにすぎないというものである。

【発明の概要】

【0005】

(発明の概要)

ガレクチン-10のインビボ機能及びCLC形成の重要性は依然として分かりにくい、それは、特に、マウスがガレクチン-10をコードするLGALS10遺伝子を保有していないという理由による。ガレクチン-10結晶が炎症促進性応答をインビボでどのように誘導することができるかということ及びこの応答をガレクチン-10結晶化を中断させることができるガレクチン-10抗体の投与によってどのように抑制することができるかということが本明細書で報告されている。IgG、VHH抗体、及びFabを含む、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片がどのようにガレクチン-10の結晶化を妨げ、また、既に存在するガレクチン-10結晶を溶解させることができるかということが本明細書で報告されている。重要なことに、ガレクチン-10抗体は、患者粘液試料由来のCLCを溶解させることができた。まとめると、これは、ガレクチン-10結晶化を標的とする薬剤をどのように用いて、その病理がCLCの存在に関連している疾病及び障害を治療することができるかということを示している。

【0006】

第一の態様において、本発明は、ガレクチン-10に結合するアンタゴニストを提供し、ここで、該アンタゴニストは、ガレクチン-10のエピトープに結合し、それにより、ガレクチン-10の結晶充填界面を遮蔽する。該アンタゴニストは、好ましくは、ヒトガレクチン-10に結合する。本発明は、可溶性ガレクチン-10に結合したときに、ガレクチン-10の結晶化を阻害する、ガレクチン-10に結合するアンタゴニストをさらに提供する。本発明は、結晶性ガレクチン-10に結合したときに、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進する、ガレクチン-10に結合するアンタゴニストをさらに提供する。

【0007】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合し、それにより、ガレクチン-10の結晶充填界面を遮蔽するアンタゴニストは、可溶性ガレクチン-10に結合したときに、ガレクチン-10の結晶化を阻害する。その代わりに又はそれに加えて、ガレクチン-10アンタゴニストは、結晶性ガレクチン-10に結合したときに、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進することができる。

【0008】

本発明のアンタゴニストは、好ましくは、ヒトガレクチン-10に結合する。ある実施態様において、該アンタゴニストは、ガレクチン-10、好ましくは、ヒトガレクチン-10の結晶充填界面由来の1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。該エピトープは、Ser2、Leu3、Leu4、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Ala12、Ser13、Thr16、Thr42、Glu43、Met44

10

20

30

40

50

、Lys45、Asp49、Ile50、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Leu96、Pro97、Asp98、Lys99、Gln101、Met103、Gly106、Gln107、Ser108、Ser109、Tyr110、Thr111、Asp113、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Ala120、Gln125、Thr133、Lys134、Phe135、Asn136、Val137、Ser138、Tyr139、Leu140、及びLys141:からなる群から選択される1以上、2以上、3以上、4以上、5以上のアミノ酸を含むことができる。ガレクチン-10のアミノ酸残基又は位置は、本明細書で配列番号141として特定されるヒトタンパク質配列を参照して定義される。

【0009】

ある実施態様において、該アンタゴニストは、Tyr69を含むエピトープ又はTyr69に隣接するアミノ酸を含むエピトープに結合する。好ましい実施態様において、該アンタゴニストは、Tyr69を含むエピトープに結合する。さらに好ましい実施態様において、該アンタゴニストは、Glu68、Tyr69、及びGly70を含むエピトープに結合し、ここで、アミノ酸位置は、配列番号141を参照して特定される。ある実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、His114、Arg115、Ile116、Lys117、及びAla120を含むエピトープに結合する。ある実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、Ala120、及びLys122を含むエピトープに結合する。該エピトープは、Gln74及び/又はAsp98をさらに含むことができる。ある実施態様において、該アンタゴニストは、Glu33、Gly59、Arg60、及びLys79を含むエピトープに結合する。該エピトープは、Gln74、Gln75、及びGlu77をさらに含むことができる。ある実施態様において、該エピトープは、Leu31、Glu33、Gly59、Arg60、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、及びGln84を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Glu33、Gly59、Arg60、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、及びSer109を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Glu33、Gly59、Arg60、Trp72、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、Gln84、及びSer109を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Glu33、Gly59、Arg60、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、Phe83、Gln84を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Thr42、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、及びAla120を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Glu43、Asp49、Glu68、Tyr69、Lys73、Asp98、Asp113、His114、Arg115、Lys117、Glu119、及びAla120を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Asp49、Glu68、Tyr69、Lys73、Gln74、Asp98、Asp113、His114、Arg115、Ile116、及びLys117を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、該エピトープは、Ser2、Leu3、Leu4、Pro5、Pro7、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Lys23、Arg25、Met44、Gly86、Gln87、Glu88、Phe89、Glu90、Asn105、Gln125、Thr133、Lys134、及びPhe135を含むか又はこれらからなる。ガレクチン-10のアミノ酸位置は、本明細書で配列番号141として特定されるヒトタンパク質配列を参照して定義される。

【0010】

ガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10の結晶充填界面由来のアミノ酸からなるエピトープに結合することができる。そのような実施態様において、該エピトープは、Ser2、Leu3、Leu4、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Ala12、Ser13、Thr16、Thr42、Glu43、Met44、Lys45、Asp49、Ile50、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Leu96、Pro97、Asp98、Lys99、Gln101、Met103、Gly106、Gln107、Ser108、Ser109、Tyr110、Thr111、Asp113、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Ala120、Gln125、Thr133、Lys134、Phe135、Asn136、Val137、Ser138、Tyr139、Leu140、及びLys141:からなる群から選択される1以上、2以上、3以上、4以上、5以上のアミノ酸からなることができる。ガレクチン-10のアミノ酸位置は、本明細書で配列番号141として特定されるヒトタンパク質配列を参照して定義される。

【0011】

その代わりに又はそれに加えて、該アンタゴニストは、ガレクチン-10の二量体化界面由来の1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合することができる。そのような実施態様において、該アンタゴニストは、Pro5、Pro7、Leu27、Ala28、Cys29、Leu31、Asn32、Glu33、Pro34、Tyr35、Gln37、His41、Glu46、Glu47、Gln55、Arg60、Arg61、Arg67、Trp72、Gln75、Trp127、Arg128、及びAsp129:からなる群から選択される1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合することができる。

【0012】

ある実施態様において、該アンタゴニストは、小分子、阻害性ポリペプチド、又は抗体模倣物である。好ましい実施態様において、該アンタゴニストは、本明細書中の別所で定義される抗体又はその抗原結合断片である。該抗体は、免疫グロブリン、好ましくは、IgGクラスの免疫グロブリン、より好ましくは、IgG1であることができる。該抗体は、VHH抗体であることができる。該抗体又はその抗原結合断片は、非ヒト抗体、例えば、ラクダ科動物由来抗体のヒト化又は生殖系列化変異体であることができる。該抗体又は抗原結合断片は、ヒトIgG、好ましくは、IgG1のCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、及び/又はCH3ドメインを含むことができる。

【0013】

ある実施態様において、該抗原結合断片は、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; 単腕(一価)抗体; ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、又はそのような抗原結合断片の組合せ、会合、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子:からなる群から選択される。好ましい実施態様において、該抗原結合断片は、Fabである。

【0014】

本発明は、さらなる態様において、ガレクチン-10に結合する抗体及び抗原結合断片を提供する。これらの抗体は、下記のようなその構造的特徴に関してのみ定義することができる。ある実施態様において、該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、

(i) 配列番号3を含むか又は配列番号3からなるHCDR3; 配列番号2を含むか又は配列番号2からなるHCDR2; 配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1; 配列番号58を含むか又は配列番号58からなるLCDR3; 配列番号57を含むか又は配列番号57からなるLCDR2; 配列番号56を含むか又は配列番号56からなるLCDR1;

(ii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3; 配列番号5を含むか又は配列番号5からなるHCDR2; 配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1; 配列番号61を含むか又は配列番号61からなるLCDR3; 配列番号60を含むか又は配列番号60からなるLCDR2; 配列番号59を含むか又は配列番号59からなるLCDR1;

(iii) 配列番号9を含むか又は配列番号9からなるHCDR3; 配列番号8を含むか又は配列番号8からなるHCDR2; 配列番号7を含むか又は配列番号7からなるHCDR1; 配列番号64を含むか又は配列番号64からなるLCDR3; 配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2; 配列番号62を含むか又は配列番号62からなるLCDR1;

(iv) 配列番号12を含むか又は配列番号12からなるHCDR3; 配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2; 配列番号10を含むか又は配列番号10からなるHCDR1; 配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3; 配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2; 配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;

(v) 配列番号15を含むか又は配列番号15からなるHCDR3; 配列番号14を含むか又は配列番号14からなるHCDR2; 配列番号13を含むか又は配列番号13からなるHCDR1; 配列番号70を含むか又は配列番号70からなるLCDR3; 配列番号69を含むか又は配列番号69からなるLCDR2; 配列番号68を含むか又は配列番号68からなるLCDR1;

(vi) 配列番号18を含むか又は配列番号18からなるHCDR3; 配列番号17を含むか又は配列番号17からなるHCDR2; 配列番号16を含むか又は配列番号16からなるHCDR1; 配列番号72を含むか又は配列番号72からなるLCDR3; 配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2; 配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;

(xix) 配列番号50を含むか又は配列番号50からなるHCDR3; 配列番号49を含むか又は配列番号49からなるHCDR2; 配列番号48を含むか又は配列番号48からなるHCDR1; 配列番号96を含む

50

か又は配列番号96からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;

(xx)配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号52を含むか又は配列番号52からなるHCDR2;配列番号51を含むか又は配列番号51からなるHCDR1;配列番号98を含むか又は配列番号98からなるLCDR3;配列番号97を含むか又は配列番号97からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;及び

(xxi)配列番号55を含むか又は配列番号55からなるHCDR3;配列番号54を含むか又は配列番号54からなるHCDR2;配列番号53を含むか又は配列番号53からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む。

【0015】

ある実施態様において、該抗体又はその抗原結合断片は、以下のもの:

(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号100のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号102のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii)配列番号103のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号104のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv)配列番号105のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号106のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v)配列番号107のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号108のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi)配列番号109のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号110のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vii)配列番号111のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号112のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(viii)配列番号113のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号114のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ix)配列番号115のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号116のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(x)配列番号117のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号118のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xi)配列番号119のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号120のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xii)配列番号121のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号122のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xiii)配列番号123のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98

10

20

30

40

50

%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号124のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xiv) 配列番号125のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号126のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xv) 配列番号127のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号128のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xvi) 配列番号129のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号130のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xvii) 配列番号131のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号132のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xviii) 配列番号133のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号134のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xix) 配列番号135のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号136のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(xx) 配列番号137のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号138のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに

(xxi) 配列番号139のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号140のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列

から選択される重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)の組合せを含む。

【0016】

該抗体又は抗原結合断片のドメインが参照配列との特定のパーセンテージ配列同一性によって定義される実施態様について、VH及び/又はVLドメインは、そのバリエーションがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するものと同一のCDR配列を保持することができる。

【0017】

ある実施態様において、該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、

(i) 配列番号162を含むか又は配列番号162からなるHCDR3;配列番号161を含むか又は配列番号161からなるHCDR2;配列番号160を含むか又は配列番号160からなるHCDR1;配列番号179を含むか又は配列番号179からなるLCDR3;配列番号178を含むか又は配列番号178からなるLCDR2;配列番号177を含むか又は配列番号177からなるLCDR1;

(ii) 配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号182を含むか又は配列番号182からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(iii) 配列番号168を含むか又は配列番号168からなるHCDR3;配列番号167を含むか又は配列番号167からなるHCDR2;配列番号166を含むか又は配列番号166からなるHCDR1;配列番号185を含むか又は配列番号185からなるLCDR3;配列番号184を含むか又は配列番号184からなるLCDR2;配列番号183を含むか又は配列番号183からなるLCDR1;

(iv) 配列番号171を含むか又は配列番号171からなるHCDR3;配列番号170を含むか又は配列番号170からなるHCDR2;配列番号169を含むか又は配列番号169からなるHCDR1;配列番号187を含むか又は配列番号187からなるLCDR3;配列番号186を含むか又は配列番号186からなるL

CDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(v)配列番号174を含むか又は配列番号174からなるHCDR3;配列番号173を含むか又は配列番号173からなるHCDR2;配列番号172を含むか又は配列番号172からなるHCDR1;配列番号189を含むか又は配列番号189からなるLCDR3;配列番号188を含むか又は配列番号188からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(vi)配列番号176を含むか又は配列番号176からなるHCDR3;配列番号175を含むか又は配列番号175からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号192を含むか又は配列番号192からなるLCDR3;配列番号191を含むか又は配列番号191からなるLCDR2;配列番号190を含むか又は配列番号190からなるLCDR1;及び

(vii)配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号193を含むか又は配列番号193からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む。

【0018】

ある実施態様において、該抗体又はその抗原結合断片は、以下のもの:

(i)配列番号194のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号195のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii)配列番号196のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号197のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii)配列番号198のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号199のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv)配列番号200のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号201のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v)配列番号202のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号203のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi)配列番号204のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号205のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに

(vii)配列番号206のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号207のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列

から選択される重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)の組合せを含む。

【0019】

該抗体又は抗原結合断片のドメインが参照配列との特定のパーセンテージ配列同一性によって定義される実施態様について、VH及び/又はVLドメインは、そのバリエーションがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するものと同一のCDR配列を保持することができる。

【0020】

ある実施態様において、該抗体は、

(i)配列番号210を含むか又は配列番号210からなるCDR3;配列番号209を含むか又は配列番号209からなるCDR2;配列番号208を含むか又は配列番号208からなるCDR1;

(ii)配列番号213を含むか又は配列番号213からなるCDR3;配列番号212を含むか又は配列番号212からなるCDR2;配列番号211を含むか又は配列番号211からなるCDR1;

(iii)配列番号216を含むか又は配列番号216からなるCDR3;配列番号215を含むか又は配列

番号215からなるCDR2;配列番号214を含むか又は配列番号214からなるCDR1;
(iv)配列番号219を含むか又は配列番号219からなるCDR3;配列番号218を含むか又は配列番号218からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1;
(v)配列番号222を含むか又は配列番号222からなるCDR3;配列番号221を含むか又は配列番号221からなるCDR2;配列番号220を含むか又は配列番号220からなるCDR1;
(vi)配列番号225を含むか又は配列番号225からなるCDR3;配列番号224を含むか又は配列番号224からなるCDR2;配列番号223を含むか又は配列番号223からなるCDR1;
(vii)配列番号228を含むか又は配列番号228からなるCDR3;配列番号227を含むか又は配列番号227からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(viii)配列番号231を含むか又は配列番号231からなるCDR3;配列番号230を含むか又は配列番号230からなるCDR2;配列番号229を含むか又は配列番号229からなるCDR1;
(ix)配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3;配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(x)配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3;配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(xi)配列番号238を含むか又は配列番号238からなるCDR3;配列番号237を含むか又は配列番号237からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(xii)配列番号241を含むか又は配列番号241からなるCDR3;配列番号240を含むか又は配列番号240からなるCDR2;配列番号239を含むか又は配列番号239からなるCDR1;
(xiii)配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3;配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2;配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(xiv)配列番号244を含むか又は配列番号244からなるCDR3;配列番号243を含むか又は配列番号243からなるCDR2;配列番号242を含むか又は配列番号242からなるCDR1;
(xv)配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3;配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2;配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(xvi)配列番号247を含むか又は配列番号247からなるCDR3;配列番号246を含むか又は配列番号246からなるCDR2;配列番号245を含むか又は配列番号245からなるCDR1;及び
(xvii)配列番号249を含むか又は配列番号249からなるCDR3;配列番号248を含むか又は配列番号248からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1
:からなる群から選択されるCDR配列を含むVHH抗体である。

【0021】

ある実施態様において、該抗体は、VHHドメインが、配列番号250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、もしくは266のいずれか1つによって表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHH抗体である。

【0022】

VHHドメインが参照配列との特定のパーセンテージ配列同一性によって定義される実施態様について、VHHドメインは、バリエーションがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するものと同一のCDR配列を保持することができる。

【0023】

本発明は、具体的な配列番号を参照して本明細書で定義される抗体又は抗原結合断片と同じエピトープに結合する抗体又はその抗原結合断片をさらに提供する。本明細書に記載される抗体及び抗原結合断片のVH及び/又はVLドメインをコードするポリヌクレオチドを含む、該抗体又はその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチドも提供される。本発明は、宿主細胞又は無細胞発現系における抗体、抗原結合断片、可変重鎖ドメイン、又は可変軽鎖ドメインの発現を許容する調節性配列に機能的に連結された前述のポリヌクレオチドを含む発現ベクターをさらに提供する。前述の発現ベクターを含有する宿主細胞又は無細胞発現系も提供される。

【0024】

本発明は、本発明の第一の態様によるアンタゴニスト、特に、抗体又はその抗原結合断

10

20

30

40

50

片及び少なくとも1つの医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含む医薬組成物も提供する。

【0025】

医薬として使用するための、本発明の第一の態様によるアンタゴニスト、特に、抗体もしくはその抗原結合断片、又は本発明による医薬組成物がさらに提供される。

【0026】

さらなる態様において、本発明は、それを必要としている対象を治療する方法であって、該対象に、本発明の第一の態様によるアンタゴニスト、特に、抗体もしくはその抗原結合断片又は本発明による医薬組成物の治療有効量を投与することを含む、方法を提供する。該アンタゴニスト、抗体、抗原結合断片、又は医薬組成物は、ガレクチン-10結晶の存在又は形成と関連する疾患又は疾病を治療するために投与することができる。ある実施態様において、該疾患又は疾病は：喘息；慢性副鼻腔炎；セリアック病；蠕虫感染症；消化管好酸球性炎症；嚢胞性線維症(CF)；アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)；チャージ・ストラウス血管炎；慢性好酸球性肺炎；及び急性骨髄性白血病から選択される。好ましい実施態様において、該アンタゴニスト、抗体、抗原結合断片、又は医薬組成物は、喘息を治療するために投与される。

【0027】

本発明は、患者から得られた試料中のガレクチン-10の検出のための、本発明の第一の態様によるアンタゴニスト、特に、抗体又はその抗原結合断片の使用も提供する。該アンタゴニスト、抗体、又は抗原結合断片は、好ましくは、結晶性ガレクチン-10の検出のために使用される。患者試料は、喀痰試料であることができる。

【0028】

本発明は、本発明の第一の態様によるガレクチン-10アンタゴニスト、好ましくは、ガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片及び任意に、使用説明書を含むキットも提供する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1:インビボのCLC結晶に類似している組換えGal10結晶の産生 Hisタグ化Gal10を大腸菌(E coli)で発現させた。(A)Hisタグを除去するためのTEVプロテアーゼの添加前及び添加後のHisタグ化Gal10のSDS Page。(B)多角度レーザー散乱(MALLS)により、溶液中のHisタグ化Gal10の二量体形態を表す約40kDaの分子質量が明らかにされている。(C)TEVプロテアーゼによる切断の後、タンパク質溶液は自発的に結晶化して、針状結晶になる。(D)喘息患者の気道で見られる様々な形状の結晶を記載しているCharcotの文献(1853)の原図。(E)組換えGal10結晶の蛍光標識バッチから得られた様々な形態の結晶のスナップショット。Charcot及びvon Leydenによって最初に記載された肉眼で見られる形態の結晶が全て見られる。

【図2】図2:副鼻腔炎患者のインビボで成長したCLC結晶の単離及び結晶構造 (A)粘液試料を慢性鼻茸合併副鼻腔炎(CRSwNP)を有する患者の手術時に回収した。茸組織がここに示されている。(B)Gal10の免疫染色は、アレルギー性の粘着性ムチン中の大量の結晶物質を示している。同様の粘液は、喘息患者及びABPA患者の気道にも見られる。(C)X線回折試験に標本化されたエクスビボで得られた結晶。(D)患者から得られた結晶のX線回折パターン。(E)患者から得られたCLC結晶の結晶構造により、二量体の性質が明らかになっている。(F)エクスビボで得られた結晶構造と組換え産生されたGal10結晶及びヒト好酸球細胞株(AML14.3D10)から得られた公表済みの再結晶化CLC結晶との比較により、完全な類似性(0.2オングストロームの距離二乗平均平方根(RMSD)変位)が明らかになり、組換えGal10結晶がCLCのバイオシミラーであることが示されている。

【図3】図3:Gal10結晶の結晶充填界面の詳細な解析による結晶化抵抗性Gal10ムテインの作製 (A)及び(B)は、2つの近接するGal10二量体間の結晶充填界面に密接に関連する様々なアミノ酸の近接図である。強調されているアミノ酸は、ムテインの突然変異解析及び作

製のために選択された。(C)TEVプロテアーゼによるHisタグ除去後の野生型及びムテインGal10タンパク質の自発的結晶化実験。Tyr69Gluムテインは、自己結晶化に対して完全に抵抗性であり、本明細書の全体を通して、結晶化抵抗性の可溶性Gal10ムテインとして使用された。(D)Gal10 Tyr69GluムテインのX線構造。この構造を用いて、溶液中のTyr69Gluムテインの溶液中小角X線散乱(SAXS)実験における散乱プロファイルをモデリングした。(E) SAXS実験の実験データは、モデル化されたデータと重複し、該ムテインが溶液中で二量体を形成することを本質的に示している。(F) SAXSデータに基づく野生型とY69E Gal10突然変異体の構造の重複。

【図4】図4: Gal10結晶によって誘導される自然気道炎症 C57Bl/6マウスに、Gal10結晶、可溶性Gal10mut、又は対照PBSを気管内注射した。(a)処置から6及び24時間後に肺から回収された好中球(左のパネル)及び単球(右のパネル)の数。(b)処置から6及び24時間後の気管支肺胞洗浄液中のIL-6(左のパネル)及びTNF α (右のパネル)のレベル。(c)処置から6及び24時間後の肺におけるIL-1 β 及びCCL-2のレベル。NSはp値>0.12を意味し; *はp値<0.033を意味し; **はp値<0.002を意味し; ***はp値<0.0002を意味し; ****はp値<0.001を意味する。

【図5】図5: Gal10結晶によって誘導される自然炎症はNLRP3インフラマソームに依存しない。Nlrp3欠損マウス(左のパネル)及びカスパーゼ1/11欠損マウス(右のパネル)(欠損マウスを-/-と称する)、並びにこれらの野生型同腹子(+/+と称する)に、Gal10結晶又は対照PBSを気管内注射した。様々なマウス系統の消化された肺から回収された好中球の数を処置から6及び24時間後に決定した。NSはp値>0.12を意味し; *はp値<0.033を意味し; **はp値<0.002を意味し; ***はp値<0.0002を意味し; ****はp値<0.0001を意味する。

【図6】図6: Gal10結晶によって誘導される自然炎症はTLR4に依存しない Toll様受容体4(TLR4)欠損体及びその野生型(WT)同腹子に、Gal10結晶又は対照PBSを気管内注射した。様々なマウス系統の消化された肺から回収された好中球の数を処置から24時間後に決定した。NSはp値>0.12を意味し; *はp値<0.033を意味し; **はp値<0.002を意味し; ***はp値<0.0002を意味し; ****はp値<0.0001を意味する。

【図7】図7: Gal10結晶は疾患のヒト化モデルにおいてヒトの喘息特徴を強化する。(A)チリダニ(HDM)抽出物及び様々な形態のガレクチン10の投与レジメンを示す実験設定。末梢血単核細胞(PBMC)を腹腔内注射した。チリダニ(HDM)抽出物、シャルコー・ライデン結晶(CLC)、及び突然変異ガレクチン10(Gal10^{mut})を全て気管内投与した。(B)(A)に記載されている通りに処置されたマウスの左肺から回収されたヒトCD45⁺白血球の数。(C)(A)に記載されている通りに処置されたマウスの血清中で測定されたヒトIgEのレベル。

【図8】図8: Gal10抗体の添加によるインビトロでのGal10自己結晶化の防止 (A)TEVプロテアーゼによるHisタグの除去により、Gal10を自己結晶化させた。このアッセイを様々なGal10特異的scFv-Fc抗体クローン又は無関係なscFv-Fc抗体の存在下で実施し、結晶形成を結晶化ロボットで観察した。(B)様々なscFv-Fc及びIgG1抗体の活性の概要。

【図9】図9: IgG1抗体の4つのクローンによる結晶溶解の低速度撮影画像 (A)抗体が存在している結晶を溶解させることもできるかどうかを調べるために、クローンをインビトロで成長したGal10結晶に添加し、スピニングディスク共焦点顕微鏡法を用いて観察した。これら4つのクローンが全て、結晶を90分以内で完全に溶解させたのに対し、無関係なアイソタイプ抗体は溶解させなかった。(B)結晶溶解性抗体を添加したときの結晶の動力学的溶解曲線。結晶を添加する前に、スピニングディスク顕微鏡の高出力視野における屈折性結晶物質の全面積を積分し、1に標準化した。

【図10】図10: Gal10と複合した結晶溶解性クローンのFab断片の結晶構造 Fab断片と組換えGal10の混合物の結晶を結晶化ロボットを用いて形成させ、その後、X線回折により解析した(A~C)。Gal10結晶構造は、ポンチ絵モデル(黒)として示されている。Fab断片の軽鎖(LC)及び重鎖(HC)は、白色のLC及び濃灰色のHCを用いて表面モードで示されている。(D~F)共結晶化構造を得ることができる3つのクローンは全て、Gal10の重要なTyr69残基を標的とする。

【図11】図11: 抗体によるCRSwNP患者の粘液中のCLC結晶の可溶化 CRSwNP患者の新鮮な

10

20

30

40

50

粘着性アレルギー性ムチンをルーチンの副鼻腔洞手術中に回収し、結晶溶解性抗体又はアイソタイプ対照を添加する前に2日間保存した。結晶は、スピニングディスク共焦点顕微鏡におけるその高回折特性のために、患者の新鮮な粘液中ですぐに同定することができた。結晶溶解性抗体を添加すると、結晶は一晩溶解した。

【図12】図12: Gal10結晶をインビボで可溶化するという概念の証明はヒト化マウスモデルにおける喘息の重要な特徴を低下させる (A)チリダニ(HDM)抽出物、ガレクチン10結晶、及び抗体の投与レジメンを示す実験設定。抹消血単核細胞(PBMC)を腹腔内注射した。チリダニ(HDM)抽出物、ガレクチン10結晶、1D11抗体、及び対照抗体を全て気管内投与した。(B)肺切片のヘマトキシリンエオシン染色、(C)血清中で測定されたヒトIgEのレベル、(D)(A)に記載されている通りに処置されたマウスの肺におけるムチンMuc5ac mRNA発現、(E)基底膜の長さ当たりで表された、基底膜から500 μ mの外周領域に及ぶ炎症細胞の数の治験責任医師盲検化定量的画像解析、(F)増加する濃度の気管支収縮剤メタコリンを吸入した後の動的気道抵抗(Rrs)として測定された気管支収縮。

10

【図13】図13: ELISAによるscFvペリプラズム抽出物のスクリーニング scFvペリプラズム抽出物のガレクチン-10結合能を本明細書に記載される結合ELISAにより決定した。吸光度を450nm(620nmの基準)で測定した。各々のペリプラズムマスタープレート(PMP)について、ブランク対照及び陰性対照(無関係な標的に結合するペリプラズム抽出物)を含めた。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。バインダーを、ELISA結合で0.5のOD値よりも高い結合能を示すscFvと定義した。

【図14】図14: BLI技術を用いるscFvペリプラズム抽出物のスクリーニング 選択されたtscFvペリプラズム抽出物のガレクチン-10結合能を、Octet Red96を使用することにより、BLI技術で解析した。抗His1Kバイオセンサー上に固定化した後、ヒト及びカニクイザル(WGS又はREFアイソフォーム)ガレクチン-10-Hisを希釈済みの選択されたscFvペリプラズム抽出物とともにインキュベートする、捕捉アプローチを使用した。GraphPad Prism 7.01でプロットされた各々のscFvクロンの解離速度。

20

【図15】図15: Gal10 IgG1抗体による結晶溶解 Gal10抗体が存在している結晶を溶解させることができるかどうかを調べるために、クロンをインビトロで成長した組換えヒトGal10結晶に添加し、スピニングディスク共焦点顕微鏡法を用いて観察した。8つのクロン全てが調べた時間的経過にわたって結晶を完全に溶解させたのに対し、無関係なアイソタイプ抗体は溶解させなかった。

30

【図16】図16: Gal10と複合した結晶溶解性クロンのFab断片の結晶構造 Fab断片と組換えGal10の混合物の結晶を結晶化ロボットを用いて形成させ、その後、X線回折により解析した。

【図17】図17: Gal10 IgG1抗体及びFab断片による結晶溶解 予め形成された組換えヒトCLCを用いるCLC溶解実験をGal10 mAb及びGal10 Fabの存在下で時間的経過にわたって実施した。結晶の溶解は、スピニングディスク共焦点顕微鏡法を用いて観察した。

【図18】図18: ELISAによるVHHペリプラズム抽出物のスクリーニング VHHペリプラズム抽出物のガレクチン-10結合能を本明細書に記載される結合ELISAにより測定した。吸光度を450nm(620nmの基準)で測定した。各々のペリプラズムマスタープレート(PMP)について、ブランク対照及び陰性対照(無関係な標的に結合するVHHペリプラズム抽出物)を含めた。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。

40

【図19】図19: BLI技術を用いるVHHペリプラズム抽出物のスクリーニング 選択されたVHHペリプラズム抽出物の結合能を、Octet Red96を使用することにより、BLI技術で解析した。この目的のために、ヒト及びカニクイザル(WGS又はYRTアイソフォーム)ガレクチン-10-Hisを抗His1Kバイオセンサー上に固定化した後、希釈済みの選択されたVHHペリプラズム抽出物とともにインキュベートする、捕捉アプローチを使用した。各々のVHHクロンの解離速度(1/s)及び応答(nm)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。

【図20】図20: Gal10 VHH抗体による結晶溶解 予め形成された組換えヒトCLCを用いるCLC溶解実験をGal10 VHH抗体の存在下で時間的経過にわたって実施した。結晶の溶解は、スピニングディスク共焦点顕微鏡法を用いて観察した。

50

【発明を実施するための形態】

【0030】

(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、本発明の技術分野の専門家によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0031】

「アンタゴニスト」—本明細書で使用される場合、「アンタゴニスト」という用語は、ガレクチン-10に結合し、かつ結晶充填界面を遮蔽することができる任意の薬剤を意味する。結晶充填界面を遮蔽する又は「覆い隠す」ことにより、アンタゴニストの機能は、ガレクチン-10分子の結晶化を中断することになる。本発明によるアンタゴニストは、通常、ガレクチン-10に特異的に結合する(bind specifically)又は「特異的に結合する(specifically bind)」。「特異的に結合する(specifically bind)」という用語は、その標的、今回の場合、ガレクチン-10に優先的に結合するアンタゴニストの能力を指す。タンパク質標的に結合することができる薬剤、特に、所与のタンパク質標的に対する結合特異性を示すことができる薬剤は、当業者に公知である。そのような薬剤としては、小分子阻害因子、阻害性ペプチドを含む生体分子、並びにアフィボディ、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、パーサボディ、及びデュオカリンなどの抗体模倣物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明による好ましいアンタゴニストは、抗体及びその抗原結合断片である。

【0032】

「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、それが何らかの関連性のある特異的な免疫反応性を保有するか否かにかかわらず、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(本明細書では、ガレクチン-10)に対する顕著な既知の特異的な免疫反応活性を有するそのような会合を指す。「ガレクチン-10抗体」という用語は、ヒトガレクチン-10を含むガレクチン-10タンパク質に対する免疫学的特異性を示す抗体、及び場合によっては、その種ホモログを指すために本明細書で使用される。抗体及び免疫グロブリンは、それらの間の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。脊椎動物システムにおける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。

【0033】

「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。5つのクラスの抗体は全て、本発明の範囲内にある。以下の議論は、概して、IgGクラスの免疫グロブリン分子に対するものである。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つの同一の軽ポリペプチド鎖及び分子量53,000~70,000の2つの同一の重鎖を含む。これら4つの鎖は、「Y」字の形状でジスルフィド結合により接続されており、ここで、軽鎖は重鎖を挟み、「Y」字の口部分で始まって、可変領域を通じて伸びている。

【0034】

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、カッパ軽鎖又はラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。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連結又は非共有結合的連結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。当業者は、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バージョンは、本開示に照らして、当業者に直ちに識別可能であり、したがって、本発明の範囲内にある。

【0035】

上に示されているように、抗体の可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、それに特異的に結合することを可能にする。すなわち、抗体のVLドメインとVHドメインが組み合わさって、3次元抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この4次抗体構造は、Y字の各々のアームの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鎖及びVL鎖の各々の上にある3つの相補性決定領域（CDR）によって定義される。

10

【0036】

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。

【0037】

「VHH抗体」一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、リャマ、アルパカを含む、ラクダ科ファミリーの種によってのみ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」ドメインと称される。

20

【0038】

「ガレクチン-10」一本明細書で使用される場合、「ガレクチン-10」（又はGal10もしくはGal-10）という用語は、自己結晶化して、シャルコー・ライデン結晶を形成する小さい疎水性のグリカン結合タンパク質を指す。ガレクチン-10は、シャルコー・ライデン結晶タンパク質（CLCP）、好酸球リゾホスホリパーゼ、及びリゾレシチンアシルヒドロラーゼとも称される。「ガレクチン-10」という用語は、ヒトタンパク質及び任意の種ホモログを網羅するほど幅広い。全長ヒトガレクチン-10のアミノ酸配列は、配列番号141（下記参照）によって表される。この配列は、UniProtデータベースにヒトガレクチン-10、アクセッション番号Q05315として寄託された配列に対応する。ヒト配列の天然の変異体、例えば、位置28におけるAla→Val変異体も「ガレクチン-10」という用語に包含される。

30

【化1】

配列番号: 141

1	10	20	30	40	50
MSLLPVPYTE	AASLSTGSTV	TIKGRPLACF	LNEPYLQVDF	HTEMKEESDI	
	60	70	80	90	100
VFHFQVCFGR	RVVMNSREYG	AWKQQVESKN	MPFQDQGEFE	LSISVLPDKY	
	110	120	130	140	
QVMVNGQSSY	TFDHRIKPEA	VKMQVQVRDI	SLTKFNVSYL	KR	

【0039】

「ガレクチン-10結晶」又は「シャルコー・ライデン結晶」－「ガレクチン-10結晶」、「シャルコー・ライデン結晶」、及び「CLC」という用語は、ガレクチン-10から形成された結晶を指すために、本明細書で互換的に使用される。ガレクチン-10によって形成された結晶は、通常、六角両錐型結晶であり、長さが約20～40 μm、幅が約2～4 μmである。これらの結晶は、好酸球性の炎症性障害と関連付けられている。

40

【0040】

「結晶充填界面」－ガレクチン-10の「結晶充填界面」は、結晶線格子中の1以上の隣接するガレクチン-10分子と接触するガレクチン-10上の表面パッチを形成する一連のアミノ酸を指す。CLCは、様々な結晶充填界面を有し、これらの結晶充填界面を形成するアミノ酸は、Ser2、Leu3、Leu4、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Ala12、Ser13、Thr16、Thr42、Gl

50

u43、Met44、Lys45、Asp49、Ile50、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Leu96、Pro97、Asp98、Lys99、Gln101、Met103、Gly106、Gln107、Ser108、Ser109、Tyr110、Thr111、Asp113、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Ala120、Gln125、Thr133、Lys134、Phe135、Asn136、Val137、Ser138、Tyr139、Leu140、及びLys141:として特徴付けられており、ここで、これらの位置は、上記の配列番号141を参照して規定される。

【0041】

「エピトープ」一本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、アンタゴニストが結合するガレクチン-10タンパク質の領域を意味する。アンタゴニストは、通常、アンタゴニスト上の相補的結合部位を介して、そのそれぞれのガレクチン-10エピトープに結合する。アンタゴニストが結合するエピトープは、通常、全長ガレクチン-10タンパク質由来の1以上のアミノ酸を含む。エピトープは、ガレクチン-10タンパク質中で連続しているアミノ酸、すなわち、線状エピトープを含んでいてもよいし、又はガレクチン-10タンパク質中で連続していないアミノ酸、すなわち、立体構造エピトープを含んでいてもよい。

【0042】

「結合部位」一本明細書で使用される場合、「結合部位」という用語は、対象となる標的抗原(例えば、ガレクチン-10)への選択的結合に参与するポリペプチドの領域を含む。結合ドメインは、少なくとも1つの結合部位を含む。例示的な結合ドメインとしては、抗体可変ドメインが挙げられる。本発明の抗体分子は、単一の結合部位又は複数(例えば、2つ、3つ、もしくは4つ)の結合部位を含むことができる。

【0043】

「に由来する」一本明細書で使用される場合、指定されたタンパク質(例えば、ラクダ科抗体又はその抗原結合断片)「に由来する」という用語は、ポリペプチド又はアミノ酸配列の源を指す。一実施態様において、特定の出発ポリペプチドに由来するポリペプチド又はアミノ酸配列は、CDR配列又はそれに関連する配列である。一実施態様において、特定の出発ポリペプチドに由来するアミノ酸配列は、連続していない。例えば、一実施態様において、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDRは、出発抗体に由来する。一実施態様において、特定の出発ポリペプチド又はアミノ酸配列に由来するポリペプチド又はアミノ酸配列は、出発配列又はその一部(ここで、該一部は、少なくとも3~5個のアミノ酸、少なくとも5~10個のアミノ酸、少なくとも10~20個のアミノ酸、少なくとも20~30個のアミノ酸、もしくは少なくとも30~50個のアミノ酸からなる)のアミノ酸配列と本質的に同一であるか、又はそうでなければ、出発配列中にその源を有することが当業者に同定可能である、アミノ酸配列を有する。一実施態様において、出発抗体に由来する1以上のCDR配列は、変異体CDR配列、例えば、親和性変異体を産生するように改変され、ここで、該変異体CDR配列は、標的抗原結合活性を維持している。

【0044】

「ラクダ科由来」一ある好ましい実施態様において、本発明の抗体は、ラクダ科動物の従来の抗体又はラクダ科動物の能動免疫によって惹起されたVHH抗体に由来するフレームワークアミノ酸配列及び/又はCDRアミノ酸配列を含む。しかしながら、ラクダ科動物由来アミノ酸配列を含む本発明の抗体は、ヒトアミノ酸配列(すなわち、ヒト抗体)又は他の非ラクダ科動物哺乳動物種に由来するフレームワーク及び/又は定常領域配列を含むように改変することができる。例えば、ヒト又は非ヒト霊長類フレームワーク領域、重鎖部分、及び/又はヒンジ部分をガレクチン-10抗体に含めることができる。一実施態様において、1以上の非ラクダ科動物アミノ酸が、「ラクダ科動物由来」抗体のフレームワーク領域中に存在していてもよく、例えば、ラクダ科動物フレームワークアミノ酸配列は、対応するヒト又は非ヒト霊長類アミノ酸残基が存在する1以上のアミノ酸突然変異を含むことができる。さらに、ラクダ科動物由来VH及びVLドメイン、又はそのヒト化変異体を、本明細書中の別所に記載されているように、ヒト抗体の定常ドメインに連結させて、キメラ分子を産生することができる。

【0045】

「保存的アミノ酸置換」—「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されており、これには、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β -分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。したがって、免疫グロブリンポリペプチド中の非必須アミノ酸残基を同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基と置き換えることができる。別の実施態様において、アミノ酸の列を、側鎖ファミリーメンバーの順序及び/又は組成が異なる構造的に類似した列と置き換えることができる。

10

【0046】

「重鎖部分」—本明細書で使用される場合、「重鎖部分」という用語は、免疫グロブリン重鎖の定常ドメインに由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、CH1ドメイン、ヒンジ(例えば、上部、中央、及び/もしくは下部ヒンジ領域)ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、又はこれらの変異体もしくは断片:のうちの少なくとも1つを含む。一実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合断片は、免疫グロブリン重鎖のFc部分(例えば、ヒンジ部分、CH2ドメイン、及びCH3ドメイン)を含むことができる。別の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合断片は、定常ドメインの少なくとも一部(例えば、CH2ドメインの全て又は一部)を欠くことができる。ある実施態様において、定常ドメインの少なくとも1つ、好ましくは、全てがヒト免疫グロブリン重鎖に由来する。例えば、好ましい一実施態様において、重鎖部分は、完全ヒトヒンジドメインを含む。他の好ましい実施態様において、重鎖部分は、完全ヒトFc部分(例えば、ヒト免疫グロブリン由来のヒンジ、CH2、及びCH3ドメイン配列)を含む。

20

【0047】

ある実施態様において、重鎖部分の構成的定常ドメインは、異なる免疫グロブリン分子に由来するものである。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、IgG1分子に由来するCH2ドメイン及びIgG3又はIgG4分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。他の実施態様において、定常ドメインは、異なる免疫グロブリン分子の部分を含むキメラドメインである。例えば、ヒンジは、IgG1分子由来の第一の部分及びIgG3又はIgG4分子由来の第二の部分を含むことができる。上に示されているように、重鎖部分の定常ドメインは、天然(野生型)の免疫グロブリン分子由来のアミノ酸配列が異なるように修飾され得ることが当業者によって理解されるであろう。すなわち、本明細書に開示される本発明のポリペプチドは、重鎖定常ドメイン(CH1、ヒンジ、CH2、もしくはCH3)のうちの1つもしくは複数に対する及び/又は軽鎖定常領域ドメイン(CL)に対する改変又は修飾を含むことができる。例示的な修飾としては、1以上のドメインにおける1以上のアミノ酸の付加、欠失、又は置換が挙げられる。

30

【0048】

「キメラ」—「キメラ」タンパク質は、それが本来は天然に連結していない第二のアミノ酸配列に連結された第一のアミノ酸配列を含む。該アミノ酸配列は、通常、融合ポリペプチド中で1つになる別々のタンパク質中に存在することができるか、又は該アミノ酸配列は、通常、同じタンパク質中に存在することができるが、融合ポリペプチド中、新しい配置で配置される。キメラタンパク質は、例えば、化学合成によるか、又はペプチド領域が所望の関係性でコードされるポリヌクレオチドを作製及び翻訳することにより作製することができる。本発明の例示的なキメラ抗体には、ヒト抗体、例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4の定常ドメインに融合された、ラクダ科動物由来VH及びVLドメイン、又はそのヒト化変異体を含む融合タンパク質が含まれる。

40

【0049】

50

「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)、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(長さにより異なる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))。

【0050】

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。

【0051】

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、免疫学的関心のあ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。

【0052】

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、免疫学的関心のあ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。

【0053】

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。

【0054】

「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、免疫学的関心のあ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

【0055】

「フレームワーク領域」一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。

【0056】

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。

10

【0057】

「ヒンジ領域」一本明細書で使用される場合、「ヒンジ領域」という用語は、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。

表2: ヒトヒンジ配列

【表2】

20

IgG	上部ヒンジ	中央部ヒンジ	下部ヒンジ
IgG1	EPKSCDKTHT (配列番号:142)	CPPCP (配列番号:143)	APELLGGP (配列番号:144)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (配列番号:145)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (配列番号:146)	APELLGGP (配列番号:147)
IgG4	ESKYGPP (配列番号:148)	CPSCP (配列番号:149)	APEFLGGP (配列番号:150)
IgG42	ERK (配列番号:151)	CCVECPPPCP (配列番号:152)	APPVAGP (配列番号:153)

30

【0058】

「CH2ドメイン」一本明細書で使用される場合、「CH2ドメイン」という用語は、従来の付番スキームを用いて、例えば、抗体の約残基244から残基360(残基244~360、Kabat付番体系;及び残基231~340、EU付番体系、Kabat EAらの文献、免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991)にまで及ぶ重鎖分子の部分を含む。CH2ドメインは、それが別のドメインと密接に対を形成しないという点で独特である。それどころか、2つのN-結合型分岐炭水化物鎖が無傷の天然のIgG分子の2つのCH2ドメイン間に挿入されている。CH3ドメインがIgG分子のCH2ドメインからC-末端にまで及び、約108個の残基を含むことも十分に立証されている。

40

【0059】

「断片」一本発明の抗体との関連で使用される「断片」という用語は、無傷の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)を指す。「抗原結合断片」という用語は、抗原に結合するか又は無傷の抗体と(すなわち、それが由来した無傷の抗体と)抗原結合(すなわち、ガレクチン-10との特異的結合)を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、

50

Fd断片、Fv断片、単腕(一価)抗体、ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、又はそのような抗原結合断片の組合せ、会合、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、無傷の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。

【0060】

「Fab」―「Fab」又は「Fab断片」は、重鎖及び軽鎖から構成される分子を指し、ここで、該軽鎖は、VLドメイン及び1つの定常ドメイン(CL、Cκ、又はCλ)からなり、該重鎖は、VHドメイン及びCH1ドメインのみからなる。Fab断片は、通常、Y型の免疫グロブリン分子の1つのアームである。Fab断片は、酵素パパインの作用により、免疫グロブリン分子から生成させることができる。パパインは、2つのFab断片と別々のFc領域とを生じるように、ヒンジの領域中で免疫グロブリン分子を切断する。

【0061】

「scFv」又は「scFv断片」―scFv又はscFv断片は、単鎖可変断片を意味する。scFvは、リンカーを介して接続された抗体のVHドメインとVLドメインの融合タンパク質である。

【0062】

「原子価」―本明細書で使用される場合、「原子価」という用語は、ポリペプチド中の潜在的な標的結合部位の数を指す。各々の標的結合部位は、1つの標的分子又は標的分子上の特異的部位に特異的に結合する。ポリペプチドが複数の標的結合部位を含む場合、各々の標的結合部位は、同じ又は異なる分子に特異的に結合することができる(例えば、異なるリガンドもしくは異なる抗原、又は同じ抗原上の異なるエピトープに結合することができる)。

【0063】

「特異性」―「特異性」という用語は、所与の標的、例えば、ガレクチン-10と結合する(例えば、免疫反応する)能力を指す。ポリペプチドは、単一特異的であり、かつ標的に特異的に結合する1以上の結合部位を含有していてもよいし、又はポリペプチドは、多重特異的であり、かつ同じもしくは異なる標的に特異的に結合する2以上の結合部位を含有していてもよい。

【0064】

「合成」―本明細書で使用される場合、ポリペプチドに関する「合成」という用語は、天然ではないアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。例えば、天然のポリペプチドの修飾形態(例えば、付加、置換、もしくは欠失などの突然変異を含む)であるか又はアミノ酸の直線状配列中で、それが本来は天然に連結していない第二のアミノ酸配列(これは、天然であっても天然でなくてもよい)に連結している第一のアミノ酸配列(これは、天然であっても天然でなくてもよい)を含む、非天然のポリペプチド。

【0065】

「改変された」―本明細書で使用される場合、「改変された」という用語は、合成手段による(例えば、組換え技法、インビトロペプチド合成による、ペプチドの酵素的もしくは化学的カップリングによる、又はこれらの技法のいくつかの組合せによる)核酸又はポリペプチド分子の操作を含む。好ましくは、本発明の抗体は、例えば、ヒト化及び/又はキメラ抗体、並びに抗原結合、安定性/半減期、又はエフェクター機能などの1以上の特性を改善するように改変されている抗体を含めて、改変される。

【0066】

「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

10

20

30

40

50

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)を含む。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つの重鎖部分を含み、かつ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。

【0067】

「修飾抗体」という用語は、本明細書で構造的に定義された本発明の抗体のアミノ酸配列変異体を指すために、本明細書で使用することもできる。抗体は、それが由来した抗体と比較してアミノ酸配列が異なる変異体抗体を産生するように修飾され得ることが当業者によって理解されるであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基における保存的置換又は変化をもたらすヌクレオチド又はアミノ酸置換を(例えば、CDR及び/又はフレームワーク残基中で)行うことができる。アミノ酸置換は、1以上のアミノ酸と天然又は非天然アミノ酸との置換を含むことができる。

【0068】

「ヒト化置換」一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(例えば、ラクダ科動物由来ガレクチン-10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。

【0069】

「ヒト化変異体」一本明細書で使用される場合、「ヒト化変異体」という用語は、参照抗体と比較して1以上の「ヒト化置換」を含有する変異体抗体を指し、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。

【0070】

「生殖系列化変異体」一本明細書で使用される場合、「ヒト化置換」が抗体(例えば、ラクダ科動物由来ガレクチン-10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「ヒト化変異体」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「生殖系列化変異体」について、生殖系列化変異体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。「ヒト化変異体」及び「生殖系列化変異体」という用語は、多くの場合、本明細書で互換的に使用される。ラクダ科動物由来(例えば、リャマ由来)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(リャマ)由来VH又はVLドメインの「ヒト化変異体」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(リャマ)由来VH又はVLドメインの「ヒト生殖系列化変異体」という結果になり得る。

【0071】

「親和性変異体」一本明細書で使用される場合、「親和性変異体」という用語は、参照抗体と比較してアミノ酸配列の1以上の変化を示す変異体抗体を指し、ここで、該親和性変異体は、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、親和性変異体は、参照ガレクチン-10抗体と比較したとき、ガレクチン-10に対する変化した親和性を示す。好ましくは、親和性変異体は、参照抗体と比較したとき、標的抗原、例えば、ガレクチン-10に対する改善された親和性を示す。親和性変異体は、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。

【0072】

「高いヒト相溶性」ー重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗体は、VHドメイン及びVLドメインが1つにまとまって、最も近く一致するヒト生殖系列VH及びVL配列との少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を示す場合、高いヒト相溶性を有するとなすことができる。高いヒト相溶性を有する抗体には、例えば、ラクダ科動物の従来の抗体のVH及びVLドメインを含む抗体を含む、ヒト生殖系列配列との十分に高い%配列同一性を示す天然の非ヒト抗体のVH及びVLドメインを含む抗体、並びにそのような抗体の改変された、特に、ヒト化又は生殖系列化された変異体、及び同じく「完全ヒト」抗体が含まれてもよい。

10

【0073】

ー実施態様において、高いヒト相溶性を有する抗体のVHドメインは、フレームワーク領域FR1、FR2、FR3、及びFR4にわたって、1以上のヒトVHドメインとの80%以上のアミノ酸配列同一性又は配列相溶性を示すことができる。他の実施態様において、本発明のポリペプチドのVHドメインと最も近く一致するヒト生殖系列VHドメイン配列との間のアミノ酸配列同一性又は配列相溶性は、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、もしくは最大99%、又は100%ですらあってもよい。

【0074】

ー実施態様において、高いヒト相溶性を有する抗体のVHドメインは、最も近く一致するヒトVH配列と比較して、フレームワーク領域FR1、FR2、FR3、及びFR4にわたって、1以上(例えば、1~10個)のアミノ酸配列ミスマッチを含有することができる。

20

【0075】

別の実施態様において、高いヒト相溶性を有する抗体のVLドメインは、フレームワーク領域FR1、FR2、FR3、及びFR4にわたって、1以上のヒトVLドメインとの80%以上の配列同一性又は配列相溶性を示すことができる。他の実施態様において、本発明のポリペプチドのVLドメインと最も近く一致するヒト生殖系列VLドメイン配列との間のアミノ酸配列同一性又は配列相溶性は、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、もしくは最大99%、又は100%ですらあってもよい。

【0076】

ー実施態様において、高いヒト相溶性を有する抗体のVLドメインは、最も近く一致するヒトVL配列と比較して、フレームワーク領域FR1、FR2、FR3、及びFR4にわたって、1以上(例えば、1~10個)のアミノ酸配列ミスマッチを含有することができる。

30

【0077】

(B. ガレクチン-10アンタゴニスト)

第一の態様において、本発明は、ガレクチン-10に結合するアンタゴニストを提供し、ここで、該アンタゴニストは、ガレクチン-10のエピトープに結合し、それにより、ガレクチン-10の結晶充填界面を遮蔽する。本発明は、可溶性ガレクチン-10に結合したときに、ガレクチン-10の結晶化を示す、ガレクチン-10に結合するアンタゴニストをさらに提供する。本発明は、結晶性ガレクチン-10に結合したときに、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進する、ガレクチン-10に結合するアンタゴニストをさらに提供する。本発明のアンタゴニストは、好ましくは、ヒトガレクチン-10に結合する。

40

【0078】

タンパク質ガレクチン-10は、比較的小さい(16.5kDa)グリカン-結合タンパク質である。ガレクチン-10タンパク質は、溶液中で二量体を形成し、不溶性の六角錐結晶を形成することもできる。これらの結晶は、アレルギー性喘息及び寄生虫感染症を有する患者で最初に観察され、別名、シャルコー・ライデン結晶(又はCLC)として知られている。

【0079】

本発明のアンタゴニストは、ガレクチン-10のエピトープに結合する。該エピトープは、線状エピトープであることができる、すなわち、それは、ガレクチン-10の一次タンパク質配列中で2以上の連続するアミノ酸からなることができる。或いは、該エピトープは

50

、ガレクチン-10の一次タンパク質配列中で互いに近接して位置していない2以上のアミノ酸を含むか又は該アミノ酸からなる立体構造エピトープであることができる。アンタゴニストが立体構造エピトープに結合する実施態様について、該エピトープの2以上のアミノ酸は、通常、ガレクチン-10タンパク質の3次元構造内でごく近接して位置している。本発明のガレクチン-10アンタゴニストが結合するエピトープは、少なくとも2つのアミノ酸、少なくとも3つのアミノ酸、少なくとも4つのアミノ酸、少なくとも5つのアミノ酸、少なくとも6つのアミノ酸、少なくとも7つのアミノ酸を含むことができるか又は該アミノ酸からなることができる。ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストが結合するエピトープは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個のアミノ酸を含むことができるか又は該アミノ酸からなることができる。

10

【0080】

本発明のアンタゴニストは、ガレクチン-10のエピトープに結合し、それにより、ガレクチン-10の結晶充填界面を遮蔽する。本明細書中の別所で定義されているように、ガレクチン-10の結晶充填界面は、結晶線格子中の1以上の隣接するガレクチン-10分子と接触するアミノ酸の表面パッチである。ガレクチン-10の結晶充填界面を遮蔽する働きをするガレクチン-10のエピトープに結合することにより、本発明のアンタゴニストは、ガレクチン-10の結晶化を中断させる。したがって、本発明のアンタゴニストは、該アンタゴニストがガレクチン-10の結晶化を中断させるならば、結晶充填界面を完全に又は部分的に遮蔽することができるということになる。ある実施態様において、該アンタゴニストは、可溶性ガレクチン-10に結合したときに、ガレクチン-10の結晶化を阻害する。ある実施態様において、該アンタゴニストは、結晶性ガレクチン-10に結合したときに、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進する。

20

【0081】

本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニストのアンタゴニスト特性を、本明細書に記載されるアッセイに従って測定することができる。例えば、ガレクチン-10抗体を含む、ガレクチン-10アンタゴニストを、ガレクチン-10結晶化に有利に働く実験条件の下で可溶性ガレクチン-10とともにインキュベートすることができ、該アンタゴニストがこのプロセスを阻害する能力を測定することができる。ガレクチン-10アンタゴニストの阻害活性を、対照、例えば、ガレクチン-10に結合しないアンタゴニストと比べて測定することができる。ガレクチン-10アンタゴニストの阻害活性を、結晶化阻害活性を有さないガレクチン-10結合分子である対照と比べて測定することもできる。ガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10の結晶化を、対照と比べて100%、対照と比べて90%、対照と比べて80%、対照と比べて70%阻害することができる。

30

【0082】

或いは、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片を含む、ガレクチン-10アンタゴニストを予め形成されたガレクチン-10結晶とインキュベートすることができ、該アンタゴニストが結晶を溶解させる能力を好適な時間経過にわたって測定することができる。ガレクチン-10結晶は、インビトロで産生された組換えガレクチン-10から形成された組換え結晶であってもよい。或いは、ガレクチン-10結晶は、患者試料から得られた結晶、例えば、患者の鼻腔又は副鼻腔内の茸から得られた結晶であってもよい。ある実施態様において、本発明のガレクチン-10アンタゴニストは、最大10時間、最大12時間、最大14時間、最大16時間、最大18時間、最大20時間の期間にわたって、予め形成されたガレクチン-10結晶を溶解させることができる。ガレクチン-10アンタゴニストは、結晶を完全に、すなわち、100%溶解させることができる。或いは、ガレクチン-10アンタゴニストは、時間経過をかけて、結晶の50%超が溶解され、結晶の60%超が溶解され、結晶の70%超が溶解され、結晶の80%超が溶解され、結晶の90%超が溶解されるように、結晶を溶解させることができる。

40

【0083】

ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10の結晶充填界面由来の1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合することにより、結晶充填界面を遮蔽

50

する。結晶充填界面を形成するガレクチン-10のアミノ酸は、通常、Ser2、Leu3、Leu4、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Ala12、Ser13、Thr16、Thr42、Glu43、Met44、Lys45、Asp49、Ile50、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Leu96、Pro97、Asp98、Lys99、Gln101、Met103、Gly106、Gln107、Ser108、Ser109、Tyr110、Thr111、Asp113、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Ala120、Gln125、Thr133、Lys134、Phe135、Asn136、Val137、Ser138、Tyr139、Leu140、及びLys141:として同定され、ここで、該位置は、配列番号141を参照して定義される。したがって、ある実施態様において、本発明のガレクチン-10アンタゴニストは、Ser2、Leu3、Leu4、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Ala12、Ser13、Thr16、Thr42、Glu43、Met44、Lys45、Asp49、Ile50、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Leu96、Pro97、Asp98、Lys99、Gln101、Met103、Gly106、Gln107、Ser108、Ser109、Tyr110、Thr111、Asp113、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Ala120、Gln125、Thr133、Lys134、Phe135、Asn136、Val137、Ser138、Tyr139、Leu140、及びLys141:からなる群から選択される1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。ある実施態様において、該エピトープは、ガレクチン-10の結晶充填界面由来のアミノ酸から完全になる。例えば、該エピトープは、ガレクチン-10の結晶充填界面由来の5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個のアミノ酸から構成されることができる。或いは、該エピトープは、結晶充填界面由来のアミノ酸を含み、かつガレクチン-10の結晶充填界面のアミノ酸の外側からの少なくとも1つのアミノ酸をさらに含むことができる。

10

20

【0084】

好ましい実施態様において、該アンタゴニストは、Tyr69を含むエピトープに結合する。その代わりに又はそれに加えて、該アンタゴニストは、好ましくは、Tyr69に隣接するアミノ酸、具体的には、Glu68又はGly70を含むエピトープに結合することができる。一実施態様において、該アンタゴニストは、Glu68、Tyr69、及びGly70を含むエピトープに結合する。

【0085】

特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、His114、Arg115、Ile116、Lys117、及びAla120を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、Ala120、及びLys122を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Thr42、Glu43、Lys45、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Gln74、Asp98、His114、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、Ala120、及びLys122を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。

30

【0086】

ある実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Glu33、Gly59、Arg60、及びLys79を含むエピトープに結合する。該エピトープは、アミノ酸: Gln74、Gln75、及びGlu77をさらに含むことができる。

40

【0087】

特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Leu31、Glu33、Gly59、Arg60、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、及びGln84を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Glu33、Gly59、Arg60、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、及びSer109を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Glu33、Gly59、Arg60、Trp72、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Lys79、Asn80、Met81、Pro82、Gln84、及びSer109を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。特定の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸: Glu33、Gly59、Arg60、Gln74、Gln75、Val76、Glu77、Ser78、Lys79、Asn80、Met81

50

、Pro82、Phe83、Gln84を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。

【0088】

代わりの実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸：Thr42、Asp49、Glu68、Tyr69、Gly70、Ala71、Lys73、Arg115、Ile116、Lys117、Glu119、及びAla120を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。別の実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸：Glu43、Asp49、Glu68、Tyr69、Lys73、Asp98、Asp113、His114、Arg115、Lys117、Glu119、及びAla120を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。さらなる実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸：Asp49、Glu68、Tyr69、Lys73、Gln74、Asp98、Asp113、His114、Arg115、Ile116、及びLys117を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。さらなる実施態様において、該アンタゴニストは、アミノ酸：Ser2、Leu3、Leu4、Pro5、Pro7、Tyr8、Thr9、Glu10、Ala11、Lys23、Arg25、Met44、Gly86、Gln87、Glu88、Phe89、Glu90、Asn105、Gln125、Thr133、Lys134、及びPhe135を含むか又は該アミノ酸からなるエピトープに結合する。

10

【0089】

ガレクチン-10のアミノ酸位置は、配列番号141に示されるヒトタンパク質に関して同定される。

【0090】

ある実施態様において、該アンタゴニストは、ガレクチン-10の二量体化界面由来の1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。二量体化ドメインを形成するガレクチン-10のアミノ酸は、結晶充填界面に関与するアミノ酸と異なってもよい。しかしながら、二量体化界面に位置するアミノ酸に結合するアンタゴニストが結晶充填界面も遮蔽し、それにより、ガレクチン-10の結晶化を中断させることが可能である。二量体化界面を形成するガレクチン-10のアミノ酸は、通常、Pro5、Pro7、Leu27、Ala28、Cys29、Leu31、Asn32、Glu33、Pro34、Tyr35、Gln37、His41、Glu46、Glu47、Gln55、Arg60、Arg61、Arg67、Trp72、Gln75、Trp127、Arg128、及びAsp129：として同定される。したがって、ある実施態様において、本発明のガレクチン-10アンタゴニストは、Pro5、Pro7、Leu27、Ala28、Cys29、Leu31、Asn32、Glu33、Pro34、Tyr35、Gln37、His41、Glu46、Glu47、Gln55、Arg60、Arg61、Arg67、Trp72、Gln75、Trp127、Arg128、及びAsp129：からなる群から選択される1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上のアミノ酸を含むか又は該アミノ酸配列からなるエピトープに結合する。ガレクチン-10のアミノ酸位置は、配列番号141に関して同定される。

20

30

【0091】

ある実施態様において、本発明のガレクチン-10アンタゴニストは、結晶充填界面由来の1以上のアミノ酸及び二量体化界面由来の1以上のアミノ酸を含むガレクチン-10のエピトープに結合する。結晶充填界面由来の1以上のアミノ酸及び二量体化界面由来の1以上のアミノ酸は、上で定義された特定のアミノ酸のいずれかであることができる。好ましい実施態様において、本発明のアンタゴニストは、Glu68、Tyr69、及びGly70を含むエピトープに結合する。

【0092】

(C. ガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片)

40

好ましい実施態様において、本発明のガレクチン-10アンタゴニストは、抗体又はその抗原結合断片である。本明細書中の「抗体」という用語は、最も幅広い意味で使用され、かつガレクチン-10タンパク質に対する適切な免疫学的特異性を示す限り、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体(例えば、二重特異性抗体)、VHH抗体を包含するが、これらに限定されない。本明細書に記載されるガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、上の第B節に記載されているガレクチン-10エピトープのいずれかに対する免疫学的特異性を示すことができる。

【0093】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、微量に存在し得るあり得る天然の突然変異を除いて同一

50

である集団を含む個々の抗体を指す。モノクローナル抗体は、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。さらに、通常は抗原上の異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含む、従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、各々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基又はエピトープに対するものである。「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、全長抗体の一部、通常、抗原結合又はその可変ドメインを含む。抗体断片は、本明細書中の別所に記載されており、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、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子、単鎖可変断片(scFv)、並びに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる(その内容が引用により本明細書中に組み込まれる、Holliger及びHudsonの文献、Nature Biotechnol. 23:1126-36(2005)を参照)。

10

【0094】

本明細書に記載されるガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、ヒトでの治療的使用を意図しており、それゆえ、典型的には、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM型、多くの場合、IgG型の免疫グロブリンであり、その場合、これらは、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、該ガレクチン-10抗体は、IgG抗体である。特に好ましいのは、IgG1抗体である。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ので、モノクローナル抗体が好ましい。ある好ましい実施態様において、ガレクチン-10抗原結合断片は、Fab断片又は「Fab」である。

【0095】

ガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片は、本明細書中の別所で定義されている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には、ヒト生殖系列配列に対する十分に高い%配列同一性を示す天然の非ヒト抗体のVH及びVLドメインを含む抗体が含まれ得る。ある実施態様において、該抗体又はその抗原結合断片は、非ヒト抗体のヒト化又は生殖系列化変異体である。

20

【0096】

ある実施態様において、本明細書に記載されるガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、ラクダ科動物由来であってもよい。ラクダ科動物由来抗体は、重鎖のみの抗体、すなわち、VHH抗体であってもよく、又は従来のヘテロ四量体抗体であってもよい。好ましい実施態様において、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、ラクダ科動物ヘテロ四量体抗体に由来する。さらに好ましい実施態様において、ガレクチン-10抗体はVHH抗体であるか、又はVHH抗体に由来する。

30

【0097】

例えば、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、ラクダ科動物を、対象となる標的、すなわち、ガレクチン-10で免疫する工程を含む方法によって得られる免疫ライブラリーから選択することができる。ラクダ科動物を、標的タンパク質又はそのポリペプチド断片で、又は該タンパク質もしくはそのポリペプチド断片を発現するmRNA分子もしくはcDNA分子で免疫することができる。抗体をラクダ科動物種で産生し、好ましい標的に対する抗体をラクダ科動物免疫ライブラリーから選択する方法は、例えば、引用により本明細書中に組み込まれる、国際特許出願W02010/001251号に記載されている。

【0098】

ある実施態様において、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、ラクダ科ファミリーの種のVHドメイン又はVLドメインから得られる少なくとも1つの超可変(HV)ループ又は相補性決定領域を含むという点で、ラクダ科動物由来であり得る。特に、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、ガレクチン-10による非近交系のラクダ科動物、例えば、リャマの能動免疫によって得られるVH及び/もしくはVLドメイン、又はそのCDRを含むことができる。

40

【0099】

これに関連した「から得られる」という用語は、抗体のHV又はCDRがもとはラクダ科免疫グロブリン遺伝子によってコードされていたアミノ酸配列(又はそのマイナー変異体)を具体化するという意味で構造的関係性を意味する。しかしながら、これは、抗体又はその

50

抗原結合断片を調製するために使用される産生プロセスに関して、必ずしも特定の関係性を意味するものではない。

【0100】

ラクダ科動物由来抗体又はその抗原結合断片は、とりわけ、リャマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコ、又はラクダを含む、任意のラクダ科動物種に由来することができる。

【0101】

ラクダ科動物由来VH及びVLドメイン、又はそのCDRを含む抗体分子は、通常、組換え発現されたポリペプチドであり、キメラポリペプチドであってもよい。「キメラポリペプチド」という用語は、それ以外の場合には隣接して生じることがない2以上のペプチド断片の並置によって作り出される人工的な(非天然の)ポリペプチドを指す。この定義に含まれるのは、2以上の種、例えば、ラクダ科動物及びヒトによってコードされるペプチド断片の並置によって作り出される「種」キメラポリペプチドである。

【0102】

ある実施態様において、VHドメイン全体及び/又はVLドメイン全体は、ラクダ科ファミリーの種から得ることができる。ラクダ科動物由来VHドメイン及び/又はラクダ科動物由来VLドメインは、その後、1以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失がラクダ科動物アミノ酸配列に導入されるタンパク質エンジニアリングに供することができる。これらの人工的に作成される変化は、好ましくは、ラクダ科動物配列に対するアミノ酸置換を含む。そのような変化には、ラクダ科動物によってコードされるVH又はVLドメイン中の1以上のアミノ酸残基がヒトによってコードされる相同なVH又はVLドメイン由来の等価な残基と置き換えられる、「ヒト化」又は「生殖系列化」が含まれる。

【0103】

ガレクチン-10によるラクダ科動物(例えば、リャマ)の能動免疫によって得られる単離されたラクダ科動物VH及びVLドメインは、本発明に従ってガレクチン-10抗体及び抗原結合断片を人工的に作製する土台として使用することができる。無傷のラクダ科動物VH及びVLドメインから出発して、出発ラクダ科動物配列から逸脱する1以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を人工的に作製することが可能である。ある実施態様において、そのような置換、挿入、又は欠失は、VHドメイン及び/又はVLドメインのフレームワーク領域中に存在していてもよい。

【0104】

他の実施態様において、ラクダ科動物由来VH及びVLドメイン(又はその人工的に作成される変異体)及び非ラクダ科抗体由来の1以上の定常ドメイン、例えば、ヒトによってコードされる定常ドメイン(又はその人工的に作成される変異体)を含む「キメラ」抗体分子が提供される。そのような実施態様において、VHドメインとVLドメインは両方ともラクダ科動物の同じ種から得られることが好ましく、例えば、(人工的に作成されるアミノ酸配列変化の導入の前に)、VHとVLは両方ともリャマ(Lama glama)に由来するものであってもよく、又はVHとVLは両方ともアルパカ(Lama pacos)に由来するものであってもよい。そのような実施態様において、VHドメインとVLドメインは両方とも、単一の動物、特に、対象となる抗原で能動免疫された単一の動物に由来してもよい。

【0105】

ラクダ科VH及び/又はVLドメインの一次アミノ酸配列の人工的改変の代わりとして、個々のラクダ科動物由来超可変ループもしくはCDR、又はその組合せをラクダ科動物VH/VLドメインから単離し、CDRグラフティングにより、代替りの(すなわち、非ラクダ科)フレームワーク、例えば、ヒトVH/VLフレームワークに移すことができる。

【0106】

非限定的な実施態様において、ガレクチン-10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。ヒトで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、又はその少なくとも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1以上の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ってもよい。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抗体に由来してもよい。

【0107】

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、ヒト定常領域との少なくとも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。本発明は、「完全ヒト」ヒンジ領域の存在が明示的に要求される実施態様を除いて、ヒト配列に関する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換により改変されている「ヒト」配列の定常ドメインを含むポリペプチドも企図する。

【0108】

ガレクチン-10抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の定常領域内に、特に、Fc領域内に1以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を有することができる。アミノ酸置換は、置換されるアミノ酸と、異なる天然のアミノ酸との又は非天然もしくは修飾アミノ酸との交換を生じさせることができる。他の構造的修飾、例えば、グリコシル化パターンの変化(例えば、N-結合型又はO-結合型グリコシル化部位の付加又は欠失によるもの)なども許容される。

【0109】

ガレクチン-10抗体をFc領域内で修飾して、新生児受容体FcRnに対する結合親和性を増大させることができる。増大した結合親和性は、酸性pH(例えば、大体約pH 5.5~約pH 6.0)で測定可能であり得る。増大した結合親和性は、中性pH(例えば、約pH 6.9~約pH 7.4)でも測定可能であり得る。「増大した結合親和性」とは、未修飾のFc領域と比べたFcRnに対する増大した結合親和性を意味する。通常、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増大したFcRn結合親和性は、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。

【0110】

ある実施態様において、Fc領域内の1以上のアミノ酸残基は、FcRnに対する結合を増大させるように異なるアミノ酸と置換することができる。FcRn結合を増大させ、それにより、抗体薬物動態を改善するいくつかのFc置換が報告されている。そのような置換は、例えば、その内容が本明細書中に完全に組み込まれる、Zalevskyらの文献(2010) Nat. Biotechnol. 28(2):157-9; Hintonらの文献(2006) J Immunol. 176:346-356; Yeungらの文献(2009) J Immunol. 182:7663-7671; Presta LGの文献(2008) Curr. Op. Immunol. 20:460-470; 及びVaccaroらの文献(2005) Nat. Biotechnol. 23(10):1283-88に報告されている。

【0111】

ある実施態様において、ガレクチン-10抗体は、アミノ酸置換H433K及びN434Fを含むか又は該アミノ酸置換からなる修飾されたヒトIgG Fcドメインを含み、ここで、Fcドメイン付番は、EU付番によるものである。さらなる実施態様において、本明細書に記載されるガレクチン-10抗体は、アミノ酸置換M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434Fを含むか又は該アミノ酸置換からなる修飾されたヒトIgG Fcドメインを含み、ここで、Fcドメイン付番は、EU付番によるものである。

【0112】

ある実施態様において、ガレクチン-10抗体は、対応する野生型IgG配列と比べて、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個、最大10個、最

10

20

30

40

50

大12個、最大15個、最大20個の置換からなる修飾されたヒトIgG Fcドメインを含む。

【0113】

ガレクチン-10抗体は、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性のある毒素、又はその断片)、或いは放射性同位体(すなわち、放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートされた抗体を含む免疫コンジュゲートを形成するように修飾することもできる。Fc領域は、引用により本明細書中に組み込まれるChan及びCarterの文献(2010) Nature Reviews: Immunology 10:301-316により記載されているように、半減期延長のために改変することもできる。

【0114】

また別の実施態様において、Fc領域は、抗体依存的細胞傷害性(ADCC)を媒介する抗体の能力を増大させるために及び/又は1以上のアミノ酸を修飾することによりFc γ 受容体に対する抗体の親和性を増大させるために修飾される。

【0115】

特定の実施態様において、Fc領域は、エフェクター機能がないように改変することができる。ある実施態様において、本発明の抗体分子は、低下したエフェクター機能を有する天然のIgGアイソタイプ、例えば、IgG4に由来するFc領域を有することができる。IgG4に由来するFc領域は、例えば、インビボでのIgG4分子間のアームの交換を最小限に抑える修飾の導入により、治療的有用性を増大させるようにさらに修飾することができる。IgG4に由来するFc領域は、S228P置換を含むように改変することができる。

【0116】

ある実施態様において、抗体分子は、グリコシル化に関して修飾される。例えば、アグリコシル化抗体を作製することができる(すなわち、該抗体はグリコシル化を欠く)。グリコシル化は、例えば、標的抗原に対する抗体の親和性を増大させるように改変することもできる。そのような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1以上のグリコシル化部位を改変することにより達成することができる。例えば、1以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の消失をもたらす、それにより、その部位でのグリコシル化を消失させる1以上のアミノ酸置換を行うことができる。そのような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増大させることができる。

【0117】

フコシル残基の量が低下している低フコシル化抗体又は完全にもしくは部分的に脱フコシル化されている抗体(Natsumeらの文献、Drug Design Development and Therapy, Vol.3, pp7-16, 2009に記載されているもの)或いはバイセクティングGlcNac構造が増加している抗体などの改変されたタイプのグリコシル化を有する変異体ガレクチン-10抗体も想定される。そのような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC活性を増大させ、通常、「天然の」ヒトFcドメインを含む等価な抗体と比べて10倍のADCC増強を生じさせることが示されている。そのような炭水化物修飾は、例えば、改変されたグリコシル化酵素装置(Yamane-Ohnuki及びSatohの文献mmAbs 1:3, 230-236, 2009により記載されているもの)を有する宿主細胞で抗体を発現させることにより達成することができる。増強したADCC機能を有する非フコシル化抗体の例は、BioWa社のPotelligent(商標)技術を用いて産生されるものである。

【0118】

(D. 例示的なガレクチン-10抗体)

本発明は、例示的なガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片を提供する。これらのガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、本発明による好ましいガレクチン-10アンタゴニストとして働く。本発明の例示的なガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、下記のように、もっぱらその構造的特徴に関して定義することができる。

【0119】

本明細書に提供されるのは、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であり、ここで、該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、

10

20

30

40

50

- (i) 配列番号3を含むか又は配列番号3からなるHCDR3;配列番号2を含むか又は配列番号2からなるHCDR2;配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1;配列番号58を含むか又は配列番号58からなるLCDR3;配列番号57を含むか又は配列番号57からなるLCDR2;配列番号56を含むか又は配列番号56からなるLCDR1;
- (ii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3;配列番号5を含むか又は配列番号5からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号61を含むか又は配列番号61からなるLCDR3;配列番号60を含むか又は配列番号60からなるLCDR2;配列番号59を含むか又は配列番号59からなるLCDR1;
- (iii) 配列番号9を含むか又は配列番号9からなるHCDR3;配列番号8を含むか又は配列番号8からなるHCDR2;配列番号7を含むか又は配列番号7からなるHCDR1;配列番号64を含むか又は配列番号64からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号62を含むか又は配列番号62からなるLCDR1;
- (iv) 配列番号12を含むか又は配列番号12からなるHCDR3;配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2;配列番号10を含むか又は配列番号10からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;
- (v) 配列番号15を含むか又は配列番号15からなるHCDR3;配列番号14を含むか又は配列番号14からなるHCDR2;配列番号13を含むか又は配列番号13からなるHCDR1;配列番号70を含むか又は配列番号70からなるLCDR3;配列番号69を含むか又は配列番号69からなるLCDR2;配列番号68を含むか又は配列番号68からなるLCDR1;
- (vi) 配列番号18を含むか又は配列番号18からなるHCDR3;配列番号17を含むか又は配列番号17からなるHCDR2;配列番号16を含むか又は配列番号16からなるHCDR1;配列番号72を含むか又は配列番号72からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;
- (vii) 配列番号20を含むか又は配列番号20からなるHCDR3;配列番号19を含むか又は配列番号19からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号75を含むか又は配列番号75からなるLCDR3;配列番号74を含むか又は配列番号74からなるLCDR2;配列番号73を含むか又は配列番号73からなるLCDR1;
- (viii) 配列番号23を含むか又は配列番号23からなるHCDR3;配列番号22を含むか又は配列番号22からなるHCDR2;配列番号21を含むか又は配列番号21からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号65を含むか又は配列番号65からなるLCDR1;
- (ix) 配列番号25を含むか又は配列番号25からなるHCDR3;配列番号24を含むか又は配列番号24からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号78を含むか又は配列番号78からなるLCDR3;配列番号77を含むか又は配列番号77からなるLCDR2;配列番号76を含むか又は配列番号76からなるLCDR1;
- (x) 配列番号28を含むか又は配列番号28からなるHCDR3;配列番号27を含むか又は配列番号27からなるHCDR2;配列番号26を含むか又は配列番号26からなるHCDR1;配列番号67を含むか又は配列番号67からなるLCDR3;配列番号66を含むか又は配列番号66からなるLCDR2;配列番号79を含むか又は配列番号79からなるLCDR1;
- (xi) 配列番号31を含むか又は配列番号31からなるHCDR3;配列番号30を含むか又は配列番号30からなるHCDR2;配列番号29を含むか又は配列番号29からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;
- (xii) 配列番号33を含むか又は配列番号33からなるHCDR3;配列番号32を含むか又は配列番号32からなるHCDR2;配列番号1を含むか又は配列番号1からなるHCDR1;配列番号84を含むか又は配列番号84からなるLCDR3;配列番号83を含むか又は配列番号83からなるLCDR2;配列番号82を含むか又は配列番号82からなるLCDR1;
- (xiii) 配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号35を含むか又は配列番号35からなるHCDR2;配列番号34を含むか又は配列番号34からなるHCDR1;配列番号87を含む

か又は配列番号87からなるLCDR3;配列番号86を含むか又は配列番号86からなるLCDR2;配列番号85を含むか又は配列番号85からなるLCDR1;

(xiv) 配列番号38を含むか又は配列番号38からなるHCDR3;配列番号11を含むか又は配列番号11からなるHCDR2;配列番号37を含むか又は配列番号37からなるHCDR1;配列番号78を含むか又は配列番号78からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号88を含むか又は配列番号88からなるLCDR1;

(xv) 配列番号41を含むか又は配列番号41からなるHCDR3;配列番号40を含むか又は配列番号40からなるHCDR2;配列番号39を含むか又は配列番号39からなるHCDR1;配列番号91を含むか又は配列番号91からなるLCDR3;配列番号90を含むか又は配列番号90からなるLCDR2;配列番号89を含むか又は配列番号89からなるLCDR1;

10

(xvi) 配列番号43を含むか又は配列番号43からなるHCDR3;配列番号42を含むか又は配列番号42からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号94を含むか又は配列番号94からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号92を含むか又は配列番号92からなるLCDR1;

(xvii) 配列番号6を含むか又は配列番号6からなるHCDR3;配列番号44を含むか又は配列番号44からなるHCDR2;配列番号4を含むか又は配列番号4からなるHCDR1;配列番号97を含むか又は配列番号97からなるLCDR3;配列番号96を含むか又は配列番号96からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;

(xviii) 配列番号47を含むか又は配列番号47からなるHCDR3;配列番号46を含むか又は配列番号46からなるHCDR2;配列番号45を含むか又は配列番号45からなるHCDR1;配列番号94を含むか又は配列番号94からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1;

20

(xix) 配列番号50を含むか又は配列番号50からなるHCDR3;配列番号49を含むか又は配列番号49からなるHCDR2;配列番号48を含むか又は配列番号48からなるHCDR1;配列番号96を含むか又は配列番号96からなるLCDR3;配列番号63を含むか又は配列番号63からなるLCDR2;配列番号95を含むか又は配列番号95からなるLCDR1;

(xx) 配列番号36を含むか又は配列番号36からなるHCDR3;配列番号52を含むか又は配列番号52からなるHCDR2;配列番号51を含むか又は配列番号51からなるHCDR1;配列番号98を含むか又は配列番号98からなるLCDR3;配列番号97を含むか又は配列番号97からなるLCDR2;配列番号80を含むか又は配列番号80からなるLCDR1;及び

30

(xxi) 配列番号55を含むか又は配列番号55からなるHCDR3;配列番号54を含むか又は配列番号54からなるHCDR2;配列番号53を含むか又は配列番号53からなるHCDR1;配列番号81を含むか又は配列番号81からなるLCDR3;配列番号93を含むか又は配列番号93からなるLCDR2;配列番号71を含むか又は配列番号71からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む。

【0 1 2 0】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該抗体又は抗原結合断片が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、ここで、可変重鎖CDR3配列が

【化2】

40

配列番号:3 [DRNLGYRLGYPYDY]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;

可変重鎖CDR2配列が

【化3】

配列番号:2 [GISWNGGSTYYAESMKG]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;

可変重鎖CDR1配列が

【化 4】

配 列 番 号:1 [DYAMS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR3配列が

【化 5】

配 列 番 号:58 [ASYRSSNNAV]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR2配列が

10

【化 6】

配 列 番 号:57 [EVNKRAS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR1配列が

【化 7】

配 列 番 号:56 [AGTSSDVGYGNYVS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;かつ

ここで、該配列変異体が、列挙された配列中に1つ、2つ、又は3つのアミノ酸置換(例えば、保存的置換、ヒト化置換、又は親和性変異体)を含む、
抗体又はその抗原結合断片が提供される。

20

【0 1 2 1】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、
該抗体又は抗原結合断片が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、ここで、
可変重鎖CDR3配列が

【化 8】

配 列 番 号:6 [PGDRLWYYRYDY]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変重鎖CDR2配列が

30

【化 9】

配 列 番 号:5 [AINSGGGSTSYADSVKG]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変重鎖CDR1配列が

【化 1 0】

配 列 番 号:4 [SYAMS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR3配列が

40

【化 1 1】

配 列 番 号:61 [ASYRYRNNVV]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR2配列が

【化 1 2】

配 列 番 号:60 [KVSRRAS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;

50

可変軽鎖CDR1配列が
【化13】

配列番号:59 [AGTSSDIGYGNYS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;かつ
ここで、該配列変異体が、列挙された配列中に1つ、2つ、又は3つのアミノ酸置換(例えば、保存的置換、ヒト化置換、又は親和性変異体)を含む、
抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【0122】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって 10
、該抗体又は抗原結合断片が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、ここで、
可変重鎖CDR3配列が

【化14】

配列番号:9 [YIRGSSWSGWSAYDY]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変重鎖CDR2配列が

【化15】

配列番号:8 [VIASDGSTYYSPSLKS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変重鎖CDR1配列が

【化16】

配列番号:7 [TSYYAWS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR3配列が

【化17】

配列番号:64 [QSADSSDNPV]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR2配列が

【化18】

配列番号:63 [KDSERPS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR1配列が

【化19】

配列番号:62 [QGGNFGYYYGS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;かつ
ここで、該配列変異体が、列挙された配列中に1つ、2つ、又は3つのアミノ酸置換(例えば、保存的置換、ヒト化置換、又は親和性変異体)を含む、
抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【0123】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって
、該抗体又は抗原結合断片が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、ここで、
可変重鎖CDR3配列が

10

20

30

40

【化 2 0】

配 列 番 号:12 [RPNWYRALDA]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変重鎖CDR2配列が

【化 2 1】

配 列 番 号:11 [AIAYSGSTYYSPSLKS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変重鎖CDR1配列が

【化 2 2】

配 列 番 号:10 [TNSYYWS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR3配列が

【化 2 3】

配 列 番 号:67 [QSYESSTSPV]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR2配列が

【化 2 4】

配 列 番 号:66 [GDSNRPS]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;
可変軽鎖CDR1配列が

【化 2 5】

配 列 番 号:65 [QGANLGRYYGI]

もしくはその配列変異体を含むか又はこれらからなり;かつ

ここで、該配列変異体が、列挙された配列中に1つ、2つ、又は3つのアミノ酸置換(例えば、保存的置換、ヒト化置換、又は親和性変異体)を含む、抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【0 1 2 4】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合する抗体及び抗原結合断片は、以下のもの

(i) 配列番号99のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号100のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;

(ii) 配列番号101のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号102のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;

(iii) 配列番号103のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号104のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;

(iv) 配列番号105のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

(xvii) 配列番号131のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もし 50

くは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号132のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;

(xviii) 配列番号133のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号134のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;

(xix) 配列番号135のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号136のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;

(xx) 配列番号137のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL;並びに

(xxi) 配列番号139のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVH及び配列番号140のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるVL

:から選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる抗体分子から選択される。

【0125】

本明細書に提供されるのは、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該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、

(i) 配列番号162を含むか又は配列番号162からなるHCDR3;配列番号161を含むか又は配列番号161からなるHCDR2;配列番号160を含むか又は配列番号160からなるHCDR1;配列番号179を含むか又は配列番号179からなるLCDR3;配列番号178を含むか又は配列番号178からなるLCDR2;配列番号177を含むか又は配列番号177からなるLCDR1;

(ii) 配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号182を含むか又は配列番号182からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(iii) 配列番号168を含むか又は配列番号168からなるHCDR3;配列番号167を含むか又は配列番号167からなるHCDR2;配列番号166を含むか又は配列番号166からなるHCDR1;配列番号185を含むか又は配列番号185からなるLCDR3;配列番号184を含むか又は配列番号184からなるLCDR2;配列番号183を含むか又は配列番号183からなるLCDR1;

(iv) 配列番号171を含むか又は配列番号171からなるHCDR3;配列番号170を含むか又は配列番号170からなるHCDR2;配列番号169を含むか又は配列番号169からなるHCDR1;配列番号187を含むか又は配列番号187からなるLCDR3;配列番号186を含むか又は配列番号186からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(v) 配列番号174を含むか又は配列番号174からなるHCDR3;配列番号173を含むか又は配列番号173からなるHCDR2;配列番号172を含むか又は配列番号172からなるHCDR1;配列番号189を含むか又は配列番号189からなるLCDR3;配列番号188を含むか又は配列番号188からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1;

(vi) 配列番号176を含むか又は配列番号176からなるHCDR3;配列番号175を含むか又は配列番号175からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号192を含むか又は配列番号192からなるLCDR3;配列番号191を含むか又は配列番号191からなるLCDR2;配列番号190を含むか又は配列番号190からなるLCDR1;及び

(vii) 配列番号165を含むか又は配列番号165からなるHCDR3;配列番号164を含むか又は配列

10

20

30

40

50

番号164からなるHCDR2;配列番号163を含むか又は配列番号163からなるHCDR1;配列番号193を含むか又は配列番号193からなるLCDR3;配列番号181を含むか又は配列番号181からなるLCDR2;配列番号180を含むか又は配列番号180からなるLCDR1

:からなる群から選択されるCDR配列を含む、抗体又はその抗原結合断片である。

【0126】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合する抗体及び抗原結合断片は、以下のもの

(i) 配列番号194のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号195のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(ii) 配列番号196のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号197のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iii) 配列番号198のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号199のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(iv) 配列番号200のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号201のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(v) 配列番号202のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号203のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;

(vi) 配列番号204のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号205のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列;並びに

(vii) 配列番号206のアミノ酸配列を含むVH又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列及び配列番号207のアミノ酸配列を含むVL又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列

:から選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる抗体分子から選択される。

【0127】

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定義される実施態様について、VH及び/又はVLドメインは、そのバリエーションがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するものと同一のCDR配列を保持することができる。

【0128】

本明細書に提供されるのは、ガレクチン-10に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、該抗体がVHH抗体であり、かつ該VHHドメインが、

(i) 配列番号210を含むか又は配列番号210からなるCDR3;配列番号209を含むか又は配列番号209からなるCDR2;配列番号208を含むか又は配列番号208からなるCDR1;

(ii) 配列番号213を含むか又は配列番号213からなるCDR3;配列番号212を含むか又は配列番号212からなるCDR2;配列番号211を含むか又は配列番号211からなるCDR1;

(iii) 配列番号216を含むか又は配列番号216からなるCDR3;配列番号215を含むか又は配列番号215からなるCDR2;配列番号214を含むか又は配列番号214からなるCDR1;

(iv) 配列番号219を含むか又は配列番号219からなるCDR3;配列番号218を含むか又は配列番号218からなるCDR2;配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1;

(v) 配列番号222を含むか又は配列番号222からなるCDR3;配列番号221を含むか又は配列番号221からなるCDR2;配列番号220を含むか又は配列番号220からなるCDR1;

(vi) 配列番号225を含むか又は配列番号225からなるCDR3;配列番号224を含むか又は配列番号224からなるCDR2;配列番号223を含むか又は配列番号223からなるCDR1;

(vii) 配列番号228を含むか又は配列番号228からなるCDR3; 配列番号227を含むか又は配列番号227からなるCDR2; 配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(viii) 配列番号231を含むか又は配列番号231からなるCDR3; 配列番号230を含むか又は配列番号230からなるCDR2; 配列番号229を含むか又は配列番号229からなるCDR1;
(ix) 配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3; 配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2; 配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(x) 配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3; 配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2; 配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(xi) 配列番号238を含むか又は配列番号238からなるCDR3; 配列番号237を含むか又は配列番号237からなるCDR2; 配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(xii) 配列番号241を含むか又は配列番号241からなるCDR3; 配列番号240を含むか又は配列番号240からなるCDR2; 配列番号239を含むか又は配列番号239からなるCDR1;
(xiii) 配列番号236を含むか又は配列番号236からなるCDR3; 配列番号235を含むか又は配列番号235からなるCDR2; 配列番号226を含むか又は配列番号226からなるCDR1;
(xiv) 配列番号244を含むか又は配列番号244からなるCDR3; 配列番号243を含むか又は配列番号243からなるCDR2; 配列番号242を含むか又は配列番号242からなるCDR1;
(xv) 配列番号234を含むか又は配列番号234からなるCDR3; 配列番号233を含むか又は配列番号233からなるCDR2; 配列番号232を含むか又は配列番号232からなるCDR1;
(xvi) 配列番号247を含むか又は配列番号247からなるCDR3; 配列番号246を含むか又は配列番号246からなるCDR2; 配列番号245を含むか又は配列番号245からなるCDR1; 及び
(xvii) 配列番号249を含むか又は配列番号249からなるCDR3; 配列番号248を含むか又は配列番号248からなるCDR2; 配列番号217を含むか又は配列番号217からなるCDR1
: からなる群から選択されるCDR配列を含む、抗体又はその抗原結合断片である。

10

20

【0129】

ある実施態様において、ガレクチン-10に結合するVHH抗体は、配列番号250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、もしくは266のいずれか1つによって表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか或いは該アミノ酸配列からなる抗体分子から選択されるものを含むか或いはそれからなるVHHドメインを含む。

【0130】

VHHドメインが参照配列との特定のパーセンテージ配列同一性によって定義される実施態様について、VHHドメインは、バリエーションがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するものと同一のCDR配列を保持することができる。

30

【0131】

本発明は、本明細書で例示されるガレクチン-10抗体と同じエピトープに結合する抗体又はその抗原結合断片も提供する。

【0132】

ある実施態様において、上記のCDR配列を有すると定義されているか又は上記の特定のVH/VL/VHHドメインアミノ酸配列との特定のパーセンテージ同一性を有すると定義されている例示的なガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片は、該CDR、VH、VL、及び/又はVHH配列が由来する抗体又はその抗原結合断片のヒト化、生殖系列化、又は親和性変異体である。

40

【0133】

好ましい実施態様において、例えば、高いヒト相同性を示す上記のCDR配列を有する例示的なガレクチン-10抗体分子は、該CDR配列が由来する抗体又はその抗原結合断片のヒト化又は生殖系列化変異体である。

【0134】

非限定的な実施態様において、上記のCDR、VH、及び/又はVL配列を有する例示的なガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片は、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

50

のである。ヒトで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その少なくとも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1以上の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ってもよい。

【0135】

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、ヒト定常領域との少なくとも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。本発明は、「完全ヒト」ヒンジ領域の存在が明示的に要求される実施態様を除いて、ヒト配列に関する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換により改変されている「ヒト」配列の定常ドメインを含むポリペプチドも企図する。本明細書に記載される例示的なFc領域修飾はいずれも、上記のCDR及び/又はVH/VLドメイン配列を有するガレクチン-10抗体に組み込むことができる。ある実施態様において、上記のCDR及び/又はVH/VLドメイン配列を有するガレクチン-10抗体は、アミノ酸置換H433K及びN434Fを含むか又は該アミノ酸置換からなる修飾されたヒトIgG Fcドメインを含み、ここで、Fcドメイン付番は、EU付番によるものである。ある実施態様において、上記のCDR及び/又はVH/VLドメイン配列を有するガレクチン-10抗体は、アミノ酸置換M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434Fを含むか又は該アミノ酸置換からなる修飾されたヒトIgG Fcドメインを含む。

【0136】

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、最適な形でアラインされ、かつ比較されることになるアミノ酸配列がこれら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る。同一性のパーセンテージは、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、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域内の位置の総数で除し、かつ得られた結果に100を掛けることにより計算される。例えば、使用されるパラメータがデフォルトで与えられ(特に、「オープンギャップペナルティ」:5及び「伸長ギャップペナルティ」:2というパラメータについて;選ばれるマトリックスは、このプログラムによって提供されるマトリックス「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がこのプログラムによって直接計算される、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>というサイトで入手可能なBLASTプログラム「BLAST 2配列」(Tatusovaらの文献、「Blast 2配列—タンパク質配列と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 Microbiol Lett. 174:247-250)を使用することが可能である。

【0137】

(E. ガレクチン-10抗体をコードするポリヌクレオチド)

本発明は、本発明のガレクチン-10抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチド分子も提供する。本明細書に記載されるガレクチン-10抗体の断片、例えば、VH、VL、及び/又はVHHドメインをコードするポリヌクレオチド分子とともに、全長ガレクチン-10抗体をコードするポリヌクレオチド分子が提供される。宿主細胞又は無細胞発現系、及びこの発現ベクターを含有する宿主細胞又は無細胞発現系における抗体又はその断片の発現を可能にする調節性配列に機能的に連結された本発明の該ヌクレオチド配列を含有する発現ベクターも提供される。

【0138】

本発明のガレクチン-10抗体をコードするポリヌクレオチド分子には、例えば、組換えD

NA分子が含まれる。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、又は「ポリヌクレオチド分子」という用語は、本明細書で互換的に使用され、一本鎖又は二本鎖のいずれかの任意のDNA又はRNA分子、及び一本鎖の場合、その相補的配列の分子を指す。核酸分子を議論する際、特定の核酸分子の配列又は構造は、5'から3'への方向に配列を提供する通常の慣例に従って、本明細書に記載され得る。本発明のいくつかの実施態様において、核酸又はポリヌクレオチドは「単離されて」いる。この用語は、核酸分子に適用されるとき、それが由来した生物の天然のゲノム中で直接隣接している配列から分離されている核酸分子を指す。例えば、「単離された核酸」は、プラスミド又はウイルスベクターなどのベクターに挿入されているか、或いは原核もしくは真核細胞又は非ヒト宿主生物のゲノムDNAに組み込まれているDNA分子を含むことができる。RNAに適用されるとき、「単離されたポリヌクレオチド」は、主に、上で定義された単離されたDNA分子によってコードされるRNA分子を指す。或いは、この用語は、その天然状態で(すなわち、細胞又は組織中で)関連しているであろう他の核酸から精製/分離されているRNA分子を指すことができる。単離されたポリヌクレオチド(DNA又はRNAのいずれか)は、生物学的又は合成的手段により直接産生され、その産生の間に存在する他の構成要素から分離された分子をさらに表すことができる。

【0139】

本発明によるガレクチン-10抗体の組換え産生のために、それをコードする組換えポリヌクレオチド又は異なる鎖もしくはドメインをコードする組換えポリヌクレオチドを(標準的な分子生物学技法を用いて)調製し、選ばれた宿主細胞又は無細胞発現系における発現のための複製可能なベクターに挿入することができる。好適な宿主細胞は、原核生物、酵母、高等真核生物細胞、具体的には、哺乳動物であることができる。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);ヒト胎児腎臓株(懸濁培養での増殖用にサブクローニングされた293又は293細胞、Grahamらの文献、J. Gen. Virol. 36:59(1977));ベイビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO、Urlaubらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));マウスセルトリ細胞(TM4、Matherの文献、Biol. Reprod. 23:243-251(1980));マウス骨髄腫細胞SP2/0-AG14(ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287)又はNS0(HPAカルチャーコレクション第85110503号);サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34);パッファローラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065);マウス乳腺腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL51);TRI細胞(Matherらの文献、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5細胞;FS4細胞;及びヒト肝癌株(Hep G2)、並びにDSMのPERC-6細胞株である。これらの宿主細胞の各々で使用するのに好適な発現ベクターも当技術分野で一般に公知である。

【0140】

「宿主細胞」という用語は、一般に、培養細胞株を指すことに留意すべきである。本発明による抗原結合ポリペプチドをコードする発現ベクターが導入されているヒト全体は、「宿主細胞」の定義から明白に除外される。

【0141】

(F. 抗体産生)

さらなる態様において、本発明は、抗体の発現を可能にする条件下で抗体をコードするポリヌクレオチド(例えば、発現ベクター)を含有する宿主細胞(又は無細胞発現系)を培養すること、及び発現された抗体を回収することを含む、本発明の抗体を産生する方法も提供する。この組換え発現プロセスは、ヒトでの治療的使用が意図されるモノクローナル抗体を含む、本発明によるガレクチン-10抗体を含む抗体の大規模製造に使用することができる。インビボでの治療的使用に好適な組換え抗体の大規模製造のための好適なベクター、細胞株、及び製造プロセスは、一般に、当技術分野で入手可能であり、かつ当業者に周知である。

【0142】

(G. 医薬組成物)

本発明の範囲には、1以上の医薬として許容し得る担体又は賦形剤とともに製剤化された、ガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片のうちの1つ又は組合せを含有する医薬組成物が含まれる。そのような組成物は、(例えば、2以上の異なる)ガレクチン-10抗体のうちの1つ又は組合せを含むことができる。ヒトでの治療的使用のためのモノクローナル抗体を製剤化するための技法は、当技術分野で周知であり、例えば、その内容が本明細書中に完全に組み込まれる、Wangらの文献、Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp 1-26, 2007で概説されている。

【0143】

組成物を製剤化するために使用し得る医薬として許容し得る賦形剤としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、人血清アルブミン、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば、プロタミン硫酸塩、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム)、ポリエチレングリコール、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂:が挙げられるが、これらに限定されない。

【0144】

ある実施態様において、組成物は、限定されないが、筋肉内、静脈内、皮内、腹腔内注射、皮下、硬膜外、経鼻、口腔、直腸、局所、吸入、口腔内(例えば、舌下)、及び経皮投与を含む、任意の好適な投与経路を介する対象への投与のために製剤化される。

【0145】

(H. 治療方法)

本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニスト、特に、ガレクチン-10抗体及び抗原結合断片は、治療方法で 사용할 ことができる。したがって、本明細書に提供されるのは、医薬として使用するための本発明の第一の態様によるガレクチン-10アンタゴニストである。或いは、本明細書に提供されるのは、治療方法で使用するための本発明の第一の態様によるガレクチン-10アンタゴニストである。好ましい実施態様において、本発明は、医薬として使用するための本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体及び抗原結合断片を提供する。或いは、本発明は、治療方法で使用するための本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体及び抗原結合断片を提供する。医薬として使用するためのガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片を含むガレクチン-10アンタゴニストは、通常、医薬組成物として製剤化される。重要なことに、ガレクチン-10アンタゴニスト、特に、ガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片に関する上記の全ての実施態様は、本明細書に記載される方法に等しく適用可能である。

【0146】

本発明は、それを必要としている対象を治療する方法であって、該対象に、本発明の第一の態様によるガレクチン-10アンタゴニストの治療有効量を投与することを含む方法も提供する。好ましい実施態様において、該ガレクチン-10アンタゴニストは、本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片である。そのような治療方法において、ガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片を含むガレクチン-10アンタゴニストは、通常、医薬組成物として製剤化される。本明細書で 使用される場合、「治療有効量」という用語は、治療効果を生じるのに十分であるガレクチン-10アンタゴニスト、例えば、抗体の分量又は用量、例えば、疾患又は疾病と関連する症状を根絶するか又は少なくとも緩和するために必要とされるアンタゴニストの分量又は用量を意味することが意図される。適当な量又は用量は、必要に応じて、医師により決定されることができる。例えば、該用量は、治療されるべき対象のサイズ又は重量、治療されるべき対象の年齢、治療されるべき対象の全身の健康状態、治療されるべき疾病、及び投与経路などの因子に基づいて調整することができる。

【0147】

臨床的使用のために、ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストは、本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片であり、これは、約0.1mg/kg体重～約20mg/kg体重の1以上の用量として対象に投与される。ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストは、本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片であり、これは、約0.1mg/kg体重～約10mg/kg体重の用量で対象に投与される。ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストは、本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片であり、これは、約0.5mg/kg体重～約10mg/kg体重の用量で対象に投与される。ある実施態様において、the ガレクチン-10アンタゴニストは、本明細書中の別所で記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片であり、これは、約1mg/kg体重～約10mg/kg体重の用量で対象に投与される。

10

【0148】

ガレクチン-10アンタゴニスト、特に、ガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片は、ガレクチン-10結晶化を中断させることができるという理由で、治療方法において有用である。本明細書中の別所で説明されているように、本発明のガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10のエピトープに結合し、それにより、結晶充填界面を遮蔽し、結果として、ガレクチン-10の結晶化を中断させる。ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10の結晶化を阻害する。ある実施態様において、ガレクチン-10アンタゴニストは、結晶性ガレクチン-10の溶解を促進する。

【0149】

ガレクチン-10抗体及びその抗原結合断片を含む、ガレクチン-10アンタゴニストは、ガレクチン-10結晶又はCLCの存在又は形成と関連する疾患又は疾病を予防又は治療する際に使用するためのものであることができる。本明細書に提供されるのは、本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニスト、特に、ガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片の有効量を投与することにより、それを必要としている患者又は対象におけるガレクチン-10結晶又はCLCの存在又は形成と関連する疾患又は疾病を予防又は治療する方法である。

20

【0150】

本明細書で使用される場合、疾患又は疾病を「予防する」方法は、疾患の発症を予防すること、症状を予防すること、疾患もしくは疾病の進行を予防すること、又は疾患もしくは疾病を発症する対象のリスクを軽減することを意味する。本明細書で使用される場合、疾患又は疾病を「治療する」方法は、疾患もしくは疾病を治癒させること、及び/又は患者の苦しみが軽減されるように、疾患もしくは疾病と関連する症状を緩和もしくは根絶することを意味する。

30

【0151】

ガレクチン-10結晶の存在を特徴とする疾患又は疾病を有する患者について、治療方法は、通常、患者の組織中にあるガレクチン-10結晶を溶解させることができる、ガレクチン-10アンタゴニスト、好ましくは、ガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片の投与を含む。ガレクチン-10結晶の形成を特徴とする疾患又は疾病を発症する「リスクがある」と特定された患者について、予防方法は、ガレクチン-10の結晶化を阻害することができる、ガレクチン-10アンタゴニスト、好ましくは、ガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片の投与を含むことができる。

40

【0152】

ガレクチン-10結晶又はCLCは、様々な疾患及び疾病を有する患者で観察されている。したがって、本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニストは、喘息;慢性副鼻腔炎;セリアック病;蠕虫感染症;消化管好酸球性炎症;嚢胞性線維症(CF);アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA);チャージ・ストラウス血管炎;慢性好酸球性肺炎;及び急性骨髄性白血病:からなる群から選択される疾患又は疾病を予防又は治療するために使用することができるということになる。好ましい実施態様において、ガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片は、喘息;慢性副鼻腔炎;セリアック病;蠕虫感染症;消化管好酸球性炎症;嚢胞性線維症(CF);アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA);チャージ・ストラウス血管炎;慢性好酸球性肺炎;及び急性骨髄性白血病:からなる群から選択される疾患又は疾病

50

を予防又は治療するために使用される。

【0153】

上述のように、ガレクチン-10結晶又はCLCは、特に、好酸球性炎症を特徴とする疾患又は疾病と関連している。好ましい実施態様において、本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニスト、好ましくは、本明細書に記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片は、好酸球性炎症と関連する障害又は疾病を治療するために使用される。

【0154】

特に好ましい実施態様において、本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニスト、好ましくは、本明細書に記載されるガレクチン-10抗体又はその抗原結合断片は、喘息を予防するために使用される。

10

【0155】

本明細書に提示される結果は、インビボでの自然免疫応答の誘導及び気道炎症の誘導におけるCLCの重要な役割を強調している。これらの効果は、本明細書に記載される例示的なガレクチン-10抗体によって復帰させることに成功した。本明細書に記載されるマウスモデルで観察された炎症は、NLRP3インフラマソーム複合体とは無関係であることが分かった。これらの結果は、NLRP3インフラマソーム、すなわち、以前にCLC病理に関係があるとされた炎症性複合体とは無関係な経路により媒介される炎症応答におけるCLCの原因としての役割を初めて示すものである。したがって、本発明の方法は、炎症状態又は障害、特に、気道の炎症状態又は障害を治療するために使用することができるということになる。治療効果は、NLRP3インフラマソーム複合体とは無関係に媒介されることができる。

20

【0156】

本発明は、患者から得られた試料中のガレクチン-10の検出のためのガレクチン-10アンタゴニストの使用も提供する。ある実施態様において、本発明によるガレクチン-10抗体又は抗原結合断片は、患者から得られた試料中のガレクチン-10を検出するために使用される。アンタゴニスト、抗体、又はその抗原結合断片は、通常、結晶性ガレクチン-10を検出するために使用される。上述のように、ガレクチン-10結晶又はCLC結晶は、いくつかの異なる疾患及び疾病を有する患者で観察されている。したがって、患者試料は、以下の疾患又は疾病：喘息、慢性副鼻腔炎、セリアック病、蠕虫感染症、消化管好酸球性炎症、のう胞性線維症(CF)、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)、チャージ・ストラウス血管炎、慢性好酸球性肺炎、又は急性骨髄性白血病のうちのいずれか1つを有するか又はそれを有することが疑われる対象から得ることができるということになる。患者試料中の結晶性ガレクチン-10の検出は、試料が得られた対象の疾患又は疾病を診断するために使用することができる。該試料は、任意の好適な患者試料、例えば、CLCが疾患状態で観察される任意の流体又は組織であることができる。ある実施態様において、該試料は、茸、例えば、鼻茸から得られる組織試料である。ある実施態様において、該試料は、粘液試料である。そのような実施態様において、本発明のアンタゴニストを用いる粘液試料中の結晶性ガレクチン-10の検出は、慢性副鼻腔炎を検出又は診断するために使用することができる。好ましい実施態様において、患者試料は、喀痰試料である。そのような実施態様において、本発明のアンタゴニストを用いる喀痰試料中の結晶性ガレクチン-10の検出は、喘息を検出又は診断するために使用することができる。

30

40

【0157】

(I. キット)

本明細書に記載されるガレクチン-10アンタゴニスト、抗体、又は抗原結合断片のいずれかをキットとして包装し、任意に、使用説明書を含めることができる。

【実施例】

【0158】

(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。

【0159】

(実施例1. 組換えシャルコー・ライデン結晶(CLC)の産生)

50

CLCに関する以前の研究は、初代ヒト血液好酸球又は白血病細胞株のタンパク質が豊富な溶解物の自己結晶化によって得られた結晶に対して実施され、これにより、リゾホスホリパーゼのような夾雑タンパク質の共精製がもたらされた(Ackermanらの文献(1980); Wellerらの文献(1984)、及びArcherらの文献(1965))。

【0160】

インビボでの機能研究において使用するための大量の純粋なCLC結晶を作製するために、TEV切断性N-末端His-タグを保有するヒトガレクチン-10を大腸菌(E.coli)で産生し、固相化親和性クロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーの組合せにより精製した(図1A)。ヒトガレクチン-10(残基1~142、Uniprot Q05315)をコードする合成されたコードン最適化DNA配列を、N-末端におけるHis-タグ並びに2つのプロテアーゼ切断部位であるエンテロキナーゼ

10

【化26】

(DDDDK)

及びTEVプロテアーゼ

【化27】

(ENLYFQG)

【化28】

(MASTTHHHHHHDTDIPTTGGGSRPDDDD-KENLYFQGHM)

を有するpET28a細菌発現ベクター(Novagen, cat#69864-3)のNcoI/XhoI部位にクローニングした。カナマイシン(25 µg/mL)を選択マーカーとして用いて、pET28a-ガレクチン-10をBL21(DE3)細胞に形質転換した。発現培養物を、カナマイシン(25 µg/mL)を含有するLuria-Bertani培地中、28°Cで増殖させた。イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(ITPG)を1mMの最終濃度まで添加することにより、ガレクチン-10の発現を0.6の培養物OD₆₀₀で誘導し、その後、培養物を一晩増殖させておいた。細菌を遠心分離(6,000g、4°Cで20分間)により回収し、細胞ペーストを-80°Cで保存した。細菌ペレットを解凍し、溶解バッファー(50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl pH 7.4)中で再懸濁させた。細胞をBranson sonifier(30秒の中断時間を散在させて、30秒のパルス、30%出力で4分の総実行時間)で超音波処理により溶解させた。細胞残渣を遠心分離により4°C(20,000gで30分間)で除去した。0.22 µmボルトトップフィルターを用いて、上清を濾過により清澄化し、50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl pH 7.4で平衡化したNiセファロースカラムに充填した。次に、このカラムを、20mMイミダゾール及び0.1%empigen洗剤が補充されたローディングバッファーで洗浄し、その後、20mMイミダゾールが補充されたローディングバッファーで洗浄した。次に、50mM及び500mMイミダゾールが補充されたローディングバッファーを用いて、タンパク質を溶出させた。50mM及び500mM溶出ピークをプールし、濃縮し、PBS pH 7.4を泳動バッファーとして用いてHiLoad 16/600 Superdex 200pgカラムに注入した。ガレクチン-10に対応する溶出画分をプールし、-80°Cで保存した。エンドトキシン-レベルは、Endosafe-PTSシステム(Charles River)で、5 EUmg⁻¹組換えタンパク質よりも低いと決定された。Hisタグ化ガレクチン-10タンパク質は、最大30mg/ml溶けた。

20

30

【0161】

His-タグ化ガレクチン-10の分子質量及びオリゴマー状態を解析するために、SEC-MALLSを実施した(図1B)。タンパク質試料(100 µL)を、PBS pH 7.4を泳動バッファーとして0.5ml分⁻¹で使用する、25°CでオンラインUV-検出器(Shimadzu)、多角度光散乱miniDAWN TREOS装置(Wyatt)、及びOptilab T-rEX屈折計(Wyatt)に連結された、Superdex 200 Increase 10/300 GLカラム(GE Healthcare)に注入した。0.185ml g⁻¹の屈折率増分(dn/dc)値をタンパク質濃度及び分子質量の決定に使用した。ASTRA6ソフトウェア(Wyatt)を用いて、データを解析した。同一の泳動条件下で注入されるBSAから得られるパラメータを用いて、バンド広がり補正を適用した。SEC-MALLS解析により、Hisタグ化ガレクチン-10が溶液中で二量体であることが示された(図1B)。決定された分子量は、40±0.8kDaであった。これは、41.2kDaというタグ化二量体ガレクチン-10の理論上の重量とよく一致している。

40

50

【0162】

組換えガレクチン-10結晶を形成させるために、N-末端タグ化ガレクチン-10(2~4.5mg/mlの濃度)を施設内で産生されたTEVプロテアーゼとともにインキュベートした(Kapustらの文献、2001)。Hisタグ化TEVをコードするpRK793プラスミドは、David Waughからの親切的な寄贈品であった(Addgeneプラスミド #8827)。一晩消化した後、タンパク質溶液を5回転倒させることにより攪拌し、その後、この溶液は、針状のCLC結晶の自発的形成のために、約30分で白濁した(図1C)。TEV切断の後、組換えガレクチン-10は、PBSバッファー中で自己結晶化し、0.2mg/mlの濃度までしか溶けなかった。TEV消化の後、3つの残基が組換えガレクチン-10のN-末端(GHM)に残される。結晶は、Charcot及びvon Leydenによって最初に記載された様々な肉眼的形状によく似ていた(図1D)。

10

【0163】

蛍光標識された形態のガレクチン-10結晶も産生した。ガレクチン-10は2つの溶媒露出システイン残基(Cys29及びCys57)を含有するので、チオール反応性蛍光色素5-ヨードアセトアミドフルオレセイン(5-IAF)を用いて、タグ化ガレクチン-10を蛍光標識した。5-IAFを100mMの濃度まで100%ジメチルホルムアミド中で可溶化させた。100mM Tris pH 8.5(1M Tris pH 8.5ストック溶液を使用)を添加することにより、ガレクチン-10タンパク質溶液(~5mg/mL)のpHをpH 8.5に調整した。次に、ガレクチン-10(単量体)に対して10倍モル過剰の5-IAFをタンパク質溶液に添加し、標識反応を、暗所、室温で2時間保持した。N-末端His-タグを保有するガレクチン-10については、 $21430\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ のモル吸光係数を使用した。次に、5mM DTT(1M DTTを使用)を添加することにより、余分な非反応5-IAFをクエンチした。その後、PBSを泳動バッファーとして用いて、試料を50mL HiTrap脱塩カラム(GE Healthcare)で泳動させることにより、余分な5-IAFを除去した。次に、5-IAF標識ガレクチン-10を濃縮し、HiLoad 16/600 Superdex 200pgカラムに注入した。その後、溶出ピークの画分をプールし、-80℃で保存した。エンドトキシン-レベルは、Endosafe-PTSシステム(Charles River)で、 5EUmg^{-1} 組換えタンパク質よりも低いと決定された。蛍光ガレクチン-10結晶を形成させるために、5-IAF標識ガレクチン-10のN-末端His-タグを上記のような一晩のインキュベーションにより除去した。これらの蛍光結晶は、Charcotによって最初に記載された多種多様な形状を有していた(図1E)。

20

【0164】

(実施例2. インビボで成長したCLCの特徴解析)

30

今まで、インビボで成長したCLCの結晶格子構造は記載されていない。それゆえ、結晶をCRSwNP患者の粘着性のある粘液から単離した。気道粘膜組織及び/又は分泌物を、慢性鼻茸合併副鼻腔炎(CRSwNP)の内視鏡下副鼻腔手術を受けている患者から回収した(図2A)。鼻茸は、症状、臨床検査、鼻腔内内視鏡検査、及び鼻茸合併副鼻腔炎ガイドラインに関する欧州ポジションペーパーによる副鼻腔コンピュータ断層撮影スキャンに基づいて診断された。全ての患者は、手術前の少なくとも4週間、経口及び/又は局所コルチコステロイドの使用を控えた。試験及び試料の回収は、ヘント大学病院(Ghent University Hospital)の倫理委員会によって承認され、試験への登録の前に、インフォームドコンセントが全ての患者から得られた。患者から得られた「粘着性のあるアレルギー性ムチンタイプ」の粘膜を、抗生物質(50IU/mLペニシリン及び50mg/mLストレプトマイシン; Invitrogen)、並びに0.1%BSA(Sigma)を含有するRPMI 1640(Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium)中、4℃で一晩保存した。

40

【0165】

CLC結晶の存在及び内容を明らかにするために、免疫蛍光染色をガレクチン-10について行った。回収されたアレルギー性ムチンを4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。包埋したムチンの組織スライド(5µm)を切削し、キシレン(3×10分)を用いて脱パラフィン化し、減少するエタノール濃度(100%、90%、60%、30%、0%エタノール、2分/工程)への段階的浸漬により再水和させた。再水和後、スライドをPBSに5分間浸漬させ、その後、0.05%トリプシン-EDTA(Life Technologies)とともに、湿室中、37℃で1時間インキュベートした。PBS(Life Technologies)で10分間洗浄した後、スライドを

50

、ブロッキングバッファー(PBS中7.5%BSA(Sigma Aldrich))とともに、湿室中、RTで1時間インキュベートした。その後、スライドを、抗ヒトガレクチン-10抗体(クローンEPR11197、Abcam、ブロッキングバッファー中1/200希釈)とともに、4℃で一晩インキュベートした。翌日、スライドをPBSで10分間洗浄し、FITC標識二次ヤギ抗ウサギ抗体(A11034 Life Technologies、1/400希釈)とともにインキュベートした。PBSで10分間洗浄した後、スライドをDAPIを含むVectashieldで標本化した。スライドを暗所で保存し、翌日、共焦点レーザー走査顕微鏡(Leica)で解析した。これにより、ガレクチン-10に免疫反応性である大量の針状結晶の存在が明らかになった(図2B)。

【0166】

エクスピボ結晶構造解析用の結晶を精製するために、培地を廃棄し、1gの粘液を、抗生物質(50IU/mLペニシリン及び50mg/mLストレプトマイシン; Invitrogen)、0.1%BSA(Sigma)、並びに1mg/mlコラーゲンタイプ2(Worthington)を含有する10ml RPMI 1640(Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium)中で十分に切断した。この粘液をGentleMACS Dissociator(Myltenyi Biotec)を用いてさらにホモジナイズし、その後、連続回転下、37℃で45分間インキュベートした。インキュベーション後、部分溶解した粘液をGentleMACS Dissociator(Myltenyi Biotec)でホモジナイズし、400gで、RTで7分間遠心分離した。遠心分離後、上清を廃棄し、ペレットを50IU/mlペニシリン及び50mg/mlストレプトマイシン(Life technologies)を含有する3ml PBS(Life technologies)に溶解させた。3mlの単離された流体を6mlのフィコール-Paque(GE Healthcare)と混合し、250gで10分間遠心分離した。上清及び大部分のフィコール層を除去した後、抗生物質を含む2.8mlのPBSをチューブの底にある残りの流体(200 µl)に添加した。この沈殿プロセスをあと5回繰り返した。チューブの底に結晶を含有する最後の流体を、抗生物質を含む2ml PBSに再懸濁させ、200gで5分間遠心分離した。上清の大部分を除去し、抗生物質を含む800 µlのPBSをチューブの底にある残りの200 µlの流体中の結晶に添加した。マウンテッド・クライオループ(mounted cryoloop)を用いて、単結晶を溶液から回収した(図2C)。液体窒素中で瞬間凍結させる前に、35%(v/v)グリセロールが補充されたPBSに短時間浸漬させることにより、結晶を凍結保護した。100Kでの回折実験をPetraIII(DESY, Hamburg, Germany)のビームラインP14で行った。全てのデータを統合し、XDSスーツ(Kabschの文献、2010)を用いてスケーリングした。分子置換(MR)を、ガレクチン-10(PDB 1LCL)の構造に基づく検索モデルを用いてPhaserで実施した(McCoyらの文献、2007)。モデル(再)構築をCOOT(Emsleyらの文献、2010)で実施し、個々の座標及びADPの精密化をPHENIX(Adamsらの文献、2010)及びautoBuster(Bricogneらの文献、2017)で実施した。COOT及びPHENIXスーツのモデル及びマップ検証ツールをワークフローの全体を通じて用いて、改善を導き、結晶学的モデルの質を検証した。この方法を用いて、シンクロトロン放射線を使用する単結晶X線回折を(2.2 Åの解像度まで)用いて、鼻茸に罹患している患者から単離されたヒトCLC結晶の構造を決定した(図2D、2E、表17)。得られた結晶構造を組換えガレクチン-10結晶の結晶構造(1.4 Åの解像度)、並びに好酸球溶解及びインビトロでの結晶化(pdb 1LCL、1.8Å)によって得られたガレクチン-10結晶の公開されている構造(Leonidasらの文献、1995)と比較した。結果として得られた解析により、3つ全てのガレクチン-10結晶形態が同様の単位胞パラメータを有する空間群P 6₅22に属することが示された(表17)。さらに、大腸菌で産生された組換えガレクチン-10の原子構造及びヒト好酸球細胞株から得られたガレクチン-10(pdb 1LCL)の原子構造は、ヒトCLC結晶(RMSD<0.2 Å)中のガレクチン-10の構造とほぼ同一であるとみなすことができる(図2F)。

【0167】

(実施例3 非自己結晶化ガレクチン-10変異体であるガレクチン-10-Tyr69Gluの産生)

ガレクチン-10の非自己結晶化変異体を産生するために、ガレクチン-10(PDB 1LCL)の報告されている構造における結晶充填相互作用(図3A及び図3B)を解析した。結晶格子中の隣接するガレクチン-10-Tyr69残基との結晶充填相互作用に参与する残基Tyr69を自己結晶化のための潜在的に重要な残基として選択した(図3A)。したがって、Tyr69Glu(Y69E)置換を担持するガレクチン-10の変異体を野生型ガレクチン-10と同一のプロトコルに従って組換

え産生した。潜在的に非自己結晶化するガレクチン-10変異体を産生するために、残基Tyr 69をQuickchange部位特異的突然変異誘発(Agilent)を用いてグルタミン酸残基に突然変異させた。突然変異誘発PCRのために、以下のフォワード及びリバースプライマーFP:

【化 2 9】

GATGAACTCTCGTGAAGAAGGTGCATGGAAACAG (配列番号:154)及びRP:

CTGTTTCCATGCACCTTCTTCACGAGAGTTCATC (配列番号:155)

を使用した。pET28a-ガレクチン-10プラスミドを鋳型として用いた。得られたプラスミド pET28a-ガレクチン-10-Y69Eを用いて、BL21(DE3)細胞を形質転換した。タンパク質産生及び精製は、野生型ガレクチン-10と比較して同一であった。ガレクチン-10-Y69EのN-末端タグのTEV媒介性除去の後、PBSを泳動バッファーとして用いて、Ni-セファロースカラムで消化混合物を泳動させることにより、Hisタグ化TEVを除去した。次に、ガレクチン-10-Y69Eを含有するカラムフロースルーを濃縮し、HiLoad 16/600 Superdex 200 pgカラムに注入した。ガレクチン-10-Y69Eに対応するSEC溶出画分をプールし、-80℃で保存した。エンドトキシン-レベルは、Endosafe-PTSシステム(Charles River)で5 EUmg⁻¹組換えタンパク質よりも低いと決定された。TEV処理の後、Y69Eガレクチン-10ムテインは、野生型ガレクチン-10と比較して、自己結晶化しないことが分かった(図3C)。同様の方法に従って、いくつかの他の結晶化抵抗性ムテインを結晶充填界面における予測された重要性に基づいて作成した(図3C)。SEC-MALLS解析により、Y69E変異体が溶液中で二量体であることも示された。決定された分子量は32.6kDaであり、これは、TEVによって切断された二量体ガレクチン-10-Tyr69Gluの理論上の分子量(33.2kDa)とよく一致している。

【0168】

非自己結晶化ガレクチン-10-Y69Eムテインの結晶構造も取得した。このために、ガレクチン-10-Y69Eを結晶化実験の前に6~7mg/mLまで濃縮した。ナノリットル規模のシッティングドロップ蒸気拡散結晶化実験を、Mosquito結晶化ロボット(TTP Labtech)及び市販の疎行列スクリーン(Molecular Dimensions, Hampton research)を用いて293Kで設定した。突然変異体ガレクチン-10-Y69Eムテインの結晶は、24時間後、PEG/Ionスクリーンの条件D12で出現した(Hampton Research-0.2Mクエン酸アンモニウムpH 5.1、20%PEG₃₃₅₀)。液体窒素に入れて瞬間凍結する前に、25%PEG 400を含む母液補給剤に結晶を短時間浸漬させることにより、ガレクチン-10-Y69Eの結晶を凍結保護した。

【0169】

X線結晶学によるガレクチン-10-Tyr69Gluの解析により、非自己結晶化変異体がpdb 1LC L中の結晶学的ガレクチン-10二量体(RMSD<0.3 Å)とほぼ同一の構造を取ることが示された(図3D及びF、表17)。

【0170】

溶液中の可溶性ムテインの構造も溶液中小角X線散乱(SAXS)を用いて調べた。このために、SAXSデータをSOLEILシンクロトロン(Gif-sur-Yvette, France)のSWINGビームラインで測定した。50 µlのガレクチン-10-Tyr69Gluを、300 Å細孔径及び15℃で0.3ml分⁻¹の流速の泳動バッファーとしてのHBS pH 7.4を用いるAgilent 4.6×300mm Bio SEC-3カラムに注入した。X線散乱データは、フレーム当たり1秒の露光時間にして、連続フローモードで回収した。データは、 $q=4\pi\sin\theta/\lambda$ で、 $0.0066\text{ Å}^{-1}<q<0.609\text{ Å}^{-1}$ の運動量移動範囲内で記録した。生データをすぐに平均化し、Foxtrot v3.3.4(シンクロトロンSOLEILで開発され、Xenocs, Sassenage, Franceにより提供された)を用いてバッファー減算した。データの質は、溶出ピークの長さに対する回転半径の安定性を検査することにより、及び最も強い散乱のプロファイルに対して全ての曲線をスケーリングすることにより、Foxtrotで解析した。最終的な散乱曲線は、溶出ピークの頂点に対応するフレーム255から268までのスケーリングしていないバッファー減算散乱プロファイルを平均化することにより得た。構造パラメータは、ATSASソフトウェアバージョン2.8.3(Frankeらの文献、2017)で決定した。分子量推定値は、Porod体積(Petoukhovらの文献、2012)、相関体積(Ramboらの文献、2013)、及び見掛けの体積(Fischerらの文献、2010)に基づく方法により、DATMWを用いて計算し

た。二量体ガレクチン-10-Tyr69Gluの理論上のSAXSプロファイルを決定的X線構造から計算し、FoXSサーバ(Schneidman-Duhovnyらの文献、2016)を用いて、実験データに当てはめた。誤差加重残差プロットを $\Delta/\sigma=[I_{\text{exp}}(q)-cI_{\text{mod}}(q)]/\sigma(q)$ 対 q として計算した(Trewhellaらの文献、2017)。SAXS解析により、X線結晶学によって得られる二量体会合が溶液中構造に対応することが明らかになった(図3E)。

【0171】

(実施例4. CLCは自然免疫応答をインビボで誘導する)

ガレクチン-10結晶がインビボで肺炎を促進するかどうかを探索するために、実験未使用のC57Bl/6マウス(Janvier)に、結晶性ガレクチン-10又は対照可溶性ガレクチン-10-Tyr69Gluムテインの気管内注射を受けさせた。このために、マウスに、イソフルラン(21/分、2~3%; 05260-05, Abbott Laboratories)で麻酔をかけ、その後、100 μ gガレクチン-10結晶又は対照可溶性ガレクチン-10-Tyr69Gluムテイン(80 μ l PBS中)を気管内注射した(i.t.)。6及び24時間後、マウスをCO₂吸入により安楽死させ、肺を回収した。単一細胞懸濁液を得るために、まず肺を鋏で切断し、その後、Liberase(商標)(1:50; 05 401 127 001, Sigma-Aldrich)及びDNアーゼI(1:1000; 04 536 282 001, Sigma-Aldrich)を含有するRPMI-1640(Thermo Fisher Scientific)中、37°Cで30分間消化した。得られた懸濁液を70 μ mフィルターを通して濾過し、RBC溶解バッファー(MilliQ H₂O中、0.15M NH₄Cl、1mM KHCO₃、0.1mM Na₂EDTA)により赤血球を除去した。単一細胞懸濁液をフローサイトメトリー用に染色した。以下の抗体を使用した:抗CD3e FITC(145-2C11)(35-0031-U500, Tonbo Biosciences)、抗CD19 FITC(1D3)(35-0193-U500, Tonbo Biosciences)、抗CD11c FITC(HL3)(55 3801, BD Biosciences)、抗シグレック-F PE(552126, E50-2440)(BD Biosciences)、抗CD127 PE-CF594(SB/199)(562419, BD Biosciences)、抗CD25 PE-Cy7(PC61.5)(25-0251-82, ThermoFisher Scientific)、抗CD11b BD Horizon V450(M1/70)(560455, BD Biosciences)、抗CD45 BV605(30-F11)(563053, BD Biosciences)、抗CD90.2 APC(52-2.1)(17-0902-82, ThermoFisher Scientific)、抗Ly6G AF700(1A8)(561236, BD Biosciences)、及び抗CD117 APC-eFluor780(2B8)(47-1171-82, ThermoFisher Scientific)。生きた細胞をeBioscience(商標) Fixable Viability Dye eFluor(商標)506(ThermoFisher Scientific)を用いて識別した。非特異的抗体結合をブロックするために、Fc Block 2.4.G2(1:600, BioCros)を使用した。細胞表面マーカーを暗所4°Cで30分間染色した。123count eBeads(商標) Counting Beads(ThermoFisher Scientific)を各々の試料に添加した。UltraComp eBeads(商標) Compensation Beads(ThermoFisher Scientific)を用いて設定を行った。データをBD LSRFortessaで収集し、FlowJoソフトウェア(Tree Star Incorporation)で解析した。

【0172】

6時間後、ガレクチン-10結晶を投与されたマウスの気道に好中球の強い流入が見られたが、可溶性ガレクチン-10-Y69Eムテイン又は対照PBS溶液を投与されたマウスでは見られなかった(図4A)。24時間後、ガレクチン-10結晶を受けたマウスの気道に単球の強い流入が見られたが、可溶性ガレクチン-10-Y69Eムテイン又は対照PBS溶液を投与されたマウスでは見られなかった(図4A)。

【0173】

ガレクチン-10結晶を投与されたマウスにおける炎症促進性サイトカインの産生も測定した(図4B及びC)。ケモカインCCL-2の産生も測定した(図4C)。マウスをペントバルビタールの過剰投与により安楽死させ、0.01mM EDTAを含む1mlのPBSを注入することにより、気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。その後、BALをスピンドウンし(400g、5分、4°C)、上清を-20°Cで保存した。肺組織の溶解物も産生した。サイトカイン分泌の評価のために、ThermoFisher Scientific製のReady-Set-Go ELISAキットを使用した。平底96ハーフエリアウェルプレート(Greiner)を1×コーティングバッファー(00-0000-53, ThermoFisher Scientific)に希釈した1ウェル当たり50 μ lの捕捉抗体でコーティングし、4°Cで一晩インキュベートした。以下の抗体をThermoFisher Scientificという商業的プロバイダの指示に従って使用した:抗マウスIL-1 β 捕捉抗体(1:250; 14-7012-68A);抗マウスIL-6捕捉抗体(1:250; 14-7061-68);抗マウスTNF α 捕捉抗体(1:250; 14-7423-68)。1ウェル当たり50 μ lの試料、標

準品(マウスIL-1 β 標準品(39-8012-60);マウスIL-6標準品(39-8061-60);マウスTNF α 標準品(39-8321-60)、全てThermoFisher Scientific製)、及びブランクを2連で添加した。インキュベーション及び洗浄後、1 $\times$ アッセイ希釈剤に希釈した1ウェル当たり50 μ lの検出抗体(ビオチン化抗マウスIL-1 β 検出抗体(1:250; 13-7112-68A);ビオチン化抗マウスIL-6検出抗体(1:250; 13-7062-68A);ビオチン化抗マウスTNF α 検出抗体(1:250; 13-7341-68A)、全てThermoFisher Scientific製)を添加し、その後、室温でもう1時間インキュベートした。その後、ウェルを洗浄し、アッセイ希釈剤に希釈したストレプトアビジン-HRP試薬(1:250; 00-4100-94, ThermoFisher Scientific)を添加した。室温で30分間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、TMB基質溶液(00-4201-56, ThermoFisher Scientific)を添加した。反応を2.5N H₂SO₄により停止させ、吸光度をPerkin Elmerマルチラベルカウンターにより450nmで読み取り、データをWallac 1420 Managerソフトウェアで収集した。CCL-2レベルの評価のために、eBioscience製のマウスCCL2(MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!(商標)キットを製造元の指示(カタログ番号50-112-5204)に従って使用した。

10

【0174】

ガレクチン-10結晶の注射は、注射後6時間でIL-6及びTNF- α の産生を伴ったが、IL-1 β の誘導はBAL試料中で観察されなかった(図示せず)。対照可溶性ガレクチン-10-Y69Eムテイン又はPBSの注射は、サイトカイン産生をもたらさなかった(図4B)。

【0175】

肺組織で測定したとき、ガレクチン-10結晶の注射は、大量のIL-1 β 及びCCL-2の産生も伴った(図4C)。

20

【0176】

(実施例5. CLCによって誘導される自然免疫応答はインビボでNlrp3インフラマソームに依存しない)

多くの無機及び有機結晶は、Nlrp3インフラマソームの誘発を通じて炎症細胞からのIL-1 β 分泌を誘発し、プロ-IL-1 β プロセシングのためのASCアダプター動員、ASC spec形成、及びカパーゼ1活性化をもたらす潜在能力を有する(Koolらの文献、2011)。BioRxivに投稿された最近の論文(bioRxiv 252957; doi: <https://doi.org/10.1101/252957>)により、ヒト好酸球細胞株から精製されたシャルコー・ライデン結晶がNLRP3インフラマソームをインビトロで誘発する潜在能力を有することが報告された。しかしながら、結晶誘導性炎症は、インビボでNLRP3に依存しているかどうかは報告されなかった。そうであれば、インフラマソームが治療剤として特定されることとなる。炎症を実施例4と同様に24時間で調べた。ガレクチン-10結晶をNlrp3^{-/-}又はCasp1/11^{-/-}マウスの気道に注射したとき、野生型同腹子のC57Bl/6対照マウスと比較して、結晶誘導性の細胞流入は低下しなかった(図5)。それゆえ、インフラマソーム障害がCLC誘導性炎症をインビボで障害するのに成功する可能性は低い。

30

【0177】

(実施例6. CLCによって誘導される自然免疫応答はTlr4に依存しない)

組換えガレクチン-10結晶は、その細胞壁に細菌エンドトキシンを有する大腸菌から産生されたガレクチン-10タンパク質から産生される。エンドトキシンは肺での自然免疫応答を誘発することができるので、気道炎症の誘導に対するガレクチン-10結晶へのエンドトキシンの混入の潜在的な重要性を検証することが重要であった。このため、エンドトキシンの受容体を欠くTlr4^{-/-}マウスにおけるガレクチン-10結晶に対する免疫応答も調べた。炎症を実施例4と同様に調べた。これらのマウスにおいて、注射から24時間後に、野生型同腹子C57Bl/6マウスと比較して、結晶誘導性の好酸球性気道炎症低下は見られなかった(図6)。

40

【0178】

(実施例7. ガレクチン-10結晶はヒト喘息患者由来のPBMCを受容したヒト化マウスで気道炎症及びIgE合成を刺激する)

マウスはガレクチン-10をコードするLGALS10遺伝子を保有しないので、ガレクチン-10はマウス免疫系に対する新生抗原である。それゆえ、ヒトチリダニ(HDM)アレルギー性喘

50

息ドナーの免疫系を保有するヒト化マウスで実験を設定した。PBMCを回収するために、チリダニアレルギー患者由来の50mlの血液をEDTAコーティングしたチューブに回収した。この血液をRPMI 1640(v/v)に希釈し、12mlのフィコールに重層した。遠心分離(1200g、20分、室温)後、PBMCを回収し、PBS中で洗浄した。死細胞を除外するためのトリパンブルーを用いて、細胞をカウントした。PBMCを 15×10^6 細胞/mlの濃度でPBSに再懸濁させた。0日目に、NOD Rag^{-/-} γ c^{-/-} (NRG)マウスを 3×10^6 個のPBMCの腹腔内注射により再構成した。1~4及び7~9日目に、全てのマウスに、50 μ lのPBSに希釈した20 μ gのHDM抽出物(Greer)を気管内注射した。ガレクチン-10結晶の炎症促進効果に取り組む実験において、1、3、7、及び9日目に、NRGマウスを以下のレジメンで処置した(図7A):レジメン1、PBS対照30 μ l;レジメン2、30 μ lのPBSに希釈した100 μ gの組換えガレクチン-10結晶(1 μ lのストック);レジメン3、30 μ lのPBSに希釈した100 μ gの組換えガレクチン-10-Tyr69Gluムテイン(1 μ lのストック)。

【0179】

27日目に、全てのマウスに、80 μ lのPBSに希釈した20 μ gのHDM抽出物(Greer)をもう一度気管内投与した。腹腔内注射されるペントバルビタールの過剰投与を用いて、全てのマウスを28日目に屠殺した。マウスの腸骨静脈から採血した。血液を乾燥チューブに回収した。これらのチューブを遠心分離して(5000rpmで10分間)、血清を得た。単一の肺細胞懸濁液を得るために、左肺を回収し、虹彩切除鋏を用いて細かく切り刻み、PBS中で100 μ mのメッシュにかけてホモジナイズし、過剰のPBSを添加することにより洗浄し、400gで7分間遠心分離した。ペレットをPBSに再懸濁させ、さらなる使用(フローサイトメトリー)まで氷上で保存した。

【0180】

右肺の上葉及び下葉を4%PFAで固定し、その後、組織学的検査用にパラフィンに包埋した。右肺の中葉をOCTに包埋し、さらなる使用(qRT-PCR及び免疫蛍光)まで-80℃で凍結させた。

【0181】

ヒト細胞を検出するために、マウスの左肺由来の単一の細胞懸濁液をAPC標識抗ヒトCD45とともに4℃で20分間インキュベートした。Aqua Live/Dead固定可能死細胞染色キット(BD)を用いて、死細胞を染色した。細胞をPBS中で洗浄した後、15000個のカウンティングビーズを各々の試料に添加した。その後、細胞をFortessa(BD)でフローサイトメトリーにより解析した。使用したAbはいずれも、マウス組織と交差反応しない。

【0182】

ヒトIgE非コーティングELISAキット(ThermoFischer)を用いて、ヒトIgE濃度をNRGマウスの血清中で測定した。簡潔に述べると、ELISAプレートを、コーティングバッファー中、4℃で一晩、抗ヒトIgE抗体でコーティングした。過剰のPBS-0.05%Tween 20で洗浄した後、ELISAプレートを、製造元により提供されたブロッキングバッファーで、室温で2時間ブロッキングした。洗浄後、IgE標準品(1:2連続希釈)及びNRGマウス由来の血清をプレートに添加し(ブロッキングバッファー中、1:5希釈)、2時間インキュベートした。検出抗体を室温で1時間添加した。全てのウェルにTMB基質を添加することにより、ヒトIgEの存在を明らかにした。プレートを分光光度計で450nmで読み取った。

【0183】

28日後、気道へのヒトCD45+細胞流入の度合い(図7B)、及びヒトIgE合成(図7C)は、HDM投与期間中にガレクチン-10-Tyr69Gluムテインを投与されたマウス又はPBSを投与されたマウスと比較して、結晶性ガレクチン-10の4回の注射を投与されたマウスでかなり高く、ガレクチン-10結晶がHDMアレルギードナーの免疫系で再構成された免疫不全マウスの喘息モデルで肺へのヒト細胞流入及びIgE合成を強化することを示している。

【0184】

(実施例8. ガレクチン-10抗体の産生)

(A. リャマの免疫)

Ynigo及びMontoyoと命名した2匹のリャマ(llama)(リャマ(llama glama))をガレクチン-

10

20

30

40

50

10結晶(1mg/投与/リヤマ)で筋肉内にタンパク質免疫した。タンパク質免疫を0日目に開始し、ガレクチン-10結晶を、合計3回の注射の間(合計5週間)、14日毎に投与した。最後の免疫から5日後、免疫されたリヤマの400mLの血液を回収して、PBMCを単離し、RNA抽出を可能にした。

【0185】

免疫された2匹のリヤマの免疫応答を決定するために、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の設定を使用した。ELISAのために、均一な非結晶化形態のガレクチン-10を使用した。

【0186】

ELISAを実施するために、Maxisorpプレートをガレクチン-10(100 µg/mL)でコーティングし、カゼインでブロッキングした。免疫前及び免疫後のリヤマ血清の連続希釈物をプレートのウェルに添加した。その後、コーティングしたガレクチン-10に結合したリヤマIgG1をマウス抗リヤマCH1特異的抗体(10D12)で検出し、検出を抗マウスIgG-HRP(DAMPO)で実現した。最後に、TMBの添加後、反応を0.5M H₂SO₄で停止させ、吸光度を450nmで測定した(Tecan Sunrise, Magellan software)。3回の注射しか実施していないにもかかわらず、免疫された両方のリヤマは、ガレクチン-10に対する強い免疫応答を示した。

【0187】

(B. ライブラリー構築(scFv))

scFvライブラリーを次のように構築した。mRNAを免疫されたリヤマの血液から単離したPBMCから精製した。mRNAをランダムヘキサマープライマーで逆転写して、cDNAを得た。重鎖及び軽鎖ライブラリーの構築のために、2段階PCRを実施した。まず、非タグ化プライマーをcDNAに対して直接用いて、VH-CH1、VL-CL、及びVk-Ck領域を増幅させた。その後、PCR産物を精製し、タグ化したscFvプライマーを用いる第2ラウンドのPCRで用いて、VH、VL、及びVkを増幅させ、これらをファージミドベクター中に別々にクローニングして、それぞれ、「ラムダ」及び「カッパ」リヤマscFvライブラリーを作成した。scFv融合タンパク質は、約25kDaのサイズの(G₄S)₃リンカー(グリシン及びセリン残基)によって連結されたVH及びVL配列からなっていた。scFvライブラリーを作製するという選択は、scFv断片がファージの先端でタンパク質III融合体としてFabよりも良好に発現されるという事実を基にした。これは、ファージディスプレイ選択時のファージライブラリーのより良好な収率及び多様性をもたらす。しかしながら、scFv断片は、その結合力作用のために、一見するとより良好な親和性を生じ得る、凝集体を形成する傾向がある。scFvフォーマットの抗体断片は、IPTGによる誘導によって、大腸菌のペリプラズム空間に分泌させることができる。

【0188】

特異的なガレクチン-10 scFv断片を発現するファージの濃縮は、固定化されたガレクチン-10上での3回の選択によって行った。

【0189】

ガレクチン-10に特異的な適切なscFvクローンの最初の選択をバイオパニングアプローチによって実施した。簡潔に述べると、ガレクチン-10-HISをMaxisorp ELISAプレートに固定化し、その後、scFvファージライブラリー(Input)を添加した。未結合のファージを複数回の洗浄工程によって除去した。最後に、結合したファージをトリプシンで溶出させ、選択されたファージを増幅するために、大腸菌感染を行った。このプロセスにより、高親和性の抗ガレクチン-10を有するscFvを発現するファージ集団が濃縮された。選択ラウンドの最後に、溶出したファージの数を、アンピシリン及びグルコースを含む固体LB培地を含有するペトリ皿の上にスポットした(10⁻¹~10⁻⁶)、感染した大腸菌の力価測定により推定した。両方のリヤマ由来のラムダ及びカッパライブラリーの第1ラウンドの選択により、特異的な抗ガレクチン-10ファージがわずかに濃縮された。これらの第2ラウンド及び第3ラウンドの選択により、おそらく、ガレクチン-10に対するより高い親和性を有するscFvを発現するファージが濃縮された。

【0190】

第2ラウンド(5 µg/mLのガレクチン-10に対するライブラリーカッパ及びラムダ)及び第3ラウンド(0.2 µg/mLに対するライブラリーカッパ及び0.02 µg/mLに対するラムダライブラ

リー)の産出から、単一のクローンを作製し、6枚のマスタープレートを作製した。これらのマスタープレートから、ペリプラズムマスタープレート(PMP)を作製した。この目的のために、マスタープレートからの単一のクローンをまず96ウェルフォーマット(深いウェル)で増幅させ、scFvの産生をIPTGとの一晩のインキュベーションにより誘導した。翌日、細菌を2サイクルの凍結/解凍(-80℃及び-20℃)により溶解させた。遠心分離後、上清(ペリプラズム抽出物)を回収し、結合能(ELISA及びBiacore)について試験するために、別々の96ウェルプレートに移した。

【0191】

(C. ELISAによるscFvペリプラズム抽出物のスクリーニング)

ガレクチン-10に対するscFvの結合能を試験するために、ELISA結合アッセイを確立した。簡潔に述べると、maxisorpプレートを可溶性ガレクチン-10(1 µg/mL)でコーティングし、その後、カゼインでブロッキングし、その後、scFv-Mycを含有するペリプラズム抽出物(PBS中、希釈1/5)とともにインキュベートした。バインダーの検出を抗Myc-HRP抗体で実施した。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。第2ラウンドの選択の後、かなりの数のガレクチン-10 scFvバインダーを単離した(バインダーの45~87%)。両方のリヤマについて、ラムダライブラリーは、カップライブラリーよりも多くの数のガレクチン-10バインダーを示した。第3ラウンドの選択により、ガレクチン-10に対する高い結合能を有するscFvクローンの数の増加がもたらされた。ラムダライブラリーから作製されたscFvクローンがガレクチン-10に対する74~93%のバインダーを示したのに対し、カップライブラリーから作製されたscFvは、15~20%のバインダーを示した。

【0192】

(D. scFvクローンのシーケンシング及び再フォーマット化)

ガレクチン-10に対する結合を示す選択されたscFvクローンをシーケンシングした。そのCDR1-2-3、VH、及びVL配列に基づいて、各々のクローンを特定のファミリーに属するものに分類した。このプロセスにより、65のVHファミリー、13のVカップファミリー、及び23のVラムダファミリーが決定された。下の表3に示されている12のクローンをさらなる特徴解析のために選択した。

表3 ガレクチン-10に結合するscFvクローン

【表3】

クローン名	何回目の選択ラウンドから単離されたか	選択時のGal10濃度(ug/ml)	PERI-ELISA結合(OD値)	VHファミリーnb	ラムダファミリーnb	カップファミリーnb
1A12	2	5	2,134	32	4	
2B11	2	0,5	3,793	57	1	
2C07	2	0,5	3,626	7	1	
2E11	2	0,5	3,511	23	23	
3A03	3	0,2	3,4	65		2
4B10	3	0,02	2,435	17	4	
4G05	3	0,2	3,803	18	4	
4H10	3	0,02	3,484	59	17	
5012	3	0,02	2,415	64		3
6A11	3	0,02	2,346	24	23	
6F05	3	0,2	3,827	26	17	
6F011	3	0,02	3,757	53	23	

【0193】

これらのクローンのCDR、VH、及びVL配列は、下の表14、15、及び16に示されている。

【0194】

表3の12のscFvクローンをscFv-ヒトFc融合分子として再クローニングした。この目的のために、各々の選択されたscFvクローンのDNAを制限酵素(AscI/SfiI)でまず消化した。アガロースゲルからDNAを抽出した後、ヒトIgG1のCH2-CH3定常ドメインを含有する予め消化

されたベクターへのDNAのライゲーションを行った(pUPEX50: pScFv-Fc融合ベクター)。To p10細菌を用いて、熱ショックとアンピシリンを含むLB-アガロースプレート上への移動とにより、各々のライゲーションされた産物の形質転換を行った。一晚のインキュベーションの後、ライゲーションされた産物は、多数の単一の細菌コロニーを示したが陰性対照(空ベクター)については、コロニーが観察されなかった。scFvクローン当たり、4～8個のコロニーを拾い、シークエンシングに送った。適切な挿入物(VH/VL)を示すクローンを選択し、DNA配列を精製するために(MidiPrep)、増幅させた。

【0195】

その後、哺乳動物中での産生を開始した。scFv-ヒトFcクロンの各々のDNAをポリエチレンイミン(PEI)によりHEK293E細胞にトランスフェクトした。6日後、プロテイン-Aセファロースビーズを用いて、scFv-ヒトFc分子を細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行って、scFv-ヒトFc分子(～100kDa)の純度及び完全性を評価した。

【0196】

(E. scFv-ヒトFcパネルの特徴解析)

ELISAとT3000 Biacoreを用いるSPRとを用いて、scFv-ヒトFcパネルの結合特性を評価した。

【0197】

(i)ELISA解析

初期のスクリーニング時に使用した設定と同様の設定において、12のscFv-ヒトFcクロンの相対的結合特性をELISAにより解析した。簡潔に述べると、maxisorpプレートを0.2 µg/mLのガレクチン-10-Hisでコーティングし、カゼインでブロッキングした後、scFv-ヒトFc融合分子の連続希釈物とともにインキュベートした。数回の洗浄工程の後、抗ヒトFc-HRP抗体を用いて、結合したscFv-ヒトFcの検出を行った。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のEC50値を非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、下の表4に示されている。

表4 scFv-ヒトFc抗体のリードパネルのELISA結合特徴

【表4】

クローン名 (ScFv-hFc)	Bmax (OD 値)	EC50 (nM)
1A12	0,409	不明確
2B11	2,432	0,08
2C07	2,887	0,05
2E11	1,425	0,14
3A03	1,81	0,06
4B10	1,28	0,08
4G05	3,034	0,09
4H10	1,301	0,2
5E12	1,84	0,25
6A11	1,595	0,01
6F05	2,895	0,02
6F11	1,565	0,48
アイソタイプ対照	0,018	/

・クローン2C07、6F05、4G05、及び2B11は、0.02～0.09nMのEC50値を有する最も優れた相対的結合能を示した。

・クローン6F11及び5E12は、最も低い結合能(0.25～0.48nMのEC50値)を示した。

・1つのクローン(1A12)は、不明確な適合で、ガレクチン-10に対する弱い結合を示した。

【0198】

さらに、全体としてのパネルは、コーティングしたガレクチン-10及びHisタグ化ガレクチン-10に対する同様の結合能を示した。

【0199】

(ii)SPR解析

scFv-ヒトFcパネルの結合特性(結合速度/解離速度)を決定するために、ガレクチン-10に対するその結合能をBiacore T3000で解析した。この目的のために、捕捉アプローチを設定した。CM5チップを8000RUでポリクローナル抗ヒトFcでコーティングし、その後、HBS-EP pH7.4に希釈した一定濃度のscFv-ヒトFcパネル(1.5 µg/mL)を捕捉させると、約150RUの結合シグナルに達した。最後に、HBS-EP pH7.4に希釈したガレクチン-10-Hisの連続希釈物(5 µg/mLから2分の1の連続希釈、6点の希釈)を注入した。BIA評価ソフトウェアにより、ブランク減算(4-3)を用いて、生データを解析した。ガレクチン-10-Hisに対する各々のscFv-ヒトFcのkd/KD及びRmaxを、BIA評価ソフトウェアで質量移動/局所Rmaxを伴うFit Kineticsの同時ka/kd/結合を用いて決定した。結果は、下の表5に示されている。

表5 Biacore T3000でのscFv-ヒトFc抗体のパネルの結合特性の特徴解析

【表5】

クローン名 (ScFv-hFc)	Rmax	kd 1E-04 (1/s)	KD (nM)
1A12	12,4	31,5	11,7
2B11	37,3	180	0,875
2C07	41,3	2,59	0,677
2E11	21,6	111	1,16
3A03	18,3	111	1,56
4B10	20,6	128	1,94
4G05	23,6	437	0,911
4H10	19,6	27,7	1,55
5E12	6,67	17,7	4,73
6A11	35,6	1240	0,711
6F05	38	1,17	0,918
6F11	28,84	172	2,96
アイソタイプ対照	6,06	/	/

・クローン6F05及び2C07は、最も良好な親和性(それぞれ、0.9及び0.6nM)を明白に示し、それぞれ、1.17E-04及び2.59 E-04 s⁻¹の解離速度であった。

・しかしながら、他の10クローンは、速い解離速度を示し、ナノモル濃度範囲(>17nM)の親和性を有していた。

【0200】

(F. バイオレイヤー干渉法(BLI)技術(Octet)によるscFvクローンのスクリーニング)

上のD節及びE節に記載されたクローンのシークエンシング及び特徴解析に加えて、ELISA(スクリーニング)で明白な結合を示すマスタープレート1~6由来の272のscFvクローンを選択し、ガレクチン-10-Hisに対するその結合能を、Octet RED96を用いてBLIで解析した。BLIは、生体分子相互作用を測定するための無標識技術である。これは、2つの表面: バイオセンサーの先端の固定化されたタンパク質の層及び内部基準層から反射された白色光の干渉パターンを分析する光学的分析技法である。バイオセンサーの先端に結合した分子の数の何らかの変化が、リアルタイムで測定することができる干渉パターンの変化を引き起こす。

【0201】

簡潔に述べると、キネティックバッファーに希釈したHisタグ化ガレクチン-10を、1nmの固定化レベルに達するまで、抗ペンタHis 1Kセンサー先端部に捕捉させた。その後、希

釈したペリプラズム抽出物(1/10)を適用し、固定化されたガレクチン-10-Hisに対する会合/解離をForteBioデータ解析9.0ソフトウェア(基準先端部の減算、1.1結合モデル)を用いて測定した。スクリーニング中、scFvの解離(解離速度)しか決定することができないが、それは、scFvの有効濃度が不明であり、かつクローン毎に大きく異なり得るからである。この結果から、scFvパネル内の選択されたクローンの大部分が速い解離速度を示すことが確認された。しかしながら、主にラムダライブラリー(第2ラウンド及び第3ラウンドの選択)由来のいくつかのクローンは、捕捉されたガレクチン-10に対して遅い解離速度(解離)を示した。それゆえ、ELISA及びBLIのデータを考慮して、リードscFvの新しいパネルを選択した。

【0202】

ELISAデータ及びBLIデータに基づいて、リードscFvクローンの第二のパネルをさらなる特徴解析のために前に進めた。これらのscFvクローンの特徴は、下の表に示されている。

表6 リードscFvクローンの第二のパネル

【表6】

クローン名	何回目の 選択ラウンド から 単離されたか	選択 に使用された ガレクチン-10の 濃度	ELISA 結合 (OD 値)	BLI 結合 (解離速度 kdis(1/s))	VH ファミリー	ラムダ ファミリー
1C08	2	5	3,7	8,2E-03	59	17
1C09	2	5	3,5	1,4E-03	58	4
1D011	2	5	3,3	5,2E-03	62	17
2C07	2	0,5	3,6	6,7E-03	7	1
2F09	2	0,5	3,6	9,9E-03	57	23
4E08	3	0,2	3,6	9,4E-03	56	1
6A08	3	0,02	3,5	8,2E-03	26	14
6B06	3	0,2	3,7	5,8E-03	53	23
6E10	3	0,02	3,7	1,6E-02	35	23
6F06	3	0,2	3,8	5,7E-03	14	1

【0203】

これらのscFvクローンのCDR、VH、及びVL配列は、下の表14～16に示されている。

【0204】

(G. マウスIgG1骨格への選択されたscFvクローンの再フォーマット化)

上の表6に示されている選択されたリードをさらなる特徴解析のためにマウスIgG1骨格に再クローニングした。この目的のために、各々のクローンのVH及びVLを特異的プライマーを用いてPCR増幅させ、電気泳動により単離し、精製し、制限酵素(BsmBi)で消化した。消化及び浄化の後、マウスラムダ軽鎖の定常ドメイン(pUPEX116.35)又はマウスIgG1重鎖の定常ドメイン(CH1-CH2-CH3、pUPEX116.33)を含有するBsmBiで予め消化されたベクターへのDNA(VH又はVL)のライゲーションを行った。Top10細菌を用いて、熱ショックとアンピシリン(ベクターの耐性遺伝子)を含むアガロースプレート上への移動とにより、各々のライゲーションされた産物の形質転換を行った。一晚のインキュベーションの後、ライゲーションされた産物は、多数の単一の細菌コロニーを示したが、陰性対照(空ベクター)については、コロニーが観察されなかった。クローン(HC及びLC)当たり、4～8個のコロニーを拾い、シーケンシングに送った。適切な挿入物を示すクローンを選択し、DNA配列を精製するために(MidiPrep)、増幅させた。

【0205】

ポリエチレンイミン(PEI)によってHEK293E細胞に取り込まれる3つの軽鎖に1つの重鎖の比でのトランスフェクションにより、10種のマウスIgG1の産生を行った。6日後、プロテイン-Aセファロースビーズを用いて、マウスモノクローナル抗体を細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行って、抗体(150kDa)の純度及び完全性を評価した。

【0206】

(H. ガレクチン-10マウスIgG1パネルの結合特性の特徴解析)

10

20

30

40

50

いくつかのアッセイを行って、ガレクチン-10マウスIgG1パネルの結合及び機能特性を評価した。ELISAとT3000 Biacoreを用いるSPRの両方を用いて、リードパネルの結合能を決定した。

【0207】

(i)ELISA解析

scFv-ヒトFc分子の特徴解析時に使用した設定と同様の設定において、10種のマウスIgG1抗体の相対的結合親和性をELISAにより解析した。maxisorpプレートに0.2 μ g/mLのガレクチン-10-Hisで一晩コーティングした。その後、各々のクローンの連続希釈物(100nMから1/4希釈、12点の希釈)を、コーティングしたガレクチン-10上でインキュベートした。数回の洗浄工程の後、抗マウスFc-HRP抗体を用いて、結合したマウスIgG1の検出を行った。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。マウスIgG1アイソタイプ対照を陰性対照として使用した。ポリクローナル抗ガレクチン-10抗体をガレクチン-10のコーティングの陽性対照として使用した。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した各々の抗体のEC50値は、下の表に報告されている。

【0208】

ガレクチン-10マウスIgG1抗体の新しいパネルは、コーティングしたガレクチン-10に対して3.22nM~0.04nMの相対的結合能を示した。クローン2F09、6A05、6B06、及び2C07は、最も良好な相対的結合親和性(0.05~0.08nM)を示した。

表7 ELISAによるマウスIgG1パネルの結合特性の特徴解析

【表7】

コンストラクト (マウスIgG1)	Bmax	EC50 (nM)
1C09	2,297	0,13
1D011	1,498	0,1
2C07	2,947	0,08
2F09	3,293	0,05
4E08	2,063	3,22
6A05	1,744	0,07
6A08	3,196	0,15
6B06	3,278	0,08
6E10	2,398	0,17
6F06	2,926	0,08
アイソタイプ対照	0,042	/

【0209】

(ii)SPR解析

ガレクチン-10に対するマウスIgG1抗体の結合能をBiacore T3000で解析した。この目的のために、捕捉アプローチを設定した。CM5チップを8000RUでポリクローナル抗マウスFcでコーティングし、その後、HBS-EP pH7.4に希釈した一定濃度のマウスIgG1抗体パネル(1.5 μ g/mL)を捕捉させると、約150RUの結合シグナルに達した。最後に、HBS-EP pH7.4に希釈したガレクチン-10-Hisの連続希釈物(5 μ g/mLから2分の1の連続希釈)を注入した。BIA評価ソフトウェアにより、ブランク減算(4-3)を用いて、生データを解析した。ガレクチン-10-Hisに対する各々のmAbのkd/KD及びRmaxは、BIA評価ソフトウェアで質量移動/局所Rmaxを伴うFit Kineticsの同時ka/kd/結合を用いて決定した。

表8 Biacore T3000によるマウスIgG1パネルの結合特性の特徴解析

【表 8】

コンストラクト (マウスIgG1)	KD (nM)	kd 1E-04 (1/s)
1C09	0,5	52,9
1D11	1	52,9
2C07	0,5	3,6
2F09	0,3	3,4
4E08	0,8	8,5
6A05	0,6	48,3
6A08	1	6,7
6B06	0,3	30,6
6E10	0,5	8,2
6F06	0,7	48,7

10

【0210】

この設定において、10個のクローンは、ナノモル濃度からサブナノモル濃度までの範囲の親和性を示し、解離速度は、 $3.4 \sim 53 \times 10^{-4} (1/s)$ であった。ELISA結合データと一致して、クローン2F09及び2C07は、パネルの最上位に見出された。マウスパネルの特徴解析時に測定された解離速度は、スクリーニング時に測定された解離速度と一致していなかった。これは、主に、スクリーニング時に使用されたアッセイ設定(BLI、抗Hisセンサー先端部によって捕捉されたガレクチン-10-His)と特徴解析時に使用されたアッセイ設定(SPR、ポリクローナル抗マウスFcチップによって捕捉されたマウスIgG1)の違いによって説明される。

20

【0211】

(I. ガレクチン-10マウスIgG1パネルのエピトープマッピング)

様々なクローンのガレクチン-10結合部位を同定するために、BLI技術を用いるエピトープマッピング法(TANDEM)を確立した。簡潔に述べると、ガレクチン-10-Hisを抗HIS 1Kセンサー先端部に捕捉させた後、過剰な1つの抗体(「飽和」抗体と呼ばれる)とともにインキュベートし、その後、準最適濃度の「競合因子」抗体を含有する溶液にそのまま移した。「飽和」抗体と競合因子抗体が同じ結合部位に結合する場合、「競合因子」の結合(nmの変化で表される)は検出されない。これらがエピトープを共有しない場合、「競合因子」抗体は、「飽和」抗体の存在下で結合することができる。アイソタイプ対照を「飽和」抗体に対する陰性対照として使用し、この場合、「競合因子」抗体として使用したクローンは全て、ガレクチン-10に対する明らかな結合を示した。

30

表9 競合アッセイによるエピトープマッピング

【表 9】

抗体1(飽和 Ab) (10 ug/mL)	1ug/mLの抗体2(競合因子) (nmで示した結合シグナル)										
	1C09	1D011	2F09	4E08	6A05	2C07	6A08	6B06	6E010	6F06	バッファー
1C09	0,03	0,01	0,04	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	-0,02
1D011	0,10	0,06	0,12	0,03	0,04	0,04	0,05	0,07	0,10	0,06	0,02
2F09	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
4E08	0,08	0,00	0,10	-0,08	-0,03	-0,05	-0,05	0,03	0,10	0,02	0,01
6A05	0,09	0,06	0,12	0,03	0,05	0,04	0,05	0,06	0,09	0,05	0,01
6A08	0,04	0,01	0,07	-0,03	0,00	-0,01	-0,04	0,02	0,04	0,00	0,01
6E010	0,02	-0,01	0,03	-0,05	-0,03	-0,04	-0,05	-0,02	0,00	-0,03	-0,21
2C07	0,03	0,02	0,05	0,00	0,01	0,03	0,05	0,04	0,06	0,03	0,02
6B06	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,03
6F06	0,04	0,03	0,06	0,01	0,02	0,04	0,05	0,05	0,07	0,04	-0,05
アイソタイプ	1,21	1,18	1,14	0,97	1,02	0,73	1,04	0,94	1,34	1,15	-0,05
バッファー	/	/	/	/	/	0,80	1,08	0,98	1,38	1,22	/

【0 2 1 2】

これらの結果から、試験した10個のクローンが互いに競合することが示され、これらがガレクチン-10-His上の同じ結合部位/エピトープに結合することが示唆された。

【0 2 1 3】

同様のアプローチをscFv-ヒトFc融合体の第一のパネルに対して使用した。全て、ガレクチン-10上の同じエピトープ、すなわち、mIgG1抗ガレクチン-10と同じエピトープに結合した(データは示さない)。

【0 2 1 4】

(実施例9. インビトロで結晶化に影響を及ぼす能力についてのガレクチン-10抗体の特徴解析)

実施例1に記載されている組換えCLCの形成に対するリードガレクチン-10 scFv-ヒトFc分子及びリードガレクチン-10マウスIgG抗体の効果を試験した。ガレクチン-10自己結晶化はインビトロでは非常に再現性が高いので、Mosquito結晶化ロボット(TTP Labtech)を用いて、抗ガレクチン-10抗体をガレクチン-10自己結晶化を阻止するその潜在能力についてスクリーニングした。このアプローチを用いて、ガレクチン-10結晶化を阻害するクローンをスクリーニングした。結晶阻害アッセイのために、PBS中のTEVによって切断された可溶性野生型組換えガレクチン-10を抗ガレクチン抗体又は無関係な抗体の存在下で50% PEG 3350の溶液に対して一晩平衡化した。結晶形成の阻害を評価するために、0.4~0.7mg/mLの濃度のPBS中の250nLのTEVによって切断された可溶性野生型組換えガレクチン-10を100nLの抗ガレクチン-10抗体又は無関係な抗体と混合した。次に、タンパク質混合物を96ウェル結晶化プレートのリザーバウェルに含まれる40マイクロリットルの50%(v/v) PEG 3350に対して平衡化した。PEGの作用のために、液滴内の水の量は減少し、それゆえ、ガレクチン-10の濃度は、それが、ガレクチン-10が結晶化してCLCを形成する閾値に達するまで増加した。一晩のインキュベーションの後、実体顕微鏡を用いて、CLC結晶の有無を評価した。結晶の存在を100%の結晶形成と判定し、同等の数観察された少しの結晶を50%の結晶形成と判定し、インキュベーション時間の後に結晶が観察されなかったものを0%の結晶形成と定めた。この実験は定性的なものではなく、様々なガレクチン-10クローンがCLC形成を阻止する潜在能力を順位付けることだけを目的とした。実験設定及び必要とされる抗ガレクチン-10分子の濃度の高さのために、scFv-ヒトFc及びマウスIgG1抗ガレクチン-10パネル由来の選択されたクローンだけを試験した。

【0 2 1 5】

CLC結晶は、対照条件では一貫して見られたが、抗ガレクチン-10抗体を含有する条件では存在しなかった。この実験設定は、図8Aに例示されており、いくつかのクローンの有効性は、図8Bにまとめられている。

【0216】

これらの結果は、試験した全てのクローン(合計17)がCLC形成を阻止することができたことを示している。scFv-ヒトFcパネルの中で、クローン4B10、2E11、及び6F5は、CLC出現を阻止する最も優れた効力を示した。クローン1D11は、マウスIgG1パネルの中でCLCの形成を阻止する最も優れた潜在能力を示した。クローン6A05は、最も低いガレクチン-10/マウスIgG1抗ガレクチン-10の比でさえもCLC形成を示さなかった。この理由は不明である。しかしながら、全ての陰性対照(無関係なscFv-ヒトFc又はマウスIgG1、バッファー又はBSA(2mg/mL)とともにインキュベートされたガレクチン-10)は、インキュベーションから2日後に、100%のCLC形成を示した。

【0217】

(実施例10 ガレクチン-10抗体は予め存在するCLCをインビトロで可溶化することができる)

同様の実験設定を用いて、リードガレクチン-10 scFv-ヒトFc分子及びリードガレクチン-10マウスIgG抗体を用いて、既に形成された組換えガレクチン-10結晶の抗体媒介性可溶化を評価した。このアッセイでは、抗体を、PEG3350溶液に対する一晩の平衡化の後に形成されていた結晶(一晩の50%PEG 3350に対するPBS中の250nLのTEVによって切断された可溶性野生型組換えガレクチン-10)に添加した。結晶可溶化を抗体添加後の時間の関数として観察した。100nLの抗ガレクチン-10又は対照抗体を添加し、ガレクチン-10結晶の可溶化を実体顕微鏡下で観察した。各々の条件を12のレプリカで実施した。陰性対照として、無関係なscFv-ヒトFc及びマウスIgG1、並びにバッファーのみのものを含めた。

【0218】

表10は、試験されたガレクチン-10抗体クローンの大部分が予め存在していたCLCを溶解させることができたことを示している。この溶解は、抗ガレクチン-10分子とともにインキュベートしてから2時間未満で起こった。

【表10】

クローン名	フォーマット	CLCの100% 可溶化(濃度 μ M)	クローン名	フォーマット	CLCの100% 可溶化(濃度 μ M)
1A12	ScFv- ヒト Fc	n.t	1C09	マウス IgG1	10,48
2B11	ScFv- ヒト Fc	5,04	1D11	マウス IgG1	7,86
2C07	ScFv- ヒト Fc	6,86	2C07	マウス IgG1	>2,2
2E11	ScFv- ヒト Fc	4,36	2F09	マウス IgG1	10,67
3A03	ScFv- ヒト Fc	n.t	4E08	マウス IgG1	>10
4B10	ScFv- ヒト Fc	6,14	6A05	マウス IgG1	10,1
4G05	ScFv- ヒト Fc	4,36	6A08	マウス IgG1	>10
4H10	ScFv- ヒト Fc	6	6B06	マウス IgG1	>10
5E12	ScFv- ヒト Fc	n.t	6E10	マウス IgG1	10,48
6A11	ScFv- ヒト Fc	n.t	6F06	マウス IgG1	7,57
6F05	ScFv- ヒト Fc	4	6F06	マウス IgG1	7,57
6F11	ScFv- ヒト Fc	n.t	アイソタイプ	マウス IgG1	可溶化なし
6F11	ScFv- ヒト Fc	n.t			
アイソタイプ	ScFv- ヒト Fc	可溶化なし			

10

20

30

40

50

【0219】

(実施例11 選択されたガレクチン-10抗体の結晶溶解特性のさらなる特徴解析)

下の表に示されている4つのクローンをさらなる解析のために選択した。

表11 6F05、1C09、1D11、及び4E08の特徴のまとめ

【表11】

クローン 名	フォーマット	ELISA 結合	Biacore (捕捉 アプローチ)		CLC形成及び 可溶化の阻害 における効力	
		EC50 (nM)	KD (nM)	kd 1E-04 (1/s)	CLC 形成の 100% 阻害 (濃度 (μ M))	CLCの 100% 可溶化 (濃度 μ M)
6F05	scFv- ヒト Fc	0,02	0,9	1,2	1,00	4,00
1C09	マウス IgG1	0,13	0,5	52,9	0,82	10,48
1D11	マウス IgG1	0,1	1	52,9	0,34	7,86
4E08	マウス IgG1	3,22	0,8	8,5	1,11	>10

【0220】

(A. 6F05、1C09、1D11、及び4E08によるCLCの経時的可溶化)

抗ガレクチン-10抗体によるCLC結晶の可溶化プロセスをより良く立証し、かつ特徴付けるために、スピニングディスク共焦点顕微鏡での低速度撮影実験を行った。PBS中の2.5 μ Lの自己結晶化CLC溶液(0.7mg/mL)をガラス底のチャンバー顕微鏡のウェルスライド(Ibidi)にスポットした。その後、結晶可溶化を開始させ、2 μ Lの抗ガレクチン-10抗体を7mg/mLの濃度で添加することにより、経時的に追跡調査した。蒸発を防ぐために、チャンバーを真空用グリース及びガラス製カバースライドで密閉した。6F05、1C09、1D11、及び4E08によって誘導されるCLC溶解をモニタリングした。簡潔に述べると、CLCを含有する溶液を μ -スライドウェルプレートにスポットした後、一定濃度(8mg/mL)の4つのリード抗ガレクチン-10抗体のうちの1つとともにインキュベートした。各々のウェルについて、イメージング位置を規定し、各々の位置を3~5分毎にイメージングした。これらの実験により、いくつかの抗ガレクチン抗体は1~2時間で組換えCLC結晶を可溶化することができるが、無関係な対照アイソタイプ抗体はできないことが示された(図9A)。さらに、これらの高解像度低速度撮影実験により、CLC結晶がほぼ例外なくその一番長い軸に沿ってサイズを減少させることが示されている。

【0221】

クローン1D11は、既に存在するCLCを溶解させる最も優れた能力を示し(図9B)、この場合、完全な溶解は1時間後に達成された。クローン6F05及び4E08は、同様の溶解能力を示し、90分のインキュベーション後に、90%を超えるCLC溶解を伴った。マウスアイソタイプ対照は、CLCに対する効果を示さなかった;しかしながら、視野上でのCLCの移動のために、ソフトウェアは、これをCLCによって占有された空間の縮小と誤解した。

【0222】

(B. Fabフォーマットの6F05、1C09、1D11、及び4E08の結合特性の特徴解析)

対象となる4つのクローンをFab断片として再フォーマット化した。最初の工程として、各々のクローンのVH及びVLを特異的プライマーを用いてPCR増幅させ、電気泳動により精製し、制限酵素(BsmBI)で消化し、ヒト定常ドメイン: VLのヒトラムダ定常ドメイン(pUPEX116.9)又はVHのCH1定常ドメイン(pUPEX86、ヒンジ領域の部分を含む)を含有する予め消化されたベクターにライゲーションした。各々のライゲーションされた産物の形質転換を熱ショックによりTop10細菌に入れて行い、アンピシリン(ベクターの耐性遺伝子)を含む

アガロースプレート上に移した。一晚のインキュベーションの後、ライゲーションされた産物は、多数の単一のコロニーを示したが、陰性対照(空ベクター)については、コロニーが観察されなかった。クローン(VH及びVL)当たり、4～8個のコロニーを拾い、シーケンシングに送った。適切な挿入物を示すコロニーを選択し、DNA配列を精製するために(Midi Prep)、増幅させた。4つのリードクローンの産生を哺乳動物細胞で開始した。トランスフェクションを行い、重鎖1対軽鎖1の比で、ポリエチレンイミン(PEI)によりHEK293E細胞に取り込ませた。産生から10日後、Capture Select IgG-CH1セファロースビーズを用いて、ヒトFabを精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行って、Fab分子(55kDa)の立体構造、純度、及び完全性を評価した。

【0223】

10

Fabフォーマットのリードの結合特性を、上記のプロトコルに従ってOctetRed96を用いて、ELISA結合及びBLI結合で評価した。ELISA結合データ(下の表12を参照)により、4つのリードをコーティングされたガレクチン-10-Hisに対するその結合能に基づいて2つのグループに分離することができることが示された。クローン1C09及び1D11は、1.6～1.9nMのEC50値で、最も優れた相対的結合能を示したのに対し、クローン4E08及び6F5は、25.6～26.7nMの親和性で、より低い結合能を示した。

表12 ELISAによる4つのリード抗ガレクチン-10抗体(Fabフォーマット)の結合特性の特徴解析

【表12】

20

コンストラクト (Fab)	Bmax	EC50 (nM)
1C09	1,0	1,9
1D11	0,9	1,6
4E08	0,7	25,6
6F05	0,8	26,7

【0224】

30

BLI技術で得られた結合データにより、同様の結果が示され、クローン1C09及び1D11は、最も優れた結合能(10～13nMのKD、 $3 \sim 3.8^{E-03}$ (1/s)のkd)を有し、クローン4E08及び6F05は、より弱い結合(147～188nMのKD、 $25 \sim 35^{E-03}$ (1/s)のkd)を示した(表13を参照)。

表13 BLI技術による4つのリード抗ガレクチン-10抗体(Fabフォーマット)の結合特性の特徴解析

【表13】

40

コンストラクト (Fab)	KD (nM)	kd 1E-04 (1/s)
1C09	13,4	3,83
1D11	10,7	2,99
4E08	147	24,8
6F05	188	35,6

【0225】

(実施例12. ガレクチン-10と複合したガレクチン-10 Fab断片の結晶構造)

ガレクチン-10と複合した様々なFab断片の結晶構造を得て、ガレクチン-10抗体が存在する結晶をいかにして溶解させることができるかを明らかにした。構造試験のために、選択された抗体(1D11、6F5、4E8、1C9)のFab断片をHEK293細胞で産生した。1mg/mLの組換えHisタグ化ガレクチン-10を、1:100のTEV:ガレクチン-10比を用いて、室温で一晩、TEVで消化した。次に、精製されたFabを消化されたガレクチン-10に1.25モル過剰で添加した。

50

次に、タンパク質混合物をHBSバッファーで泳動するHiLoad 16/600 Superdex 200pgカラムに注入して、ガレクチン-10:Fab複合体を単離した。ガレクチン-10:Fab複合体に対応する画分をプールし、さらなる使用まで-80℃で保存した。ガレクチン-10:Fab複合体を結晶化実験の前に6~7mg/mLまで濃縮した。ナノリットル規模のシッティングドロップ蒸気拡散結晶化実験を、Mosquito結晶化ロボット(TTP Labtech)及び市販の疎行列スクリーン(Molecular Dimensions, Hampton research)を用いて、293Kで設定した。

【0226】

Fab 1D11との複合体を形成したガレクチン-10の結晶を、ProPlex Screen(Molecular Dimensions-0.2M酢酸アンモニウム、0.1M酢酸ナトリウムpH 4.0、15%PEG₄₀₀₀)の条件B7で一晩成長させた。Fab 6F5との複合体を形成したガレクチン-10は、BCS Eco Screen(Molecular Dimensions)の条件G7(0.04M CaCl₂、0.04M Na-ギ酸塩、0.1M PIPES pH 7.0、8%PEG Smear High)で24時間以内に結晶化した。2週間後、結晶は、PEG/Ionスクリーン(Hampton Research)の条件B7(0.2M硝酸アンモニウム、20%PEG3350)でFab 4E8と複合したガレクチン-10から出現した。

【0227】

液体窒素に入れて瞬間凍結させる前、25%PEG400を含む母液補給液中に結晶を短時間浸漬させることにより、ガレクチン-10:Fab複合体の結晶を凍結保護した。100Kでの回折実験をSOLEILシンクロトロン(Gif-sur-Yvette, France)のProxima 2A及びESRF(Grenoble, France)のID23-2というビームラインで実施した。全てのデータを統合し、XDSスーツ(Kabschの文献、2010)を用いてスケーリングした。ガレクチン-10(PDB 1LCL)の構造及び高解像度マウスFab構造(PDB 5X4G)に基づく検索モデルを用いるPhaser(McCoyらの文献、2007)で分子置換(MR)を行った。モデル(再)構築をCOOT(Emsleyらの文献、2010)で行い、個々の座標及びADP精緻化をPHENIX(Adamsらの文献、2010)及びautoBuster(Bricogneらの文献、2017)で行った。COOT及びPHENIXスーツのモデル及びマップ検証ツールをワークフローの全体を通じて用いて、結晶学的モデルの改善を導き、その質を検証した。

【0228】

3つの異なるガレクチン-10:Fab複合体の構造を(抗体6F5、1D11、及び4E8について)決定した(図10A~C、表17)。これらの構造は、様々な抗体が残基Tyr69周辺のガレクチン-10上のエピトープを標的とすること示した(図10D~F)。この残基Tyr69は、ガレクチン-10の自己結晶化挙動のための重要な残基であることが分かっている(図3A及びC)。

【0229】

(実施例13. ガレクチン-10抗体は患者で成長したアレルギー性ムチン中のガレクチン-10結晶をエキスピボで可溶化する)

選択されたクローンがCRSwNPを有する患者から得られたアレルギー性ムチン中に含まれる結晶を可溶化する潜在能力を調べた。それゆえ、これらの結晶を天然の粘液環境中に置き、インビボで成長させた。粘液中のヒトCLCの抗体媒介性可溶化のための低速度撮影実験を次のように実施した。患者から単離された4μLのCLC含有粘液をガラス底のチャンバー顕微鏡スライドのウェル(Ibidi)にスポットした。次に、4μLの抗ガレクチン-10又は対照抗体(7mg/mL)をスポットした粘液に添加した。蒸発を防ぐために、チャンバーを真空グリース及びガラスカバースライドで密閉した。ヒトCLCの可溶化をスピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて経時的に追跡した。顕微鏡データをFijiを用いて解析した。これらの低速度撮影実験は、図11に示されている。ヒトCLCは、組換えガレクチン-10結晶と同様の可溶化プロセスを経るが、可溶化には、より時間がかかった。しかしながら、これは、結晶溶解性抗体とともにアレルギー性ムチンを18時間インキュベートすることにより終了した。

【0230】

(実施例14. ガレクチン-10抗体はCLCによって誘導される気道炎症を阻害する)

結晶溶解抗体をHDMアレルギー性喘息個体のPBMCで再構成したヒト化NRGマウスに投与した(Perrosらの文献、2009)。マウスはガレクチン-10結晶を産生せず、PBMC画分はヒト好酸球(ヒトにおける内在性ガレクチン-10の源)を含有しないので、ガレクチン-10結晶を、

HDM投与とともにマウスの気道に投与した。生きたヒト好酸球をマウスに養子移入するのは極めて難しい。そのため、ガレクチン-10結晶をHDMアレルゲン曝露の時に気管内投与しなければならなかった。CLCがプロトコルの28日目にマウスで観察されたとき、これは、まさに患者で見られた、気道の内側の過ヨウ素酸シッフ(PAS)陽性粘液と常に関連があり、養子移入アプローチに正当性を付与した。

【0231】

0日目に、NOD Rag^{-/-} γ c^{-/-} (NRG) マウスを 3×10^6 個のPBMCの腹腔内注射により再構成した。1~4及び7~9日目に、全てのマウスに、50 μlのPBSに希釈した20 μgのチリダニ(HDM)抽出物(Greer)を気管内注射した。ヒト化マウスの使用により、28日プロトコルの時間枠にわたって不可避免的に誘導されるマウスガレクチン-10 IgG1抗体の交絡効果が回避された。

10

【0232】

ガレクチン-10結晶の炎症促進効果に取り組む実験において、1、3、7、及び9日目に、NRGマウスを以下のレジメン: レジメン1、気管内への200 μgのアイソタイプ対照抗体(30 μlのPBSに希釈); レジメン2、気管内への10 μgの組換えガレクチン-10結晶(1 μlのストック) + 200 μgのアイソタイプ対照抗体(30 μlのPBSに希釈); レジメン3、気管内への10 μgの組換えガレクチン-10結晶(1 μlのストック) + 200 μgの1D11抗体(30 μlのPBSに希釈)で処置した(図12A)。

【0233】

11日目以降から、マウスに、切片を作製する日まで週3回、200 μgのアイソタイプ抗体又は200 μgの1D11抗体のi.t.注射を投与した。27日目に、全てのマウスに、80 μlのPBSに希釈した20 μgのチリダニ抽出物(Greer)をもう1度気管内投与した。全てのマウスを28日目に屠殺した。

20

【0234】

28日後、肺炎の度合い(図12B)は、HDM投与期間中、アイソタイプのみと比べてガレクチン-10結晶+アイソタイプを投与されたマウスでかなり高かった。1D11抗体による処置は、肺炎に対するガレクチン-10結晶の増強効果を逆転させた。さらに、治験責任医師盲検化形態計測解析(病理学用のQuPath画像解析ソフトウェアを使用)を行って、気道の基底膜から500 μmの周長における細胞流入の度合いを評価した。この解析により、気道周辺の炎症細胞の流入の顕著な増加が明らかになった(図12E)。

30

【0235】

IgE合成の度合い(図12C)をELISAにより評価した(実施例7を参照)。28日後、IgEの血清濃度(図12C)は、HDM投与期間中、アイソタイプのみと比べてガレクチン-10結晶+アイソタイプを投与されたマウスでかなり高かった。1D11抗体による処置は、IgE濃度に対するガレクチン-10結晶の増強効果を逆転させた。

【0236】

ムチンMUC5AC mRNAレベルを用いて測定された杯細胞化生の存在も評価した。このために、凍結肺組織をエッペンドルフチューブ中に回収し、1mlのTripureを添加した。組織ホモジナイザーを用いて、組織をホモジナイズした。RNAを抽出するために、ホモジナイズした肺を含有するチューブに、200 μlのクロロホルムを添加した。5分のインキュベーション期間の後、チューブを12000gで15分間遠心分離した。上部の透明な相をRNアーゼを含まないエッペンドルフ中に回収し、500 μlのイソプロパノール及び1 μlのグリコーゲンと10分間混合した。チューブを12000gで5分間遠心分離した。上清を廃棄し、精製されたRNAを含有するペレットを75%エタノール中で洗浄した(7500gで5分間の遠心分離)。ペレットを室温で10分間風乾させ、20 μlのRNアーゼを含まない水に再懸濁させた。チューブを60℃で10分間置いた。RNAの濃度を、Nanodrop装置を用いて、各々の試料中で決定した。1 μgのRNAを用いて、sensifast cDNA合成キット(Bioline)を用いて、cDNAを作製した。残りのRNAを-80℃で凍結させた。cDNAを水に10倍希釈し、さらなる使用まで凍結させた。リアルタイムPCRを実施するために、以下のマスターミックス: 10 μlのSensifast SYBR No-Ro xミックス、4,75 μlの水、5 μlのcDNAをPCRプレートの各々のウェルに使用した。0.125 μ

40

50

1のフォワードプライマー及び0.125 μ lのリバースプライマー(100 μ Mストックから取ったもの)を各々のPCR反応液に添加した。使用されたプライマーは、以下のものであった:マウスMuc5ac

【化30】

(Fwd:

CTCCGTCTTAGTCAATAACCACC (配列番号:156); Rev: GGAACTCGTTGGATTTTGGACTG

(配列番号:157))

; ハウスKEEPINGとしてのマウスGAPDH

【化31】

(Fwd: ACAAATGGTGAAGGTCGGTG

(配列番号:158); Rev: TGGCAACAATCTCCACTTTGC (配列番号:159))

。

【0237】

28日後、Muc5ACのmRNA濃度(図12D)は、HDM投与期間中、アイソタイプのみと比べてガレクチン-10結晶+アイソタイプを投与されたマウスでかなり高かった。1D11抗体による処置は、MUC5AC mRNA濃度に対するガレクチン-10結晶の増強効果を逆転させた。より詳細な組織学的解析により、杯細胞の典型的な顆粒に富む特徴を有する肺上皮細胞のPAS染色の増強によって可視化されるような、顕著に増強した杯細胞化生及び粘液産生が明らかになった。

【0238】

気管支過敏症(BHR)は喘息の本質的特徴であるので、BHRもマウスモデルで評価した。機械的に人工呼吸器につながれたマウスの吸入型気管支収縮剤メタコリンへの応答性に対するCLC投与の効果を、動的抵抗のFlexiVent観血的測定(Hammadらの文献、2007)を用いて評価した。簡潔に述べると、マウスをウレタンで麻酔し、D-ツボクラリンを用いて麻痺させ、気管切開し、18Gカテーテルを挿管し、その後、Flexivent装置により人工呼吸器につないだ。増加濃度のメタコリン(0~200 μ g/ml)をカテーテルを介してエアロゾル化した。メタコリン投与後2分間、10秒毎に施される標準的吸入操作の後、動的抵抗(rrs)を記録した。HDMへのCLCの添加により、HDMのみと比較した気管支収縮の度合いが上昇し、1D11による処置により、この効果が完全に中和された(図12Fを参照)。

【0239】

(参考文献)

10

20

30

【化 3 2】

1. Ackerman, S.J., D.A. Loegering, and G.J. Gleich, *The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay*. J Immunol, 1980. **125**(5): p. 2118-26.
2. Weller, P.F., D.S. Bach, and K.F. Austen, *Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase)*. J Biol Chem, 1984. **259**(24): p. 15100-5.
3. Archer, G.T. and A. Blackwood, *Formation of Charcot-Leyden Crystals in Human Eosinophils and Basophils and Study of the Composition of Isolated Crystals*. J Exp Med, 1965. **122**: p. 173-80. 10
4. Leonidas D, Elbert BL, Zhou Z-Q, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. *Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate binding family of galectins*. Structure 1995; **3**:1379-1393
5. Franke, D., et al., *ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions*. Journal of applied crystallography, 2017. **50**(4): p. 1212-1225. 20

6. Petoukhov, M.V., et al., *New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis*. Journal of applied crystallography, 2012. **45**(2): p. 342-350.
7. Rambo, R.P. and J.A. Tainer, *Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 477.
8. Fischer, H., et al., *Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale*. Journal of Applied Crystallography, 2010. **43**(1): p. 101-109. 10
9. Schneidman-Duhovny, D., et al., *FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles*. Nucleic acids research, 2016. **44**(W1): p. W424-W429.
10. Trewhella, J., et al., *2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update*. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2017. **73**(9).
11. Kool, M., et al., *An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 527-40. 20
12. Perros, F., et al., *Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation*. Allergy, 2009. **64**(7): p. 995-1002.
13. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010, **66**(4): p. 486-501.
14. Adams, Paul D., et al. *"PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution."* Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 2010, **66**(2): p. 213-221 30
15. Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vornrhein C., Womack T.O. (2017). BUSTER. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
16. Hammad H., et al., *Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells*. J. Exp. Med. 2007, **204**: p. 357-367 40

表14: ガレクチン-10に結合する scFv 抗体の重鎖CDR配列

【表 1 4】

scFvクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
1D11	DYAMS	1	GISWNGGSTYYAESMKG	2	DRNLGYRLGYPYDY	3
6F05	SYAMS	4	AINSGGGSTSYADSVKG	5	PGDRLWYYRYDY	6
4E08	TSYYAWS	7	VIASDGSTYYSPSLKS	8	YIRGSSWSGWSAYDY	9
1C09	TNSYYWS	10	AIAYSGSTYYSPSLKS	11	RPNWYRALDA	12
3A03	VYAMS	13	DINTSGDSTTYADSVKG	14	RYTQE	15
1A12	SYYMS	16	AINSGGGSTYYADSVKG	17	NGGIWSFGS	18
2E11	SYAMS	4	PINSGSDSASYVDSVKG	19	ARTSVVAGGMDY	20
4G05	RYWMI	21	SIYNDGGNTYYADSVKG	22	LKAAYYGMDY	23
2C07	SYAMS	4	NINSGGGSTGYADSVKG	24	YLRTYYPNAAFGMDY	25
4B10	NYWMY	26	AIDVGGGTTDYAGSVKG	27	GGSYYGMDY	28
6A11	AYAMN	29	GVNSGGGLTSYGESVKG	30	SKRGAVVAGTGDDY	31
4H10	DYAMS	1	AISWNGGSTYYAESMKG	32	DLSASGSYYHTFGS	33
6F11	TGPYSWS	34	YIGYSGSTYYSPSLKS	35	SRSSPTTFGMDY	36
2B11	TNYYYWS	37	AIAYSGSTYYSPSLKS	11	APYGISREYDY	38
5E12	NYPMT	39	AINGGGDIPYYADSVKG	40	QKWGYDPRRTDFEF	41
6A05	SYAMS	4	AINSGGGWTSYVDSVKG	42	YSGPELNTQYGMDY	43

10

20

30

40

6A08	SYAMS	4	AINRGGGSTYYADSVKG	44	PGDRLWYYRYDY	6
2F09	TNYFYWS	45	AIAYSGRTYYSPSLKS	46	GPKGLASYDY	47
6F06	RYSMS	48	TINSGGGSTSYVDSVKG	49	SQGGISFSTQYGMDY	50
6B06	TNYYSWS	51	YIAYSGSTSYSPSLKS	52	SRSSPTTFGMDY	36
6E10	SYWMY	53	AINTGGGSTYYADSVKG	54	AGSGVAGTGYDY	55

表15: ガレクチン-10に結合するscFv抗体の軽鎖CDR配列

10

20

30

40

50

【表 1 5】

scFvクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
1D11	AGTSSDVGYGNYVS	56	EVNKRAS	57	ASYRSSNNAV	58
6F05	AGTSSDIGYGNVVS	59	KVSRRAS	60	ASYRYRNNVV	61
4E08	QGGNFGYYYGS	62	KDSERPS	63	QSADSSDNPV	64
1C09	QGANLGRYYGI	65	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
3A03	KPGRTLVTGRTYLY	68	QVSNRGS	69	AQATYYPLT	70
1A12	QGGNFGYYYVS	71	GDSNRPS	66	LSYESSDYPV	72
2E11	QGGKFGSYYVS	73	KDNERPS	74	QSGSSSDNIV	75
4G05	QGANLGRYYGI	65	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
2C07	QGGNFGRYYAS	76	RDSERPS	77	QSGRSSDNAV	78
4B10	QGAKLGRYYGI	79	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67

10

20

30

40

6A11	QGGNFGYYVS	80	KDSEKPS	63	QSGSSSDNAV	81
4H10	AGTSSDVGYGDYVS	82	KVKTRAS	83	ASYKNGGTAV	84
6F11	QGGDFGRYYVA	85	QDSEKPS	86	QSGISSDNIV	87
2B11	QGGKFGYYAS	88	KDSEKPS	63	QSGRSSDNAV	78
5E12	KSSQSVRIESNHKTYLN	89	DASSRES	90	QQAYAAPT	91
6A05	QGGNFGYYAS	92	RDSGRPS	93	QSGSSSDNTV	94
6A08	GLSSGSGVTSSNYPG	95	NTNSRYS	96	ALNRVVRGTYRV	97
2F09	QGGNFGYYVS	71	RDSGRPS	93	QSGSSSDNTV	94
6F06	QGGNFGYYAN	95	KDSEKPS	63	QSGSVSDNAV	96
6B06	QGGNFGYYVS	80	QDSEKPT	97	QSGTSSDNIV	98
6E10	QGGNFGYYVS	71	RDSGRPS	93	QSGSSSDNAV	81

10

20

30

40

表16: ガレクチン-10に結合するscFv抗体のVH及びVL配列

50

【表 16】

scFv クローン	VH	配列番号	VL	配列番号
1D11	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISWNGGSTYYAESMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDYAVYCAKDRNLGYRLGYPDYWGQGTQVTVSS	99	QSVLTQPPSVSGSPGETVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIYEVNKRASGITDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEGDYYCASYRRSSNNAVFGGGTHLTVL	100
6F05	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGGS TSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK PEDTAVYYCATPGDRLWYYRYDYWGQGTQVTVSS	101	QAGLTQPPSVSGTLGKAVTISCAGTSSDYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIYKVSRRASGVDPDRFSGSKSGNTASLSISGLQSEDEADYYCASYRYRNNVFGGGTHLTVL	102
4E08	QVQRQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIITTSYAWSWIRQPPGKGLEWMGVASDGSTYYSPSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLSVTPEDTAVYYCALYIRGSSWSGWSAYDYWGQGTQVTVSS	103	QPVLNQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYGYGWSWYQKPGQAPVLVIYKDSERPSPGIPERFSGSSGGTATLTISRQAQAEDEADYYCQASADSSDNPVFGGGTHLTVL	104
1C09	QVQLVESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSIITNSYYWVSWIRQPPGKGLEWMGAIAYSGSTYYSPSLKSRTSISRDTSKNQFTLHLSVTPEDTAVYYCARRPNWYRALDAWGQGTQVTVSS	105	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGANLGRYYGIWYQKPGQAPVQVIYGDNSRPSGIPERFSGSSGGTATLTISGAQAEDEADYYCQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	106
3A03	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSVYAMSWVRQAPGKGLEWVADINTSGDSTTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKP EDTAVYYCANRYTQERGQGTQVTVSS	107	DVVLTTQTPGSLVWPGEAASISCKPGRTLVTHTDGR TYLYWLQQKPGQRPQLLIYQVSNRSGSVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVYYCAQATYYPLTFGSGTRLEIK	108
1A12	QVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGGS	109	SSALTQPSAISVSLGQTARITCQGGNFGYGYVSWYQKPGQAPVQVIYGDNSRPSGIPERFSGSSGGT	110

10

20

30

40

	TYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK SEDTAVYYCVQNGGIWSFGSWGQGTQVT VSS		ATLTISGAQAEADYYCLSYESSDYPVFGGGTHL TVL	
2E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLWVSPINSGSDSA SYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK EDTAVYYCAKARTSVVAGGMDYWGKGLTV TVSS	111	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGKFGSYVSW YQKPGQAPVMVIYKDNERPSPGIPERFSGSSSGT STLTISGAQAEDEGTYCQSGSSSDNIVFGGGTEL TVF	112
4G05	QLQVESGGGLVQTGGSLTSLCTTSGFTF SRYWMIWVRQAPGKGLWVSSIYNDGGN TYADSVKGRFTISRDNSENNTLYLQMNSLK SEDTAVYYCAKLKAAYYGMDYWGKGLTV VSS	113	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGANLGRYYGIWY QQKPGQAPVQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGT ATLTISGAQAEADYYCQSYESSTSPVFGGGTHL TVL	114
2C07	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLWVSNINSGGGS TGYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK PEDMAVYYCAKYLRTYYPNAAFMDYWG KGLTVTVSS	115	QAVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRRYYASW YQKPGQAPVLVIYRDSERPSPGIPERFSGSSSGT ATLTISGAQAEADYYCQSGRSSDNAVFGGGTHL TGL	116
4B10	QLQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SNYWMYWRQAPGKGLWVSAIDVGGGT TDYAGSVKGRFTISRDNKSTVYLQMNLT PEDTALYYCLRGSSYYGGMDYWGKGLTV VSS	117	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGAKLGRYYGIWY QQKPGQAPVQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGT ATLTISGAQAEADYYCQSYESSTSPVFGGGTHL TVL	118
6A11	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF GAYAMNWRQAPGKGLWVSGVNSGGG LTSYGESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNRL NPDDTAVYYCAKSKRGAWAGTGDDYWG QGTQVTVSS	119	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRRYYVSW YQKPGQAPVLVIYKDSERPSPGIPERFSGSSSGT ATLTISGAQAEADYYCQSGSSSDNNAVFGGGTHL TVL	120

10

20

30

40

4H10	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGS TYAESMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK SEDAAVYYCAKDLASAGSYHTFGSWGQG TQVTVSS	121	QAGLTQPPSVAGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGDYV SWYQHPIPGTAPKLLIYKVKTRASGIPDRFSGSKSGN TASLTISGLQSGDESDYYCASYKNGGTAVFGGGTH LTVL	122
6F11	QVQRQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIT TGPYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIGYSGST YYSPSLKSRTSISRDTSNQFSLQLSSVTP EDTAVYYCARSSRSPPTTFGMDYWGKGTLV TVSS	123	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGDFGRYYVAW YTQKPGQAPVLVIYQDSERPSGIPERFSGSSSGDT ATLTISGAQAEDEAEYYCQSGISSDNIVFGGGTHLT VL	124
2B11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIT TNYYWSWIRQPPGKGLEWMGAIAYSGST YYSPSLKSRTSISRDTSKNQFTLQLSSVTP DTAVYYCARAPYGISREYDYWGQGQTQVT SS	125	HSAVTQPSAVSVSLGQTARITCQGGKFGRYYASW YQOKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGDT ATLSISGAQAEDEADYFCQSGRSSDNVAVFGGGTHL TVL	126
5E12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTF RNYPMTWVRQAPGKGPWVSAINGGGDIP YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMDSLKP EDTAMYYCAKQKWGYDPRRTDFFFRGGQ TQVTVSS	127	ETVPTQSPSSVTASVGEKVTITCKSSQSVRIESNHK TYLNWYQQRPGRGPRLIYDASSRESGIPDRFSGS GSTSDFTLTISSVQPEDAAVYYCQQAAYAAPTFGQG TKLEIK	128
6A05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISNGG GWTSYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQM DSLKPEDTAVYYCTKYSGPENLTQYGM YWGKGTLVTVSS	129	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGSYASW YQOKPGQAPVLVIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDT ATLTISGAQAEDEADYFCQSGSSSDNTVFGGGTHL TVL	130
6A08	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGPWVSAINRG GGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDAAVYYCATPGDRLWYYRYD YWGGGAQVTVSS	131	QTVVTQEPSLSVSPGGTTLTCLSSGSSVTSSNYP GWYQQTTPGQAPRLIYNTNSRYSGVPNRFSGSISG NKAALISGAQPEDEADYHICALNRVRGTYRVFGGG THLTVL	132

10

20

30

40

2F09	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGS ITTNYFYWSWIRQSPGKGLEWIGAIYSG RTYYSPSLKSRSTSISRDTSNNQFTLQLSS VTPEDTAVYYCARGPKGLASYDYDWGQ GTQVTVSS	133	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYVSW YQKPGQAPVLVIYRDSGRPSGIPERFSGSSGDT ATLTISGAQAEDADYYCQSGSSSDNTVFGGGTHL TVL	134
6F06	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFT FSRYMSWVVRQAPGKGLEWVSTINSGG GSTSYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCTKSQGGISFSTQYGM DYWGKGLTVTVSS	135	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYANW YQKPGQAPVLVIYKDSERPSPGIPERFSGSSGDT ATLTISGAQAEDADYYCQSGSVSDNAVFGGGTHL AVL	136
6B06	QVQRQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGS ITTNYYSWSWIRQPPGKGLEWIGIYIYSG STSYSPSLKSRSTSISRDTSNNQFSLQLSS VTPEDTAVYYCARSSRSPPTFGMDYWG KGLTVTVSS	137	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYVSW YTQKPGQAPVLVIYQDSERPTGIPERFSGSSGDT ATLTISGAQAEDADYYCQSGTSSDNIVFGGGTHL TVL	138
6E10	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYWMYVVRQAPGKGLEWVSAINTGG GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLKPEDTALYYCARAGSGVAGTGIDY WGQGTQVTVSS	139	QPVLNQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYVSW YQKPGQAPVLVIYRDSGRPSGIPERFSGSSGDT ATLTISGAQAEDADYYCQSGSSSDNAVFGGGTHL TVL	140

10

20

30

40

表17 X線データ及び精密化統計

【表 17】

	組換え Gal10	エキスピボ CLC 結晶	組換え Gal10-Tyr6Glu	組換え Gal10:Fab- 1D11	組換え Gal10:Fab-6F5	組換え Gal10:Fab-4E8
ビームライン	P14 (PetraIII)	P14 (PetraIII)	PXIII (SLS)	ID23-2 (ESRF)	ID23-2 (ESRF)	Proxima 2A (SOLEIL)
配位子	グリセロール	グリセロール	PG4, PG6, PGE	PG4	Ca ²⁺ , PGE	/
結晶化 条件	PBS	PBS	0.2 M 硫酸アンモニウム pH 5.1 20 % PEG ₃₃₅₀	0.2 M 酢酸アンモニウム 0.1 M 酢酸ナトリウム pH 4.0 15% PEG ₄₀₀₀	0.04 M CaCl ₂ , 0.04 M ギ酸 ナトリウム、 0.1 M PIPES pH 7.0 8% PEG Smear High	0.2 M 硝酸アンモニウム 20% PEG ₃₃₅₀
凍結	35%グリセロール	35%グリセロール	25 % PEG ₄₀₀	25% PEG ₄₀₀	25% PEG ₄₀₀	20% PEG ₄₀₀
データ収集						
波長	0.9763	0.9763	0.99998	0.87313	0.87313	0.980058
空間群	P 6522	P 6522	P 21	P 21 21 21	C 2 2 21	P 21
胞寸法						
a, b, c (Å)	48.88, 48.88, 258.64	48.86, 48.86, 257.88	72.82, 93.30, 93.07	61.63, 89.22, 249.27	59.01, 146.19, 185.70	41.33, 150.45, 94.50
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 108.94, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 96.31, 90.00
分解能 (Å)	50.00-1.34 (1.42-1.34)	50.00-2.22 (2.35-2.22)	50.00-2.10 (2.23-2.10)	50.00-1.90 (2.02-1.90)	50.00-1.91 (2.02-1.91)	50.00-3.39 (3.60-3.39)
R_{meas}	7.6 (71.5)	30.7 (194.6)	15.4 (227.8)	23.4 (137.0)	23.6 (215.1)	21.9 (107.0)
$I/\sigma I$	25.64 (5.81)	7.85 (1.29)	9.33 (0.70)	6.72 (1.30)	7.67 (1.00)	5.09 (1.05)
完全性 (%)	92.4 (68.3)	99.9 (99.1)	99.0 (98.6)	99.1 (94.6)	99.7 (98.3)	98.4 (98.1)
冗長性	17.9 (14.65)	11.86 (12.20)	6.90 (6.74)	6.40 (5.99)	12.85 (11.44)	3.22 (3.33)
ウィルソンB因子	10.13	23.36	39.68	20.09	25.08	81.87
精密度						
分解能 (Å)	43.10-1.38	43.06-2.30	47.30-2.10	46.97-1.90	47.24-1.91	46.97-3.39
反射数	37 604	10 056	68 227	107 597	63 022	15 645
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	16.81 / 17.94	18.26 / 23.54	17.24 / 20.43	17.47 / 22.34	16.61 / 20.11	31.74 / 34.44
原子数						

10

20

30

40

タンパク質	1248	1122	6766	8812	4452	8344
配位子/イオン	6	6	112	13	11	/
水	209	129	648	1457	835	/
B-因子						
タンパク質	15.04	28.68	50.77	26.14	38.06	133.84
配位子/イオン	25.31	53.67	70.35	65.21	71.99	/
水	36.26	45.50	60.13	40.34	52.48	/
R.m.s. 偏差						
結合長 (Å)	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.008
結合角度 Bond angles (°)	0.91	1.14	1.12	1.14	1.09	1.16

(実施例15.さらなるガレクチン-10抗体の産生)

さらなるガレクチン-10抗体を、ヒト及びカニクイザルガレクチン-10に対するバイオパニングにより選択し、ガレクチン-10(ヒト及びカニクイザル)に対する結合についてのELISA及びBLIによりスクリーニングした。

【0241】

3つのカニクイザルガレクチン-10アイソフォーム(WGS、REF、及びYRT)の配列が、ヒト配列とともに以下に示されている。

【化33】

ヒト : MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLACFLNEPVLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFGRVVMNSREY
WGS: MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHQVYFGNRRVVMNSREF
REF: MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIKGRPLVCFEENEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHQVYFGNRRVVMNSREF
YRT: MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIEARPLVCFFNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHQVYFGNRRVVMNSREY

10

GAWKQCVESKNMPFQDGQEFELSIIVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPEAVKMQVQVWRDISLTKFNVSYLKR
KIWKKEEVESKNMPFQDGQEFELSIIVLEDKYQVMVNGQAYYFNHRIPIVSSVKMQVQVWRDISLTKFNVS---
KIWKKEEVESKNMPFQDGQEFELSIIVLEDKYQVMVNGQAYYFNHRIPIVSSVKMQVQVWRDISLTKFNVS---
RTWKKEEVESKNMPFQDGQEFELRIIVLEDKYQVMVNGQAYYFNHRIPIVSSVKMQVQVWRDISLTKFNVS---

(WGS: 配列番号: 267; REF: 配列番号: 268; YRT: 配列番号: 269)

【0242】

ヒト及び3つのカニクイザルアイソフォームの配列解析により、以下のことが明らかになった:

20

- ・カニクイザルガレクチン-10のアイソフォームは、ヒトガレクチン-10と78~81%の同一性を示す。
- ・WGS及びREFアイソフォームは、位置31における単一のアミノ酸(F/L)が異なる。
- ・YRTアイソフォームは、REFアイソフォームと比較して、位置23(K/E)、24(G/R)、69(F/Y)、70(K/R)、71(I/T)、及び92(S/R)における6つの異なるアミノ酸を示す。
- ・YRTアイソフォームのみが、ヒトと同様に、位置69にチロシン残基を有する。

【0243】

ガレクチン-10に対する結合を示す11のscFvクローンをシークエンシングし、実施例8に記載されているように、ヒトFc融合分子として再フォーマット化した。

30

【0244】

(A. ELISA及びバイオレイヤー干渉法(BLI)技術によるscFvのスクリーニング)

(i)ELISA解析

ヒトガレクチン-10並びにカニクイザルガレクチン-10の2つの利用可能なアイソフォーム(WGS及びREF)に対するscFv(ペリプラズム抽出物)の結合能をELISA結合で解析した。簡潔に述べると、maxisorpプレートを1µg/mLのヒトガレクチン-10-His又はカニクイザルWGSもしくはREFアイソフォームガレクチン-10-Hisで一晩コーティングし、その後、PBS 1%カゼインでブロッキングした後、Mycタグ化scFvを含有するペリプラズム抽出物(PBS 0.1%カゼイン中、1/5希釈)とともにインキュベートした。バインダーの検出を、抗Myc-HRP抗体(Bethyl、カタログA190-105P)を用いて実施した。その後、TMB基質を添加し、反応を0.5M H₂SO₄で停止させた。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01を用いてプロットした。これは、図13に示されている。0.5よりも高いOD値によって定義される、MPプレート当たり及びライブラリー当たりのバインダーの数を決定した。ブランク対照及び陰性対照(無関係な標的に結合するscFvペリプラズム抽出物)が含まれ、これらは、予想通り、結合を示さなかった。

40

【0245】

これらの結果から、最後の回の選択の後に、ヒト又はカニクイザルガレクチン-10に結合するかなりの数のscFvが単離されることが示された。しかしながら、ヒトカニクイザルバインダー(REF及びWGSアイソフォーム)の濃縮におけるかなりの差がマスタープレート間で観察され、ヒトバインダーは10.6~87%、カニクイザルWGS及びREFアイソフォームバイ

50

ンダーは0～92,6%であった。両方のリヤマについて、ラムダライブラリーは、カップライブラリーよりも明らかに高いパーセンテージのヒト又はカニクイザルガレクチン-10に対するscFv結合を示した。これは、特に、0～4%のカニクイザルバインダー(WGS及びREFアイソフォーム)を示すライブラリー1Kの場合であった。反対に、ライブラリー1L及び2Lは、76～92.6%のヒトカニクイザルバインダーを示し、ラムダライブラリーがヒトカニクイザル交差反応性バインダーの平均的な供給源であり得ることを示した。酸性pH溶出が適用される条件から作製されたマスタープレート(MP07及びMP08)も、比較的高いパーセンテージのヒト及びカニクイザルバインダーを示し、カップライブラリーについては、0～60.9%のバインダー、ラムダライブラリーについては、76.1～89.1%のバインダーであった。予想通り、その極めて近い相同性のために、一般的な傾向のscFvは、カニクイザルガレクチン-10-HisのWGS及びREFアイソフォームに対する同様の結合を示した。

表18 選択後に作製されたMP由来のscFvペリプラズム抽出物のELISA結合スクリーニング【表18】

MP 番号	ライブラリー	ガレクチン-10-His	ヒット	%ヒット
MP07	1K	ヒト	24	52,2
		カニクイザル_WGS	1	2,2
		カニクイザル_REF	0	0,0
	1L	ヒト	41	89,1
		カニクイザル_WGS	41	89,1
		カニクイザル_REF	41	89,1
MP08	2K	ヒト	5	10,9
		カニクイザル_WGS	28	60,9
		カニクイザル_REF	28	60,9
	2L	ヒト	35	76,1
		カニクイザル_WGS	36	78,3
		カニクイザル_REF	38	82,6
MP09	1K	ヒト	58	61,7
		カニクイザル_WGS	0	0,0
		カニクイザル_REF	4	4,3
MP10	1L	ヒト	82	87,2
		カニクイザル_WGS	87	92,6
		カニクイザル_REF	87	92,6
MP11	2L	ヒト	76	80,9
		カニクイザル_WGS	80	85,1
		カニクイザル_REF	79	84,0
MP12	2K	ヒト	10	10,6
		カニクイザル_WGS	59	62,8
		カニクイザル_REF	59	62,8

【0246】

(ii)BLI解析

選択時に作製された6つのマスタープレートから、ELISAスクリーニングキャンペーン中にヒト及びカニクイザル結合を示す321のクローンを拾い上げ、その結合能をOctet RED96を用いてBLIで試験した。簡潔に述べると、Hisタグ化ガレクチン-10のヒト及びカニクイザルWGS又はREFアイソフォームをキネティックバッファー(PBS 0.01%BSA、0.002%Tween 20)に200 µg/mLで希釈した後、1nmの固定化レベルに達するまで、抗ペンタHis 1Kセンサー先端部(ForteBio, Cat#18-5120)に捕捉させた。その後、scFvクローンを含有する希釈したペリプラズム抽出物(キネティックバッファー中、1/5)を適用し、固定化されたガレクチン-10-Hisに対する会合/解離をForteBioデータ解析9.0ソフトウェア(基準先端部の減算(無関係なHisタグ化タンパク質を1nmまで積載、1.1結合モデル)を用いて測定した。スクリーニング中、scFvの解離(解離速度)しか決定することができなかったが、それは、sc

Fvの有効濃度が不明であり、かつクローン毎に大きく異なり得るからである。これらの結果から、選択されたscFvクローンの大部分がヒトカニクイザル交差反応性を示すことが確認された(図14を参照)。

【0247】

(B. scFv-ヒトFcパネルの特徴解析)

ELISAとT3000 Biacoreを用いるSPRとを用いて、scFv-ヒトFcパネルの結合特性を評価した。

【0248】

(i)ELISA解析

初期のスクリーニング時に使用した設定と同様の設定において、11の新しいscFv-ヒトFcクローンの相対的結合特性をELISAにより解析した。簡潔に述べると、maxisorpプレートを0.2 µg/mLのガレクチン-10-Hisのヒト又はカニクイザルWGS又はYRTアイソフォームで一晩コーティングし、PSB 1%カゼインでブロッキングした後、scFv-ヒトFc融合分子の連続希釈物(100nMから1/5希釈、8点の希釈)とともにインキュベートした。数回の洗浄工程の後、抗ヒトFc-HRP抗体(Jackson ImmunoResearch、カタログ109-035-008)を用いて、結合したscFv-ヒトFcの検出を行った。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算された各々のクローンのEC50値は、下の表19に報告されている。陽性対照として、先のガレクチン-10抗体パネル由来のクローン6F05を含めた。

表19 scFv-ヒトFcガレクチン-10抗体のパネルのELISA結合特徴

【表19】

クローン (scFv- ヒト Fc)	ヒト Gal10-His (0.2 µg/mL)		カニクイザル Gal10- His_WGS (0.2 µg/mL)		カニクイザル Gal10-His_YRT (0.2 µg/mL)	
	Bmax	EC50 (nM)	Bmax	EC50 (nM)	Bmax	EC50 (nM)
7B07	0,6	1,11	0,6	0,82	0,0	結合なし
7C05	1,0	0,67	1,5	不明確	2,1	2,53
7D10	1,5	不明確	2,3	不明確	2,3	不明確
7E09	2,0	1,48	2,9	1,66	2,3	1,64
8H11	2,3	0,18	3,1	0,13	3,1	0,10
10A06	1,2	0,08	2,5	0,10	3,0	0,04
10B02	2,2	0,09	3,3	0,05	3,2	0,05
10D02	1,9	0,56	3,1	1,12	2,0	1,40
10H06	1,9	0,63	2,9	0,90	2,4	0,96
11F02	1,5	0,77	2,5	不明確	2,5	不明確
11F12	1,8	0,56	3,1	0,23	3,0	0,24
6F05	2,4	0,02	0,3	不明確	0,3	不明確

【0249】

コーティングしたヒト及びカニクイザルガレクチン-10に対するscFv-ヒトFcパネルの結合は、ヒトに対して0.08~1.48nMの範囲、及びガレクチン-10のカニクイザルWGS及びYRTアイソフォームに対して0.04~2.53nMの範囲の相対的結合能を示した。以下のことを観察した：

- ・陽性対照クローン6F05は、ヒト標的に対するscFvパネルの最も優れた相対的結合能を示した(0.02nMのEC50値及びBmaxとして2.4 OD値)。しかしながら、このクローンは、両方のカニクイザルアイソフォームに対する弱い結合を示した(不明確な適合及び0.3 OD値に等しいBmax)。

- ・クローン10A06、10B02、及び8H11は、最も優れた相対的結合能を示し、EC50値はヒトガ

レクチン-10に対して0.08～0.18nM、カニクイザルガレクチン-10の両方のアイソフォームに対して0.04～0.13nMであった。

・クローン7C05を除いて、scFv-ヒトFcパネルの残りのものは、カニクイザルガレクチン-10の2つのアイソフォームに関する同様の結合プロファイルを示した。

【0250】

(ii)SPR解析

ガレクチン-10に対するscFv-ヒトFcパネルの結合特性をBiacore T3000で解析した。この目的のために、CM5チップを8000RUのポリクロール抗ヒトFcでコーティングし、その後、一定濃度のscFv-ヒトFcパネル(1.5 μg/mL)を捕捉させると、約150RUの結合シグナルに達した。最後に、ガレクチン-10-Hisのヒト又はカニクイザルWGSアイソフォームの連続希釈物(5 μg/mLから2分の1の連続希釈、6点の希釈)を注入した。BIA評価ソフトウェアにより、ブランク減算(4-3)を用いて、生データを解析した。最後に、ガレクチン-10-Hisに対する各々のscFv-ヒトFcのkd/KD及びRmaxを、BIA評価ソフトウェアで質量移動/局所Rmaxを伴うFit Kineticsの同時ka/kd/結合を用いて決定した。結果は、下の表に示されている。

表20 Biacore T3000でのscFv-ヒトFcガレクチン-10抗体のパネルの結合特性の特徴解析

【表20】

名前	以下のものに対するscFv-ヒトFcのBiacore結合 (捕捉アプローチ)							
	ヒトGal10-His				カニクイザルGal10-His WGS			
	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	Rmax	KD (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	Rmax	KD (nM)
007B07	15,0	12,4	90,0	0,8	500,0	766,0	37,0	1,5
007C05	9,9	12,4	31,0	1,3	3,8	1,4	10,0	0,4
007D10	7,9	22,2	28,0	2,8	1,8	5,8	35,0	3,2
007E09	5,4	19,0	19,0	3,5	4,9	17,4	14,0	3,6
008H11	4,53	8,2	55	1,8	17,5	16,1	41	0,9
010A06	9,1	2,5	42,0	0,3	6,6	3,5	27,0	0,5
010B02	5,0	8,1	39,0	1,6	7,7	8,0	52,0	1,0
010D02	3,4	6,6	39,0	2,0	4,5	12,2	24,0	2,7
010H06	3,2	5,6	40,0	1,8	3,4	26,2	15,0	7,8
011F02	3,7	20,3	22,0	5,4	2,4	18,5	21,0	7,9
011F12	3,2	7,2	40,0	2,3	75,4	112,0	35,0	1,5

【0251】

上で報告されたELISA結合データと一致して、scFv-ヒトFc融合体のパネルは、ガレクチン-10-HisのヒトとカニクイザルWGSアイソフォームの両方に対する多様な結合特性を示した。以下のことを観察した。

・scFv-ヒトFcパネルは、ヒトガレクチン-10-Hisに対して0.3～5.4nM及びガレクチン-10-HisのカニクイザルWGSアイソフォームに対して0.5～7.9nMの親和性を示した。

・クローン10A06、7B07、及び7C05は、最も高い親和性(それぞれ、0.3nM～最大1.3nM)を示し、解離速度は、ヒトガレクチン-10-Hisに対して $2.5^{E-04} \text{ s}^{-1}$ ～最大 $12.4^{E-04} \text{ s}^{-1}$ であった。クローン7B07は、このパネルの最も速い会合速度(15^{E05} 1/Ms)及びRmax(90RU)を示した。

・scFv-ヒトFcパネルは、ヒト標的と比較して、カニクイザルガレクチン-10-Hisに対する2倍低いRmaxを示した。

・クローン7C05、10A06、8H11は、最も高い親和性(それぞれ、0.4nM～最大0.9nM)を示し、解離速度は、ガレクチン-10-HisのカニクイザルWGSアイソフォームに対して $1.4^{E-04} \text{ s}^{-1}$ ～最大 8^{E-04} s^{-1} であった。クローン7B07は、このパネルの最も速い会合速度(500^{E05} 1/Ms)及び解離速度(766^{E-04})を示した。

【0252】

(C. マウスIgG1骨格中への選択されたscFvクローンの再フォーマット化)

下の表に示されている7つの選択されたリードを、さらなる特徴解析のためにマウスIgG1骨格中に再クローニングした。

表21 マウスIgG1骨格中の再フォーマット化されたscFvクローンのパネル

【表 2 1】

クローン ScFv- hFc	VH ファミリー	VL ファミリー	bELISA hGal10	bELISA カニクイザル Gal10-WGS	bELISA カニクイザル Gal10-YRT	ヒトGal10に対する Biacore			カニクイザルGal10 WGS に対するBiacore		
			EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	KD (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	KD (nM)
007B07	2	9	1,11	0,82	結合なし	15,0	12,4	0,8	500,0	766,0	1,5
008H11	7	10	0,18	0,13	0,10	4,53	8,2	1,8	17,5	16,1	0,9
010A06	12	34	0,08	0,10	0,04	9,1	2,5	0,3	6,6	3,5	0,5
010B02	5	26	0,09	0,05	0,05	5,0	8,1	1,6	7,7	8,0	1,0
010D02	6	17*	0,56	1,12	1,40	3,4	6,6	2,0	4,5	12,2	2,7
011F02	7b	33	0,77	10,41	不明確	3,7	20,3	5,4	2,4	18,5	7,9
011F12	7	16	0,56	0,23	0,24	3,2	7,2	2,3	75,4	112,0	1,5

10

【 0 2 5 3】

これら7つの抗体のCDR、VH、及びVL配列は、下の表32、33、及び34に示されている。

20

【 0 2 5 4】

再フォーマット化のために、各々のクローンのVH及びVL領域をPCR増幅させ、マウスIgG1定常ドメインをコードする発現ベクターにインフレームでクローニングした。

【 0 2 5 5】

ポリエチレンイミン(PEI)によりHEK293E細胞に取り込まれる3つの軽鎖に1つの重鎖の比でのトランスフェクションにより、マウスIgG1抗ガレクチン-10の産生を実施した。産生から6日後、プロテイン-Aセファロースビーズを用いて、マウスモノクローナル抗体を細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行って、抗体(150kDaに等しいMW)の純度及び完全性を評価した。

【 0 2 5 6】

30

(実施例16. マウスIgG1フォーマットのガレクチン-10抗体の特徴解析)

(A. ガレクチン-10 マウスIgG1パネルの結合特性の特徴解析)

(i)ELISA解析

scFv-ヒトFc分子の特徴解析時に使用した設定と同様の設定において、7つのマウスIgG1抗体の相対的結合特性をELISAにより解析した。maxisorpプレートを0.5 µg/mLのガレクチン-10-Hisのヒト又はカニクイザルWGS又はYRTアイソフォームで一晩コーティングした。その後、各々のクローンの連続希釈物(100nMから1/4希釈、12点の希釈)を、コーティングしたガレクチン-10上でインキュベートした。数回の洗浄工程の後、抗マウスFc-HRP抗体(DAMPO, Jackson ImmunoResearch、カタログ715-035-150)を用いて、結合したマウスIgG1の検出を行った。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算された各々の抗体のEC50値は、下の表に示されている。先のパネル由来の抗体1D11を比較のために含めた。

40

表22 ELISAによるマウスIgG1パネルの結合特性の特徴解析

【表 2 2】

クローン(マウス IgG1)	ヒトGal10-His (0.5 µg/mL)		カニクイザル Gal10-His_WGS (0.5 µg/mL)		カニクイザル Gal10-His_YRT (0.5 µg/mL)	
	OD 値	EC50 (nM)	OD 値	EC50 (nM)	OD 値	EC50 (nM)
1D11	2,0	0,10	0,05	n.d	0,03	n.d
7B07	0,4	0,57	3,22	0,06	0,01	n.d
8H11	1,5	1,46	3,61	0,03	2,97	0,30
10A06	0,3	0,63	3,69	0,03	3,38	0,06
10B02	1,4	2,28	3,70	0,04	3,36	0,14
10D02	2,7	3,55	3,51	0,14	2,63	不明確
11F02	0,9	3,08	3,29	0,60	1,70	不明確
11F12	2,7	4,83	3,69	0,05	3,35	0,21

10

【0 2 5 7】

以下のことを観察した。

- ・マウスIgG1抗ガレクチン-10抗体の新しいパネルは、それぞれ、ヒトガレクチン-10に対して0.57nM～4.83nM、カニクイザルWGSアイソフォームに対して0.03nM～0.60nM、及びカニクイザルYRTアイソフォームに対して0.06nM～0.30nMの相対的結合能をELISAで示した。
- ・クローン1D11は、ヒトガレクチン-10(0.10nMのEC50値)に対する最も優れた相対的結合能を示したが、カニクイザルガレクチン-10に対する結合を示さなかった。
- ・ヒトガレクチン-10に対して、クローン7B07、10A06、及び8H11は、最も優れた相対的結合能を示し、EC50値は0.57nM～1.46nMであった。ガレクチン-10のWGSアイソフォームに対して、クローン8H11、10A06、及び10B02は、ヒト標的と比較して18～53倍強力な、0.03nM～0.04nMのEC50値を有する最も優れたバインダーであることが分かった。
- ・最後に、クローン10A06、10B02、及び11F12は、カニクイザルガレクチン-10-HisのYRTアイソフォームに対する最も優れた相対的結合能を示し、0.06nM～0.21nMのEC50値であった。

20

【0 2 5 8】

(ii)SPR解析

ガレクチン-10に対するマウスIgG1抗体パネルの結合能をBiacore T3000で解析した。この目的のために、捕捉アプローチを使用し、その場合、一定濃度(1.5 µg/mL)のマウスIgG1クローンをCM5チップ上に固定化されたポリクロナル抗マウスFc抗体により捕捉させると、約150RUの結合シグナルに達した。その後、HBS-EP pH7.4に希釈したガレクチン-10-Hisのヒト及びカニクイザルWGSアイソフォームの連続希釈物(5 µg/mLから2分の1の連続希釈)を注入した。BIA評価ソフトウェアにより、ブランク減算を用いて、生データを解析した。ガレクチン-10-Hisに対する各々のmAbのkd/KD及びRmaxを、BIA評価ソフトウェアで質量移動/局所Rmaxを伴うFit Kineticsの同時ka/kd/結合を用いて決定した。

表23 Biacore T3000によるマウスIgG1パネルの結合特性の特徴解析

30

40

【表 2 3】

クローン (マウス IgG1)	マウスIgG1に対するBiacore結合(捕捉アプローチ):							
	ヒト Gal10-His				カニクイザル Gal10-His_WGS			
	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	Rmax	KD (nM)	ka (1/Ms) E05	kd (1/s) E-04	Rmax	KD (nM)
1D11	127	93,1	68	0,7	n.d	n.d	7	n.d
7B07	27,8	39	65	1,4	454	660	24	1,5
8H11	23,1	19,7	50	0,9	1,7	7,54	30	4,4
10A06	117	101	39	0,9	129	147	21	1,1
10B02	14,2	20,5	37	1,5	4,94	4,2	40	0,9
10D02	5,47	8,65	37	1,6	4,77	9,12	21	1,9
11F02	22,7	48,9	24	2,2	3,94	19,8	17	5,0
11F12	30,4	22,4	37	0,7	4,94	5,94	30	1,2

【0 2 5 9】

以下のことを観察した。

- ・この設定において、7つのヒトカニクイザル交差反応性クローンは、ヒト及びカニクイザルガレクチン-10(WGSアイソフォーム)に対してナノモル濃度からサブナノモル濃度までの範囲の親和性を示し、解離速度は $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 660 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の範囲であった。
- ・ヒト及びカニクイザルガレクチン-10-Hisの両方について、クローン8H11、10A06、及び11F12は、ヒト標的については0.7nM~0.9nM、及びカニクイザル抗原(WGSアイソフォーム)については、0.9nM~1.2nMの親和性を有する最も優れた結合能を示した。
- ・クローン1D11は、ヒトガレクチン-10に対する最も優れたバインダー(0.7nMに等しい親和性)の1つであることが分かったが、カニクイザル抗原に対する無/低結合(7RUに等しいRmax)を示した。

【0 2 6 0】

(B. インビトロでの組換えヒトCLC結晶の溶解)

抗ガレクチン-10マウスIgG1クローンによって誘導されるCLCの溶解をスピニングディスク共焦点顕微鏡を用いてモニタリングした。簡潔に述べると、ヒトCLCを含有する溶液をμ-スライドウェルプレートにスポットした後、一定濃度(50 μM)のマウスIgG1抗ガレクチン-10抗体とともにインキュベートした。最後に、各々のウェルについて、イメージング位置を定義し、各々の位置を3~5分毎に合計120分間イメージングした。最後に、ソフトウェアに基づいて、CLCによって占有された表面を決定し、実験の開始時にCLCによって覆われた最初の面積を1と定義した。陰性対照として、マウスIgG1アイソタイプ対照を含めた。CLCの全体的なサイズを経時的に測定し、GraphPad Prism 7.01でプロットした(図15を参照)。各々のマウスIgG1クローンのEC50及びEC90値を非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。これは、下の表に報告されている。

表24 インビトロでのガレクチン-10結晶の溶解

【表 2 4】

濃度 (μM)	クローン	フォーマット	50% 溶解 (分)	90% 溶解 (分)
50	1D11	mIgG1	30,1	56,7
	7B07		13,2	44,4
	8H11		22,4	43,5
	10A06		44,5	86,6
	10B02		25,1	47,4
	10D02		26,5	58,6
	11F02		25,5	57,5
	11F12		21,3	42,6

【0261】

(実施例17. Fabフォーマットのガレクチン-10抗体の特徴解析)

(A. Fabクローン及びbELISAデータの作製)

7つのガレクチン-10マウスIgG1抗体のガレクチン-10上での正確なエピトープを決定するために、結晶学的試験を開始した。この目的のために、上の実施例16で特徴付けられた7つの抗ガレクチン-10抗体をFabとして産生した。

【0262】

このために、各々のクローンのVH及びVLを特異的プライマーを用いてPCR増幅させ、電気泳動により精製し、制限酵素(BsmBI)で消化し、ヒト定常ドメイン: VLのヒトラムダ定常ドメイン(pUPEX116.9)又はVHのCH1定常ドメイン(pUPEX86、ヒンジ領域の一部を含む)を含有する予め消化されたベクターにライゲーションした。ライゲーションされた産物の各々の形質転換を熱ショックによりTop10細菌に入れて実施し、細胞をアンピシリン(ベクターの耐性遺伝子)を含有するアガロースプレートに移した。一晚のインキュベーションの後、ライゲーションされた産物は、多数の単一コロニーを示したが、陰性対照(空ベクター)については、コロニーが観察されなかった。クローン(VH及びVL)当たり、4~8個のコロニーを拾い、シーケンシングに送った。正確な挿入物を示すクローンを選択し、DNA配列を精製するために(MidiPrep)、増幅させた。

【0263】

7つのFabリードクローンの産生を哺乳動物細胞で開始させた。ポリエチレンイミン(PEI)によりHEK293E細胞に取り込まれる3つの軽鎖に1つの重鎖の比でのトランスフェクションを実施した。産生から10日後、Capture Select IgG-CH1セファロースビーズを用いて、ヒトFabを細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行って、Fab分子(MW ~55kDa)の純度及び完全性を評価した。

【0264】

リード抗ガレクチン-10 Fabの結合能を結合ELISAにより試験した。簡潔に述べると、maxisorpプレートを1µg/mLのヒトガレクチン-10-Hisで一晚コーティングした。その後、各々のクローンの連続希釈物(4µMから1/4希釈、12点の希釈)を、コーティングしたガレクチン-10上でインキュベートした。数回の洗浄工程の後、結合したFabの検出を抗ヒトIgG Fab特異的ペルオキシダーゼを用いて行った。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。結果は、下の表に示されている。

表25 ガレクチン-10 Fabの結合特性の特徴解析

【表25】

1µg/mLでコーティングした ガレクチン-10-Hisに対するbELISA		
	Bmax	EC50 (nM)
1D11	1,59	1,4
7B07	0,65	24,4
8H11	0,95	24,3
10A06	0,36	89,5
10B02	0,74	61,2
10D02	1,03	16,1
11F02	0,46	81,4
11F12	1,375	22,4

【0265】

ELISA結合データは、コーティングしたヒトガレクチン-10-Hisに対するその結合能に基づいて、Fabを3つのグループに分けることができることを示した:

- ・グループ1: クローン8H11、10D02、及び11F12は、最も高い相対的結合能(16~24nM)及びBmax(0.74~1.3 OD値)を有する最も優れたバインダーであることが分かった
- ・グループ2: クローン7B07は、24nMに等しいEC50値及びOD値0.65に等しい最大結合能を伴う、比較的良好な結合能を示したが、ゆっくりとした斜面勾配を示し、ガレクチン-10と

の別の結合相互作用を示唆した。

- ・グループ3:最も低い相対的結合能(61~90nM)及びBmax(0.36~0.74 OD値)を有するあまり強力でないバインダーには、クローン10B02、10A06、及び11F02が含まれた。
- ・1,4nMに等しい相対的結合能を伴って、クローン1D11は、完全なmAbデータと一致する、ヒトガレクチン-10に対する最も優れた結合能を示した。

【0266】

(B. ガレクチン-10と複合したガレクチン-10 Fab断片の結晶構造)

ガレクチン-10と複合した様々なFab断片の結晶構造を実施例12に記載されている通りに得た。結果は、図16に示されている。これらの構造は、クローン8H11、1D11、4E8、6F5、10D2、及び11F12がチロシン69(Y69)又はY69にごく近接しているエピトープに結合するの

10

【0267】

ガレクチン-10二量体へのガレクチン-10 Fabの結合に関与したガレクチン-10の残基は、下の表26に示されている。

表26 ガレクチン-10 FabのCDRと直接相互作用するガレクチン-10の残基

【表26】

クローン	以下のものと相互作用するガレクチン-10残基	
	VH	VL
1D11	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120	69, 70, 71 及び 73
6F5	43, 49, 68, 69, 114-117, 119-120	73, 98, 113-115 及び 117
4E8	74, 113-115	49, 68, 69, 73, 98, 115-117
8H11	33, 59, 60, 78-82 及び 109	60, 74, 75, 77 及び 79
11F12	33, 59, 60, 72, 79-82, 84 及び 109	74, 75, 76, 77 及び 79
10B02	33, 59, 60, 77-84	74, 75, 76, 77 及び 79
10D02	31, 33, 59, 60, 78-82 及び 84	79
7B7	2-5, 7-11, 25, 44, 88, 123, 125, 133 及び 135	2, 23, 25, 86-90, 105 及び 134

20

【0268】

ガレクチン-10二量体への結合に関与したガレクチン-10 Fab CDR残基は、下の表27に示されている。

表27 結晶構造中のガレクチン-10二量体の残基と接触するFabのCDR残基

30

【表 2 7】

クローン		CDR 残基 Fab1	ガレクチン-10 残基 (単量体A)	CDR 残基 Fab2	ガレクチン-10 残基 (単量体B)
1D11	VH	CDR1 - 31 CDR2 - 53 CDR3 - 102-107	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120	CDR1 - 31 CDR2 - 53 CDR3 - 102-107	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120
	VL	CDR1 - 31 及び 34 CDR3 - 93 及び 97	69, 70, 71, 73	CDR1 - 31 及び 34 CDR3 - 93, 96 及び 97	69, 70, 71, 73
6F5	VH	CDR1 - 2, 27, 31 及び 32 CDR3 - 98, 99, 102- 105, 107, 110	43, 49, 68, 69, 114-117, 119- 120	CDR1 - 2, 27, 31 及び 32 CDR3 - 98, 99, 102-105, 107, 110	43, 49, 68, 69, 114-117, 119- 120
	VL	CDR1 - 33 及び 34 CDR2 - 51, 52, 55 及び 58	73, 98, 113-115 及び 117	CDR1 - 33 及び 34 CDR2 - 51, 52, 55 及び 58	73, 98, 113-115 及び 117
4E8	VH	CDR2 - 60 CDR3 - 105, 107 及び 109	74, 113-115	CDR2 - 60 CDR3 - 104, 105, 107 及び 109	74, 113-115

10

20

	VL	CDR1 - 26, 28-31 CDR2 - 49 CDR3 - 91-94	49, 68, 69, 73, 98, 115-117	CDR1 - 26, 28- 31 CDR3 - 91-94	49, 68, 69, 73, 98, 115-117
7B07	VH	CDR1 - 30 及び 31 CDR2 - 53-57 CDR3 - 100, 102- 105	2, 3, 25, 88 及び 133	CDR1 - 30 及び 31 CDR2 - 53-57 CDR3 - 100, 102-104	4, 5, 7-11, 44, 123, 125, 135
	VL	CDR1 - 26, 28-31 CDR2 - 48, 50, 51 CDR3 - 65, 91-93	2, 23, 25, 86-90, 105 及び 134	CDR1 - 26, 28- 31 CDR2 - 48, 50, 51 CDR3 - 65, 91- 93	2, 23, 25, 86-90, 105, 134
8H11	VH	CDR1 - 31-33 CDR2 - 52-54, 56, 57 及び 59 CDR3 - 99-101	33, 59, 60, 78- 82 及び 109	CDR1 - 30-33 CDR2 - 52-54, 56, 57 及び 59 CDR3 - 100 及び 101	33, 59, 60, 78- 82 及び 109
	VL	CDR1 - 31, 32 及び 34 CDR3 - 93 及び 97	60, 74, 75, 77 及び 79	CDR1 - 31, 32 及び 34 CDR3 - 93 及び 97	60, 74, 75, 77 及び 79
11F12	VH	CDR1 - 30-33 CDR2 - 52-54, 56 及び 57 CDR3 - 99-101	33, 59, 60, 72, 79-82, 84 109	CDR1 - 30-33 CDR2 - 52-54, 57 CDR3 - 99-101	33, 59, 60, 78- 82 及び 109
	VL	CDR1 32 及び 34 CDR3 97	74, 75, 76, 77 及び 79	CDR1 - 32 及び 34 CDR3 - 97	74, 75, 77 及び 79,
10B02	VH	CDR1 - 31-33 CDR2 - 52-54, 56, 57 及び 59 CDR3 - 99-102	33, 59, 60, 70, 72, 77-82, 84	CDR1 - 31 及び 33 CDR2 - 53-54, 56, 57 及び 59 CDR3 - 99-102	33, 59, 60, 70, 72, 77-82, 84
	VL	CDR1 - 31, 32 及び 34 CDR3 - 93 及び 97	74, 75, 76, 77 及び 79	CDR1 -30, 31, 32 及び 34 CDR3 - 93 及び 97	74, 75, 76, 77 及び 79
10D02	VH	CDR1 - 28, 30-33 CDR2 - 53-57 CDR3 - 99-101	31, 33, 59, 60, 70, 72, 78-82, 84,	CDR1 - 28, 30- 33 CDR2 - 52-54, 56 及び 57 CDR3 - 99-103	31, 33, 59, 60, 70, 72, 78-82, 84,
	VL	CDR3 - 97	79	CDR3 - 97	2, 79

10

20

30

40

【 0 2 6 9 】

(実施例18. ガレクチン-10 mAb及びFab断片によるCLC溶解の比較)

予め存在する組換えヒトガレクチン-10結晶をインビトロで可溶化するガレクチン-10 F

50

abの能力をガレクチン-10 mAbと比較した。プロトコルは、上の実施例16に記載されている通りであった。

【0270】

結果は、図17及び下の表にも示されている。場合により、Fab断片は、対応するmAbよりもCLCを溶解させるのに効果的であった。

表28 ガレクチン-10 mAb及びFabによって媒介されるCLC溶解

【表28】

濃度 (μM)	クローン	フォーマット	50% 結晶 溶解 (分)	90% 結晶 溶解 (分)
50	7B07	mIgG1	31,76	93,02
	8H11		68,29	>120
	10A06		>120	>120
	10B02		73,66	>120
	11F12		65,43	>120
	1D11		100	>120
50	7B07	hFab	15,09	54,14
	8H11		48,53	>120
	10A06		49,15	>120
	10B02		102,2	>120
	10D02		59,67	>120
	11F02		77,86	>120
	11F12		61,96	>120
	1D11		33,42	97,85

【0271】

(実施例19. ガレクチン-10に結合するVHH抗体の産生)

2匹のリヤマを組換えヒトガレクチン-10で免疫した。メッセンジャーRNA(mRNA)を免疫されたリヤマの血液から単離されたPBMCから精製した。mRNAをランダムヘキサマープライマーで逆転写して、cDNAを得た。タグ付きプライマーをcDNAに対して直接使用して、VHH領域をPCR増幅させた。その後、PCR産物を精製し、消化し、ファージミドベクター(Hisタグ化VHH-Myc)にクローニングして、VHHライブラリーを作製した。

【0272】

ヒトガレクチン-10とカニクイザルガレクチン-10の両方に対する適切な結合能を有するVHHクローンを選択するために、バイオパニング手法を使用した。この目的のために、第1ラウンドの選択をヒトガレクチン-10-Hisに対して実施し、その後、第2ラウンドの濃縮をヒト又はカニクイザルWGS又はYRTアイソフォーム(Hisタグ)に対して行った。簡潔に述べるとヒト又はカニクイザル(WGSもしくはYRTアイソフォーム)ガレクチン-10-HisをMaxisor p ELISAプレート上に固定化し、その後、VHHファージライブラリー(Input)を添加した。未結合のファージを複数回の洗浄工程により除去した。最後に、選択されたファージを増幅させるために、大腸菌感染を実施した。このプロセスにより、ヒト及びカニクイザルガレクチン-10に対する高い親和性を有するVHHを発現するファージ集団の濃縮がもたらされた。

【0273】

第2ラウンドの溶出したファージから、0.5及び0.05 μg/mLのガレクチン-10のヒト、カニクイザルWGSアイソフォーム、及びカニクイザルYRTアイソフォームに対して、単一のクローンを作製した。VHHクローン抗ヒト及びカニクイザルガレクチン-10を含有するペリブ

ラズム抽出物をELISA及びバイオレイヤー干渉法(BLI)での結合能についてスクリーニングした。

【0274】

ヒト並びにカニクイザル(WGS及びYRTアイソフォーム)ガレクチン-10に対するVHH(ペリプラズム抽出物)の結合能をELISAにより解析した。簡潔に述べると、maxisorpプレートを1 µg/mLのヒトガレクチン-10-His又はカニクイザルWGSもしくはYRTアイソフォームガレクチン-10-Hisで一晩コーティングし、その後、PBS 1%カゼインでブロッキングした後、Mycタグ化VHHを含有するペリプラズム抽出物(PBS 0.1%カゼイン中、1/5希釈)とともにインキュベートした。バインダーの検出を抗Myc-HRP抗体(Bethyl、カタログA190-105P)を用いて実施した。その後、TMB基質を添加し、反応を0.5M H₂SO₄で停止させた。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01を用いてプロットした。これは、図18に示されている。0.5よりも高いOD値によって定義される、MPプレート当たりのバインダーの数を決定した。ブランク対照及び陰性対照(無関係な標的に結合するVHHペリプラズム抽出物)が含まれ、これらは、予想通り、結合を示さなかった。

10

表29 ELISAスクリーニングによるVHHペリプラズム抽出物の特徴解析

【表29】

MP 番号	抗原	ヒット	%ヒット
MP13	ヒト Gal10HIS	51	53,1
	カニクイザル Gal10HIS_WGS	57	59,4
	カニクイザル Gal10HIS_YRT	67	69,8
MP14	ヒト Gal10HIS	14	14,6
	カニクイザル Gal10HIS_WGS	13	13,5
	カニクイザル Gal10HIS_YRT	34	35,4

20

【0275】

結合ELISAに加えて、BLIを用いて、ガレクチン-10-結合クローンについてスクリーニングした。

30

【0276】

選択時に作製された2つのマスタープレートから、ELISAスクリーニングキャンペーン中にヒト及びカニクイザル結合を示す130のクローンを拾い、その結合能をOctet RED96を用いてBLIで試験した。簡潔に述べると、Hisタグ化ガレクチン-10のヒト及びカニクイザルWGS又はYRTアイソフォームをキネティックバッファー(PBS 0.01%BSA、0.002%Tween 20)に200 µg/mLで希釈した後、1nmの固定化レベルに達するまで、抗ペンタHis 1Kセンサー先端部(ForteBio, Cat#18-5120)上に捕捉させた。その後、VHHクローンを含有する希釈したペリプラズム抽出物(キネティックバッファー中、1/5)を適用し、固定化されたガレクチン-10-Hisに対する会合/解離をForteBioデータ解析9.0ソフトウェア(基準先端部の減算(無関係なHisタグ化タンパク質を1nmまで積載、1.1結合モデル))を用いて測定した。スクリーニング中、VHHの解離(解離速度)しか決定することができなかったが、それは、VHHの有効濃度が不明であり、かつクローン毎に大きく異なり得るからである。結果は、図19に示されており、これにより、選択されたVHHクローンの大部分がヒトカニクイザル交差反応性を示すことが確認された。

40

【0277】

ガレクチン-10に対する結合を示す選択されたVHHクローンをシークエンシングに送った。そのCDR1-2-3 VHH配列に基づいて、各々のクローンをファミリーに分類した。このプロセスにより、44のファミリーが結果として決定された。そのスクリーニング結合データ(E

50

LISA及びBLI)並びにその配列に基づいて、15のVHHクローンをさらなる特徴解析のために選択した。精製されたVHHの産生を大腸菌で開始した。この目的のために、選択されたVHHを少量のグルコースを含む2TY培地中でまず成長させ、VHHの産生をIPTG(1mM)による一晩のインキュベーションにより誘導した。翌日、細菌ペレットを2サイクルの凍結/融解(-80℃及び-20℃)により溶解させた。遠心分離後、Talon金属親和性樹脂(BDカタログ635504)を用いて、Hisタグ化VHHを細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行って、VHH分子(MW ~15kDa)の純度及び完全性を評価した。

【0278】

さらなる特徴解析のために選択された15クローンのCDR及びVHHドメイン配列は、下の表35及び36に示されている。

【0279】

(実施例20. ガレクチン-10に結合するVHH抗体の特徴解析)

(A. ELISAによって測定されるガレクチン-10に対するVHHクローンの結合)

15のVHHクローンの結合能をELISAにより解析した。簡潔に述べると、maxisorpプレートに1µg/mLのヒト又はカニクイザルWGSもしくはYRTアイソフォームガレクチン-10-Hisで一晩コーティングし、PSB 1%カゼインでブロッキングした後、VHHの連続希釈物(4µMから1/3希釈、12点の希釈)とともにインキュベートした。数回の洗浄工程の後、抗Myc-HRP抗体(Bethyl、カタログA190-105P)を用いて、結合したVHHの検出を行った。吸光度をTecan装置により450nm(620nmの基準)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算された各々の化合物のEC50値を下の表に報告した。陽性対照として、先のヒト特異的パネル由来のクローン1D06を含めた。結果は、下の表に示されている。

表30 ELISAによるガレクチン-10 VHHクローンの特徴解析

【表30】

クローン (VHH)	1µg/mLのコーティングしたGal10-HISに対するVHHのbELISA					
	ヒト		カニクイザル_WGS		カニクイザル_YRT	
	Bmax (OD 値)	EC50 (nM)	Bmax (OD 値)	EC50 (nM)	Bmax (OD 値)	EC50 (nM)
13A05	1,8	69,7	2,7	77,8	2,9	66,3
13B06	1,0	不明確	1,4	不明確	2,0	不明確
13C03	2,0	30,6	0,1	/	0,1	/
13C04	1,1	不明確	2,7	369,1	2,5	不明確
13C06	2,8	27,5	2,9	10,3	2,9	16,2
13C07	1,3	106,7	2,9	7,1	2,8	33,2
13C10	1,0	不明確	2,3	不明確	2,7	185,8
13D12	0,8	不明確	1,3	不明確	2,4	118,9
13E07	1,1	不明確	2,3	371,0	2,4	不明確
13E09	1,8	105,7	2,3	438,4	3,0	66,9
13G12	1,6	141,0	2,9	11,8	3,1	3,1
13H07	1,5	179,9	2,7	15,6	3,1	1,3
14E02	0,7	不明確	1,8	不明確	2,1	不明確
14E10	0,5	不明確	1,4	不明確	2,7	15,8
14F10	0,5	不明確	2,6	60,4	3,0	3,0
1D06	1,2	90,7	0,0	/	0,0	/

【0280】

以下のことを観察した:

- ・クローン13C06及び13A05は、最も優れたヒトカニクイザル交差反応性バインダーであり、ヒトガレクチン-10に対する27~69.7nMのEC50値に等しい相対的結合能、並びにカニクイザルガレクチン-10のWGSアイソフォームに対する10.3~77.8nMのEC50値、及びYRTアイ

ソフォームに対する16.2～66.3nMのEC50値に等しい相対的結合能を有していた。

・クローン13C07、13E09、13G12、及び13H07は、105～180nMのEC50値で、ヒトガレクチン-10に対する中等度の結合能を示したが、WGSアイソフォームに関して7.1～438nMのEC50値で、及びYRTアイソフォームに対する1.3～33nMのEC50値で、カニクイザルガレクチン-10に対する強い結合能を示した。

・クローン13C03は、30nMに等しい相対的結合能を伴う、ヒトガレクチン-10に対する強い結合を示したが、カニクイザルアイソフォームに対する弱い結合(Bmax 0.1 OD値)を示した。

・ヒトガレクチン-10に対してのみ選択された先のscFvライブラリーから単離されたクローン1D06は、90nMに等しいEC50値を示したが、カニクイザル交差反応性を示さなかった。

【0281】

(B. VHHクローンはヒト組換えCLCをインビトロで溶解させる)

VHHクローン1D06によって誘導されるCLC溶解を、スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いてモニタリングした。簡潔に述べると、ヒトCLCを含有する溶液をμ-スライドウェルプレートにスポットした後、一定濃度(50 μM又は100 μM)のVHH抗体1D06とともにインキュベートした。最後に、各々のウェルについて、イメージング位置を定義し、各々の位置を3～5分毎に合計120分間イメージングした。最後に、ソフトウェアに基づいて、CLCによって占有された表面を決定し、実験の開始時にCLCによって覆われた最初の面積を1と定義した。陰性対照として、VHHアイソタイプ対照を含めた。CLCの全体的なサイズを経時的に測定し、GraphPad Prism 7.01でプロットした(図20を参照)。VHHクローンのEC50及びEC90値を非線形回帰(log(アゴニスト)対応答の可変勾配(4パラメータ))を用いて計算し、下の表に報告した。

表31 VHHクローン1D06によるCLCの溶解

【表31】

濃度 (μM)	クローン	フォーマット	50% 溶解 (分)	90% 溶解 (分)
50	1D06	VHH	20,1	13,6
100			7,2	43,96

表32: ガレクチン-10に結合するscFv抗体の重鎖CDR配列

10

20

30

【表 3 2】

scFvクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
7B07	SYDMS	160	AIKNGGGITYYADSVKG	161	THGIGTLGFGS	162
8H11	TNYMN	163	GITSGGGRTYYADSVKG	164	TDHAWLDA	165
10A06	NYDMS	166	DINSGGGSTYYADSVKG	167	GYTGYY	168
10B02	YHYMN	169	GISAGGGRTYYADSVKG	170	VHGITNDY	171
10D02	SYYMS	172	GIVTGGGRTHYTDSDVKG	173	VNGVVTNYDY	174
11F02	TNYMN	163	GITSHGARTYYADSVKG	175	TDHASLDA	176
11F12	TNYMN	163	GITSGGGRTYYADSVKG	164	TDHAWLDA	165

表33: ガレクチン-10に結合するscFv抗体の軽鎖CDR配列

10

20

30

40

50

【表 3 3】

scFvクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
7B07	DGNNIGKSAQ	177	ADEYRPE	178	QVWDGSAAV	179
8H11	AGTSSDVGYGNYVS	180	AVSTRAS	181	ASYRSSNNVV	182
10A06	GLSSGVTSSNYP	183	SINSRHS	184	TLYMGTSNNVV	185
10B02	AGTSSDVGYGNYVS	180	EVNKRAS	186	ASYRNSNNVV	187
10D02	AGTSSDVGYGNYVS	180	DVNKRAS	188	ASYRSPNNVV	189
11F02	GLSSGVTSSNYPG	190	NTNSRYS	191	ALYMGSSSYNTV	192
11F12	AGTSSDVGYGNYVS	180	AVSTRAS	181	ASYSVRNNVV	193

表34: ガレクチン-10に結合するscFv抗体のVH及びVL配列

10

20

30

40

50

【表 3 4】

scFv クローン	VH	配列番号	VL	配列番号
7B07	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRS YDMSWVRQAPGKGPPEWVSAIKNGGGITYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAV YYCATTHGIGTLGFGSWGQGTQVTVSS	194	SYELTQSASVSVALTQTAKITCDGNNIGSKSAQWY QQKPGQAPALVIYADEYRPEGIPERFSGNSGNTA TLISGAQAEADYYCQVWDGSAAVFGRGTHLTV L	195
8H11	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST NYMNWVRQAPGKGLEWVSGITSGGRTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAL YYCARDHAWLDAWGQGTQVTVSS	196	QAGLTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYV SWYQQLPGTAPKLLIYAVSTRASGIPDRFSGSKSGN TASLTISGLLSEDEADYYCASYRSSNNVVFEGGTKL TVL	197
10A06	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG NYDMSWVRQAPGKGPPEWVSDINSGGGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTA VYYCATGYTGYYWGQGTQVTVSS	198	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCLSSGGSVTSSNYP AWYQQTPGQAPRALIYINSRHSVGVPDRFSGSISG NKAALTITGAQAEDEADYYCTLYMG TGSSNNVVFEGG GTHLTVL	199
10B02	QVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFS YHYMNWVRQAPGKGLEWVSGISAGGGRTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLNAEDT ALYYCARVHGITNDYWGGGTQVTVSS	200	QSALTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYV SWYQQLPGMAPKLLIYEVNKRASGITDRFSGSKSG NTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRNSNNVVFEGGT HLTVL	201
10D02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSS YMSWVRQAPGKGLEWVSGIVTGGGRTHYT DSVKGRFTITRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCARVNGVVTNYDYWGQGTQVTVSS	202	QAVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYV SWYQQLPGMAPKLLIYDVNKRASGITDRFSGSKSG NTASLTISGLQSEDEADYFCASYRSPNNVVFEGGT HLTVL	203
11F02	ELQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST NYMNWVRQAPGKGLEWVSGITSHGARTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAL YYCARDHASLDAWGQGTQVTVSS	204	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCLSSGGSVTSSNYP GWYQQKPGQAPRTLINTNSRYSGVPPNRFSGSISG NKAALTITGAQPEDEADYYCALYMGSSSYNTVFEGG GTHLTVL	205
11F12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST NYMNWVRQAPGKGLEWVSGITSGGRTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAL YYCARDHAWLDAWGQGTQVTVSS	206	HSALTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYV SWYQHLPGTAPKLLIYAVSTRASGVPDRFSGSKSG NTASLTISGLQSEDEGDYYCASYSVRN NVVFEGGT RLTVL	207

表35: ガレクチン-10に結合するVHH抗体のCDR配列

10

20

30

40

50

【表 3 5】

VHHクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
13G12	AYSMG	208	VISWGGSHYDDSVKG	209	GTLYSFRYRDYDY	210
13H07	TYAMD	211	AISWHSAIYYADAVKG	212	ALRYRFNPSAMEY	213
14F10	GYAVG	214	IISWNGGTHYADSVKG	215	SPKYYFSPETYNY	216
13C06	SYSMG	217	TISWGGGFYDDSVKG	218	GTRFSFSYREYHY	219
13C07	AYSMA	220	AITWGGSHHDDSVKG	221	GTLYSFSYRDYDY	222
14E10	PYAMG	223	VISLSGAYTYNVNAVKG	224	SRTYYRTDESTYEY	225
13D12	SYHMM	226	ALAWRGGTYCANSVKG	227	SRRYVFDPSAMDY	228
13A05	SYSMS	229	IISWGGGTYDDSVKG	230	GTQFSFSYREYDY	231
13C04	TYSMA	232	AITRSGGNTYADSVKG	233	GGTYSFVPRSYNY	234
13E09	SYHMM	226	AIAWRGGTYCANSVKG	235	SLRYVFDPSAMDY	236
14E02	TYSMA	232	AITWAGGYTYGADSEKG	237	GRLFTSQSSAYQY	238
13C10	PYTMG	239	VVSSGGGTYYANSVKG	240	GSIFRWSPMSYDY	241
13E07	SYHMM	226	AIAWRGGTYCANSVKG	235	SLRYVFDPSAMDY	236
13C03	ISRMG	242	IIFSDASTDYADSVKG	243	VLRAAGYGYFNQY	244
13B06	TYSMA	232	AITRSGGNTYADSVKG	233	GGTYSFVPRSYNY	234
1D6	TYAMG	245	AITRAGGNTYNADSVKG	246	GPRYSTISTMFPY	247
15A2	SYSMG	217	TISWGGGNYVDNSVKG	248	GTQFSFSYRQYDY	249

表36: ガレクチン-10に結合するVHH抗体のVHHドメイン配列

10

20

30

40

50

【表 3 6】

クローン	VH 配列	配列番号
13G12	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASSAYSMDWFRQAPGKEREFVAVISWGGSHYDDSVKGRF TISRDAKNTVYLMNSLKPEDTAVYCAVGTLYSFRYRDYDWGGGTQVTSS	250
13H07	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCVSGRTFTSTYAMDWFRQAPGKEREFVAAISWHSAIYYADAVKG RFTISRDNKNTMYLQMNLLKPEDTAVYFCAAALRYRFPNSAMEYWGKGLTVTVSS	251
14F10	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSGYAVGWFRQAPGKEREFVTIISWNGGTHYADSVKG RFAISRDNKNTVYLMNNLLKPEDTAVYCAVSPKYYFSPETYNWGGGTQVTSS	252
13C06	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASSSYSMDWFRQAPGKEREFVATISWGGFYDDSVKGRFT VSRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYCAAGTRFSFSYREHYWGGGTQVTSS	253
13C07	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASSAYSMDWFRQAPGKEREFVAAITWGGSHHDDSVKGRF TISRDAKNTVYLMNSLKPEDTAVYCAVGTLYSFSYRDYDWGGGTQVTSS	254
14E10	ELQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASEGTRPYAMGWFRQAPRGEREFVAVISLGAYTYNNNAVK GRFTISRDNKNTVYLMNSLTPEDTAYYCGASRTYRTDESTYEWGGGTQVTSS	255
13D12	QLQVVEGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREFVAAALWRRGGTYCANSVK GRCTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCAASRRYVFDPSAMDYWGKGLTVTVSS	256
13A05	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSYSMSWFRQAPGKEREFVAVISWGGTYDDSVKGRFT VSRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYCAAGTQFSFSYREYDWGGGTQVTSS	257
13C04	ELQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTSTYSMAWFRQAPGKEREFVAAITRSGGNTYADSVKG RFTISRDNKNTVTLQMNSLKPEDTAAHYCAAGGTYSFVPRSYNYWGGGTQVTSS	258
13E09	QVQVQESGGGLVQAGNSLRLSCAASGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREFVAAIWRGGTYCANSVK GRCTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCAASRLRYVFDPSAMDYWGKGLTVTVSS	259
14E02	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVSGRAAGTYSMAWFRQAPGKEREFVAAITWAGGTYGADSE KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYSCAGGRFTSQSSAYQYWGQGTQVTSS	260
13C10	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNPTMGWFRQAPGKEREFVAVSSGGGTYYANSVK GRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYCAAGSIFRWSPPMSYDWGGGTQVTSS	261
13E07	ELQVVEGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREFVAAIWRGGTYCANSVK GRCTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCAASRLRYVFDPSAMDYWGKGLTVTVSS	262
13C03	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSISRMGWYRQAPGKQRELVAIFSDASTDYADSVKGRF TISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYCKSVLRAAGYGFYFNQYWGQGTQVTSS	263

10

20

30

40

13B06	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTSTYSMAWFRQAPGKEREFVAITRSGGNTYADSVKG RFTISRDNKNTVTLMNSLKPEDTAAYHCAAGGTSFVPRSYNYWGQGTQVTVSS	264
1D6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASENSVSTYAMGWFRQAPGKEREFVAITRAGGNTYNADSVK GRFTISRDNKNTVTLMNSLKPEDTAVYSCAAGPRYSTISTMFPYWGQGTQVTVSS	265
15A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSYSMGWFRQAPGKEREFVATISWGGNYVDNSVKGRF TVSRDNKNTVTLMNSLKPEDTAVYYCAAGTQFSFSYRQDYWGQGTQVTVSS	266

10

20

30

40

【0282】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施態様によって範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書に記載されたものに加えて、本発明の様々な修飾が、前述の説明及び付随する図面から、当業者には明らかになるであろう。そのような修飾は、添付された

50

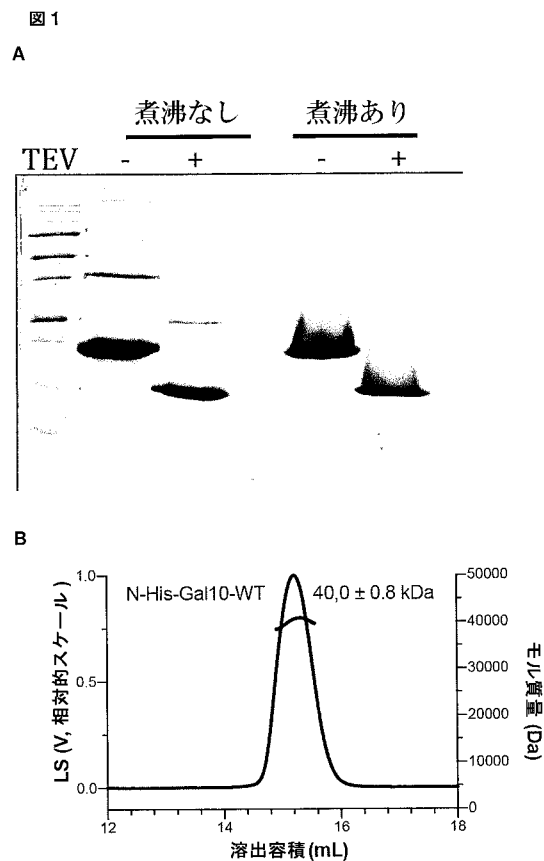
特許請求の範囲内に収まることが意図される。さらに、本明細書に記載される全ての実施態様は、広く適用可能であり、かつ適切な場合、任意の及び全ての一貫性のある実施態様と組み合わせ可能であると考えられる。

【0283】

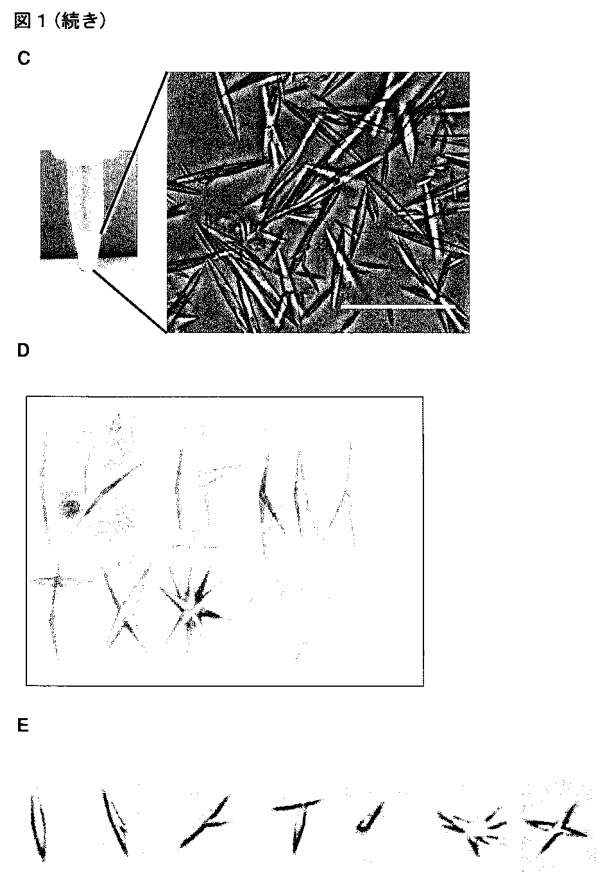
(引用による組込み)

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して引用されており、その各々は、引用により完全に本明細書中に組み込まれている。

【図1A－B】

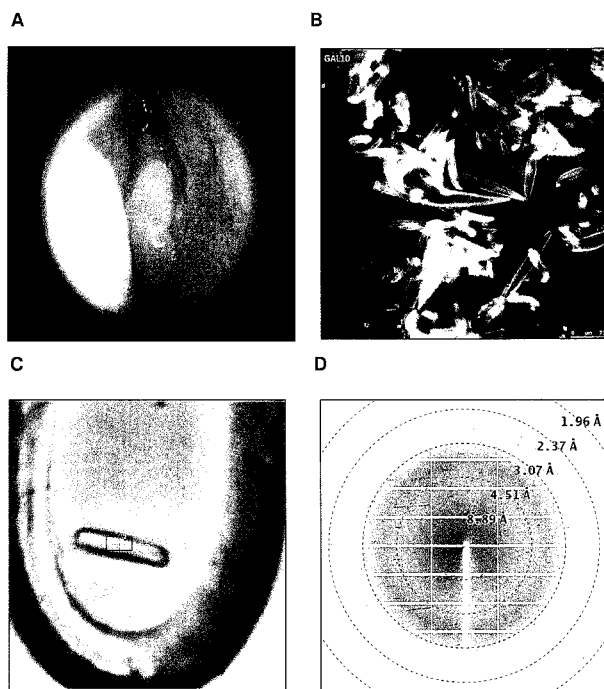


【図1C－E】



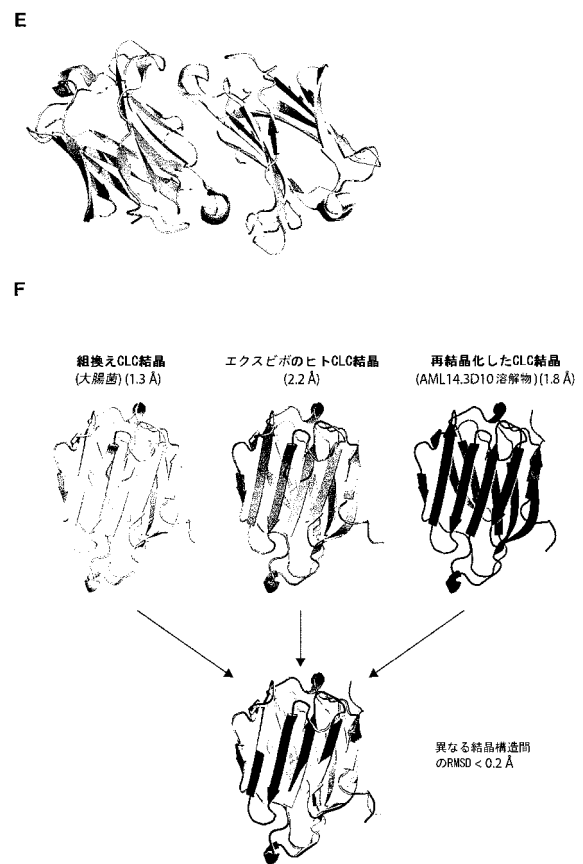
【図 2 A - D】

図 2



【図 2 E - F】

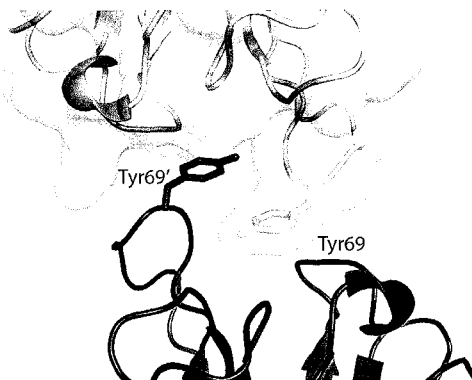
図 2 (続 き)



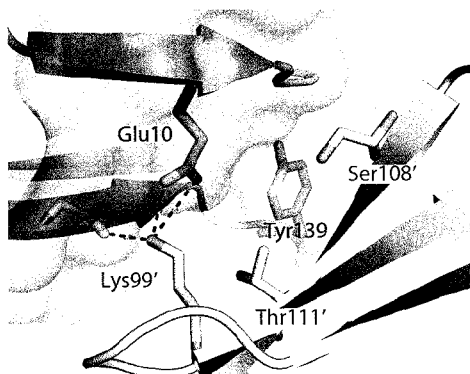
【図 3 A - B】

図 3

A



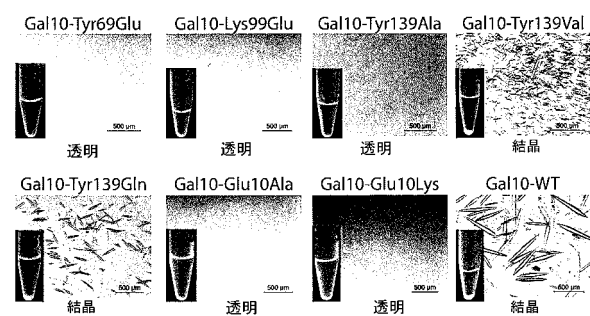
B



【図 3 C】

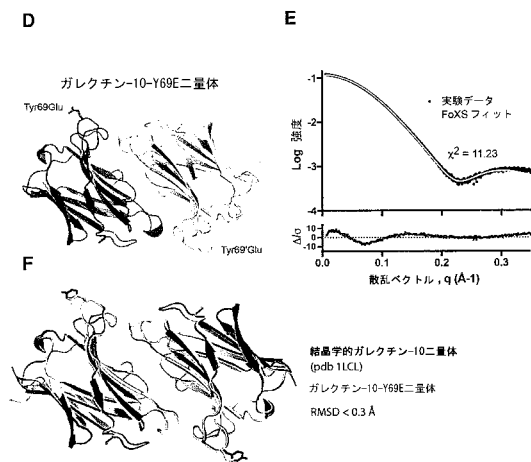
図 3 (続 き)

C



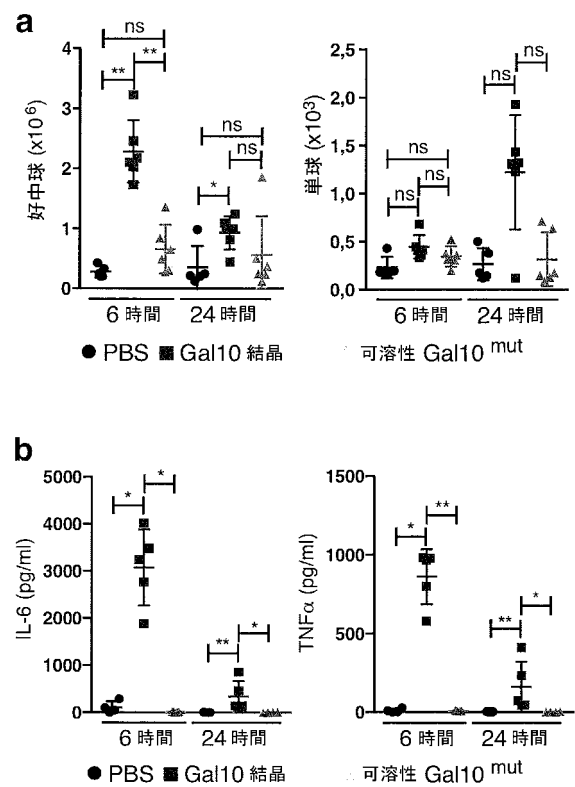
【図 3 D - F】

図3(続 き)



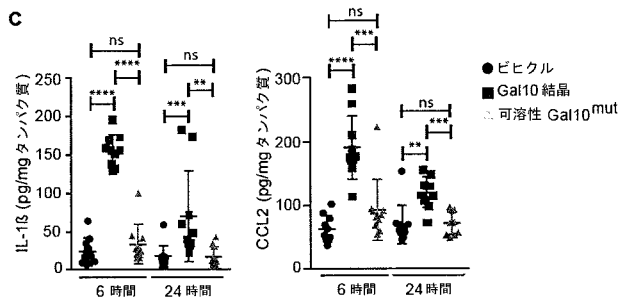
【図 4 a - b】

図 4



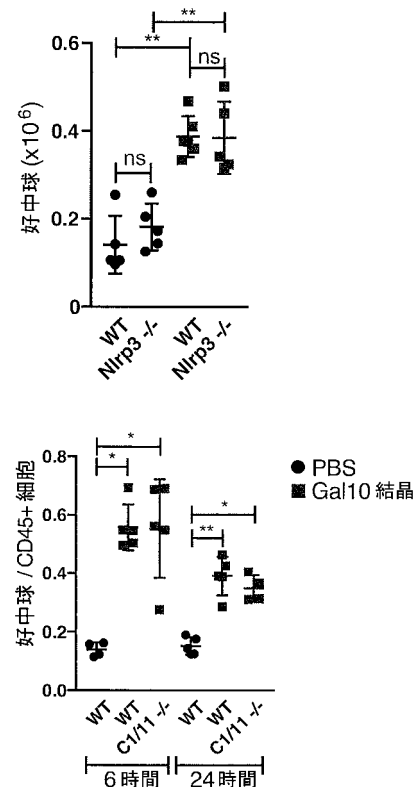
【図 4 c】

図 4 続 き



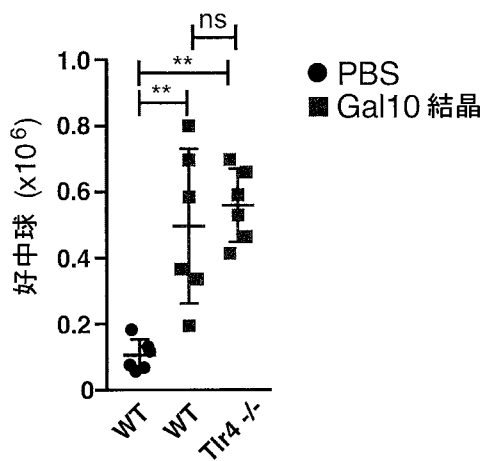
【図 5】

図 5



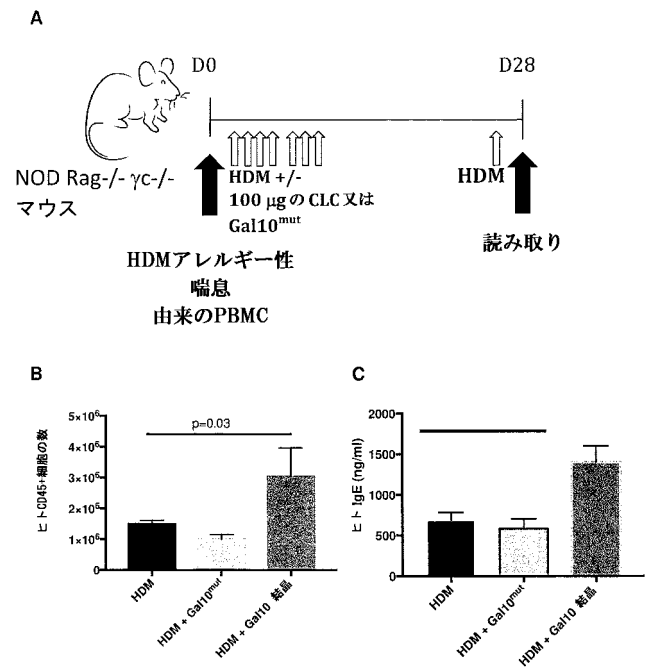
【図 6】

図 6



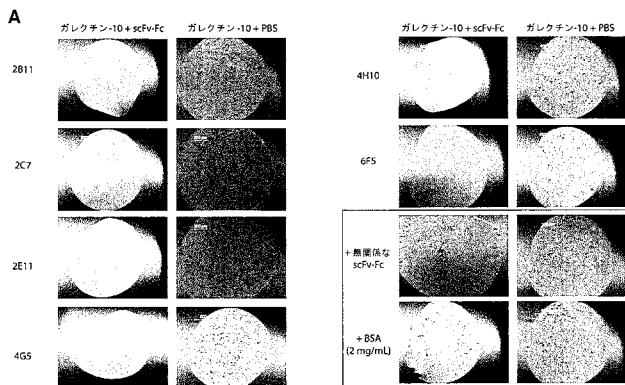
【図 7】

図 7



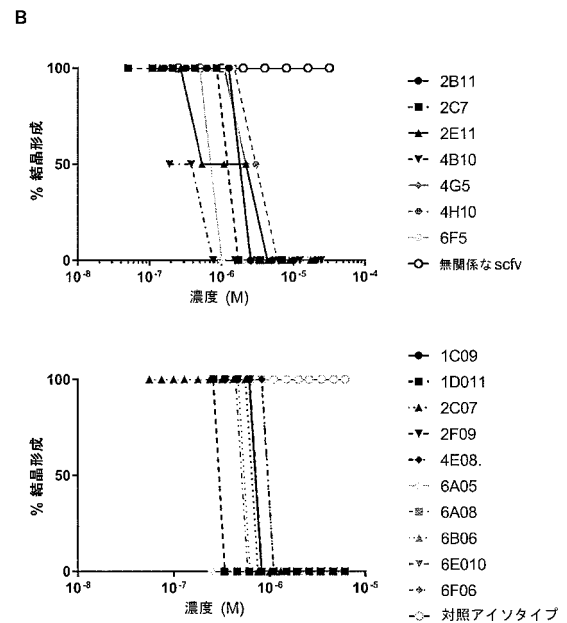
【図 8 A】

図 8



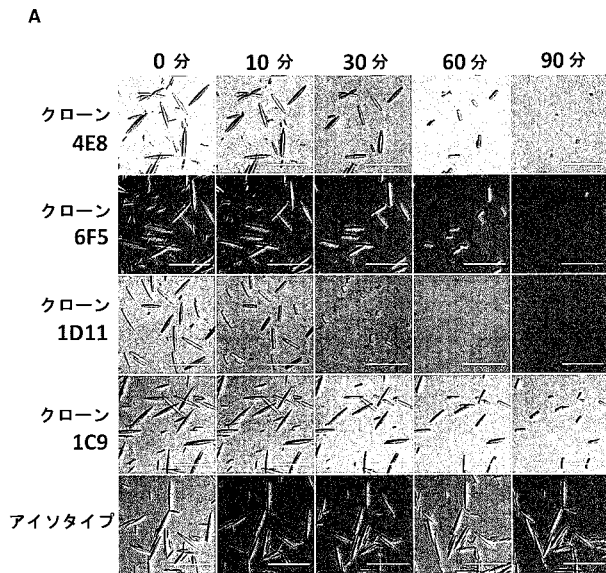
【図 8 B】

図 8(続き)



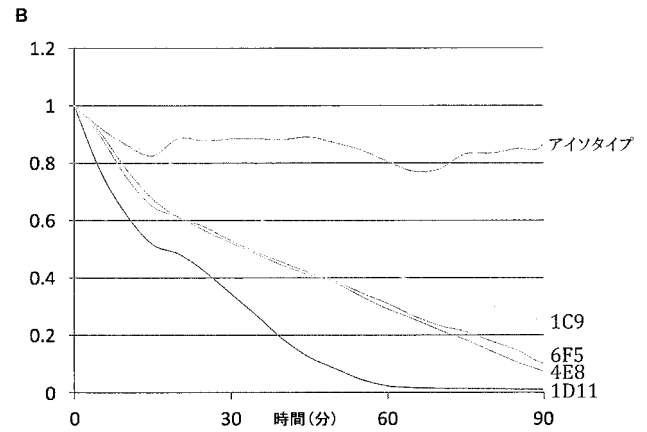
【図 9 A】

図 9



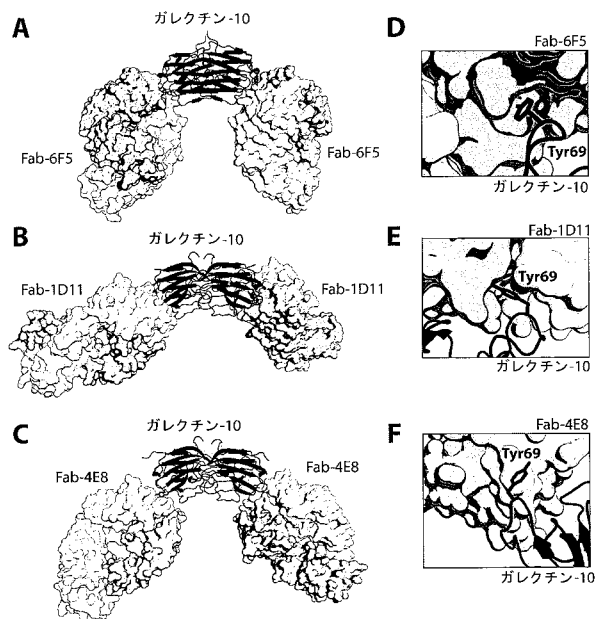
【図 9 B】

図9(続 き)



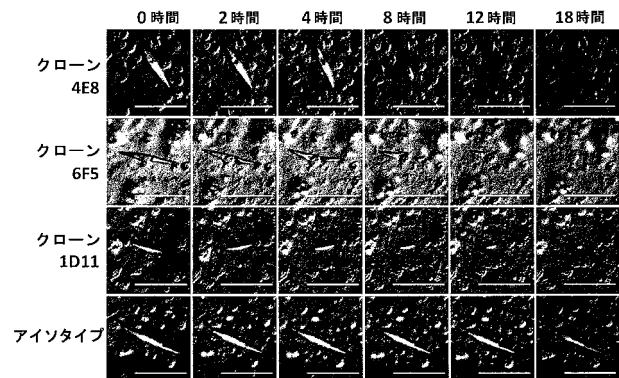
【図 10】

図 10



【図 11】

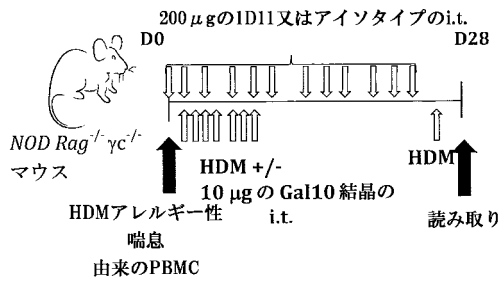
図 11



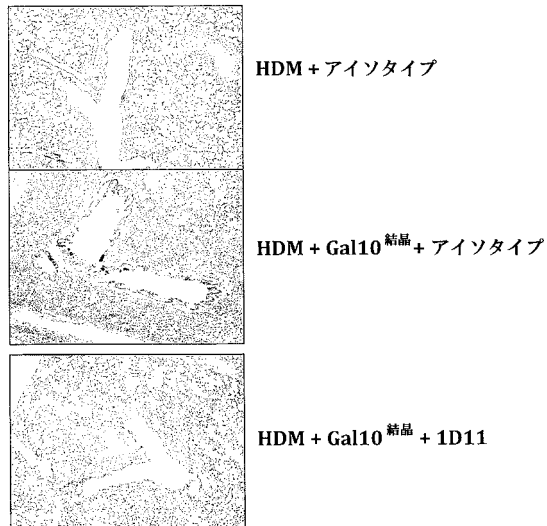
【図 1 2 A - B】

図 12

A



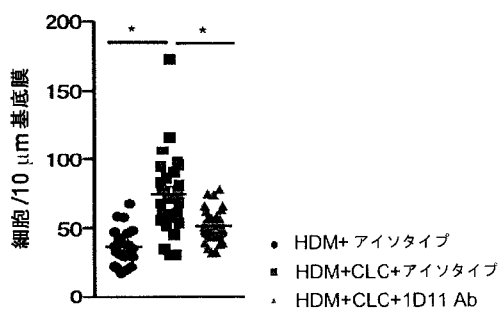
B



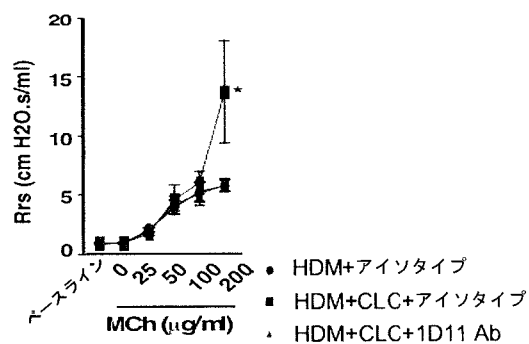
【図 1 2 E - F】

図 12 (続き)

E



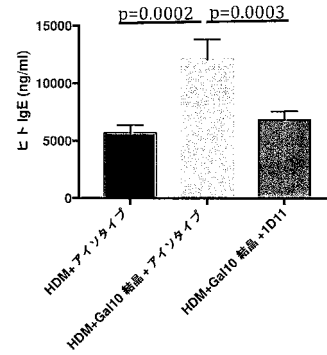
F



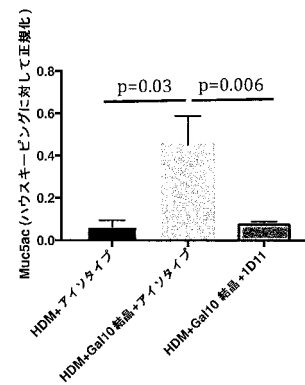
【図 1 2 C - D】

図 12 (続き)

C

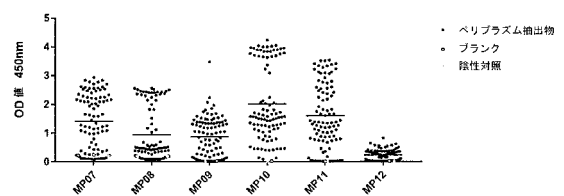
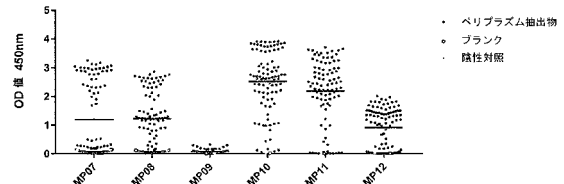
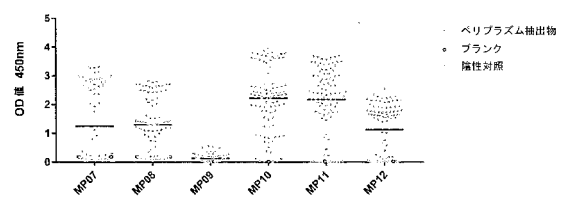


D



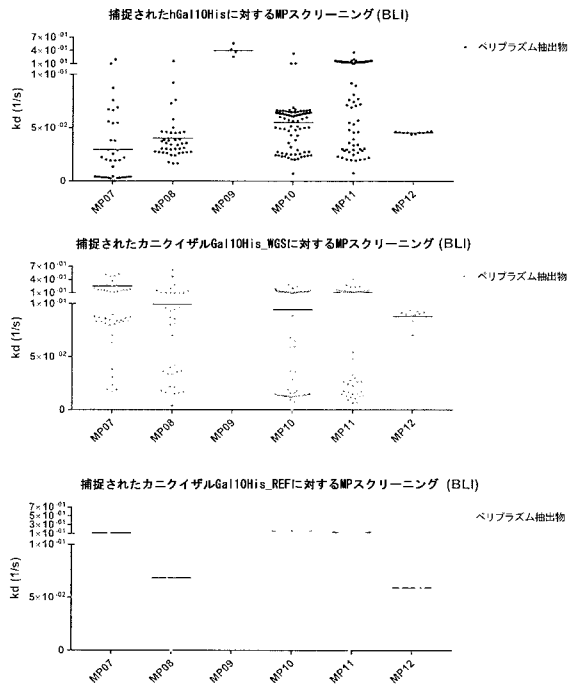
【図 1 3】

図 13

コーティングしたhGal10His (1 μ g/mL) に対するNPスクリーニングコーティングしたカニクイザルGal10His_WGS (1 μ g/mL) に対するNPスクリーニングコーティングしたカニクイザルGal10His_REF (1 μ g/mL) に対するNPスクリーニング

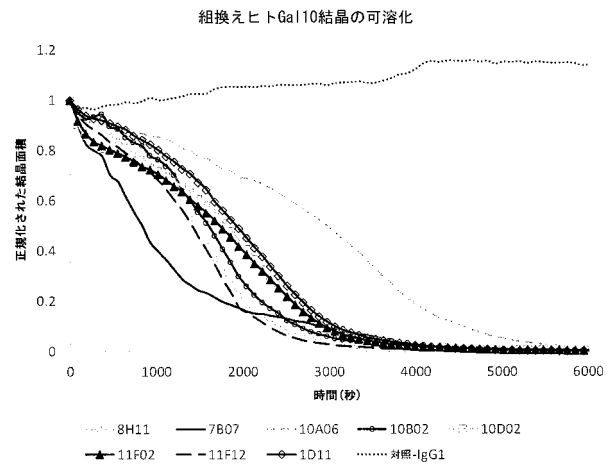
【図 14】

図 14



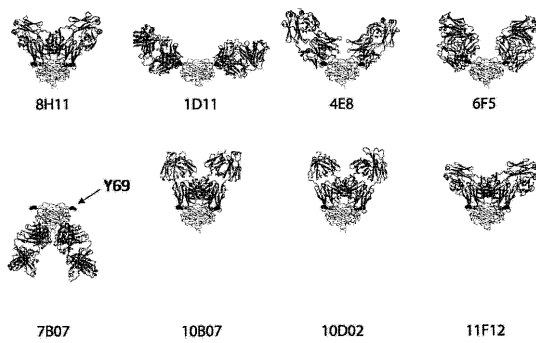
【図 15】

図 15



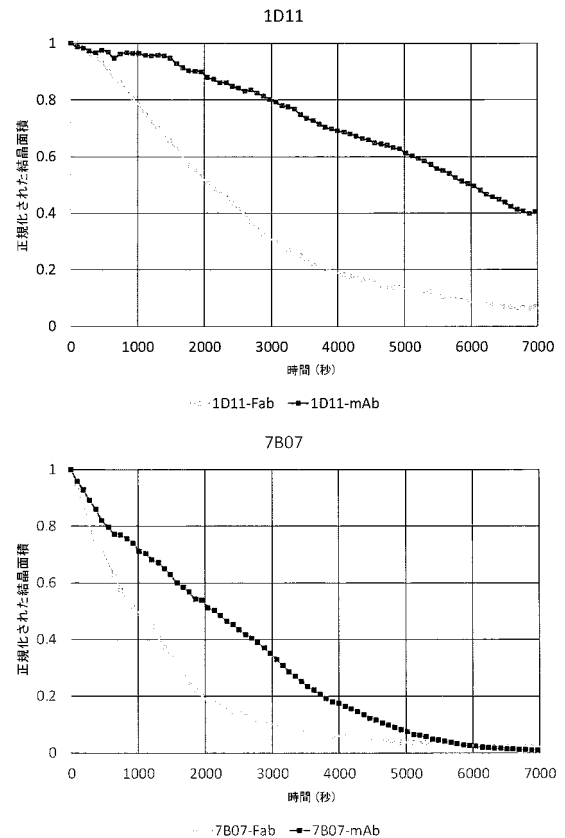
【図 16】

Fig. 16



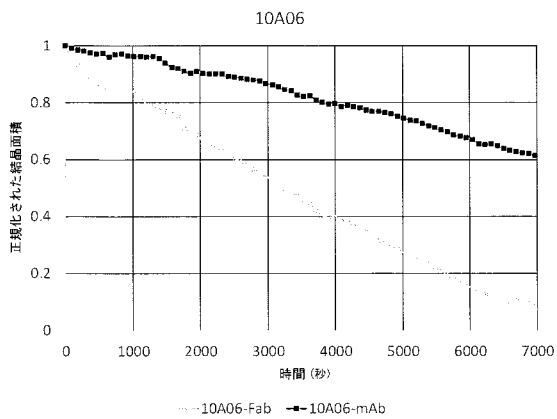
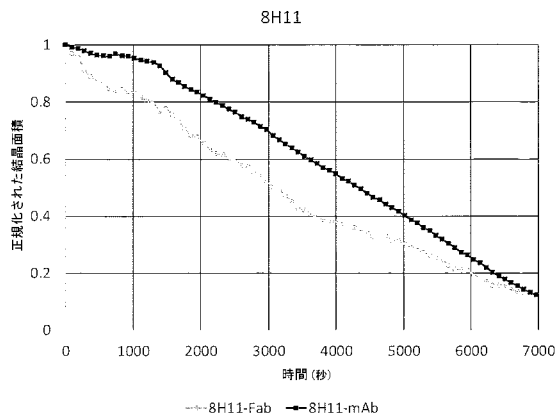
【図 17-1】

図 17



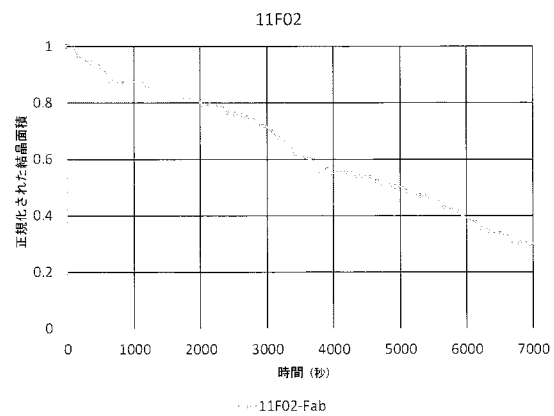
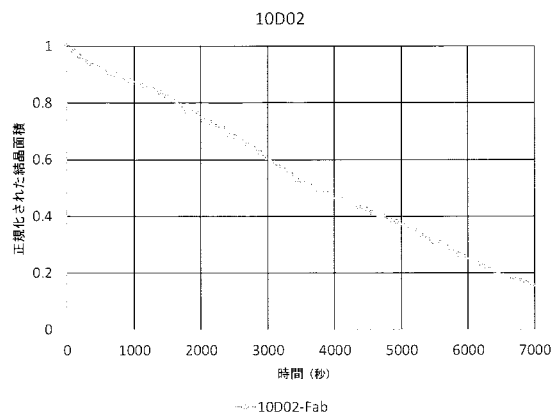
【図 17-2】

図17 続き



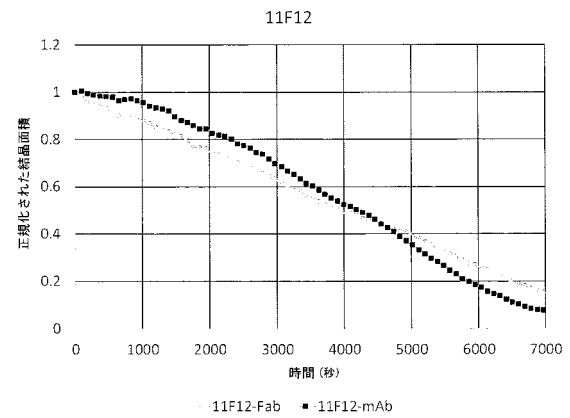
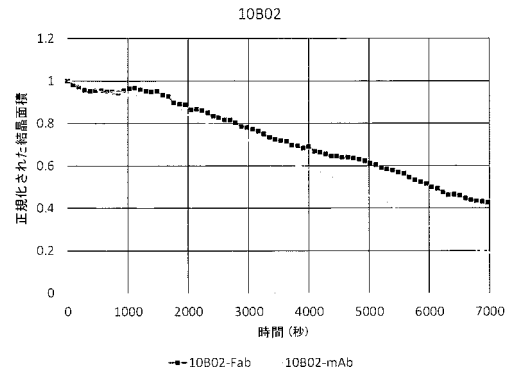
【図 17-4】

図17 続き



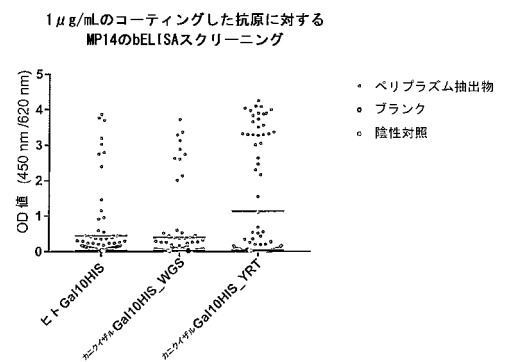
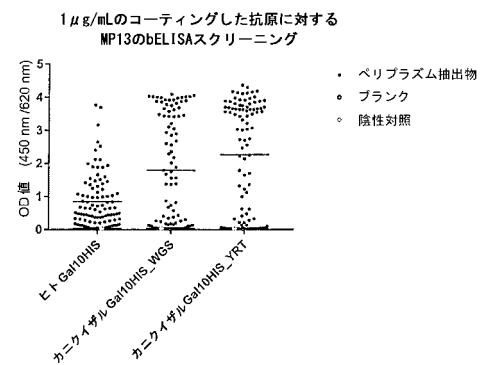
【図 17-3】

図17 続き



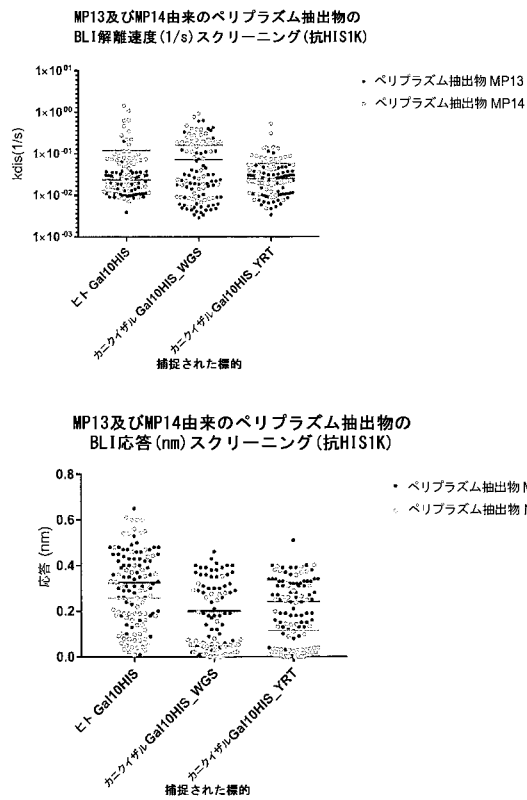
【図 18】

図18



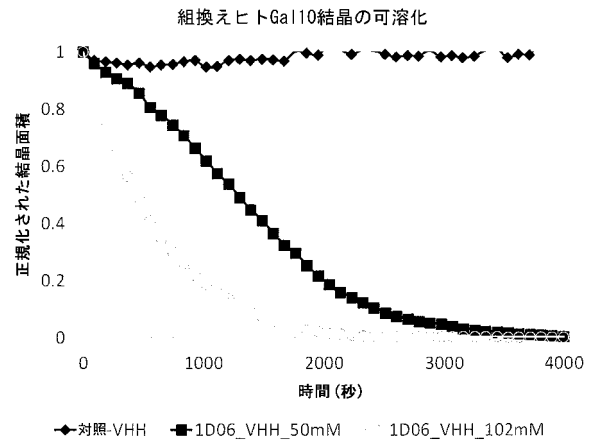
【図 19】

図 19



【図 20】

図 20



【手続補正書】

【提出日】 令和3年2月4日 (2021.2.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 配列表

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【配列表】

[2021520825000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/059570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61P11/00
ADD. A61K39/00

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)

C07K A61K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEVEN J. ACKERMAN ET AL: "Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin-10) Is Not a Dual Function Galectin with Lysophospholipase Activity but Binds a Lysophospholipase Inhibitor in a Novel Structural Fashion", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 17, 7 February 2002 (2002-02-07), pages 14859-14868, XP55594773, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M200221200 abstract -----	1-58
X	CN 106 645 752 A (XIANGYA HOSPITAL CENTRAL SOUTH UNIV) 10 May 2017 (2017-05-10) the whole document -----	1-58

☐ 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

"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

17 June 2019

Date of mailing of the international search report

01/07/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheffzyk, Irmgard

Information on patent family members

PCT/EP2019/059570

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 16/44 (2006.01)	C 0 7 K 16/44	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	C 1 2 N 15/62	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (71)出願人 514185611
ユニベルシテイト ゲント
UNIVERSITEIT GENT
ベルギー王国 ビー 9 0 0 0 ゲント、シントーピーテルスニーウストラート 2 5
Sint-Pietersnieuwstraat 25, B-9000 Gent, Belgium
- (74)代理人 100097456
弁理士 石川 徹
- (72)発明者 バート ランブレヒト
ベルギー 9 0 0 0 ヘント エードヴェルボンドカーイ 2 6 0
- (72)発明者 サバス サビデス
ベルギー 8 5 0 0 コルトリジク モリンネグード 9
- (72)発明者 ハミダ ハマド
ベルギー 9 6 0 0 ロンセ ドゥルヌムエール 1 6
- (72)発明者 ケネス ヴェルストラテ
ベルギー 9 0 0 0 ヘント モンテレイストラート 5 8
- (72)発明者 ジャン - ミッシェル ペルシエ
ベルギー 1 0 5 0 イクセル プールヴァード ヘネラル ジャック 3 0
- (72)発明者 クリストフヘ ブランチェット

- ベルギー 9070 デステルベークン ヴォルデルレーデ 49
(72)発明者 マイケル サウンダース
ベルギー 1190 ブリュッセル ジョンクシヨン 38
(72)発明者 ハンス デ ハード
オランダ 4436 エヌエー アウデランデ ティー ズウィント 1
(72)発明者 バス ヴァン デル ウォニング
ベルギー 9800 バフテ - マリア - レールネ デラ フェイルレドリーフ 9
(72)発明者 エマ ペルソン
ベルギー 8200 シント - アンドリエス アルベルト ディセリンクストラート 35
Fターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA17
4C085 AA13 BB31 BB33 BB36 CC22 DD61 EE01 GG01 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 FA74 GA26