

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7645544号
(P7645544)

(45)発行日 令和7年3月14日(2025.3.14)

(24)登録日 令和7年3月6日(2025.3.6)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
A 6 1 P	27/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	
請求項の数 15 (全73頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-514418(P2021-514418)	(73)特許権者	505211710	
(86)(22)出願日	令和1年9月16日(2019.9.16)		ユニバーシティ オブ アルスター	
(65)公表番号	特表2022-500455(P2022-500455 A)		英国 ビーティ 5 2 ・ 1 エスエイ、カウ	
(43)公表日	令和4年1月4日(2022.1.4)		ンティ・ロンドンデリー、コールレーン	
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/074744	(74)代理人	100114775	
(87)国際公開番号	WO2020/053446		弁理士 高岡 亮一	
(87)国際公開日	令和2年3月19日(2020.3.19)	(74)代理人	100121511	
審査請求日	令和4年9月13日(2022.9.13)		弁理士 小田 直	
(31)優先権主張番号	1815045.8	(74)代理人	100202751	
(32)優先日	平成30年9月14日(2018.9.14)		弁理士 岩堀 明代	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(74)代理人	100208580	
			弁理士 三好 玲奈	
		(74)代理人	100191086	
			弁理士 高橋 香元	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L - 1 R 1 および N L P R 3 標的化二重特異性抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

I L - 1 R 1 および N L R P 3 の両方に結合できる N L R P 3 インフラマソーム調節物質を含む、炎症性眼疾患の治療または予防における使用のための組成物であって、
前記調節物質が、I L - 1 R 1 および N L R P 3 の両方に結合できる二重特異性抗体、または I L - 1 R 1 および N L R P 3 の両方に結合できる抗体フラグメントであり、
前記二重特異性抗体が、I L - 1 R 1 に結合できる第1の抗体の相補性決定領域 (C D R) および N L R P 3 に結合できる第2の抗体の C D R を含み、
前記第1の抗体の重鎖 C D R が、C D R 1 : G Y P F T T A G (配列番号60) ; C D R 2 : M N T Q S E V P (配列番号61) ; および C D R 3 : A K S V Y F N W R Y F D V (配列番号62) を含み、かつ前記第1の抗体の軽鎖 C D R が、C D R 1 : Q S I S D Y (配列番号63) ; C D R 2 : Y A S ; および C D R 3 : Q H G H S F P L T (配列番号64) を含み、
前記第2の抗体の重鎖 C D R が、C D R 1 : G F T F S D Y Y (配列番号65) ; C D R 2 : I S D G G T Y T (配列番号66) ; および C D R 3 : A R G W V S T M V K L L S S F P Y (配列番号67) を含み、かつ前記第2の抗体の軽鎖 C D R が、C D R 1 : T G A V T T S N Y (配列番号68) ; C D R 2 : G T N ; および C D R 3 : A L W Y S N Y W V (配列番号69) を含み、
前記炎症性眼疾患が緑内障である、
組成物。

【請求項 2】

前記調節物質が、NLRP3のPYDドメインに結合することもできる、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記調節物質が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、融合タンパク質、またはアプタマー分子、これらの組み合わせ、およびこれらそれぞれのフラグメントを含む群から選択される、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記調節物質が、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できる組換えヒト化二重特異性抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記第1および／または第2の抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

前記抗体フラグメントが、Fab、Fv、Fab'、(Fab')₂、scFv、bis-scFv、ミニボディ、Fab₂、およびFab₃の1個または複数から選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記調節物質が、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できる組換えヒト化抗体または抗体フラグメントから選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記調節物質が、IL-1R1およびNLRP3の両方から選択される1種または複数の抗原に対し産生された抗体または抗体フラグメントである、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記調節物質は、NLRP3およびIL-1R1から選択される1種または複数の抗原に対して産生された抗体または抗体フラグメントである、請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 10】

IL-1R1が、配列：

MKVLRLICFIALLISSLEADKCKEREEKIILVSSANEID
VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFPVPAKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAQAIFFKQKLPVAGDGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDCKPLLLDNIHFSGVKDRILVMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVGTGLSDIAYWKWNGSVIDEEDDPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFACKNTHGI
DAAYIQLIYPVTNFKKLEGGPSVFIFFPPNIKDVLMI SLTP
KVTCVVVDVSEDDPDVQISWFFVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STIRVVSHLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDI
SVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKW
EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTTISRSPGK* (配列番号1)

を含むIL-1R1の細胞外ドメイン（以下、IL-1R1免疫原）を含む、請求項8または9に記載の組成物。

【請求項 11】

NLRP3が、KLH-EDYPPQKGCIPLRGQTEKADHVD (配列番号30)を含む、請求項8または9に記載の組成物。

【請求項 12】

前記調節物質は、配列：

MKVLRLICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEID
VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAQAIFFKQKLPVAGDGGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDCCKPLLLDNIHFSGVKDRILVMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFACKNTHGI
DAAYIQLIYPVTNFKLEGGPSVFIFFPPNIKDVLMISSLTP
KVTCVVVDVSEDDPDVQISWFFVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STIRVVSHLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDI
SVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKW
EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTTISRSPGK* (配列番号1)

を含むIL-1R1免疫原に対して産生された第1の抗体の相補性決定領域(CDR)、および

配列：

KLH-ヒドラジド-Ahx-EDYPPQKGCIPLRGQTEKADHVD (配列番号30)

を含むNLRP3免疫原に対して産生された第2の抗体のCDR

を含む二重特異性抗体である、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項13】

前記二重特異性抗体が、アミノ酸配列：

MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVS
LSCRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSIGIPS
RFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSIFFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC** (配列番号57)

を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

前記二重特異性抗体が、アミノ酸配列：

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGYPFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINN LKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVT VSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGS
SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL
YTLSSSVTVTSTSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMISSLSPI
VTCVVVDVSEDDPDVQISWFFVNNVEVHTAQTQTHREDYNS
TLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK
PKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLT CMVTD FMPEDIY
VEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV
ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGSAGGSGGDSE
VQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTP
EKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN AKNNLYL
QMNSLKSEDTAMYYCARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGT LVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQESALTTSPGETVTLTC

RSSTGAVTTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA
RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIFYFCALWYSNYWVFGG
GTKLTVLGQPK** (配列番号59)

を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

前記二重特異性抗体が、アミノ酸配列：

MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSL
LSCRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSI SGIPS
RFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCF LNNFY
PKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC** (配列番
号57)

10

および

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGYPFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINN LKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVT VSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGS
SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL
YTLSSSVTVTSTSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSP
VTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNS
TLRVVSA LPIQH QDWM SGEFKCKVNNKDL PAPIERTISK
PKGSVRAPQVYVLPPEEEEMTKKQVTLT CMVTD FMPEDIY
VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWV
ERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGSAGGSGGDSE
VQLVESGGGLVKPGGSLKLS CAASGFTFSDYYMYWVRQTP
EKRL EWVATI SDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN AKNNLYL
QMNSLKSEDTAMYYCARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGT LVT
VSAGGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQESALTTSPGETVTLTC
RSSTGAVTTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA
RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIFYFCALWYSNYWVFGG
GTKLTVLGQPK** (配列番号59)

20

30

を有する、

請求項1～14のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、NLRP3インフラマソーム経路の調節物質、特に抗体およびそのフラグメントならびにアプタマー分子（タンパク質または他の細胞内標的に結合可能な二次および三次構造体を形成できる小型RNA／DNA分子）に関し、これらのそれぞれは、NLRP3インフラマソームのメンバーに結合特異性を有する。特に、本発明は、NLRP3インフラマソームシグナル伝達および活性化により媒介される炎症性疾患、特に、緑内障などの炎症性眼疾患の治療または予防のための、このような抗体およびアプタマー、およびそれらのフラグメントの使用にまで及ぶ。

40

【背景技術】

【0002】

病原体関連分子パターン（PAMP）および損傷関連分子パターン（DAMP）を含む刺激物質を含む多岐にわたる炎症を認識する一群のタンパク質複合体である。種々のインフラマソーム複合体が知られており、特に、NLRP3は、LPS、細菌毒素、ダスト、

50

A T Pなどのストレスシグナル、結晶化および粒子状物質、コレステロール結晶、酸化L D L、アミロイドベータ、プリオンタンパク質線維および原線維 α シヌクレイン、剪断応力、圧力などのN L R P 3を活性化する様々なシグナルのために、最も研究されているインフラマソームである。

【0003】

N L R P 3（ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン（N A C H T））、ロイシンリッチリピート（L R R）ドメイン、およびピリンドメイン含有タンパク質3インフラマソームは、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、炎症性眼疾患、ドライアイ症候群、緑内障、加齢黄斑変性などの他の眼疾患、うつ、アルツハイマー病、パーキンソン病、炎症性腸疾患、関節リウマチなどの関節炎状態、加齢、皮膚科学的状態および癌を含む多くの感染性疾患および極めて多くの変性炎症性型疾患に結びつけられている。

10

【0004】

N L R P 3タンパク質の主要な役割は、危険信号または異物を検知し、次に炎症促進性サイトカインI L - 1 β の分泌を活性化するカスパーゼ1にそのシグナルを中継することであり、その後、I L - 1 β は身体を保護するために炎症を開始する。I L - 1 β は、炎症過程における中心的役割のために、全てのサイトカイン中で最も研究されている。I L - 1 β を活性化することは身体にとって有用であるが、多くの疾患で、この炎症が制御されなくなり、疾患の病因となることがある。今日まで、ほとんどの治療戦略は、炎症を抑制するためにI L - 1 β に対抗する治療薬の開発に注力されてきたが、我々がここで提案するように、このサイトカインの上流制御装置、すなわち、N L R P 3インフラマソームを標的化することには多くの利点が存在する。

20

【0005】

活性化の機序はまだ十分には理解されていないが、インフラマソームを介したI L - 1 β のプロセッシングは、2つの経路を伴うことが示された。第一に、N F κ B経路は、トール様受容体（T L R）および／またはC D 3 6受容体を介してD A M PまたはP A M Pにより活性化される。これは、プロ型のI L - 1 β およびN L R P 3の転写および発現をもたらす。

【0006】

また、A T PなどのD A M Pによるプリン受容体刺激が細胞内のカルシウムの増大および細胞膨潤を引き起こし、これが、細胞からのカリウム流出、リソソーム不安定化、膜易透化、ミトコンドリア損傷および続いて生じる活性酸素種の生成をもたらし、N L R P 3活性化に繋がる、第2のシグナルも必要であると考えられる。他の研究は、酸化型L D Lコレステロールは実際に、其れ自体、N L R P 3活性化に必要な2つのシグナルとして機能できることが示された。全ての研究で、カリウム流出が、N L R P 3活性化の唯一の共通因子であるように思われる。

30

【0007】

N L R P 3タンパク質はその後、ピリンドメインの同型相互作用を介してA S C（アポトーシス関連スペック様タンパク質）と相互作用する。A S Cはその後、プロカスパーゼ1と相互作用し、カスパーゼ1の切断および活性化を生じ、これが次に、プロI L - 1 β をその活性型に切断する。I L - 1 β はその後、切断されて、生物学的に活性な分泌型を産生する。

40

【0008】

今日のインフラマソーム関連障害のための最良の治療は、インフラマソーム活動の主要産物であるI L - 1 β を標的にしている。過去20年間で、多くの抗I L - 1 β 治療薬が開発されてきた。しかし、抗I L - 1 β 治療薬にはいくつかの欠点がある。全ての抗サイトカイン薬に関し、日和見主義的生物ならびに日常的細菌感染症に対する宿主防御が主要な懸念になってきた。理由は、これらの感染症の無痛性で危険な性質のためである。抗I L - 1 β 治療薬は、悪心、好中球増加症および有害アレルギー反応などの他の副作用がある。

【0009】

50

IL-1 β 治療薬に勝る抗 NLRP3 療法のいくつかの利点は、以下の通りである：
NLRP3 は、nod 様受容体であるので、疾患の根本原因の認識、すなわち、異物／危険物質の認識は、応答の抑制に比べて、有利であり得る。

これは、IL-1 β が、疾患特異的刺激物質、例えば、酸化型 LDL、 β アミロイドまたは α シヌクレインまたは特定の病原体により活性化される NLRP3 経路を介して分泌されないことを意味するであろう。しかし、IL-1 β 活性化に關与する他の経路がないために、IL-1 β は、それでも、極限状態（大規模または日和見感染症など）で必要とされる他の非疾患関連刺激物質に応答して他の経路を介して活性化され得る。

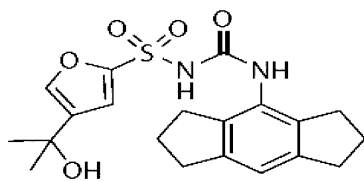
【0010】

インフラマソームは、特殊な形の細胞死、ピロネクロシス（カスパーゼ 1 とは独立）およびパイロトーシスに関連付けられており、これらは、悪化した炎症の場合に起こり得る。従って、抗 NLRP3 療法はまた、このような死経路を減らし、これは、アテローム性動脈硬化症などの特定の疾患の病因に關与することが立証された。パイロトーシスは、酸化型 LDL に反応する、この疾患のプラーク破綻のリスク因子である。

【0011】

いくつかの以前に特徴付けられた小分子阻害剤は、NLRP3 インフラマソーム機能にも影響を与えることが最近示された。スルホニルウレア薬物であるグリブリドは、このような阻害剤の一例である。MCC950（以下に示す）は、具体的な NLRP3 インフラマソームの小分子阻害剤の別の例である。

【化1】



【0012】

しかし、現在利用可能な阻害剤にはいくつかの問題がある。実際に、これらの現在利用可能なインフラマソーム機能の阻害剤の多くは、臨床的に成功しておらず、非特異的であり、重要な点は、極めて短い半減期であることである。

【0013】

ヒト化抗体型治療薬の開発は、NLRP3 インフラマソーム用の小分子阻害剤より多くの利点があることが明らかになるであろう。

小分子阻害剤に勝るヒト化抗体のいくつかの利点は次の通りである：

- ・ヒト免疫系による非認識。
- ・循環中で非ヒト抗体よりも長い半減期。
- ・小分子阻害剤より高い特異性。
- ・これまで小分子薬物を逃れてきた難易度の高い標的との相互作用。この最良の例は、わずかな荷電ポケットを有する大きく、多くの場合平らな表面を特徴とするタンパク質-タンパク質相互作用である。
- ・最も多く臨床試験に入る mAb であるキメラおよびヒト化 mAb は、特に腫瘍学の分野で、小分子薬（5%）を含む新規化学物質（NCE）より高い認証成功率（それぞれ、18% および 24%）を有する。

・生物製剤の商業化の可能性は極めて有望である。処方薬および非処方箋薬の総販売高中の生物製剤のシェアは、2004 年の 12% から 2011 年の 19% に拡大した。さらに興味深いのは、生物学的製剤は、2004 年の医薬品売上高のトップ 100 中の 17% を占め、2011 年には、34% を占めた。世界の生物製剤市場は、2025 年までに、ほぼ 40 億ドルに達すると推定されている。

- ・生物製剤は、小分子薬物より良好な全体的経済的利益をもたらすと思われる。
- ・研究はまた、生物製剤の損耗率は、小分子よりも小さいことを示している。小分子薬

10

20

30

40

50

物の 7.1%の成功率に過ぎないのに比較して、前臨床試験に入る生物製剤の 24.4%が最終的に市販される。

・生物製剤は、開発の全ての段階で小分子より良好な性能を示し、2相で驚くべき 116%の成功率であった。

【0014】

NLRP3 (NALP3 およびクリオピリンとしても知られている) は、細胞質タンパク質であり、従って、このタンパク質を標的にするために、いずれの治療薬も、細胞に入る必要がある。ヒト化抗体は、サイズが極めて大きく、サイトゾルへ入るのは困難であることがわかるであろう。小型抗体フラグメントの開発はまた、このような課題を克服する可能性を提示し、この場合、抗体フラグメントは Fab フラグメントであってよく、これは、抗体の抗原結合フラグメント、またはペプチドリンカーにより結合された抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の融合タンパク質である、単鎖可変フラグメントである。以下でさらに考察されるように、本発明者らは、追加の戦略を考案し、治療抗体またはアプタマーおよびそれらのフラグメントが細胞中に入ることができるのを確実にした。

10

【0015】

種々の薬剤を用いて NLRP3 インフラマソームまたは関連分子の標的化を記載する分野でいくつかの報告がある。例えば、WO2013/007763A1 は、アクネの予防／治療方法で使用するための細胞内局在化および NLRP3 を含むインフラマソーム群のメンバーへの細胞質ゾル結合可能な阻害剤を開示している。

20

【0016】

米国特許出願公開第 20080008652A1 号は、特に、クリオピリン (NLRP3) シグナル伝達の調節を介して、免疫応答およびアジュバント活性を調節する方法および組成物を開示している。クリオピリン調節タンパク質、またはクリオピリンシグナル経路成分を標的とするヒト化抗体が言及され、クリオピリン抗体を作製する方法が開示される。

【0017】

WO2002026780A2 は、PAAD ドメイン含有ポリペプチドに結合する抗体、ならびに抗 PAAD 抗体を投与することによる炎症を含む種々の病態を治療する方法を開示している。単鎖抗体、キメラ、二官能性、ヒト化抗体、ならびにその抗原結合フラグメントも言及される。

30

【0018】

WO2011109459A2 は、ASC または NLRP1 などの哺乳動物インフラマソームの成分に特異的に結合する少なくとも 1 種の抗体を含む組成物を提供することにより、皮膚／毛髪の炎症性疾患を治療する方法を開示している。ASC および NLRP1 に対する市販の抗体が言及されている。

【0019】

EP2350315B1 は、NLRP3、ASC および／またはカスパーゼ 1 の発現レベルの測定を含む、アテローム性動脈硬化症の早期診断のための方法およびキットを開示している。発現レベルは、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体および Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv および scFv を含む抗体フラグメントなどの抗体を含む方法により測定され得る。

40

【0020】

WO2013119673A1 は、NLRP1 (NALP-1)、ASC、およびカスパーゼ 1 などの少なくとも 1 種のインフラマソームタンパク質のレベルを測定することを含む、CNS 傷害を有すると疑われる患者を評価する方法を開示している。NLRP1、ASC およびカスパーゼ 1 に対する市販の抗体が言及されている。

【0021】

WO2007077042A1 は、NALP3 インフラマソーム阻害剤の投与を含む、痛風または偽痛風の治療方法を開示している。NALP3 インフラマソーム阻害剤は、NALP3 インフラマソームの下流で作用するとして記載され、IL-1 の活性を阻害する

50

抗体中から選択される。

【0022】

WO2013138795A1は、Surf+透過性ポリペプチドおよび細胞内標的に結合する抗体または抗体模倣部分(AAM部分)を含む融合タンパク質を開示し、融合タンパク質は細胞中に侵入し、細胞内標的に結合し、標的と細胞内の別のタンパク質との間の結合を阻害する。

【0023】

本発明は、NLRP3インフラマソームシグナル伝達および活性化により媒介される炎症性疾患、特に、緑内障などの炎症性眼疾患の治療および予防のための、NLRP3インフラマソームの新規で有効な調節物質を提供する。このような調節物質には、IL-1R1およびNLRP3の両方を標的とする二重抗体(biantibody)またはアプタマー、それらのフラグメントを含む。二重抗体は、最初に、急速な内部移行を誘発するIL-1R1に結合することにより細胞に入り、一旦内部移行すると、二重抗体は次に細胞内タンパク質NLRP3を標的として、NLRP3インフラマソームの構築を阻害し、次に、細胞からのIL-1 β 分泌を妨害して、炎症の開始/増幅を低減させる。

【発明の概要】

【0024】

従って、本発明の第1の態様では、炎症性眼疾患の治療または予防での使用のために、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できるNLRP3インフラマソーム調節物質が提供される。

【0025】

任意選択で、炎症性眼疾患は、緑内障である。

【0026】

任意選択で、調節物質はまた、NLRP3のPYDドメインに結合することもできる。

【0027】

任意選択で、調節物質は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、融合タンパク質、またはアプタマー分子、これらの組み合わせ、およびこれらそれぞれのフラグメントを含む群から選択される。

【0028】

調節物質は、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できる二重抗体であってもよい。任意選択で、調節物質は、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できる組換えヒト化二重抗体である。

【0029】

任意選択で、調節物質は、IL-1R1に結合できる第1の抗体の1個または複数の結合領域およびNLRP3に結合できる第2の抗体の1個または複数の結合領域を含む二重抗体である任意選択で、調節物質は、IL-1R1に結合できる第1の抗体の1個または複数の相補性決定領域(CDR)およびNLRP3に結合できる第2の抗体の1個または複数のCDRを含む二重抗体である。任意選択で、第1および/または第2の抗体はモノクローナル抗体である。

【0030】

任意選択で、調節物質は、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できる抗体フラグメントから選択される。任意選択で、抗体フラグメントは、Fab、Fv、Fab'、(Fab')₂、scFv、ビスcFv、ミニボディ、Fab₂、およびFab₃の1個または複数から選択される。

【0031】

任意選択で、調節物質は、IL-1R1およびNLRP3の両方に結合できる組換えヒト化抗体または抗体フラグメントから選択される。

【0032】

任意選択で、調節物質は、IL-1R1およびNLRP3の両方から選択される1種または複数の抗原に対して産生された抗体または抗体フラグメントである。任意選択で、調

10

20

30

40

50

節物質は、IL-1R1およびNLRP3の両方の全部または一部から選択される1種または複数の抗原に対して産生される。任意選択で、調節物質は、NLRP3、任意選択で、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などの担体タンパク質に結合したNLRP3（以下、NLRP3免疫原）、およびIL-1R1、任意選択で、組換えIL-1R1から選択される1種または複数の抗原に対して産生される。

【0033】

任意選択で、IL-1R1の細胞外ドメイン（以下、IL-1R1免疫原）は、下記配列を含む：

MKVLRLICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEID
VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAAQAIKQKLPVAGDGGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDCKPLLLDNIHFSGVKDRILVMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVGTGQLSDIAYWKWNGSVIDEEDDPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFACKNTHGI
DAAYIQLIYPVTNFQKLEGGPSVFIFFPPNIKDVLMSLTP
KVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYN
STIRVVSHLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDI
SVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGSGSYFIYSKLNMKTSKW
EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK*（配列番号1）。

（*または**は、本明細書全体を通して停止コドンの意味する）。

【0034】

任意選択で、NLRP3の免疫原は、下記配列を含む：

EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD（配列番号30）。

【0035】

任意選択で、NLRP3免疫原は、任意選択で、配列EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD（配列番号30）のN末端に結合した、配列EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD（配列番号30）に結合した担体タンパク質を含む。

【0036】

ペプチドに結合した担体タンパク質は、ペプチドがより強力な免疫応答を生成するのを支援することが当該技術分野において既知である。任意選択で、担体タンパク質はKLHである。

【0037】

任意選択で、担体タンパク質は、リンカーを介して配列EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD（配列番号30）に結合され、任意選択で、リンカーはヒドラジド-Ahxである。

【0038】

任意選択で、NLRP3の免疫原は、KLH-ヒドラジド-Ahx-EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD（配列番号30）である。

【0039】

当該技術分野において理解されているように、ヒドラジドは、4個の置換基を有し、それらの少なくとも1個がアシル基である、窒素-窒素共有結合を特徴とする有機化合物の部類である。Ahxは、6炭素直鎖アミノヘキサン酸リンカーを意味する。

【0040】

任意選択で、調節物質は産生可能であり、任意選択で、NLRP3免疫原およびIL-1R1免疫原から選択される1種または複数の免疫原に対し産生され、IL-1R1免疫原は配列：

MKVLRLICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEID

VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAQAIFKQKLPVAGDGGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDCKPLLLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFACKNTHGI
DAAYIQLIYPVTNFKLEGGPSVFIFPPNIKDVLMIISLTP
KVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STIRVVSHLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDI
SVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKW
EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK* (配列番号1)

(*は、停止コドンを意味する)

を含み、NLRP3の免疫原は、配列：

KLH-ヒドラジド-Ahx-EDYPPQKGCIPLRGQTEKADHVD (配列番号30)を含む。

【0041】

任意選択で、調節物質は、産生可能であり、任意選択で、IL-1R1免疫原に対し産生され、配列：

MKVLRLICFIALLISSLEADKCKEREEKIILVSSANEID
VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAQAIFKQKLPVAGDGGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDCKPLLLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFACKNTHGI
DAAYIQLIYPVTNFKLEGGPSVFIFPPNIKDVLMIISLTP
KVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STIRVVSHLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDI
SVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKW
EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK* (配列番号1)、

(*は、停止コドンを意味する)

を含む第1の抗体の1個または複数の結合領域、および配列：

KLH-ヒドラジド-Ahx-EDYPPQKGCIPLRGQTEKADHVD (配列番号30)を含むNLRP3免疫原に対して産生された第2の抗体の1個または複数の結合領域を含む二重抗体である。

【0042】

任意選択で、調節物質は、産生可能であり、任意選択で、IL-1R1免疫原に対し産生され、配列：

MKVLRLICFIALLISSLEADKCKEREEKIILVSSANEID
VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAQAIFKQKLPVAGDGGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDCKPLLLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFACKNTHGI

DAAYIQLIYPVTNFKLEGGPSVFIFPPNIKDVLMSLT
KVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQT
THREDYNSTIRVVSHLP IQHQDWM SGEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVG
FNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSK
LNMKTSKW EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK* (配列番号1)、
(*は、停止コドンを意味する)

を含む第1の抗体の1個または複数の相補性決定領域(CDR)および配列:

KLH-ヒドラジド-Ahx-EDYPPQKGCIP LPRGQTEKADHVD (配列番号30)を含むNLRP3免疫原に対して産生された第2の抗体の1個または複数のCDRを含む二重抗体である。

10

【0043】

任意選択で、第1および/または第2の抗体はモノクローナル抗体である。

【0044】

任意選択で、第1の抗体(IL-1R1に対する)の重鎖のコンセンサス配列は、

【化2】

MGWVWNLPLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTTAGLQWVQKMSGKGL
KWIGWMNTQSEVPKYAEFEKGRIFSLTAASTAYLQINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVW
GAGTTVTVSSAKTTPPPVYPLA (SEQ ID NO: 7).

20

である。

【0045】

任意選択で、第1の抗体の重鎖CDRは、

【化3】

GYPFTTAG (SEQ ID NO: 60);

MNTQSEVP (SEQ ID NO: 61); and AKSVYFNWRYFDV (SEQ ID NO: 62)

を含む。

30

【0046】

任意選択で、第1の抗体(IL-1R1に対する)の軽鎖のコンセンサス配列は、

【化4】

MRSPAQFLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSDYLSWYQQRSHESPR
LIIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK (SEQ ID NO: 12).

である。

【0047】

任意選択で、第1の抗体の軽鎖CDRは、

【化5】

QSDY (SEQ ID NO: 63); YAS; and

QHGHFSFPLT (SEQ ID NO: 64)

40

を含む。

【0048】

任意選択で、第2の抗体(NLRP3に対する)の重鎖のコンセンサス配列は、

50

【化 6】

MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRL
EWWATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANNLYLQMNLSKSEDTAMYYCARGWVSTMVKLLSS
FPYWGGQGLTVTSAAKTTPPSVYPLA (SEQ ID NO: 36).

である。

【0049】

任意選択で、第2の抗体の重鎖CDRは、

【化 7】

GFTFSDYY (SEQ ID NO: 65);
ISDGGTYT (SEQ ID NO: 66); and ARGWVSTMVKLLSSFPY (SEQ ID NO: 67)

10

を含む。

【0050】

任意選択で、第2の抗体（NLRP3に対する）の軽鎖のコンセンサス配列は、

【化 8】

MAWISLLLLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTG
LIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKS
SPSVTLFPPSTEELSL (SEQ ID NO: 43).

20

である。

【0051】

任意選択で、第2の抗体の軽鎖CDRは、

【化 9】

TGAVTTSNY (SEQ ID NO: 68);
GTN; and ALWYSNYWV (SEQ ID NO: 69).

30

を含む。

【0052】

任意選択で、調節物質は、IL-1R1およびNLRP3に同時に結合できる。任意選択で、または追加して、調節物質は、IL-1R1およびNLRP3に逐次的に結合できる。

【0053】

任意選択で、本発明の二重特異性抗体の軽鎖は、下記アミノ酸配列を有する：

MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVS
LSCRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIP S
RFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVG VY CQHGH SFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC** (配列番
号57)。

40

【0054】

任意選択で、本発明の二重特異性抗体の重鎖は、下記アミノ酸配列を有する：

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQIQLVQSGPELRKPGETVRI SCKAS
GYPFTTAGLQWVQKMSGKGLKWI GWMNTQSEVPKYAEEFK
GRIAFSLETAASTAYLQINN LKTEDTATYFCAKSVYFNWR
YFDVWGAGTTVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTL

50

GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTTLSS
SSVTVTSSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIK
PCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCV
VVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRV
VSALPIQHGDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS
VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTTCMVTD FMPEDIYVEWT
NNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS
YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGSAGGSGGDSEVQLV
ESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTTFSDYYMYWVRQTPEKRL
EWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMNS
LKSEDTAMY YCARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGT LVTVSAG
GGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSST
GAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSG
SLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKL
TVLGPQPK** (配列番号59)。

【0055】

IL-1R1およびNLRP3の両方に「同時に結合」は、前記IL-1R1および／またはNLRP3が複合体として形成される場合であっても、またはそれらが複合体として形成されない場合であっても、調節物質がIL-1R1および／またはNLRP3のそれぞれに結合できることを意味する。

【0056】

第2の態様では、本発明は、上述のようにNLRP3インフラマソームが病因において重要な役割を果たすことが知られている炎症関連障害、任意選択で、本発明の第1の態様に記載の緑内障などの炎症性眼疾患の治療または予防での使用のために、本発明の第1の態様と関連して、本明細書で定義のNLRP3インフラマソーム調節物質を提供する。

【0057】

調節物質としての二重特異性抗体の利点は、単一抗体より低い、従って、より少ない毒性の濃度で使用でき、それにより、細胞傷害性の可能性を低減できるということである。二重特異的であることにより、より安定で、より純度の高い抗体を可能にする。

【0058】

生物学的であることにより、より長い半減期を有し、従って、小分子阻害剤に勝る大きな利点を与える。

【0059】

第3の態様では、本発明は、炎症関連障害、任意選択で、緑内障などの炎症性眼疾患の治療および／または予防方法を提供し、該方法は、次のステップを含む：

本発明の第1の態様に関連して本明細書で定義の、NLRP3インフラマソームの活性化および／またはシグナル伝達を抑制する治療有効量のNLRP3インフラマソーム調節物質を用意するステップ、および

このような治療を必要とする対象に、治療有効量の前記化合物を投与するステップ。

【0060】

第4の態様では、本発明は、炎症関連障害、任意選択で緑内障などの炎症性眼疾患の治療のための薬物の調製における、本発明の第1の態様と関連して、本明細書で定義のNLRP3インフラマソーム調節物質の使用を提供する。

【0061】

第5の態様では、本発明は、対象の炎症関連障害、任意選択で、緑内障などの炎症性眼疾患の少なくとも1つの症状を低減または防止または治療するための方法を提供し、該方法は、本発明の第1の態様と関連して、本明細書で定義のNLRP3インフラマソーム調節物質の使用によりインフラマソーム経路の活性化を選択的に阻害および／または低減することを含む。

【0062】

任意選択で、調節物質は、対象の炎症関連障害の少なくとも1つの症状の治療または予防に使用されるためのものであり、該方法は、第1の態様および第2の態様の調節物質の使用によりインフラマソーム経路の活性化を選択的に阻害および／または低減することを含む。

【0063】

任意選択で、二重特異性抗体の軽鎖は、配列番号57のアミノ酸配列を有し、二重特異性抗体の重鎖は、配列番号59のアミノ酸配列を有し、本明細書においては、Inf l a M a bまたはInf l a m a bと呼ばれ得る。

【0064】

任意選択で、Inf l a M a bは、限定されないが、アテローム性動脈硬化症などの全身状態の疾患修飾作用を有し得、それにより、炎症を防止／抑制し、従って、プラーク蓄積および／またはプラーク破裂を防止し、その結果、心筋梗塞のリスクを減らす。

10

【0065】

任意選択で、Inf l a M a bは、限定されないが、緑内障などの眼疾患の疾患修飾作用を有し得、それにより、炎症を防止し／抑制し、眼圧を下げ、および／または網膜神経節細胞および軸索の損失を防止し、視神経を保護し、視力を保護し、および／または失明を防ぐ。

【0066】

任意選択で、Inf l a M a bは、限定されないが、アルツハイマー病などの神経学的状態の疾患修飾作用を有し得、それにより、炎症を防止／抑制し、アミロイドプラーク沈着を低減／抑制し、および／または認知障害を防止する。

20

【0067】

本明細書で定義の第1態様および第2の態様の調節物質は、炎症に関連する多疾病罹患または併存症の個体で有用であり得る。

【0068】

任意選択で、上述の本発明の態様のいずれかの、Inf l a M a bとして表示される調節物質は、軽鎖の2つの対および重鎖の2つの対から構成され、N末端に融合されたs c F vドメインを有し、ジスルフィド結合を介して一緒に複合体化された、210キロダルトン(k D a)の二重特異的マウス抗体である。

【0069】

本明細書で使用される場合、「炎症関連障害」は、限定されないが、アテローム性動脈硬化症；加齢黄斑変性、ドライアイ症候群、緑内障、シェーグレン症候群、糖尿病、炎症性眼疾患などの炎症性眼状態、うつ、アルツハイマー病、パーキンソン病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、加齢、皮膚科学的状態および癌が挙げられる。

30

【0070】

任意選択で、対象はヒトなどの哺乳動物である。

【0071】

用語の「抗体」は、必要とされる特異性を有する結合ドメインを有する任意の結合メンバーまたは物質と解釈されるべきである。本発明の抗体は、モノクローナル抗体、またはそのフラグメント、機能的等価物またはホモログであり得る。この用語は、天然または全合成または部分合成であるかどうかに関わらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む。従って、別のポリペプチドに融合された免疫グロブリン結合ドメイン、または等価物を含むキメラ分子が包含される。

40

【0072】

全抗体のフラグメントは、抗原結合の機能を実行できる。このような結合フラグメントの例は、V L、V H、C LおよびC H 1抗体ドメインを含むF a bフラグメント；単一抗体のV LおよびV HドメインからなるF vフラグメント；F (a b ') 2フラグメント；2個の結合F a bフラグメントを含む二価のフラグメント；単鎖F v分子(s c F v)、この場合、V HドメインおよびV Lドメインは、2つのドメインが合体して抗原結合部位を形成可能とするペプチドリinkerにより結合される；または遺伝子融合により構築される

50

多価性のまたは多重特異性フラグメントであり得る二重または三重特異性抗体である。

【0073】

本発明で使用するための抗体またはポリペプチドのフラグメントは通常、少なくとも5～7個の連続アミノ酸、多くの場合、少なくとも約7～9個の連続アミノ酸、典型的には、少なくとも約9～13個の連続アミノ酸、より好ましくは、少なくとも約20～30個の連続アミノ酸および最も好ましくは、少なくとも約30～40またはそれ超の連続アミノ酸の一続きのアミノ酸残基を意味する。

【0074】

用語の「抗体」は、「ヒト化」されている抗体を含む。ヒト化抗体を作製する方法は、当技術分野において既知である。

【0075】

アプタマーは、特異的標的分子に結合するペプチド分子である。アプタマーは、小分子と生物製剤との間の範囲にある。それらは、サイズ、合成のし易さおよび変更の観点で、抗体治療薬に対して、大きな利点を示す。

【0076】

本明細書に記載の調節物質は、ELISAなどのアッセイで使用して、ヒト血液または組織試料からNLRP3を検出可能である。従って、さらなる態様では、本発明は、本発明の第1の態様の1種または複数の調節物質を含むキットを提供する。任意選択で、キットは、前記キットの使用のための説明書をさらに含む。任意選択で、キットは、ヒト細胞中の、血液または組織試料中のNLRP3を検出するためのものである。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】IL-1R1 FCの、4～20%変性、還元および非還元SDS-PAGE分析を示す。分子量マーカーは、キロダルトンで示される。

【図2】UUC IL-1Rに対する1回目の採取血のスクリーニングを示すグラフである。

【図3】UUC IL-1Rに対する2回目の採取血のスクリーニングを示すグラフである。

【図4】融合スクリーニング後の結果を示すグラフである。

【図5】1回目のプロトクローン24ウェルスクリーニングのグラフである。

【図6】LD1スクリーニング結果のグラフである。

【図7】24ウェルプレートスクリーニング結果のグラフである。

【図8】F237 5D1-1A8からの最終選択ハイブリドーマのグラフである。

【図9】F237 5D1-1A8最終24ウェルスクリーニングからの最終選択ハイブリドーマのグラフである。

【図10】THP1細胞中へのIL-1R1内部移行の免疫蛍光法画像である。LPSおよびATPで処理してIL-1R1の発現を誘導したTHP1マクロファージから取得した蛍光顕微鏡画像である。

【図11-1】THP1細胞中へのIL-1R1内部移行のフローサイトメトリーの図である。

【図11-2】THP1細胞中へのIL-1R1内部移行のフローサイトメトリーの図である。

【図12】Ig可変ドメインプライマーのいくつかの組み合わせを用いたPCRの結果を示す。

【図13】CDRループの図式表現である。（参考文献：Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) PMID: 12477501）。

【図14】CDRループの図式表現である（Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) PMID: 12477501）。

10

20

30

40

50

【図15】NLRP3の構造を示す図である。Bergsbaken, T. ; Fink, S. L. ; Cookson, B. T. (2009). "Pyroptosis: Host cell death and inflammation". *Nature Reviews Microbiology*. 7 (2) : 99-109. doi:10.1038/nrmicro2070. PMC 2910423. PMID 19148178. および Dagenais, M. ; Skelton, A. ; Saleh, M. (2011). "The inflammasome: In memory of Dr. Jurg Tschopp". *Cell Death and Differentiation*. 19 (1) : 5-12. doi:10.1038/cdd.2011.159. PMC 3252823. PMID 22075986. <http://jonliefmd.com/blog/cellular-intelligence-blog/inflammasomes-are-large-complex-signaling-platforms>

【図16】CLUSTAL0 (1.2.4)を用いたヒトおよびマウスNALP (NLRP) タンパク質のC末端ドメインのコンセンサス配列の配列アラインメントの図である。

【図17】Protean 3Dバージョン14.0.1を用いて二次構造的な特徴を示すNLRP3 PDB:3QF2に整列させたペプチドFUS_746_001 (黄色)のNovafold予測構造の図である。

【図18】高レベルのNLRP3 mAbを発現した免疫化マウスのグラフである。

【図19】UUC NLRP3に対する1回目の採取血のスクリーニングを示すグラフである。

【図20】UUC NLRP3に対する2回目の採取血のスクリーニングを示すグラフである。

【図21】融合スクリーニング後の結果を示すグラフである。

【図22】1回目のプロトクローン24ウェルスクリーニングのグラフである。

【図23】LD1スクリーニング結果のグラフである。

【図24】24ウェルプレートスクリーニング結果のグラフである。

【図25】F226からの最終選択ハイブリドーマのグラフである。

【図26】ドットプロット分析の結果を示す図である。

【図27】ウエスタンブロット分析の結果を示す図である。

【図28】Ig可変ドメインプライマーのいくつかの組み合わせを用いたPCRの結果を示す。

【図29】CDRループの図式表現である (Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003) PMID: 12477501)。

【図30】CDRループの図式表現である (Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003) PMID: 12477501)。

【図31】InflaMabの二重特異性設計およびプラスミドマップを示す図である。

【図32】InflaMabの4~20% SDS-PAGE分析の結果を示す図である。分子量マーカーは、キロダルトンで示される。

【図33】InflaMabはIL-1 β 放出を防止する。(注記、「Ulster Ab」は、「InflaMab」および「二重特異的Ab」と同義である)。

【図34】InflamabはTHP1細胞中のカスパーゼ1の活性化を防止する。

【図35】Inflamabの内部移行を示す図である。

【図36】マウスおよびヒトONH注のNLRP3の構成的発現を示す図である。

【図37】ヒトONHの星状膠細胞中の構成的NLRP3発現を示す図である。

【図38】マイクロビーズ注射の7日後に、ONH中のNLRP3インフラマソームの構築は、炎症メディエータの誘導と同時に起こることを示す。

【図39】炎症メディエータの早期誘導およびONH中のIba1+細胞の蓄積は、インフラマソーム欠損 (ASC KO) マウス中で抑止されることを示す。

10

20

30

40

50

【図40】マイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルにおいて、ASCおよびNLRP3は、IOP誘導軸索変性およびRGCの細胞死に必要であることを示す。

【図41】緑内障のマイクロビーズモデルにおいて、NLRP3小分子阻害剤のMCC950は、RGCの細胞死を防止することを示す。

【図42】緑内障のマイクロビーズモデルにおいて、Inf l a M a bは、RGCの細胞死を防止することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0078】

特定の使用または治療方法では、本発明の調節物質、例えば、二重特異性抗体は、下記を含むステップに従って作用する：

1. 抗体の細胞中への内部移行および侵入を可能とするために、二重特異性抗体をIL-1R1に対し標的化するステップ。

2. NLRP3インフラマソーム構築およびそれに続く細胞からのIL-1 β 放出を阻害し、その結果、炎症を減らすために、抗体をNLRP3に対し標的化するステップ。

3. IL-1R1の内部移行を誘発し、その結果、IL-1 β 結合のために利用可能なIL-1R1を少なくし、炎症の可能性および増幅をさらに抑制させるために、抗体をIL-1R1に対し標的化するステップ。

【0079】

本発明の第1の態様のこのような調節物質は、驚くべきことに、NLRP3タンパク質部分だけではなく、全体としてインフラマソームに対する追加の抑制効果をもたらし、従って、インフラマソーム関連疾患のより効果的な阻害剤を提供することになる。

【0080】

実施例

- ・IL-1R1 Fc融合体の一過性発現（実施例1）
- ・IL-1R1に対するモノクローナル抗体の生成（実施例2）
- ・IL-1R1モノクローナル抗体配列決定結果報告（実施例3）
- ・NLRP3ペプチド合成（実施例4）
- ・NLRP3に対するモノクローナル抗体の生成（実施例5）
- ・NLRP3モノクローナル抗体配列決定結果報告（実施例6）
- ・Inf l a M a bデザイン（実施例7）
- ・Inf l a M a b一過性発現（実施例8）
- ・アテローム性動脈硬化症／冠動脈疾患のためのInf l a M a b（実施例9）

【0081】

実施例1：IL-1R1 Fc融合体の一過性発現

IL-1R1 Fcを一過性に発現させ、HEK293細胞中で精製した。精製タンパク質のサイズおよび純度をSDS PAGEにより評価し、エンドトキシンレベルを検査した。最終的に、タンパク質の活性をELISAを用いて評価した。

【0082】

インターロイキン-1受容体（IL-1R1）Fc融合タンパク質をコードする哺乳動物発現ベクターをHEK293細胞中に遺伝子導入した。その後、標準的クロマトグラフィー技術を用いて、発現したFc融合タンパク質を細胞培養上清から精製した。精製生成物の濃度および純度を決定した。

【0083】

HEK293細胞の一過性遺伝子導入およびタンパク質の精製

IL-1R1 Fcのアミノ酸配列をコードするDNA（実施例1A参照）を合成し、哺乳動物一過性発現プラスミドpD2610-v1（DNA2.0）に挿入した。IL-1R1 Fcを、HEK293細胞ベース一過性発現を用いて発現させ、得られた抗体含有細胞培養上清を遠心分離および濾過により清澄化した。Protein A親和性クロマトグラフィーを介して、細胞培養上清から2ロットのIL-1R1 Fcを精製した（AKTAクロマトグラフィー装置を使用）。精製されたタンパク質は、リン酸緩衝食塩水中

10

20

30

40

50

に透析／緩衝液交換された。組換えタンパク質の純度は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルにより判定され、>95%であると決定された（図1）。タンパク質濃度は、吸光度を測定することにより決定された（1.0mg/ml=1.37のA280）。精製生成物の詳細は、表1にまとめられている。

図1は、IL-1R1 Fcの、4~20%変性、還元および非還元SDS-PAGE分析を示す。分子量マーカーは、キロダルトンで示される。レーンは次の通りである：

【表1】

レーン番号	試料	ロット	量 (μg)	条件
1	Blue plus 2 (Thermo Fisher)を 参照	-	-	還元
2	IL-1R1 Fc	1	-	還元
3	ブランク	-	-	NA
4	IL-1R1 Fc	2	-	還元

10

【表2】

表1：精製のまとめ：IL-1R1 Fc

試料	ロット	濃度 (mg/ml)	体積 (ml)	合計 (mg)	純度	エンドトキシン (EU/mg)
IL-1R1 Fc	1	0.64	1.6	1.02	>95%	ND
IL-1R1 Fc	2	0.95	1.4	1.33	>95%	ND

20

略語は次記の通り；ND、測定せず。

【0084】

実施例1A：IL-1R1 Fcアミノ酸配列

MKVLRLRICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEID
VRPCPLNPNEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEK
LWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL
CYNAQAIFKQKLPVAGDGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQW
YKDKKPLLLDNIHFSGVKDRLI VMNVAEKHRGNYTCHASY
TYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDL
GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDED DPVLGEDYYS
VENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFAKNTHGI
DAAYIQLIYPVTNFKLEGGPSVFIFPPNIKDVL MISTLP
KVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STIRVVSHLPIQH QDWM SGEFKCKVNNKDLPSP IERTIS
KPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVG FNP GDI
SVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLN MKTSKW
EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK*（配列番号1）

30

40

【0085】

実施例2：IL-1R1に対するモノクローナル抗体の生成

このプロジェクトの目的は、IL-1R1に対するモノクローナル抗体を生成することである。5匹のマウス集団に免疫し、陽性免疫応答に関しスクリーニングされた。融合に好適する候補の選定後、脾細胞をパートナー細胞と融合して、ハイブリドーマ集団を産生した。この集団は、一連の限界希釈およびスクリーニングアッセイを受けて、完全なモノクローナル細胞株を産生した。

【0086】

50

細胞株命名法

産物名「F 2 3 7 5 D 1 - 1 A 8 - 2 A 5」は、10種の選択したモノクローナルハイブリドーマ細胞株の1つを指す。名称は、各段階での産生経路を記述する要素からなる。融合後スクリーニングおよび各限界希釈から選択された各ハイブリドーマは、ハイブリドーマが選択されたプレート番号およびプレート上のウェル位置に相当する番号が付与される（すなわち、5 D 1 - 1 A 8 - 2 A 5）。この命名法は、それぞれ個別のハイブリドーマの由来を追跡し、スクリーニング過程の明確な区別を可能とする。

【0087】

【表3】

略語

Ab	抗体
DMSO	ジメチルスルホキシド
FCS	ウシ胎仔血清
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
RT	室温
OD	光学密度
PBST	リン酸塩緩衝生理食塩水+1%ツイーン20
PBS	リン酸塩緩衝生理食塩水
RPM	1分当たりの回転数
NP, LP, RP, LRP, 2LP	マウス識別表示：パンチなし、左パンチ、右パンチ、左／右パンチ、2左パンチ
HAT	ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンサプリメント
HATR 培地 ¹	2% Roche (HFCS), 2% HAT, 1% Pen/Strep, 1% L-グルタミン補充DMEM
SFM	無血清培地
PEG	ポリエチレングリコール
GAM-HRP	ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ
HT	ヒポキサンチンおよびチミジン
LD1	第1の限界希釈
LD2	第2の限界希釈

¹ これは、融合およびスクリーニング後に全ての培養物に使用された培地である。

【0088】

材料

10

20

30

40

50

【表 4】

試薬および培地

試薬	供給業者	カタログ番号
Ｌ-グルタミン	Gibco	25030-024
HAT サプリメント	Gibco	21060-017
HFCS	Roche	11363735001
DMEM Glutamax	Gibco	61965-059
ペニシリン/ストレプトマイシン	Gibco	15140-122
FCS	Gibco	16000.044
DMSO	シグマ	D2650
トリパンブルー	シグマ	T8154
PEG	シグマ	10783641001
フロイント完全アジュバント	シグマ	F5881
フロイント不完全アジュバント	シグマ	F5506
炭酸水素ナトリウム	VWR	27778.260
炭酸ナトリウム	シグマ	S2127-500G
粉末ミルク	Marvel	オリジナル乾燥脱脂
ツイーン20 (10%)	シグマ	P1379-1L
GAM-HRP (Fc 特異的)	シグマ	A2554
TMB	Biopanda	TMB-S-002
Mr. Frosty	ナルゲン	55710-200

10

20

【表 5】

使い捨て部材

名称	供給業者	カタログ番号
25cm ² 静置フラスコ	コーニング	430639
75cm ² 静置フラスコ	コーニング	430641
無菌96ウェルプレート	コーニング	3595
無菌96ウェルプレートTPP	Primer Scientific	92696T
クライオバイアル	Fisher Scientific	366656
Maxi Sorb 96-ウェルプレート	Nunc	442404

30

40

【0089】

装置

- ・CO₂細胞培養静置インキュベーター (SANYO)
- ・プレートリーダー Sunrise (Tecan)
- ・Centurion Scientific K40R遠心分離機
- ・Grant-Bio Multishaker PSU 20

【0090】

方法

抗原調製

50

免疫原 (IL-1R1) が精製されると、これらの溶液を無菌 E F - P B S 中で $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、 $600 \mu\text{l}$ を免疫用に、および $150 \mu\text{l}$ を追加免疫および E L I S A スクリーニング用に分取した。これらの分割量を標識し、 -20°C で貯蔵した。

【0091】

免疫

5匹の B a l b C マウス集団に、 $200 \mu\text{l}$ の 1 : 1 のフロイント完全アジュバント (シグマ) および本明細書で調製した $600 \mu\text{l}$ の IL-1R1 乳剤を皮下に免疫した。1回目の免疫の2週間後に、この集団に、元の注射と同体積および濃度のフロイント不完全アジュバント (シグマ) のみを代わりに用いた2回目の注射により免疫した。2回目の免疫の1週間後に、マウスに耳パンチ (NP、RP、LP、LRP、2LP) により目印を付けて、予備的結果を得るために試験採取血を本明細書に記載のようにスクリーニングした。2回目の免疫の3週間後に、集団に2回目の注射と同じ方法で3回目の免疫を行った。3回目の免疫の1週間後に、試験採取血をスクリーニングし、その後、RPの耳標を有するマウスを融合のために選択した。

【0092】

試験採取血の E L I S A

尾部採取血を5匹の B a l b C マウス集団から取得し、 8000rpm 、室温で10分間の遠心分離を行った。各マウスから血清を収集し、スクリーニングと同じ日にプレートに加え、 -20°C で貯蔵した。このスクリーニングを融合に好適なマウスを選択するために2回実施した。

【0093】

スクリーニングの前日に、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IL-1R1 含有 50mM のナトリウムカーボネートコーティング緩衝液 ($\text{pH} 9.5$) の約 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ を加えることにより M a x i S o r p プレートをコートした。A P O - A 1 を同じコーティングバッファー中で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈することにより、別のコーティング溶液を調製した。2つのウェルに陽性および陰性の結果を示す各試料を添加することが可能なように、これらの溶液をプレートの交互の列に加えた。このプレートを 4°C の静止状態で一晩インキュベートした。

【0094】

翌朝、コーティングバッファーを除去し、 $200 \mu\text{l}/\text{well}$ のブロッキング溶液 ($4.0\% \text{w}/\text{v}$ のセミスキムミルク粉末、 $1 \times \text{PBS}$) を加え、 150rpm 、室温下で2時間攪拌した。プレートを PBS-T ($0.1\% \text{v}/\text{v}$ のツイーン20) で3回洗浄した。PBSを各ウェルに $100 \mu\text{l}/\text{well}$ で加え、 $1 \mu\text{l}$ の各試験採取血血清を各陽性および陰性ウェルに加えた。プレートを 150rpm (G r a n t S h a k e r) で2時間、室温でインキュベートした。その後、これらの試料を取り出し、 PBS-T で4回洗浄した。1 : 5000 希釈 G A M - H R P (シグマ、UK) の $100 \mu\text{l}/\text{well}$ を加え、プレートを 150rpm で攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。二次抗体を除去し、プレートを PBS-T で4回、PBS中で1回洗浄した。 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ の T M B 基質溶液を加え、 37°C で10分間インキュベートした。ウェル当り $50 \mu\text{l}$ の 1M H C l を加え、直ちにプレートを T e c a n S u n r i s e プレートリーダーを用いて 450nm で読み取った。

【0095】

第2の試験採取血 E L I S A スクリーニング後に、RPの耳標を有するマウスを最大の陽性免疫応答を発現することにより、融合用として選択した。

【0096】

追加免疫注射

3回目、最終免疫の1週間後に、追加免疫注射を、 $100 \mu\text{l}$ の $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の分取 IL-1R1 を、アジュバントなしで B a l b C マウス RP に投与した。

【0097】

融合 F 2 3 7

融合の1週間前に、S P 2 細胞を液体窒素から取り出し、 $1\% \text{Pen}/\text{Strep}$ 、1

10

20

30

40

50

% L-グルタミンを補充した10% FCS DMEM中で、3 x 12 mlのT75フラスコが融合を行う日に75%~90%の集密的になるまで継代培養した。融合の日に、フラスコをタッピングすることによりSP2細胞を取り出し、1000 rpm、37℃で5分間遠心分離した。細胞を20 mlのSFM DMEMに再懸濁し、再度遠心分離し、10 mlのSFM DMEMに再懸濁した。SP2細胞をSFM中のステリリンチューブ中に37℃、6% CO₂下で必要になるまで貯蔵した。

【0098】

安楽死後、最強の免疫応答を示したマウスから脾臓を無菌で取り出した。脾細胞を脾臓の両端を穿孔することにより細いゲージの注射針で抽出し、10~15 mlのSFM DMEMでフラッシングした。脾細胞をステリリンチューブに移し、37℃、1300 rpmで5分の遠心分離により20 mlの無血清DMEMで2回洗浄し、穏やかに上清を除去した。脾細胞をステリリンチューブ中の10 mlの無血清DMEMに再懸濁した。

【0099】

37℃で貯蔵したSP2細胞を用いて、SP2細胞を脾細胞に添加した。このSP2/脾細胞培養物を37℃、1300 rpmで5分間遠心分離した。上清を廃棄後、1 mlのPEGをSP2/脾細胞培養物に滴加し、その間、3分間にわたり連続的に攪拌した。1 mlのSFM DMEMを融合混合物に加え、4分間攪拌した。10 mlのSFM DMEMを新しい培養物に添加し、37℃の水浴中で5分間インキュベートした。その後、この細胞を37℃、1000 rpmで5分間遠心分離した。ペレットを200 mlのHATR培地中に再懸濁し、200 µl/ウェルで10 x 96ウェル培養プレートに播種し、これを、スクリーニングの前に、6% CO₂下、37℃で11日間インキュベートした。

【0100】

融合後スクリーニングおよびLD後スクリーニング

融合の11日後、プロトクローンをELISAでスクリーニングした。20 x Maxi Sorp 96ウェルプレートを、1 µg/mlのAPO-A1を用いて特異性の陰性対照として本明細書に記載のようにコートした。コーティング溶液を除去し、本明細書に記載のようにプレートをブロックした。160 µlの上清を10個の融合プレート、限界希釈プレート、または24ウェルプレートの各ウェルから取り出し、50 µlの1 x PBS含有の新しい96ウェル培養プレートに移すことにより、試料を調製した。ブロッキングの2時間後に、ブロッキング溶液を取り除き、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。各希釈プレートからの試料を100 µl/ウェルの濃度で、コーティング抗原の特異性を説明するために、各希釈プレートからELISAプレートの2列毎に1列に添加することにより、ELISAプレートに加えた。ELISA毎に2つのウェルを陰性対照としての100 µlの1 x PBSと共にインキュベートした。これらの試料を150 rpmで2時間、室温でインキュベートした。

【0101】

限界希釈

24ウェルプレート中でハイブリドーマ集団が増殖され、十分に成長すると、二次スクリーニングを実施し、限界希釈のラウンドで最も特異的で、最も高産生性集団を選択した。

【0102】

両方の限界希釈を1~3プロトクローンに対し、それぞれ、2~4 x 96ウェルプレートに、200 µl培養液/ウェル中の1細胞/ウェルで播種することにより実施した24ウェルプレート中の各培養物を計数することにより、プレートを調製し、中間希釈として、10 xに希釈し、その後、40 ml中の200細胞に希釈した。培養物を200 µl/ウェルで播種し、ウェルが80%~90%集密的になるまで、37℃、6% CO₂で7~10日間、インキュベートさせた。両方の限界希釈の各ウェルを本明細書に記載のようにELISAによりスクリーニングした。

【0103】

最終クローン選択

第2の限界希釈後に、10種のクローンを24ウェルプレート中での増殖により選択し

た。各クローンを、各ウェルが80%~90%集密的になるまで、37℃、6%CO₂で6日間増殖させた。クローンが24ウェルプレート中で十分に確立されると、各クローンの1ml/ウェルを、凍結保存のために、5mlの新しい10%HATR DMEMを含むT25フラスコに移した。

【0104】

モノクローナル細胞株の凍結保存

クローンがT25フラスコ中で十分に確立されると(80%~90%集密度)、各5mlの培養物を1000rpm、37℃で5分間遠心分離し、1mlの新しい10%DMEM HATR培地中に再懸濁した。各1mlの培養物を1:1比率のFCS/DMSOの300μlを含むクライオバイアルに移した。このバイアルを密閉し、Mr. Frosty 10

【0105】

配列決定のための細胞調製

クローンF237 5D1-1A8-2A5から産生した抗IL-1R1を配列決定のために選択した。T25フラスコ中で培養物が集密的になると、上清を廃棄した。2mlの新しい培地中への細胞の掻き取りにより細胞を取り出し、7,600rpm、室温で5分間遠心分離した。その後、上清を廃棄し、ペレットを液体窒素中で急速冷凍し、mRNA抽出の準備ができるまで-70℃中に置いた。

【0106】

免疫および試験採取血のスクリーニング

マウスのコロニーをIL-1R1免疫原(社内でCHO細胞中で産生)で免疫し、定期的な試験採取血を11週の期間にわたり取得した。ELISAを使って、試験採取血をIL-1R1 mAb発現レベルに関しスクリーニングし、pHrodo蛍光アッセイを用いて内部移行能力に関しスクリーニングした(Thermo Fisher Scientific, UK <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P35369> and <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m4280?lang=en®ion=GB>)。20

【0107】

結果

試験採取血1

2回目免疫の1週間後に、尾部採取血をそれぞれ5匹のマウスから取得し、産生されたポリクローナル抗体の融合に好適な動物および相対的特異度の決定のために、IL-1RおよびAPO-A1に対しスクリーニングした(図2参照)。

【0108】

試験採取血2

尾部採取血からの血清のスクリーニング後に、RP耳標を有するマウスが、最良の免疫応答を示したために、その脾細胞の融合パートナーSP2培養物との融合のために選択された(図3参照)。

【0109】

融合後スクリーニング

各プレートのウェルが70%~80%の集密度に達すると、ELISAにより、IL-1R1およびAPO-A1に対しプレートをスクリーニングした。最高の応答を生成するハイブリドーマ集団を24ウェルプレート中の増殖により選択した(図4参照)。

【0110】

1回目の24ウェルプレートスクリーニング

クローンが、融合後スクリーニングから選択され、増殖とそれに続く、限界希釈の第1のラウンドに対し好適なプロトクローンを決定する二次スクリーニングのために24ウェルプレート中に整列された(図5参照)。

【0111】

10

20

30

40

50

限界希釈法 1 スクリーニング

1 回目の限界希釈プレートが集密的になると、E L I S A により、I L - 1 R 1 および A P O - A 1 に対し限界希釈がスクリーニングされた。11 種のハイブリドーマ集団が、最も高く、最も特異的応答を示した、F 2 3 7 2 H 1 2、F 2 3 7 5 D 1、および F 2 3 7 7 E 6 から選択された（図 6 参照）。

【0112】

2 回目の 24 ウェルプレートスクリーニング

クローンが 24 ウェルプレート中で集密的になると、各クローンは、I L - 1 R 1 および A P O - A 1 に対して E L I S A によりスクリーニングされた。F 2 3 7 - 5 D 1 - 1 A 8 が、4 x 96 ウェルプレートに全体にわたり 2 回目のラウンドの限界希釈に対し選

10

【0113】

限界希釈 2 スクリーニング

各プレートのウェルが 70%~80% の集密度に達すると、E L I S A により、I L - 1 R 1 および A P O - A 1 に対しプレートをスクリーニングした。最高の応答および最大の特異性を生成するハイブリドーマ集団を 24 ウェルプレート中の増殖および凍結保存のために選択した（図 8 参照）。

T H P 1 細胞中への I L - 1 R 1 の内部移行を免疫蛍光法により画像化した。

L P S および A T P で処理して I L - 1 R 1 の発現を誘導した T H P 1 マクロファージから取得した蛍光顕微鏡画像である（図 10 参照）。I L - 1 R 1 に対する試験抗体を含むいくつかの異なるマウス由来のマウス血清と共に細胞をインキュベートし、これを p H r o d o（商標）色素（細胞内で蛍光を発する唯一の色素）に結合した。強力な I L - 1 R 1 免疫反応性が T H P 1 細胞の核および細胞質中で観察された。x 40 倍率での I L - 1 R 1 および D A P I 染色。対照細胞のみで処理された二次抗体では、染色は観察されなかった。画像は、2 つの異なる実験で使用された 4 つの異なるウェル由来である。融合ハイブリドーマおよびクローニング段階に進めるために、最良のマウスが選択された。

20

【0114】

T H P 1 マクロファージ（図 11 参照）は、L P S および A T P で処理され、I L - 1 R 1 の発現を誘導した。I L - 1 R 1 に対する試験モノクローナル抗体を含むいくつかのマウス由来のマウス血清と共に細胞をインキュベートし、これを p H r o d o（商標）色素（細胞内で蛍光を発する唯一の色素）に結合し、フローサイトメトリーで分析した。対照二次抗体のみで処理した細胞（i i）に比べて、I L - 1 R 1 抗体処理細胞（i）中でより多くの蛍光が観察された。このデータおよび図 3 からのデータを用いて、融合ハイブリドーマおよびクローニング段階に進めるために、最良のマウスが選択された。

30

【0115】

結論

このプロジェクトの目的は、I L - 1 R 1 に対する一連の抗体を産生することであった。マウスが免疫され、スクリーニングされると、R P が融合用として選択された。10 個のモノクローナルハイブリドーマ細胞株が 2 回のラウンドの限界希釈から産生された。各集団は、I L - 1 R 1 に対する最高の生成および最高の特異性により選択された。これらの最終的細胞株は、凍結されており、この細胞株により発現された抗体は、配列決定される。

40

【0116】

実施例 3：I L - 1 R 1 モノクローナル抗体配列決定

m R N A は、ハイブリドーマ細胞ペレットから抽出された。総 R N A は、従来の R N A 抽出プロトコルを用いてペレットから抽出された。細胞ペレットを R N A S T A T - 60 試薬を用いてホモジナイズした。クロロホルムの添加時に、ホモジネートは水相と有機相に分離し、総 R N A が水相に単離された。イソプロパノールを用いて R N A を沈殿させ、続けて、エタノール洗浄および水中への可溶化を行った。

【0117】

50

R T - P C R

オリゴ（d T）プライマーを用いて逆転写によりRNAからcDNAを生成した。PCR反応は、可変ドメインプライマーを用いて設定し、次のバンド（図12参照）を与えるモノクローナル抗体DNAのVHおよびVL領域の両方を増幅した

【0118】

VHおよびVL産物をInvitrogen配列決定ベクターpCR2.1に挿入し、TOP10細胞中に形質転換し、陽性形質転換体に対しPCRによりスクリーニングした。選択コロニーを採取し、ABI3130xI Genetic Analyzerで、DNA配列決定法により分析した。結果は下記に示す。

【0119】

配列決定結果

重鎖

V_Hアミノ酸配列アラインメント

10

20

30

40

50

【化 1 0】

		1		50
VH1.1	(1)	MEWSCVMLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
VH1.4	(1)	MECSCVMLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISRKASGYPFTT		
VH1.3	(1)	MGWSWVMLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
VH2.1	(1)	MGWVWNLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
VH2.5	(1)	MGWVWTLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
VH2.3	(1)	MGWVWNLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
VH1.2	(1)	MDWVWTLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
VH2.4	(1)	MDWLWNLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
コンセンサス	(1)	MGWVWNLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPFTT		
		51		100
VH1.1	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		10
VH1.4	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
VH1.3	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
VH2.1	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
VH2.5	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
VH2.3	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
VH1.2	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
VH2.4	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
コンセンサス	(51)	AGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYL		
		101		150
VH1.1	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		
VH1.4	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVEPL		
VH1.3	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		
VH2.1	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		
VH2.5	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		20
VH2.3	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		
VH1.2	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPL		
VH2.4	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		
コンセンサス	(101)	QINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPL		
		151		
VH1.1	(151)	A		
VH1.4	(151)	A		
VH1.3	(151)	A		
VH2.1	(151)	V		
VH2.5	(151)	V		
VH2.3	(151)	A		
VH1.2	(151)	A		
VH2.4	(151)	A		
コンセンサス	(151)	A		30

VH1. 1 (配列番号2)
 VH1. 4 (配列番号3)
 VH1. 3 (配列番号4)
 VH2. 1 (配列番号5)
 VH2. 5 (配列番号6)
 VH2. 3 (配列番号7)
 VH1. 2 (配列番号8)
 VH2. 4 (配列番号9)
 コンセンサス (配列番号7)

40

【0 1 2 0】

【化 1 1】

アミノ酸描影法の凡例：

黒字

非類似残基

シアン背景色で青字

所与の位置の残基ブロック由来のコンセンサス残基

緑背景色で黒字

コンセンサス残基に対する構造中の類似の残基または

コンセンサスが見つからない場合の相互に類似の残基

黄背景色で赤字

所与の位置の完全に保存された残基由来のコンセンサ

ス残基

緑字

所与の位置のコンセンサス残基に低い類似性の残基

V_Hコンセンサスアミノ酸配列：

10

【化 1 2】

MGWVWNLPLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRISCKASGYPTTAGLQWVQKMSGKGL
 KWIGWMNTQSEVPKYAEEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLTEDTATYFCAKSVYFNWRYFDVW
 GAGTTVTVSSAKTTPPPVYPLA (SEQ ID NO: 7)

可変ドメインは、太字で強調されている。

IMGTナンバリングシステムにより決定される相補性決定領域（CDR）には、下線を引いている（Lefranc, M. - P. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209 - 212 (1999)）（図13参照）。

20

【0 1 2 1】

図13のアミノ酸描影法の凡例：

青色網掛円は、抗体の大部分の疎水性である位置でのフレームワーク1～3中の疎水性（非極性）残基である。

黄色網掛円は、プロリン残基である。

四角は、CDRの開始および終了位置でキーとなる残基である。

フレームワーク中の赤色のアミノ酸は、構造的に保存されたアミノ酸である。

【0 1 2 2】

軽鎖

30

V_Lアミノ酸配列アラインメント：

40

50

【化 1 3】

		1	50	
VK1.1	(1)	MRAPAQFLGLLLLWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
VK1.5	(1)	MRAPQLLGLLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
VK1.3	(1)	MRSPAQFLGLLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
VK1.4	(1)	MRSPAQFLGLLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
VK2.1	(1)	MVSSAQFLGLLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
VK2.6	(1)	MVSTAQFLGLLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
コンセンサス	(1)	MRSPAQFLGLLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ	SIS	
		51	100	
VK1.1	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	SINSVEP
VK1.5	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	NINSVEP
VK1.3	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	SINSVEP
VK1.4	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	SINSVEP
VK2.1	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	SINSVEP
VK2.6	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	SINSVEP
コンセンサス	(51)	DYLSWYQQRSHESPRLI IKYASQ	SISGIPSRFSGSGSGSDFTL	SINSVEP
		101	150	
VK1.1	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
VK1.5	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
VK1.3	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
VK1.4	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
VK2.1	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
VK2.6	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
コンセンサス	(101)	EDVGVIYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT	VSIFPPSSEQLTSGGA	
		151	162	
VK1.1	(151)	SVVCFLNNFYPK		
VK1.5	(151)	SVVCFLNNFYPK		
VK1.3	(151)	SVVCFLNNFYPK		
VK1.4	(151)	SVVCFLNNFYPR		
VK2.1	(151)	SVVCFLNNFYPK		
VK2.6	(151)	SVVCFLNNFYPR		
コンセンサス	(151)	SVVCFLNNFYPK		

VK 1. 1 (配列番号 1 0)

VK 1. 5 (配列番号 1 1)

VK 1. 3 (配列番号 1 2)

VK 1. 4 (配列番号 1 3)

VK 2. 1 (配列番号 1 4)

VK 2. 6 (配列番号 1 5)

コンセンサス (配列番号 1 2)

【0 1 2 3】

【化 1 4】

アミノ酸描影法の凡例：

黒字

非類似残基

シアン背景色で青字

所与の位置の残基ブロック由来のコンセンサス残基

緑背景色で黒字

コンセンサス残基に対する構造中の類似の残基またはコンセ

ンサスが見つからない場合の相互に類似の残基

黄背景色で赤字

所与の位置の完全に保存された残基由来のコンセンサス残基

緑字

所与の位置のコンセンサス残基に低い類似性の残基

V_Lコンセンサスアミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化 15】

MRSPAQFLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSDYLSWYQQRSHESPRL
IIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQHGHSFPLTFGSGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK (SEQ ID NO: 12)

可変ドメインは、太字で強調されている。

IMGTナンバリングシステムにより決定される相補性決定領域 (CDR) には、下線を引いている (Le franc, M. - P. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212 (1999)) (図 14 参照)。

10

【0124】

図 14 のアミノ酸描影法の凡例：

青色網掛円は、抗体の大部分の疎水性である位置でのフレームワーク 1～3 中の疎水性 (非極性) 残基である。

黄色網掛円は、プロリン残基である。

四角は、CDR の開始および終了位置でキーとなる残基である。

フレームワーク中の赤色のアミノ酸は、構造的に保存されたアミノ酸である。

VH 配列決定結果：

VH1.1 DNA 配列：

ACA A C T G C T G G A T T G C A G T G G G T A C A G A A G A T G T C A G G A A
A G G G T T T G A A A T G G A T T G G C T G G A T G A A C A C C C A G T C T G A
A G T G C C A A A A T A T G C A G A A G A G T T C A A G G G A C G G A T T G C C
T T C T C T T T G G A A A C C G C T G C C A G T A C T G C A T A T T T A C A G A
T A A A C A A C C T C A A A A C T G A G G A C A C G G C A A C G T A T T T C T G
T G C G A A A T C G G T C T A T T T T A A C T G G A G A T A T T T C G A T G T C
T G G G G T G C A G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C T C A G C C A A A A
C G A C A C C C C C A C C C G T T T A T C C A C T G G C C (配列番号 16)

20

VH1.1 アミノ酸配列：

MEW S C V M L F L M A A A Q S I Q A Q I Q L V Q S G P E L R K P G E T V R I S
C K A S G Y P F T T A G L Q W V Q K M S G K G L K W I G W M N T Q S E V P K Y A
E E F K G R I A F S L E T A A S T A Y L Q I N N L K T E D T A T Y F C A K S V Y
F N W R Y F D V W G A G T T V T V S S A K T T P P P V Y P L A (配列番号 2)

30

VH1.3 DNA 配列：

ACA A C T G C T G G A C T G C A G T G G G T A C A G A A G A T G T C A G G A A
A G G G T T T G A A A T G G A T T G G C T G G A T G A A C A C C C A G T C T G A
A G T G C C A A A A T A T G C A G A A G A G T T C A A G G G A C G G A T T G C C
T T C T C T T T G G A A A C C G C T G C C A G T A C T G C A T A T T T A C A G A
T A A A C A A C C T C A A A A C T G A G G A C A C G G C A A C G T A T T T C T G
T G C G A A A T C G G T C T A T T T T A A C T G G A G A T A T T T C G A T G T C
T G G G G T G C A G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C T C A G C C A A A A
C G A C A C C C C C A C C C G T T T A T C C C T T G G C C (配列番号 17)

40

VH1.3 アミノ酸配列：

M G W S W V M L F L M A A A Q S I Q A Q I Q L V Q S G P E L R K P G E T V R I S
C K A S G Y P F T T A G L Q W V Q K M S G K G L K W I G W M N T Q S E V P K Y A
E E F K G R I A F S L E T A A S T A Y L Q I N N L K T E D T A T Y F C A K S V Y
F N W R Y F D V W G A G T T V T V S S A K T T P P P V Y P L A (配列番号 4)

VH1.4 DNA 配列：

A T G G A A T G C A G C T G T G T A A T G C T C T T T C T C A T G G C A G C A G
C T C A A A G T A T C C A A G C A C A G A T C C A G T T G G T G C A G T C T G G
A C C T G A G C T G A G G A A G C C T G G A G A G A C A G T C A G G A T C T C C

50

CGCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTTCACAACCTGCTGGATTGCA
AGTGGGTACAGAAGATGTCAGGAAAGGGTTTGAAATGGAT
TGGCTGGATGAACACCCAGTCTGAAGTGCCAAAATATGCA
GAAGAGTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAACCG
CTGCCAGTACTGCATATTTACAGATAAACCAACCTCAAAAC
TGAGGACACGGCAACGTATTTCTGTGCGAAATCGGTCTAT
TTTAACTGGAGATATTTTCGATGTCTGGGGGTGCAGGGACCA
CGGTCAACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCCATCCGT
CTTCCCCCTGGCA (配列番号18)

VH1. 4アミノ酸配列:

MECSCVMLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
RKASGYPFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLIKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVFPLA (配列番号3)

VH2. 1 DNA配列:

ATGGGGTTGGGTGTGGAACCTTGCTATTCCTCATGGGCAGCAG
CTCAAAGTATCCAAGCACAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGAGGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGGATCTCC
TGCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTTCACAACCTGCTGGATTGC
AGTGGGTACAGAAGATGTCAGGAAAGGGTTTGAAATGGAT
TGGCTGGATGAACACCCAGTCTGAAGTGCCAAAATATGCA
GAAGAGTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAACCG
CTGCCAGTACTGCATATTTACAGATAAACCAACCTCAAAAC
TGAGGACACGGCAACGTATTTCTGTGCGAAATCGGTCTAT
TTTAACTGGAGATATTTTCGATGTCTGGGGGTGCAGGGACCA
CGGTCAACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCACCCGT
CTATCCA CTGGTC (配列番号19)

VH2. 1アミノ酸配列:

MGWVWNLLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGYPFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLIKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVYPLV (配列番号5)

VH1. 2 DNA配列:

ATGGATTGGGTGTGGACCTTGCCATTTCCTCATGGGCAGCAG
CTCAAAGTATCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGAGGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGGATCTCC
TGCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTTCACAACCTGCTGGATTGC
AGTGGGTACAGAAGATGTCAGGAAAGGGTTTGAAATGGAT
TGGCTGGATGAACACCCAGTCTGAAGTGCCAAAATATGCA
GAAGAGTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAACCG
CTGCCAGTACTGCATATTTACAGATAAACCAACCTCAAAAC
TGAGGACACGGCAACGTATTTCTGTGCGAAATCGGTCTAT
TTTAACTGGAGATATTTTCGATGTCTGGGGGTGCAGGGACCA
CGGTCAACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCCATCTGT
CTATCCA CTGGCC (配列番号20)

VH1. 2アミノ酸配列:

MDWVWTLPLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGYPFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLIKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLA (配列番号8)

10

20

30

40

50

VH2.3 DNA配列:

ATGGGGTTGGGTGTGGAACCTTGCCATTTCCTCATGGGCAGCAG
CTCAAAGTATCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGAGGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGGATCTCC
TGCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTTCACAACTGCTGGATTGC
AGTGGGTACAGAAAGATGTCAGGAAAGGGTTTGA AATGGAT
TGGCTGGATGAACACCCAGTCTGAAGTACCAAAATATGCA
GAAGAGTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAACCG
CTGCCAGCACTGCATATTTACAGATAAACAACCTCAAAAC
TGAGGACACGGCAACGTATTTCTGTGCGAAATCGGTCTAT
TTTA ACTGGAGATATTTTCGATGTCTGGGGTGCAGGGACCA
CGGTCAACGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCACCCGT
CTATCCATTGGCC (配列番号21)

10

VH2.3 アミノ酸配列:

MGWVWNL PFLMAAAQS IQAQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGY PFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINN LKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTT PPPVYPLA (配列番号7)

VH2.4 DNA配列:

ATGGATTGGCTGTGGAACCTTGCCATTTCCTCATGGGCAGCAG
CTCAAAGTATCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGAGGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGGATCTCC
TGCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTTCACAACTGCTGGATTGC
AGTGGGTACAGAAAGATGTCAGGAAAGGGTTTGA AATGGAT
TGGCTGGATGAACACCCAGTCTGAAGTGCCAAAATATGCA
GAAGAGTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAACCG
CTGCCAGTACTGCATATTTACAGATAAACAACCTCAAAAC
TGAGGACACGGCAACGTATTTCTGTGCGAAATCGGTCTAT
TTTA ACTGGAGATATTTTCGATGTCTGGGGTGCAGGGACCA
CGGTCAACGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCACCCGT
CTATCCACTGGCC (配列番号22)

20

30

VH2.4 アミノ酸配列:

MDWLWNL PFLMAAAQS IQAQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGY PFTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINN LKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTT PPPVYPLA (配列番号9)

VH2.5 DNA配列:

ATGGGGTTGGGTGTGGACCTTGCCATTTCCTCATGGGCAGCAG
CTCAAAGTATCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGAGGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGGATCTCC
TGCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTTCACAACTGCTGGATTGC
AGTGGGTACAGAAAGATGTCAGGAAAGGGTTTGA AATGGAT
TGGCTGGATGAACACCCAGTCTGAAGTGCCAAAATATGCA
GAAGAGTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAACCG
CTGCCAGTACTGCATATTTACAGATAAACAACCTCAAAAC
TGAGGACACGGCGACGTATTTCTGTGCGAAATCGGTCTAT
TTTA ACTGGAGATATTTTCGATGTCTGGGGTGCAGGGACCA
CGGTCAACGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCACCCGT
CTATCCCCTGGTC (配列番号23)

40

VH2.5 アミノ酸配列:

50

MGWVWTL PFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELRKPGETVIRIS
CKASGYPTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLIKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPPVPYPLV (配列番号6)

【0125】

VL配列決定結果：

VK1.1 DNA配列：

ATGAGGGCCCCCTGCTCAGTTTCTTGGGGCTTTTGCTTCTCT
GGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT
CTTTCCTGTCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAT
CCTGGTATCAACAAAGATCTCATGAGTCTCCAAGGCTTAT
CATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGACTTCACTCTCA
GTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTA
CTGTCAACATGGTCACAGCTTTCGCTCACGTTTCGGTTCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
CCCAAAGA (配列番号24)

VK1.1アミノ酸配列：

MRAPAQFLGLLLLWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRV
LSCRASQSISDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPS
RFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PK (配列番号10)

VK1.3 DNA配列：

ATGAGGTCCCCCTGCTCAGTTCCTTGGGGCTTTTGCTTTTCT
GGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT
CTTTCCTGTCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAT
CCTGGTATCAACAAAGATCTCATGAGTCTCCAAGGCTTAT
CATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGACTTCACTCTCA
GTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTA
CTGTCAACATGGTCACAGCTTTCGCTCACGTTTCGGTTCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
CCCAA (配列番号25)

VK1.3アミノ酸配列：

MRSPAQFLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRV
LSCRASQSISDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPS
RFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PK (配列番号12)

VK1.4 DNA配列：

ATGAGGTCCCCAGCTCAGTTTCTGGGGCTTTTGCTTTTCT
GGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT

CTTTCCTGCAGGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTTAT
CCTGGTATCAACAAAGATCTCATGAGTCTCCAAGGCTTAT
CATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAAGACTTCACTCTCA
GTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTA
CTGTCAACATGGTCACAGCTTTCCGCTCACGTTTCGGTTCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
CCCAGAGA (配列番号26)

10

VK1.4アミノ酸配列:

MRS PAQFLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRV
LS CRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPS
RFS GSGSGSDFTL SINSVEPEDVGVYQCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PR (配列番号13)

VK1.5 DNA配列:

ATGAGGGGCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTTTTGCTTTTCT
GGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT
CTTTCCTGCAGGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAT
CCTGGTATCAACAAAGATCTCATGAGTCTCCAAGGCTTAT
CATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAAGACTTCACTCTCA
ATATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTA
CTGTCAACATGGTCACAGCTTTCCGCTCACGTTTCGGTTCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAT
CCCAAAGA (配列番号27)

20

30

VK1.5アミノ酸配列:

MRAPAQLLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRV
LS CRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPS
RFS GSGSGSDFTLNINSVEPEDVGVYQCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PK (配列番号11)

VK2.1 DNA配列:

ATGGTATCCTCAGCTCAGTTCCTTGGACTTTTGCTTTTCT
GGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT
CTTTCCTGCAGGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAT
CCTGGTATCAACAAAGATCTCATGAGTCTCCAAGGCTTAT
CATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAAGACTTCACTCTCA
GTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTA
CTGTCAACATGGTCACAGCTTTCCGCTCACGTTTCGGTTCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
CCCAA (配列番号28)

40

50

VK2.1 アミノ酸配列：

MVSSAQFLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSL
LSCRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPSR
FSGSGSGSGSDFTL SINSVEPEDVG VY CQHGH S FPLTFGS
GTKLELKRADAAPT V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y
PK (配列番号14)

VK2.6 DNA配列：

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCTCTTGGACTTTTGTCTTTTCT
GGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTCT
TCCAGCCACCCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT
CTTTCCTG CAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAT
CCTGGTATCAACAAAGATCTCATGAGTCTCCAAGGCTTAT
CATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGT CAGACTTCACTCTCA
GTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTA
CTGTCAACATGGTCA CAGCTTTCCGCTCACGTTTCGGTTCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATC
TGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
CCCAGAGA (配列番号29)

VK2.6 アミノ酸配列：

MVSTAQFLGLLLFWTSASRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSL
LSCRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPSR
FSGSGSGSGSDFTL SINSVEPEDVG VY CQHGH S FPLTFGS
GTKLELKRADAAPT V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y
PR (配列番号15)

【0126】

実施例4-NLRP3 抗原合成

NLRP3 インフラマソームの形成を抑制できる抗体応答を生成するNLRP3 に対するペプチド (抗原) のデザイン

NLRP3 インフラマソームは、哺乳動物細胞中で炎症性の刺激に反応して形成される不均一タンパク質複合体であり、その形成を調節し、弱める能力は、一連の炎症性疾患に対する重要な治療潜在力を有し得る。NALP3 タンパク質配列由来の、NALP3 インフラマソーム複合体中の他のタンパク質成分へのNALP3 の結合を遮断できる抗体を生成するはずのペプチドが設計される。

【0127】

NLRP3 活性化は、NLRP タンパク質のASC との自己集合により起こり、これは、CARD、PYD およびカスパーゼ1 ドメインのヘテロ複合体である。NLRP3 およびASC は、それらそれぞれのPYD ドメインを通して相互作用し、PYD ドメインは、大きな比率の高度に保存された荷電アミノ酸残基を含み、これが相互作用して、静電相互作用を形成し、複合体を安定化する (図15 参照)。

【0128】

図16 は、CLUSTAL0 (1.2.4) を用いたヒトおよびマウスNALP (NLRP) タンパク質のC末端ドメインのコンセンサス配列の配列アラインメントを示す図である。赤は、部位特異的変異誘発によるNLRP/ASC 相互作用に不可欠であると認められる残基を示す (Vajjala et al, 2012)。

【0129】

ペプチド選択は、広範に研究され、ASC との相互作用に関与している1~61 の排列領域に注力された (Vajjala et al, 2012)。この領域はまた、結晶学により十分にモデル化され、多くのPDB 構造がこのドメインに対して利用可能である。

NLRP3のPYRドメインからなるPDBモデル3QF2を、最も有用なPDB構造的基準として選択した。初期ペプチド候補配列は、可能なエピトープとしての利便性および視認性、およびまた、マウスとヒト排列との間の類似性の程度を基準に選択されたが、他のNLRP変種との差異は保持された。これら初期の3種のペプチドは、NovaFoldを用いて、3D構造にモデル化された。

【0130】

NovaFold分析

NovaFoldは、I-TASSERアルゴリズム：テンプレートベーススレッディング（PDBから）および第一原理法の組み合わせを使用して、タンパク質またはペプチドの折り畳みを予測する3Dタンパク質モデル化ソフトウェアである。この状況では、親タンパク質内でインサイツ配列により示されることが既知のペプチド内の二次構造的特徴の存在を予測するために使用される。これは、親タンパク質内の折り畳みおよび近接度をベースにした関係を最も良く反映し、抗体中の免疫原性タンパク質の潜在能力を最大化するのを支援し、完全長タンパク質中の対応するエピトープに対する完全活性化抗体をもたらす、ペプチド配列の選択の最適化を支援できる。

【0131】

ペプチドのモデル化および整列

NovaFoldを用いて4種の別個の配列をモデル化し、得られた最高得点のモデルを評価した後、PDB：3QF2に示されるように、親NLRP3構造に整列させた。

【表6】

表2：NovaFold12.0を用いてモデル化し、Protean 3D、バージョン14.0.1を用いてNLRP3構造PDB：3QF2に整列させたペプチド候補の整列と構造的特徴の比較。

ペプチド ID	コンセンサス配列の位置	配列	二次構造
FUS_746_001	30-53	EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD (配列番号30)	α ヘリックス
FUS_746_002	35-53	QKGCIPLPRGQTEKADHVD (配列番号31)	なし
FUS_746_003	35-49	QKGCIPLPRGQTEKA (配列番号32)	なし

【0132】

モデル化および比較は、ペプチドFUS_746_001がペプチド免疫原として使用するのに好ましい候補であることを示す。親タンパク質のモデルと最大の整列を示すことに加えて、それは、二次構造の予測での高い類似性も示し、利用可能なエピトープ標的である。

NovaFold予測構造を用いたペプチドFUS_746_001整列を図17に示す。

【0133】

結論

ソフトウェアのモデル化は、常に、確定的ではなく、推奨として受け取られるべきであり、親分子内で見つかるべき強い二次構造的特徴が既知でない場合は特に、この基準で解釈されるべきである。しかし、これを念頭に置いても、このモデル化は、ペプチドFUS_746_001、配列EDYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVD（配列番号30）は、親タンパク質への整列および予測された抗原性を基準にして、このプロジェクトの免疫原として選択するための最良の候補であろう。ペプチドはまた、マウスとヒトとの間のほんのわずかの差異点を示し、これは、望ましい特徴でもある、これらの種間で交

差反応性を許容し、他方で、他のNLRP型に対する交差反応性を最小化する、マウスの抗体応答の生成を支援する。注記：KLHへの架橋のためには、N末端Cys残基を付加することが推奨される。

【0134】

参考文献

Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics, 23 Jan. 9 (40).

Vajjhala, P. R., Mirams, R. E., and Hill, J. M. (2012). Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. J. Biol. Chem. 287, 41732-41743.

10

【0135】

NLRP3抗原合成

bioSynthesis Inc, Texasにより、追加のC末端システイン残基を介して、マレイミドカップリングを用いてKLHに結合し、NLRP3ペプチドを合成した。

NLRP3免疫原を免疫したマウスからの1回目の採取血のELISAスクリーニング結果（図18参照）。

20

【0136】

実施例5-NLRP3に対するモノクローナル抗体の生成

5匹のマウス集団に免疫し、陽性免疫応答に関しスクリーニングされた。融合に好適する候補の選定後、脾細胞をパートナー細胞と融合して、ハイブリドーマ集団を産生した。この集団は、一連の限界希釈およびスクリーニングアッセイを受けて、完全なモノクローナル細胞株を産生した。

【0137】

細胞株命名法

産物名「F226 7A7-1E1-2D5」は、10種の選択したモノクローナルハイブリドーマ細胞株の1つを指す。名称は、各段階での産生経路を記述する要素からなる。融合後スクリーニングおよび各限界希釈から選択された各ハイブリドーマは、ハイブリドーマが選択されたプレート番号およびプレート上のウェル位置に相当する番号が付与された（すなわち、7A7-1E1-2D5）。この命名法は、それぞれ個別のハイブリドーマの由来を追跡し、スクリーニング過程の明確な区別を可能とする。

30

【0138】

40

50

【表 7】

略語

Ab	抗体
DMSO	ジメチルスルホキシド
FCS	ウシ胎仔血清
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
RT	室温
OD	光学密度
PBST	リン酸塩緩衝生理食塩水+1%ツイーン20
PBS	リン酸塩緩衝生理食塩水
RPM	1分当たりの回転数
NP, LP, RP, LRP, 2LP	マウス識別表示：パンチなし、左パンチ、右パンチ、左／ 右パンチ、2左パンチ
HAT	ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンサプリメント
HATR 培地 ¹	2% Roche (HFCS), 2% HAT, 1% Pen/Strep, 1% L-グルタミン 補充DMEM
SFM	無血清培地
PEG	ポリエチレングリコール
GAM-HRP	ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ
HT	ヒポキサンチンおよびチミジン
LD1	第1の限界希釈
LD2	第2の限界希釈

¹ これは融合およびスクリーニング後に全ての培養物に対し使用された培地である。

【0139】

材料

10

20

30

40

50

【表 8】

試薬および培地

試薬	供給業者	カタログ番号
L-グルタミン	Gibco	25030-024
HAT サプリメント	Gibco	21060-017
HFCS	Roche	11363735001
DMEM Glutamax	Gibco	61965-059
ペニシリン/ストレプトマイシン	Gibco	15140-122
FCS	Gibco	16000.044
DMSO	シグマ	D2650
トリパンブルー	シグマ	T8154
PEG	シグマ	10783641001
フロイント完全アジュバント	シグマ	F5881
フロイント不完全アジュバント	シグマ	F5506
炭酸水素ナトリウム	VWR	27778.260
炭酸ナトリウム	シグマ	S2127-500G
粉末ミルク	Marvel	オリジナル乾燥脱脂
ツイーン20 (10%)	シグマ	P1379-1L
GAM-HRP (Fc 特異的)	シグマ	A2554
TMB	Biopanda	TMB-S-002
Mr. Frosty	ナルゲン	55710-200

10

20

【表 9】

使い捨て部材

名称	供給業者	カタログ番号
25cm ² 静置フラスコ	コーニング	430639
75cm ² 静置フラスコ	コーニング	430641
無菌96ウェルプレート	コーニング	3595
無菌96ウェルプレートTPP	Primer Scientific	92696T
クライオバイアル	Fisher Scientific	366656
Maxi Sorb 96-ウェルプレート	Nunc	442404

30

40

【0140】

装置

- ・CO₂細胞培養静置インキュベーター (SANYO)
- ・プレートリーダーSunrise (Tecan)
- ・Centurion Scientific K40R遠心分離機
- ・Grant-Bio Multishaker PSU 20

【0141】

方法

抗原調製

免疫原、NLRP3ペプチド-KLH複合体 (bioSynthesis Inc, T

50

e x a s) が受け入れられると、これらの溶液を無菌 E F - P B S 中で $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、 $600 \mu\text{L}$ を免疫用に、および $150 \mu\text{L}$ を追加免疫および E L I S A スクリーニング用に分取した。これらの分割量を標識し、 -20°C で貯蔵した。

【0142】

免疫

5匹の B a l b C マウス集団に、 $200 \mu\text{L}$ の 1 : 1 のフロイント完全アジュバント (シグマ) および本明細書で調製した $600 \mu\text{L}$ の分取量の N L R P 3 ペプチド-K L H 複合体の乳剤を皮下に免疫した。1回目の免疫の2週間後に、この集団に、元の注射と同体積および濃度のフロイント不完全アジュバント (シグマ) のみを代わりに用いた2回目の注射により免疫した。2回目の免疫の1週間後に、マウスに耳パンチ (N P、R P、L P、L R P、2 L P) により目印を付けて、予備的結果を得るために試験採取血を本明細書に記載のようにスクリーニングした。2回目の免疫の3週間後に、集団に2回目の注射と同じ方法で3回目の免疫を行った。3回目の免疫の1週間後に、試験採取血をスクリーニングし、その後、R P を融合のために選択した。

【0143】

試験採取血の E L I S A

尾部採取血を5匹の B a l b C マウス集団から取得し、 8000rpm 、室温で10分間の遠心分離を行った。各マウスから血清を収集し、スクリーニングと同じ日にプレートに加え、 -20°C で貯蔵した。このスクリーニングを融合に好適なマウスを選択するために2回実施した。

【0144】

スクリーニングの前日に、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の遊離 N L R P 3 ペプチド含有 50mM のナトリウムカーボネートコーティング緩衝液 ($\text{pH} 9.5$) の $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ を加えることにより M a x i S o r b プレートをコートした。A P O - A 1 を同じコーティングバッファー中で $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈することにより、別のコーティング溶液を調製した。2つのウェルに陽性および陰性の結果を示す各試料を添加することが可能なように、これらの溶液をプレートの交互の列に加えた。このプレートを 4°C の静止状態で一晚インキュベートした。

【0145】

翌朝、コーティングバッファーを除去し、 $200 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ のブロッキング溶液 ($4.0\% \text{w}/\text{v}$ のセミスキムミルク粉末、 $1 \times \text{P B S}$) を加え、 150rpm 、室温下で2時間攪拌した。プレートを P B S - T ($0.1\% \text{v}/\text{v}$ のツイーン20) で3回洗浄した。P B S を各ウェルに $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で加え、 $1 \mu\text{L}$ の各試験採取血血清を各陽性および陰性ウェルに加えた。プレートを 150rpm (G r a n t S h a k e r) で2時間、室温でインキュベートした。その後、これらの試料を取り出し、P B S - T で4回洗浄した。1 : 5000 希釈 G A M - H R P (シグマ、U K) の $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ を加え、プレートを 150rpm で攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。二次抗体を除去し、プレートを P B S - T で4回、P B S 中で1回洗浄した。 $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の T M B 基質溶液を加え、 37°C で10分間インキュベートした。ウェル当り $50 \mu\text{L}$ の 1M H C l を加え、直ちにプレートを T e c a n S u n r i s e プレートリーダーを用いて 450nm で読み取った。

【0146】

第2の試験採取血 E L I S A スクリーニング後に、R P を最大の陽性免疫応答を発現することにより、融合用として選択した。

追加免疫注射

3回目、最終免疫の1週間後に、追加免疫注射を、 $100 \mu\text{L}$ の $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ の分取 I L - 1 R を、アジュバントなしで B a l b C マウス R P に投与した。

【0147】

融合 F 2 2 6

融合の1週間前に、S P 2 細胞を液体窒素から取り出し、 $1\% \text{P e n}/\text{S t r e p}$ 、1

10

20

30

40

50

% L-グルタミンを補充した10% FCS DMEM中で、3 x 12 mlのT75フラスコが融合を行う日に75%~90%の集密的になるまで継代培養した。融合の日に、フラスコをタッピングすることによりSP2細胞を取り出し、1000 rpm、37℃で5分間遠心分離した。細胞を20 mlのSFM DMEMに再懸濁し、再度遠心分離し、10 mlのSFM DMEMに再懸濁した。SP2細胞をSFM中のステリリンチューブ中に37℃、6% CO₂下で必要になるまで貯蔵した。

【0148】

安楽死後、最強の免疫応答を示したマウスから脾臓を無菌で取り出した。脾細胞を脾臓の両端を穿孔することにより細いゲージの注射針で抽出し、10~15 mlのSFM DMEMでフラッシングした。脾細胞をステリリンチューブに移し、37℃、1300 rpmで5分の遠心分離により20 mlの無血清DMEMで2回洗浄し、穏やかに上清を除去した。脾細胞をステリリンチューブ中の10 mlの無血清DMEMに再懸濁した。

【0149】

37℃で貯蔵したSP2細胞を用いて、SP2細胞を脾細胞に添加した。このSP2/脾細胞培養物を37℃、1300 rpmで5分間遠心分離した。上清を廃棄後、1 mlのPEGをSP2/脾細胞培養物に滴加し、その間、3分間にわたり連続的に攪拌した。1 mlのSFM DMEMを融合混合物に加え、4分間攪拌した。10 mlのSFM DMEMを新しい培養物に添加し、37℃の水浴中で5分間インキュベートした。その後、この細胞を37℃、1000 rpmで5分間遠心分離した。ペレットを200 mlのHATR培地中に再懸濁し、200 µl/ウェルで10 x 96ウェル培養プレートに播種し、これを、スクリーニングの前に、6% CO₂下、37℃で11日間インキュベートした。

【0150】

融合後スクリーニングおよびLD後スクリーニング

融合の11日後、プロトクローンをELISAでスクリーニングした。20 x Maxi Sorb 96ウェルプレートを、1 µg/mlのAPO-A1を用いて特異性の陰性対照としてセクション0で記載のようにコートした。コーティング溶液を除去し、本明細書に記載のようにプレートをブロックした。160 µlの上清を10個の融合プレート、限界希釈プレート、または24ウェルプレートの各ウェルから取り出し、50 µlの1 x PBS含有の新しい96ウェル培養プレートに移すことにより、試料を調製した。ブロッキングの2時間後に、ブロッキング溶液を取り除き、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。各希釈プレートからの試料を100 µl/ウェルの濃度で、コーティング抗原の特異性を明らかにするために、各希釈プレートからELISAプレートの2列毎に1列に添加することにより、ELISAプレートに加えた。ELISA毎に2つのウェルを陰性対照としての100 µlの1 x PBSと共にインキュベートした。これらの試料を150 rpmで2時間、室温でインキュベートした。

【0151】

限界希釈

24ウェルプレート中でハイブリドーマ集団が増殖され、十分に成長すると、二次スクリーニングを実施し、限界希釈のラウンドで最も特異的で、最も高産生性集団を選択した。

両方の限界希釈を1~3プロトクローンに対し、それぞれ、2~4 x 96ウェルプレートに、200 µl培養液/ウェル中の1細胞/ウェルで播種することにより実施した24ウェルプレート中の各培養物を計数することにより、プレートを調製し、中間希釈として、10 x に希釈し、その後、40 ml中の200細胞に希釈した。培養物を200 µl/ウェルで播種し、ウェルが80%~90%集密的になるまで、37℃、6% CO₂で7~10日間、インキュベートさせた。両方の限界希釈の各ウェルをセクション0に記載のようにELISAによりスクリーニングした。

【0152】

最終クローン選択

第2の限界希釈後に、10種のクローンを24ウェルプレート中での増殖のために選択した。各クローンを、各ウェルが80%~90%集密的になるまで、37℃、6% CO₂

で6日間増殖させた。クローンが24ウェルプレート中で十分に確立されると、各クローンの1ml/ウェルを、凍結保存のために、5mlの新しい10% HATR DMEMを含むT25フラスコに移した。

【0153】

モノクローナル細胞株の凍結保存

クローンがT25フラスコ中で十分に確立されると(80%~90%集密度)、各5mlの培養物を1000rpm、37℃で5分間遠心分離し、1mlの新しい10% DMEM HATR培地中に再懸濁した。各1mlの培養物を1:1比率のFCS/DMSOの300μlを含むクライオバイアルに移した。このバイアルを密閉し、Mr. Frosty中に入れ、短期間の貯蔵のために、-70℃の冷凍庫に移した。

10

【0154】

配列決定のための細胞調製

クローンF226 7A7-1E1-2D5から産生した抗NLRP3を配列決定のために選択した。T25フラスコ中で培養物が集密的になると、上清を廃棄した。2mlの新しい培地中への細胞の掻き取りにより細胞を取り出し、7,600rpm、室温で5分間遠心分離した。その後、上清を廃棄し、ペレットを液体窒素中で急速冷凍し、mRNA抽出の準備ができるまで-70℃中に置いた。

【0155】

免疫および試験採取血のスクリーニング

マウスのコロニーをNLRP3ペプチド-KLH複合体(生物情報学でデザインし、bioSynthesis Inc, Texasにより合成)で免疫し、定期的な試験採取血を11週の期間にわたり取得した。その後、試験採取血を抗原に対しスクリーニングした。

20

【0156】

陽性マウスの特定時に、融合を実施し、次に、ハイブリドーマクローン由来の上清を検証した。その後、特異的抗体を限界希釈およびクローニングに供し、NLRP3に対する安定なハイブリドーマ細胞株を産生した。

【0157】

ELISAを用いて標的タンパク質-NLRP3-に対して抗体をスクリーニングし、少なくともバックグラウンドの3倍のシグナルを有するクローンを選択した。24個のクローンからの抗体を選択し、さらに社内試験を実施して、最良の6個のクローンを選出した。

30

【0158】

結果

試験採取血1

2回目免疫の1週間後に、尾部採取血をそれぞれ5匹のマウスから取得し、産生されたポリクローナル抗体の融合に好適な動物および相対的特異度の決定のために、非コンジュゲートNLRP3ペプチドおよびAPO-A1に対しスクリーニングした(図19参照)。

【0159】

試験採取血2

尾部採取血からの血清のスクリーニング後に、2RPが、最良の免疫応答を示したために、その脾細胞の融合パートナーSP2培養物との融合のために選択された(図20参照)。

40

【0160】

融合後スクリーニング

各プレートのウェルが70%~80%の集密度に達すると、ELISAにより、NLRP3ペプチドおよびAPO-A1に対しプレートをスクリーニングした。最高の応答を生成するハイブリドーマ集団を24ウェルプレート中の増殖により選択した(図21参照)。

【0161】

1回目の24ウェルプレートスクリーニング

50

クローンが、融合後スクリーニングから選択され、増殖とそれに続く、限界希釈の第1のラウンドに対し好適なプロトクローンを決定する二次スクリーニングのために24ウェルプレート中に整列された。3個のクローンが選択され、限界希釈が調製された（図22参照）。

【0162】

限界希釈法1スクリーニング

1回目の限界希釈プレートが集密的になると、ELISAにより、NLRP3ペプチドおよびAPO-A1に対し限界希釈がスクリーニングされた。31種のハイブリドーマ集団が、最も高く、最も特異的応答を示した、F226 5B7および7A7から選択された。3D4由来のクローンは好適しなかった（図23参照）。

【0163】

2回目の24ウェルプレートスクリーニング

クローンが24ウェルプレート中で集密的になると、各クローンは、NLRP3ペプチドおよびAPO-A1に対してELISAによりスクリーニングされた。F226 5B7-1E10、5B7-1G2、7A7-1C4および7A7-1E1が、2x 96ウェルプレート全体にわたり2回目のラウンドの限界希釈に対しクローン毎に選択された（図24参照）。

【0164】

限界希釈2スクリーニング

各プレートのウェルが70%~80%の集密度に達すると、ELISAにより、NLRP3ペプチドおよびAPO-A1に対しプレートをスクリーニングした。最高の応答および最大の特異性を生成する24種のハイブリドーマ集団を24ウェルプレート中の増殖および凍結保存のために選択した（図25参照）。

【0165】

ドットプロット分析を図26に示す。THP-1マクロファージ由来のタンパク質溶解物を用いてドットプロットを実施し、融合ハイブリドーマ細胞株（A25=陽性対照：市販の抗NLRP3モノクローナル抗体（R&D Systems）、A26=陰性対照：PBS）からの最良の24クローンから収集した抗NLRP3モノクローナル抗体含有上清を試験した。クローン6、11、15、16、18および20を選択し、ウェスタンブロットティングでさらに試験した。

【0166】

ウェスタンプロット分析を図27に示す。THP-1マクロファージ由来のタンパク質溶解物を用いてウェスタンプロットを実施し、未処理（レーン1）およびLPSおよびATPで刺激した（レーン2、（タンパク質ラダーレーン3））融合ハイブリドーマ細胞株からの最良の6クローンから収集した抗NLRP3モノクローナル抗体含有上清を試験した。クローン18を、配列決定用を選択し、二重特異的モノクローナル抗体開発に使用した。

【0167】

結論

このプロジェクトの目的は、NLRP3インフラマソームの構築を妨害するのに機能的である、NLRP3に対する一連の抗体を産生することであった。マウスが免疫され、スクリーニングされると、2RPが融合用として選択された。24種のモノクローナルハイブリドーマ細胞株が2回のラウンドの限界希釈から産生された。各集団は、NLRP3に対する最高の生成および最高の特異性により選択された。クローンF226 7A7-1E1-2D5が、NLRP3構築の防止に対し最も活性であることがインビトロアッセイで示された。これらの最終的細胞株は、凍結されており、この7A7-1E1-2D5により発現された抗体は、二重特異的InfLa Mabの産生における次の段階のために配列決定される。

【0168】

実施例6-NLRP3モノクローナル配列決定

mRNAは、2016年02月23日に、ハイブリドーマ細胞ペレットから抽出された。総RNAは、Fusion Antibodies Ltdの自社製RNA抽出プロトコルを用いてペレットから抽出された（実施例3参照）。

【0169】

RT-PCR

オリゴ（dT）プライマーを用いて逆転写によりRNAからcDNAを生成した。PCR反応は、可変ドメインプライマーを用いて設定し、次のバンド（図28参照）を与えるモノクローナル抗体DNAのVHおよびVL領域の両方を増幅した

【0170】

VHおよびVL産物をInvitrogen配列決定ベクターpCR2.1に挿入し、TOP10細胞中に形質転換し、陽性形質転換体に対しPCRによりスクリーニングした。選択コロニーを採取し、ABI3130xl Genetic Analyzerで、DNA配列決定法により分析した。結果は下記に示す。

【0171】

配列決定結果

重鎖

VHアミノ酸配列アラインメント

10

20

30

40

50

【化 1 6】

		1		50	
VH1.1	(1)	MNFGSLVFLVLVLKGAQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
VH3.7	(1)	-----FLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
VH3.4	(1)	MDFGLSRVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
VH3.1	(1)	MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
VH3.5	(1)	MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
VH3.8	(1)	MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
コンセンサス	(1)	MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSD			
		51		100	
VH1.1	(51)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			10
VH3.7	(43)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			
VH3.4	(51)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			
VH3.1	(51)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			
VH3.5	(51)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			
VH3.8	(51)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			
コンセンサス	(51)	YYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL			
		101		150	
VH1.1	(101)	QMNSLK-----			
VH3.7	(93)	QMNSLKSEDTAMYICARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS			
VH3.4	(101)	QMNSLKSEDTAMYICARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS			
VH3.1	(101)	QMNSLKSEDTAMYICARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS			
VH3.5	(101)	QMNSLKSEDTAMYICARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS			
VH3.8	(101)	QMNSLKSEDTAMYICARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS			20
コンセンサス	(101)	QMNSLKSEDTAMYICARGWVSTMVKLLSSFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS			
		151			
VH1.1	(107)	-----			
VH3.7	(143)	VYPLA			
VH3.4	(151)	VYPLA			
VH3.1	(151)	VYPLA			
VH3.5	(151)	VYPLA			
VH3.8	(151)	VYPLA			
コンセンサス	(151)	VYPLA			

VH1.1	(配列番号 33)		30
VH3.7	(配列番号 34)		
VH3.4	(配列番号 35)		
VH3.1	(配列番号 36)		
VH3.5	(配列番号 36)		
VH3.8	(配列番号 36)		
コンセンサス	(配列番号 36)		

【0 1 7 2】

【化 1 7】

アミノ酸描影法の凡例：		40
黒字	非類似残基	
シアン背景色で青字	所与の位置の残基ブロック由来のコンセンサス残基	
緑背景色で黒字	コンセンサス残基に対する構造中の類似の残基またはコンセンサスが見つからない場合の相互に類似の残基	
黄背景色で赤字	所与の位置の完全に保存された残基由来のコンセンサス残基	
緑字	所与の位置のコンセンサス残基に低い類似性の残基	
V _H コンセンサスアミノ酸配列：		

【化 1 8】

MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRL
EWWATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMNSLKSEDTAMYYCARGWVSTMVKLLSS
FPYWGQGTLVTVSAAKTTPPSVYPLA (SEQ ID NO: 35)

可変ドメインは、太字で強調されている。

IMGTナンバリングシステムにより決定される相補性決定領域 (CDR) には、下線を引いている (Le franc, M. - P. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212 (1999)) (図 29 参照)。

10

【0 1 7 3】

図 29 のアミノ酸描影法の凡例：

青色網掛円は、抗体の大部分の疎水性である位置でのフレームワーク 1～3 中の疎水性 (非極性) 残基である。

黄色網掛円は、プロリン残基である。

四角は、CDR の開始および終了位置でキーとなる残基である。

フレームワーク中の赤色のアミノ酸は、構造的に保存されたアミノ酸である。

【0 1 7 4】

軽鎖

V_L アミノ酸配列アラインメント：

20

【化 1 9】

		1	50
VL1.1	(1)	MAWISLIFSLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
VL1.6	(1)	MAWISLIFSLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
VL1.2	(1)	MAWTSLLLSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
VL1.7	(1)	MAWTSLLFSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
VL1.4	(1)	MAWIPLLFSLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
VL1.5	(1)	MAWISLLLSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
コンセンサス	(1)	MAWISLLFSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT	
		51	100
VL1.1	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLVGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
VL1.6	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
VL1.2	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
VL1.7	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGAPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
VL1.4	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
VL1.5	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
コンセンサス	(51)	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ	
		101	149
VL1.1	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL	
VL1.6	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL	
VL1.2	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLCPPSSEKLSL	
VL1.7	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLCPPSSEKLSL	
VL1.4	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL	
VL1.5	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL	
コンセンサス	(101)	TEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL	

30

40

V L 1 . 1 (配列番号 3 7)
V L 1 . 6 (配列番号 3 8)
V L 1 . 2 (配列番号 3 9)
V L 1 . 7 (配列番号 4 0)
V L 1 . 4 (配列番号 4 1)
V L 1 . 5 (配列番号 4 2)
コンセンサス (配列番号 4 3)

【0 1 7 5】

50

【化 2 0】

アミノ酸描影法の凡例：

黒字

非類似残基

シアン背景色で青字

所与の位置の残基ブロック由来のコンセンサス残基

緑背景で黒地

コンセンサス残基に対する構造中の類似の残基またはコンセ

ンサスが見つからない場合の相互に類似の残基

黄背景色で赤字

所与の位置の完全に保存された残基由来のコンセンサス残基

緑字

所与の位置のコンセンサス残基に低い類似性の残基

V_Lコンセンサスアミノ酸配列：

10

【化 2 1】

MAWISLLLLLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLFTG
LIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKLTVLGQPKS
SPSVTLFPPSTEELSL (SEQ ID NO: 43)

可変ドメインは、太字で強調されている。

IMGTナンバリングシステムにより決定される相補性決定領域 (CDR) には、下線を引いている (Lefranc, M. - P. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212 (1999)) (図 30 参照)。

20

【0176】

図 30 のアミノ酸描影法の凡例：

青色網掛円は、抗体の大部分の疎水性である位置でのフレームワーク 1～3 中の疎水性 (非極性) 残基である。

黄色網掛円は、プロリン残基である。

四角は、CDR の開始および終了位置でキーとなる残基である。

フレームワーク中の赤色のアミノ酸は、構造的に保存されたアミノ酸である。

【0177】

VH 配列決定結果：

VH1.1 DNA 配列：

ATGAACCTTCGGGTTGAGCTTGGTTTTTCCTTGTCCTTGTTTT
TAAAAGGTGCCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAAGTGACTATTACATGT
ATTGGGGTTTCGCCAGACTCCGGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGT
CGCAACCATTAGTGATGGTGGTACTTACACCTACTATCCA
GACAGTGTGAAGGGGCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATG
CCAAGAACAACTTTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAAG (配
列番号 44)

30

VH1.1 アミノ酸配列：

MNFGLSLVFLVLVLKGAQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLS
CAASGFTTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVATISDGGTYTYYP
DSVKGRFTTISRDNANKNNLYLQMNSLK (配列番号 33)

40

VH3.1 DNA 配列：

ATGGACTTCGGGTTGAGCTGGGGTTTTTCCTTGTCCTTGTTTT
TAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAAGTGACTATTACATGT
ATTGGGGTTTCGCCAGACTCCGGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGT
CGCAACCATTAGTGATGGTGGTACTTACACCTACTATCCA

50

GACAGTGTGAAGGGGCGATTTCACCATCTCCAGAGACAATG
CCAAGAACAACCTTTACCTGCAAATGAACAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGATGGGTT
TCTACTATGGTTAAACTTCTTTCCCTTTCCTTACTGGG
GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGAC
ACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCC (配列番号 45)

VH3. 1 アミノ酸配列:

MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLS
CAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVATISDGGTYTYYP
DSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMNSLKSEDTAMYYCARGWV
STMVKLLSSFPYWGQGTLLVTVSAAKTTPPSVYPLA (配列番号
36)

10

VH3. 4 DNA配列:

ATGGACTTCGGGCTGAGCAGGGTTTTTCCTTGTCCTTGTTTT
TAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGT
ATTGGGTTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGT
CGCAACCATTAGTGATGGTGGTACTTACACCTACTATCCA
GACAGTGTGAAGGGGCGATTTCACCATCTCCAGAGACAATG
CCAAGAACAACCTTTACCTGCAAATGAACAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGATGGGTT
TCTACTATGGTTAAACTTCTTTCCCTTTCCTTACTGGG
GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGAC
ACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCC (配列番号 46)

20

VH3. 4 アミノ酸配列:

MDFGLSRVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLS
CAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVATISDGGTYTYYP
DSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMNSLKSEDTAMYYCARGWV
STMVKLLSSFPYWGQGTLLVTVSAAKTTPPSVYPLA (配列番号
35)

30

VH3. 5 DNA配列:

ATGGACTTCGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTTGTCCTTGTTTT
TAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGT
ATTGGGTTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGT
CGCAACCATTAGTGATGGTGGTACTTACACCTACTATCCA
GACAGTGTGAAGGGGCGATTTCACCATCTCCAGAGACAATG
CCAAGAACAACCTTTACCTGCAAATGAACAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGATGGGTT
TCTACTATGGTTAAACTTCTTTCCCTTTCCTTACTGGG
GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGAC
ACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCC (配列番号 47)

40

VH3. 5 アミノ酸配列:

MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLS
CAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVATISDGGTYTYYP
DSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMNSLKSEDTAMYYCARGWV
STMVKLLSSFPYWGQGTLLVTVSAAKTTPPSVYPLA (配列番号
36)

50

VH3.7 DNA配列:

TTTTCCTTGTCCTTGT TTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGT
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGA
GGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGATTCACTT
TCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCGGA
AAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTGATGGTGGT
ACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCA
CCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTTTACCTGCA
AATGAACAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTAC
TGTGCAAGAGGATGGGT TTTCTACTATGGTTAAACTTTCTTT
CCTCCTTTTCTTACTGGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGT
CTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG
GCC (配列番号48)

10

VH3.7 アミノ酸配列:

FLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTF
SDYYMYWVRQTPEKRLWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFT
ISRDNANKNNLYLQMNSLKSEDTAMY YCARGWVSTMVKLLS
SFPYWGQGT LVT VSA AKTTPPSVYPLA (配列番号33)

VH3.8 DNA配列:

ATGGACTTCGGGGCTGAGCTGGGT TTTTCCTTGTCCTTGT TTT
TAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGTCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAAGTGAAGTATTACATGT
ATTGGGTTCGCCAGACTCCGGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGT
CGCAACCATTAGTGATGGTGGTACTTACACCTACTATCCA
GACAGTGTGAAGGGGCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATG
CCAAGAACAACCTTTACCTGCAAATGAACAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGATGGGT T
TCTACTATGGTTAAACTTTCTTTTCTCCTTTTCTTACTGGG
GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGTCAGCCAAAACGAC
ACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCC (配列番号49)

20

30

VH3.8 アミノ酸配列:

MDFGLSWVFLVLVLKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLS
CAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVATISDGGTYTYYP
DSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMNSLKSEDTAMY YCARGWV
STMVKLLSSFPYWGQGT LVT VSA AKTTPPSVYPLA (配列番号
36)

【0178】

VL配列決定結果:

VL1.1 DNA配列:

ATGGCCTGGATTTCTCTTATATTCTCTCTCCTGGCTCTCA
GCTCAGGGGGCCATTTCCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC
TGCACTCACACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATG
CCAACCTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGG
TCTAGTAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCC
TCACCATCACAGGGGCGACAGACTGAGGATGAGGCAATATA
TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAATTATTGGGTGTTCTGGT
GGAGGAACCAAACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTT

40

50

CGCCATCAGTCACCCCTGTTCCCACCCCTCCACTGAAGAGCT
AAGCTTGGG (配列番号50)

VL1.1 アミノ酸配列:

MAWISLIFSL LALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLHFTGLVGGTNNRAPGVP
ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL (配列番号37)

VL1.2 DNA配列:

ATGGCCTGGACTTCACTCTTACTCTCTCTCCTGGCTCTCA
GCTCAGGGGGCCATTTCCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC
TGCACCTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATG
CCAACCTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGG
TCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCC
TCACCATCACAGGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATA
TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAATTATTGGGTGTTTCGGT
GGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTT
CGCCATCAGTCACCCCTGTGCCCGCCCTCCTCAGAGAAGCT
AAGCTTGGG (配列番号51)

VL1.2 アミノ酸配列:

MAWTSLLLSLL LALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLHFTGLIGGTNNRAPGVP
ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLCPPSSEKLSL (配列番号39)

VL1.4 DNA配列:

ATGGCCTGGATTCTCTTTTATTCTCTCTCCTGGCTCTCA
GCTCAGGGGGCCATTTCCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC
TGCACCTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATG
CCAACCTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGG
TCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCC
TCACCATCATAGGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATA
TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAATTATTGGGTGTTTCGGT
GGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTT
CGCCATCAGTCACCCCTGTTCCCAGCCCTCCTTAGAAAAGCT
TAGCTTGGG (配列番号52)

VL1.4 アミノ酸配列:

MAWIPLLFSL LALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLHFTGLIGGTNNRAPGVP
ARFSGSLIGDKAALTIIIGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSLEKLSL (配列番号41)

VL1.5 DNA配列:

ATGGCCTGGATTCTCACTTTTACTCTCTCTCCTGGCTCTCA
GCTCAGGGGGCCATTTCCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC
TGCACCTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATG
CCAACCTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGG
TCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT

GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCC
TCACCATCACAGGGGCGACAGACTGAGGATGAGGCAATATA
TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAATTATTGGGTGTTTCGGT
GGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTT
CGCCATCAGTCACCCCTGTTTCCACCCCTCCACAGAAGAGCT
AAGCTTGGG (配列番号53)

VL1.5アミノ酸配列:

MAWISLLLSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVP
ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSTEELSL (配列番号42)

10

VL1.6 DNA配列:

ATGGCCTGGATTTCACTTATCTTCTCTCTCCTGGCTCTCA
GCTCAGGGGGCCATTTCCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC
TGCACTCACCCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATG
CCAACCTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGG
TCTAATAGGTGGTACCAGCAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCC
TCACCATCACAGGGGCGACAGACTGAGGATGAGGCAATATA
TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAATTATTGGGTGTTTCGGT
GGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTT
CGCCATCAGTCACCCCTGTACCCGCCCCTCTACAAAGGAGCT
TAGCTTGGG (配列番号54)

20

VL1.6アミノ酸配列:

MAWISLIFSLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTSNRAPGVP
ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLYPPSTKELSL (配列番号38)

30

VL1.7 DNA配列:

ATGGCCTGGACTTCTCTCTTATTCTCTCTCCTGGCTCTCA
GCTCAGGGGGCCATTTCCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC
TGCACTCACCCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATG
CCAACCTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTGG
TCTAATAGGTGGTACCACAACCGAGCTCCAGGTGCTCCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCC
TCACCATCACAGGGGCGACAGACTGAGGATGAGGCAATATA
TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAATTATTGGGTGTTTCGGT
GGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTT
CGCCATCAGTCACCCCTGTGCCCGCCCCTCTACAGAAAAGCT
AAGCTTGGG (配列番号55)

40

VL1.7アミノ酸配列:

MAWTSLLFSLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGAP
ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLCP PSTEKLSSL (配列番号40)

【0179】

実施例7-InflaMabデザイン-IL-1R1およびNLRP3の両方に対する
二重特異性抗体の開発

50

モノクローナル抗体 I L - 1 R 1 および N L R P 3 の可変ドメイン配列の配列を決定した。

I g G 2 a マウス定常ドメイン配列を有する I L - 1 R 1 抗体を用いて抗体を構築した短いリンカーを重鎖の C 末端に付加し、リンカー (G G G G S) ₃ を有する s c F v フォーマットの N L P R 3 可変ドメインを結合して二重特異性を作り出した。DNA およびアミノ酸配列は以下で見つけることができる。

【0180】

構築物を A T U M ベクター p D 2 6 1 0 - v 5 に挿入し、配列決定のより検証した。図 3 1 は、I n f l a m a b の二重特異性設計およびプラスミドマップを示す。

【0181】

デザインした二重特異性抗体配列

軽鎖 DNA 配列：

```
ATGGGTCAGCTCTGCTCAATTTCTCGGACTCCTTCTTCTGT
GCTTTTCAAGGAACACGCTGCGATATTGTGATGACCCAGTC
CCCCGCCACCCCTGTCCGTGACTCCGGGCGACCGGGTGTCC
CTGTCGTGCCGGGCATCACAGAGCATCTCCGACTACCTGT
CGTGGTACCAAGCAGAGATCACACGAGAGCCCTCGCCTGAT
CATCAAATACGCCAGCCAGTCAATCTCCGGCATCCCCCTCG
CGGTTCTCCGGGTCCGGTTCCGGCTCCGACTTCACACTGT
CCATTAACCTCCGTGGAACCTGAGGACGTGGGAGTGTACTA
CTGTCAACACGGCCATTCTGTTCCCGCTGACTTTCGGGTCG
GGAACCAAGCTGGAATTGAAGAGGGCGGACGCGGCCCTTA
CCGTGTCAATTTTCCCAACCGAGCTCCGAACAGCTCACCAG
CGGCGGGTGCCTCGGTCTGTGTGCTTCTCTCAACAACTTCTAT
CCAAAAGACATTAACGTCAAGTGGAAGATCGATGGATCGG
AGAGACAGAACGGAGTGCTGAACAGCTGGACTGATCAGGA
CTCCAAGGATTCTGACCTACTCCATGAGCTCCACTCTGACC
CTGACCAAGGACGAATACGAGCGGCACAATTCTTACACTT
GCGAAGCCACCCACAAGACCTCAACGTCCCCCATCGTGAA
GTCCTTCAACCGCAACGAGTGTTGATAA (配列番号 56)
```

【0182】

軽鎖アミノ酸配列：

```
MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSL
SCRASQSISDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPSR
FSGSGSGSDFTLINSVEPEDVG VY YCQHGH S F P L T F G S
G T K L E L K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y
P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T
L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C * * (配列番号 57)
```

【0183】

重鎖 DNA 配列：

```
ATGGGGCTGGACCCCTCGTGTTCTCTGTTCTCTGCTGAGCGTGA
CGGCGGGCGTGCACTCCCAAAATCCAGCTTGTGCAGTCCGG
ACCCGAGCTCAGGAAGCCGGGCGAAACTGTGCGCATCAGC
TGCAAGGCTTTCAGGGTACCCTTTTCAACACCGCCGGGCTGC
AATGGGTGCAGAAAGATGTCCGGGAAGGGTCTGAAGTGGAT
CGGATGGATGAACACCCAGTCCGAAGTGCCTAAATACGCC
GAAGAATTCAAGGGCCGCATTGCGTTCAGCCTGGAGACAG
CCGCCTCGACCGCGTACCTTCAGATCAACAATCTCAAGAC
TGAGGACACTGCCACCTACTTCTGTGCCAAGAGCGTGTA C
```

10

20

30

40

50

TTCAACTGGAGATACTTCGACGTGTGGGGCGCCGGGAACCA
CCGTGACCGTGTCCAGCGCCAAGACTACCGCCCCGAGCGT
GTACCCTCTGGCGCCAGTGTGCGGCGACACGACTGGCAGC
TCGGTGACCTTGGGGCTGCCCTCGTGAAGGGTTACTTCCCCG
AGCCCCGTGACTCTGACTTTGGAACCTCGGGCTCACTGTCTC
CGGAGTGCATACCTTCCCGGGCTGTGCTGCAAAGCGACCTC
TATACCTTGTTCATCGTCCGTGACTGTGACCTCCTCCACCT
GGCCGTCCCAGAGCATCACCTGTAATGTCGCCCCACCCTGC
TTCATCGACTAAGGTCGACAAGAAGATCGAGCCCAGAGGA
CCTACCATCAAGCCCTGCCCGCCCTGCAAATGCCCGGGCCC
CAAACCTTGCTGGGAGGGGCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCC
GAAAATCAAGGACGTGCTGATGATCTCCCTGAGCCCAATT
GTCACCTTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCGAAGATGACCCAG
ATGTGCGAGATTTTCATGGTTTCGTGAACAACGTCGAAGTCCA
TACCGCACAGACCCAGACCCACCGCGAGGATTACAACCTCG
ACGCTGCGCGTCTGTCAGCGCCCTGCCGATTTCAGCACCCAGG
ATTGGATGAGCGGAAGGAATTCAAGTGCAAAGTCAACAA
CAAGGACCTTCCGGCGCCGATCGAACGGACCATCTCGAAG
CCTAAGGGATCAGTGCGGGCGCCTCAGGTCTACGTGCTCC
CGCCTCCGGAAGAGGAAATGACCAAGAAACAAGTCACCCT
GACTTGTCATGGTCAACCGACTTCATGCCTGAGGACATCTAT
GTGGAGTGGACTAACAAACGGAAAGACTGAACTGAACTACA
AAAACACCGAACCAGTGCTGGACTCTGACGGCTCCTACTT
CATGTACTTCGAAGCTGCGGGTGGAGAAGAAAACTGGGTG
GAACGAAACTCCTACTCGTGTTCGTGGTGCACGAGGGTCT
TGCAACAACCAACCATACCAACCAAGTCTTCTCCCGGACCCC
CGGAAGGGGATCCGCCGGGGGATCCGGAGGGGACTCCGAA
GTGCAACTGGTGGAGTCCGGGTGGCGGACTCGTGAAGCCCG
GGGGGTCAATTGAAGCTTTCTCTGTGCTGCCCTCCGGTTTTCAC
TTTCTCCGACTATTACATGTACTGGGTGAGACAGACCCCG
GAGAAGCGGCTCGAATGGGTGGCCACCATTTTCGGACGGTG
GAACCTACACTTACTACCCTGACTCCGTCAAGGGCCGGTT
TACTATCTCCCGCGACAACGCGAAGAACAATCTGTACCTC
CAAATGAACTCCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCCATGTACT
ATTGCGCAAGGGGATGGGTGAGCACTATGGTCAAGCTGCT
GTCATCCTTCCCTTACTGGGGACAGGGGAACCTTGTGACT
GTGTCAGCCGGTGGCGGGGGGTCCGGGCGGCGGCGGTTCGG
GTGGAGGGGGATCCCAGGCCGTCTGTGACCCAAGAGTCCGGC
TCTGACTACTTCAACCCGGAGAAACCGTGACCTTGACATGC
CGCTCCTCCACTGGCGCAGTGACCACGAGCAATTACGCCA
ACTGGGTGCAGGAAAAGCCCGATCACCTGTTCACTGGACT
CATTGGGGGAACCAACAACCGGGCGCCGGGCGTGCCCGCT
CGGTTTAGCGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCCGCCCTGA
CTATCACCGGAGCCCAGACCGAAGATGAAGCCATCTACTT
TTGCGCACTCTGGTACTCTAACTACTGGGTGTTTGGCGGC
GGAACCAAGCTGACTGTGCTCGGACAGCCGAAGTGATAAA
A (配列番号58)

【0184】

重鎖アミノ酸配列：

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQIQLVQSGPELRKPGETVRIS

10

20

30

40

50

CKASGYPTTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLIKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS
SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL
YTLSSSVTVTSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLISLSPI
VTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNS
TLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK
PKGSVRAPQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY
VEWTNNGKTELNKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKKNWV
ERNSSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGSAGGSGGDSE
VQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTP
EKRLIEWVATISDGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNNLYL
QMNSLKSEDTAMYYCARGWVSTMVKLLSSFYWGQGTLLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQESALTTSPGETVTLTC
RSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA
RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGG
GTKLTVLGQPK** (配列番号59)

【0185】

実施例8-InflaMab (IL-1R1およびNLRP3に対して二重特異性) 一過性発現

目標は、InflaMabベクターDNAのExp CHO細胞への一過性遺伝子導入を実施することであった。培養後、発現したInflaMabを培養上清から精製し、QC分析を精製タンパク質に対し実施した。

InflaMabは、軽鎖の2つの対および重鎖の2つの対から構成され、N末端に融合されたscFvドメインを有し、ジスルフィド結合を介して一緒に複合体化された、210キロダルトン(kDa)の二重特異的マウス抗体である。InflaMabをコードする哺乳動物発現ベクターをExp CHO細胞に遺伝子導入した。その後、発現した抗体を、Protein A親和性クロマトグラフィーを介して清澄化培養上清から精製した。精製抗体の濃度をNanoDrop Lite、ThermoFisherを用いて測定し、純度をSDS-PAGEにより評価した。

【0186】

配列

InflaMabのアミノ酸配列をコードするDNAを合成し、哺乳動物一過性発現プラスミドpD2610-v5 (Atum) に挿入した。

プラスミドInflaMab:

>InflaMab軽鎖 (理論MW=26.7kDa)

MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQSPATLSVTPGDRVSL
LSCRASQSI SDYLSWYQQRSHESPRLIIKYASQSISGIPSR
RFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQHGHSFPLTFGS
GTKLELKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (配列番号57)

>InflaMab重鎖 (理論MW=79.3kDa)

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQIQLVQSGPELRKPGETVRIS
CKASGYPTTTAGLQWVQKMSGKGLKWIGWMNTQSEVPKYA
EEFKGRIAFSLETAASTAYLQINNLIKTEDTATYFCAKSVY
FNWRYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS
SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL

Y T L S S S V T V T S S T W P S Q S I T C N V A H P A S S T K V D K K I E P R G
P T I K P C P P C K C P A P N L L G G P S V F I F P P K I K D V L M I S L S P I
V T C V V V D V S E D D P D V Q I S W F V N N V E V H T A Q T Q T H R E D Y N S
T L R V V S A L P I Q H Q D W M S G K E F K C K V N N K D L P A P I E R T I S K
P K G S V R A P Q V Y V L P P P E E E M T K K Q V T L T C M V T D F M P E D I Y
V E W T N N G K T E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M Y S K L R V E K K N W V
E R N S Y S C S V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G K G S A G G S G G D S E
V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y Y M Y W V R Q T P
E K R L E W V A T I S D G G T Y T Y Y P D S V K G R F T I S R D N A K N N L Y L
Q M N S L K S E D T A M Y Y C A R G W V S T M V K L L S S F P Y W G Q G T L V T
V S A G G G G S G G G G S G G G G S Q A V V T Q E S A L T T S P G E T V T L T C
R S S T G A V T T S N Y A N W V Q E K P D H L F T G L I G G T N N R A P G V P A
R F S G S L I G D K A A L T I T G A Q T E D E A I Y F C A L W Y S N Y W V F G G
G T K L T V L G Q P K (配列番号59)

【0187】

CHO細胞の一過性遺伝子導入

懸濁適応 (Suspension adapted) ExpiCHO細胞 (Thermo Fisher, UK) を通常の方法で、37℃、8%CO₂下、135rpmで撹拌しながら、500mlのエrlenマイヤーベントフラスコ中で、2～3日毎に1.0～3.0 × 10⁵個の細胞/mlで培養した。Purelink Hipure plasmid filter maxiprep kit (Thermo Fisher, UK) を用いて、製造業者の説明書に従って、遺伝子導入用のプラスミドDNAを単離した。Nano Drop lite 光度計を用いて、製造業者の説明書に従い、DNAを定量した。

【0188】

遺伝子導入の24時間前に、ExpiCHO細胞を4.0 × 10⁶個の細胞/mlの濃度でExpiCHO発現培地中に播種し、135rpm、37℃、8%CO₂下で、一晚増殖させた。遺伝子導入の日に、250mlのExpiCHO細胞をExpiCHO発現培地中で最終密度の6.0 × 10⁶個の細胞/mlに希釈した。1.0 μg/mlのプラスミドDNAおよび0.32% (v/v) Expifectamine CHO試薬 (Thermo Fisher) を、4% (v/v) Optipro SFM (Thermo Fisher) 中に別々に希釈した。Expifectamine CHO/Optipro複合体をプラスミドDNA/Optipro複合体に滴加した。遺伝子導入混合物をExpiCHO細胞に直ちに添加した。遺伝子導入した細胞を135rpm、37℃、8%CO₂下で一晩インキュベートした。

【0189】

遺伝子導入の20時間後、培養物に0.6% (v/v) ExpiCHOエンハンサー (Thermo Fisher, UK) および24% ExpiCHOフィード (Thermo Fisher, UK) を補充した。細胞の生存率を厳密に監視し、室温、4000rpmで40分間の遠心分離により8日目に培養物を回収した。

【0190】

InflaMabの精製

AKTA (GE Healthcare) クロマトグラフィー装置を用いて精製を行った。使用前に、1MのNaOHを用いて全てのAKTA装置を完全に消毒した。遠心分離後に、濾過した (0.22 μm) 細胞培養上清を1mlのHiTrap Protein Aカラム (洗浄バッファーと平衡化されている) を備えたAKTAシステムに適用した。充填後、カラムを20カラム体積の洗浄バッファーで洗浄した。結合抗体を10カラム体積の溶出バッファーで段階溶出した。全ての溶出画分をトリスpH9.0バッファーで中和した。溶出ピークに相当する溶出画分をPBSへの一晩の透析のために選択した。抗体の純度は、SDSポリアクリルアミドミディゲルにより判定して、>95%であった。

【0191】

SDS-PAGE分析（図32参照）

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動（SDS PAGE）を精製された抗体に対し標準的方法で実施した。分子量マーカーは、キロダルトンで示される。図32のレーンは次の通りである：

【表10】

レーン番号	試料	バッチ	量（ μg ）	条件
1	PageRuler Plus (Thermo Fisher)	NA	NA	還元
2	InflaMab	1	5	還元
3	ブランク	NA	NA	還元
4	InflaMab	1	5	非還元

10

【0192】

InflaMabは、SDSポリアクリルアミドゲルの分析により判定して、 $\geq 95\%$ である。還元条件下で、抗体の重鎖および軽鎖の両方は、目視可能であり、それぞれ約80および27kDaの予測された分子量で観察された。非還元条件の場合は、ただ1つのより大きいバンドおよびいくつかのより小さいバンドが観察された。追加のバンド（不純物）は、非グリコシル化されたIgGおよびIgG分解生成物の結果の可能性がある（例えば、単一の〔部分的〕軽鎖、2つの重鎖および1つの軽鎖、2つの重鎖、2つの重鎖と1つの軽鎖の組み合わせ）。

20

【0193】

精製されたInflaMabの評価

精製されたInflaMabをNanodrop Lite 分光光度計および吸光係数330、 $685\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （または $1.0\text{mg}/\text{ml} = \text{A}280$ の1.7 [MW=184, 276Daを仮定して]）を用いて、製造業者の説明書に従って定量した。0.3リットルの遺伝子導入細胞培養上清から合計17.5mgのInflaMabを精製した。

【表11】

表3：250mlの遺伝子導入に由来する抗体InflaMabの濃度および収率

試料	バッチ	培養上清 みの体積 (L)	濃度 (mg/ml)	体積 (ml)	合計 (mg)	収量 (mg/L)	エンドト キシン (EU/mg)
InflaMab	1	0.3	3.15	5.57	17.55	58.49	ND

30

【0194】

まとめ：InflaMab

材料：精製抗体

起源：チャイニーズハムスター（学名：モンゴルキヌゲネズミ）卵巣細胞株（ハムスターまたは動物成分添加せず）で産生

40

【表 1 2】

結果	
純度：	≥95%純度（S D S ポリアクリルアミドゲルで測定 [図 1]）
エンドトキシン（EU/mg）：	測定せず
濃度（mg/ml）：	3.15（280nmでの吸光度測定により決定）
マイコプラズマ：	測定せず
パッケージ内容物および貯蔵推奨条件	
体積（ml）：	5.57
合計（mg）：	17.55
容器：	2 ml チューブ x 3
容器当りの体積：	2.0 ml x 2; 1.57 ml x 1
正味重量：	測定せず
製剤：	0.2 μm 滅菌濾過PBS中溶液として提供。
出荷：	アイスパック（+4℃）
貯蔵：	4℃冷蔵

10

無害、非感染性。研究用途限定。

【0195】

20

I n f l a m a bはIL-1β放出を防止する（図33aおよびb参照）。図33aおよびbに関し、THP1細胞は、96ウェルプレート中、100,000個の細胞/200μlの完全培地で培養された。PMA（100μg/mlで72時間）を用いてTHP-1細胞をマクロファージに分化させた。24時間の静置後、分化したTHP1細胞をLPS（1μg/ml）で3時間刺激し、図MCC950（1μM）または0.0025ng/ml~2.5ng/mlの用量依存方式でIL-1R1/NLRP3 Abを用いて（図33a）、またはIL-1R1/NLRP3 Ab（1nM）を用いて（図33b）、またはIgG対照抗体を用いて、30分間処理し、続けて、ATP（5mM）で1時間処理した。上清中のIL-1β放出をELISAにより測定した。

【0196】

30

I n f l a m a bはTHP1細胞中のカスパーゼ1の活性化を防止する（図34参照）。図34に関し、THP1細胞は、96ウェルプレート中、100,000個の細胞/200μlの完全培地で培養された。PMA（100μg/mlで72時間）を用いてTHP-1細胞をマクロファージに分化させた。24時間の静置後、分化したTHP1細胞をLPS（1μg/ml）で3時間刺激し、IL-1R1/NLRP3 Ab（1μg/ml）を用いて30分間処理し、続けて、ATP（5mM）で1時間処理した。カスパーゼ1の非細胞傷害性蛍光標識阻害剤（FAM-FLICA）およびDAPI（核染色）を用いて細胞を染色することにより、カスパーゼ1活性化を評価した。細胞をLPS単独（陰性対照）、LPS+ATP（陽性対照）、マウスIgG2a（1μg/ml、Ab対照）、またはIL-1r/NLRP3二重特異的Ab（1μg/ml、実験用）で処理した。各群の代表的共焦点画像を示す。緑色=活性カスパーゼ1および青色=Dapi/核染色。

40

【0197】

I n f l a m a bの内部移行（図35参照）。図35に関し、THP1細胞は、96ウェルプレート中、100,000個の細胞/200μlの完全培地で培養された。THP1細胞の分化は、PMA（100μg/mlで72時間）により誘導された。24時間の静置後、分化したTHP1細胞をLPS（1μg/ml）で3時間刺激し、pHrodo red標識IL-1r/NLRP3 Ab（1μg/ml）を用いて30分間処理し、続けて、ATP（5mM）で1時間処理した。内部移行した場合のみに蛍光を発するpHrodo red標識二重特異的Abを用いて、Abの内部移行を追跡した。（A）代表的共焦点画像は、分化したTHP1細胞中のpHrodo red標識二重特異的Abの内

50

部移行を示す。(B) 代表的共焦点画像は、Abを内在化させなかったTHP1細胞(緑色のみ)と比較して、二重特異的Ab(赤色、白色矢印)を内部移行させたTHP1細胞中のカスパーゼ1活性化(緑色)の有意な減少を示す。

【0198】

実施例9－緑内障のためのNLRP3の標的化

背景および重要性

緑内障は、世界中の不可逆的失明の主要な原因であり、網膜神経節細胞(RGC)の進行性消失を特徴とする。最近の研究は、現在、世界中で約6千万人が緑内障に罹患していると推定しており、急速に拡大する加齢集団に伴い、この数字は、2040年までに1億人を超えると予測されている[1]。都合の悪いことに、緑内障の治療はなく、全てのタイプの緑内障に対して、眼圧(IOP)低下が唯一の治療戦略として残されている[2]。しかし、高IOPは緑内障の発症の主要なリスク因子ではあるが、IOPの低下だけでは疾患進行を防げず、IOPの低下に成功した後であっても、依然として、多くの患者は顕著な視力喪失を経験する[3]。さらに、正常眼圧緑内障の発生率の増大[4, 5]および一部の高いIOPを有する患者における神経変性の非存在[6]は、IOP非依存性機序も同様に、緑内障の発症と進行に寄与することを示し、疾患進行を防ぎ、視覚を維持するために、IOP非依存神経保護療法の開発の必要性を強調する。

【0199】

緑内障は、複雑な多因子性疾患であり、軸索変性およびRGC細胞死を媒介する正確な機序は十分に理解されていないが、視神経乳頭(ONH)中で軸索損傷がRGCに先行するという証拠が増えてきている[7, 8]。さらに、ONH中の軸索損傷は、グリア活性化および炎症と関連付けられてきた[9, 10]。ヒトおよび緑内障の実験モデルでは、活性化星状膠細胞[10, 11]および活性化ミクログリア[9, 12]が、ONH中で検出され、IL-1 β およびTNF α などの炎症促進性サイトカインおよび一酸化窒素(NO)、活性酸素種(ROS)、およびグルタミン酸などの神経毒性メディエーターの発現増大と同時に起こる[12-14]。しかし、どの程度高められたIOPがグリア活性化を誘発するか、およびどのようにして炎症性のカスケードが増幅され、持続されるかは、十分に理解されていない。

【0200】

NLRP3インフラマソームは、感染微生物により生成されたシグナル、ならびに細胞ストレスおよび組織損傷に関連する内在性シグナルに応答して炎症を誘発する、細胞内多タンパク質複合体である[15]。NLRP3インフラマソームの調節不全は、アルツハイマー病および多発性硬化症を含むいくつかの神経変性疾患に結びつけられてきた[16]が、ごく最近では、NLRP3インフラマソームの活性化は、網膜虚血再灌流障害および視神経挫滅後のRGC細胞死に結びつけられてきた[17, 18]。

【0201】

結果

グリア活性化および炎症が早期軸索損傷に結びつけられてきた、ONH領域に特に注目すると、NLRP3がマウスおよびヒトのONHで構成的に発現していることが示され[図36]、星状膠細胞特異的発現が、ヒトONH中でNLRP3と星状膠細胞特異的マーカーGFAPの共局在化を示す免疫蛍光法により確認された[図37]。マイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルを蛍光レポーターマウスと共に使用して、インフラマソームインビボ活性化を追跡することにより[19, 20]、NLRP3インフラマソーム活性化は、IOP上昇後、早期にONH中で起こり、ONH中の炎症性メディエーターの誘導と同時に起こることが示された[図38]。NLRP3インフラマソームの不可欠な成分であるASCアダプター蛋白質(ASC KO)を欠くノックアウトマウスを用いて、炎症メディエーターの初期誘導およびONH中のIba1+免疫細胞の蓄積が、インフラマソーム活性化依存であることが示された[図39]。さらに、NLRP3を特異的に欠く(NLRP3 KO)マウスを用いて、NLRP3が、マイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルにおいて、軸索変性およびRGC細胞死を特異的に媒介することが示された[20][図4

10

20

30

40

50

0]。しかし、最も臨床的に意味のある研究は、商業的に入手できるNLRP3小分子阻害剤(MCC950)[21]を用いたマウスの全身性治療は、マイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルでRGC細胞死を防止することが明らかとなった[図41]。この研究は、NLRP3の薬理学的標的化が緑内障の神経保護の治療薬として機能し得るという概念実証を提供する。しかし、極めて短い半減期のために、MCC950は、長期の研究期間にわたり1日おきに全身投与をしなければならず、さらに、インフラマソームは、感染症に対する宿主防御において不可欠な役割を果たすために、緑内障の有望な治療薬として、加齢集団におけるNLRP3インフラマソームの全身的遮断は理想的とはいえない[15, 22]。RGCおよびそれらの軸索に限定されている疾患である緑内障では、阻害剤の硝子体への局所送達が生理的であろうが、硝子体内注射回数を制限するために、より長い半減期を有する阻害剤が必要となろう。小分子より長い半減期を有する生物製剤が知られており[23]、眼科で加齢黄斑変性などの眼疾患後ようのために生物製剤の局所投与を使用する強力な先行例が存在する。

【0202】

インビトロ試験は、Inflamab(NLRP3/IL1R1)のインフラマソーム活性化を阻害する能力を明確に示し(図33a~図35)、インビボ試験は現在進行中で、マイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルの硝子体内に投与した場合に、Inflamab(NLRP3/IL1R1二重特異性抗体)の神経保護効果を評価している。現在の試験では、WT C57BL/6Jマウスは、Inflamabの単回硝子体内注射(最終硝子体中濃度2.5、25、または250ng/ml)を、マイクロビーズ注射直前の0日目に受け、生理食塩水のみ(ビーズなし)を受けたマウスは、非緑内障対照として機能する。RGC機能は、現在、げっ歯類用の完全一体化ERGシステム(Celeris)を用いてpERGにより測定されている。マイクロビーズのみを受けたマウスのpERG振幅の変化が測定され、マイクロビーズ+Inflamab(最終硝子体濃度2.5、25、および250ng/ml)または生理食塩水のみ(ビーズなし)を受けたマウスと比較される[図42]。これらの試験では、予備的pERG結果は、マイクロビーズのみ、またはマイクロビーズ+2.5もしくは25ng/mlのInflamabに比べて、最終硝子体濃度250ng/mlのInflamabで治療されたマイクロビーズ注射マウスでRGC機能の回復を示した。視運動反射ベース空間周波数閾値試験を用いた視力測定、ならびにRGCおよび軸索定量化を実施し、Inflamabおよび追加の対照群(適切なIgG対照抗体により治療したマイクロビーズ注射マウス)を含む神経保護効果をさらに実証する。

【0203】

NLRP3は、マウスおよびヒト視神経乳頭で構成的に発現されている(図36参照)。(A)タンパク質溶解物をWT C57BL/6JマウスのONH組織から調製し、NLRP3(赤)を負荷対照としてのactin(緑)と共にイムノブロットングに供した。C57BL/6J WTマウス由来の結膜(conj)を陽性対照として用い、NLRP3 KOマウスからのONHおよび結膜組織を陰性対照として使用した。ウェスタンブロット分析は、NLRP3が非緑内障マウスONH中で構成的に発現していることを示す。(B)非緑内障ヒト視神経の切片の免疫組織化学的検査は、視神経乳頭の篩状板領域のNLRP3(赤)の構成的発現を示し、視神経のミエリン化部分では構成的発現はない。

【0204】

NLRP3は、正常な(非緑内障)ヒトの眼の視神経乳頭星状膠細胞で構成的に発現されている(図37参照)。ヒト視神経の切片の免疫蛍光法は、視神経乳頭の非ミエリン化篩状板領域中でNLRP3(赤)と星状膠細胞特異的マーカーGFAP(緑)の共局在化を示す。Dapi(青)を用いて全ての有核細胞を特定した。画像は、3個の個別(非緑内障)ヒト視神経から得られた視神経切片に対し実施された代表的染色である。

【0205】

ONH中のNLRP3インフラマソーム構築は、マイクロビーズ注射の7日後の炎症メディエータの誘導と同時に起きる(図38)。蛍光レポーターマウスを用いて(ASCシ

10

20

30

40

50

トリン／Cre+) ASCスペック形成をインビボで監視した。(A) マイクロビーズまたは対照としての生理食塩水注射の7日目に、凍結眼切片をGFAP (星状膠細胞、ピンク)、MBP (ミエリン、赤) およびDAPI (青) で染色した。(B) ASCシトリンスペック (緑) の合計数をONH領域 (ONHの上端からミエリン化ゾーン (点線)) および神経網膜中でImage Jを用いて計数した (眼当りN=5切片)。生理食塩水に比べて、マイクロビーズの7日後に、ASCシトリンスペックの数の有意な増大がONH中で観察されたが、網膜中では観察されなかった。*** $P<0.001$ 、群当たりN=4。(C) NLRP3による染色は、生理食塩水注射対照眼のONH中でNLRP3 (赤) およびASC (緑) の構成的発現を示したが、ASCおよびNLRP3は、供局在化していない (マージ像) ことを示す。対照的に、マイクロビーズ注射の7日後、ASCシトリンスペックは、NLRP3と供局在化し (マージ像中の黄色染色)、インフラマソーム構築およびNLRP3の活性化を示している。(D) マイクロビーズ注射の7日後のONHおよび網膜組織に対する定量的PCRは、注射しなかった反対側の眼に比べて、ONH中でGFAP、IL-1 β 、IL-18、およびTNF α の有意な増大を示したが、網膜中では増大を示さなかった (対照に対する倍率)。N=5マウス/群 (qPCR)、* $P<0.05$ 、** $P>0.001$ 、*** $P<0.001$ 。

【0206】

IOP上昇後のWTおよびASC KOマウス中のマクロファージ浸潤および炎症性遺伝子発現 (図39参照)。(A) 凍結切片 (眼当り3切片) をWTおよびASC KO眼から、マイクロビーズ注射の0、7、および14日目後に採取し、Iba1+細胞 (マクロファージ/ミクログリア) の合計数をONH領域 (ONHの上端からミエリン化ゾーンまで) で計数した。(B) 結果は、マイクロビーズ注射後のD7およびD14のWTのIba1+細胞の有意な増大を示すが、ASC KO ONHでは増大を示さない。(C) マイクロビーズ注射の7日および14日後のONH組織に対する定量的PCRは、注射しなかった反対側の眼に比べて、WT中でIL-1 β およびIL-18のmRNAレベルの有意な増大を示した (対照の倍率)。炎症性遺伝子発現のこの増大は、ASC KOマウスでは、完全に抑止された。N=5マウス/群 (免疫蛍光法) およびN=6~8マウス/群 (qPCR)、* $P<0.05$ 、** $P>0.001$ 、*** $P<0.001$ 。

【0207】

WT、ASC KO、およびNLRP3 KOマウスにおけるRGCおよび軸索分析 (図40参照)。C57BL/6J WT、ASC KO、およびNLRP3 KOマウスは、無菌ポリスチレンマイクロビーズ (7.2 $\times 10^6$ 、15 μ m) または対照としての生理食塩水の前眼房注射を受けた。注射を受けていない反対側の眼を陰性対照として使用し、リバウンドトノメーター (Tonolab) を用いて、IOP測定を3日毎に4週間続けた。(A) IOP分析は、生理食塩水および注射を受けていない反対側の対照に比べて、マイクロビーズ注射WT、ASC KO、およびNLRP3 KOマウスでIOPの有意な増大を示し、WT、ASC KO、およびNLRP3 KOマウス間のマイクロビーズ誘導IOPの経時変化または大きさの有意差は認められない。(B) マイクロビーズ注射の4週間後でのRGC密度を β -IIIチューブリン (%RGC特異的マーカー) で染色した網膜フラットマウントで定量し、データを注射を受けていない反対側の眼と比較して、%RGC生存として表した。(C) PPDで染色した視神経中の軸索密度を定量し、データを注射を受けていない反対側の眼と比較して、%軸索生存として表した。N=8~10/群、**** $P<0.0001$ 。

【0208】

NLRP3阻害剤MCC950で治療したWTマウス中のRGC分析 (図1参照)。MCC950 (小分子NLRP3阻害剤) での治療がマイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルのRGC細胞死を防ぐことができるかどうかを判定するために、WT C57BL/6Jマウスは、MCC950の腹腔内注射 (10mg/kg、0日目に開始) を1日おきに4週間受けた。注射を受けていない反対側の眼およびピークのみを受けたマウスは、陰性対照としての役割を果たす。(A) IOP分析は、ビーズのない対照に比べて、ピーク

ルまたはMCC950で治療されたマイクロビーズ注射WTマウスは、ビーズのない対照に比べて、有意なIOPの増大を示し、ピークルおよびMCC950治療マウス間でマイクロビーズ誘導IOPの経時変化または大きさの有意差は認められない。(B) RGC特異的マーカーBrn3a (赤) および核マーカーDapi (青) で染色した、マイクロビーズ注射の4週後の網膜フラットマウントの代表的共焦点画像。(C) マイクロビーズ注射の4週後に、RGC密度が定量され、注射を受けていない (ビーズなし) 反対側の眼と比べて、ピークルのみを受けたマイクロビーズ注射WTマウスでRGC密度の有意な低下を示した。対照的に、MCC950で治療されたマウスは、RGC保護を示し、RGC密度は、注射を受けていない (ビーズなし) 対照と同じであった。N = 5 / 群、***P < 0.001。

【0209】

NLRP3阻害剤InflaMabで治療したWTマウスのRGC機能 (図42参照)。InflaMab (NLRP3 / IL-1R1) による局所治療がマイクロビーズ誘導緑内障マウスモデルのRGCを保護できるかどうかを判定するために、WT C57BL / 6Jマウスは、InflaMabの単回硝子体内注射 (最終硝子体中濃度2.5、25、または250 ng / ml) を、マイクロビーズ注射直前の0日目に受けた。生理食塩水のみ (ビーズなし) を受けたマウスは、正常な (非緑内障) 対照としての役割を果たした。RGC機能をげっ歯類用完全一体型ERGシステム (Celeris) を用いてpERGにより測定し、マイクロビーズのみを受けたマウスのpERG振幅の変化が測定され、マイクロビーズ+InflaMab (2.5、25、および250 ng / ml) または生理食塩水のみ (ビーズなし) を受けたマウスと比較された。N = 4 ~ 5 / 群。これらの試験は現在進行中である。本明細書で示される予備的pERG結果は、マイクロビーズのみ、またはマイクロビーズ+2.5もしくは25 ng / mlのInflaMabに比べて、最終硝子体濃度250 ng / mlのInflaMabで治療されたマイクロビーズ注射マウスでRGC機能の回復を示している。視運動反射ベース空間周波数閾値試験を用いた視力測定、ならびにRGCおよび軸索定量化も実施し、InflaMabおよび追加の対照群 (適切なIgG対照抗体により治療したマイクロビーズ注射マウス) の神経保護効果をさらに実証する予定である。

【0210】

参考文献

1. Tham YC, X Li, TY wong, HA Quigley, T Aung, CY Cheng. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040. Ophthalmol. 2014;121(911):2081-2090.
2. Casson RJ, G Chidlow, et al. Definition of glaucoma; clinical and experimental concepts. Clin Exp Ophthalmol. 2012;40(4):341.
3. Leske MC, A Heijl, M Hussein et al., Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. Arch Ophthalmol. 2003;121:48-56.
4. Mudumbai R. C. 2013. Clinical update on normal tension glaucoma. Sem. Ophthalmol. 28(3):173-179.
5. Song B. J., J. Caprioli. 2014. New directions in the treatment of normal tension glaucoma. Indian J. Ophthalmol. 62(5):529-537.
6. Leibowitz HM, DE Krueger, LR Maunder, et al. The Framingham Eye Study monograph: an ophthalmological and epidemiological stud

y of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973–1975. *Surv. Ophthalmol.* 1980;24 suppl:335–610.

7. Howell GR, RT Libby, TC Jakobs, RS Smith, FC Phalan, et al. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol.* 2007;179:1523–1537.

10

8. Buckingham BP, DM Inman, W Lambert, E Ogllesby, DJ Calkins et al. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2008;28:2735–2744.

9. Bordone MP, MF Gonzalez Fleitas, LA Pasquini, A Bosco et al. Involvement of microglia in early axoglial alterations of the optic nerve induced by experimental glaucoma. *J Neurochem* 2017;142:323–337.

20

10. Sun D, J Qu, TC Jakobs. Reversible reactivity by optic nerve astrocytes. *Glia.* 2013;61(8):1218–1235.

11. Hernandez MR, OA Agapova, P Yang, M Salvador-Silva, CS Ricard, S Aoi. Differential gene expression in astrocytes from human normal and glaucomatous optic nerve head analyzed by cDNA microarray. *Glia* 2002;38:45–64.

12. Yuan L, AH Neufeld. Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res.* 2001;64:523–532.

30

13. G. Tezel. 2006. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Pro Retin Eye Res* 25490.

14. Tezel, G, and MB Wax. 2003. Glial modulation of retinal ganglion cell death in glaucoma. *J Glaucoma* 12:63–68.

15. Mariathasan S, DM Monack. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:31–40.

40

16. Freeman LC, JP Ting. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neuroinflam* 2018;15(1):164.

17. Chi W, F Li, H Chen, Y Wang, Y Zhu et al. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production in acute glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(30):11181–6.

18. Puyang Z, L Feng, H Chen, P Liang, JB Tro

50

y, X Liu. Retinal Ganglion Cell Loss is Delayed Following Optic Nerve Crush in NLRP3 Knockout Mice. Sci Rep 2016;6:20998.

19. Tzeng TC, S Schattgen, B Monks, et al., A Fluorescent Reporter Mouse for Inflammasome Assembly Demonstrates an Important Role for Cell-Bound and Free ASC Specks during In Vivo Infection. Cell Re. 2016;16(2):571-82

20. Gregory-Ksander, MS, F Fei, A Krishnan, T Tzeng, et al. Destructive neuroinflammation triggered by activation of the NLRP3 inflammasome in the glaucomatous optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58(8):2021.

21. Coll RC, AAB Robertson, JJ Chae, SC Higgins, et al., A small molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome is a potential therapeutic for inflammatory diseases. Nat Med. 2015;21(3):248-255.

22. McGilligan VE, MS Gregory Ksander, L Dayu, JE Moore et al. Staphylococcus aureus Activates the NLRP3 Inflammasome in Human and Rat Conjunctival Goblet Cells. PLoS One, 2013;;8(9):e74010.

23. Hong Wan. An overall comparison of small molecules and large biologics in ADME testing. ADMET & DMPK 4(1)(2016)1-22.

[0211]

本発明は、本明細書で記載の実施形態に限定されるものではないが、本発明の範囲を逸脱することなく、修正または変更できる。

10

20

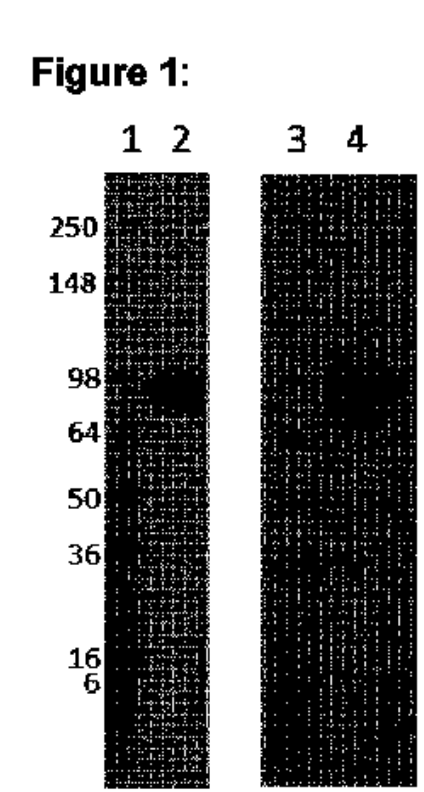
30

40

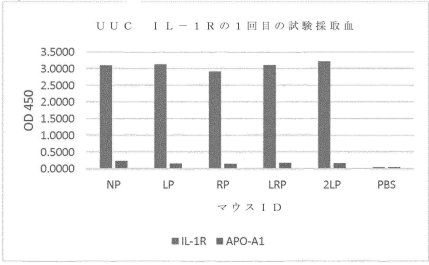
50

【図面】

【図 1】

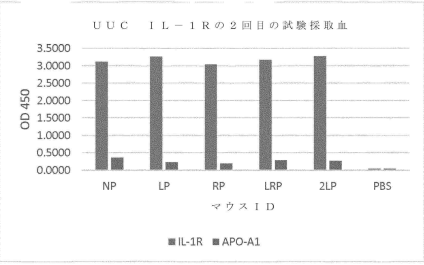


【図 2】

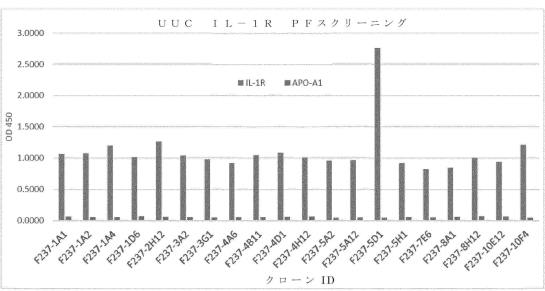


10

【図 3】



【図 4】

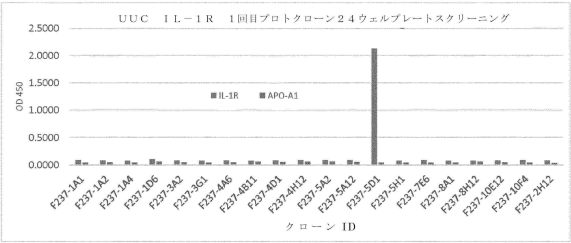


30

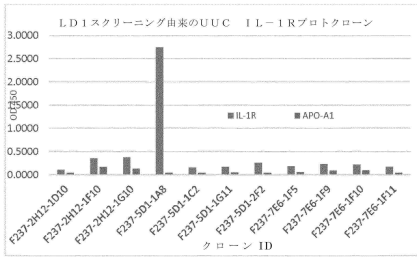
40

50

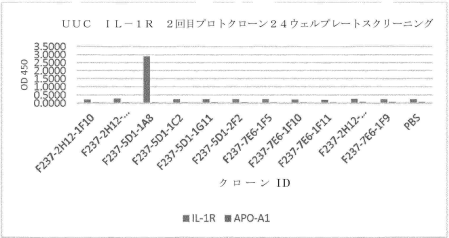
【図 5】



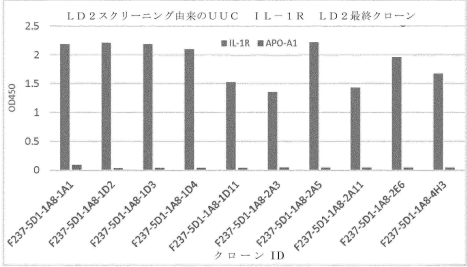
【図 6】



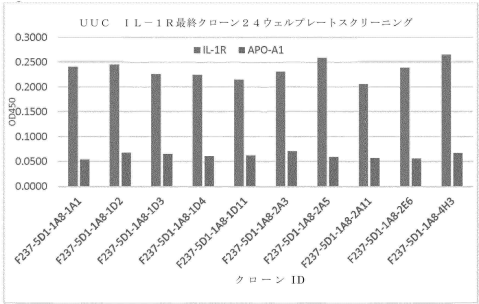
【図 7】



【図 8】

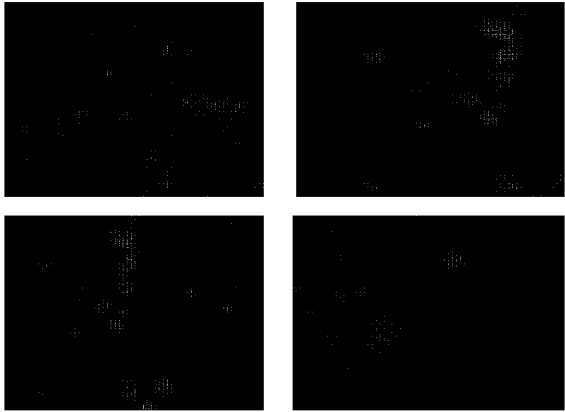


【図 9】



【図 10】

Figure 10:



10

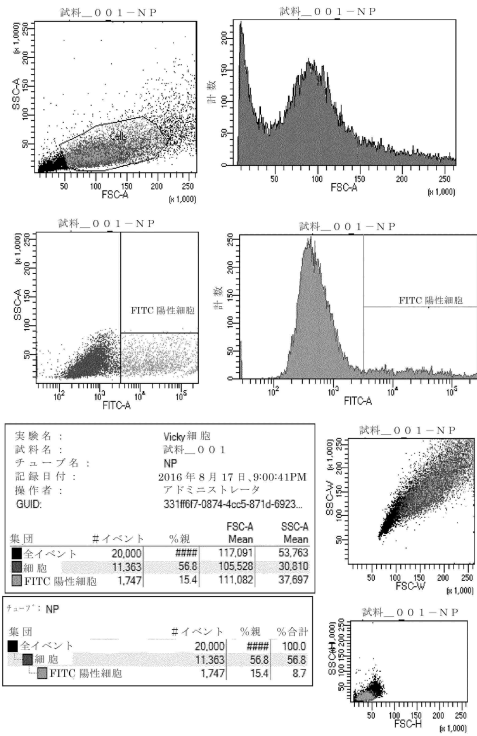
20

30

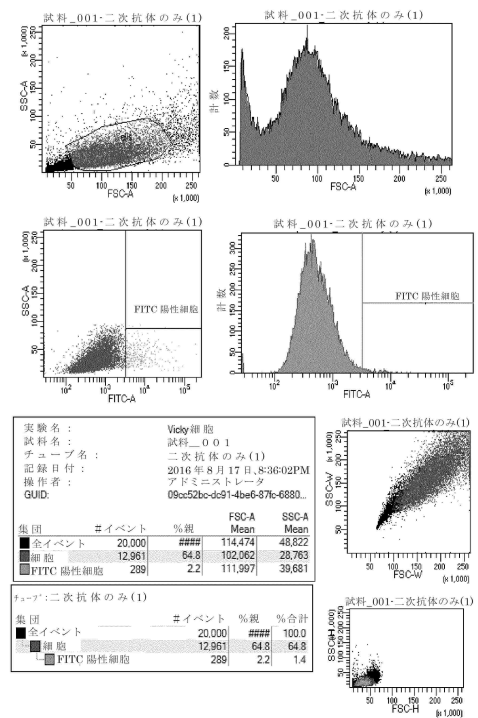
40

50

【図 1 1 - 1】



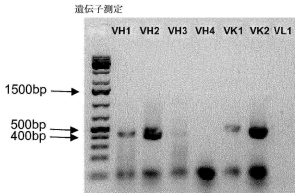
【図 1 1 - 2】



10

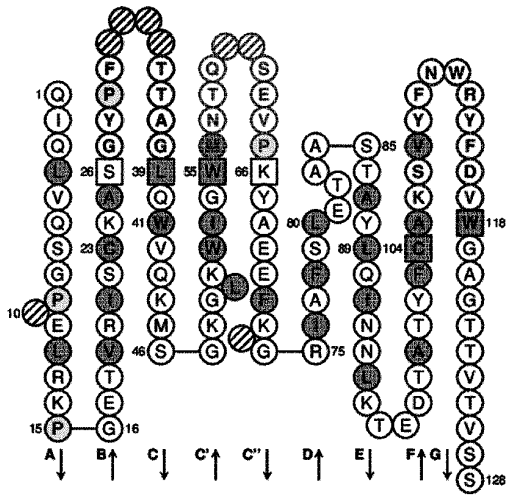
20

【図 1 2】



【図 1 3】

Figure 13:



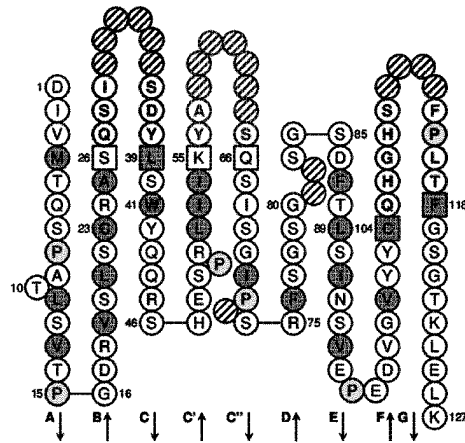
30

40

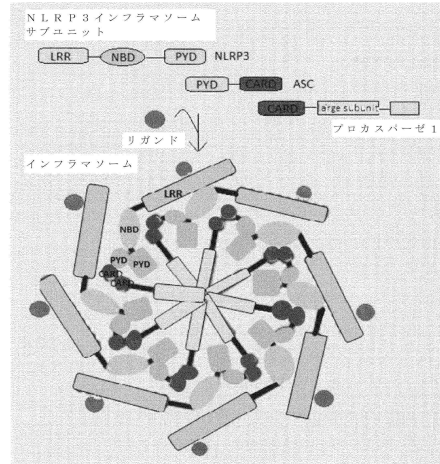
50

【図 14】

Figure 14:



【図 15】



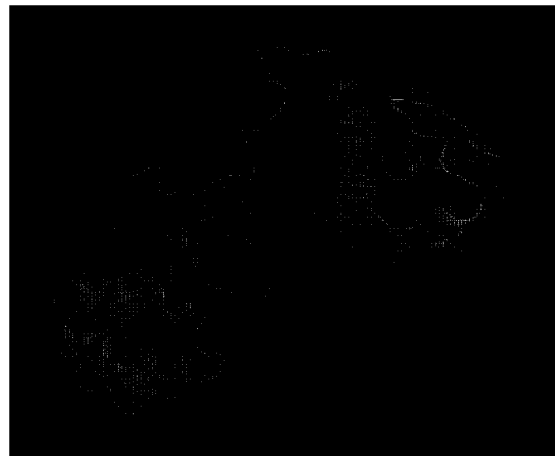
【図 16】

配列解析

```
SP|Q96P20|NALP3_HUMAN  FMASTRCKLARYLEDLEDVDLKKFFMHLEDYFPQKGCIPLPFGQTEKADHVDLATLMIDF 61
SP|Q84B8|NALP3_MOUSE  -MTSVCKRLAQYLEDLEDVDLKKFFMHLEDYFPKGCIPVFPFGQMEKADHLDLATLMIDF 59
SP|Q9C000|NALP1_HUMAN  MAGGAWKRLACYLELKKELKFFQLLAKAKHSSSSGRTPAQPEKTSQMEVASYVAQ 60
SP|Q9NX02|NALP2_HUMAN  SSAQMGNLQALLEGSLQDELSEFKYLLITTFSLARELQKIPKKEVKADGKQLVRLITTH 62
SP|Q8WX94|NALP7_HUMAN  TSPQLEWTLQTLLEGSLNEDELKSKFLMAFFLEDVLQKTPWSEVKADGKQLVRLITTH 61
SP|Q9MN2|NALP4_HUMAN  ASFFSDFGLMWYLEDLKKESFKFKELKQMTLQLELQIPWTEVKASREELANLIRK 62
SP|P59047|NALP5_HUMAN  SLTFSSYGLQCLVELDKESFQTFKELKKSSSESTCTSPQFEINANVECLALLHEY 116
SP|P59046|NAL12_HUMAN  AGDDGLHSTYLEDLAVLKKFKLYLQTA-TELSEKRIFWSSMEKAPLMAQLITH 63
SP|Q86W24|NAL14_HUMAN  SSFFPDGGLLYLELAKRELINTFKLLKETM-EPEHGLTPWNEVKARREDLANLRKY 65
SP|Q86W28|NALP8_HUMAN  PGSPCEGVMILMKNVSHSELQRKQLLTEL-STGTMPITWDQVETASWAEVHLIER 91
SP|Q7RTR0|NALP9_HUMAN  ESFFSDFGLLYLKKELKESFWKFKELKQPLEKFLKPIFWAEKKASKEDVAKLIDKH 62
SP|P59044|NALP6_HUMAN  RLAVARELLLALESLQEQELRRFRHLRLVGFQG--RSIPWGLREADAVDLAQQLAQF 71
SP|Q86W26|NAL10_HUMAN  KARKPREALLWALSLENDFFKATFYLAQMTLSGGQFFLARELEGLIPVDLALLSK 64
SP|P59045|NAL11_HUMAN  ESDSTDFDLLWYLENLSDKEFSFKYLARKILOFEL---PQFFLIQMKELANVLPIS 59
```

【図 17】

Figure 17:



10

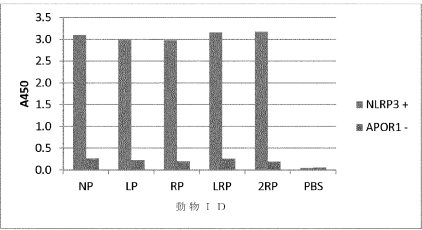
20

30

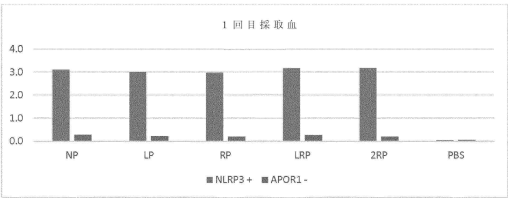
40

50

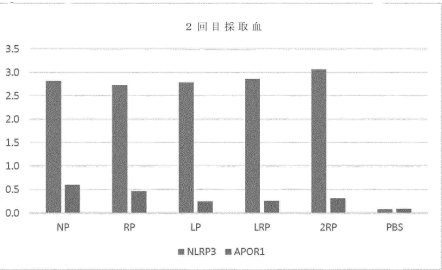
【図 18】



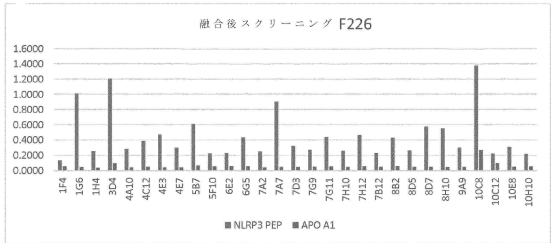
【図 19】



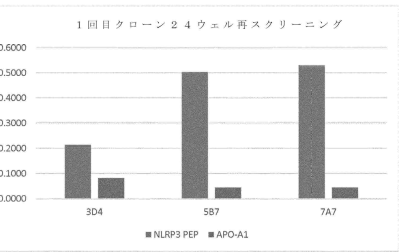
【図 20】



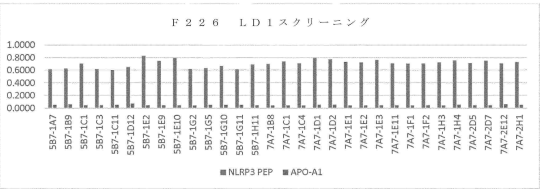
【図 21】



【図 22】

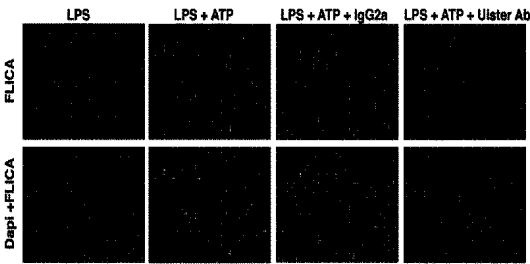


【図 23】

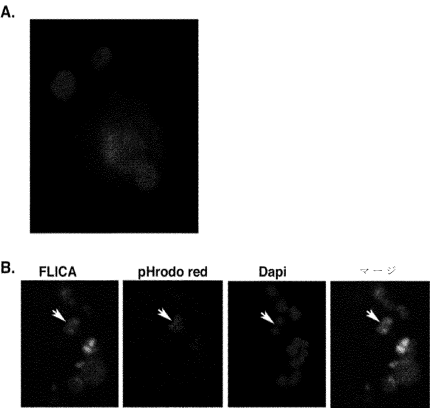


【図 3 4】

Figure 34:



【図 3 5】



10

【図 3 6】

図 3 6 a

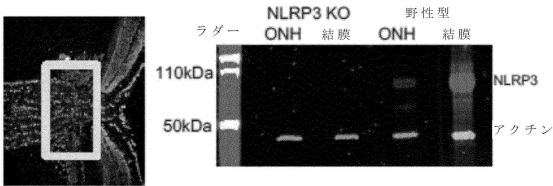
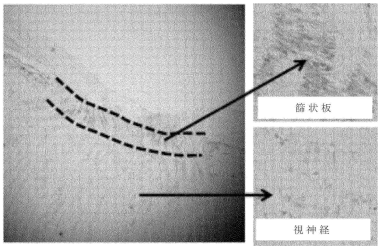
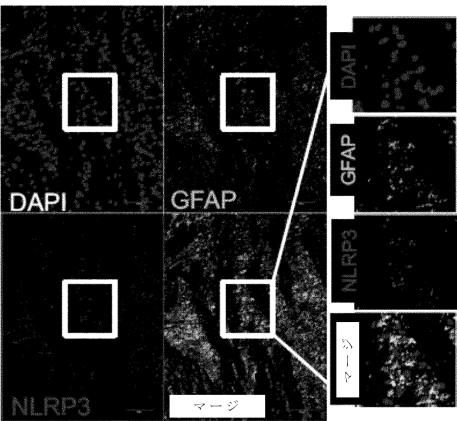


図 3 6 b



【図 3 7】



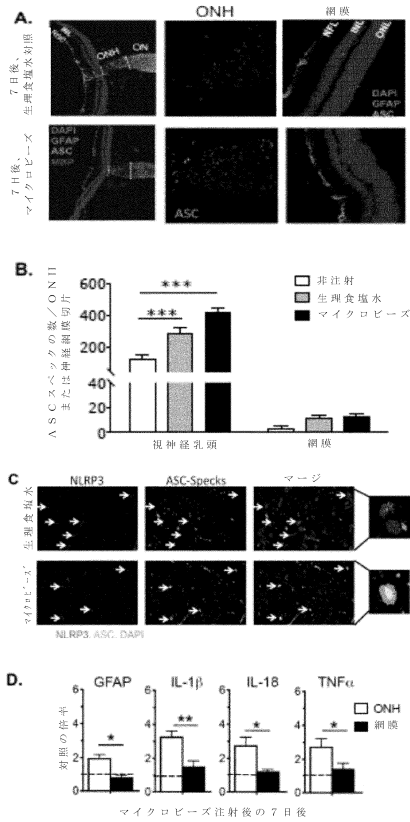
20

30

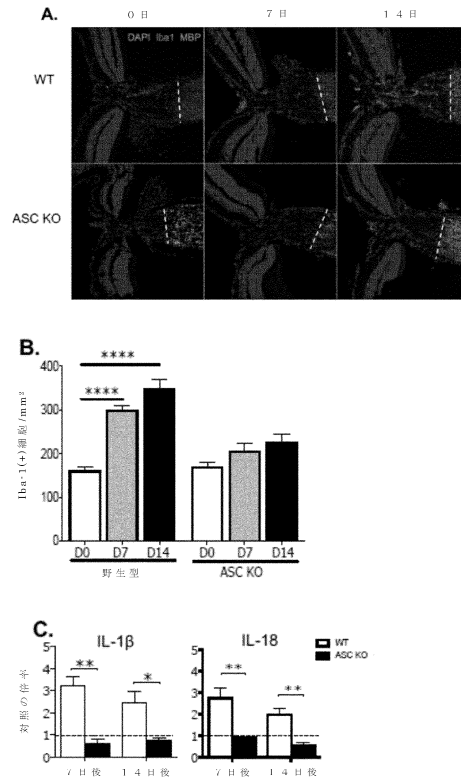
40

50

【図 3 8】



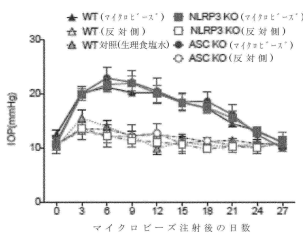
【図 3 9】



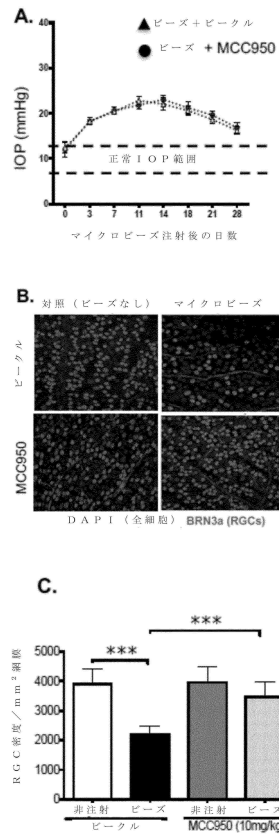
10

20

【図 4 0】



【図 4 1】

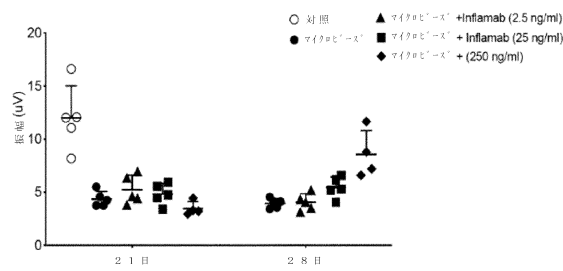


30

40

50

【図 4 2】



【配列表】

0007645544000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

(72)発明者 マクギリガン, ヴィクトリア

イギリス国, カウンティ ロンドンデリー ビーティー5 2 1エスエー, コールレーン, クロモア
ロード, コールレーン キャンパス, ユニバーシティ オブ アルスター, スクール オブ バイオメ
ディカル サイエンシズ

審査官 中野 あい

(56)参考文献 Eye, 2018年, 32, 491-505

NEURAL REGENERATION RESEARCH, 2016年, Volume 11, Issue 7, p.1077-1078

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 9 /

C 0 7 K 1 6 /

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)