(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-515304
(P2025-515304A)
(43)公表日　令和7年5月14日(2025.5.14)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4B063	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		4B064	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4B065	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C085	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		4H045	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全69頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-562791(P2024-562791)
(86)(22)出願日　令和5年4月21日(2023.4.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月21日(2024.11.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/066086
(87)国際公開番号　WO2023/205793
(87)国際公開日　令和5年10月26日(2023.10.26)
(31)優先権主張番号　63/333,952
(32)優先日　令和4年4月22日(2022.4.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　524252194
インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード １１０２５ スイート １４０
(71)出願人　524386640
フィラキシス バイオサイエンス リミテッド ライアビリティ カンパニー
アメリカ合衆国 ８０２０６ コロラド州 デンバー フィルモア ストリート １００ ＃５００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＳＩＧＬＥＣ－８結合タンパク質及びその使用方法

(57)【要約】
本明細書では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合タンパク質と、Ｓｉｇｌｅｃ－８の生物活性を調節するためにＳｉｇｌｅｃ－８結合タンパク質を使用する方法とが提供される。
【選択図】６Ａ

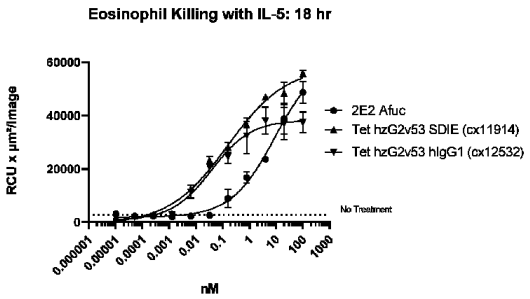


FIG. 6A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインであって、配列番号２６、５、１１、１６、２１、３１、３６、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨＨの相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、及び相補性決定領域３（ＣＤＲ３）配列を含む、前記ＶＨＨドメイン。
【請求項２】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインであって、
（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号４６、４７、及び４８、
（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号１４９、１５０、及び１５１、
（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１５２、１５３、及び１５４、
（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１５５、１５６、及び１５７、または、
（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１５８、１５９、及び１６０
に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む、前記ＶＨＨドメイン。
【請求項３】
（ａ）前記ＣＤＲ１が、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号１８、２、もしくは１３のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ２が、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号２９もしくは３のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ３が、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号８のアミノ酸配列を含むか、
（ｂ）前記ＣＤＲ１が、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７４、７５、もしくは７６のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ２が、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号８０もしくは８１のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ３が、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号８のアミノ酸配列を含むか、
（ｃ）前記ＣＤＲ１が、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８５、８６、もしくは８７のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ２が、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９２、９３、もしくは９４のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ３が、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８のアミノ酸配列を含むか、
（ｄ）前記ＣＤＲ１が、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９８、９９、もしくは１００のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ２が、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０４もしくは１０５のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ３が、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１０のアミノ酸配列を含むか、または、
（ｅ）前記ＣＤＲ１が、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１４、１１５、もしくは１１６のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ２が、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１２０もしくは１２１のアミノ酸配列を含み、前記ＣＤＲ３が、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１２６のアミノ酸配列を含む、
請求項２に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項４】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列が、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号１８、２９、及び８；配列番号２、３、及び８；配列番号１３、３、及び８；または配列番号１８、３、及び８にそれぞれ示される、請求項１～３のいずれか

１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項５】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列が、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７４、８０、及び８；配列番号７５、８０、及び８；配列番号７６、８０、及び８；または配列番号７６、８１、及び８にそれぞれ示される、請求項１～３のいずれか１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項６】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列が、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８５、９２、及び８；配列番号８６、９２、及び８；配列番号８７、９３、及び８；配列番号８７、９２、及び８；または配列番号８７、９４、及び８にそれぞれ示される、請求項１～３のいずれか１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項７】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列が、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９８、１０４、及び１１０；配列番号９９、１０４、及び１１０；配列番号１００、１０４、及び１１０；または配列番号１００、１０５、及び１１０にそれぞれ示される、請求項１～３のいずれか１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項８】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列が、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１４、１２０、及び１２６；配列番号１１５、１２０、及び１２６；配列番号１１６、１２０、及び１２６；または配列番号１１６、１２１、及び１２６にそれぞれ示される、請求項１～３のいずれか１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項９】
配列番号２６、５、１１、１６、２１、３１、３６、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項１０】
ヒト化されている、請求項１～９のいずれか１項に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項１１】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインであって、配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む、前記ＶＨＨドメイン。
【請求項１２】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、
（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号２、３、及び４、
（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７４、８０、及び４、
（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８５、９１、及び４、
（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９８、１０４、及び１０９、または、
（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１４、１２０、及び１２５
に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１１に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項１３】
配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１１または１２に記載のＶＨＨドメイン。

【請求項１４】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインであって、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む、前記ＶＨＨドメイン。
【請求項１５】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、
（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号５２、５３、５４、
（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７７、８２、５４、
（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８８、９５、５４、
（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０１、１０６、１１１、または、
（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１７、１２２、１２７
に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１４に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項１６】
配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１４または１５に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項１７】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインであって、配列番号５５のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む、前記ＶＨＨドメイン。
【請求項１８】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、
（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号５８、５９、６０、
（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７８、８３、６０、
（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８９、９６、６０、
（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０２、１０７、１１２、または、
（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１８、１２３、１２８
に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１７に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項１９】
配列番号５５のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１７または１８に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項２０】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインであって、配列番号６１のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む、前記ＶＨＨドメイン。
【請求項２１】
前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、
（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号６３のアミノ酸配列、配列番号６４のアミノ酸配列、及びＧｌｙ－Ａｌａ－Ｔｙｒ（ＧＡＹ）のアミノ酸配列、

（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７９のアミノ酸配列、配列番号８４のアミノ酸配列、及びＧｌｙ－Ａｌａ－Ｔｙｒ（ＧＡＹ）のアミノ酸配列、
（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９０のアミノ酸配列、配列番号９７のアミノ酸配列、及びＧｌｙ－Ａｌａ－Ｔｙｒ（ＧＡＹ）のアミノ酸配列、
（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０３、１０８、１１３のアミノ酸配列、または、
（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１９、１２４、１２９のアミノ酸配列
を含む、請求項２０に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項２２】
配列番号６１のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項２０または２１に記載のＶＨＨドメイン。
【請求項２３】
請求項１～２２のいずれか１項に記載のＶＨＨドメインを含む、ポリペプチド。
【請求項２４】
請求項１～２２のいずれか１項に記載のＶＨＨドメインを少なくとも２つ含む、請求項２３に記載のポリペプチド。
【請求項２５】
２つの前記ＶＨＨドメインが、ペプチドリンカーを介して互いに作動可能に連結されている、請求項２４に記載のポリペプチド。
【請求項２６】
前記ペプチドリンカーが、配列番号６９のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項２５に記載のポリペプチド。
【請求項２７】
前記ＶＨＨドメインが、同じＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３アミノ酸配列を含む、請求項２４～２６のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項２８】
前記ＶＨＨドメインが、同じＶＨＨアミノ酸配列を含む、請求項２７に記載のポリペプチド。
【請求項２９】
配列番号９、１０、１２、１７、２２、２７、３２、３７、５０、５１、５６、５７、６２、または６３のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項２４～２８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項３０】
多量体化ドメインをさらに含む、請求項２３～２９のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項３１】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも２つの抗原結合ドメインと、多量体化ドメインとを含む、ポリペプチド。
【請求項３２】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する２つの抗原結合ドメインを含む、請求項３１に記載のポリペプチド。
【請求項３３】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する３つの抗原結合ドメインを含む、請求項３１に記載のポリペプチド。

【請求項３４】
Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも３つの抗原結合ドメインを含む、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するポリペプチド。
【請求項３５】
前記抗原結合ドメインの各々が、ＶＨＨドメインである、請求項３１～３４のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項３６】
前記抗原結合ドメインの各々が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項３１～３４のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項３７】
各抗原結合ドメインが、ＦａｂまたはｓｃＦｖである、請求項３６に記載のポリペプチド。
【請求項３８】
前記多量体化ドメインが、二量体化ドメインである、請求項３０～３３及び３５～３７のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項３９】
前記二量体化ドメインが、抗体Ｆｃ領域である、請求項３８に記載のポリペプチド。
【請求項４０】
前記抗体Ｆｃ領域が、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域である、請求項３９に記載のポリペプチド。
【請求項４１】
前記抗体Ｆｃ領域が、配列番号４４、４５、６５、６６、６７、または６８のアミノ酸配列を含む、請求項４０に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
前記抗体Ｆｃ領域が、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する前記抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つにアミノ酸リンカーを介して作動可能に連結されている、請求項３９～４１のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項４３】
前記アミノ酸リンカーが、配列番号７０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項４２に記載のポリペプチド。
【請求項４４】
構造ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃを含む、請求項３９～４３のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項４５】
配列番号７１のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項４４に記載のポリペプチド。
【請求項４６】
構造ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨを含む、請求項３９～４３のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項４７】
構造ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＦｃまたはＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨを含む、請求項３９～４３のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項４８】
前記多量体化ドメインを介して生理学的条件下で多量体化されている請求項３０～４７のいずれか１項に記載のポリペプチドを２つ以上含む、タンパク質。
【請求項４９】
２つ以上の前記ポリペプチドが、ホモ多量体を形成する、請求項４８に記載のタンパク質。

【請求項５０】
前記二量体化ドメインを介して生理学的条件下で二量体化されている請求項３８～４７のいずれか１項に記載のポリペプチドを２つ含む、タンパク質。
【請求項５１】
２つの前記ポリペプチドが、ホモ二量体を形成する、請求項５０に記載のタンパク質。
【請求項５２】
ヒトＳｉｇｌｅｃ－８に結合する、請求項１～５１のいずれか１項に記載のＶＨＨ、ポリペプチド、またはタンパク質。
【請求項５３】
前記ヒトＳｉｇｌｅｃ－８が、配列番号４３のアミノ酸配列を含む、請求項５２に記載のＶＨＨ、ポリペプチド、またはタンパク質。
【請求項５４】
ＩＬ－５の存在下での好酸球殺滅を媒介する、請求項２３～５３のいずれか１項に記載のポリペプチドまたはタンパク質。
【請求項５５】
好酸球殺滅が、インビトロアッセイで判定される、請求項５４に記載のポリペプチドまたはタンパク質。
【請求項５６】
前記タンパク質が、各ポリペプチドにおいてＳｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも２つのＶＨＨドメインを含み、前記タンパク質が、ホモ二量体のポリペプチドよりも低いＥＣ５０でＩＬ－５の存在下での好酸球殺滅を媒介し、前記ホモ二量体のポリペプチドが各々、ＶＨＨ－Ｆｃの構造を有し、前記Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインのうちの１つのみを含む、請求項５０～５５のいずれか１項に記載のタンパク質。
【請求項５７】
ＩＬ－５の非存在下での好酸球殺滅を媒介する、請求項２３～５６のいずれか１項に記載のポリペプチドまたはタンパク質。
【請求項５８】
前記ポリペプチドが、抗体依存性細胞媒介細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）を介した好酸球殺滅を媒介する、請求項２３～５７のいずれか１項に記載のポリペプチドまたはタンパク質。
【請求項５９】
請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドまたはタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。
【請求項６０】
請求項２３～４７及び５２～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸。
【請求項６１】
請求項６０に記載の核酸を含む、ベクター。
【請求項６２】
請求項６０に記載の核酸または請求項６１に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項６３】
請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドまたはタンパク質を発現する、宿主細胞。
【請求項６４】
ポリペプチドまたはタンパク質を生成する方法であって、請求項６２または６３に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドまたはタンパク質を発現させるための条件下でインキュベートすることを含む、前記方法。
【請求項６５】
前記ポリペプチドまたはタンパク質を単離することをさらに含む、請求項６４に記載の方法。

【請求項６６】
好酸球性障害またはマスト細胞障害を治療する方法であって、その必要がある対象に、治療有効量の請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドもしくはタンパク質または請求項５９に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項６７】
前記好酸球性障害が、好酸球性膀胱炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸障害、好酸球性胃炎、好酸球性腸炎、チャーグ・ストラウス症候群、好酸球増多症候群、好酸球性白血病（例えば、慢性好酸球性白血病）、好酸球性表現型喘息（ａｓｔｈｍａ ｗｉｔｈ ａｎｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｉｃ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ）、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、鼻ポリープを伴う慢性鼻副鼻腔炎、または好酸球性多発血管炎性肉芽腫症である、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記マスト細胞障害が、全身性肥満細胞症、遺伝性アルファトリプターゼ血症（ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ ａｌｐｈａ ｔｒｙｐｔａｓｅｍｉａ）、またはマスト細胞活性化症候群である、請求項６６に記載の方法。
【請求項６９】
前記全身性肥満細胞症が、進行性全身性肥満細胞症であり、任意に、侵襲性全身性肥満細胞症、マスト細胞白血病、及び関連する血液新生物を伴う全身性肥満細胞症からなる群から選択される、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記全身性肥満細胞症が、非進行性全身性肥満細胞症であり、任意に、無痛性全身性肥満細胞症である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７１】
炎症性疾患または病態を治療する方法であって、その必要がある対象に、治療有効量の請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドもしくはタンパク質または請求項５９に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項７２】
アレルギー病態を治療または予防する方法であって、その必要がある対象に、治療有効量の請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドもしくはタンパク質または請求項５９に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項７３】
前記アレルギー病態が、食物アレルギー、環境アレルギー、コンパニオンアニマルアレルギー、及び／または毒アレルギーである、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
対象における好酸球を枯渇させる方法であって、前記対象に、治療有効量の請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドもしくはタンパク質または請求項５９に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項７５】
好酸球を殺滅する方法であって、請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドもしくはタンパク質または請求項５９に記載の医薬組成物の存在下で、前記好酸球をナチュラルキラー（ＮＫ）細胞と接触させることを含む、前記方法。
【請求項７６】
好酸球を殺滅する方法であって、請求項２３～５８のいずれか１項に記載のポリペプチドもしくはタンパク質または請求項５９に記載の医薬組成物の存在下で、前記好酸球をマクロファージと接触させることを含む、前記方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２２年４月２２日出願の米国特許仮出願第６３／３３３，９５２号の利

益を主張するものであり、その内容はその全体が全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

配列表の参照による組み込み

本出願は、２０２３年４月１９日に作成された、１６３，７０９バイトのサイズである、ＰＸＳ－００２ＷＯ＿ＳＬ．ｘｍｌと題する電子形式で本出願とともに提出される配列表を参照により組み込む。

【０００３】

分野

本発明は、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合タンパク質、及びＳｉｇｌｅｃ－８の生物活性を調節するためのかかるタンパク質の使用方法に関する。そのような方法としては、好酸球性障害またはマスト細胞障害を治療する方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【背景技術】

【０００４】

背景

マスト細胞は、急性及び慢性の組織炎症を調節する組織常在細胞である。マスト細胞の異常蓄積及び活性化は、好酸球性喘息、アトピー性皮膚炎、及び好酸球性胃腸疾患などのアレルギー疾患の媒介に役割を果たすことが知られている（Ｓｃｈａｎｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０２１，１４，３６６－３７６（非特許文献１））。シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン８（Ｓｉｇｌｅｃ－８）は、これらのマスト細胞ならびに成熟好酸球及び好塩基球に選択的に発現する阻害性細胞表面受容体であり、そのため、アレルギー性疾患及び炎症性疾患を治療する標的として注目を集めている。Ｓｉｇｌｅｃ－８の架橋は好酸球の死滅を誘導することが示されており、そのプロセスは活性酸素種（ＲＯＳ）の放出及びベータ２－インテグリンの活性化に依存する（Ｌｅｇｒａｎｄ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００９，１４３，２２２７－２２３７（非特許文献２））。Ｓｉｇｌｅｃ－８の選択的発現は、それを、副作用を低減させ、薬物安全性を高め得る有利な標的にする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Ｓｃｈａｎｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０２１，１４，３６６－３７６

【非特許文献２】Ｌｅｇｒａｎｄ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００９，１４３，２２２７－２２３７

【発明の概要】

【０００６】

概要

本明細書では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメイン、ポリペプチド、及びタンパク質、ならびに医学的治療に前記Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメイン、ポリペプチド、及びタンパク質を使用する方法が提供される。例えば、本明細書で開示されるＶＨＨドメイン、ポリペプチド、及びタンパク質は、好酸球性膀胱炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸障害、好酸球性胃炎（ＥｏＧ）、好酸球性腸炎、チャーグ・ストラウス症候群、好酸球増多症候群を含む好酸球性障害の治療に有用である。それらはまた、肥満細胞白血病、侵襲性全身性肥満細胞症、及び無痛性肥満細胞症を含むがこれらに限定されないマスト細胞障害を治療するために有用である。さらに、それらは、一般的なアレルギー状態、例えば、食物アレルギー、環境アレルギー、毒アレルギー、及び／またはコンパニオンアニマルアレルギーによって誘発されるものを治療するのに有用である。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態を以下に提供する。

【０００７】

一態様では、本開示は、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するＶＨＨドメインを提供し、該ＶＨＨドメインは、配列番号２６、５、１１、１６、２１、３１、３６、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨＨの相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、及び相補性決定領域３（ＣＤＲ３）配列を含む。

【０００８】

別の態様では、本開示は、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するＶＨＨドメインを提供し、該ＶＨＨドメインは、（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号４６、４７、及び４８；（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号１４９、１５０、及び１５１；（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１５２、１５３、及び１５４；（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１５５、１５６、及び１５７；または（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１５８、１５９、及び１６０、に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される場合、ＣＤＲ１は、配列番号１８、２、または１３のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ２は、配列番号２９または３のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ３は、配列番号８のアミノ酸配列を含み得る。Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される場合、ＣＤＲ１は、配列番号７４、７５、または７６のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ２は、配列番号８０または８１のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ３は、配列番号８のアミノ酸配列を含み得る。Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される場合、ＣＤＲ１は、配列番号８５、８６、または８７のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ２は、配列番号９２、９３、または９４のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ３は、配列番号８のアミノ酸配列を含み得る。Ｃｏｎｔａｃｔのナンバリングシステムに従って定義される場合、ＣＤＲ１は、配列番号９８、９９、または１００のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ２は、配列番号１０４、または１０５のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ３は、配列番号１１０のアミノ酸配列を含み得る。ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される場合、ＣＤＲ１は、配列番号１１４、１１５、または１１６のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ２は、配列番号１２０、または１２１のアミノ酸配列を含み得、ＣＤＲ３は、配列番号１２６のアミノ酸配列を含み得る。

【０００９】

上記の態様のいずれかの特定の実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列は、それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号１８、２９、及び８；配列番号２、３、及び８；配列番号１３、３、及び８；または配列番号１８、３、及び８に示されるか、それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７４、８０、及び８；配列番号７５、８０、及び８；配列番号７６、８０、及び８；または配列番号７６、８１、及び８に示されるか、それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８５、９２、及び８；配列番号８６、９２、及び８；配列番号８７、９３、及び８；配列番号８７、９２、及び８；配列番号または８７、９４、及び８に示されるか、それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔのナンバリングシステムに従って定義される配列番号９８、１０４、及び１１０；配列番号９９、１０４、及び１１０；配列番号１００、１０４、及び１１０；または配列番号１００、１０５、及び１１０に示されるか、あるいは、それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１４、１２０、及び１２６；配列番号１１５、１２０、及び１２６；配列番号１１６、１２０、及び１２６；または配列番号１１６、１２１、及び１２６に示される。

【００１０】

ある特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号２６、５、１１、１６、２１、３１、３６、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なく

とも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、ヒト化される。

【００１１】

本開示はまた、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するＶＨＨドメインを提供し、該ＶＨＨドメインは、配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号２、３、及び４；（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７４、８０、及び４；（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８５、９１、及び４；（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９８、１０４、及び１０９；または（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１４、１２０、及び１２５、に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００１２】

本開示はまた、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するＶＨＨドメインを提供し、該ＶＨＨドメインは、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号５２、５３、５４；（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７７、８２、５４；（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８８、９５、５４；（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０１、１０６、１１１；または（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１７、１２２、１２７、に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００１３】

本開示はまた、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するＶＨＨドメインを提供し、該ＶＨＨドメインは、配列番号５５のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号５８、５９、６０；（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７８、８３、６０；（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号８９、９６、６０；（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０２、１０７、１１２；または（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１８、１２３、１２８、に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号５５のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００１４】

本開示はまた、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するＶＨＨドメインを提供し、該ＶＨＨドメインは、配列番号６１のアミノ酸配列を含むＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、（ａ）それぞれ、ＡｂＭナンバリングシステムに従って定義される配列番号６３のアミノ酸配列、配列番号６４のアミノ酸配列、及びＧｌｙ－Ａｌａ－Ｔｙｒ

（ＧＡＹ）のアミノ酸配列；（ｂ）それぞれ、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングシステムに従って定義される配列番号７９のアミノ酸配列、配列番号８４のアミノ酸配列、及びＧｌｙ－Ａｌａ－Ｔｙｒ（ＧＡＹ）のアミノ酸配列；（ｃ）それぞれ、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号９０のアミノ酸配列、配列番号９７のアミノ酸配列、及びＧｌｙ－Ａｌａ－Ｔｙｒ（ＧＡＹ）のアミノ酸配列；（ｄ）それぞれ、Ｃｏｎｔａｃｔナンバリングシステムに従って定義される配列番号１０３、１０８、１１３のアミノ酸配列；または（ｅ）それぞれ、ＩＭＧＴナンバリングシステムに従って定義される配列番号１１９、１２４、１２９のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号６１のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００１５】

別の態様では、本開示は、本明細書で開示されるＶＨＨドメインを含むポリペプチドを提供する。ポリペプチドは、そのようなＶＨＨドメインのうちの少なくとも２つを含み得る。特定の実施形態では、２つのＶＨＨドメインは、ペプチドリンカー、例えば、配列番号６９のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるペプチドリンカーを介して互いに作動可能に連結される。特定の実施形態では、ポリペプチドのＶＨＨドメインは、同じＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのＶＨＨドメインは、同じＶＨＨアミノ酸配列を含む。

【００１６】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号９、１０、１２、１７、２２、２７、３２、３７、５０、５１、５６、５７、６２、または６３のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００１７】

本明細書で開示されるポリペプチドは、さらに、多量体化ドメインを含み得る。

【００１８】

別の態様では、本開示は、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合する少なくとも２つ（例えば、２つ、または３つの）抗原結合ドメイン、及び多量体化ドメインを含むポリペプチドを提供する。

【００１９】

別の態様では、本開示は、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合する少なくとも３つの抗原結合ドメインを含む、Ｓｉｇｌｅｃ－８（例えば、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８）に結合するポリペプチドを提供する。

【００２０】

上記の２つの態様のある特定の実施形態では、抗原結合ドメインの各々は、ＶＨＨドメインである。これらの態様の他の実施形態では、抗原結合ドメインの各々は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を、例えば、ＦａｂまたはｓｃＦｖの形式で含む。

【００２１】

上記の適用可能な態様のいずれかの特定の実施形態では、多量体化ドメインは、二量体化ドメイン、例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域などの抗体Ｆｃ領域である。抗体Ｆｃ領域は、配列番号４４、４５、６５、６６、６７、または６８のアミノ酸配列を含み得る。

【００２２】

抗体Ｆｃ領域は、アミノ酸リンカー、例えば、配列番号７０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるアミノ酸リンカーを介して、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つに作動可能に連結され得る。

【００２３】

前記ポリペプチドは、様々な構造形式をとることができる。特定の実施形態では、ポリペプチドは、構造ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃを含む。かかるポリペプチドは、配列番号７１のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９

５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、構造ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、構造ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＦｃまたはＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨを含む。

【００２４】

本開示はまた、多量体化ドメインを介して生理学的条件下で多量体化された本明細書に開示されるポリペプチドを２つ以上含む、タンパク質を提供する。例えば、２つ以上のポリペプチドは、ホモ多量体を形成し得る。多量体化ドメインが二量体化ドメインである場合、タンパク質は、生理学的条件下で二量体化ドメインを介して二量体化する、本明細書に開示するポリペプチドを２つ含み得る。例えば、２つのポリペプチドは、ホモ二量体を形成し得る。

【００２５】

本明細書で開示されるＶＨＨ、ポリペプチド、またはタンパク質がヒトＳｉｇｌｅｃ－８に結合する場合、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８のアミノ酸配列は、配列番号４３に示され得る。

【００２６】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるポリペプチドまたはタンパク質は、ＩＬ－５の存在下での好酸球殺滅を媒介する。好酸球殺滅は、インビトロアッセイで判定されることができる。タンパク質が、各ポリペプチドにおいてＳｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも２つのＶＨＨドメインを含む場合、ホモ二量体タンパク質は、ホモ二量体のポリペプチドよりも低いＥＣ５０でＩＬ－５の存在下での好酸球殺滅を媒介することができ、ホモ二量体のポリペプチドが各々、ＶＨＨ－Ｆｃの構造を有し、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインのうちの１つのみを含むことが企図される。

【００２７】

特定の実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、ＩＬ－５の非存在下での好酸球殺滅を媒介する。特定の実施形態では、ポリペプチドは、抗体依存性細胞媒介細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）を介した好酸球殺滅を媒介する。

【００２８】

本開示はまた、本明細書に開示されるポリペプチドまたはタンパク質と、薬学的に許容される担体の組み合わせを含む医薬組成物を提供する。

【００２９】

さらに、本開示は、本明細書に開示されるポリペプチドをコードする単離された核酸、核酸を含むベクター、核酸またはベクターを含む宿主細胞、及びポリペプチドまたはタンパク質を発現する宿主細胞を提供する。

【００３０】

本開示はまた、ポリペプチドまたはタンパク質を生成する方法を提供し、該方法は、ポリペプチドまたはタンパク質を発現させるための条件下で宿主細胞をインキュベートすることを含む。方法は、さらに、ポリペプチドまたはタンパク質を単離することを含み得る。

【００３１】

本開示の別の態様では、好酸球性障害またはマスト細胞障害を治療する方法を提供し、該方法は、その必要がある対象に、治療有効量の本明細書に開示されるポリペプチド、タンパク質、または医薬組成物を投与することを含む。好酸球性障害は、好酸球性膀胱炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸障害、好酸球性胃炎（ＥｏＧ）、好酸球性腸炎、チャーグ・ストラウス症候群、好酸球増多症候群、好酸球性白血病（例えば、慢性好酸球性白血病）、好酸球性表現型喘息（ａｓｔｈｍａ ｗｉｔｈ ａｎ ｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｉｃ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ）、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ＡＢＰＡ）、鼻ポリープを伴う慢性鼻副鼻腔炎（ＣＲＳｗＮＰ）、または好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（ＥＧＰＡ）であり得る。マスト細胞障害は、全身性肥満細胞症、遺伝性アルファトリプターゼ血症（ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ ａｌｐｈａ ｔｒｙｐｔａｓｅｍｉａ：ＨＡＴ）、または

肥満細胞活性化症候群（ＭＣＡＳ）であり得る。全身性肥満細胞症（ＳＭ）は、進行性ＳＭ（例えば、肥満細胞白血病、侵襲性ＳＭ、または血液新生物を伴うＳＭ（ＳＭ－ＡＨＮ））または非進行性ＳＭ（例えば、無痛性ＳＭ）であり得る。

【００３２】

本開示はまた、炎症性疾患または病態を治療する方法を提供し、該方法は、その必要がある対象に、治療有効量の本明細書で開示されるポリペプチド、タンパク質、または医薬組成物を投与することを含む。

【００３３】

さらに、本開示は、アレルギー病態を治療または予防する方法を提供し、該方法は、その必要がある対象に、治療有効量の本明細書に開示されるポリペプチド、タンパク質、または医薬組成物を投与することを含む。アレルギー病態は、食物アレルギー、環境アレルギー、コンパニオンアニマルアレルギー、及び／または毒アレルギーであり得る。

【００３４】

さらに、本開示は、対象における好酸球を枯渇させる方法を提供し、該方法は、対象に、治療有効量の本明細書に開示されるポリペプチド、タンパク質、または医薬組成物を投与することを含む。

【００３５】

さらに、本開示は、好酸球を殺滅する方法を提供し、該方法は、本明細書に開示されるポリペプチド、タンパク質、または医薬組成物の存在下で好酸球をナチュラルキラー（ＮＫ）細胞と接触させることを含む。本開示はまた、好酸球を殺滅する方法も提供し、該方法は、本明細書に開示されるポリペプチド、タンパク質、または医薬組成物の存在下で好酸球をマクロファージと接触させることを含む。

【図面の簡単な説明】

【００３６】

【図１Ａ】図１Ａ～図１Ｄは、フローサイトメトリーを使用してＡ６４７コンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体の結合によって測定した、非トランスフェクト（ＵＴ－ＣＨＯ）またはヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現ＣＨＯ細胞のいずれかへの親抗ヒトＳｉｇｌｅｃ８－Ｂ１２（ｃｘ８９８２、図１Ａ）、Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｄ１（ｃｘ８９８３、図１Ｂ）、Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｅ２（ｃｘ８９８４、図１Ｃ）、またはＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２（ｃｘ１０３８２、図１Ｄ）の結合の平均蛍光強度を示す。

【図１Ｂ】図１Ａの説明を参照のこと。

【図１Ｃ】図１Ａの説明を参照のこと。

【図１Ｄ】図１Ａの説明を参照のこと。

【図２Ａ】図２Ａ～図２Ｄは、フローサイトメトリーを使用してＡ６４７コンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体の結合によって測定した、二価、四価、及び六価の抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｂ１２抗体（ｃｘ８９８２、ｃｘ８４６７、ｃｘ８４６６；図２Ａ）、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｄ１抗体（ｃｘ８９８３、ｃｘ８４６９、ｃｘ８５２３；図２Ｂ）、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｅ２抗体（ｃｘ８９８４、ｃｘ８４６３、ｃｘ８５２２；図２Ｃ）、または抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４抗体（ｃｘ１１４２２、ｃｘ１１５８、ｃｘ１１５７９；図２Ｄ）による好酸球上のヒトＳｉｇｌｅｃ－８への結合の平均蛍光強度（図２Ａ～２Ｃ）またはＳｉｇｌｅｃ－８トランスフェクトＣＨＯ細胞への結合の中央値蛍光強度（図２Ｄ）を示す。

【図２Ｂ】図２Ａの説明を参照のこと。

【図２Ｃ】図２Ａの説明を参照のこと。

【図２Ｄ】図２Ａの説明を参照のこと。

【図３Ａ】図３Ａ～３Ｅは、用量設定する量の、２４時間後のＩＬ－５の存在下における二価、四価、または六価の抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｂ１２抗体（ｃｘ８９８２、ｃｘ８４６７、ｃｘ８４６６；図３Ａ）、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｄ１抗体（ｃｘ８９８３、ｃｘ８４６９、ｃｘ８５２３；図３Ｂ）、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｅ２抗体（ｃｘ８９８４、ｃｘ８４６３、ｃｘ８５２２；図３Ｃ）、または１８時間後のＩＬ－５の存在下（図３Ｄ）もしくはＩ

Ｌ－５の非存在下（図３Ｅ）の抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４（ｃｘ１１４２２、ｃｘ１１５８０、ｃｘ１１５７９）アゴニスト抗体で処置された、精製されたヒト好酸球に組み込まれたヒト死細胞マーカーｃｙｔｏｔｏｘレッドの総レッド物質積分強度（ＲＣＵｘμｍ２／画像）を示す。
【図３Ｂ】図３Ａの説明を参照のこと。
【図３Ｃ】図３Ａの説明を参照のこと。
【図３Ｄ】図３Ａの説明を参照のこと。
【図３Ｅ】図３Ａの説明を参照のこと。
【図４Ａ】図４Ａ～４Ｃは、フローサイトメトリーを使用してＡ６４７コンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体の結合によってすべて測定した、新たに単離されたヒト好酸球へのｈｚＧ２ｖ５２（ｃｘ１１９１３）またはｈｚＧ２ｖ５３（ｃｘ１１９１４）と比較類似体２Ｅ２　Ａｆｕｃとを含む四価のＳｉｇｌｅｃ－８アゴニスト抗体の結合の中央値蛍光強度（図４Ａ）、またはヒトＳｉｇｌｅｃ－２、３、６、７、８、９、１２、及び１５のトランスフェクトされたＣＨＯ細胞へのｈｚＧ２ｖ５２（ｃｘ１１９１３）、ｈｚＧ２ｖ５３（ｃｘ１１９１４）、またはｈｚＧ２ｖ１４（ｃｘ１１７６９）を含む四価のＳｉｇｌｅｃ－８アゴニスト抗体の結合の平均蛍光強度（図４Ｂ～４Ｃ）を示す。
【図４Ｂ】図４Ａの説明を参照のこと。
【図４Ｃ】図４Ａの説明を参照のこと。
【図５Ａ】図５Ａ～５Ｈは、フローサイトメトリーを使用してＡ６４７コンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体の結合によって測定した、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現ＣＨＯ２９３細胞（図５Ａ～５Ｄ）または非トランスフェクト２９３細胞（図５Ｅ～５Ｈ）いずれかに結合する単量体ＶＨＨ－ｈＩｇＧ１融合体でフォーマットされた親抗ヒトＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２（ｌｍＧ２）及びそのヒト化バリアントの中央値蛍光強度を示す。
【図５Ｂ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図５Ｃ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図５Ｄ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図５Ｅ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図５Ｆ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図５Ｇ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図５Ｈ】図５Ａの説明を参照のこと。
【図６Ａ】図６Ａ～６Ｂは、操作されたＦｃ領域（ｃｘ１２５６２及び／またはｃｘ１１９１４）を有するｈｚＧ２ｖ５３を含む多価Ｓｉｇｌｅｃ－８アゴニスト抗体、または野生型Ｆｃ領域（ｃｘ１２５３２）有する四価、及び比較類似体２Ｅ２　Ａｆｕｃの直接的（図６Ａ）及びＡＤＣＣ媒介性（図６Ｂ）の殺滅活性を示す。図６Ａは、ＩＬ－５の存在下における精製されたヒト好酸球に組み込まれた死細胞マーカーサイトトックスレッドの総レッドオブジェクト統合強度（ＲＣＵ×μｍ２／画像）を示す。図６Ｂは、ＩＬ－５の非存在下におけるＮＫ細胞介在性ＡＤＣＣにより殺滅されたアポトーシス性アポトラッカグリーン陽性好酸球のパーセントを示す。
【図６Ｂ】図６Ａの説明を参照のこと。
【図７】二価Ｓｉｇｌｅｃ－８標的化ポリペプチドと比較した、多価Ｓｉｇｌｅｃ－８標的化ポリペプチドの例示的なフォーマットを図示する。
【発明を実施するための形態】
【００３７】
詳細な説明
本明細書で提供される実施形態は、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド、及びＳｉｇｌｅｃ－８関連疾患または障害を治療する様々な方法におけるそれらの使用に関する。
【００３８】
定義及び様々な実施形態
本明細書で使用される節の見出しは、構成目的のみのためであり、記載される主題を限定するものと解釈されるべきではない。

【００３９】
特許出願、特許公報、及びＧｅｎＢａｎｋ 受託番号を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、各個々の参考文献が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。
【００４０】
本明細書に記載または参照される技術及び手順は、一般的に当業者に周知かつ従来の方法論を使用して用いられており、広く利用される方法論は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ３ｒｄ．ｅｄｉｔｉｏｎ（２００１）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，（２００３））；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ２：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．（１９９５））,Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．（１９８８）ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ,ａｎｄ ＡＮＩＭＡＬ ＣＥＬＬ ＣＵＬＴＵＲＥ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．（１９８７））；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ，ｅｄ．，１９８４）；Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｎｏｔｅｂｏｏｋ（Ｊ．Ｅ．Ｃｅｌｌｉｓ，ｅｄ．，１９９８）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ），ｅｄ．，１９８７）；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｊ．Ｐ．Ｍａｔｈｅｒ ａｎｄ Ｐ．Ｅ．Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９８）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ（Ａ．Ｄｏｙｌｅ，Ｊ．Ｂ．Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ,ａｎｄ Ｄ．Ｇ．Ｎｅｗｅｌｌ,ｅｄｓ．,１９９３－８）Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ ａｎｄ Ｃ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ,ｅｄｓ．）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｍ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ,ｅｄｓ．,１９８７）；ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ，（Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．,ｅｄｓ．,１９９４）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．,ｅｄｓ．,１９９１）；Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ,１９９９）；Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ（Ｃ．Ａ．Ｊａｎｅｗａｙ ａｎｄ Ｐ．Ｔｒａｖｅｒｓ,１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｐ．Ｆｉｎｃｈ,１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｄ．Ｃａｔｔｙ．,ｅｄ．,ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ,１９８８－１９８９）；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ａｎｄ Ｃ．Ｄｅａｎ,ｅｄｓ．,Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ,２０００）；Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｅ．Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄ．Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ,１９９９）；Ｔｈｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｍ．Ｚａｎｅｔｔｉ ａｎｄ Ｊ．Ｄ．Ｃａｐｒａ,ｅｄｓ．,Ｈａｒｗｏｏｄ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ,１９９５）；及び Ｃａｎｃｅｒ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（Ｖ．Ｔ．ＤｅＶｉｔａ ｅｔ ａｌ．,ｅｄｓ．,Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）；ならびにそれらの改訂版に記載されている。
【００４１】

別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別途要求または明記されない限り、単数形の用語は、複数形の用語を含むものとし、複数形の用語は単数形の用語を含むものとする。様々な供給源または参照文献の間で定義の矛盾がある場合は、本明細書で提供される定義が優先する。

【００４２】

一般的に、免疫グロブリン重鎖中の残基のナンバリングはＫａｂａｔ ｅｔ ａｌ．, Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ,５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ,Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ,Ｂｅｔｈｅｓｄａ,ＭＤ（１９９１）のようなＥＵインデックスのナンバリングである。「ＫａｂａｔにあるようなＥＵ指標」は、ヒトＩｇＧ１ ＥＵ抗体の残基ナンバリングを指す。

【００４３】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、実施形態「を含むこと」、「からなること」、及び／または「から本質的になること」を含むことが理解される。本明細書で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」は、別途指示されない限り、複数の対象を含む。本明細書における「または」という用語の使用は、代替物が相互に排他的であることを意味することを意図しない。

【００４４】

本出願では、「または」の使用は、明示的に述べられていない限り、または当業者によって理解されない限り、「及び／または」を意味する。複数の従属請求項の文脈において、「または」の使用は、複数の先行する独立請求項または従属請求項に戻ることを指す。

【００４５】

「参照試料」、「参照細胞」、または「参照組織」という語句は、少なくとも１つの未知の特徴を有する試料との比較として使用され得る、少なくとも１つの既知の特徴を有する試料を示す。いくつかの実施形態では、参照試料は、陽性または陰性の指標として使用され得る。参照試料を使用して、未知の特性を有する試料中に存在するタンパク質及び／またはｍＲＮＡのレベルと対照的に、例えば、健康な組織に存在するタンパク質及び／またはｍＲＮＡのレベルを確立することができる。いくつかの実施形態では、参照試料は、同じ対象に由来するが、試験される対象とは異なる部分に由来する。いくつかの実施形態では、参照試料は、がんの周囲または隣接する組織領域に由来するものである。いくつかの実施形態では、参照試料は、試験されている対象に由来するものではなく、目的の障害（例えば、Ｓｉｇｌｅｃ－８関連障害）を有するか、または有しないことが分かっている対象に由来する試料である。いくつかの実施形態では、参照試料は、同じ対象に由来するが、対象が障害を発症する前の時点に由来する。いくつかの実施形態では、参照試料は、同じまたは異なる対象に由来する。陰性参照試料が比較に使用される場合、陰性参照試料中の対象分子の発現レベルまたは量は、本開示を考慮して、当業者が理解するであろう分子がない及び／または低レベルであるレベルを示すことになる。陽性参照試料が比較に使用される場合、陽性参照試料中の対象分子の発現レベルまたは量は、本開示を考慮して、当業者が理解するであろう分子レベルのレベルを示すことになる。

【００４６】

治療薬の投与からの利益、またはそれへの応答における文脈において、本明細書で使用される「利益」、「臨床的有用性」、「応答性」及び「治療応答性」いう用語は、様々なエンドポイントを評定することによって測定され得、これらのエンドポイントは、例えば、減速及び完全阻止を含む、疾患進行のある程度の阻害；疾患の発作及び／もしくは症状の数の低減；病巣サイズの低減；隣接する末梢器官及び／もしくは組織への疾患細胞浸潤の阻害（即ち、低減、減速、または完全停止）；疾患蔓延の阻害（即ち、低減、減速、または完全停止）；疾患病変の退縮または除去につながり得るが必ずしもそうではない自己免疫応答の減少；障害と関連付けられる１つ以上の症状のある程度の軽減；治療後の無疾患提示、例えば、無進行生存の長さの増加；増加した全生存；より高い応答率；ならびに

／または治療後の所定の時点における低下した死亡率である。「非応答性」または「応答しない」対象またはがんは、「応答性」となるための上記の適格性を満たさなかったものである。

【００４７】

「核酸分子」、「核酸」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、互換的に使用されてもよく、ヌクレオチドのポリマーを指す。ヌクレオチドのこのようなポリマーは、天然及び／または非天然ヌクレオチドを含み得、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及びＰＮＡを含むが、これらに限定されない。「核酸配列」は、核酸分子またはポリヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの線形配列を指す。

【００４８】

「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指し、最小の長さに限定されない。アミノ酸残基のこのようなポリマーは、天然または非天然アミノ酸残基を含み得、ペプチド、オリゴペプチド、ならびに天然ポリペプチドの完全長形態及び断片を含むが、これらに限定されない。用語には、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、シアリル化、リン酸化なども含まれる。さらに、本開示の目的のために、「ポリペプチド」は、所望の活性を維持する限り、天然配列への欠失、付加、及び置換（一般に本質的に保守的）などの改変を含み得る。これらの改変は、部位特異的変異誘発を介してのように意図的であり得るか、もしくは例えば、タンパク質を産生する宿主の変異またはＰＣＲ増幅に起因するエラーを介してなど、偶発的であり得る。

【００４９】

「タンパク質」という用語は、１つ以上のポリペプチドを含む高分子を指す。例えば、タンパク質は、複数の同じまたは異なるポリペプチドによって形成される多量体（例えば、二量体、三量体、または四量体）であり得る。

【００５０】

本明細書で使用される「Ｓｉｇｌｅｃ－８」とは、細胞におけるＳｉｇｌｅｃ－８前駆体のプロセシングから生じる任意の天然の成熟Ｓｉｇｌｅｃ－８を指す。この用語には、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト及びカニクイザルまたはアカゲザル）ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の哺乳動物源由来のＳｉｇｌｅｃ－８　が含まれる。非限定的な例示的なヒトＳｉｇｌｅｃ－８アミノ酸配列は、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｑ９ＮＹＺ４．２に示されており、配列番号４２を参照のこと。非限定的な例示的な成熟ヒトＳｉｇｌｅｃ－８アミノ酸配列を、例えば、配列番号４３に示す。

【００５１】

抗原またはエピトープに「特異的に結合する」という用語は、当該技術分野でよく理解されている用語であり、かかる特異的結合を判定する方法もまた、当該技術分野で周知である。分子は、特定の細胞または物質と、代替の細胞または物質との場合よりも頻繁に、より迅速に、より長い持続時間、及び／またはより高い親和性で反応するまたは会合する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと称される。単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）またはＶＨＨ含有ポリペプチドは、他の物質に結合するよりも高い親和性、親和性で、より容易に、及び／またはより長い持続時間で結合する場合、標的に「特異的に結合する」または「優先的に結合する」。例えば、Ｓｉｇｌｅｃ－８エピトープに特異的または優先的に結合するｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドは、このエピトープを、他のＳｉｇｌｅｃ－８エピトープまたは非Ｓｉｇｌｅｃ－８エピトープに結合するよりも、よりも高い親和性、アビディティ、より容易に、及び／またはより長い持続時間で結合するｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドである。また、この定義を読むと、例えば、第１の標的に特異的にまたは優先的に結合するｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドは、第２の標的に特異的にまたは優先的に結合する場合もあれば、結合しない場合もあることが理解される。したがって、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的結合を必要としない（ただし、それは含むことができるが）。一般に、必ずしもそうではないが、結合への言及は、優先的結合を意味する。「特異性」とは、結合タンパク質が抗原に

選択的に結合する能力を指す。

【００５２】

「阻害」または「阻害する」という用語は、任意の表現型特性の低下、停止、もしくは抑制、またはその特性の発生率、程度、もしくは可能性の低下、停止、もしくは抑制を指す。「低減する」または「阻害する」とは、参照と比較して、活性、機能、量、存在量または増加率を減少、低減、抑制または停止させることである。いくつかの実施形態では、「低減する」または「阻害する」とは、１０％以上の全体的な低下を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、「低減する」または「阻害する」とは、５０％以上の全体的な低下を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、「低減する」または「阻害する」とは、７５％、８５％、９０％、９５％、またはそれよりも大きい全体的な低下を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、上記の量は、同じ期間にわたる対照と比較して、一定期間にわたって阻害または減少される。

【００５３】

「アゴナイズする」または「活性化する」という用語は、任意の表現型特徴の増加、活性化、もしくは誘導、またはその特性の可能性の発生率の増加、活性化、もしくは誘導を指す。「アゴナイズする」または「活性化する」とは、参照と比較して、活性、機能、量、存在量、または増加率を増加させる、活性化する、または誘導することである。いくつかの実施形態では、「アゴナイズする」または「活性化する」とは、１０％以上の全体的な増加を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、「アゴナイズする」または「活性化する」とは、５０％以上の全体的な増加を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、「アゴナイズする」または「活性化する」とは、７５％、８５％、９０％、９５％、またはそれ以上の全体的な増加を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、上記の量は、同じ期間にわたる対照と比較して、一定期間にわたって増加する。本明細書で使用される場合、Ｓｉｇｌｅｃ－８の活性に関する「アゴナイズする」という用語は、マスト細胞及び好酸球上の阻害性受容体であるＳｉｇｌｅｃ－８の活性が増加することを指し、ＩＬ－５の存在下での好酸球の細胞死を媒介し、マスト細胞の活性化を負に調節する。従って、いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８のアゴニストは、ＩＬ－５の存在下で好酸球細胞死を増加させ、及び／またはマスト細胞活性化の阻害を増加させる。いくつかの実施形態では、「アゴナイズする」とは、調節因子の非存在下でのＳｉｇｌｅｃ－８活性と比較して、Ｓｉｇｌｅｃ－８活性の増加を指す。

【００５４】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗原結合分子（例えば、ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチド）が結合する。エピトープはしばし、アミノ酸、ポリペプチド、または糖側鎖等の分子の化学的に活性な表面分類からなり、特定の３次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。エピトープは、標的分子の隣接残基及び／または並置非隣接残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）の両方から形成され得る。隣接残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒への暴露時に保持されるが、第３次折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的に、変性溶媒で処理することで失われる。エピトープには、少なくとも３個、少なくとも５個、または８～１０個の残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）が含まれ得るが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、エピトープは、長さ２０残基未満（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）、１５残基未満、または１２残基未満である。２つの抗体が、抗原に対して競合的結合を示す場合、抗原内の同じエピトープに結合し得る。いくつかの実施形態では、エピトープは、抗原結合分子上のＣＤＲ残基に対する特定の最小距離によって同定され得る。いくつかの実施形態では、エピトープは、上記の距離によって同定され得、さらに、抗原結合分子の残基と抗原残基との間の結合（例えば、水素結合）に関与する残基に限定され得る。エピトープは、様々なスキャンによっても同定することができ、例えば、アラニンまたはアルギニンスキャンは、抗原結合分子が相互作用することができる１つ以上の残基を示すことができる。明示的に示されない限り、エピトープとしての残基のセットは、他の残基が特定の抗原結合

分子に対するエピトープの一部であることを除外するものではない。むしろ、このようなセットの存在は、エピトープの最小限のシリーズ（または種のセット）を指定する。従って、いくつかの実施形態では、エピトープとして同定される残基のセットは、抗原上のエピトープに対する残基の排他的なリストではなく、抗原に関連する最小限のエピトープを指定する。

【００５５】

「非線状エピトープ」または「立体構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原性タンパク質内の非隣接的なポリペプチド、アミノ酸及び／または糖を含む。いくつかの実施形態では、残基のうちの少なくとも１つは、エピトープのその他の記載される残基と非隣接的であるが、しかし、残基のうちの１つ以上は、他の残基と隣接することもできる。

【００５６】

「線状エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原性タンパク質内の隣接的なポリペプチド、アミノ酸及び／または糖を含む。いくつかの実施形態では、線状エピトープ内の残基のすべてが抗原結合分子によって直接結合される（または結合に関与する）必要はないことに留意されたい。いくつかの実施形態では、線状エピトープは、線状エピトープの配列から効果的になるペプチドを用いた免疫化に由来し得る、またはその配列セクションとだけ（抗原結合分子が、少なくとも一時的に、相互作用することができるように）タンパク質の残部から比較的単離されているタンパク質の構造セクションに由来し得る。

【００５７】

「抗体」という用語は、最も広義に使用され、従来の抗体（典型的には、少なくとも１つの重鎖及び少なくとも１つの軽鎖を含み、より典型的には、２つの抗原結合ドメインを形成する２つの重鎖及び２つの軽鎖を含む）、単一ドメイン抗体（例えば、少なくとも１つのＶＨＨドメイン及びＦｃ領域を含むｓｄＡｂ）、ＶＨＨ含有ポリペプチド（少なくとも１つのＶＨＨドメインを含むポリペプチド））、及び所望の抗原結合活性を呈する限りにおいて、前述のいずれかの断片を含むがこれらに限定されない、抗体様抗原結合ドメインを含む様々なポリペプチドを包含する。いくつかの実施形態では、抗体は、二量体化ドメインを含む。このような二量体化ドメインには、重鎖定常ドメイン（ＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３を含み、ＣＨ１は通常、軽鎖定常ドメイン、ＣＬと対になって二量体化を媒介する）及びＦｃ領域（ヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３を含み、ヒンジ及びＣＨ３は二量体化を媒介する）が挙げられるが、これらに限定されない。抗体という用語にはまた、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びラクダ科の動物（ラマを含む）、サメ、マウス、ヒト、カニクイザルなどの様々な種の抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【００５８】

本明細書で使用される、「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原に結合するのに十分な抗体の部分を指す。いくつかの実施形態では、従来の抗体の抗原結合ドメインは、３つの重鎖ＣＤＲ及び３つの軽鎖ＣＤＲを含む。従って、いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３、及び抗原への結合を維持するのに必要なＦＲ１及び／またはＦＲ４の任意の部分を含む重鎖可変領域、ならびにＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３、及び抗原への結合を維持するのに必要なＦＲ１及び／またはＦＲ４の任意の部分を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。非限定的なかかる抗原結合ドメインとしては、Ｆａｂ及びｓｃＦｖが挙げられる。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドの抗原結合ドメインは、ＶＨＨドメインの３つのＣＤＲを含む。従って、いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドの抗原結合ドメインは、ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３、ならびに抗原への結合を維持するのに必要なＦＲ１及び／またはＦＲ４の任意の部分を含むＶＨＨドメインを含む。

【００５９】

本明細書で使用される「ＶＨＨ」または「ＶＨＨドメイン」という用語は、ラクダ科抗体などの単一ドメイン抗体の抗原結合部分を指す。いくつかの実施形態では、ＶＨＨは、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４と呼ばれる３つのＣＤＲと４つのフレームワーク領域とを含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨは、ＶＨＨが抗原結合及び特異性を実質的に維持する限り、ＦＲ１及び／もしくはＦＲ４の一部のみを含むように、またはそれらのフレームワーク領域の一方もしくは両方を欠くように、Ｎ末端またはＣ末端で切断され得る。

【００６０】

「単一ドメイン抗体」及び「ｓｄＡｂ」という用語は、本明細書で互換的に使用され、軽鎖のないＶＨＨドメインなどの少なくとも１つの単量体ドメイン、及びＦｃ領域を含む抗体を指す。いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂは、２つのポリペプチドの二量体であり、各ポリペプチドは、少なくとも１つのＶＨＨドメイン及びＦｃ領域を含む。本明細書で使用される場合、「単一ドメイン抗体」及び「ｓｄＡｂ」という用語は、複数のＶＨＨドメインを含むポリペプチド、例えば、構造VHH_1-VHH_2-Fcまたは$VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc$を有するポリペプチドを包含し、ここで、VHH_1、VHH_2、及びVHH_3は、同じでも異なっていてもよい。

【００６１】

「ＶＨＨ含有ポリペプチド」という用語は、少なくとも１つのＶＨＨドメインを含むポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、ＶＨＨポリペプチドは、２つ、３つ、または４つ以上のＶＨＨドメインを含み、各ＶＨＨドメインは、同じでも異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、ＶＨＨ含有ポリペプチドは、Ｆｃ領域を含む。いくつかのそのような実施形態では、ＶＨＨ含有ポリペプチドは、ｓｄＡｂと称され得る。さらに、いくつかのそのような実施形態では、ＶＨＨポリペプチドは二量体を形成し得る。ｓｄＡｂでもあるＶＨＨ含有ポリペプチドの非限定的な構造には、VHH_1-Fc、VHH_1-VHH_2-Fc、及び$VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc$が含まれ、ここで、VHH_1、VHH_2、及びVHH_3は同じでも異なっていてもよい。このような構造のいくつかの実施形態では、１つのＶＨＨは、リンカーによって別のＶＨＨに接続され得る、または１つのＶＨＨは、リンカーによってＦｃ領域に接続され得る。いくつかのかかる実施形態では、リンカーは、１～２０個のアミノ酸、好ましくは、主にグリシン及び任意選択でセリンから構成される１～２０個のアミノ酸を含む。非限定的なリンカーは、配列番号６９及び７０に提示される。いくつかの実施形態では、ＶＨＨ含有ポリペプチドがＦｃを含む場合、二量体を形成する。したがって、構造VHH_1-VHH_2-Fcは、二量体を形成する場合、四価であるとみなされる（すなわち、二量体は、４つのＶＨＨドメインを有する）。同様に、構造Ｖ$HH_1_VHH_2-VHH_3-Fc$は、二量体を形成する場合、六価であるとみなされる（すなわち、二量体は、６つのＶＨＨドメインを有する）。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域を含むＶＨＨ含有ポリペプチドは、例えば、Ｆｃ領域のヒンジの会合を介して、ホモ二量体を形成する。

【００６２】

「モノクローナル抗体」という用語は、抗体の実質的に均質の集団の抗体（ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチド）を指し、すなわち、個体群を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る可能な自然発生の変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位を対象としている。さらに、異なる決定基（エピトープ）を対象とする異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象としている。したがって、モノクローナル抗体の試料は、抗原上の同じエピトープに結合することができる。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、最初にＫｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ,１９７５,Ｎａｔｕｒｅ２５６：４９５により記載されるハイブリドーマ法を使用して作製され得るか、または例えば、米国特許第４，８１６，５６７号に記載される組換えＤＮＡ法により作製され

得る。モノクローナル抗体はまた、例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．,１９９０,Ｎａｔｕｒｅ３４８：５５２－５５４に記載される技術を使用して生成されたファージライブラリーから単離され得る。

【００６３】

「ＣＤＲ」という用語は、当業者に対して少なくとも１つの識別方法によって定義される相補性決定領域を示す。いくつかの実施形態では、ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリングスキーム（Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｋ，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，１９８７，１９６：９０１－９１７を参照）、Ｋａｂａｔナンバリングスキーム（Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９９２,Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＤＩＡＮＥ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ：２７１９を参照）、ＫａｂａｔとＣｈｏｔｈｉａの組み合わせ、ＡｂＭの定義（Ｗｈｉｔｅｌｅｇｇ＆Ｒｅｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．２０００，１３：８１９－８２４；Ｗｈｉｔｅｌｅｇ＆Ｒｅｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．２００４，２４８：５１－９１を参照）、ＩＭＧＴの定義（Ｌｅｆｒａｎｃ，（１９９９）Ｔｈｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｓｔ，７，１３２－１３６を参照）、及び／またはＣｏｎｔａｃｔの定義（ＭａｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．,Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，２６２：７３２－７４５を参照）のいずれかに従って定義することができる。ＶＨＨは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と呼ばれる３つのＣＤＲを含む。

【００６４】

本明細書で使用される「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも３つの重鎖定常ドメイン、ＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３を含む領域を指す。当然のことながら、ドメイン内の非機能的な欠失及び改変は、別段の指定がない限り、「重鎖定常領域」という用語の範囲内に包含される。非限定的な例示的な重鎖定常領域には、γ、δ、及びαが挙げられる。非限定的な例示的な重鎖定常領域には、ε及びμも挙げられる。各重鎖定常領域は、抗体のアイソタイプに対応する。例えば、γ定常領域を含む抗体はＩｇＧ抗体であり、δ定常領域を含む抗体はＩｇＤ抗体であり、α定常領域を含む抗体はＩｇＡ抗体である。さらに、μ定常領域を含む抗体はＩｇＭ抗体であり、ε定常領域を含む抗体はＩｇＥ抗体である。特定のアイソタイプは、さらにサブクラスに分割され得る。例えば、ＩｇＧ抗体としては、ＩｇＧ１（γ_1定常領域を含む）抗体、ＩｇＧ２（γ_2定常領域を含む）抗体、ＩｇＧ３（γ_3定常領域を含む）抗体、及びＩｇＧ４（γ_4定常領域を含む）抗体が挙げられるが、これらに限定されず；ＩｇＡ抗体としては、ＩｇＡ１（α_1定常領域を含む）抗体、及びＩｇＡ２（α_2定常領域を含む）抗体が挙げられるが、これらに限定されず；ＩｇＭ抗体としては、ＩｇＭ１及びＩｇＭ２が挙げられるが、これらに限定されない。本発明で論じられている全ての重鎖定常領域アミノ酸位置について、ナンバリングは、最初に配列決定されたヒトｌｇＧ１である骨髄腫タンパク質Ｅｕのアミノ酸配列が記載されているＥｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９６９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　６３（１）：７８－８５で最初に記載されるＥＵ指数に従う。Ｅｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌのＥｕ指数はＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．,１９９１　,Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ,５ｔｈ　Ｅｄ．,Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ,Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ,Ｂｅｔｈｅｓｄａにも記載されている。したがって、語句「Ｋａｂａｔに示されるＥＵ指数」または「ＫａｂａｔのＥＵ指数」及び「Ｋａｂａｔに示されるＥＵ指数に従う位置」及びその文法上の変形は、Ｋａｂａｔ　１９９１に示されるＥｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌのヒトｌｇＧ１　Ｅｕ抗体に基づく残基ナンバリングシステムを指す。

【００６５】

本明細書で使用される「Ｆｃ領域」は、ＣＨ２及びＣＨ３を含む重鎖定常領域の一部を指す。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３を含む。様々な実施形態では、Ｆｃ領域がヒンジを含む場合、ヒンジ及びＣＨ３は、２つのＦｃ含有ポリペプチド間の二量体化を媒介する。Ｆｃ領域は、本明細書で論じられる任意の抗体重鎖

定常領域アイソタイプであり得る。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４に由来する。

【００６６】

本明細書で使用される場合、「アクセプターヒトフレームワーク」は、本明細書に記載される、ヒト免役グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、重鎖可変ドメイン（V_H）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免役グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、またはそれは、アミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は、１０未満、または９未満、または８未満、または７未満、または６未満、または５未満、または４未満、または３未満であり、ＶＨＨのような単一の抗原結合ドメインにおけるヒトフレームワークのすべてにまたがる。

【００６７】

「親和性」は、分子（例えば、ｓｄＡｂ、またはＶＨＨ含有ポリペプチドなどの抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の、総計の非共有性相互作用の強度を指す。分子Ｘの、そのパートナーＹに対する親和性または見かけの親和性は、一般に、それぞれ解離定数（K_d）または$K_{d\text{見かけ}}$によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されるものを含めた、当該技術分野で周知の一般的な方法（例えば、ＥＬＩＳＡ　K_d、ＫｉｎＥｘＡ、フローサイトメトリー、及び／または表面プラズモン共鳴デバイスなど）によって測定することができる。そのような方法としては、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）、またはフローサイトメトリーを含む方法が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、例示的なポリペプチドは、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイによって測定した場合、約９０、８５、８０、７５、７０、６８、６５、６０、５５、５６、または５０×１０^{-１２}Ｍ以下のK_DでＳｉｇｌｅｃ－８に結合する。いくつかの実施形態では、例示的なポリペプチドは、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイによって測定した場合、約５００、４００、３００、２００、１００、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６８、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、または１０×１０^{-１２}Ｍ以下のK_DでＳｉｇｌｅｃ－８に結合する。

【００６８】

本明細書で使用される「K_d」という用語は、抗原結合分子／抗原相互作用の平衡解離定数を指す。「K_d」という用語が本明細書で使用される場合、それはK_d及び$K_{d-見かけ}$を含む。

【００６９】

いくつかの実施形態では、抗原結合分子のK_dは、抗原発現細胞株を使用し、各抗体濃度で測定された平均蛍光を非線形１部位結合式（Ｐｒｉｓｍ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　ＧｒａｐｈＰａｄ）にフィッティングするフローサイトメトリーによって測定される。いくつかのそのような実施形態では、K_dは、$K_{d-見かけ}$である。

【００７０】

「生物活性」という用語は、分子の任意の１つ以上の生物学的特性を指す（インビボで見出されるように天然に存在するか、または組換え手段によって提供されるか、もしくは可能になるかに関わらず）。

【００７１】

「アゴニスト」または「活性化」抗体は、標的抗原の生物活性を増加及び／または活性化するものである。いくつかの実施形態では、アゴニスト抗体は、抗原に結合し、その生物活性を少なくとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％、またはそれ以上増加させる。

【００７２】

「アンタゴニスト」、「遮断」または「中和」抗体は、標的抗原の生物活性を阻害するものである。いくつかの実施形態では、中和抗体は、抗原に結合し、その生物活性を少な

くとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％またはそれ以上低下させる。

【００７３】

「親和性成熟」ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドは、変化を有さない親ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドと比較して、１つ以上のＣＤＲにおいて１つ以上の変化を有するｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドを指し、そのような変化が結果として抗原に対するｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドの親和性を改善させる。

【００７４】

本明細書で使用される「ヒト化ＶＨＨ」は、１つ以上のフレームワーク領域がヒトフレームワーク領域で実質的に置き換えられているＶＨＨを指す。いくつかの事例では、ヒト免疫グロブリンの特定のフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化ＶＨＨは、元のＶＨＨにもヒトフレームワーク配列にも見られないが、ｓｄＡｂ　ＶＨＨ含有ポリペプチドの性能をさらに改良及び最適化するために含まれる残基を含み得る。いくつかの実施形態では、ヒト化ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドは、ヒトＦｃ領域を含む。理解されるであろうように、ヒト化配列は、その一次配列によって同定することができ、必ずしも抗体が創出されたプロセスを示すものではない。

【００７５】

「エフェクター陽性Ｆｃ領域」は、天然配列Ｆｃ領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」は、Ｆｃ受容体結合；Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）のダウンレギュレーション；及びＢ細胞活性などを含む。これらのようなエフェクター機能は、結合ドメイン（たとえば、抗体可変ドメイン）と組み合わされるＦｃ領域を一般的に必要とし、様々なアッセイを使用して評価されることが可能である。

【００７６】

「天然配列Ｆｃ領域」は、天然で見出されるＦｃ領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトＦｃ領域には、天然配列ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域（非Ａ及びＡアロタイプ）、天然配列ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域、天然配列ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域、及び天然配列ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域、ならびにそれらの天然に存在するバリアントが含まれる。

【００７７】

「バリアントＦｃ領域」は、少なくとも１つのアミノ酸改変によって天然配列Ｆｃ領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、「バリアントＦｃ領域」は、少なくとも１つのアミノ酸改変によって天然配列Ｆｃ領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含み、さらに少なくとも１つの天然配列Ｆｃ領域のエフェクター機能を保持する。いくつかの実施形態では、バリアントＦｃ領域Ｆｃ領域は、天然配列Ｆｃ領域または親ポリペプチドのＦｃ領域と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Ｆｃ領域中または親ポリペプチドのＦｃ領域中に約１～約１０個のアミノ酸置換、及び好ましくは約１～約５個のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本明細書のバリアントＦｃ領域は、天然配列Ｆｃ領域及び／または親ポリペプチドのＦｃ領域と少なくとも約８０％の配列同一性、それらとの少なくとも約９０％の配列同一性、それらと少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性を保有するであろう。

【００７８】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体を表す。いくつかの実施形態では、ＦｃγＲは、天然ヒトＦｃＲである。いくつかの実施形態では、ＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスの受容体を含み、それらの受容体の対立遺伝子バリアント、あるいはスプライス形態を含む。ＦｃγＲＩＩ受容体は、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性化受

容体」）及びＦｃγＲＩＩＢ（「阻害受容体」）を含み、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる同様のアミノ酸配列を有する。活性化受容体ＦｃγＲＩＩＡは、その細胞質ドメインに免疫受容体のチロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含有する。阻害受容体ＦｃγＲＩＩＢは、その細胞質ドメインに免疫受容体のチロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）を含有する。（例えば、Ｄａｅｒｏｎ,Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３－２３４（１９９７）を参照されたい）。ＦｃＲｓは、例えば、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ,Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ９：４５７－９２（１９９１）；Ｃａｐｅｌ ｅｔ ａｌ．,Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ４：２５－３４（１９９４）；及びｄｅ Ｈａａｓ ｅｔ ａｌ．,Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０－４１（１９９５）に概説されている。将来的に特定されるものも含む他のＦｃＲは、本明細書における「ＦｃＲ」という用語に包含される。例えば、用語「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」はまた、母体のＩｇＧの胎児への転移及び免疫グロブリンの恒常性の規制を担う新生児受容体ＦｃＲｎも包含する（Ｇｕｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）及びＫｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））。ＦｃＲｎに対する結合の測定方法は既知である（例えば、Ｇｈｅｔｉｅ ａｎｄ Ｗａｒｄ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １８（１２）：５９２－５９８（１９９７）；Ｇｈｅｔｉｅ ｅｔ ａｌ．,Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ,１５（７）：６３７－６４０（１９９７）；Ｈｉｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ．,Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９（８）：６２１３－６２１６（２００４）；ＷＯ ２００４／９２２１９（Ｈｉｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ．を参照されたい）。

【００７９】

本明細書で使用される場合、「実質的に類似」または「実質的に同じ」という用語は、当業者が、該値により測定される生物学的特質の文脈において、２つ以上の値の間の差異を生物学的及び／または統計学的に有意性がほとんどないか、または全くないと見なすような、２つ以上の数値間の十分に程度の高い類似性を意味する。いくつかの実施形態では、２つ以上の実質的に類似した値は、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、または５０％のいずれか１つ以下で異なる。

【００８０】

ポリペプチド「バリアント」とは、配列をアラインし、必要であれば、最大配列同一性の割合を達成するためのギャップを導入した後に、配列同一性の一部として保存的置換を考慮しない、天然配列ポリペプチドと少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する、生物活性のあるポリペプチドを意味する。そのようなバリアントとしては、例えば、１つ以上のアミノ酸残基がペプチドのＮ末端またはＣ末端に付加または欠失されたポリペプチドが挙げられる。いくつかの実施形態では、バリアントは、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、バリアントは、少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、バリアントは、天然配列ポリペプチドと少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性を有する。

【００８１】

本明細書で使用される場合、ペプチド、ポリペプチド、または抗体配列に関して、「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」及び「相同性」は、配列同一性最大パーセントを達成するために、配列を整合させ、必要に応じてギャップを導入した後の、配列同一性の一部としていずれの保存的置換も考慮しない、特定のペプチドもしくはポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野における技術の範囲内である種々の方式で、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、またはＭＥＧＡＬＩＧＮＴＭ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェア等の、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

【００８２】
アミノ酸置換は、ポリペプチド内の１つのアミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることを含み得るが、これに限定されない。例示的な置換を表１に示す。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、その産物が、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性、または改善されたＡＤＣＣもしくはＣＤＣについて、スクリーニングされてもよい。

【００８３】
（表１）

元の残基	例示的な置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

【００８４】
アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って群分けされ得る：
（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、
（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、
（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ、
（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、
（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、
（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【００８５】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うであろう。

【００８６】

「ベクター」という用語は、宿主細胞内で増殖され得るクローン化されたポリヌクレオチド（複数可）を含むように操作され得るポリヌクレオチドを説明するために使用される。ベクターは、以下の要素のうちの１つ以上を含み得る：複製起点、目的のポリペプチドの発現を制御する１つ以上の制御配列（例えば、プロモーター及び／またはエンハンサーなど）、及び／またはより選択可能なマーカー遺伝子（例えば、抗生物質耐性遺伝子、及び比色アッセイに使用され得る遺伝子、例えば、β－ガラクトシダーゼ）。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞において目的のポリペプチドを発現させるために使用されるベクターを指す。

【００８７】

「宿主細胞」は、ベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得るか、またはそうであったことがある細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。例示的な真核細胞としては、霊長類または非霊長類の動物細胞などの哺乳動物細胞；酵母などの真菌細胞；植物細胞；及び昆虫細胞などが挙げられる。非限定的な例示的な哺乳動物細胞としては、ＮＳＯ細胞、ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞（Ｃｒｕｃｅｌｌ）、ならびに２９３及びＣＨＯ細胞、ならびにそれらの誘導体、例えば、２９３－６Ｅ、ＣＨＯ－ＤＧ４４、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－Ｓ細胞、及びＣＨＯ－ＤＳ細胞が挙げられる。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫が含まれ、子孫は、自然、偶発的、または意図的な変異のため、必ずしも元の親細胞と（形態においてまたはゲノムＤＮＡ相補体において）完全に同一である必要はない。宿主細胞は、本明細書で提供されるポリヌクレオチド（複数可）でインビボでトランスフェクトされた細胞を含む。

【００８８】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、それが典型的に自然界に見られるか、または産生される成分の少なくとも一部から分離された分子を指す。例えば、ポリペプチドは、そのポリペプチドが産生された細胞の成分の少なくとも一部から分離される場合、「単離された」と称される。ポリペプチドが発現後に細胞によって分泌される場合、ポリペプチドを含む上清をそれを産生した細胞から物理的に分離することは、ポリペプチドを「単離する」こととみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、通常、自然界で見出される、または、例えば、ＲＮＡポリヌクレオチドの場合には、それが産生された細胞の成分の少なくとも一部から分離されている、より大きなポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡポリヌクレオチドの場合、ゲノムＤＮＡまたはミトコンドリアＤＮＡなど）の一部でない場合、「単離された」と称される。したがって、宿主細胞内のベクターに含まれるＤＮＡポリヌクレオチドは、「単離された」と称され得る。

【００８９】

「個体」及び「対象」という用語は、本明細書では、動物、例えば、哺乳動物を指すために互換的に使用される。いくつかの実施形態では、ヒト、げっ歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳動物実験動物、哺乳動物家畜、哺乳動物スポーツ動物、及び哺乳動物ペットを含むがこれらに限定されない、哺乳動物を治療する方法が提供される。いくつかの実施例では、「個体」または「対象」は、疾患または障害の治療を必要とする個体または対象を指す。いくつかの実施形態では、治療を受ける対象は、対象が治療に関連する障害を有する、または障害にかかる十分なリスクがある事実を示す特定された患者であり得る。

【００９０】

本明細書で使用される「疾患」または「障害」とは、治療が必要とされる及び／または所望される病態を指す。

【００９１】

いくつかの実施形態では、「増加」または「減少」は、それぞれ、統計学的に有意な増加または減少を指す。当業者には明らかであろうように、「調節すること」はまた、その

リガンド、結合パートナー、ホモ多量体もしくはヘテロ多量体形態への会合のためのパートナー、または基質の１つ以上対して、標的または抗原の親和性、アビディティ、特異性、及び／または選択性に変化（増加または減少のいずれかであり得る）をもたらすこと；標的または抗原が存在する培地または環境中の１つ以上の条件（例えば、ｐＨ、イオン強度、共同因子存在など）に対して、標的または抗原の感度に変化（増加または減少のいずれかであり得る）をもたらすこと；及び／または試験薬剤が存在しない同じ条件と比較した、細胞増殖もしくはサイトカイン産生が関与する。これは、関与する標的に応じて、任意の適切な方法で、及び／またはそれ自体が公知であるか、または本明細書に記載される任意の適切なアッセイを使用して、判定することができる。

【００９２】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」は、疾患（例えば、がんまたはがん転移）の症状を阻害する、または症状の発生を予防する、または症状を改善するのに十分な細胞及び／または体液性免疫応答を包含することを意味する。「免疫反応」は、自然免疫系と適応免疫系の両方の態様を含み得る。

【００９３】

本明細書で使用される場合、「治療」とは、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本明細書で使用される「治療」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患のための治療薬の任意の投与または適用を包含する。本開示の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果は、１つ以上の症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の増悪の予防、疾患の再発の予防または遅延、疾患進行の遅延または減速、病状の改善、疾患または疾患の進行の阻害、及び疾患またはその進行の阻害または減速のうちのいずれか１つ以上を含むが、これらに限定されない。疾患の病理学的結果の軽減もまた、「治療」に包含される。本明細所に提供されるそれらの態様のうちの任意の１つ以上を企図する。上記に沿って、治療という用語は、障害のすべての態様の１００％の除去を必要としない。

【００９４】

「改善する」とは、治療薬を投与しない場合と比較して、１つ以上の症状が軽減または改善されることを意味する。「改善する」には、症状の持続期間の短縮または低減も含まれる。

【００９５】

「生体試料」という用語は、生物または以前に生物であった物質の量を意味する。このような物質としては、限定されるものではないが、血液（例えば、全血）、血漿、血清、気管支肺胞洗浄液、嚥下、経鼻洗浄液、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球洗浄液、細胞、器官、組織、骨髄、リンパ節、及び脾臓が挙げられる。

【００９６】

実験または比較の文脈における「対照」または「参照」という用語は、分析物を含まないことが知られている組成物（「陰性対照」）または分析物を含むことが知られている組成物（「陽性対照」）を指す。陽性対照は、既知濃度の分析物を含み得る。対照または参照はまた、試験されている薬剤、例えば、抗体の活性を欠くことが知られている対照剤を指す場合もある。

【００９７】

本明細書で使用される「予防すること」には、疾患に罹患しやすいがまだ疾患と診断されていない対象における疾患の発生または再発に関して予防を提供することが含まれる。別段の定めのない限り、「低減させる」、「阻害する」、または「防止する」という用語は、全ての期間にわたる完全な防止を示すかまたは必要とするものではなく、測定されている期間にわたるものである。

【００９８】

物質／分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重等の要因、ならびに個体における所望の応答を引き出す物質／分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの能力により変動し得る。治療有効量はまた、治療的に有益な効果が、物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの毒性または有害効

果を上回るものである。治療有効量は、１回以上の投与で送達することができる。治療有効量とは、所望の治療結果及び／または予防結果を達成するために必要な用量及び期間に有効な量を指す。

【００９９】

「薬学的製剤」及び「医薬組成物」という用語は互換的に使用され、活性成分の生物学的活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象が受け入れられない程度に毒性のいかなる成分も含まない調製物を指す。かかる製剤は、滅菌であり得る。

【０１００】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に投与するための「医薬組成物」を一緒に含む治療薬とともに使用するための当該技術分野において従来の非毒性の固体、半固体、または液体充填剤、希釈剤、封入材料、製剤助剤、または担体を指す。薬学的に許容される担体は、使用される用量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、製剤の他の成分と適合する。薬学的に許容される担体は、用いられる製剤に適切である。

【０１０１】

１つ以上のさらなる治療薬剤と「組み合わせた」投与は、同時（同時期）及び任意の順序の連続した投与を含む。

【０１０２】

「同時に」という用語は、本明細書では、２つ以上の治療薬の投与を指すために使用され、投与の少なくとも一部が時間的に重複するか、または１つの治療薬の投与が他の治療薬の投与に対して短期間内になるか、または、両方の薬剤の治療効果が少なくとも一定期間重複する。

【０１０３】

「連続して」という用語は、本明細書では、時間的に重複しない２つ以上の治療薬の投与、または薬剤の治療効果が重複しない２つ以上の治療薬の投与を指すために使用される。

【０１０４】

本明細書で使用されるとき、「と併せて」とは、１つの治療法に加えた別の治療法の施行を指す。したがって、「と併せて」とは、個体への１つの治療法の施行前、施行中、または施行後の別の治療法の施行を指す。

【０１０５】

用語「添付文書」は、治療薬の市販パッケージに習慣的に含まれる、適応、用途、用量、投与、複合療法、禁忌、及び／またはそのような治療薬の使用に関する警告についての情報を含む指示書を指すために用いられる。

【０１０６】

「製品」とは、少なくとも１つの試薬、例えば、疾患もしくは障害（例えば、がん）の治療のための医薬品、または本明細書に記載のバイオマーカーを特異的に検出するためのプローブを含む、任意の製造物（例えば、パッケージもしくは容器）またはキットである。いくつかの実施形態では、製造物またはキットは、本明細書に記載の方法を実行するためのユニットとして、推奨、流通、または販売される。

【０１０７】

「標識」及び「検出可能な標識」という用語は、例えば、抗体または抗原に結合して、特異的結合対のメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能にする部分を意味する。特定の結合対の標識されたメンバーは、「検出可能に標識された」と称される。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の同定を提供する標識が組み込まれたタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、標識は、視覚または機器手段、例えば、放射性標識化されたアミノ酸の組み込み、または標識されたアビジン（例えば、蛍光マーカー、または光学法もしくは熱量測定法によって検出され得る酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合によって検出可能なシグナルを生成することができる検出可能なマーカーである。ポリペプチドの標識の例としては、以下：放射性同位体または放射性核種（例えば、^{3}H、^{14}

Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ、または^{153}Ｓｍ）；色素原、蛍光標識（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；及びガドリニウムキレートなどの磁気剤が挙げられるが、これらに限定されない。イムノアッセイに一般的に使用される標識の代表的な例としては、光を発生する部分、例えば、アクリジニウム化合物、及び蛍光を発生する部分、例えば、フルオレセインが挙げられる。この点で、部分自体は検出可能に標識されていなくてもよいが、さらに別の部分との反応時に検出可能になり得る。

【０１０８】

例示的なＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド及びタンパク質

Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド及びタンパク質が本明細書で提供される。様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、Ｓｉｇｌｅｃ－８アゴニストである。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも２つの抗原結合ドメインを含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも３つの抗原結合ドメインを含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも２つの抗原結合ドメイン及び二量体化ドメインを含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも３つの抗原結合ドメイン及び二量体化ドメインを含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、二量体化ドメインは、Ｆｃ領域である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、生理学的条件下でＳｉｇｌｅｃ－８に結合する２つの抗原結合ドメインを含むポリペプチドよりも、例えば従来の抗体よりも低いＥＣ５０でＩＬ－５の存在下での好酸球殺滅を媒介する。いくつかの実施形態では、２つ以上の抗原結合ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、２つ以上の抗原結合ドメインは、異なる。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは全て、同じである。いくつかの態様では、各抗原結合抗体断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、各抗原結合ドメインは、ＦａｂまたはｓｃＦｖである。

【０１０９】

様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８に結合する。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合し、Ｓｉｇｌｅｃ－８をアゴナイズする（すなわち、その活性を増加させる）。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、Ｓｉｇｌｅｃ－８をアゴナイズし、ＩＬ－５の存在下で好酸球殺滅をもたらす。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、ＩＬ－５の存在下でインビトロまたはインビボで好酸球を枯渇させる。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、または８つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する１つ、２つ、３つ、または４つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する２つまたは３つのＶＨＨドメインを含む。Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８以外の１つ以上の標的タンパク質に結合する１つ以上のＶＨＨドメインを含み得る。このようなポリペプチドは、「多特異性」ポリペプチドと称され得る。

【０１１１】
様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する１つ、２つ、３つ、または４つのＶＨＨドメインを含む。様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する２つまたは３つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して互いに作動可能に連結されたＳｉｇｌｅｃ－８に結合する２つ、３つ、または４つのＶＨＨドメインを含む。ＶＨＨドメインを連結するために使用され得るリンカーの非限定的な例は、配列番号６９に提示される。
【０１１２】
いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する少なくとも１つのＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する１つ、２つ、３つ、または４つのＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する２つまたは３つのＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、タンパク質内のＳｉｇｌｅｃ－８結合部位の数を２倍にする二量体が形成されるように、生理学的条件におけるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。例えば、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する３つのＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、単量体として三価であるが、生理学的条件では、Ｆｃ領域は二量体化を媒介して、かかる条件下で六価の二量体としてＳｉｇｌｅｃ－８タンパク質を形成する。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域バリアント、例えば、本明細書に記載の任意のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域バリアントである。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｆｃ領域に融合された、本明細書に記載の少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、配列番号４４、４５、６５、６６、６７、または６８の配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介してＦｃ領域に作動可能に連結された、本明細書に記載の少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。ＶＨＨドメイン及びＦｃ領域を連結するために使用され得るリンカーの非限定的な例は、配列番号７０に提示される。
【０１１４】
様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、ヒトＦｃ領域であるか、またはヒトＦｃ領域に由来する。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１アイソタイプ、ＩｇＧ２アイソタイプ、ＩｇＧ３アイソタイプ、またはＩｇＧ４アイソタイプである。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、野生型ＩｇＧ１アイソタイプ（例えば、配列番号４５及び６６を参照）である。
【０１１５】
いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、ヒトＦｃ領域に由来し、ヘテロ二量体化のために設計された変異を含む。
【０１１６】
いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、ヒトＦｃ領域に由来し、抗体依存性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）及び／または補体依存性細胞傷害作用（ＣＤＣ）を変化させるように設計された変異を含み、例えば、ＷＯ００／４２０７２、ＷＯ０４／０２９２０７、ＷＯ０４／０９９２４９、及びＷＯ０４／０６３３５１に記載されるアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、Ｋａｂａｔに示されるＥＵ指数によるＧｌｕ２３３、Ｌｅｕ２３４、Ｌｅｕ２３５、またはそれらの任意の組み合わせの欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、ＡＤＣＣを低減または排除するために、Ｋａｂａｔに示されるＥＵ指数によるＧｌｕ２３３、Ｌｅ

ｕ２３４、Ｌｅｕ２３５（ｘＥＬＬ）の欠失を含む（例えば、配列番号４５及び６７を参照）。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、Ｋａｂａｔに示されるＥＵ指数によるＳｅｒ２３９及び／またはＩｌｅ３３２において改変を含む。一実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに含まれるＦｃ領域は、ＡＤＣＣを増強するためにＫａｂａｔに示されるＥＵ指数によるＳｅｒ２３９Ａｓｐ及びＩｌｅ３３２Ｇｌｕ（Ｓ２３９Ｄ、Ｉ３３２Ｅ）の改変を含む（例えば、配列番号６５及び６８）。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、Ｋａｂａｔに示されるＥＵ指数によるＬｙｓ４４７を欠く（例えば、配列番号６６、６７、及び６８を参照）。

【０１１７】

Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに使用され得るＦｃ領域には、配列番号４４、４５、６５、６６、６７、または６８のアミノ酸配列を含むＦｃ領域が含まれる。

【０１１８】

本明細書で開示されるＳｉｇｌｅｃ－８結合タンパク質は、様々な形式、例えば、図７に記載の形式をとることができる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、２つの同一のポリペプチド鎖を含むホモ二量体であり、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する１つ以上、２つ以上、３つ以上、２つ、３つ、または２つもしくは３つのＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド鎖は、Ｎ末端からＣ末端へ、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド鎖は、Ｎ末端からＣ末端へ、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第１のＶＨＨドメイン、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第２のＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含み、第１及び第２のＶＨＨドメインは、同一でも異なってもよい。いくつかの実施形態では、ポリペプチド鎖は、Ｎ末端からＣ末端へ、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第１のＶＨＨドメイン、Ｆｃ領域、及びＳｉｇｌｅｃ－８に結合する第２のＶＨＨドメインを含み、第一及び第二のＶＨＨドメインは、同一でも異なってもよい。いくつかの実施形態では、ポリペプチド鎖は、Ｎ末端からＣ末端へ、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第１のＶＨＨドメイン、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第２のＶＨＨドメイン、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第３のＶＨＨドメイン、及びＦｃ領域を含み、第１，第２、及び第３のＶＨＨドメインは、ＶＨＨドメインは同一でも異なってもよい。いくつかの実施形態では、ポリペプチド鎖は、Ｎ末端からＣ末端へ、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第１のＶＨＨドメイン、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する第２のＶＨＨドメイン、Ｆｃ領域、及びＳｉｇｌｅｃ－８に結合する第３のＶＨＨドメインを含み、第１，第２、及び第３のＶＨＨドメインは、ＶＨＨドメインは同一でも異なってもよい。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、ＡＤＣＣエフェクター機能を有するＦｃドメインを含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質の場合、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、ＩＬ－５の非存在下でＮＫ細胞による好酸球殺滅を増加させる。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、少なくとも２つのＶＨＨドメインを含み、第１のＶＨＨドメインは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合し、第２のＶＨＨドメインは、Ｓｉｇｌｅｃ－８以外の抗原に結合する。このようなポリペプチドは、「二重特異性」または「多重特異性」を称され得る。

【０１２１】

非限定的な例示的なＳｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは、以下の「Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメイン」サブセクションに記載される。

【０１２２】

Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメイン

本開示は、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインを提供する。表２は、様々なＣＤＲの定義に基づく例示的なＶＨＨドメイン、及びこれらのＶＨＨドメイン内のＣＤＲ配列を列挙する。「ｈｚ」で始まるＶＨＨ名は、対応する親ポリペプチドのヒト化型である

ことを示す。

【０１２３】

（表２）Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインを含むポリペプチド

名称	配列番号					
	VHH	CDR1, CDR2, CDR3				
		AbM	Chothia	Kabat	Contact	IMGT
Siglec8-G2	1	2, 3, 4	74, 80, 4	85, 91, 4	98, 104, 109	114, 120, 125
hzG2v14	5	6, 7, 8; 2, 3, 8	74, 80, 8	85, 92, 8	98, 104, 110	114, 120, 126
hzG2v47	11	13, 14, 15; 13, 3, 8	75, 80, 8	86, 92, 8	99, 104, 110	115, 120, 126
hzG2v51	16	18, 19, 20; 18, 3, 8	76, 80, 8	87, 93, 8	100, 104, 110	116, 120, 126
hzG2v52	21	23, 24, 25; 18, 3, 8	76, 80, 8	87, 92, 8	100, 104, 110	116, 120, 126
hzG2v53	26	28, 29, 30, 18, 29, 8	76, 81, 8	87, 94, 8	100, 105, 110	116, 121, 126
hzG2v54	31	33, 34, 35 18, 3, 8	76, 80, 8	87, 92, 8	100, 104, 110	116, 120, 126
hzG2v55	36	38, 39, 40 13, 3, 8	75, 80, 8	86, 92, 8	99, 104, 110	115, 120, 126
Siglec8-B12	49	52, 53, 54	77, 82, 54	88, 95, 54	101, 106, 111	117, 122, 127
Siglec8-D1	55	58, 59, 60	78, 83, 60	89, 96, 60	102, 107, 112	118, 123, 128
Siglec8-E2	61	63, 64, “GAY”	79, 84, “GAY”	90, 97, “GAY”	103, 108, 113	119, 124, 129

例えば、ＡｂＭ　ＣＤＲの定義下でのｈｚＧ２ｖ１４など、ＣＤＲ配列の識別子の複数のセットが提供されている場合、それらのＣＤＲ配列の複数のセットは同一の配列を指す。換言すれば、ｈｚＧ２ｖ１４の例では、配列番号２及び６は同じ配列を表し、配列番号３及び７は同じ配列を表す。

【０１２４】

追加の例示的なヒト化ＶＨＨドメインのアミノ酸配列は、配列番号１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４に記載されている。それらのＣＤＲ配列は、配列表には提供されていないが、それらは、当該技術分野で周知の方法によって例えば、ＡｂＹｓｉｓサーバー（ｗｗｗ．ａｂｙｓｉｓ．ｏｒｇ／ａｂｙｓｉｓ／）を使用して同定することができる。これらのＶＨＨドメインは、表２のｈｚＧ２ｖ１４、ｈｚＧ２ｖ４７、ｈｚＧ２ｖ５１、ｈｚＧ２ｖ５２、ｈｚＧ２ｖ５３、ｈｚＧ２ｖ５４、及びｈｚＧ２ｖ５５のバリアントである。したがって、それらのＣＤＲ配列は、ＶＨＨアミノ酸配列をそれらのうちの１つ以上のそれらの参照配列（例えば、ｈｚＧ２ｖ１４）でアラインし、参照配列のＣＤＲに対応する領域を単離することによっても同定することができる。

【０１２５】

ある特定の実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは例えば、配列番号２６、５、１１、１６、２１、３１、３６、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４から選択される配列に示される、本明細書で開示されるＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、ＡｂＭの定義下で本明細書に開示されるＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列、例えば、表２の「ＡｂＭ」の列に開示されるＣＤＲ配列のセットを含む。特定の実施形態で

は、ＶＨＨドメインは、Ｃｈｏｔｈｉａの定義下で本明細書に開示されるＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列、例えば、表２の「Ｃｈｏｔｈｉａ」の列に開示されるＣＤＲ配列のセットを含む。特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、Ｋａｂａｔの定義下で本明細書に開示されるＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列、例えば、表２の「Ｋａｂａｔ」の列に開示されるＣＤＲ配列のセットを含む。特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、Ｃｏｎｔａｃｔの定義下で本明細書に開示されるＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列、例えば、表２の「Ｃｏｎｔａｃｔ」の列に開示されるＣＤＲ配列のセットを含む。特定の実施形態では、ＶＨＨドメインは、ＩＭＧＴの定義下で本明細書に開示されるＶＨＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列、例えば、表２の「ＩＭＧＴ」の列に開示されるＣＤＲ配列のセットを含む。

【０１２６】

特定の実施形態では、ＡｂＭの定義下では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは、それぞれ配列番号４６、４７、及び４８に示されるコンセンサスｈｚＧ２のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、配列番号４８のX_1は、Ｑ、Ｓ、またはＴである。特定の実施形態では、配列番号４８のX_2はＴである。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号２、６、１３、１８、２３、２８、３３、または３８のＣＤＲ１配列、配列番号３、７、１４、１９、２４、２９、３４、または３９のＣＤＲ２配列、及び配列番号４、８、１５、２０、２５、３０、３５、または４０のＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号６、７、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１３、１４、及び１５のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１８、１９、及び２０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号２３、２４、及び２５のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号２８、２９、及び３０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号３３、３４、及び３５のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号３８、３９、及び４０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。

【０１２７】

特定の実施形態では、Ｃｈｏｔｈｉａの定義下では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは、それぞれ配列番号１４９、１５０、及び１５１に示されるコンセンサスｈｚＧ２のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、配列番号１５１のＸ１は、Ｑ、Ｓ、またはＴである。特定の実施形態では、配列番号１５１のX_2は、Ｔである。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号７４、７５、または７６のＣＤＲ１配列；配列番号８０または８１のＣＤＲ２配列；及び配列番号８のＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号７４、８０、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号７５、８０、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号７６、８０、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号７６、８１、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。

【０１２８】

特定の実施形態では、Ｋａｂａｔの定義下では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは、それぞれ配列番号１５２、１５３、及び１５４に示されるコンセンサスｈｚＧ２のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、配列番号１５４のX_1は、Ｑ、Ｓ、またはＴである。特定の実施形態では、配列番号１５４のX_2は、Ｔである。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号８５、８６、または８７のＣＤＲ１配列；配列番号９２、９３、または９４のＣＤＲ２配列；及び配列番号８のＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号８５、９２、及び８のＣＤ

Ｒ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号８６、９２、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号８７、９３、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号８７、９２、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号８７、９４、及び８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。

【０１２９】

特定の実施形態では、Ｃｏｎｔａｃｔの定義下では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは、それぞれ配列番号１５５、１５６、及び１５７に示されるコンセンサスｈｚＧ２のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、配列番号１５７のX_1は、Ｑ、Ｓ、またはＴである。特定の実施形態では、配列番号１５７のX_2は、Ｔである。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号９８、９９、または１００のＣＤＲ１配列；配列番号１０４または１０５のＣＤＲ２配列；及び配列番号１１０のＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号９８、１０４、及び１１０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号９９、１０４、及び１１０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１００、１０４、及び１１０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１００、１０５、及び１１０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。

【０１３０】

特定の実施形態では、ＩＭＧＴの定義下では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ＶＨＨドメインは、それぞれ配列番号１５８、１５９、及び１６０に示されるコンセンサスｈｚＧ２のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。特定の実施形態では、配列番号１６０のX_1は、Ｑ、Ｓ、またはＴである。特定の実施形態では、配列番号１６０のX_2は、Ｔである。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１１４、１１５、または１１６のＣＤＲ１配列；配列番号１２０または１２１のＣＤＲ２配列；及び配列番号１２６のＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１１４、１２０、及び１２６のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１１５、１２０、及び１２６のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１１６、１２０、及び１２６のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１１６、１２１、及び１２６のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＡｂＭ定義下における配列番号２、３、及び４のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＡｂＭ定義下における配列番号５２、５３、及び５４のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＡｂＭ定義下における配列番号５８、５９、及び６０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、ＡｂＭ定義下における、それぞれ配列番号６３及び６４のＣＤＲ１及びＣＤＲ２配列、ならびにアミノ酸配列「ＧＡＹ」を含むＣＤＲ３を含む。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、ヒト化される。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｈｏｔｈｉａ定義下における配列番号７４、８０、及び４のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｈｏｔｈｉａ定義下における配列番号７７、８２、及び５４のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形

態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｈｏｔｈｉａ定義下における配列番号７８、８３、及び６０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義下における、それぞれ配列番号７９及び８４のＣＤＲ１及びＣＤＲ２配列、ならびにアミノ酸配列「ＧＡＹ」を含むＣＤＲ３を含む。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、ヒト化される。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＫａｂａｔ定義下における配列番号８５、９１、及び４のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＫａｂａｔ定義下における配列番号８８、９５、及び５４のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＫａｂａｔ定義下における配列番号８９、９６、及び６０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、Ｋａｂａｔ定義下における、それぞれ配列番号９０及び９７のＣＤＲ１及びＣＤＲ２配列、ならびにアミノ酸配列「ＧＡＹ」を含むＣＤＲ３を含む。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、ヒト化される。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｏｎｔａｃｔ定義下における配列番号９８、１０４、及び１０９のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｏｎｔａｃｔ定義下における配列番号１０１、１０６、及び１１１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｏｎｔａｃｔ定義下における配列番号１０２、１０７、及び１１２のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＣｏｎｔａｃｔ定義下における配列番号１０３、１０８、及び１１３のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、ヒト化される。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＩＭＧＴ定義下における配列番号１１４、１２０、及び１２５のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＩＭＧＴ定義下における配列番号１１７、１２２、及び１２７のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＩＭＧＴ定義下における配列番号１１８、１２３、及び１２８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨＨドメインは、それぞれＩＭＧＴ定義下における配列番号１１９、１２４、及び１２９のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む。様々な実施形態では、ＶＨＨドメインは、ヒト化される。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号１、５、１１、１６、２１、２６、３１、３６、４９、５５、または６１から選択されるＶＨＨドメインの１～３つのＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号１、５、１１、１６、２１、２６、３１、３６、４９、５５、または６１から選択されるＶＨＨドメインの２つまたは３つのＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号１、５、１１、１６、２１、２６、３１、３６、４９、５５、または６１から選択されるＶＨＨドメインの３つのＣＤＲを含む。いくつかの態様では、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ　ＣＤＲである。いくつかの態様では、ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲである。いくつかの態様では、ＣＤＲは、ＡｂＭ　ＣＤＲである。いくつかの態様では、ＣＤＲは、Ｃｏｎｔａｃｔ　ＣＤＲである。いくつかの態様では、ＣＤＲは、ＩＭＧＴ　ＣＤＲである。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、ＣＤＲは、本明細書で提供されるＣＤＲと少なくとも約５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％の同一性を有するＣＤＲである。い

くつかの実施形態では、ＣＤＲ１は、配列番号２、６、１３、１８、２３、２８、３３、３８、５２、５８、６３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、または１１９から選択され、最大１、２、３、４、または５個のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ２は、配列番号３、７、１４、１９、２４、２９、３４、３９、５３、５８、６４、８０、８１、８２、８３、８４、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１２０、１２１、１２２、１２３、または１２４から選択され、最大１、２、３、４、５、６、７、または８個のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ３は、配列番号４、８、１５、２０、２５、３０、３５、４０、５４、６０、「ＧＡＹ」、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１２５、１２６、１２７、１２８、または１２９から選択され、最大１、２、３、４、５、６、７、または８個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書で「バリアント」と称される。いくつかの実施形態では、かかるバリアントは、例えば、親和性成熟、部位特異的突然変異誘発、ランダム突然変異誘発、または当該技術分野で周知であるか、または本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、かかるバリアントは、本明細書で提供される配列に由来するものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離され得る。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインは、フレームワーク１内のＬｅｕ　１１に改変を含む。例えば、ＶＨＨドメインは、Ｌｅｕ１１Ｇｌｕ（Ｌ１１Ｅ）、Ｌｅｕ１１Ａｓｐ（Ｌ１１Ｄ）、Ｌｅｕ１１Ａｒｇ（Ｌ１１Ｒ）またはＬｅｕ１１Ｌｙｓを含み得る。（Ｌ１１Ｋ）。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインは、ＴＶＫＰ（配列番号５１）、ＴＶＫＰＧ（配列番号５２）、ＴＶＫＰＧＧ（配列番号５０）、ＴＶＲＰ（配列番号５３）、ＴＶＲＰＧ（配列番号５４）、ＴＶＴＶＲＰＧＧ（配列番号５５）、ＴＶＥＰ（配列番号５６）、ＴＶＥＰＧ（配列番号５７）、ＴＶＥＰＧＧ（配列番号５７）５８）、ＴＶＤＰ（配列番号５９）、ＴＶＤＰＧ（配列番号６０）、またはＴＶＤＰＧＧ（配列番号６１）などの改変Ｃ末端配列を含む。いくつかの実施形態では、改変Ｃ末端配列は、ＬＶＴＶＫＰＧＧ（配列番号４９）である。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインは、Ｌｅｕ１１に改変及び改変されたＣ末端配列を含む。Ｌ１１Ｅ変異及び改変Ｃ末端配列は、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドに改善された特性、例えば、免疫原性の低減を提供する。例えば、ＷＯ２０１６／１１８７３３を参照されたい。

【０１３９】

いくつかのかかる実施形態では、ＶＨＨドメインは、配列番号１、５、１１、１６、２１、２６、３１、３６、４９、５５、６１、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４から選択されるアミノ酸配列（例えば、ＶＨＨドメインのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む本明細書のアミノ酸配列）と少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインは、配列番号１、５、１１、１６、２１、２６、３１、３６、４９、５５、６１、１３０～１３８、１４０～１４８、１６１、１６３、及び１６４から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１４０】

様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する１つ、２つ、３つ、または４つのＶＨＨドメインを含む。様々な実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合する２つまたは３つのＶＨＨドメインを含む。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して互いに作動可能に連結されたＳｉｇｌｅｃ－８に結合する２つ、３つ、または４つのＶＨＨドメインを含む。ＶＨＨドメインを連結するために使用され得るリンカーの非限定的な例は、配列番号６９に提示される。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、Ｆｃ領域に融合された、本明細書に記載の少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域は、配列番号４４、４５、６５、６６、６７、または６８の配列を含む。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介してＦｃ領域に作動可能に連結された、本明細書に記載の少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。ＶＨＨドメイン及びＦｃ領域を連結するために使用され得るリンカーの非限定的な例は、配列番号７０に提示される。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に結合するＶＨＨドメインはヒト化される。ヒト化抗体（ｓｄＡｂまたはＶＨＨ含有ポリペプチドなど）は、ヒト化抗体が非ヒト抗体に対するヒト免疫応答を低減または排除し、それが抗体治療薬に対する免疫応答をもたらし、治療の効果を減少させるため、治療用分子として有用である。一般に、ヒト化抗体は、ＣＤＲ（またはそれらの部分）が非ヒト抗体に由来し、ＦＲ（またはそれらの部分）がヒト抗体配列に由来する、１つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むであろう。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかのＦＲ残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元または向上させるために、非ヒト抗体（例えば、ＣＤＲ残基の由来となった抗体）に由来する対応する残基で置換される。

【０１４５】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Ａｌｍａｇｒｏ ａｎｄ Ｆｒａｎｓｓｏｎ，（２００８）Ｂｉｏｓｃｉ．１３：１６１９－１６３３に記載され、さらに、例えばＲｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ３３２：３２３－３２９；Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：１００２９－１００３３；米国特許第５,８２１，３３７号、同第７，５２７，７９１号、同第６，９８２，３２１号、及び同第７，０８７，４０９号；Ｋａｓｈｍｉｒｉ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｍｅｔｈｏｄｓ３６：２５－３４；Ｐａｄｌａｎ，（１９９１）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２８：４８９－４９８（「リサーフェイシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）」を記載）；Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｍｅｔｈｏｄｓ３６：４３－６０（「ＦＲシャフリング」を記載）；ならびにＯｓｂｏｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｍｅｔｈｏｄｓ３６：６１－６８及びＫｌｉｍｋａ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ８３：２５２－２６０（ＦＲシャッフリングへの「誘導選択」手法を記載）に記載されている。

【０１４６】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：「最良適合（ｂｅｓｔ－ｆｉｔ）」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２２９６を参照）、重鎖可変領域の特定の下位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ,８９：４２８５、及びＰｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．,１５１：２６２３を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞突然変異した）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域（例えば、Ａｌｍａｇｒｏ ａｎｄ Ｆｒａｎｓｓｏｎ，（２００８）Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｓｃｉ．１３：１６１９－１６３３）；及びＦＲライブラリーのスクリーニングから得られるフレームワーク領域（例えば、Ｂａｃａ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃ

ｈｅｍ．２７２：１０６７８－１０６８４、及びＲｏｓｏｋ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：２２６１１－２２６１８を参照）。通常、ＶＨＨのＦＲ領域は、ヒトＦＲ領域と置き換えられ、ヒト化ＶＨＨが作製される。いくつかの実施形態では、ヒト化ＶＨＨの１つ以上の特性を改善するために、ヒトＦＲの特定のＦＲ残基を置き換える。このように残基が置換されたＶＨＨドメインは、本明細書では依然として「ヒト化」と称される。

【０１４７】

ポリペプチド及びタンパク質の発現及び産生

Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、核酸分子はまた、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質の分泌を指示するリーダー配列をコードしてもよく、このリーダー配列は、典型的には、それが分泌されたポリペプチドまたはタンパク質中に存在しないように切断される。リーダー配列は、天然の重鎖（またはＶＨＨ）リーダー配列であっても、別の異種リーダー配列であってもよい。

【０１４８】

核酸分子は、当技術分野における従来の組換えＤＮＡ技術を使用して構築され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、選択した宿主細胞での発現に適した発現ベクターである。

【０１４９】

本明細書に記載のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド及びタンパク質をコードする核酸を含むベクターを提供する。そのようなベクターとして、ＤＮＡベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＣＨＯもしくはＣＨＯ由来細胞、またはＮＳＯ細胞などの所望の細胞型におけるポリペプチドまたはタンパク質の発現のために最適化されたベクターを選択する。例示的なそのようなベクターは、例えば、Ｒｕｎｎｉｎｇ Ｄｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．２０：８８０－８８９（２００４）に記載される。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、細菌細胞などの原核細胞内で；または真菌細胞（酵母など）、植物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞などの真核細胞内で発現され得る。そのような発現は、例えば、当技術分野で周知の手順に従って実施され得る。ポリペプチド及びタンパク質を発現させるために使用され得る例示的な真核細胞としては、ＣＯＳ７細胞を含むＣＯＳ細胞；２９３－６Ｅ細胞を含む２９３細胞；ＣＨＯ－Ｓ、ＤＧ４４．Ｌｅｃ１３ ＣＨＯ細胞、及びＦＵＴ８ ＣＨＯ細胞を含むＣＨＯ細胞；ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞（Ｃｒｕｃｅｌｌ）；及びＮＳＯ細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、酵母で発現され得る。米国公開第ＵＳ２００６／０２７００４５Ａ１号を参照。いくつかの実施形態では、特定の真核生物宿主細胞を、ポリペプチドまたはタンパク質に所望の翻訳後修飾を行う能力に基づいて選択する。例えば、いくつかの実施形態では、ＣＨＯ細胞は、ＨＥＫ２９３細胞で産生される同じポリペプチドまたはタンパク質よりも高いシアリル化レベルを有するポリペプチドまたはタンパク質を産生する。

【０１５１】

所望の宿主細胞への１つ以上の核酸（ベクターなど）の導入は、リン酸カルシウム形質移入法、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介形質移入法、カチオン性脂質媒介形質移入法、電気穿孔法、形質導入、感染などを含むがこれらに限定されない任意の方法によって達成され得る。非限定的な例示的な方法は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ ｅｄ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２００１）に記載される。核酸は、任意の適切な方法に従って、所望の宿主細胞に一時的または安

定的に形質移入され得る。

【０１５２】

本明細書に記載の核酸またはベクターのうちのいずれかを含む宿主細胞もまた提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を発現する宿主細胞が提供される。宿主細胞内で発現されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、任意の好適な方法によって精製され得る。そのような方法としては、親和性マトリックスまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用が挙げられるが、これらに限定されない。適切な親和性リガンドとしては、ＲＯＲ１ＥＣＤ及びＦｃ領域に結合する薬剤が挙げられる。例えば、タンパク質Ａ、タンパク質Ｇ、タンパク質Ａ／Ｇ、または抗体親和性カラムを使用して、Ｆｃ領域に結合し、Ｆｃ領域を含むＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を精製することができる。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えば、ブチルまたはフェニルカラムが、抗体などのいくつかのポリペプチドまたはタンパク質を精製するのに好適であり得る。イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー及び／または陽イオン交換クロマトグラフィー）もまた、抗体などのいくつかのポリペプチドまたはタンパク質を精製するのに好適であり得る。ミックスモードクロマトグラフィー（例えば、逆相／陰イオン交換、逆相／陽イオン交換、親水性相互作用／陰イオン交換、親水性相互作用／陽イオン交換など）もまた、抗体などのいくつかのポリペプチドまたはタンパク質を精製するのに好適であり得る。ポリペプチドまたはタンパク質を精製する多くの方法が当技術分野で周知である。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、無細胞系で産生される。非限定的な例示的な無細胞系は、例えば、Ｓｉｔａｒａｍａｎ ｅｔ ａｌ.,Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４９８：２２９－４４（２００９）；Ｓｐｉｒｉｎ,Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２２：５３８－４５（２００４）；Ｅｎｄｏ ｅｔ ａｌ.,Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｄｖ．２１：６９５－７１３（２００３）に記載される。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、上述の方法で調製されたＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、宿主細胞内で調製される。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、無細胞系で調製される。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、精製される。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を含む細胞培養培地が提供される。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、上述の方法で調製される抗体を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、宿主細胞内で調製されたＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、無細胞系で調製されたＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、精製されたＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を含む。

【０１５６】

Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を使用して疾患を治療する例示的な方法

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を投与することを含む、個体における疾患を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８に関連する疾患（例えば、同じ型及び／または同じ組織内の正常な参照細胞と比較して、ある特定の細胞でのＳｉｇｌｅｃ－８発現の増加に関連する疾患）を治療するための方法。そのような疾患としては、好酸球性膀胱炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸障害、好酸球性胃炎（ＥｏＧ）、好酸球性腸炎、チャーグ・ストラウス症候群

、好酸球性症候群（ＨＥＳ）（例えば、家族性ＨＥＳ、特発性ＨＥＳ、原発性（腫瘍性）ＨＥＳ、二次（反応性）ＨＥＳ、またはＨＥＳのリンパ球バリアント）、グライヒ症候群、好酸球増多筋痛症候群（ＥＭＳ）、ＩｇＧ４関連疾患（ＩｇＧ４－ＲＤ）、好酸球性白血病（例えば、慢性好酸球性白血病）、好酸球性表現型喘息、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ＡＢＰＡ）、鼻ポリープを伴う慢性鼻副鼻腔炎（ＣＲＳｗＮＰ）、または好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（ＥＧＰＡ）を含む好酸球性障害が挙げられる。追加の例示的な好酸球性障害及び関連する症候群は、Ｖａｌｅｎｔ　ｅｔ　ａｌ．,Ａｌｌｅｒｇｙ（２０２３）７８（１）：４７－５９に記載される。かかる疾患には、全身性肥満細胞症、遺伝性アルファトリプターゼ血症（ＨＡＴ）、マスト細胞活性化症候群（ＭＣＡＳ）、または一般的なアレルギー病態を含むマスト細胞障害も含む。全身性肥満細胞症（ＳＭ）は、進行性ＳＭ（例えば、肥満細胞白血病、侵襲性ＳＭ、または血液新生物を伴うＳＭ（ＳＭ－ＡＨＮ））または非進行性ＳＭ（例えば、無痛性ＳＭ）であり得る。ある特定の実施形態では、ＳＭを有する対象は、ｃ－ＫＩＴにＤ８１６Ｖ変異を含む。特定の実施形態では、ＣＤ２５及び／またはＣＤ２の発現の増加が、ＳＭを有する対象のマスト細胞で観察される。一般的なアレルギー病態は、食物アレルギー（例えば、ピーナッツ、ゴマ、ミルク、卵、魚、または木の実アレルギーなど）、環境アレルギー（例えば、イエダニ、花粉、カビアレルギー、またはラテックスアレルギー）、コンパニオンアニマルに対するアレルギー（例えば、ネコ、イヌ、帯、ウマアレルギーなど）、及び毒アレルギー（例えば、ミツバチ、スズメバチアレルギーなど）などのアレルギーによって誘発され得る。いくつかの実施形態では、アレルギー障害を治療するための方法が提供される。方法は、有効量の本明細書で提供されるＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、ＩＬ－５の存在下で好酸球の細胞死を誘発する。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、マスト細胞の活性化を阻害する。いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、炎症反応を阻害する。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、追加の治療薬などの追加の薬剤に連結され、免疫コンジュゲートを形成する。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、治療の方法は、ヒトまたは動物におけるものであり得る。いくつかの実施形態においては、ヒトを治療する方法が提供される。

【０１５９】

Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド及びタンパク質は、必要に応じて対象に投与され得る。投与頻度の決定は、治療してる病態、治療している対象の年齢、治療している状態の重症度、患者の一般的な健康状態の考慮に基づいて、主治医などの当業者によって行われ得る。いくつかの実施形態では、有効用量のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、対象に１回以上投与される。いくつかの実施形態では、有効用量のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、対象に、毎日、週２回、週１回、２週間ごと、月１回等で投与される。有効用量のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、有効用量のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、複数回投与され得る。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、Ｓｉｇｌｅｃ－８に関連する疾患を治療するのに有効な量で投与される。治療有効量は、典型的には、治療される対象の体重、その対象の身体的もしくは健康状態、治療される病態の程度、または治療される対象の年齢に依存する。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、静脈内、動脈内、非経口、腹腔内、または皮下を含むがこれらに限定されない様々な経路で

インビボで投与され得る。適切な製剤及び投与経路は、意図される用途に従って選択され得る。

【０１６２】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を含む組成物は、多種多様な薬学的に許容される担体を含む製剤で提供される（例えば、Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ｗｉｔｈ Ｆａｃｔｓ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎｓ：Ｄｒｕｇｆａｃｔｓ Ｐｌｕｓ,２０ｔｈ ｅｄ．（２００３）；Ａｎｓｅｌ ｅｔ ａｌ．,Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ,７ｔｈ ｅｄ．,Ｌｉｐｐｅｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ（２００４）；Ｋｉｂｂｅ ｅｔ ａｌ．,Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ,３ｒｄ ｅｄ．,Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（２０００）を参照されたい）。ビヒクル、アジュバント、及び希釈剤を含む、様々な薬学的に許容される担体が利用可能である。さらに、ｐＨ調整剤及び緩衝剤、等張化剤、安定剤、湿潤剤などの様々な薬学的に許容される補助物質も利用可能である。

【０１６３】

併用療法

本開示のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド及びタンパク質は、単独で、または追加の治療薬などの他の治療様式と組み合わせて投与してもよい。Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質は、１つ以上の他の治療様式の前に、実質的に同時に、または後に（すなわち、同時にまたは連続して）提供され得る。

【０１６４】

非限定的な例示的な診断方法

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象及び／または対象からの試料を評価するのに有用である。いくつかの実施形態では、評価は、診断、予後、及び／または治療への応答のうちの１つ以上である。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、タンパク質または他の分子、例えば、Ｓｉｇｌｅｃ－８、ヒスタミン、ｂ－トリプターゼ、または他のアレルギーメディエーターの有無、またはレベルを評価することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、核酸の発現の有無、またはレベルを評価することを含む。本明細書に記載の組成物は、これらの測定に使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、試料、血清、または試料由来の細胞を、本明細書に記載される治療薬と接触させることを含む。

【０１６６】

キット

また、本明細書に記載のＳｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチド及びタンパク質のいずれかを含む製品及びキット、ならびに適切な包装も提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、（ｉ）Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質、及び（ｉｉ）Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ポリペプチドまたはタンパク質を個体に投与するためにキットを使用するための説明書を備えたキットを含む。

【０１６７】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質を含む医薬組成物などの組成物の適切な包装は、当該技術分野で周知であり、例えば、バイアル（例えば、密封バイアル）、容器、アンプル、ボトル、ジャー、軟質包装（例えば、密封マイラーまたはプラスチックバッグ）などが挙げられる。これらの製品は、さらに滅菌及び／または密封され得る。また、本明細書に記載の組成物を含む単位剤形も提供される。これらの単位剤形は、単一または複数の単位剤形で適切な包装内に保存することができ、さらに滅菌及び密封することも

できる。本発明のキット内に供給される説明書は、典型的には、ラベルまたは添付文書（例えば、キット内に含まれる紙シート）上の文書による指示であるが、機械可読指示（例えば、磁気または光学記憶ディスク上で配信される指示）も許容される。抗体の使用に関する説明書は、一般に、目的の治療または産業的用途のための用量、投与計画及び投与経路に関する情報を含む。

【０１６８】

容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数回用量パッケージ）、またはサブユニット用量であり得る。例えば、長期間にわたって個体に効果的な治療を提供するのに十分な投与量の本明細書で開示されるポリペプチドまたはタンパク質を含むキットもまた提供され得る。キットはまた、ポリペプチドまたはタンパク質の複数の単位用量、及び使用に関する説明書を含み、薬局、例えば、病院薬局及び配合薬局での保管及び使用に十分な量でパッケージングされる得る。

【実施例】

【０１６９】

以下に論じられる実施例は、単に本発明の例示となるよう意図されており、決して本発明を限定するものと見なされるべきではない。実施例は、以下の実験が行われる全ての実験または唯一の実験であることを表すようには意図されていない。使用される数（例えば、量、温度等）に対する正確さを確保するよう努力されているが、いくつかの実験誤差及び偏差が計上されるべきである。別途示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧であるか、またはそれに近い。

【０１７０】

実施例１：ヒトＳｉｇｌｅｃ－８に特異的に結合する単一ドメイン抗体の開発

Ｓｉｇｌｅｃ－８は、好酸球、マスト細胞、及び好塩基球で発現する阻害性受容体である。ヒトＳｉｇｌｅｃ－８を標的とする単一ドメイン抗体を、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８細胞外ドメインの組み換え型（ＥＣＤ：ヒトＳｉｇｌｅｃ－８のアミノ酸１７～３６３）でラマ及びアルパカを免疫化することにより生成した。

【０１７１】

特異的な抗Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体力価の開発後、ラマ／アルパカ末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を免疫化動物由来の５００ｍＬの血液から単離し、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　Ｍａｘｉ　Ｋｉｔを使用して全ｍＲＮＡを単離し、その後、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＶ逆転写酵素及びオリゴｄＴプライミングを使用して第１のストランドｃＤＮＡに変換した。単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）配列を、ｃＤＮＡを鋳型として用いてＰＣＲによって特異的に増幅し、ファージディスプレイベクターｐＡＤＬにクローニングした。

【０１７２】

ラマ由来ｓｄＡｂを表示するファージライブラリー（３．７ｘ１０^{10}多様性）を、Ｓｉｇｌｅｃ８－ＥＣＤの組み換え形態を表面発現するようにトランスフェクトしたフリースタイルＨＥＫ２９３細胞またはＣＨＯ細胞の細胞パニングによって濃縮した。濃縮したＳｉｇｌｅｃ８ファージライブラリーからのＤＮＡをＢＬ２１コンピテント細胞に形質転換し、これをプレーティングし、９６ウェルのブロックに単離した。ＩＰＴＧ誘導培地は、上清へのｓｄＡｂ分泌を可能にし、これをＳｉｇｌｅｃ－８陽性及び陰性細胞に適用した。細胞を洗浄し、フルオロフォアで標識した抗Ｍｙｃ二次抗体で処理し、９６ウェルフローサイトメトリーにより解析した。

【０１７３】

Ｓｉｇｌｅｃ－８陽性細胞に結合するがＳｉｇｌｅｃ－８陰性細胞には結合しないｓｄＡｂをコードする核酸配列を、ヒトＦｃコード領域とインフレームで哺乳動物発現ベクターにクローニングし、ＨＥＫ２９３フリースタイル細胞（２９３Ｆ細胞）またはポリエチレンイミンを使用したＣＨＯ細胞において一過性トランスフェクションによって発現させた。３～７日後に上清を回収し、分泌された組み換えタンパク質をプロテインＡクロマト

グラフィーによって精製し、２８０ｎｍでの吸光度及び吸光係数から濃度を計算した。

【０１７４】

二価ＶＨＨ－ｈＩｇＧ１－ｘＥＬＬ－Ｆｃ（それぞれリンカー２を介してＦｃ　ｘＥＬＬに連結する配列番号４９、５５、６１、及び１のＶＨＨＢ、これらの構築物は、それぞれｃｘ８９８２、ｃｘ８９８３、ｃｘ８９８４、及びｃｘ１０３８２とも呼ばれる）としての抗ヒトＳｉｇｌｅｃ－８　ＶＨＨ、Ｂ１２、Ｄ１、Ｅ２、及びＧ２の結合は、完全長ヒトＳｉｇｌｅｃ－８を一過性にトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を使用したフローサイトメトリーによって測定された。結合特異性を、トランスフェクトしていない（ＵＴ）ＣＨＯ細胞を対照として使用して評価した。結合アッセイのために、５０，０００個のＳｉｇｌｅｃ－８ＣＨＯまたはＵＴ　ＣＨＯを９６ウェルプレートに播種し、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－ｘＥＬＬをＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ１％ＢＳＡ、０．１％ＮａＮ３　ｐＨ７．４）に滴加し、４℃で３０分間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ＦＡＣＳ緩衝液中に１：２０００で希釈したＡ６４７コンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体（ＪａｃｋｓｏｎＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）と一緒に４℃で３０分間インキュベートした。これらのプレートを洗浄し、結合は、Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ　ｉＱｕｅ　Ｐｌｕｓを使用して抗ヒトＡ６４７の平均蛍光強度を定量化するフローサイトメトリーによって測定した。

【０１７５】

各抗ヒトＳｉｇｌｅｃ－８　ＶＨＨ－ｘＥＬＬ　Ｆｃ構築物の結合を図１Ａ～１Ｄに示す。抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｂ１２－ｘＥＬＬ（図１Ａ）は、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現ＣＨＯ細胞に計算親和性０．３６７ｎＭで特異的に結合し、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｄ１－ｘＥＬＬ（図１Ｂ）は、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現ＣＨＯ細胞に計算親和性０．４２７ｎＭで特異的に結合し、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｅ２－ｘＥＬＬ（図１Ｃ）は、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現ＣＨＯ細胞に計算親和性０．３３１ｎＭで特異的に結合し、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｇ２－ｘＥＬＬ（図１Ｄ）は、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現ＣＨＯ細胞に計算親和性０．２６８ｎＭで特異的に結合する。試験した構築物のいずれについても、トランスフェクトしていないＣＨＯ細胞への検出可能な結合がなかったため、結合はＳｉｇｌｅｃ－８に特異的であった。

【０１７６】

実施例２：ヒトＳｉｇｌｅｃ－８発現細胞に結合する多価抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｆｃ抗体

Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体の価数を増やすことでアゴニスト活性を増強できるかどうかを判定するために、親ラマのＢ１２、Ｄ１、及びＥ２のＶＨＨ配列を使用して、四価（Ｔｅｔ－Ｂ１２（ｃｘ８４６７；Ｆｃに連結された配列番号５０）、Ｔｅｔ－Ｄ１（ｃｘ８４６９；Ｆｃに連結された配列番号５６）、及びＴｅｔ－Ｅ２（ｃｘ８４６３；Ｆｃに連結された配列番号６２））、ならびに六価（Ｈｅｘ－Ｂ１２（ｃｘ８４６６；Ｆｃに連結された配列番号５１）、Ｈｅｘ－Ｄ１（ｃｘ８５２３；Ｆｃに連結された配列番号５７）、及びＨｅｘ－Ｅ２（ｃｘ８５２２；Ｆｃに連結された配列番号１６５）を生成し、Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体を、リンカー２を介して低エフェクター機能ｘＥＬＬヒトＦｃ領域に連結した。二価（Ｂｉ－Ｂ１２（ｃｘ８９８２）、Ｂｉ－Ｄ１（ｃｘ８９８３）、及びＢｉ－Ｅ２（ｃｘ８９８４））、四価、及び六価Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体を、好酸球への結合に関するフローサイトメトリー（ＣＤ１６$^{-}$ＣＣＲ３$^{+}$）によって評価した。細胞を遠心分離によって全血から単離し、２％ＦＢＳ　ＰＢＳで２回洗浄し、室温（ＲＴ）で１０分間、１×ＲＢＣ溶解緩衝液に再懸濁し、２％ＦＢＳ　ＰＢＳで１回洗浄し、第２のＲＢＣ溶解ステップで処理し、２％　ＦＢＳで２回洗浄した。細胞を２００ｋ／ウェルで播種し、室温で１０分間ヒトＦＣブロックに再懸濁した。細胞を遠沈させ、次いで、２００ｎＭ　１：４で開始する滴定した試験品に再懸濁し、４℃で３０分間インキュベートした後、２回洗浄し、二次混合物（２＊；抗ＣＣＲ３　ＦＩＴＣ、抗ヒトＡＦ６４７、ＰＩ、抗ＣＤ１６　ＢＶ６０５））に再懸濁し、４℃で３０分間インキュベートし、２回洗浄し、結合した抗体をフローサイトメトリー（Ｎｏｖｏｃｙｔｅ）によって検出した。

【０１７７】
図２Ａ～２Ｃに示すように、二価、四価、及び六価のＳｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体Ｂ１２（図２Ａ）、Ｄ１（図２Ｂ）、及びＥ２（図２Ｃ）は、好酸球に結合した。算出された親和性は、二価、四価、及び六価のｈｚＳｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体間で同様であった。観察されたＢｍａｘは、予想どおり価数の増加とともに減少した。これは、抗体のＦｃ部分がこのアッセイで検出され、抗Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ドメインに対するＦｃ領域の比が価数に逆数であるという事実による。他の顆粒球集団（ＣＤ１６$^{+}$ＣＣＲ３$^{-}$）では結合は観察されなかった。
【０１７８】
さらなる試験では、親ラマＧ２配列をヒト化し、多価ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ抗体を低エフェクター機能ｘＥＬＬヒトＦｃでクローニングした。二価（ｃｘ１１４２２；リンカー２を介してＦｃ　ｘＥＬＬに連結された配列番号５）、四価（ｃｘ１１５８０；リンカー２を介してＦｃ　ｘＥＬＬに連結された配列番号９）、及び六価（ｃｘ１１５７９；リンカー２を介してＦｃ　ｘＥＬＬに連結された配列番号１０）ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ抗体を、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８でトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を使用してフローサイトメトリーによって評価した。融合タンパク質の滴定シリーズを、９６ウェルプレート中のＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ　１％　ＢＳＡ、０．１％ＮａＮ３　ｐＨ７．４）中、４℃でＳｉｇｌｅｃ８発現ＣＨＯ細胞（５×１０^{4}細胞／ウェル）と３０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液で１５０μＬで１回洗浄した後、ＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を添加し、細胞を４℃で３０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液中で追加の１回の洗浄後、結合した抗体をフローサイトメトリー（ｉＱｕｅ　Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔｅ）を介して検出した。
【０１７９】
図２Ｄに示すように、二価、四価、及び六価のｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ抗体は、ヒトＳｉｇｌｅｃ－８を発現するＣＨＯ細胞に結合した。算出された親和性は、二価、四価、及び六価のｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ抗体間で同様であった。観察されたＢｍａｘは、予想どおり価数の増加とともに減少した。これは、抗体のＦｃ部分がこのアッセイで検出され、抗Ｓｉｇｌｅｃ－８結合ドメインに対するＦｃ領域の比が価数に逆数であるという事実による。
【０１８０】
実施例３：抗Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体の価数の増加は、好酸球殺滅活性の向上をもたらす
Ｓｉｇｌｅｃ－８アゴニズムは、ＩＬ－５の存在下で好酸球の直接殺滅を促進する。Ｓｉｇｌｅｃ－８媒介性殺滅活性に対する原子価の影響を評価するために、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＥａｓｙＳｅｐ（商標）直接ヒト好酸球単離キットを使用して好酸球を健康なドナー全血から単離し、二価（Ｂｉ－Ｂ１２（ｃｘ８９８２）、Ｂｉ－Ｄ１（ｃｘ８９８３）及びＢｉ－Ｅ２（ｃｘ８９８４））、四価（Ｔｅｔ－Ｂ１２（ｃｘ８４６７）、Ｔｅｔ－Ｄ１（ｃｘ８４６９）、及びＴｅｔ－Ｅ２（ｃｘ８４６３））、ならびに六価（Ｈｅｘ－Ｂ１２（ｃｘ８４６６）、Ｈｅｘ－Ｄ１（ｃｘ８５２３）、及びＨｅｘ－Ｅ２（ｃｘ８５２２））Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体で処理した。試験した抗体を、５０ｎＭから開始してプレート全体で滴定し（３点滴定、１：１０希釈）、単離された好酸球を１０％ＦＢＳ　ＲＰＭＩ＋サイトトックスレッド中に１６０ｋ／ｍＬに再懸濁させ、ＩＬ－５の存在下で４８－ウェルプレート中に８０ｋ／ウェルで添加した。Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）細胞アナライザを使用してサイトトックスレッドの取り込みを経時的に監視し、オンボードソフトウェアを使用して２４時間の時点での総レッドオブジェクト強度（ＲＣＵ×μｍ^{2}／画像）を計算した。５ｎＭの各試験抗体で処理した細胞に関して２４時間の時点で観察された殺滅を図３Ａ～３Ｃにプロットする。価数を二価から四価に増加させると、試験したすべてのＳｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体に対する好酸球殺滅の効力の増加をもたらした。原子価をさらに六価に増加させると、四価の原子価と比較して、効力が同様またはわずかに増加した。

【０１８１】
さらなる試験では、単離された好酸球を９６ウェルプレートに３０，０００細胞／ウェルで添加し、二価（ｃｘ１１４２２）、４価（ｃｘ１１５８０）、または六価（ｃｘ１１５７９）ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ抗体で処理し、ＩＬ－５の存在下で、１０ｎＭから開始しするプレート全体で滴定した試験品とインキュベートした。殺滅活性を、同様に滴定した内部由来の脱フコシル化ＡＫ００２（リレンテリマブ）類似体と比較した。好酸球殺滅を観察するために、サイトトックスレッドを最終濃度２５０ｎＭで各ウェルに加えた。Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）細胞アナライザを使用してサイトトックスレッドの取り込みを経時的に監視し、オンボードソフトウェアを使用して１８時間の時点での総レッドオブジェクト強度（ＲＣＵ×μｍ^2／画像）を計算した。

【０１８２】
図３Ｄに示すように、二価ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ（ｃｘ１１４２２）は、ＩＬ－５の存在下で好酸球殺滅を増強する上で、脱フコシル化ＡＫ００２（リレンテリマブ）類似体抗体よりも強力であった。ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃの価数を四価（ｃｘ１１５８０）に増加させると、好酸球殺滅効力の劇的な増加をもたらし、その結果、脱フコシル化ＡＫ００２類似体抗体よりもほぼ３０倍改善し、二価ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃと比較して１０倍増加した。さらに価数を六価（ｃｘ１１５７９）に増加させても、四価のｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃ抗体と比較してより強力な好酸球殺滅は得られなかったが、脱フコシル化ＡＫ００２類似体及び二価ｈｚＳｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ｖ１４－Ｆｃと比較して優れた殺滅活性を維持した。ＩＬ－５の非存在下では殺滅は観察されなかった（図３Ｅ）。

【０１８３】
実施例４：Ｇ２　ＶＨＨ配列最適化
抗Ｓｉｇｌｅｃ８　Ｇ２　ＶＨＨ配列ｈｚＧ２ｖ１４は、Ｓｉｇｌｅｃ－２（ＣＤ２２）及び他のＳｉｇｌｅｃタンパク質（下記参照）への結合を最小にし、潜在的な免疫原性を低減させ、製造性を最適化するためにさらなる改変を行った。ｈｚＧ２ｖ１４（配列番号９）、ｈｚＧ２ｖ４７（配列番号１２）、ｈｚＧ２ｖ５１（配列番号１７）、ｈｚＧ２ｖ５２（配列番号２２）、ｈｚＧ２ｖ５３（配列番号２７）、ｈｚＧ２ｖ５４（配列番号３２）またはｈｚＧ２ｖ５５（配列番号３７）を含むヒト化四価Ｓｉｇｌｅｃ－８アゴニスト抗体を、操作されたＦｃ　ＳＤＩＥ領域（実施例５にさらに記載）にリンカー２を介して連結した。好酸球上のヒトＳｉｇｌｅｃ－８への結合を評価し、フローサイトメトリーによって、脱フコシル化抗Ｓｉｇｌｅｃ－８　２Ｅ２（２Ｅ２　Ａｆｕｃ）参照抗体のものと比較した。ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＥａｓｙＳｅｐ（商標）直接ヒト好酸球単離キットを使用して健康なドナー全血から好酸球を単離し、ＦＡＣＳ緩衝液で希釈し、９６ウェルのアッセイプレートに１０ｋ／ウェルで添加し、１０ｎＭの試験品から開始する滴定シリーズ（１０～１２点滴定、１：４希釈）とともに４℃で２０分インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液で１回洗浄した後 、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）　６４７　ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｄｏｎｋｅｙ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　Ｆｃγ特異的二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を添加し、細胞を４℃で２０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液中で追加の１回の洗浄後、結合した抗体をフローサイトメトリー（ＮｏｖｏＣｙｔｅ　３０００）を介して検出した。ＳＳＣ^{高}／ＣＣＲ３$^{+}$細胞上でＮｏｖｏｅｘｐｒｅｓｓオンボードソフトウェアゲーティングを使用して、中央値蛍光強度を計算した。これらの試験からの解離定数（Ｋｄ）値を表３にまとめ、ｈｚＧ２ｖ５２（ｃｘ１１９１３）及びｈｚＧ２ｖ５３（ｃｘ１１９１４）を含む四価抗Ｓｉｇｌｅｃ８抗体の代表的な結合データを図４Ａに示す。ＥｘＰａｓｙを使用して決定したＶＨＨドメインのｐＩを表３に示す。一般に、ｐＩが高いほど製造に好ましい。

【０１８４】
（表３）好酸球に結合するヒト化四価Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体

名称	Kd (nM)*	pI
hzG2v14	0.00812	6.66
hzG2v47	0.00888	5.39
hzG2v51	0.119	6.67
hzG2v52	0.012	5.42
hzG2v53	0.013	6.66
hzG2v54	0.036	6.59
hzG2v55	0.010	6.58
2E2 Afuc	0.112	

＊１～３回の実験から決定

【０１８５】

図４Ａに示すように、四価抗Ｓｉｇｌｅｃ８抗体ｃｘ１１９１３及びｃｘ１１９１４は、滴定依存的様態でＣＣＲ３$^{+}$好酸球集団に結合した。ｃｘ１１９１３及びｃｘ１１９１４の両方が、２Ｅ２　Ａｆｕｃ比較抗体よりも約８倍高い親和性で結合した。予想通り、ｃｘ１１９１３及びｃｘ１１９１４のＢｍａｘは両方とも、２Ｅ２　Ａｆｕｃと比較して減少し、これは、四価抗体と結合される利用可能なＦｃ受容体が少ないためである。

【０１８６】

このデータは、ｈｚＧ２ｖ４７、ｈｚＧ２ｖ５２、ｈｚＧ２ｖ５３、ｈｚＧ２ｖ５４、及びｈｚＧ２ｖ５５を含むさらに改変されたヒト化四価抗Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体の標的ヒト好酸球集団への高親和性結合を実証する。ＥＬＩＳＡアッセイにおいて、ｈｚＧ２ｖ４７を含む四価抗Ｓｉｇｌｅｃ８抗体は、組み換えＳｉｇｌｅｃ－２（ＣＤ２２）への結合をいくらか示した。Ｓｉｇｌｅｃ－２に対する相対的な交差反応性は、

ｈｚＧ２ｖ１４＞ｈｚＧ２ｖ４７　ｈｚＧ２ｖ５４＞ｈｚＧ２ｖ５２　ｈｚＧ２ｖ５３　ｈｚＧ２ｖ５５

であった。

【０１８７】

四価Ｓｉｇｌｅｃ－８アゴニスト抗体ｃｘ１１９１３及びｃｘ１１９１４、ｃｘ１１７６９（ｈｚＧ２ｖ１４－Ｆｃ　ＳＤＩＥ）、及び２Ｅ２　Ａｆｕｃの、ＣＨＯ細胞で一過性に発現したヒトＳｉｇｌｅｃタンパク質のパネルへの結合もフローサイトメトリーによって評価した。ＣＨＯ細胞を、同じベクター内でシトリンまたはＧＦＰのいずれかの共発現との細胞表面発現のために膜貫通型タンパク質に連結したヒトＳｉｇｌｅｃ－２、３、６、７、８、９、１２、または１５の完全長細胞外ドメインをコードするプラスミドのパネルで一過性にトランスフェクトした（ＢａｌａｎＣＤ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｒｙ　ＣＨＯ細胞培養培地（Ｉｒｖｉｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中へのＰＥＩトランスフェクションによって）。翌日、１μＭｎｏ試験品のから開始する滴定シリーズ（２２点、１：３希釈）を、Ｓｉｇｌｅｃ発現細胞株（５０ｋ細胞／ウェル）と、９６ウェルのプレート中のＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ１％ＢＳＡ、０．１％ＮａＮ３（ｐＨ７．４））中、４℃で２０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液で１回洗浄した後、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７　ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｄｏｎｋｅｙ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　Ｆｃγ特異的二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を添加し、細胞を４℃で２０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液中で追加の１回の洗浄後、結合した抗体をフローサイトメトリー（ｉＱｕｅ　Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔｅ）を介して検出した。平均蛍光強度は、ＧＦＰ＋またはシトリン＋細胞でｉＱｕｅオンボードソフトウェアゲーティングを使用して計算した。

【０１８８】

図４Ｂ～４Ｃに示すように、四価抗ヒトＳｉｇｌｅｃ－８抗体ｃｘ１１９１３（ｈｚＧ２ｖ５２を含む）及びｃｘ１１９１４（ｈｚＧ２ｖ５３）は、Ｓｉｇｌｅｃ－８に高い親和性で結合したが（図４Ｃ、左上）、他のＳｉｇｌｅｃタンパク質はいずれも結合しなか

った。試験した最高１μＭ濃度で、ｃｘ１１９１３はＳｉｇｌｅｃ－１２に結合したが（図４Ｃ、下左）、他の濃度では結合を示さなかった。両方の構築物は、２Ｅ２　Ａｆｕｃ比較抗体と同様のＳｉｇｌｅｃ特異性プロファイルを示した。対照的に、試験されたある特定のより高い濃度では、抗ヒトＳｉｇｌｅｃ－８抗体ｃｘ１１７６９（ｈｚＧ２ｖ１４を含む）は、Ｓｉｇｌｅｃ－２及びいくつかの他のＳｉｇｌｅｃタンパク質との交差反応性を示した（図４Ｂ～４Ｃ）。

【０１８９】

実施例５：追加的ヒト化Ｇ２ＶＨＨ構築物の評価

ラマ抗Ｓｉｇｌｅｃ８－Ｇ２ＶＨＨドメイン（ｌｍＧ２）をヒト化して、追加的バリアント、すなわち、配列番号１３０～１４８及び１６１～１６４に示されるアミノ酸配列を有するＳｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１１、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１２、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１３、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１５、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１６、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１７、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１８、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１９、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２０、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２１、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２２、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２４、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２５、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２６、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２８、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２９、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ３０、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ３１、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ３２、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ３３、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ２．１、Ｓｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ５．１、及びＳｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ６．１を生成する。ｈｚＧ２ｖ１１～ｈｚＧ２ｖ１４におけるＡｂＭ　ＣＤＲ３の２位のアスパラギン（Ｎ）または３位のセリン（Ｓ）の置換は、潜在的な脱アミド化部位が排除するように設計された。

【０１９０】

ヒンジＦｃ　ＮＮＴを欠いた非二量体化ヒトＩｇＧ１　Ｆｃバリアント領域を使用して、単量体ＶＨＨ－ｈＩｇＧ１融合タンパク質としてフォーマット化されたｌｍＧ２及びヒト化バージョン（さらにＳｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ１４を含む）の結合を、完全長ヒトＳｉｇｌｅｃ－８で一過性にトランスフェクトし、抗ヒトＡＦ６４７二次抗体で検出した２９３の細胞を使用してフローサイトメトリーによって評価した。結合特異性を、トランスフェクトしていない２９３細胞を対照として使用して評価した。結合アッセイのために、Ｓｉｇｌｅｃ－８　２９３細胞または未形質転換２９３細胞を９６ウェルのＵ底プレートに５０ｋ細胞／ウェルでＦＡＣＳ緩衝液中に播種し、抗Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－ＮＮＴの滴定とともに４℃で３０分間インキュベートした。洗浄後、これらのプレートを、ＦＡＣＳ緩衝液中で１：１０，０００に希釈したＡ６４７コンジュゲート抗ヒトＦｃγ特異的二次抗体とともに、４℃で２０分間インキュベートした。プレートを洗浄し、結合をフローサイトメトリー定量化抗ヒトＡ６４７中央値蛍光強度によって測定した。最大特異結合（Ｂｍａｘ）及び親和性（Ｋｄ）を、非線形フィットモデルを使用してフローサイトメトリー結合データから決定した。各プレートの結合曲線を図５Ａ～５Ｈに提示する。

【０１９１】

Ｇ２のヒト化型は、発現が良好であり、図５Ａ～５Ｄに示すように、ｈｚＧ２ｖ１９－ｈｚＧ２ｖ２１及びＳｉｇｌｅｃ８　ｈｚＧ２ｖ５．１を除いて、ほとんどすべてのバリアントが、親クローンと同様の親和性でＳｉｇｌｅｃ－８に結合した。非トランスフェクト細胞では結合は観察されなかった（図５Ｅ～５Ｈ）。

【０１９２】

実施例６：抗Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体の抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性の増強は、好酸球殺滅活性の増強をもたらす

上記で実証されるように、二価、四価、及び六価の抗Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体は、ＩＬ－５などの炎症性メディエーターの存在下で好酸球を直接殺滅することができ、四価及び六価は、二価抗体よりも高い相対的効力を示す。しかしながら、殺滅活性はＩＬ－５の非存在下では消失する。Ｓｉｇｌｅｃ－８媒介性殺滅活性におけるＦｃ領域の効果を評価するために、ＣＤ１６結合及び後続の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性（ｃｘ

１１９１４；Ｆｃに連結された配列番号２７（配列番号７１を参照））を改善するための、ヒト化Ｇ２　ＶＨＨ、ｈｚＧ２ｖ５３、及び自然型ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域（ｈＩｇＧ１）（ｃｘ１２５３２；Ｆｃに連結された配列番号２７（配列番号７２を参照））または２つの残基Ｓ２３９Ｄ及びＩ３３２Ｅ（ＳＤＩＥ）で変異を有する操作されたＩｇＧ１　Ｆｃ領域のいずれかを含む四価抗Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ　Ｆｃ抗体を生成した。さらに、ｈｚＧ２ｖ５３及びＳＤＩＥ　Ｆｃ領域（ｃｘ１２５６２；Ｆｃに連結された配列番号２６（配列番号７３を参照）を含む二価抗Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体を生成した。ｈｚＧ２ｖ５３ベースの四価抗Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体を、ＩＬ－５の存在下における直接好酸球殺滅アッセイで評価した。ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＥａｓｙＳｅｐ（商標）直接ヒト好酸球単離キットを使用して、健康なドナー全血から好酸球を単離し、ＩＬ－５（最終１０ｎｇ／ｍＬ）の存在下、１０％ＦＢＳ　ＲＰＭＩ中に３０，０００細胞／ウェルで添加し、１００ｎＭから開始する、試験した抗体の滴定シリーズ（１１点滴定、１：４希釈）とともにインキュベートした。殺滅活性を、同様に滴定した内部由来の脱フコシル化ＡＫ００２（リレンテリマブ）類似体と比較した。好酸球殺滅を観察するために、サイトトックスレッドを最終濃度２５０ｎＭで各ウェルに加えた。Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）細胞アナライザを使用してサイトトックスレッドの取り込みを経時的に監視し、オンボードソフトウェアを使用して１８時間の時点での総レッドオブジェクト強度（ＲＣＵ×μｍ２／画像）を計算した。

【０１９３】

図６Ａに示すように、ヒト化四価抗Ｓｉｇｌｅｃ－８抗体構築物による処理は、ＩＬ－５の存在下で最も高い効力を示し、Ｆｃ改変が、ＩＬ－５の存在下での直接的な好酸球殺滅活性に有意に影響を及ぼさないことを示している。

【０１９４】

ｈｚＧ２ｖ５３ベースの四価及び二価抗Ｓｉｇｌｅｃ８－ＶＨＨ－Ｆｃ抗体を、脱フコシル化ＡＫ００２（リレンテリマブ）類似体とともに、ＩＬ－５の非存在下で初代ヒト好酸球のＡＤＣＣを促進する能力についても評価した。好酸球を上記の通りに単離し、自家ＮＫ細胞を、濃縮したＰＢＭＣから、ＥａｓｙＳｅｐ（商標）ヒトＮＫ細胞濃縮キットを使用して単離した。抗体を９６ウェルプレートに滴定した（１１点滴定１：４希釈）。単離ＮＫ細胞（５０，０００細胞／ウェル）及び好酸球（１０，０００細胞／ウェル）を、ＮＫ細胞刺激用に１００μＬの１０％ＦＢＳ　ＲＰＭＩ＋ＩＬ－２（最終２ｎｇ／ｍＬ）にプレーティングし（エフェクター：標的比５：１）、ＩＬ－５は添加しなかった。翌日、細胞を洗浄し、Ａｐｏｔｒａｃｋｅｒ　Ｇｒｅｅｎ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を使用してアポトーシス標的細胞を２０分間標識した。次に、細胞を洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁させ、ＮｏｖｏＣｙｔｅ　３０００フローサイトメーター（ＡＣＥＡ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）で解析した。

【０１９５】

図６Ｂに示すようにｔｅｔ－ｈｚＧ２ｖ５３－ＳＤＩＥでの６Ｂ処理は、ＩＬ－５の非存在下でも好酸球殺滅の用量依存的な増加をもたらした。ＡＤＣＣ活性の最適範囲は１～１００ｐＭであり、高濃度では徐々に低下した。ＳＤＩＥ　Ｆｃ改変は、野生型エフェクター有効化Ｆｃを用いたｔｅｔ－ｈｚＧ２ｖ５３－ＩｇＧ１と比較して、ＡＤＣＣ活性を劇的に改善した。ｔｅｔ－ｈｚＧ２ｖ５３－ＳＤＩＥ抗体は、ｂｉ－ｈｚＧ２ｖ５３－ＳＤＩＥ及び２Ｅ２　Ａｆｕｃ抗体と比較して、最大ＡＤＣＣ殺滅活性にわずかな減少を示したが、上記で実証したように、四価の形式は、直接殺滅アッセイにおいてより高い相対的効力を示した。

【０１９６】

本開示は、その精神または本質的特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具現化され得る。したがって、前述の実施形態は、本開示を限定するものではなく、あらゆる点において例示的であると見なされるべきである。したがって、本開示の範囲は、前述の説明によってではなく添付の特許請求の範囲によって示され、したがって、特許請求の範囲の意味及び均等の範囲内に入るすべての変更は、本明細書に含まれることが意図される。

【０１９７】

特定の配列の表

配列番号	説明	配列
1	Siglec8-G2 VHH	QVTLKESGGGLVRTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMASLKPDDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTQVTVKP
2	Siglec8-G2 CDR1	GSISIFSMYVVA
3	Siglec8-G2 CDR2	FIQRGGTAN
4	Siglec8-G2 CDR3	INSDNEIGGP
5	hzG2v14 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVKP
6	hzG2v14 CDR1	GSISIFSMYVVA
7	hzG2v14 CDR2	FIQRGGTAN
8	hzG2v14 CDR3	INTDNEIGGP
9	Siglec8-Tet-hzG2v14 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVKPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVKP
10	Siglec8-Hex-hzG2v14 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVKPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVKPGGSGGSEVQ LLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQ RGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNE IGGPWGQGTLVTVKP
11	hzG2v47 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSDYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRP
12	Siglec8-Tet-hzG2v47 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSDYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSDYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVRP
13	hzG2v47 CDR1	GSISIFSDYVVA
14	hzG2v47 CDR2	FIQRGGTAN
15	hzG2v47 CDR3	INTDNEIGGP
16	hzG2v51 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKDRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRP
17	Siglec8-Tet-hzG2v51 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKDRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKDRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVRP
18	hzG2v51 CDR1	GSISIFSKYVVA
19	hzG2v51 CDR2	FIQRGGTAN
20	hzG2v51 CDR3	INTDNEIGGP

21	hzG2v52 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVEP
22	Siglec8-Tet-hzG2v52 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVEPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVEP
23	hzG2v52 CDR1	GSISIFSKYVVA
24	hzG2v52 CDR2	FIQRGGTAN
25	hzG2v52 CDR3	INTDNEIGGP
26	hzG2v53 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRP
27	Siglec8-Tet-hzG2v53 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVRP
28	hzG2v53 CDR1	GSISIFSKYVVA
29	hzG2v53 CDR2	FIQSGGTAN
30	hzG2v53 CDR3	INTDNEIGGP
31	hzG2v54 VHH	QVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVEP
32	Siglec8-Tet-hzG2v54 VHH	QVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVEPGGSGGSQVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVEP
33	hzG2v54 CDR1	GSISIFSKYVVA
34	hzG2v54 CDR2	FIQRGGTAN
35	hzG2v54 CDR3	INTDNEIGGP
36	hzG2v55 VHH	QVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSDYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRP
37	Siglec8-Tet-hzG2v55 VHH	QVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSDYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGSGGSQVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSDYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVRP
38	hzG2v55 CDR1	GSISIFSDYVVA
39	hzG2v55 CDR2	FIQRGGTAN
40	hzG2v55 CDR3	INTDNEIGGP
46	hzG2 CDR1 コンセンサス (AbM)	GSISIFSXYVVA, 配列中、XはM、K、D、Y、L、またはIである
47	hzG2 CDR2 コンセンサス (AbM)	FIQXGGTAN, 配列中、XはRまたはSである
48	hzG2 CDR3 コンセンサス (AbM)	IX_1X_2DNEIGGP, 配列中、X_1はN、Q、S、またはTであり;かつX_2はSまたはTである

49	Siglec8-B12 VHH	QVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSLLNAMAWYRQAPGKERELVAAI SSGGGTYYADSVKGRFTISTNNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAPGPNYS DYEEINWGQGTQVTVKP
50	Siglec8-Tet-B12 VHH	QVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSLLNAMAWYRQAPGKERELVAAI SSGGGTYYADSVKGRFTISTNNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAPGPNYS DYEEINWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST SLLNAMAWYRQAPGKERELVAAISSGGGTYYADSVKGRFTISTNNAKNTLY LQMNSLKPEDTAMYYCAPGPNYSDYEEINWGQGTQVTVKP
51	Siglec8-Hex-B12 VHH	QVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSLLNAMAWYRQAPGKERELVAAI SSGGGTYYADSVKGRFTISTNNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAPGPNYS DYEEINWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST SLLNAMAWYRQAPGKERELVAAISSGGGTYYADSVKGRFTISTNNAKNTLY LQMNSLKPEDTAMYYCAPGPNYSDYEEINWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQVV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSLLNAMAWYRQAPGKERELVAAISSGGG TYYADSVKGRFTISTNNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAPGPNYSDYEEI NWGQGTQVTVKP
52	Siglec8-B12 CDR1	GSTSLLNAMA
53	Siglec8-B12 CDR2	AISSGGGTY
54	Siglec8-B12 CDR3	GPNYSDYEEIN
55	Siglec8-D1 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHGMGWYRQAPGKERELVAAI AGEGSTYYADSVKGRFTISRDFAKNTLYLQMNNLKAEDTAMYYCANNDERD DYWGQGTQVTVKP
56	Siglec8-Tet-D1 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHGMGWYRQAPGKERELVAAI AGEGSTYYADSVKGRFTISRDFAKNTLYLQMNNLKAEDTAMYYCANNDERD DYWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIH GMGWYRQAPGKERELVAAIAGEGSTYYADSVKGRFTISRDFAKNTLYLQMN NLKAEDTAMYYCANNDERDDYWGQGTQVTVKP
57	Siglec8-Hex-D1 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHGMGWYRQAPGKERELVAAI AGEGSTYYADSVKGRFTISRDFAKNTLYLQMNNLKAEDTAMYYCANNDERD DYWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIH GMGWYRQAPGKERELVAAIAGEGSTYYADSVKGRFTISRDFAKNTLYLQMN NLKAEDTAMYYCANNDERDDYWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGSIASIHGMGWYRQAPGKERELVAAIAGEGSTYYADSVK GRFTISRDFAKNTLYLQMNNLKAEDTAMYYCANNDERDDYWGQGTQVTVKP
58	Siglec8-D1 CDR1	GSIASIHGMG
59	Siglec8-D1 CDR2	AIAGEGSTY
60	Siglec8-D1 CDR3	NDERDDY
61	Siglec8-E2 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFTSNVINWYRQAPGKQREFVAFI TSITSGQSTMYADAVKGRFTVSRDNDKNIGYLQMTSLQPEDTARYVCNVGA YWGQGTQVTVKP
62	Siglec8-Tet-E2 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFTSNVINWYRQAPGKQREFVAFI TSITSGQSTMYADAVKGRFTVSRDNDKNIGYLQMTSLQPEDTARYVCNVGA YWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFTSNV INWYRQAPGKQREFVAFITSITSGQSTMYADAVKGRFTVSRDNDKNIGYLQ MTSLQPEDTARYVCNVGAYWGQGTQVTVKP
165	Siglec8-Hex-E2 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFTSNVINWYRQAPGKQREFVAFI TSITSGQSTMYADAVKGRFTVSRDNDKNIGYLQMTSLQPEDTARYVCNVGA YWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFTSNV INWYRQAPGKQREFVAFITSITSGQSTMYADAVKGRFTVSRDNDKNIGYLQ MTSLQPEDTARYVCNVGAYWGQGTQVTVKPGGSGGSQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCATSGIIFTSNVINWYRQAPGKQREFVAFITSITSGQSTMYADAV KGRFTVSRDNDKNIGYLQMTSLQPEDTARYVCNVGAYWGQGTQVTVKP

63	Siglec8-E2 CDR1	GIIFTSNVIN
64	Siglec8-E2 CDR2	FITSITSGQSTM
n/a	Siglec8-E2 CDR3	GAY
41	Siglec8-ECD-LFc	MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWF RAGDRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRD KGSYFFRLERGSMKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGH SRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLTPKPQDHGT SLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDATASTALGNGSSL SVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVHVRD EGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAGTGGSGGGGC PPCPAPELPGGPSVFVFPPKPKDVLSISGRPEVTCVVVDVGKEDPEVNFNW YIDGVEVRTANTKPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLTGKEFKCKVNNKAL PAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTVSVTCLVKGFYPADINV EWQRNGQPESEGTYANTPPQLDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQRGETLTCVVM HEALHNHYTQKSISQSLGK
42	ヒトSiglec8	MLLLLLLLPLLWGTKGMEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSY PQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDI WSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTAL THRPDILILGTLESGHSRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTA RSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVF QGDATASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSR SSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVS QVTLAAVGGAGATALAFLSFCIIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDTGMEDAKA IRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPSSGEEGELHYATLSFHKVKPQD PQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQACLRNHNPSSKEVRG
43	成熟ヒトSiglec8 (アミノ酸17-499)	MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWF RAGDRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRD KGSYFFRLERGSMKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGH SRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLTPKPQDHGT SLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDATASTALGNGSSL SVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVHVRD EGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALA FLSFCIIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDTGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKD GNPLKKPPPAVAPSSGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKI HKRETAETQACLRNHNPSSKEVRG
44	ヒトIgG1 Fc領域	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	ヒトIgG1 Fc xELL	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	ヒトIgG1 Fc S239D, I332E (SDIE)	DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	ヒトIgG1 Fc領域 -K447	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	ヒトIgG1 Fc xELL -K447	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD

		IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
68	ヒトIgG1 Fc S239D, I332E (SDIE) – K447	DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	リンカー1	GGSGGS
70	リンカー2	GGGG
71	cx11914	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVRPGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
72	cx12532	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGS ISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVAFIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINTDNEIGGPWGQGTLVTVRPGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
73	cx12562	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQSGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINT DNEIGGPWGQGTLVTVRPGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	Siglec8-G2 CDR1 (Chothia)	GSISIFSMY
75	hzG2v47 CDR1 (Chothia)	GSISIFSDY
76	hzG2v51 CDR1 (Chothia)	GSISIFSKY
77	Siglec8-B12 CDR1 (Chothia)	GSTSLLN
78	Siglec8-D1 CDR1 (Chothia)	GSIASIH
79	Siglec8-E2 CDR1 (Chothia)	GIIFTSN
80	Siglec8-G2 CDR2 (Chothia)	QRGGT
81	hzG2v53 CDR2 (Chothia)	QSGGT
82	Siglec8-B12 CDR2 (Chothia)	SSGGG
83	Siglec8-D1 CDR2 (Chothia)	AGEGS

84	Siglec8-E2 CDR2 (Chothia)	TSITSGQS
85	Siglec8-G2 CDR1 (Kabat)	FSMYVVA
86	hzG2v47 CDR1 (Kabat)	FSDYVVA
87	hzG2v52 CDR1 (Kabat)	FSKYVVA
88	Siglec8-B12 CDR1 (Kabat)	LNAMA
89	Siglec8-D1 CDR1 (Kabat)	IHGMG
90	Siglec8-E2 CDR1 (Kabat)	SNVIN
91	Siglec8-G2 CDR2 (Kabat)	FIQRGGTANYADSAKG
92	hzG2v14 CDR2 (Kabat)	FIQRGGTANYAESAKG
93	hzG2v51 CDR2 (Kabat)	FIQRGGTANYAESAKD
94	hzG2v53 CDR2 (Kabat)	FIQSGGTANYAESAKG
95	Siglec8-B12 CDR2 (Kabat)	AISSGGGTYYADSVKG
96	Siglec8-D1 CDR2 (Kabat)	AIAGEGSTYYADSVKG
97	Siglec8-E2 CDR2 (Kabat)	FITSITSGQSTMYADAVKG
98	Siglec8-G2 CDR1 (Contact)	IFSMYVVA
99	hzG2v47 CDR1 (Contact)	IFSDYVVA
100	hzG2v51 CDR1 (Contact)	IFSKYVVA
101	Siglec8-B12 CDR1 (Contact)	LLNAMA
102	Siglec8-D1 CDR1 (Contact)	SIHGMG
103	Siglec8-E2 CDR1 (Contact)	TSNVIN
104	Siglec8-G2 CDR2 (Contact)	WVAFIQRGGTAN
105	hzG2v53 CDR2 (Contact)	WVAFIQSGGTAN
106	Siglec8-B12 CDR2 (Contact)	LVAAISSGGGTY
107	Siglec8-D1 CDR2 (Contact)	LVAAIAGEGSTY
108	Siglec8-E2 CDR2 (Contact)	FVAFITSITSGQSTM

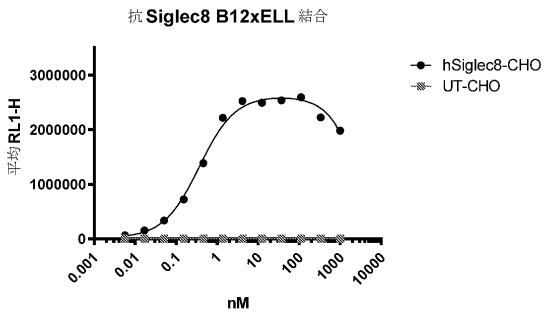
109	Siglec8-G2 CDR3 (Contact)	NYINSDNEIGG
110	hzG2v14 CDR3 (Contact)	NYINTDNEIGG
111	Siglec8-B12 CDR3 (Contact)	APGPNYSDYEEI
112	Siglec8-D1 CDR3 (Contact)	ANNDERDD
113	Siglec8-E2 CDR3 (Contact)	NVGA
114	Siglec8-G2 CDR1 (IMGT)	GSISIFSMYV
115	hzG2v47 CDR1 (IMGT)	GSISIFSDYV
116	hzG2v51 CDR1 (IMGT)	GSISIFSKYV
117	Siglec8-B12 CDR1 (IMGT)	GSTSLLNA
118	Siglec8-D1 CDR1 (IMGT)	GSIASIHG
119	Siglec8-E2 CDR1 (IMGT)	GIIFTSNV
120	Siglec8-G2 CDR2 (IMGT)	IQRGGTA
121	hzG2v53 CDR2 (IMGT)	IQSGGTA
122	Siglec8-B12 CDR2 (IMGT)	ISSGGGT
123	Siglec8-D1 CDR2 (IMGT)	IAGEGST
124	Siglec8-E2 CDR2 (IMGT)	ITSITSGQST
125	Siglec8-G2 CDR3 (IMGT)	NYINSDNEIGGP
126	hzG2v14 CDR3 (IMGT)	NYINTDNEIGGP
127	Siglec8-B12 CDR3 (IMGT)	APGPNYSDYEEIN
128	Siglec8-D1 CDR3 (IMGT)	ANNDERDDY
129	Siglec8-E2 CDR3 (IMGT)	NVGAY
130	Siglec8 hzG2v11	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYIQS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
131	Siglec8 hzG2v12	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYISS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
132	Siglec8 hzG2v13	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYITS DNEIGGPWGQGTLVTVKP

133	Siglec8 hzG2v15	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSYYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
134	Siglec8 hzG2v16	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSLYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
135	Siglec8 hzG2v17	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSIYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
136	Siglec8 hzG2v18	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSKYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
137	Siglec8 hzG2v19	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSSYAVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
138	Siglec8 hzG2v20	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSSYAMAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
139	Siglec8 hzG2v21	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSSYAMSWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
140	Siglec8 hzG2v24	QVTLKESGGGLVRTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
141	Siglec8 hzG2v25	EVQLLESGGGLVQTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
142	Siglec8 hzG2v26	EVQLLESGGGLVRPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
143	Siglec8 hzG2v28	EVQLLESGGGEVQTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
144	Siglec8 hzG2v29	EVQLLESGGGEVRPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
145	Siglec8 hzG2v30	EVQLLESGGGLVRTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
146	Siglec8 hzG2v31	EVQLLESGGGLVRTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
147	Siglec8 hzG2v32	EVQLLESGGGEVQTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRPEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
148	Siglec8 hzG2v33	EVQLLESGGGEVQTGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRADDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
149	hzG2 CDR1 コンセンサス (Chothia)	GSISIFSXY, 配列中、XはM、K、D、Y、L、またはIである
150	hzG2 CDR2 コンセンサス (Chothia)	QXGGT, 配列中、XはRまたはSである
151	hzG2 CDR3 コンセンサス (Chothia)	IX_1X_2DNEIGGP, 配列中、X_1はN、Q、S、またはTであり;かつX_2はSまたはTである
152	hzG2 CDR1 コンセンサス (Kabat)	FSXYVVA, 配列中、XはM、K、D、Y、L、またはIである

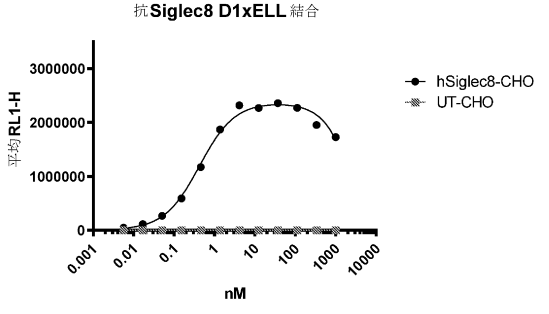
153	hzG2 CDR2 コンセンサス (Kabat)	FIQX$_1$GGTANYAESAKX$_2$, 配列中、X$_1$はRまたはSであり;かつX$_2$はGまたはDである
154	hzG2 CDR3 コンセンサス (Kabat)	IX$_1$X$_2$DNEIGGP, 配列中、X$_1$はN、Q、S、またはTであり;かつX$_2$はSまたはTである
155	hzG2 CDR1 コンセンサス (Contact)	IFSXYVVA, 配列中、XはM、K、D、Y、L、またはIである
156	hzG2 CDR2 コンセンサス (Contact)	WVX$_1$FIQX$_2$GGTAN, 配列中、X$_1$はAまたはSであり;かつX$_2$はRまたはSである
157	hzG2 CDR3 コンセンサス (Contact)	NYIX$_1$X$_2$DNEIGG, 配列中、X$_1$はN、Q、S、またはTであり;かつX$_2$はSまたはTである
158	hzG2 CDR1 コンセンサス (IMGT)	GSISIFSXYV, 配列中、XはM、K、D、Y、L、またはIである
159	hzG2 CDR2 コンセンサス (IMGT)	IQXGGTA, 配列中、XはRまたはSである
160	hzG2 CDR3 コンセンサス (IMGT)	NYIX$_1$X$_2$DNEIGGP,配列中、X$_1$はN、Q、S、またはTであり;かつX$_2$はSまたはTである
161	Siglec8 hzG2v2.1	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKEREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
162	Siglec8 hzG2v5.1	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVS AIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
163	Siglec8 hzG2v6.1	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVS FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP
164	Siglec8 hzG2v22	QVTLKESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISIFSMYVVAWYRQAPGKQREWVA FIQRGGTANYAESAKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNYINS DNEIGGPWGQGTLVTVKP

【図面】

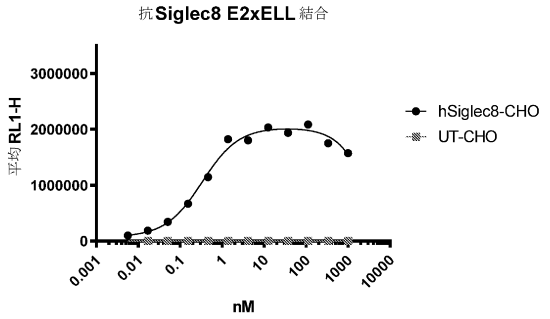
【図１Ａ】



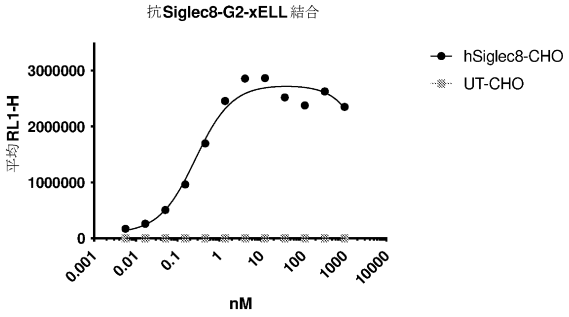
【図１Ｂ】



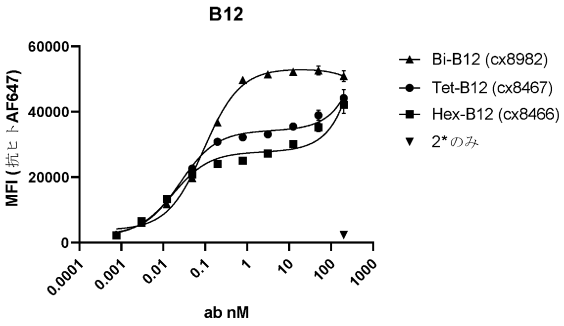
【図１Ｃ】



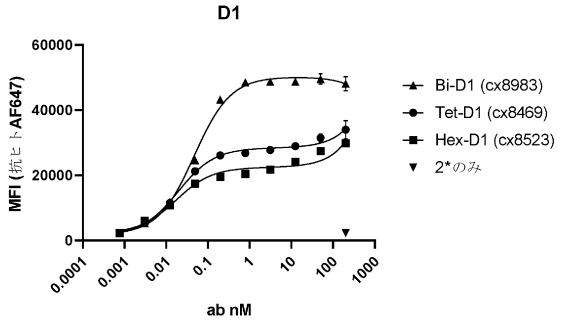
【図１Ｄ】



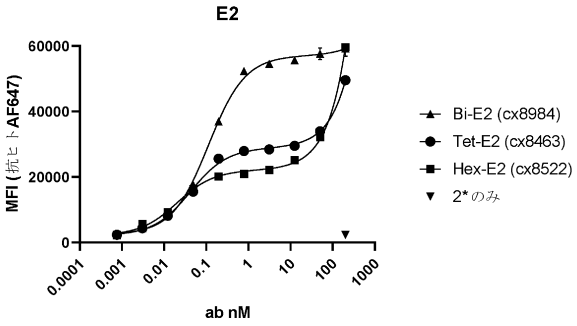
【図２Ａ】



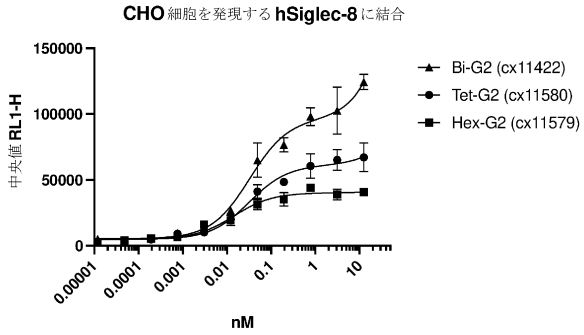
【図２Ｂ】



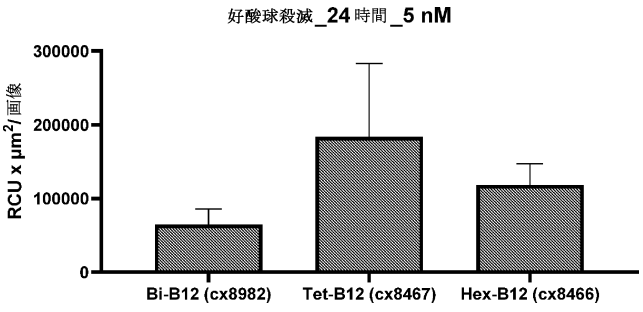
【図２Ｃ】



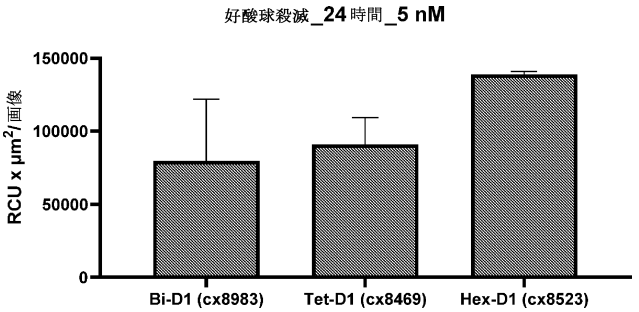
【図２Ｄ】



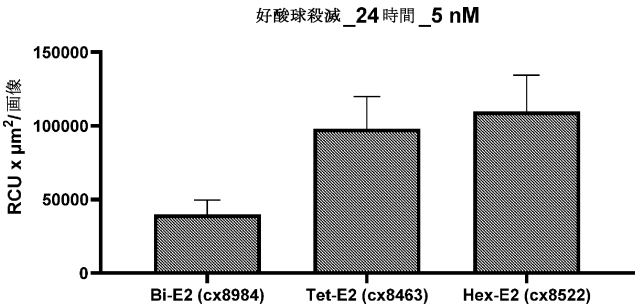
【図３Ａ】



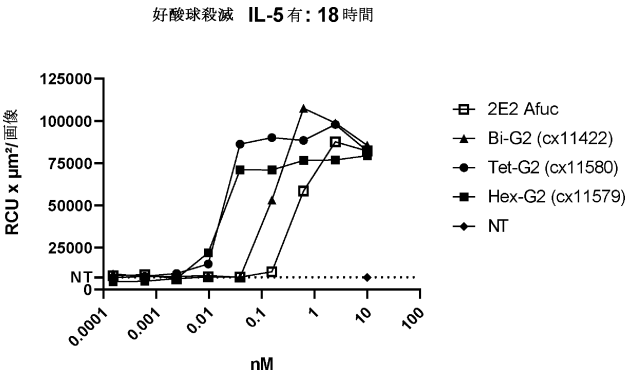
【図３Ｂ】



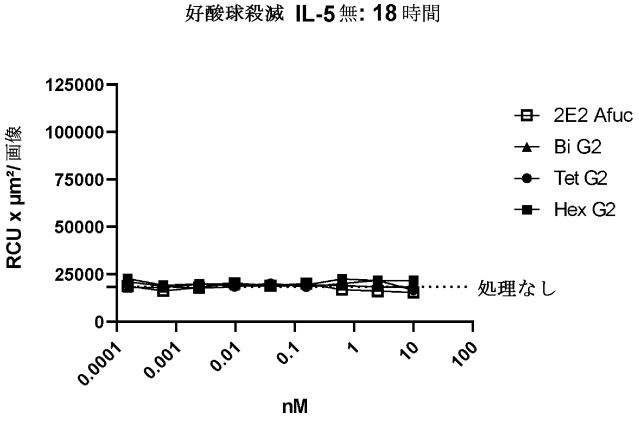
【図３Ｃ】



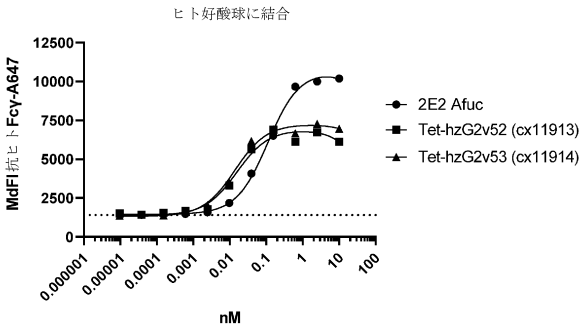
【図３Ｄ】



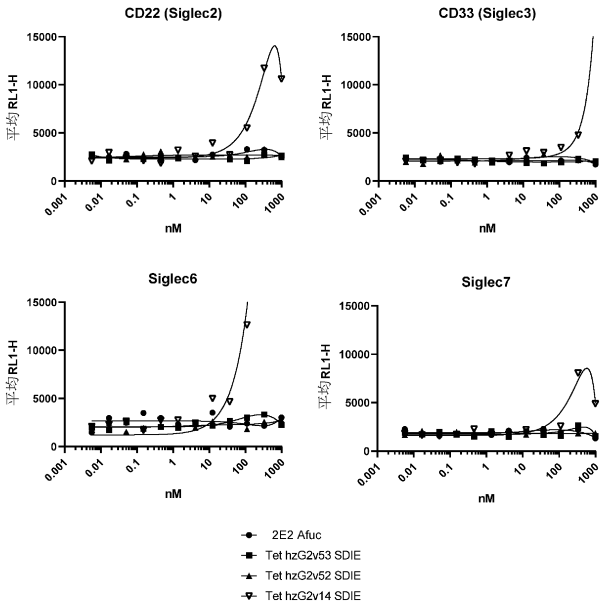
【図３Ｅ】



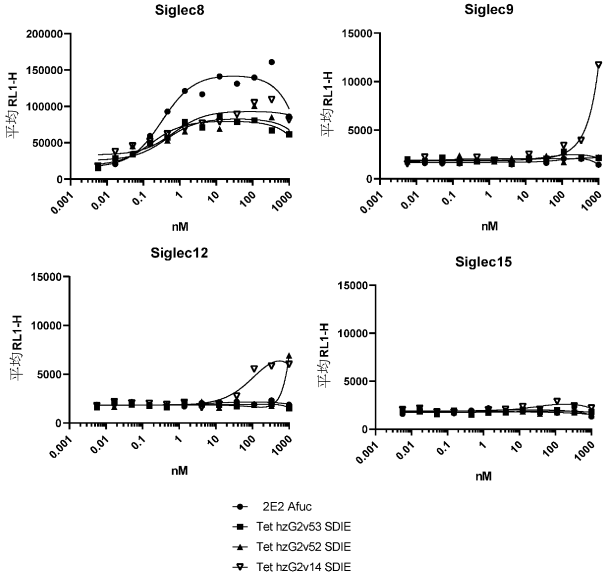
【図４Ａ】



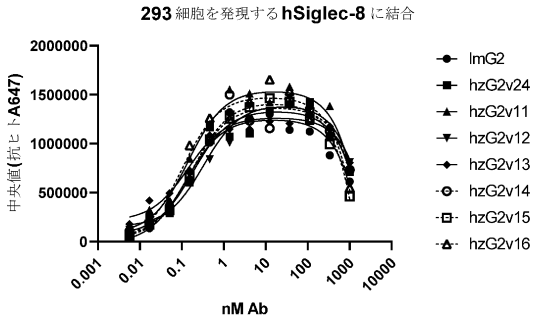
【図４Ｂ】



【図４Ｃ】

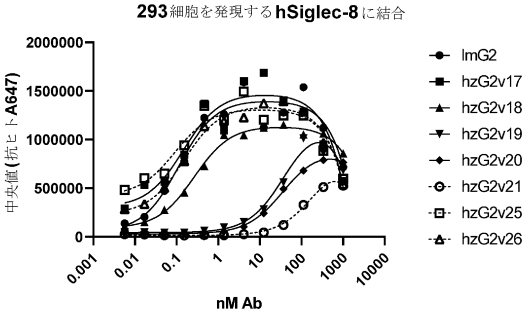


【図５Ａ】



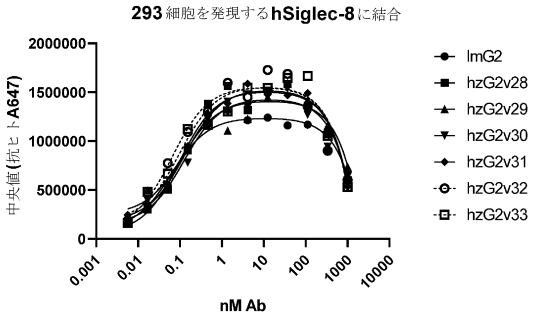
	Bmax	Kd
hIgG2	1275440	0.1236
hzG2v24	1272835	0.1811
hzG2v11	1470328	0.1400
hzG2v12	1251577	0.3269
hzG2v13	1061765	0.1375
hzG2v14	1346777	0.1638
hzG2v15	1403056	0.1748
hzG2v16	1494836	0.1001

【図５Ｂ】



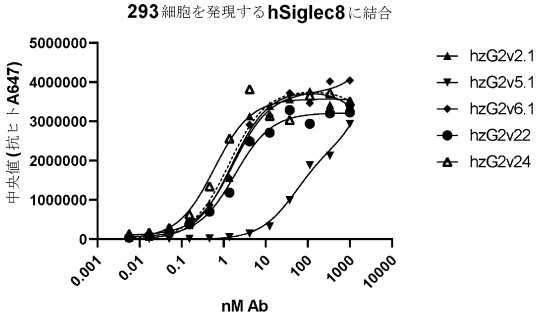
	Bmax	Kd
hIgG2	1356733	0.1142
hzG2v17	1173749	0.1455
hzG2v18	1052107	0.2634
hzG2v19	1244491	41.88
hzG2v20	889078	36.81
hzG2v21	1103241	255.5
hzG2v25	897286	0.09121
hzG2v26	1116244	0.1508

【図５Ｃ】



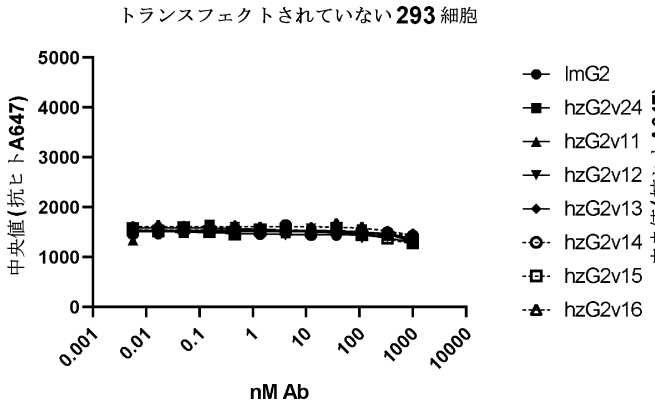
	Bmax	Kd
hmG2	1147980	0.06374
hzG2v28	1462724	0.09656
hzG2v29	1172452	0.1111
hzG2v30	1292352	0.1236
hzG2v31	1354757	0.1303
hzG2v32	1454897	0.06431
hzG2v33	1387121	0.09791

【図５Ｄ】

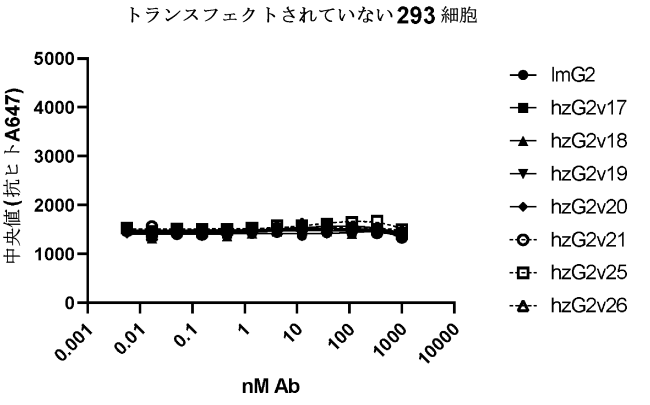


	Bmax	Kd
hzG2v2.1	3813511	1.568
hzG2v5.1	2379445	50.98
hzG2v6.1	3629920	1.701
hzG2v22	3159126	1.837
hzG2v24	3563902	0.5968

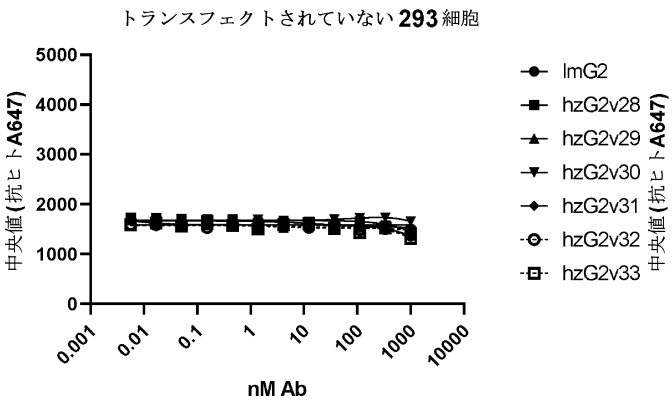
【図５Ｅ】



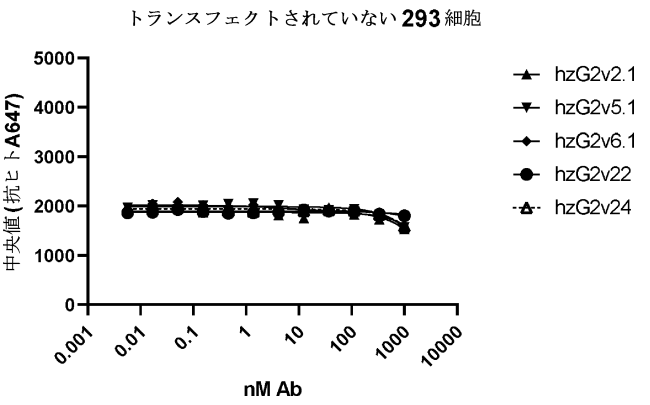
【図５Ｆ】



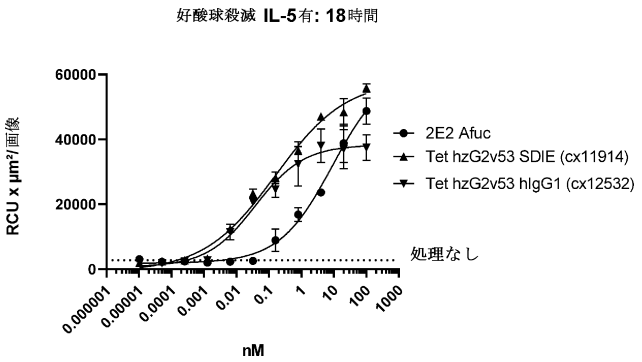
【図５Ｇ】



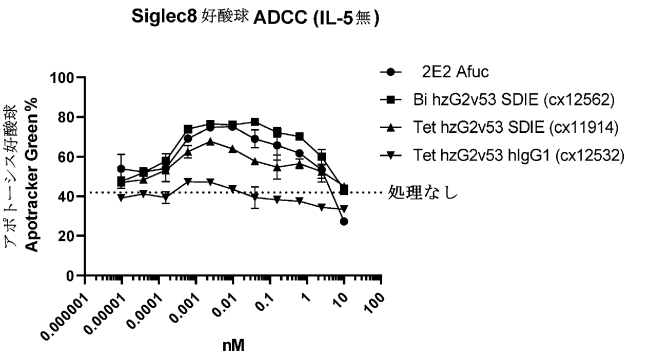
【図５Ｈ】



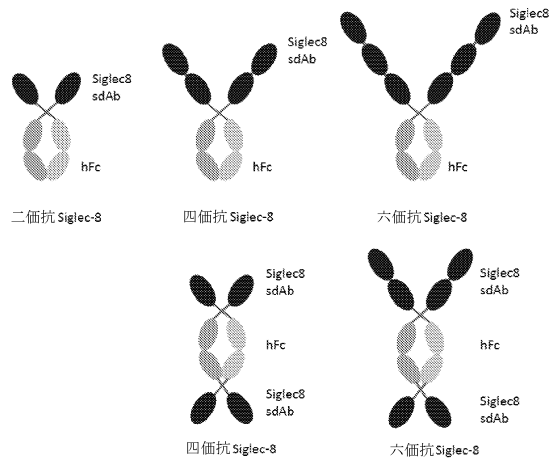
【図６Ａ】



【図６Ｂ】



【図７】



【配列表】

<u>20255153040000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/66086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C07K 16/18 (2023.01)
ADD. C07K 16/28 (2023.01)

CPC - INV. C07K 16/3076, C07K 2317/565

ADD. C07K 2317/569, C07K 2317/24, C07K 2317/22, C07K 2317/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017/0114138 A1(ALLAKOS INC.) 27 April 2017(27.04.2017) abstract, para [0043]	1, (4-8)/1
A	US 2020/0347133 A1 (INHIBRX, INC.) 05 November 2020 (05.11.2020) para [0139]; SEQ ID NO: 122	1, (4-8)/1
A	WO 2020/227474 A1 (BLUEBIRD BIO, INC.) 12 November 2020 (12.11.2020) pg 5, ln 21-22; SEQ ID NO: 26	1, (4-8)/1
A	US 2017/0198050 A1 (INHIBRX, INC.) 13 July 2017 (13.07.2017) para [0220]; SEQ ID NO: 123	1, (4-8)/1

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 2023	OCT 19 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/66086

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

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

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/66086

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 9-10, 23-30 and 38-76
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

----------see extra sheet ----------

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, (4-8)/1; note: Claim 3 was excluded from the search because it is dependent on claim 2 and therefore falls outside the scope of the first named invention of Group I+.

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/66086

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Group I+: Claims 1-8 and 11-22 directed to an isolated VHH domain polypeptide composition that binds Siglec-8, comprising complementarity determining region 1 (CDR1), complementarity determining region 2 (CDR2), and complementarity determining region 3 (CDR3) sequences of a VHH. The Siglec-8 binding VHH composition will be searched to the extent that the VHH comprises SEQ ID NO: 26, wherein the CDR1-3 comprise SEQ ID NOs: 28, 29, 30, 18, 29, 8 (AbM-numbering system); SEQ ID NOs: 76, 81, 8 (Chothia); SEQ ID NOs: 87, 94, 8 (Kabat); SEQ ID NOs: 100, 105, 110 (Contact); and SEQ ID NOs: 116, 121, 126 (IGMT), see applicant Table 2. The first named invention was determined based on amino acid sequences listed in claims 1, 3 and 4-8. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1, 3 and 4-8 (in part) limited to said Siglec-8 binding VHH encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that VHH encompasses said sequence features. Additional Siglec-8 binding VHHs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected Siglec-8 binding VHHs . Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a Siglec-8 binding VHH, wherein the VHH comprises SEQ ID NO: 5, wherein the CDR1-3 comprise SEQ ID NOs: 6, 7, 8/2, 3, 8 (AbM-numbering system); SEQ ID NOs: 74, 80, 8 (Chothia); SEQ ID NOs: 85, 92, 8 (Kabat); SEQ ID NOs: 98, 104, 110 (Contact); and SEQ ID NOs: 114, 120, 126 (IGMT)-see Table 2 (claims 1, 3 and 4-8 (in part)).

Group II: Claims 31-37, drawn to a polypeptide comprising two or three antigen-binding domains that bind Siglec-8 and a multimerization domain.

The inventions listed as Groups I+, and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the amino acid sequences of the peptides of Group I+ and, accordingly, Group I+ lacks unity a priori. Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Group I+ requires an isolated VHH domain (heavy chain antibody) polypeptide with defined amino acid sequences (VHH and CDR1-3) not required by Group II.

Group II requires a polypeptide with two or three antigen-binding domains (e.g. scFv) that bind Siglec-8 and a multimerization domain., not required by Group I+.

Common Technical Features

The feature shared by the inventions of Group I+ is a VHH (e.g. heavy chain only) polypeptide that binds Siglec-8.
However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2017/0114138 A1 to Allakos Inc. (hereinafter 'Allakos'). Allakos teaches anti-Siglec-8 antibodies having VH domains (abstract "the invention provides ... antibodies or agonists that bind to human Siglec-8 or compositions comprising said antibodies or agonists"), and further teaches that said antibodies may consist of a heavy chain only (para [0043] " "hypervariable region," "HVR," or "HV," when used herein refers to the regions of an antibody-variable domain that are hypervariable in sequence ...Generally, antibodies comprise six HVRs; three in the VH (H1, H2, H3), and three in the VL (L1, L2, L3). In native antibodies ... H3 in particular is believed to play a unique role in conferring fine specificity to antibodies .... Indeed, naturally occurring camelid antibodies consisting of a heavy chain only are functional and stable in the absence of light chain.", i.e. VHH antibodies).

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of antibodies that bind Siglec-8.However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by Allakos (para [0011] "provided herein is a composition comprising an antibody or an agonist that binds to human Siglec-8").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4, continued: claims 9-10, 23-30 and 38-78 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) regarding multiply dependent claims.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12P	*21/08 (2006.01)*	C12P	21/08		
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	Z	
C12Q	*1/02 (2006.01)*	C12Q	1/02		
A61P	*29/00 (2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	105	
A61P	*37/08 (2006.01)*	A61P	37/08		
A61P	*35/02 (2006.01)*	A61P	35/02		
A61P	*11/06 (2006.01)*	A61P	11/06		
A61P	*11/02 (2006.01)*	A61P	11/02		
A61P	*13/10 (2006.01)*	A61P	13/10		
A61P	*1/04 (2006.01)*	A61P	1/04		
A61P	*11/00 (2006.01)*	A61P	11/00		
A61P	*21/00 (2006.01)*	A61P	21/00		
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	N	
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	Y	
G01N	*33/531 (2006.01)*	G01N	33/531	A	

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

弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(74)代理人　100221741
弁理士　酒井 直子
(74)代理人　100114926
弁理士　枝松 義恵
(72)発明者　エクルズ アンドリュー エム.

アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州 ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード １１０２５ スイート １４０ インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者 ガノー ジェイコブ ジェイ.
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州 ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード １１０２５ スイート １４０ インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者 ベックルンド ブライアン
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州 ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード １１０２５ スイート １４０ インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者 エッケルマン ブレンダン ピー.
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州 ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード １１０２５ スイート １４０ インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者 ヤオ トニー ダン－リン
アメリカ合衆国 ８０２０６ コロラド州 デンバー フィルモア ストリート １００ ＃５００ フィラキシス バイオサイエンス リミテッド ライアビリティ カンパニー内

Ｆターム（参考） 4B063 QQ03 QQ08 QR48 QR72 QR77 QS33
4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 CE12
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 BB41 BB42 EE01 GG02 GG04 GG06
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26