

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6951246号
(P6951246)

(45) 発行日 令和3年10月20日(2021.10.20)

(24) 登録日 令和3年9月28日(2021.9.28)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/13	(2006.01)
C 07 K 16/18	(2006.01)
C 12 N 1/15	(2006.01)
C 12 N 1/19	(2006.01)
C 12 N 1/21	(2006.01)
	C 12 N 15/13
	C 07 K 16/18
	C 12 N 1/15
	C 12 N 1/19
	C 12 N 1/21

請求項の数 31 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-543310 (P2017-543310)
(86) (22) 出願日	平成27年11月5日 (2015.11.5)
(65) 公表番号	特表2018-501813 (P2018-501813A)
(43) 公表日	平成30年1月25日 (2018.1.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/059185
(87) 國際公開番号	W02016/073685
(87) 國際公開日	平成28年5月12日 (2016.5.12)
審査請求日	平成30年10月31日 (2018.10.31)
(31) 優先権主張番号	62/075, 793
(32) 優先日	平成26年11月5日 (2014.11.5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	516008350 アネクソン, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州, サウス サンフランシスコ, キンボール ウェイ 180, セカンド フロア
(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(72) 発明者	ローゼンタール, アーノン アメリカ合衆国 94062 カリフォルニア州, ウッドサイド, ノルマンディーレーン 150

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト化抗補体因子C1q抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、

a)配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号23のアミノ酸配列を有する超可変領域(HVR)-H1、配列番号24のアミノ酸配列を有するHVR-H2、及び配列番号25のアミノ酸配列を有するHVR-H3を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号30のアミノ酸配列を有するHVR-L1、配列番号31のアミノ酸配列を有するHVR-L2、及び配列番号32のアミノ酸配列を有するHVR-L3を含む軽鎖可変ドメイン

を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

【請求項2】

ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体又はその抗原結合断片が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが配列番号3のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号7のアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3】

ラットC1qに、ヒトC1q及びマウスC1qの両方に、又はヒトC1q、マウスC1q及びラットC1qに特異的に結合する、請求項1又は2に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 4】

抗体がIgGクラスのものである、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 5】

抗体がIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプを有する、請求項4に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 6】

抗体がIgG4アイソタイプを有する、請求項4に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 7】

抗体がヒトIgG4定常領域を含む、請求項6に記載の抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項 8】

ヒトIgG4重鎖定常領域が、配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 9】

ヒトIgG4重鎖定常領域がFc領域を含む、請求項7に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 10】

Fc領域が、以下の(1)～(3)：(1)C1qタンパク質に結合すること、(2)補体活性を誘導すること、及び(3)抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導すること、
の一以上ができない、請求項9に記載の抗体又は抗原結合断片。

20

【請求項 11】

Fc領域が一以上の修飾を含む、請求項9又は10に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 12】

Fc領域が一以上のアミノ酸置換を含む、請求項11に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 13】

Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にアミノ酸置換を含む、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換を含む、及び／又はKabat番号付け法に従う248位のアミノ酸置換が、Fc領域のFc受容体との相互作用を阻害する、請求項12に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 14】

30

Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にアミノ酸置換を含む、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にセリンからプロリンへのアミノ酸置換を含む、及び／又はKabat番号付け法に従う241位のアミノ酸置換が、抗体の腕部のスイッチングを妨げる、請求項12又は13に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 15】

抗体結合断片がFab、F(ab')₂又はFab'断片である、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 16】

抗体断片が、その対応する全長抗体と比較してより良好な脳透過性を有する、及び／又は抗体断片が、その対応する全長抗体と比較してより短い半減期を有する、請求項15に記載の抗体又は抗原結合断片。

40

【請求項 17】

抗体がヒトC1qに対して10pM未満～5pM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する、及び／又は抗体がマウスC1qに対して125nM未満～5pM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 18】

抗体がC1qに特異的に結合し、C1qの生物学的活性を中和する、請求項1～17のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 19】

生物学的活性が、(1)自己抗体へのC1q結合、(2)C1rへのC1q結合、(3)C1sへのC1q結合、

50

(4)ホスファチジルセリンへのC1q結合、(5)ペントラキシン-3へのC1q結合、(6)C反応性タンパク質(CRP)へのC1q結合、(7)球状C1q受容体(gC1qR)へのC1q結合、(8)補体受容体1(CR1)へのC1q結合、(9)ベータ-アミロイドへのC1q結合、又は(10)カルレティキュリンへのC1q結合である、請求項1～8に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項20】

生物学的活性が、(1)古典的補体活性化経路の活性化、(2)抗体及び補体依存性細胞傷害の活性化、(3)CH50溶血、(4)シナプラス喪失、(5)B細胞抗体産生、(6)樹状細胞成熟、(7)T細胞増殖、(8)サイトカイン産生、(9)ミクログリア活性化、(10)アルサス反応、(11)シナプラス又は神経終末の食作用、又は(12)補体受容体3(CR3/C3)を発現する細胞の活性化である、請求項1～8又は1～9に記載の抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項21】

CH50溶血が、ヒト、マウス、及び/又はラットCH50溶血を含む、抗体が少なくとも50%～少なくとも90%のCH50溶血を中和することができる、及び抗体が150ng未満、100ng未満、50ng未満又は20ng未満の用量で少なくとも50%のCH50溶血を中和することができる、請求項2～9に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項22】

抗体がC1qと、20:1～1.0:1又は1.0:1未満の範囲の結合化学量論で結合する、請求項1～9～2～1のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項23】

請求項1～2～2のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

20

【請求項24】

請求項2～3に記載のポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項25】

請求項1～2～2のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項26】

補体活性化に関連する疾患の治療のための医薬の製造における、請求項1～2～2のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片の使用。

【請求項27】

30

疾患が神経変性障害、炎症性疾患、自己免疫疾患、又は代謝性障害である、請求項2～6に記載の使用。

【請求項28】

疾患がアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縫内障、筋緊張性ジストロフィー、ギラン・バレー症候群(GBS)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、脊髄性筋萎縮症、ダウン症候群、パーキンソン病、及びハンチントン病から選択される、請求項2～7に記載の使用。

【請求項29】

炎症性疾患、自己免疫疾患、又は代謝性障害が、糖尿病、白斑、橋本甲状腺炎、アジソン病、セリアック病、クローン病、悪性貧血、尋常性天疱瘡、肥満、自己免疫性溶血性貧血、腫瘍随伴症候群、血管炎病、低補体血症性蕁麻疹様血管炎(HUV)、リウマチ性多発筋痛症、ウェゲナー肉芽腫症、関節リウマチ(RA)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血及び再灌流後の遠隔組織傷害、心肺バイパス手術中の補体活性化、皮膚筋炎、天疱瘡、ループス腎炎とその結果生じる糸球体腎炎及び血管炎、心肺バイパス、心臓麻痺に誘発される冠動脈内皮機能障害、II型膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、急性腎不全、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質症候群、慢性開放隅角縫内障、急性閉塞隅角縫内障、黄斑変性疾患、加齢黄斑変性(AMD)、(AMD-wet)、地図状萎縮、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、虚血関連網膜症、眼内炎、眼内新生血管疾患、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フオン・ヒッペル-リンダウ病、眼のヒストプラスマ症、視神経脊髄炎(NMO)、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜血管新生、網膜血管新生、レーベル遺伝性視神経症、視神経炎、ベー

40

50

チエット網膜症、虚血性視神経症、網膜血管炎、抗好中球細胞質自己抗体血管炎、プルチエル網膜症、シェーグレンドライアイ疾患、ドライAMD、サルコイドーシス、側頭動脈炎、結節性多発動脈炎、多発性硬化症、超急性拒絶反応、血液透析、慢性閉塞性肺窮迫症候群(COPD)、喘息並びに誤嚥性肺炎から選択される、請求項27に記載の使用。

【請求項30】

請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片、及び補体活性化に関連する疾患の治療又は予防を必要とする個体において補体活性化に関連する疾患を治療又は予防するために該抗体を使用するための指示を含む添付文書を含むキット。

【請求項31】

生物学的試料におけるシナプスを検出する方法であって、

10

a)生物学的試料を請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片と接触させるステップ、及び

b)シナプスに結合した抗体又は抗原結合断片を検出し、それによって生物学的試料におけるシナプスを検出するステップ

を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年11月5日に出願した米国仮出願第62/075,793号及びの利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

1. 分野

本開示は、抗C1q抗体及びそれを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

過剰な補体活性化は、多くの炎症性及び自己免疫疾患を含む、ある範囲の疾患状態に関連している。より最近では、補体系はまた、神経変性疾患病理学に寄与することが示されている。具体的には、C1qなどの補体因子は、ニューロンシナプスにおいて発現され、排除のためにこれらのシナプスにマークを付すことが示された。例えば、米国特許公開第2012/0195880号及び第2012/328601号を参照されたい。選択的シナプス喪失は、正常な脳の発達の本質的な側面(「シナプス刈り込み」)であるが、過剰なシナプス喪失は、特に成熟又は加齢脳において、神経変性及び認知低下をもたらす。シナプス補体発現の上昇は、正常な加齢及び神経変性疾患の進行におけるシナプス喪失に寄与することが見出された。逆に、神経補体発現の低下は、神経保護的であることが見出された。これらの知見に基づいて、C1qなどの補体因子の活性を中和することは、シナプス喪失を防止し、神経変性疾患の進行並びに正常な加齢における認知低下を遅延させる有望な治療戦略として理解される。

30

【0004】

シナプス喪失を伴い、C1qなどの補体因子の中和を目的とした治療に対して影響を受けやすいと考えられる神経変性疾患としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縁内障、筋緊張性ジストロフィー、ダウン症候群、パーキンソン病、ハンチントン病などが含まれる。

40

【0005】

ほんの僅かな数の補体を中和する抗体が今日までに知られている(例えば、Klos A. et al., Mol Immunol. 2009, 46(14), 2753-2766、Carroll S. & Georgiou G., Immunobiology 2013, 218(8), 1041-1048、Tuzun et al., J. Neuroimmunol. 2007, 182, 167-176、Nelson et al., J. Clin. Invest. 2006, 116:2892-2900、Heinz et al., J. Immunol. 1984, 133, 400-404、Jiang et al., J. Immunol. 1991, 146, 2324-2330、Trinder et al.

50

, Scand. J. Immunol. 1999, 50, 635-641, Hwang et al., Mol. Immunol. 2008, 45, 2570-2580を参照されたい)。末端の補体活性化経路の阻害剤である、C5中和抗体であるエクリズマブ(Eculizumab)だけが、今日まで規制当局の承認を得ている。エクリズマブは、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH、Hillmen et al., N Engl J Med. 2006, 355(12):1233-43)の治療のために市販されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許公開第2012/0195880号

【特許文献2】米国特許公開第2012/328601号

10

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Klos A. et al., Mol Immunol. 2009, 46(14), 2753-2766

【非特許文献2】Carroll S. & Georgiou G., Immunobiology 2013, 218(8), 1041-1048

【非特許文献3】Tuzun et al., J. Neuroimmunol. 2007, 182, 167-176

【非特許文献4】Nelson et al., J. Clin. Invest. 2006, 116:2892-2900

【非特許文献5】Heinz et al., J. Immunol. 1984, 133, 400-404

【非特許文献6】Jiang et al., J. Immunol. 1991, 146, 2324-2330

【非特許文献7】Trinder et al., Scand. J. Immunol. 1999, 50, 635-641

【非特許文献8】Hwang et al., Mol. Immunol. 2008, 45, 2570-2580

20

【非特許文献9】PNH、Hillmen et al., N Engl J Med. 2006, 355(12):1233-43

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このように、C1qなどの補体因子に特異的に結合し、その生物学的活性を中和するさらなる抗体を開発する必要がある。

【0009】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用されている全ての引用文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本明細書において、ヒト化抗C1q抗体、及びヒト化抗C1q抗体を使用する方法が提供される。

【0011】

特定の態様において、本開示は、C1qタンパク質に特異的に結合するヒト化抗体であって、抗体が重鎖可変領域及びヒト重鎖定常領域を含み、重鎖可変領域がFab領域を含み、重鎖定常領域がFc領域を含み、Fab領域がC1qタンパク質に特異的に結合し、Fc領域がC1qタンパク質に結合できない、前記抗体を提供する。

【0012】

前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が補体活性を誘導できない。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導できない。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、ヒト重鎖定常領域がヒトIgG4重鎖定常領域である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、ヒトIgG4重鎖定常領域が、配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、ヒトIgG4重鎖定常領域がFc領域を含み、Fc領域が一以上の修飾を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が一以上のアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にアミノ

40

50

酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Kabat番号付け法に従う248位のアミノ酸置換が、Fc領域のFc受容体との相互作用を阻害する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にセリンからプロリンへのアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Kabat番号付け法に従う241位のアミノ酸置換が、抗体の腕部のスイッチング(arm switching)を妨げる。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含むFc領域を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、軽鎖可変ドメインが配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0013】

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0014】

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖可変ドメインが配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【0015】

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体がa)配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び/又はb)配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0016】

40

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体がa)配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及びb)配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体がa)配列番号2のアミノ酸配列、又は配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及びb)配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はそ

50

、又は配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体がa)配列番号4のアミノ酸配列、又は配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及びb)配列番号6のアミノ酸配列、又は配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体がa)配列番号4のアミノ酸配列、又は配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及びb)配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体がa)配列番号4のアミノ酸配列、又は配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及びb)配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0022】

前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がヒトC1q及びマウスC1qの両方に特異的に結合する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がラットC1qに特異的に結合する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がヒトC1q、マウスC1q、及びラットC1qに特異的に結合する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体又は抗原結合断片がATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生される抗体M1又はその抗C1q結合断片と本質的に同じC1qエピトープに結合する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体又は抗原結合断片がATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体M1のヒトC1q又はマウスC1qとの結合を阻害する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がIgGクラスのものである。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプを有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がIgG4アイソタイプを有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がヒトIgG4定常領域を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、ヒトIgG4重鎖定常領域が、配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、ヒトIgG4重鎖定常領域がFc領域を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域がC1qタンパク質に結合できない。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が補体活性を誘導できない。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導できない。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が一以上の修飾を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が一以上のアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Kabat番号付け法に従う248位のアミノ酸置換が、Fc領域のFc受容体との相互作用を阻害する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番

10

20

30

40

50

号付け法に従う241位にアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にセリンからプロリンへのアミノ酸置換を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、Kabat番号付け法に従う241位のアミノ酸置換が、抗体の腕部のスイッチングを妨げる。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が二重特異性抗体である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が脳透過性を増加させるように操作されている。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が第1の抗原及び第2の抗原を認識する二重特異性抗体である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、第1の抗原がC1qタンパク質であり、第2の抗原が血液脳関門を横断する輸送を促進する抗原である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、第2の抗原が、トランスフェリン受容体(TR)、インスリン受容体(HIR)、インスリン様増殖因子受容体(IGFR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2(LPR-1及び2)、ジフェリア毒素受容体、CRM197、ラマ単ードメイン抗体、TMEM30(A)、タンパク質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、angiopoepペプチド、並びにANG1005から選択される。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体結合断片がFab、 $F(ab')_2$ 又はFab'断片である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体断片が、その対応する全長抗体と比較してより良好な脳透過性を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体断片が、その対応する全長抗体と比較してより短い半減期を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がヒトC1qに対して約10pM未満～約5pM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がマウスC1qに対して約125nM未満～約5pM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がC1qに特異的に結合し、C1qの生物学的活性を中和する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、生物学的活性が、(1)自己抗体へのC1q結合、(2)C1rへのC1q結合、(3)C1sへのC1q結合、(4)ホスファチジルセリンへのC1q結合、(5)ペントラキシン-3へのC1q結合、(6)C反応性タンパク質(CRP)へのC1q結合、(7)球状C1q受容体(gC1qR)へのC1q結合、(8)補体受容体1(CR1)へのC1q結合、(9)ベータ-アミロイドへのC1q結合、又は(10)カルレティキュリンへのC1q結合である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、生物学的活性が、(1)古典的補体活性化経路の活性化、(2)抗体及び補体依存性細胞傷害の活性化、(3)CH50溶血、(4)シナプス喪失、(5)B細胞抗体産生、(6)樹状細胞成熟、(7)T細胞増殖、(8)サイトカイン産生、(9)ミクログリア活性化、(10)アルサス反応、(11)シナプス又は神経終末の食作用、又は(12)補体受容体3(CR3/C3)を発現する細胞の活性化である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、CH50溶血が、ヒト、マウス、及び/又はラットCH50溶血を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が少なくとも約50%～少なくとも約90%のCH50溶血を中和することができる。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が、150ng/未満、100ng未満、50ng未満又は20ng未満の用量で少なくとも50%のCH50溶血を中和することができる。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体がC1qと、20:1～1.0:1又は1.0:1未満の範囲の結合化学量論(binding stoichiometry)で結合する。

【0023】

特定の態様において、本開示は、前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体をコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチオドを提供する。特定の態様において、本開示は、前記実施形態のいずれかの核酸配列を含む、単離された宿主細胞を提供する。特定の態様において、本開示は、前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0024】

10

20

30

40

50

特定の態様において、本開示は、そのような治療を必要とする個体における補体活性化に関連する疾患を治療又は予防する方法であって、治療有効用量の前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体を投与することを含む、前記方法を提供する。他の態様において、本開示は、そのような治療を必要とする個体における補体活性化に関連する疾患を治療又は予防における使用のための前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体を提供する。他の態様において、本開示は、そのような治療を必要とする個体における補体活性化に関連する疾患を治療又は予防のための医薬の製造における前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体の使用を提供する。

【 0 0 2 5 】

前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、補体活性化に関連する疾患が神経変性障害である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、神経変性障害が、シナプスの喪失又は神経接合部喪失に関連する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、神経変性障害が、補体受容体3(CR3)/C3又は補体受容体CR1に依存性であるシナプス喪失に関連する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、神経変性障害が、病理学的活性依存性のシナプス刈り込みに関連する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、神経変性障害が、ミクログリアによるシナプス食作用に関連する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、神経変性障害が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縫内障、筋緊張性ジストロフィー、ギラン・バレー症候群(GBS)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、脊髄性筋萎縮症、ダウン症候群、パーキンソン病、及びハンチントン病から選択される。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、補体活性化に関連する疾患が、炎症性疾患、自己免疫疾患、又は代謝性障害である。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、炎症性疾患、自己免疫疾患又は代謝性障害が、糖尿病、肥満、関節リウマチ(RA)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血及び再灌流後の遠隔組織傷害、心肺バイパス手術中の補体活性化、皮膚筋炎、天疱瘡、ループス腎炎とその結果生じる糸球体腎炎及び血管炎、心肺バイパス、心臓麻痺に誘発される冠動脈内皮機能障害、II型膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、急性腎不全、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質症候群、慢性開放隅角縫内障、急性閉塞隅角縫内障、黄斑変性疾患、加齢黄斑変性(AMD)、(AMD-wet)、地図状萎縮、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、虚血関連網膜症、眼内炎、眼内新生血管疾患、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォン・ヒッペル-リンダウ病、眼のヒストラスマ症、視神経脊髄炎(NMO)、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜血管新生、網膜血管新生、レーベル遺伝性視神経症、視神経炎、ベーチェット網膜症、虚血性視神経症、網膜血管炎、ANCA血管炎、ブルチエル網膜症、シェーグレンドライアイ疾患、ドライAMD、サルコイドーシス、側頭動脈炎、結節性多発動脈炎、多発性硬化症、アロ移植、超急性拒絶反応、血液透析、慢性閉塞性肺窮迫症候群(COPD)、喘息並びに誤嚥性肺炎から選択される。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、補体活性化に関連する疾患が、重症筋無力症、1型真性糖尿病、橋本甲状腺炎、アジソン病、セリアック病、クローン病、悪性貧血、尋常性天疱瘡、白斑、自己免疫性溶血性貧血、腫瘍隨伴症候群、血管炎病、低補体血症性尋麻疹様血管炎(HUV)、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎及びウェグナー肉芽腫症から選択される自己免疫疾患である。

【 0 0 2 6 】

特定の態様において、本開示は、前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体、及びそのような治療を必要とする個体において補体活性化に関連する疾患を治療又は予防するために該抗体を使用するための指示を含む添付文書を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、補体活性化に関連する疾患が神経変性障害である。いくつかの実施形態において、神経変性障害が、シナプスの喪失又は神経接合部喪失に関連する。いくつかの実施形態において、神経変性障害が、補体受容体3(CR3)/C3又は補体受容体CR1に依存性であるシナプス喪失に関連する。いくつかの実施形態において、神経変性障害が、病理学的

10

20

30

40

50

活性依存性のシナプス刈り込みに関連する。いくつかの実施形態において、神経変性障害が、ミクログリアによるシナプス食作用に関連する。いくつかの実施形態において、神経変性障害が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縫内障、筋緊張性ジストロフィー、ダウン症候群、パーキンソン病及びハンチントン病から選択される。いくつかの実施形態において、補体活性化に関連する疾患が、炎症性疾患、自己免疫疾患又は代謝性障害である。いくつかの実施形態において、炎症性疾患、自己免疫疾患又は代謝性障害が、糖尿病、肥満、関節リウマチ(RA)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血及び再灌流後の遠隔組織傷害、心肺バイパス手術中の補体活性化、皮膚筋炎、天疱瘡、ループス腎炎とその結果生じる糸球体腎炎及び血管炎、心肺バイパス、心臓麻痺に誘発される冠動脈内皮機能障害、II型膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、急性腎不全、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質症候群、慢性開放隅角縫内障、急性閉塞隅角縫内障、黄斑変性疾患、加齢黄斑変性(AMD)、(AMD-wet)、地図状萎縮、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、虚血関連網膜症、眼内炎、眼内新生血管疾患、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォン・ヒッペル-リンダウ病、眼のヒストプラスマ症、視神経脊髄炎(NMO)、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜血管新生、網膜血管新生、レーベル遺伝性視神経症、視神経炎、ベーチエット網膜症、虚血性視神経症、網膜血管炎、ANCA血管炎、ブルチャル網膜症、シェーグレンドライアイ疾患、ドライAMD、サルコイドーシス、側頭動脈炎、結節性多発動脈炎、多発性硬化症、アロ移植、超急性拒絶反応、血液透析、慢性閉塞性肺窮迫症候群(COPD)、喘息並びに誤嚥性肺炎から選択される。いくつかの実施形態において、補体活性化に関連する疾患が、重症筋無力症、1型真性糖尿病、橋本甲状腺炎、アジソン病、セリアック病、クローン病、悪性貧血、尋常性天疱瘡、白斑、自己免疫性溶血性貧血、腫瘍随伴症候群、血管炎病、低補体血症性尋麻疹様血管炎(HUV)、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎及びウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される自己免疫疾患である。

【0027】

特定の態様において、本開示は、前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体を含む診断用キットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは本明細書に開示された診断又は治療用途のためのものである。

【0028】

特定の態様において、本開示は、個体におけるシナプスを検出する方法であって、a)前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体を個体に投与するステップ、及びb)シナプスに結合した抗体を検出し、それによって個体におけるシナプスを検出するステップを含む、前記方法を提供する。他の態様において、本開示は、個体におけるシナプス検出における使用のための前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体を提供する。他の態様において、本開示は、個体においてシナプスを検出するための医薬の製造における前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体の使用を提供する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、シナプスに結合した抗体が、陽電子放出断層撮影(PET)、X線コンピュータ断層撮影、単一光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、コンピュータ断層撮影(CT)及びコンピュータ体軸断層撮影(CAT)からなる群から選択される画像技術を用いて検出される。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、シナプスに結合した抗体の検出が、個体におけるシナプス数の定量的測定をもたらす。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、個体が神経変性疾患又は自己免疫疾患有する。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、個体におけるシナプス数が、ある期間にわたって反復して測定され、個体におけるシナプスの喪失が経時的に検出される。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、経時的なシナプスの喪失が、神経変性疾患又は自己免疫疾患に対する治療の有効性についての尺度である。

【0029】

特定の態様において、本開示は、a)生物学的試料を前記実施形態のいずれかのヒト化抗C1q抗体と接触させるステップ、及びb)シナプスに結合した抗体を検出し、それによって生物学的試料におけるシナプスを検出するステップによって、生物学的試料におけるシナ

10

20

30

40

50

プスを検出する方法を提供する。

前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、方法は、ステップa)の前に、個体から生物学的試料を得るステップをさらに含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、生物学的試料が、生検標本、組織又は細胞を含む。前記実施形態のいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態において、抗体が、免疫蛍光顕微鏡法、免疫細胞化学、免疫組織化学、ELISA、FACS分析、免疫沈降、又はマイクロポジトロン放射断層撮影によって検出される。

【0030】

本明細書に記載されている様々な実施形態の1つ、いくつか又は全ての特性は、本明細書に提供される組成物及び方法の他の実施形態を形成するために組み合わせてもよいことは理解されなければならない。本明細書に提供される組成物及び方法のこれらの態様及び他の態様は、当業者に明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、軽鎖及び重鎖発現ベクターのプラスミドマップを示す。図1Aは、軽鎖発現ベクターpANTVKのプラスミドマップを示す。図1Bは、重鎖発現ベクターpANTVhG4(S241P L248E)のプラスミドマップを示す。VH及びVベクターの両方が、イントロン及びポリア配列を組み込むゲノムDNA断片を含む。両方の鎖の発現は、CMVプロモーターによって駆動され、(重鎖ベクターにおける)選択はDHFRミニ遺伝子を介する。

【図2A】図2Aは、M1抗体の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列とヒト化VH変異体VH1-VH2のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【図2B】図2Bは、M1抗体の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列とヒト化VH変異体VH3-VH4のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【図2C】図2Cは、M1抗体の軽鎖可変領域(V)のアミノ酸配列とヒト化V変異体V1-V2のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【図2D】図2Dは、M1抗体の軽鎖可変領域(V)のアミノ酸配列とヒト化V変異体V3-V4のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【図3】図3は、プロテインA精製抗体のクマシーブルー染色SDS-PAGEゲルを示す。2μgの各サンプルをNuPage 4~12% Bis-Trisゲルに供し、200Vで35分間泳動した。サイズマーカーは、事前染色タンパク質スタンダードのFermentas PageRuler Plusである。

【図4A-B】図4は、ヒトC1qに対する競合ELISAアッセイを示す。段階希釈した精製ヒト化抗C1q抗体を、一定濃度のビオチン化モノクローナル抗体M1と、ヒトC1qタンパク質に対する結合について競合させた。結合したビオチン化M1抗体を、ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート及びTMB基質を用いて検出した。図4Aは、ヒト化抗体VH1/V1、VH1/V2、及びVH1/V3を用いた結果を示す。図4Bは、ヒト化抗体VH1/V4、VH2/V1、VH2/V2、VH2/V3、及びVH2/V4を用いた結果を示す。図4Cは、ヒト化抗体VH3/V1、VH3/V2、VH3/V3、及びVH3/V4を用いた結果を示す。図4Dは、ヒト化抗体VH4/V1、VH4/V2、VH4/V3、及びVH4/V4を用いた結果を示す。

【図4C-D】図4A-Bの続きである。

【図5】図5は、マウスC1qに対する競合ELISAアッセイを示す。段階希釈した精製ヒト化抗C1q抗体を、一定濃度のビオチン化キメラ抗体M1と、マウスC1qタンパク質に対する結合について競合させた。結合したビオチン化キメラM1を、ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート及びTMB基質を用いて検出した。

【図6】図6は、ゲルろ過精製抗体のクマシーブルー染色SDS-PAGEゲルを示す。1μgの各サンプルをNuPage 4~12% Bis-Trisゲルに供し、200Vで35分間泳動した。サイズマーカー(M)は、事前染色タンパク質スタンダードのFermentas PageRuler Plusである。レーン1は還元Fab VH3/V3を示し、レーン2は非還元Fab VH3/V3を示し、レーン3は還元IgG V VH3/V3を示し、レーン4は非還元IgG V VH3/V3を示す。

【図7】図7は、ヒトにおける抗C1q抗体のC1q中和活性、及び用量応答形式でのラットCH50溶血アッセイを図示する。図7Aは、ヒトCH50溶血アッセイの結果を図示する。図7Bは、

10

20

30

40

50

ラットCH50溶血アッセイの結果を図示する。「ANN-005」はモノクローナル抗体M1に対応し、「3E2」はキメラM1抗体に対応し、「2B12」は抗体VH1/V 1に対応し、「5H7」は抗体VH3/V 3に対応し、「3F1」は抗体VH3/V 4に対応し、「1D3」は抗体VH4/V 3に対応する。

【図8】図8は、15及び100mg/Kgの単一IV投与でのサルの血清5H7レベルの時間経過を図示する。

【図9】図9は、15及び100mg/Kgの単一IV投与でのサルの血清C1qレベルの時間経過を図示する。図9Aは、JL1-M1アッセイを用いたサルの血清C1qレベルの時間経過を示す。図9Bは、JL1-JL1アッセイを用いたサルの血清C1qレベルの時間経過を示す。

【図10】図10は、15及び100mg/Kgの単一IV投与でのサルの血清溶血の持続的減少を示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

一般技術

本明細書において記載され又は参照される技術及び手法は、当業者に一般的に十分に理解され、従来の方法を用いて通常使用され、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d 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.): PCR 2: 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)に記載されている幅広く利用される方法が挙げられる。

【0033】

定義

本明細書で使用するとき、用語「予防すること」には、個体における特定の疾患、障害又は状態の発生又は再発に対して予防を提供することが含まれる。個体は、特定の疾患、障害若しくは状態に対する素因がある、罹りやすい、又はこのような疾患、障害若しくは状態を発症する危険性があり得るが、該疾患、障害若しくは状態とまだ診断されていない。

【0034】

本明細書で使用するとき、特定の疾患、障害若しくは状態を発症する「危険性がある」個体は、検出可能な疾患若しくは疾患の症状があってもよく又はなくともよく、本明細書に記載されている治療方法の前に検出可能な疾患若しくは疾患の症状を示していてもよく

10

20

30

30

40

50

又は示していなくてもよい。「危険性がある」とは、個体が1つ以上の危険因子を有することを示し、該危険因子は、当該技術分野において公知の特定の疾患、障害又は状態の発症と相關する測定可能なパラメータである。これらの危険因子の1つ以上を有する個体は、これらの危険因子の1つ以上がない個体よりも、特定の疾患、障害又は状態を発症する確率が高い。

【0035】

本明細書で使用するとき、用語「治療」とは、臨床的病理の経過中に治療されている個体の自然経過を変更するために設計された臨床的介入を指す。治療の望ましい効果としては、特定の疾患、障害若しくは状態の進行速度の減少、改善又は病理学的状態の緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。個体は、例えば、特定の疾患、障害又は状態に関連する1つ以上の症状が軽減又は排除される場合、成功的に「治療される」。

10

【0036】

「有効量」とは、所望の治療的又は予防的結果を達成するために必要とされる用量及び期間での少なくとも効果的な量を指す。有効量は、1回以上の投与で提供することができる。

【0037】

「治療有効量」は、特定の疾患、障害又は状態の測定可能な改善を達成するために必要とされる少なくとも最小濃度である。本明細書において、治療有効量は、疾患状態、患者の年齢、性別及び体重、並びに個体において所望の応答を誘発する抗C1q抗体の能力などの因子に応じて変化しうる。治療有効量はまた、抗C1q抗体の任意の毒性又は有害な作用を治療的に有益な効果が上回るものである。

20

【0038】

「慢性的」投与とは、長期間にわたり、初期の治療効果(活性)を維持するように急性様式とは異なり連続的な医薬(単数又は複数)の投与を指す。「間欠」投与とは、中断することなく連続的に行われないが、むしろ本質的には周期的である治療を指す。

【0039】

本明細書で使用するとき、別の化合物又は組成物と「併用した」投与は、同時投与及び/又は異なる時点での投与を含む。併用投与にはまた、同時処方としての投与又は別々の組成物としての投与が含まれ、異なる投与頻度又は間隔で、並びに同じ投与経路又は異なる投与経路を用いることを含む。

30

【0040】

治療、予防又は危険性の低減の対象となる「個体」とは、哺乳動物として分類される任意の動物を指し、例えば、ヒト、家畜及び農場動物、並びに動物園、スポーツ又はペット動物、例えば、イヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、スナネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどが挙げられる。いくつかの実施形態において、個体はヒトである。

【0041】

本明細書で使用するとき、「自己抗体」とは、宿主抗原を認識する任意の抗体を意味する。

【0042】

用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書において「抗体」と互換的に使用される。本明細書において、用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的には、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクタント抗体から形成される多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)及び抗体断片を含む。

40

【0043】

基本的な4本鎖抗体ユニットは、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。 V_H 及び V_L の対は一緒にになって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性について、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照された

50

い。

【0044】

任意の脊椎動物種由来のL鎖を、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(「 κ 」)及びラムダ(「 λ 」)と呼ばれる2つの明確に異なるタイプのうちの1つに割り当てることができる。それらの重鎖(CH)の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラス又はアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには5クラス:IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それぞれ、アルファ(「 α 」)、デルタ(「 δ 」)、イプシロン(「 ϵ 」)、ガンマ(「 γ 」)及びミュー(「 μ 」)と称する重鎖を有する。及びクラスは、CH配列及び機能の相対的にわずかな差異に基づいて、サブクラス(アイソタイプ)にさらに分類され、例えば、ヒトは、以下のサブクラス:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を発現する。免疫グロブリンの様々なクラスのサブユニット構造及び三次元立体配置は周知であり、例えば、Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000)に一般的に記載されている。
10

【0045】

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖で構成される約15,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結され、一方、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖及び軽鎖はまた、規則的に間隔をおいた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン(V_H)、続くいくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)、その他端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられる。
20

【0046】

「単離された」抗体、例えば、本開示の抗C1q抗体は、その生成環境(例えば、天然又は組換え)の成分から同定、分離及び/又は回収された抗体である。いくつかの実施形態において、単離されたポリペプチドは、その生成環境に由来する他の全ての夾雜成分が付随していない。その生成環境に由来する夾雜成分、例えば、トランスフェクトされた組換え細胞から生じるものは、典型的には、抗体の研究、診断的又は治療的使用に干渉する物質であり、酵素、ホルモン及び他のタンパク性又は非タンパク性溶質が含まれ得る。いくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、(1)例えばLowry法によって決定したとき抗体の95重量%を超えるまで、いくつかの実施形態において99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシーケネーター(Spinning cup sequenator)の使用によってN末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度に、又は(3)非還元又は還元条件下でクーマシープルー又は銀染色を用いたSDS-PAGEで均質になるまで精製される。単離された抗体には、組換えT細胞内のインサイチュ抗体が含まれる。これは、該抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分が存在しないためである。しかしながら、通常、単離されたポリペプチド又は抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。
30

【0047】

抗体、例えば、本開示の抗C1q抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「 V_H 」及び「 V_L 」と称することができる。これらのドメインは、一般的に、抗体の最可変部分(同じクラスの他の抗体と比較して)であり、抗原結合部位を含む。
40

【0048】

用語「可変」とは、可変ドメインの一定のセグメントが、本開示の抗C1q抗体などの抗体間で配列に関して広範囲に相違するという事実を指す。 V ドメインは抗原結合を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。しかしながら、可変性は、可変ドメインの全長にわたって均質に分布していない。代わりに、可変性は、軽鎖と重鎖の可変ドメインの両方の超可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに集中する。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及
50

び軽鎖の可変ドメインは、各々4つのFR領域を含み、大部分はベータシート立体配置を採り、3つのHVRによって連結され、それらはベータシート構造を連結するループを形成し、いくつかの場合ではベータシート構造の部分を形成する。各鎖のHVRは、FR領域によって極めて接近して一緒に保持され、他の鎖のHVRとともに抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)を参照されたい)。定常ドメインは、抗原への抗体の結合には直接的には関与しないが、抗体依存性細胞傷害への抗体の参加などの多様なエフェクター機能を示す。

【 0 0 4 9 】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書で使用するとき、実質的に均質な抗体集団から得られる抗体、例えば、本開示の抗C1q抗体を指す。すなわち、該集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に存在する可能性がある突然変異及び/又は翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化)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、ただ1つの抗原部位に指向される。典型的には種々の決定基(エピトープ)に指向される種々の抗体を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ただ1つの決定基に指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養によって合成され、他の免疫グロブリンによる夾雑がないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、いずれかの具体的な方法による抗体の生成を要求すると解されるべきではない。例えば、本開示に従って用いられるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法(例えばKohler and Milstein., Nature, 256:495-97 (1975)、Hongo et al, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995)、Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988)、Hammerling et al, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991)、Marks et al, J. Mol Biol. 222: 581-597 (1992)、Sidhu et al, J. Mol Biol. 338(2): 299-310 (2004)、Lee et al, J. Mol Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)、Fellouse, Proc. Nat'l. Acad. Sci USA 101 (34): 12467-472 (2004)、及びLee et al, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132, (2004)を参照されたい)、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の部分又は全部を有する動物においてヒト又はヒト様抗体を製造する技術(例えば、WO1998/24893、WO1996/34096、WO1996/33735、WO1991/10741、Jakobovits et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci USA 90: 2551 (1993)、Jakobovits et al, Nature 362: 255-258 (1993)、Bruggemann et al, Year in Immunol. 7:33 (1993)、米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号及び第5,661,016号、Marks et al, Bio/Technology 10: 779-783 (1992)、Lonberg et al, Nature 368: 856-859 (1994)、Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)、Fishwild et al, Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996)、Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)、並びにLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, (1995)を参照されたい)を含む多様な技術によって作製できる。

【 0 0 5 0 】

用語「全長抗体」、「インタクト抗体」又は「全抗体」は、抗体断片とは対照的に、実質的に無傷な形態で、本開示の抗C1q抗体などの抗体を指すために互換的に使用される。具体的には、全抗体は、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものを含む。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であってもよい。いくつかの場合において、インタクト抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有することができる。

【 0 0 5 1 】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部分、インタクト抗体の抗原結合領域及び/又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片、ダイアボディ、線

10

20

30

40

50

状抗体(米国特許第5,641,870号、実施例2、Zapata et al, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)を参照されたい)、一本鎖抗体分子及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0052】

本開示の抗C1q抗体などの抗体のパパイン消化は、「Fab」断片又は領域と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片又は領域、及び残留物の「Fc」断片又は領域(容易に結晶化する能力を反映した呼称)を生じる。Fab断片又は領域は、完全なL鎖と併せてH鎖の可変領域ドメイン(V_H)及び1つの重鎖の第1の定常ドメイン(C_H1)からなる。各Fab断片又は領域は、抗原結合に関して一価であり、すなわち、それはただ1つの抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、ただ1つの大きな $F(ab')_2$ 断片又は領域を生じ、それは大ざっぱに、異なる抗原結合活性を有する2つのジスルフィド連結されたFab断片又は領域に対応し、なお抗原を架橋することができる。Fab'断片又は領域は、抗体のヒンジ領域に由来する1つ以上のシステインを含む C_H1 ドメインのカルボキシ末端にいくつかの追加の残基を有するという点でFab断片と異なる。Fab'-SHは、Fab'についての本明細書における呼称であり、定常ドメインのシステイン残基(单数又は複数)が遊離チオール基を保持する。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、もともとFab'断片の間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学的結合物もまた公知である。

【0053】

Fc断片又は領域は、ジスルフィドによって一緒に保持された両H鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列によって決定され、その領域はまたある種の細胞上で見出されるFc受容体(FcR)によって認識される。

【0054】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、しっかりと固定された非共有結合の1つの重鎖及び1つの軽鎖の可変領域ドメインの二量体からなる。これらの折畳みから2つのドメインは、6つの超可変ループを生じ(H鎖及びL鎖からそれぞれ3ループ)、それは、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗原結合特異性を抗体に付与する。しかしながら、ただ1つの可変ドメイン(又は1つの抗原に特異的な3つのHVRのみを含む半分のFv)でも、抗原を認識し、結合する能力を有するが、親和性は完全な結合部位よりも低い。

【0055】

「一本鎖Fv」は、「sFv」又は「scFv」とも略され、1本のポリペプチド鎖に連結されたVH及びVL抗体ドメインを含む抗体断片である。いくつかの実施形態において、sFvポリペプチドはさらに、抗原結合のためにsFvに所望の構造を形成させることができるポリペプチドリンカーを V_H と V_L ドメインの間に含む。sFvの概説については、Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【0056】

本開示の抗C1q抗体などの抗体の「機能的断片」は、インタクト抗体の一部分を含み、一般的には、インタクト抗体の抗原結合領域若しくは可変領域、又は修飾されたFcR結合能力を保持若しくは有する抗体のF領域が含まれる。抗体断片の例には、線状抗体、一本鎖抗体分子及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0057】

用語「ダイアボディ」は、Vドメインの鎖内ではなく鎖間の対形成が達成されるように、それによって二価断片、すなわち、2つの抗原結合部位を有する断片を生じるように、 V_H と V_L ドメインの間に短いリンカー(約5~10残基)を有するsFv断片(先行する段落を参照されたい)を構築することによって調製された小さな抗体断片を指す。二重特異性ダイアボディは、2つの「クロスオーバー」sFv断片のヘテロダイマーであり、2つの抗体の V_H 及び V_L ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、EP404,097、W093/11161、Hollinger et al, *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* 90: 6444-48 (1993)に非常に詳細に記載されている。

10

20

30

40

50

【0058】

本明細書で使用するとき、「キメラ抗体」は、重鎖及び/又は軽鎖の一部分が、特定の種に由来する又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であり、一方、鎖(単数又は複数)の残余部分は、別の種に由来する又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である本開示の抗C1q抗体などの抗体(免疫グロブリン)、並びに所望の生物学的活性を示す限り、このような抗体の断片を指す(米国特許第4,816,567号、Morrison et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81: 6851-55 (1984))。本明細書において対象とするキメラ抗体は、PRIMATIZED(登録商標)抗体を含み、該抗体の抗原結合領域は、例えば、対象とする抗原を用いてマカクザルを免疫することによって產生される抗体由来である。本明細書で使用するとき、「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットとして用いられる。10

【0059】

本開示の抗C1q抗体などの非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)であり、レシピエントのHVR由来の残基が、所望の特異性、親和性及び/又は能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)、例えば、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類のHVR由来の残基によって置き換えられる。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体及びドナー抗体で見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は、結合親和性などの抗体の性能をさらに洗練するために実施され得る。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含み、超可変ループの全部又は実質的に全部が、非ヒト免疫グロブリン配列のものと対応し、FR領域の全部又は実質的に全部が、ヒト免疫グロブリン配列のものであるが、FR領域は、抗体の性能、例えば、結合親和性、異性化、免疫原性などを改善する個々のFR残基の1つ以上の置換を含むことができる。FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は、典型的には、H鎖では6個以下であり、L鎖では3個以下である。ヒト化抗体はまた、場合により、免疫グロブリブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分を含む。さらなる詳細については、例えば、Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986)、Riechmann et al, Nature 332: 323-329 (1988)及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照されたい。また、例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998)、Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995)、Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994)、並びに米国特許第6,982,321号及び第7,087,409号を参照されたい。2030

【0060】

「ヒト抗体」は、ヒトによって產生された、本開示の抗C1q抗体などの抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するヒト抗体、及び/又は本明細書に開示されるヒト抗体を作製するための技術のいずれかを用いて作製されたヒト抗体である。このヒト抗体の定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該技術分野において公知の多様な技術を用いて製造することができる。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)、Marks et al, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)。さらにヒトモノクローナル抗体の調製には、Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boerner et al, J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)に記載された方法が利用できる。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してこのような抗体を產生するように修飾されているが、その内因性遺伝子座は不能にされているトランスジェニック動物、例えば、免疫ゼノマウスに抗原を投与することによって調製できる(例えば、XENOMOUSE(商標)技術に関しては米国特許第6,075,181号及び第6,150,584号を参照されたい)。さらに、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体に関しては、例えば、Li et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)を参照されたい。4050

【0061】

用語「超可変領域」、「HVR」又は「HV」は、本明細書で使用するとき、配列が超可変である及び/又は構造的に規定されたループを形成する抗体の可変ドメイン領域、例えば、本開示の抗C1q抗体の可変ドメイン領域を指す。一般的に、抗体は、6つのHVRを含み、3つはVHにあり(H1、H2、H3)、3つはVLにある(L1、L2、L3)。天然の抗体では、H3及びL3は6つのHVRで最大の多様性を示し、特に、H3は抗体に精密な特異性を付与する上で固有の役割を果たすと考えられる。例えば、Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000)、Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ (2003))を参照されたい。実際に、天然に存在するラクダ科の重鎖のみからなる抗体は、軽鎖の非存在下で機能し、安定である。例えば、Hamers-Casterman et al., *Nature* 363: 446-448 (1993)及びSheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996)を参照されたい。

【0062】

いくつかのHVRの範囲決定が用いられ、本明細書に包含される。Kabatの相補性決定領域(CDR)であるHVRは配列可変性に基づき、最も一般的に用いられている(Kabat et al.、上述)。Chothiaは、むしろ構造性ループの配置に言及する(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987))。AbM HVRは、Kabat CDRとChothia構造性ループの折衷案を提示し、オックスフォードモレキュラー(Oxford Molecular)のAbM抗体モデリングソフトウェアで用いられている。「接触」HVRは、利用可能な複合結晶構造の分析に基づいている。これらHVRの各々の残基を下記に記す。

【0063】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 番号付け)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 番号付け)	
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	30
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

【0064】

HVRは以下の通りの「伸長HVR (extended HVR)」を含むことができる: VLにおいて24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)、並びにVHにおいて26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102又は95-102(H3)。可変ドメイン残基は、これらの伸長HVRの定義の各々についてKabat et al.(上述)に従って番号付けされる。

【0065】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書で定義されるHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0066】

語句「Kabatの可変ドメイン残基の番号付け」又は「Kabatのアミノ酸の位置の番号付け」及びそれらの変型は、抗体の編集に関して重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインについて用いられるKabat et al.(上述)の番号付与システムを指す。この番号付与システムを用いると、実際の直線的なアミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVRにおける短縮又は挿入に対応してアミノ酸の減少又は付加を含むことができる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後ろに1アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)及び重鎖FR残基82の後ろに挿入残基(例えば、Kabatによる残基82a、82b及び82cなど)を含むことができる。残基のKabat番号付与は、Kabat番号付与が実施された「標準」配列と所与の抗体の配列の相同性 50

領域におけるアラインメントによって該抗体について決定することができる。

【0067】

Kabat番号付与システムは、一般的に、可変ドメインにおける残基(軽鎖の残基1-107程度及び重鎖の残基1-113程度)に言及する場合に使用される(例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。「EU番号付与システム」又は「EUインデックス」は、一般的に、免疫グロブリン重鎖定常領域における残基に言及するときに使用される(例えば、Kabat et al.(上述)において報告されているEUインデックス)。「KabatにおけるようなEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付与を指す。本明細書において他に記述がなければ、抗体の可変ドメインにおける残基番号への言及は、Kabat番号付与システムによる残基番号付与を意味する。本明細書において他に記述がなければ、抗体の定常ドメインにおける残基番号への言及は、EU番号付与システムによる残基番号付与を意味する(例えば、米国特許公開第2010-280227号を参照されたい)。10

【0068】

「アクセプターヒトフレームワーク」は、本明細書で使用するとき、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク由来のVL又はVH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。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又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、同じアミノ酸配列を含んでもよく、又は既存のアミノ酸配列変化を含んでもよい。いくつかの実施形態において、既存のアミノ酸変化の数は、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下又は2個以下である。いくつかの実施形態において、既存のアミノ酸変化がVHに存在する場合、それらの変化は、位置71H、73H及び78Hのほんの3つ、2つ又は1つで起こり、例えば、それらの位置でのアミノ酸残基は71A、73T及び/又は78Aであってもよい。一実施形態において、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。20

【0069】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンのVL又はVHフレームワーク配列の選択における最も一般的に存在するアミノ酸残基を示すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンのVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般的に、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)におけるようなサブグループである。VLについての例には、Kabat et al.(上述)におけるようなサブグループであり得るカッパI、カッパII、カッパIII又はカッパIVが含まれ得る。さらに、VHについては、サブグループは、Kabat et al.(上述)におけるようなサブグループI、サブグループII又はサブグループIIIであり得る。30

【0070】

例えば、本開示の抗C1q抗体の特定の位置の「アミノ酸修飾」は、特定の残基の置換若しくは欠失、又は特定の残基に隣接する少なくとも1つのアミノ酸残基の挿入を指す。特定の残基に「隣接する」挿入は、その1つ又は2つの残基内の挿入を意味する。挿入は、特定の残基のN末端側又はC末端側であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書ではアミノ酸修飾は置換である。40

【0071】

本開示の抗C1q抗体などの「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のHVRにおいて1つ以上の変更を有する抗体であり、該変更は、そのような変更(単数又は複数)をもたない親抗体と比較して、抗原に対する該抗体の親和性の改善をもたらす。一実施形態において、親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル親和性又はピコモル親和性さえ有する。親和性成熟抗体は、当該技術分野において公知の手法によって製造される。例えば、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和性50

成熟を記載している。HVR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、例えば、Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci USA 91:3809-3813 (1994)、Schier et al. Gene 169:147-155 (1995)、Yalton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)、Jackson et al, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)及びHawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に記載されている。

【0072】

本明細書で使用するとき、用語「特異的に認識する」又は「特異的に結合する」とは、測定可能であり、再現性を有する相互作用、例えば、標的と、本開示の抗C1q抗体などの抗体との間の引力又は結合を指し、生物学的分子を含む不均質な分子集団の存在下で該標的の存在を決定できる。例えば、標的又はエピトープと特異的に又は優先的に結合する抗体、例えば、本開示の抗C1q抗体は、それが他の標的又は標的の他のエピトープと結合するよりもはるかに高い親和性、結合性(avidity)で、より迅速に及び/又ははるかに長い時間、この標的又はエピトープと結合する抗体である。また、この定義を読むことによって、例えば、第1の標的に特異的又は優先的に結合する抗体(又は部分)は、第2の標的に特異的に又は優先的に結合してもよく又は結合しなくてもよいことが理解される。したがって、「特異的な結合」又は「優先的な結合」は、必ずしも排他的な結合を必要としない(ただし、排他的な結合を含んでもよい)。標的に特異的に結合する抗体は、少なくとも約 10^3 M⁻¹若しくは 10^4 M⁻¹、時々約 10^5 M⁻¹若しくは 10^6 M⁻¹、他の例においては約 10^6 M⁻¹若しくは 10^7 M⁻¹、約 10^8 M⁻¹～ 10^9 M⁻¹、又は約 10^{10} M⁻¹～ 10^{11} M⁻¹あるいはそれを超える結合定数を有してもよい。様々なイムノアッセイフォーマットを用いて、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択することができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイを慣用的に用いて、タンパク質と特異的に免疫反応するモノクローナル抗体を選択する。特異的な免疫反応性を決定するために用いることができるイムノアッセイフォーマット及び条件の説明については、例えば、Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照されたい。

【0073】

本明細書で使用するとき、補体因子C1qなどの補体タンパク質と第2のタンパク質の間の「相互作用」は、限定されないが、タンパク質-タンパク質相互作用、物理的相互作用、化学的相互作用、結合、共有結合及びイオン結合を包含する。本明細書で使用するとき、抗体は、抗体が2つのタンパク質間の相互作用を破壊し、減少し、又は完全に排除するとき、2つのタンパク質間の「相互作用を阻害する」。本開示の抗体又はその断片は、該抗体又はその断片が2つのタンパク質のうちの1つに結合するとき、2つのタンパク質間の「相互作用を阻害する」。

【0074】

「ブロッキング」抗体、「アンタゴニスト」抗体、「阻害」抗体又は「中和」抗体は、該抗体が結合する抗原の1つ以上の生物学的活性、例えば、1つ以上のタンパク質との相互作用を阻害又は低減する、本開示の抗C1q抗体などの抗体である。いくつかの実施形態において、ブロッキング抗体、アンタゴニスト抗体、阻害抗体又は「中和」抗体は、1つ以上の生物学的活性又は抗原の相互作用を実質的に又は完全に阻害する。

【0075】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異Fc領域)に起因するそれらの生物学的活性を指し、抗体アイソタイプとともに変動する。

【0076】

本明細書において、用語「Fc領域」は、天然配列Fc領域と変異Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するために用いられる。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変動する可能性があるが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、Cys226位のアミノ酸残基又はPro230からそのカルボキシル末端までの一続きの長さと規定される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付与システムによる残基447)は、例えば、抗体の製造若しくは精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換えにより操作することによって除去することができる。したがって、インタクト抗体の組成は、全てのK447残基が除去された抗体集団、K447

10

20

30

40

50

残基が除去されていない抗体集団、及びK447残基をもつ抗体及びもたない抗体の混合物を有する抗体集団を含むことができる。本開示の抗体で使用するために適切な天然配列のFc領域としては、ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が含まれる。

【0077】

「天然配列のFc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。天然配列のヒトFc領域には、天然配列のヒトIgG1 Fc領域(非A及びAアロタイプ)、天然配列のヒトIgG2 Fc領域、天然配列のヒトIgG3 Fc領域、及び天然配列のヒトIgG4 Fc領域並びに天然に存在するそれらの変異体が含まれる。

【0078】

「変異Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって、天然配列のFc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、変異Fc領域は、1つ以上のアミノ酸置換において異なる。いくつかの実施形態において、変異Fc領域は、天然配列のFc領域又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、天然配列のFc領域又は親ポリペプチドのFc領域において、約1個～約10個のアミノ酸置換、及びいくつかの実施形態において約1個～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書において、変異Fc領域は、いくつかの実施形態において、天然配列のFc領域及び/又は親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%相同性を有し、いくつかの実施形態において、それと少なくとも約90%相同性、いくつかの実施形態において、それと少なくとも約95%相同性を有する。

【0079】

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域と結合する受容体を表す。いくつかの実施形態において、FcRは、天然配列のヒトFcRである。さらに、いくつかの実施形態において、FcRは、IgG抗体と結合するもの(ガンマ受容体)であり、Fc RI、Fc RII及びFc RIIIサブクラスの受容体を含み、これには対立遺伝子変異体及びこれらの受容体の別のスプライス型を含む。Fc RII受容体はFc RIIA(「活性化受容体」)及びFc RIIB(「阻害性受容体」)を含み、それらは同様のアミノ酸配列を有し、主としてその細胞質ドメインにおいて相違する。活性化受容体Fc RIIAは、イムノレセプターチロシン系活性化モチーフ(「ITAM」)をその細胞質ドメインに含む。阻害性受容体Fc RIIBは、イムノレセプターチロシン系阻害モチーフ(「ITIM」)をその細胞質ドメインに含む。(例えば、M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)を参照されたい)。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)、Capel et al, Immunomethods 4: 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。他のFcRは、将来同定されるものを含み、本明細書において用語「FcR」に包含される。また、FcRは、抗体の血清半減期を増加させ得る。

【0080】

FcRnとのインビボでの結合及びヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス若しくはトランスフェクトされたヒト細胞株で、又は変異Fc領域を有するポリペプチドを投与した靈長類でアッセイすることができる。WO2004/42072(Presta)は、FcRとの結合が改善された又は低下した抗体変異体を記載している。例えば、Shields et al, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照されたい。

【0081】

用語「 k_{on} 」は、本明細書で使用するとき、抗原への抗体の結合に関する速度定数を指すことが意図される。

【0082】

用語「 k_{off} 」は、本明細書で使用するとき、抗体/抗原複合体からの抗体の解離の速度定数を指すことが意図される。

【0083】

用語「 K_D 」は、本明細書で使用するとき、抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を指すことが意図される。

10

20

30

40

50

【0084】

本明細書で使用するとき、ペプチド、ポリペプチド又は抗体の配列に関して「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」及び「相同性」は、配列をアラインさせ、必要な場合にギャップを導入して最大のパーセント配列同一性を達成した後、配列同一性の部分として保存的置換を一切考慮しないで、該特定のペプチド又はポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを指す。パーセントアミノ酸配列同一性の決定を目的とするアラインメントは、当該技術分野の技術範囲内である多様な方法、例えば、公開されているコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMEGALIGN(商標)(DNASTAR)ソフトウェアを用いて達成できる。当業者は、アラインメントを測定するために適切なパラメータを決定することができ、それには、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、当該技術分野で公知の任意のアルゴリズムが含まれる。

10

【0085】

「単離された」分子又は細胞は、それが生成された環境において元来関連付けられる少なくとも1つの夾雑分子又は細胞から同定及び分離される分子又は細胞である。いくつかの実施形態において、単離された分子又は細胞は、生成環境に関連する全ての成分が付随していない。単離された分子又は細胞は、それが天然に見出される形態又は設定以外の形態にある。したがって、単離された分子は、細胞中に天然に存在する分子とは区別され、単離された細胞は、組織、器官又は個体において天然に存在する細胞と区別される。いくつかの実施形態において、単離された分子は、本開示の抗C1q抗体である。他の実施形態において、単離された細胞は、本発明の抗C1q抗体を産生する宿主細胞又はハイブリドーマ細胞である。

20

【0086】

本開示の抗C1q抗体などの抗体をコードする「単離された」核酸分子は、同定されている核酸分子であって、該核酸分子が生成された環境で通常付随する少なくとも1つの夾雑核酸分子から分離されている核酸分子である。いくつかの実施形態において、単離された核酸は、生成環境に関連する全ての成分が付随していない。本明細書のポリペプチド及び抗体をコードする単離された核酸分子は、それが天然に見出される形態又は設定以外の形態にある。したがって、単離された核酸分子は、細胞内に天然に存在する本明細書のポリペプチド及び抗体をコードする核酸と区別される。

30

【0087】

用語「ベクター」は、本明細書で使用するとき、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すことが意図される。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは、その中に付加的なDNAセグメントを連結させ得る環状の二本鎖DNAを指す。別のタイプのベクターはファージベクターである。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、この場合、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノム中に連結させることができる。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞内に導入されたときに宿主細胞のゲノム中に組み込まれることができ、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能的に連結されている遺伝子の発現を導くことができる。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」又は単に「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるため、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用することができる。

40

【0088】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、本明細書で互換的に使用するとき、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド若しくは塩基、及び/又はそれ

50

らの類似体、あるいはDNA若しくはRNAポリメラーゼによって又は合成反応によってポリマーに取り込ませることができる任意の基質であることができる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体などの修飾されたヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後に与えることができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、標識とのコンジュゲーションなどの、合成後になされる修飾(単数又は複数)を含むことができる。他の修飾の種類には、例えば、「キャッシング」、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上を類似体に置換すること、例えば、非荷電結合(例えば、ホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど)を有するもの及び荷電結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を有するものなどのヌクレオチド間修飾、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ(poly)-L-リジンなど)などのペンドント部分を含有するもの、インターラーカー(例えば、アクリジン、ソラレンなど)を有するもの、キレート剤(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された連結を有するもの(例えば、アルファアノマー核酸など)、並びにポリヌクレオチド(単数又は複数)の非修飾形態が含まれる。さらに、糖の中に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかを、例えば、ホスホン酸基、リン酸基によって置き換える、標準的な保護基によって保護する、若しくはさらなるヌクレオチドとのさらなる連結を調製するために活性化することができる、又は固体若しくは半固体の支持体にコンジュゲートさせることができる。5'及び3'末端のOHは、リン酸化するか、又はアミン若しくは1~20個の炭素原子の有機キャップ基部分で置換することができる。他のヒドロキシルを標準的な保護基へと誘導体化することもできる。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル-、2'-フルオロ-、又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、-アノマー糖、アラビノース、キシロース、又はリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状類似体、及びメチルリボシドなどの塩基性ヌクレオシド類似体を含む、当該技術分野において一般に知られているリボース又はデオキシリボース糖の類似形態を含有することもできる。1つ以上のリン酸ジエステル結合を代替の連結基によって置き換えることができる。これらの代替の連結基には、限定されないが、リン酸が、P(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO、又はCH₂(「ホルムアセタール」)によって置き換えられている実施形態が含まれ、ここで、各々のR又はR'は、独立して、H、又はエーテル(-O-)結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、若しくはアラルジルを場合によって含有する置換若しくは非置換アルキル(1~20個のC)である。ポリヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。前述の説明は、RNA及びDNAを含む、本明細書で言及された全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0089】

「宿主細胞」は、ポリヌクレオチドインサートの組み込み用のベクター(単数又は複数)のレシピエントとすることができます又はそれであった個々の細胞若しくは細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、子孫は、天然の、偶発的な又は意図的な突然変異のために、もとの親細胞と必ずしも完全に同一(形態構造において又はゲノムDNA相補体において)でなくてもよい。宿主細胞は、本開示のポリヌクレオチド(単数又は複数)をインピボでトランスフェクトされた細胞を含む。

【0090】

「担体」は、本明細書で使用するとき、薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を含み、採用される用量及び濃度でそれに曝露される細胞又は哺乳動物に対して毒性を示さない。多くの場合、生理学的に許容される担体はpH緩衝水溶液である。生理学的に許容される担体の例には、緩衝剤、例えば、リン酸、クエン酸及び他の有機酸、酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸、低分子量(約10残基未満)ポリペプチド、タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン、親水性ポリマー、例えば、ポリビニルビロリドン、アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリ

ジン、単糖類、二糖類及び他の糖質、例えば、グルコース、マンノース又はデキストリン、キレート剤、例えば、EDTA、糖アルコール、例えば、マンニトール又はソルビトール、塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)及びPLURONICS(商標)が含まれる。

【0091】

用語「約」は、本明細書で使用するとき、本技術分野における当業者に容易に知られる各値に関する通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」の付いたある値又はパラメータへの言及は、その値又はパラメータそれ自体を対象とする実施形態を含む(及び記載する)。

【0092】

本明細書で使用するとき、及び添付の特許請求の範囲において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈が明確にその他を指示しない限り、複数への言及を含む。例えば、「抗体」への言及は、モル量などの1つから多数の抗体への言及であり、当業者に知られているその同等物を含む、などが挙げられる。

【0093】

本明細書に記載されている本開示の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」及び「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0094】

概要

本開示は、ヒト化抗C1q抗体及びその使用を提供する。本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示のC1qタンパク質に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qを中和する抗体である。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、C1複合体に結合することができる。

【0095】

特定の態様において、本開示は、C1qタンパク質に特異的に結合するヒト化抗体であって、抗体が重鎖可変領域及びヒト重鎖定常領域を含み、重鎖可変領域がFab領域を含み、重鎖定常領域がFc領域を含み、Fab領域がC1qタンパク質に特異的に結合し、Fc領域がC1qタンパク質に結合できない、前記抗体を提供する。

【0096】

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0097】

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖可変ドメインが配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0098】

特定の態様において、本開示は、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0099】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、C1qの生物学的活性を中和する。ヒト化抗C1q抗体の使用としては、限定するものではないが、例えば補体因子1(CF1

10

20

30

40

50

)依存性病理学的シナプス喪失に関連する神経変性障害を有する個体における補体因子C1qの検出が挙げられる。ヒト化抗C1q抗体のさらなる非限定的な使用としては、例えば自己抗体によって古典的補体経路が活性化される場合の補体活性化の古典的経路の阻害が挙げられる。ヒト化抗C1q抗体のさらなる非限定的な使用としては、C1q等の補体因子の高められた発現に関連する、又は補体経路の活性化と関連する障害の診断及び治療が挙げられる。かかる障害としては、限定するものではないが、自己免疫障害、炎症性障害、及び神経変性障害、例えばシナプスの喪失と関連する神経変性障害が挙げられる。

【0100】

他の態様では、本開示は、本開示の抗体をコードする単離された核酸分子を提供する。

【0101】

本開示は、本開示の抗体をコードする単離された核酸分子を含む、単離された宿主細胞も提供する。さらに、薬学的に許容される担体と共に抗C1q抗体、例えば本開示のヒト化C1q中和抗体を含む医薬組成物が提供される。本開示は、本明細書に開示された方法のいずれかにおける使用のためのヒト化抗C1q抗体を含むキットも提供する。

【0102】

本開示はさらに、そのような治療を必要とする個体において神経変性疾患又は自己免疫疾患を治療又は予防するために、神経変性疾患又は自己免疫疾患を有する個体においてシナプスを検出するために、及び生物学的試料においてシナプスを検出するために、本開示のヒト化抗C1q抗体(例えば、本開示のヒト化C1q中和抗体)を使用する方法を提供する。本開示は、本開示のヒト化抗C1q抗体(例えば、本開示のヒト化C1q中和抗体)を含むキットも提供する。

【0103】

補体タンパク質

本開示の抗体は、補体因子C1q及び/又は古典的補体活性化経路のC1複合体中のC1qを特異的に認識する。認識される補体因子は、限定されないが、補体系を有する任意の生物に由来してもよく、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラクダ、ヒツジ、ヤギ又はブタなどの任意の哺乳類生物が挙げられる。

【0104】

本明細書で使用するとき、「C1複合体」は、限定されないが、1つのC1qタンパク質、2つのC1rタンパク質及び2つのC1sタンパク質(例えば、C1qr²s²)を含むことができるタンパク質複合体を指す。

【0105】

本明細書で使用するとき、「補体因子C1q」は、野生型配列と天然に存在する変異配列の両方を指す。

【0106】

本開示の抗体によって認識される補体因子C1qの非限定的な例は、3つのポリペプチド鎖A、B及びCを含むヒトC1qである：

C1q、鎖A(ホモサピエンス)、アクセッション番号タンパク質データベース:NP_057075.1、GenBank番号:NM_015991:

>gi|7705753|ref|NP_057075.1|補体C1qサブコンポーネントサブユニットA前駆体[ホモサピエンス]

MEGPRGWLVCVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRRGRPGLKGEQGEPGAPGIRTGIQGLKGDQGEPGPSGNPGKVGYPGPGSGPLGARGIPGIKGPKGSPGNIKDQPRPAFSAIRRNPMPGGNNVVIFDTVITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYYYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGFLQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHIFYQGSEADSVFSGFLIFPSA(配列番号9)

C1q、鎖B(ホモサピエンス)、アクセッション番号タンパク質データベース:NP_000482.3、GenBank番号:NM_000491.3:

>gi|87298828|ref|NP_000482.3|補体C1qサブコンポーネントサブユニットB前駆体[ホモサピエンス]

MMMKIPWGSIPVLMLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIKGEKGLPGLAGDHGEFGEKGDP

10

20

30

40

50

G1PGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDHVITNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYYFTYHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA (配列番号10)

C1q、鎖C(ホモサピエンス)、アクセッション番号タンパク質データベース:NP_001107573.1、GenBank番号:NM_001114101.1:

>gi|166235903|ref|NP_001107573.1|補体C1qサブコンポーネントサブユニットC前駆体[ホモサピエンス]

MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLLRLRGQANTGCYGI PGMPGLPGAPGKDGYDGLPGPKGEPEGIPAIPGIRGPKGQKGEPEGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPEEGRYKQKFQSFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDYYDMVGIQGSDSVFSGFLLFPD (配列番号11)

10

【0107】

したがって、本開示のヒト化抗C1q抗体は、C1qタンパク質のポリペプチド鎖A、ポリペプチド鎖B及び/又はポリペプチド鎖Cに結合することができる。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ヒトC1qのポリペプチド鎖A、ポリペプチド鎖B及び/若しくはポリペプチド鎖C、又はマウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラクダ、ヒツジ、ヤギ又はブタのC1qなどのそのホモログに結合する。

【0108】

ヒト化抗C1q抗体

本開示のヒト化抗体は、古典的補体経路のC1複合体中の補体因子C1q及び/又はC1qタンパク質に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体はヒトC1qに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体はヒト及びマウスのC1qに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体はラットC1qに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、ヒトC1q、マウスC1q及びラットC1qに特異的に結合する。

20

【0109】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗C1q抗体は、Fab領域を含む重鎖可変領域を含み、Fc領域を含む重鎖定常領域を含み、Fab領域が本開示のC1qタンパク質に特異的に結合するが、Fc領域がC1qタンパク質に結合できない。いくつかの実施形態では、Fc領域はヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4に由来する。いくつかの実施形態では、Fc領域は補体活性を誘導できず、及び/又は抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導できない。いくつかの実施形態では、Fc領域は、限定するものではないがアミノ酸置換をはじめとする一以上の改変を含む。特定の実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体のFc領域が、Kabat番号付け法に従う248位又はKabat番号付け法に従う248位に対応する位置に、及び/又はKabat番号付け法に従う241位又はKabat番号付け法に従う241位に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、248位又は248位に対応する位置のアミノ酸置換が、Fc領域のFc受容体との相互作用を阻害する。いくつかの実施形態では、248位又は248位に対応する位置のアミノ酸置換が、ロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、241位又は241位に対応する位置のアミノ酸置換が、抗体の腕部のスイッチングを妨げる。いくつかの実施形態では、241位又は241位に対応する位置のアミノ酸置換が、セリンからプロリンへのアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体のFc領域は、配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体は、補体因子C1qの生物学的活性を中和する。いくつかの実施形態において、抗体は、補体因子C1qとC1r若しくはC1sなどの他の補体因子との間、又はC1qと自己抗体などの抗体との間の相互作用を阻害する。本明細書に開示されるように、本開示の自己抗体には、限定されないが、宿主抗原を認識し、補体活性化の古典的経路を活性化する抗体が含まれる。この活性化プロセスの第1のステ

40

50

ップにおいて、補体因子C1qは、自己抗体-自己抗原の免疫複合体に結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、補体因子C1qと非補体因子の間の相互作用を阻害する。非補体因子は、ホスファチジルセリン、ペントラキシン-3、C反応性タンパク質(CRP)、球状C1q受容体(gC1qR)、補体受容体1(CR1)、¹⁰-アミロイド及びカルレティキュリンを含むことができる。いくつかの実施形態において、抗体は、古典的補体活性化経路を阻害する。特定の実施形態において、抗体は代替経路をさらに阻害する。いくつかの実施形態において、抗体は、自己抗体依存性及び補体依存性細胞傷害(CDC)を阻害する。いくつかの実施形態において、抗体は、補体依存性の細胞媒介性細胞傷害(CDCC)を阻害する。いくつかの実施形態において、抗体は、B細胞の抗体産生、樹状細胞成熟、T細胞増殖、サイトカイン産生又はミクログリア活性化を阻害する。いくつかの実施形態において、抗体はアルサス反応を阻害する。いくつかの実施形態において、抗体は、シナプス又は神経終末の食作用を阻害する。いくつかの実施形態において、抗体は、補体受容体3(CR3/C3)を発現する細胞の活性化を阻害する。

【 0 1 1 1 】

本開示の抗体の機能的特性、例えば、抗原に対する解離定数、タンパク質-タンパク質相互作用(例えば、C1q-自己抗体の相互作用)の阻害、自己抗体依存性及び補体依存性細胞傷害(CDC)の阻害、補体依存性の細胞媒介性細胞傷害(CDCC)の阻害又は病変形成は、限定されないが、インピトロ、エクスピボ又はインピボ実験で測定され得る。

【 0 1 1 2 】

C1qに対するヒト化抗C1q抗体の解離定数(K_D)は、125nM未満、120nM未満、115nM未満、²⁰ 10nM未満、100nM未満、90nM未満、80nM未満、70nM未満、60nM未満、50nM未満、40nM未満、30nM未満、20nM未満、10nM未満、9nM未満、8nM未満、7nM未満、6nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満、1nM未満、0.5nM未満、0.1nM未満、0.05nM未満、0.01nM未満又は0.005nM未満であってもよい。いくつかの実施形態において、解離定数は、約125nM未満～約5pM未満の範囲である。

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体のヒトC1qに対する解離定数は約10pM～約5pM未満である。いくつかの実施形態において、ヒトC1qに対する解離定数は、約10pM未満、約9.9pM未満、約9.8pM未満、約9.7pM未満、約9.6pM未満、約9.5pM未満、約9.4pM未満、約9.3pM未満、約9.2pM未満、約9.1pM未満、約9pM未満、約8.9pM未満、約8.8pM未満、約8.7pM未満、約8.6pM未満、約8.5pM未満、約8.4pM未満、約8.3pM未満、約8.2pM未満、約8.1pM未満、約8pM未満、約7.9pM未満、約7.8pM未満、約7.7pM未満、約7.6pM未満、約7.5pM未満、約7.4pM未満、約7.3pM未満、約7.2pM未満、約7.1pM未満、約7pM未満、約6.9pM未満、約6.8pM未満、約6.7pM未満、約6.6pM未満、約6.5pM未満、約6.4pM未満、約6.3pM未満、約6.2pM未満、約6.1pM未満、約6pM未満、約5.9pM未満、約5.8pM未満、約5.7pM未満、約5.6pM未満、約5.5pM未満、約5.4pM未満、約5.3pM未満、約5.2pM未満、約5.1pM、又は約5pM未満である。

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体のマウスC1qに対する解離定数は、125nM未満、120nM未満、115nM未満、110nM未満、100nM未満、90nM未満、80nM未満、⁴⁰ 70nM未満、60nM未満、50nM未満、40nM未満、30nM未満、20nM未満、10nM未満、9nM未満、8nM未満、7nM未満、6nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満、1nM未満、0.5nM未満、0.1nM未満、又は0.05nM未満である。

【 0 1 1 5 】

C1qの以外の抗原に対する抗体の解離定数は、C1qに対する解離定数より少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1,000倍、少なくとも10,000倍又は少なくとも100,000倍高くてもよい。例えば、本開示のヒト化C1q抗体の解離定数は、C1qに対するよりもC1sに対して少なくとも1,000倍高くてもよい。解離定数は、任意の生化学的又は生物物理学的技術、例えば、ELISA、表面プラズモン共鳴(SPR)、バイオレイヤー干渉法(例えば、ForteBioによるオクテットシステムを参照されたい)、等温滴定熱量測定(ITC)⁵⁰

、示差走査熱量測定(DSC)、円偏光二色性(CD)、トップフロー分析、及び比色又は蛍光タンパク質融解分析を含む任意の分析技術を介して決定され得る。C1qに対する抗C1q抗体の解離定数(K_D)は、例えば、全長抗体又はFab断片などの抗体断片を用いて決定されてもよい。

【 0 1 1 6 】

C1qへのヒト化抗体の結合親和性を決定する1つの例示的な方法は、抗体の一機能性Fab断片の結合親和性を測定することによる。一機能性Fab断片を得るために、抗体(例えば、IgG)をパバインで切断する又は組換的に発現させることができる。抗体のFab断片の親和性は、HBS-EP泳動緩衝液(0.01M HEPES、pH7.4、0.15 NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v サーファクタントP20)を用いた、予め固定化されたストレプトアビジンセンサーチップ(SA)を備えた表面プラズモン共鳴(Biacore 3000(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)システム、Biacore(商標)、INC、Piscataway NJ)によって決定することができる。ビオチン化されたヒトC1q(又は任意の他のC1q)は、HBS-EP緩衝液中で0.5 μg/mL未満の濃度に希釈され、可変の接触時間を用いて個々のチップチャネルにわたって注入され、抗原密度の2つの範囲、詳細な動態研究については50～200応答単位(RU)又はスクリーニングアッセイについては800～1,000RUを達成することができる。再生研究は、200回を超える注入に対してチップ上のC1qの活性を維持しながら、25% v/vエタノール中の25mM NaOHが結合したFabを効果的に除去することを示した。典型的には、精製されたFab試料の連続希釈物(0.1～10倍のスペニング濃度、推定 K_D)を1分間、100 μL/分で注入し、最大2時間の解離時間を容認する。Fabタンパク質の濃度は、標準として既知の濃度のFab(アミノ酸分析によって決定される)を用いて、ELISA及び/又はSDS-PAGE電気泳動によって決定される。動力学的結合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})は、BIA評価プログラムを用いて、1:1ラングミュア結合モデル(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110)に全体的にデータを当てはめることによって同時に得られる。平衡解離定数(K_D)値は k_{off}/k_{on} として計算される。このプロトコールは、ヒトC1q、別の哺乳動物のC1q(例えば、マウスC1q、ラットC1q、靈長類C1q)、並びに異なる形態のC1qを含む任意のC1qへの抗体の結合親和性を決定する際の使用に適している。抗体の結合親和性は、一般に、25 で測定されるが、37 で測定することもできる。

【 0 1 1 7 】

本開示のヒト化抗体は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラクダ、ヒツジ、ヤギ、又はブタなどの任意の哺乳類生物を含む、補体系を有する任意の生物由来のC1q抗原に結合することができる。いくつかの実施形態において、抗C1q抗体は、ヒトC1q上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗C1q抗体は、ヒト及びマウスの両方のC1q上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗C1q抗体は、ヒト、マウス及びラットのC1q上のエピトープに特異的に結合する。

【 0 1 1 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書では、本開示の別の抗体によって結合されたC1qエピトープと同じである又は重複するC1qのエピトープに結合するヒト化抗C1q抗体が提供される。特定の実施形態において、本明細書では、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生される抗C1q抗体M1によって結合されたC1qエピトープと同じである又は重複するC1qのエピトープに結合するヒト化抗C1q抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qへの結合に関して、本開示の別の抗体と競合する。特定の実施形態において、抗C1q抗体は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生される抗C1q抗体M1又はその抗原結合断片と競合する。

【 0 1 1 9 】

ヒト化抗C1q抗体がどのC1qエピトープが結合するかを決定し、又は2つの抗体が同じ若しくは重複するエピトープに結合するかどうかを決定するために使用され得る方法としては、限定されないが、X線結晶学、NMR分光法、アラニンスキャニング突然変異誘発、重複

10

20

30

40

50

するC1q配列を有するC1q由来のペプチドを含むペプチドライブラーのスクリーニング、及び競合アッセイが挙げられ得る。競合アッセイは、2つの抗体が同一若しくは立体的に重複するエピトープを認識することによって同じエピトープに結合するかどうか、又は1つの抗体が抗原への別の抗体の結合を競合的に阻害するかどうかを決定するのに特に有用である。これらのアッセイは、当該技術分野において公知である。典型的には、抗原又は抗原を発現する細胞をマルチウェルプレートに固定し、標識抗体の結合をブロックする非標識抗体の能力を測定する。このような競合アッセイのための一般的な標識は、放射性標識又は酵素標識である。

【 0 1 2 0 】

本明細書において包含される競合抗体は、C1qへの本開示の任意の抗C1q抗体(例えば、M 1又はM1の抗原結合断片)の結合を、 $1\mu M$ 以下で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%及び95%阻害する(すなわち、対照と比較して妨げる若しくは干渉する)又は減少させるヒト化抗体である。例えば、競合アッセイにおいて抗体と競合する濃度は、抗体M1又はM1の抗原結合断片の K_D 以下であり得る。結合メンバー間の競合は、例えば、ELISAを用いて、及び/又は溶液中でC1qとの抗体の相互作用をモニターすることによって、インビトロで容易にアッセイされ得る。分析を行うための正確な手段は重要ではない。C1qを96ウェルプレートに固定してもよく、又は均一な溶液中に入れてもよい。特定の実施形態において、標識された抗C1q抗体、例えばM1の結合をブロックする非標識の候補抗体(単数又は複数)の能力は、放射性、酵素又は他の標識を用いて測定することができる。逆アッセイでは、C1qとの標識された抗C1q抗体の相互作用を干渉する非標識の抗体の能力が決定され、ここで、前記標識された抗C1q抗体、例えば、M1、及びC1qは、すでに結合されている。読み出しありは、結合した標識の測定を介する。C1q及び候補抗体(単数又は複数)は、任意の順序で又は同時に添加されてもよい。

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qと自己抗体の間の相互作用を阻害する。

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるマウス抗ヒトC1qモノクローナル抗体M 1、又はその抗C1q結合断片と本質的に同じC1qエピトープに結合する。

【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗体又はその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、抗体又はその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5~8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、抗体又はその抗原結合断片である。

【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、

10

20

30

40

50

、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0128】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株又はその子孫によって產生されるモノクローナル抗体M1の軽鎖可変ドメインのHVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3から選択される少なくとも一つのHVRを含み得る。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株又はその子孫によって產生されるモノクローナル抗体M1の重鎖可変ドメインのHVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3から選択される少なくとも一つのHVRを含み得る。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株又はその子孫によって產生されるモノクローナル抗体M1の軽鎖可変ドメインのHVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3から選択される少なくとも一つのHVR、及び重鎖可変ドメインのHVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3から選択される少なくとも一つのHVRを含み得る。

【0129】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、C1qタンパク質に結合し、(a)配列番号9のアミノ酸残基196-226(配列番号12)又は配列番号9のアミノ酸残基196-226(GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGH1)(配列番号12)に対応するC1qタンパク質鎖A(C1qA)のアミノ酸残基、(b)配列番号9のアミノ酸残基196-221(配列番号13)又は配列番号9のアミノ酸残基196-221(GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(配列番号13)に対応するC1qAのアミノ酸残基、(c)配列番号9のアミノ酸残基202-221(配列番号14)又は配列番号9のアミノ酸残基202-221(SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(配列番号14)に対応するC1qAのアミノ酸残基、(d)配列番号9のアミノ酸残基202-219(配列番号15)又は配列番号9のアミノ酸残基202-219(SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(配列番号15)に対応するC1qAのアミノ酸残基、並びに(e)配列番号9のアミノ酸残基Lys219及び/若しくはSer202又は配列番号9のLys219及び/若しくはSer202に対応するC1qAのアミノ酸残基から選択されるアミノ酸残基内のC1qタンパク質の1つ以上のアミノ酸に結合し得る。

【0130】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、(a)配列番号11のアミノ酸残基218-240(配列番号16)又は配列番号11のアミノ酸残基218-240(WLAVNDYYDMVG1QGSDSVFSF)(配列番号16)に対応するC1qタンパク質鎖C(C1qC)のアミノ酸残基、(b)配列番号11のアミノ酸残基225-240(配列番号17)又は配列番号11のアミノ酸残基225-240(YDMVG1QGSDSVFSF)(配列番号17)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(c)配列番号11のアミノ酸残基225-232(配列番号18)又は配列番号11のアミノ酸残基225-232(YDMVG1QG)(配列番号18)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(d)配列番号11のアミノ酸残基Tyr225又は配列番号11のアミノ酸残基Tyr225に対応するC1qCのアミノ酸残基、(e)配列番号11のアミノ酸残基174-196(配列番号19)又は配列番号11のアミノ酸残基174-196(HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT)(配列番号19)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(f)配列番号11のアミノ酸残基184-192(配列番号20)又は配列番号11のアミノ酸残基184-192(RSGVKVVTF)(配列番号20)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(g)配列番号11のアミノ酸残基185-187又は配列番号11のアミノ酸残基185-187(SGV)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(h)配列番号11のアミノ酸残基Ser185又は配列番号11のアミノ酸残基Ser185に対応するC1qCのアミノ酸残基、から選択されるアミノ酸残基内のC1qタンパク質の1つ以上のアミノ酸にさらに結合し得る。

【0131】

特定の実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、配列番号9に示されるヒトC1qAのアミノ酸残基Lys219とSer202又は配列番号9に示されるLys219とSer202に対応するヒトC1qAのアミノ酸、及び配列番号11に示されるヒトC1qCのアミノ酸残基Tyr225又は配列番号11

10

20

30

40

50

1に示されるTyr225に対応するヒトC1qCのアミノ酸残基に結合し得る。特定の実施形態において、抗C1q抗体は、配列番号9に示されるヒトC1qAのアミノ酸残基Lys219又は配列番号9に示されるLys219に対応するヒトC1qAのアミノ酸残基、及び配列番号11に示されるヒトC1qCのアミノ酸残基Ser185又は配列番号11に示されるSer185に対応するヒトC1qCのアミノ酸残基に結合する。

【0132】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、C1qタンパク質に結合し、(a)配列番号11のアミノ酸残基218-240(配列番号16)又は配列番号11のアミノ酸残基218-240(WLAVNDYYDMVG1QGSDSVFSGF)(配列番号16)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(b)配列番号1のアミノ酸残基225-240(配列番号17)又は配列番号11のアミノ酸残基225-240(YDMVG1QGSDSVFSGF)(配列番号17)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(c)配列番号11のアミノ酸残基225-232(配列番号18)又は配列番号11のアミノ酸残基225-232(YDMVG1QG)(配列番号18)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(d)配列番号11のアミノ酸残基Tyr225又は配列番号11のアミノ酸残基Tyr225に対応するC1qCのアミノ酸残基、(e)配列番号11のアミノ酸残基174-196(配列番号19)又は配列番号11のアミノ酸残基174-196(HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT)(配列番号19)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(f)配列番号11のアミノ酸残基184-192(配列番号20)又は配列番号11のアミノ酸残基184-192(RSGVKVVTF)(配列番号20)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(g)配列番号11のアミノ酸残基185-187又は配列番号11のアミノ酸残基185-187(SGV)に対応するC1qCのアミノ酸残基、(h)配列番号11のアミノ酸残基Ser185又は配列番号11のアミノ酸残基Ser185に対応するC1qCのアミノ酸残基、から選択されるアミノ酸残基内のC1qタンパク質の1つ以上のアミノ酸に結合する。

【0133】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、C1qとC1sの間の相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qとC1rの間の相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qとC1sの間及びC1qとC1rの間の相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qと自己抗体などの別の抗体の間の相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、2.5:1、2.0:1、1.5:1、又は1.0:1未満の化学量論で、それぞれの相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1q及び抗C1q抗体のほぼ等モル濃度で、C1q-C1s相互作用などの相互作用を阻害する。他の実施形態において、抗C1q抗体は、20:1未満、19.5:1未満、19:1未満、18.5:1未満、18:1未満、17.5:1未満、17:1未満、16.5:1未満、16:1未満、15.5:1未満、15:1未満、14.5:1未満、14:1未満、13.5:1未満、13:1未満、12.5:1未満、12:1未満、11.5:1未満、11:1未満、10.5:1未満、10:1未満、9.5:1未満、9:1未満、8.5:1未満、8:1未満、7.5:1未満、7:1未満、6.5:1未満、6:1未満、5.5:1未満、5:1未満、4.5:1未満、4:1未満、3.5:1未満、3:1未満、2.5:1未満、2.0:1未満、1.5:1未満、又は1.0:1未満の化学量論で、C1qに結合する。特定の実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、20:1～1.0:1又は1.0:1未満の範囲にある結合化学量論でC1qに結合する。特定の実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、6:1～1.0:1又は1.0:1未満の範囲にある結合化学量論でC1qに結合する。特定の実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、2.5:1～1.0:1又は1.0:1未満の範囲にある結合化学量論でC1qに結合する。いくつかの実施形態において、C1qについて1.0:1の結合化学量論を有する本開示の抗C1q抗体は、例えば本開示のCH50アッセイによって決定される場合、C1F溶血の約50%の阻害をもたらす。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qとC1rの間、又はC1qとC1sの間、又はC1qと、C1r及びC1sの両方の間の相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1qとC1rの間、C1qとC1sの間、及び/又はC1qと、C1r及びC1sの両方の間の相互作用を阻害する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1q A鎖に結合する。他の実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1q B鎖に結合する。他の実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1q C鎖に結合する。いくつかの実施形態においてヒト化抗C1q抗体は、C1q A鎖、C1q B鎖及び/又はC1q C鎖に結合する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1q A鎖、B鎖及び/又はC鎖の球状ドメインに結合する

10

20

30

40

50

。他の実施形態において、ヒト化抗C1q抗体は、C1q A鎖、C1q B鎖及び/又はC1q C鎖のコラーゲン様ドメインに結合する。

【 0 1 3 4 】

本開示のヒト化抗体がC1qとC1sの相互作用、又はC1qとC1rの間の相互作用などの2つ以上の補体因子間の相互作用を阻害する場合、抗体の存在下で生じる相互作用は、本開示の抗体が存在しない対照と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%減少し得る。特定の実施形態において、ヒト化抗体の存在下で生じる相互作用は、本開示のヒト化抗体が存在しない対照と比較して、少なくとも30%~少なくとも99%の範囲にある量だけ減少する。

10

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の抗体が存在しない対照と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも99%、又は少なくとも30%~少なくとも99%の範囲にある量だけC4切断を阻害する。C4切断を測定する方法は当該技術分野において周知である。各C4切断に関する本開示の抗体のEC₅₀値は、3 μg/ml、2.5 μg/ml、2.0 μg/ml、1.5 μg/ml、1.0 μg/ml、0.5 μg/ml、0.25 μg/ml、0.1 μg/ml、0.05 μg/ml未満であってもよい。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、C1qと各抗C1q抗体のほぼ等モル濃度でC4切断を阻害する。

20

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の抗体が存在しない対照と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも99%、又は少なくとも30%~少なくとも99%の範囲にある量だけ自己抗体依存性及び補体依存性細胞傷害(CDC)を阻害する。自己抗体依存性及び補体依存性細胞傷害の阻害に関する本開示の抗体のEC₅₀値は、3 μg/ml、2.5 μg/ml、2.0 μg/ml、1.5 μg/ml、1.0 μg/ml、0.5 μg/ml、0.25 μg/ml、0.1 μg/ml、0.05 μg/ml未満であってもよい。

30

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の抗体が存在しない対照と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも99%、又は少なくとも30%~少なくとも99%の範囲にある量だけ補体依存性の細胞媒介性細胞傷害(CDCC)を阻害する。CDCCを測定する方法は、当該技術分野において周知である。CDCC阻害に関する本開示の抗体のEC₅₀値は、3 μg/ml、2.5 μg/ml、2.0 μg/ml、1.5 μg/ml、1.0 μg/ml、0.5 μg/ml、0.25 μg/ml、0.1 μg/ml、0.05 μg/ml未満であってもよい。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、CDCCを阻害するが、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を阻害しない。

40

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の抗体が存在しない対照又は補体因子若しくは自己抗体などの別の抗体に結合しない対照抗体が使用される対照と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも99%、又は少なくとも30%~少なくとも99%の範囲にある量だけ、C1F溶血(CH50溶血とも呼ばれる)を阻害する(例えば、以下の実施例部分を参照されたい)。C1F溶血を測定する方法は、当該技術分野において周知である(例えば、以下の実施例部分を参照されたい)。C1F溶血に関する本開示のヒト化抗体のEC₅₀値は、3 μg/ml、2.5 μg/ml、2.0 μg/ml、1.5 μg/ml、1.0 μg/ml、0.5 μg/ml、0.25 μg/ml、0.1 μg/ml、0.05 μg/ml未満であってもよい。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、200ng/m

50

1未満、100ng/ml未満、50ng/ml未満又は20ng/ml未満の用量で少なくとも50%のC1F溶血を中和する。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗体は、C1q及び抗C1q抗体のほぼ等モル濃度でC1F溶血を中和する。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ヒトC1F溶血アッセイにおいて溶血を中和する。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、ヒト、マウス及びラットのC1F溶血アッセイにおいて溶血を中和する(例えば、以下の実施例部分を参照されたい)。

【0139】

いくつかの実施形態において、代替経路は、C1q結合及びその後のC1sの活性化によって開始されるCDCを増幅してもよい。これらの実施形態の少なくともいくつかにおいて、本開示の抗体は、本開示の抗体が存在しない対照と比較して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも99%、又は少なくとも30%～少なくとも99%の範囲にある量だけ代替経路を阻害する。

10

【0140】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、シナプス喪失の細胞インピトロモデル又はインピボモデル、例えば、インピボのマウスモデルにおけるシナプス喪失を防ぐ。インピボのマウスモデルは、アルツハイマー病のマウスアミロイド前駆体タンパク質(APP)のトランスジェニックモデルであるTg2576、ハンチントン病のトランスジェニックモデルであるR6/2 NT-CAG150、又は脊髄性筋萎縮症のマウスモデルであるSMA 7、又は線内障の遺伝的マウスモデルであるDBA/2Jを含むことができる。一般に、シナプス喪失を表示する任意の神経変性疾患モデルを使用することができる。

20

【0141】

インピトロ又はインピボでのシナプス喪失を測定する方法は、当該技術分野において周知である。インピトロの病変形成は、本開示の抗体が存在しない対照実験と比較して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%、又は少なくとも30%～少なくとも95%の範囲にある量だけ低減させることができる。インピトロでの病変形成の防止に関する本開示の抗体のEC₅₀値は、3μg/ml、2.5μg/ml、2.0μg/ml、1.5μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml未満であってもよい。インピボでのシナプス喪失は、本開示の抗体が存在しない対照実験と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも35%、少なくとも40%若しくは少なくとも50%、又は少なくとも5%～少なくとも50%の範囲にある量だけ低減させてもよい。

30

【0142】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、NMOのエクスピボでの脊髄スライスモデル又はNMOのインピボでのマウスモデルにおいて病変形成を防ぐ。エクスピボ又はインピボでの病変形成を測定する方法は、当該技術分野において周知である。エクスピボでの病変形成は、少なくとも0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5又は4.0の相対スコアだけ低減することができる。エクスピボでの病変形成の防止に関する本開示の抗体のEC₅₀値は、3μg/ml未満、2.5μg/ml未満、2.0μg/ml未満、1.5μg/ml未満、1.0μg/ml未満、0.5μg/ml未満、0.25μg/ml未満、0.1μg/ml未満、又は0.05μg/ml未満であってもよい。インピボでの病変形成は、染色の喪失(面積の%)との関係で、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも35%、少なくとも40%若しくは少なくとも50%、又は少なくとも5%～少なくとも50%の範囲の量だけ低減させることができる。染色は、限定されないが、APQ4染色、GFAP染色又はMBP染色によって評価することができる。

40

【0143】

本開示は、ヒト化抗C1q抗体を提供する。本開示のヒト化抗体は、以下の特徴の1つ以上を有することができる。本開示の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、抗体断片、二重特異性及び多特異性抗体、多価抗体又はヘテロコン

50

ジュゲート抗体であってもよい。本開示の抗体断片は、本開示のヒト化抗C1q抗体のいずれかと同じエピトープに結合する機能的断片であってもよい。いくつかの実施形態において、本開示の抗体断片は、C1qに特異的に結合し、C1qの生物学的活性を中和する。いくつかの実施形態において、抗体断片は、対応する全長抗体と同じエピトープを有するが、非常に小さな分子量を有する、本開示のヒト化抗C1q抗体又は抗体断片の小型化バージョンである。このような小型化された抗C1q抗体断片は、画像的及び診断的用途に有利である、より良好な脳浸透能及びより短い半減期を有してもよい(例えば、Lutje S et al., Bioconjug Chem. 2014 Feb 19;25(2):335-41、Tavare R et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 21; 111(3): 1108-13、及びWiehr S et al., Prostate. 2014 May; 74(7): 743-55を参照されたい)。したがって、いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1qの抗体断片は、それらの対応する全長抗体と比較してより良好な脳透過性を有し、及び又はそれらの対応する全長抗体と比較してより短い半減期を有する。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、第1の抗原及び第2の抗原を認識する二重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、第1の抗原はC1q抗原である。いくつかの実施形態において、第2の抗原は、血液脳関門を横断する輸送を促進する抗原であり、限定されないが、トランスフェリン受容体(TR)、インスリン受容体(HIR)、インスリン様増殖因子受容体(IGFR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2(LPR-1及び2)、ジフテリア毒素受容体、CRM197、ラマ単一ドメイン抗体、TMEM30(A)、タンパク質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、angiopepペプチド並びにANG1005が挙げられる。

10

20

【0144】

本開示のヒト化抗C1q抗体は、操作されたエフェクター機能、アミノ酸配列の修飾又は当該技術分野で公知の他の抗体の修飾をさらに含んでもよく、例えば、本明細書に記載されている抗C1q抗体の定常領域は、補体活性化を損なうように修飾されてもよい。例えば、そして理論により拘束されることを望むものではないが、ヒトIgG1、IgG2、及びIgG3のFc領域とは異なり、ヒトIgG4はC1qに結合しない。したがって、いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、例えば腕部のスイッチングを妨げる及び/又は細胞上に発現したFc受容体とFc領域の相互作用を低減するか又は阻害する一以上のアミノ酸置換をFc領域に含む(例えば、Angal S et al., Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8; and Morgan A et al., Immunology 1995 86 319-324を参照されたい)。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1qの抗体断片は、ヒトIgG4のFc領域をさらに含み得る。本開示のヒト化抗C1q抗体は、Kabat番号付け法に従う241又は248位にアミノ酸置換を含むFc領域を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は腕部のスイッチングを妨げるセリンからプロリンへのアミノ酸置換を241位に含む。いくつかの実施形態において、Fc領域はセリンからプロリンへのアミノ酸置換をKabat番号付法に従う241位に含む。いくつかの実施形態において、Fc領域は、Fc受容体とFc領域の相互作用する能力を低減するか又は阻害するセリンからプロリンへのアミノ酸置換を248位に含む。いくつかの実施形態において、Fc領域はロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換をKabat番号付法に従う248位に含む。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、配列番号37のアミノ酸配列を含むFc領域を含む。

30

40

【0145】

追加のヒト化抗C1q抗体、例えば、本開示のC1qタンパク質に特異的に結合するヒト化抗体は、当該技術分野で公知の様々なアッセイによって、同定され、スクリーニングされ、かつ/又はそれらの物理的/化学的特性及び/若しくは生物学的活性について特性決定されてもよい。

【0146】

抗体調製

本開示の抗C1q抗体は、本明細書に記載された又は本分野で知られる任意の方法を用いて産生され得る。本開示のモノクローナル抗体(例えば、ヒト化抗体)は、様々な公知技術、例えばKohler及びMilstein., Nature, 256:495(1975)に記載された標準的な体細胞ハ

50

イブリダイゼーション技術を用いて產生され得る。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、原則的にはモノクローナル抗体を產生するための他の技術、例えばウイルス又はBリンパ球の癌性形質転換及びヒト抗体遺伝子のライブラリーを用いるファージディスプレイ技術も用いられ得る。

【0147】

本開示のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを作成するための一つの方法は、マウスの系である。マウスにおけるハイブリドーマの產生、例えば免疫プロトコル及び免疫した脾臓細胞の単離及び融合のための技術は本分野で周知である。

【0148】

ポリクローナル抗体は、好適な対象をポリペプチド免疫原で免疫することによって調製され得る。免疫した対象におけるポリペプチド抗体の力価は、標準的な技術、例えば固定化したポリペプチドを用いる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって経時的にモニターされ得る。必要であれば、抗原に対する抗体が哺乳動物から(例えば血液から)単離され、さらに周知の技術、例えばIgG画分を得るためにプロテインAクロマトグラフィーによって精製され得る。免疫後の適当な時間に、例えば抗体力価が最大であるときに、抗体產生細胞が対象から得られ、標準的な技術、例えばKohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497によって最初に記載されたハイブリドーマ技術(Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73:2927-31; and Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75も参照されたい)、より近年のヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72)、EBVハイブリドーマ技術(Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)又はトリオーマ技術によって、モノクローナル抗体を調製するために用いられ得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを產生するための技術は周知である(一般的には、Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol., multivalent Med. 54:387-402; Gefter, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照されたい)。手短には、不死化細胞株(典型的にはミエローマ)を、上記の通り免疫原で免疫した哺乳動物由来のリンパ球(典型的には脾臓細胞)に融合し、得られるハイブリドーマ細胞の培養上清を、ポリペプチド抗原に好ましくは特異的に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを特定するために選抜する。

【0149】

リンパ球と不死化細胞株を融合するために用いられる多くの周知のプロトコルが、抗PD-1、PD-L1、又はPD-L2モノクローナル抗体を作製する目的に適用され得る(例えば、Galfré, G. et al. (1977) Nature 266:550-52; Gefter et al. (1977) 上掲; Lerner (1981) 上掲; Kenneth (1980) 上掲を参照されたい)。さらに、当業者は、有用なかかる方法の多くのバリエーションがあることを理解しているだろう。典型的には、不死化細胞株(例えば、ミエローマ細胞株)は、リンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマは本開示の免疫原調製物と不死化マウス細胞株で免疫したマウス由来のリンパ球を融合することによって作成され得る。好適な不死化細胞株は、ヒボキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む培地(「HAT培地」)に感受性のマウスミエローマ細胞株である。任意の多くのミエローマ細胞株、例えばP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653又はSp2/0-Ag14ミエローマ株が、標準的な技術に従って融合パートナーとして用いられ得る。ミエローマ株は、American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Mdから入手可能である。典型的には、HAT感受性マウスミエローマ細胞は、ポリエチレングリコール(「PEG」)を用いてマウス脾臓細胞に融合される。その後、融合によって生じるハイブリドーマ細胞は、非融合及び非產生融合ミエローマ細胞を殺傷するHAT培地を用いて選択される(非融合脾臓細胞は、形質転換されていない為数日後に死滅する)。本開示のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞は、例えば標準的なELISAアッセイを用いて、あるポリペプチドに結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清を選抜することによって検

10

20

30

40

50

出される。

【0150】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、所望のポリペプチド(例えばC1q)に特異的なモノクローナルを組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)と適切なポリペプチドを用いてスクリーニングすることによって同定及び単離し、それによってポリペプチドに結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離し得る。ファージディスプレイライブラリーを作製し選抜するためのキットは市販されている(例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene SurfZAPTMPhage Display Kit, Catalog No. 240612)。さらに、抗体ディスプレイライブラリーの作製及び選抜において特に用いられ得る方法及び試薬の例は、例えばLadner et al. 米国特許第5,223,409号; Kang et al. 国際公開第WO 92/18619号; Dower et al. 国際公開第WO 91/17271号; Winter et al. 国際公開第WO 92/20791号; Markland et al. 国際公開第WO 92/15679号; Breitling et al. 国際公開第WO 93/01288号; McCafferty et al. 国際公開第WO 92/01047号; Garrard et al. 国際公開第WO 92/09690号; Ladner et al. 国際公開第WO 90/02809号; Fuchs et al. (1991) Biotechnology (NY) 9:1369-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Biotechnology (NY) 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; and McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554に見出される。

【0151】

さらに、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る組換え抗C1q抗体、例えばヒト化及びキメラモノクローナル抗体が作成され得る。かかるヒト化及びキメラモノクローナル抗体は、本分野で知られる組換えDNA技術、例えばRobinson et al. 国際公開第PCT/US86/02269号; Akira et al. 欧州特許出願第184,187号; Taniguchi, M. 欧州特許出願第171,496号; Morrison et al. 欧州特許出願第173,494号; Neuberger et al. 国際出願第WO 86/01533号; Cabilly et al. 米国特許第4,816,567号; Cabilly et al. 欧州特許出願第125,023号; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; and Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559); Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) Biotechniques 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534; and Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法を用いて產生され得る。

【0152】

さらに、米国特許第5,565,332号に開示される様な標準的なプロトコルに従って作製され得る。他の実施形態では、抗体鎖又は特異的な結合ペアメンバーは、特異的な結合ペアメンバーのポリペプチド鎖及び複製可能な一般的ディスプレイパッケージの成分の融合をコードする核酸分子を含むベクターと、単一の結合ペアメンバーの第二のポリペプチド鎖をコードする核酸分子を含むベクターの組換えによって、例えば米国特許第5,565,332号、米国特許第5,871,907号、又は米国特許第5,733,743に記載される本分野で知られる技術を用いて產生され得る。細胞におけるタンパク質の機能を阻害するための細胞内抗体の使用もまた、本分野で知られている(例えば、Carlson, J. R. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2638-2646; Biocca, S. et al. (1990) EMBO J. 9:101-108; Werge, T. M. et al. (1990) FEBS Lett. 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7450

27-7428; Marasco, W. A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca, S. et al. (1994) Biotechnology (NY) 12:396-399; Chen, S-Y. et al. (1994) Hum. Gene Ther. 5:595-601; Duan, L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079; Chen, S-Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936; Beerli, R. R. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R. R. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashikar, A. M. et al. (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J. H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; Marasco et al.による国際公開第WO 94/02610号; 及びDuan et al.による国際公開第WO 95/03832号を参照されたい)。

【0153】

10

他の実施形態では、ヒトモノクローナル抗C1q抗体が、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニック又はトランスクロモソーマル(transchromosomal)マウスを用いて作製され得る。一実施形態では、本明細書で「HuMAbマウス」と呼ばれるトランスジェニックマウスは、内因性の μ 及び γ 鎖遺伝子座を不活性化する標的変異と共に、非再構成ヒト重鎖(μ 及び γ)並びに軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリンミニ遺伝子座を含む(Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859)。したがって、マウスはマウスIgM又は γ の低減した発現を示し、免疫化に反応して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチ及び高親和性のヒトIgGモノクローナル抗体を生ずる体細胞変異を経る(Lonberg, N. et al. (1994), 上掲; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101における概説; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、及びHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851に記載されている。さらには、米国特許番号第5,545,806号; 5,569,825号; 5,625,126号; 5,633,425号; 5,789,650号; 5,877,397号; 5,661,016号; 5,814,318号; 5,874,299号; 及び5,770,429号; 全てLonberg and Kay, and GenPharm International; 米国特許番号第5,545,807号から1998年6月11日に公開されたSurani et al.; 国際公開第WO 98/24884号; 1994年11月10日に公開されたWO 94/25585; 1993年6月24日に公開されたWO 93/1227; 1992年12月23日に公開されたWO 92/22645; 1992年3月19日に公開されたWO 92/03918を参照されたい。

【0154】

本開示のさらに別の態様は、動物を免疫原C1qポリペプチド、又はその免疫原部分によってそれぞれ免疫するステップ、及びその後動物から該ポリペプチドに特異的に結合する抗体を単離するステップを含む方法によって得られ得る抗C1q抗体に関する。

40

【0155】

本開示のまた別の態様では、新規な抗体を作製及び/又は発現するために、部分又は公知の抗体配列が用いられ得る。抗体は、6個の重鎖及び軽鎖相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を主に介して標的抗原と相互作用する。このため、CDR中のアミノ酸配列は、個々の抗体でCDRの外側の配列より多様性がある。CDR配列は多くの抗体抗原相互作用に関わるため、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列に移植した、特定の天然抗体由来のCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の天然抗体を模倣する組換え抗体を発現することが可能である(例えば、Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525; 及び Queen,

50

C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029 10033を参照されたい)。かかるフレームワーク配列は、生殖系列又は非生殖系列抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースから得られ得る。これらの生殖系列配列は、B細胞の成熟の間にV(D)J結合によって形成される完全に組み立てられた可変遺伝子を含まないであろうから、成熟抗体遺伝子配列とは異なるであろう。生殖系列遺伝子配列はまた、可変領域に均一に分布する高親和性の二次レパートリー抗体とも個々に異なるであろう。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部において比較的まれである。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部、及びフレームワーク領域4のカルボキシ末端部において比較的まれである。さらに、多くの体細胞変異は、抗体の結合特性を有意に変更しない。このため、元の抗体と同等の結合特性を有するインタクトな組換え抗体を再び作製するために、特定の抗体の全DNA配列を得る必要はない(例えば、1999年3月12日に出願されたPCT/US99/05535を参照されたい。)。CDR領域にまたがる部分重鎖及び軽鎖配列は、典型的にこの目的のために十分である。部分配列は、どの生殖系列及び/又は非生殖系列配列が組換え抗体可変遺伝子に寄与したかを決定するために用いられる。その後、生殖系列及び/又は非生殖系列配列は、可変領域の欠失部分を埋めるために用いられる。重鎖及び軽鎖リーダー配列は、タンパク質の成熟の間に切断され、最終的な抗体の特定に寄与しない。欠失配列を付加するために、クローニングしたcDNA配列は、ライゲーション又はPCR増幅によって合成オリゴヌクレオチドと組み合わされ得る。あるいは、全可変領域は、短い、重複したオリゴヌクレオチドのセットとして合成され、全合成可変領域クローンを作製するためにPCR増幅によって組み合され得る。この方法は、排除又は包含又は特定の制限部位、又は特定のコドンの最適化等のいくつかの利点を有する。この方法は、一つの種(例えば、ヒト)における特定の免疫グロブリンコーディング配列をスクリーニングし、他の種(例えば、マウス)の既知の抗体配列由来の免疫グロブリンコーディング配列を設計するためにも用いられ得る(例えば、以下の実施例部分を参照されたい)。

【0156】

ハイブリドーマ由来の重鎖及び軽鎖転写産物のヌクレオチド配列は、重複した合成オリゴヌクレオチドのセットを設計し、天然の配列と同じアミノ酸コーディング能を有する合成V配列を作製するためにも用いられ得る。合成重鎖及び鎖配列は、天然の配列とは三つの点で異なり得る:オリゴヌクレオチド合成及びPCR増幅を促進するために、反復ヌクレオチド塩基のストリングが中断されている、Kozakのルールに従って、最適な翻訳開始部位が組み込まれている(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)、及び翻訳開始部位の上流にHindIII部位が設計されている。

【0157】

重鎖及び軽鎖可変領域の両方について、最適化コーディング、及び対応する非コーディング鎖配列は、対応する非コーディングオリゴヌクレオチドのほぼ中間点で30~50ヌクレオチドに分解されている。したがって、各鎖について、オリゴヌクレオチドは、150~400ヌクレオチドの部分にまたがる重複二本鎖セットに組み立てられ得る。その後、プールが150~400ヌクレオチドのPCR増幅産物を产生するための鋳型として用いられる。典型的に、単一の可変領域オリゴヌクレオチドセットは、二つの重複PCR産物を作製するために別々に増幅される二つのプールに分解される。その後、これらの重複産物は、完全な可変領域を形成するためにPCR増幅によって組み合わされる。発現ベクター構築物に容易にクローニングされ得る断片を作製するために、PCR増幅に重鎖又は軽鎖定常領域の重複断片を含めることも望ましいものであり得る。

【0158】

その後、再構築された重鎖及び軽鎖可変領域は、発現ベクター構築物を形成するために、クローニングされたプロモーター、リーダー配列、翻訳開始、リーダー配列、定常領域、3'非翻訳、ポリアデニル化、及び転写終結配列と組み合わされ得る。重鎖及び軽鎖発現構築物は、単一ベクターに組み合され、宿主細胞にコトランスフェクション、連続的トランスフェクション、又は別々にトランスフェクションされ、その後これらが融合されて両方の鎖を発現する宿主細胞が形成される。

【0159】

この用途のためのプラスミドは本分野で知られており、例えば以下の実施例部分で示されるプラスミドが挙げられる。本開示の完全ヒト及びキメラ抗体はまた、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA、IgM、及びIgD抗体、並びにそのバリエント及び変異体を含む。他の重鎖アイソタイプの発現のため、又はラムダ軽鎖を含む抗体の発現のために、同様のプラスミドが構築され得る。

【0160】

したがって、本開示の一態様では、構造上の特徴が既知の非ヒト又はヒト抗体(例えば、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体M1等のマウス抗ヒト抗C1q抗体)が、本開示の抗体の少なくとも一つの機能的特性、例えばC1qタンパク質への結合を維持する、構造的に関連する抗ヒトC1q抗体を作製するために用いられる。他の機能的特性としては、競合ELISAアッセイにおけるモノクローナル抗体M1のC1qへの結合の阻害が挙げられる。いくつかの実施形態では、構造的に関連した抗ヒトC1q抗体は、以下の実施例部分において記載される様に、IC₅₀値によって測定された場合、モノクローナル抗体M1と比較して同等の抗原に対する結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、構造的に関連した抗ヒトC1q抗体は、以下の実施例部分において記載される様に、IC₅₀値によって測定された場合、モノクローナル抗体M1と比較してより高い抗原に対する親和性を有する。さらに、抗C1q抗体(例えば、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体M1)の一以上のCDR又は可変領域は、さらなる組換え操作された本開示のヒト抗C1q抗体を作製するために、既知のヒトフレームワーク領域及びCDRと組換えるに組み合わされ得る。

【0161】

重鎖及び軽鎖CDR3ドメインが、抗原に対する抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすことが周知であるため、いくつかの実施形態において、上記の通り調製された本開示の組換え抗体は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体M1の可変領域の重鎖及び軽鎖CDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗体はさらにモノクローナル抗体M1の可変領域のCDR2を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体はさらにモノクローナル抗体M1の可変領域のCDR1を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体はさらにCDRの任意の組み合わせを含み得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、上記操作された抗体のCDR1、2、及び/又は3領域は、ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体M1の可変領域のアミノ酸配列と全く同じアミノ酸配列を含み得る。しかしながら、当業者であれば、抗体のC1qへの効率的な結合を維持しながら、全く同じCDR配列からいくつかの逸脱が可能であり得ることを理解しているだろう(例えば、保存的配列変更)。したがって、他の実施形態では、操作された抗体は、モノクローナル抗体M1の一以上のCDRと例えば50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%同一である一以上のCDRで構成され得る。

【0163】

抗体断片

特定の実施形態において、抗C1q抗体の全体よりも、抗C1q抗体断片を使用することに利点がある。より小さな断片サイズは、迅速なクリアランスを可能にする。

【0164】

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク質分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992) 及び Brennan et al., Science 229:81 (1985)を参照されたい)。しかしながら、これらの断片は、現在、例えば、本開示の抗C1q抗体をコードする核酸を用いて、組換え宿主細胞により直接產生することができる。Fab、Fv及びscFv抗体断片は全て、大腸菌に発現させ、そこから分泌させることができ、よって、多量のこれらの断片の直接的な产生を可能にする。また、抗C1q抗体断片は

10

20

30

40

50

、上記で検討した抗体ファージライブライマーから単離することができる。あるいは、 Fab' -SH断片は、大腸菌から直接回収し、化学的に結合させて、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 断片を形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチによれば、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 断片を組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。インビオでの半減期が増加したFab及び $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体断片の生産は、米国特許第5,869,046号に記載されている。他の実施形態において、最適な抗体は一本鎖Fv断片(scFV)である。WO93/16185、米国特許第5,571,894号及び米国特許第5,587,458号を参照されたい。抗C1q、抗C1r又は抗C1q抗体断片はまた、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されているように、「線状抗体」であり得る。このような線状抗体断片は、単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0165】

10

二重特異性及び多特異性抗体

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、二重特異性及び多特異性抗体を包含する。

【0166】

二重特異性抗体(BsAb)は、少なくとも2つの異なるエピトープ(例えば同じ又は別のタンパク質(例えば、本開示の1つ以上のC1qタンパク質)上のものを含む)に対する結合特異性を有する抗体である。あるいは、BsAbの一部分は、標的C1q抗原に結合するアームを備えることができ、別のものは、第2のタンパク質に結合するアームと組み合わせができる。このような抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 二重特異性抗体)に由来し得る。

20

【0167】

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野で公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な产生は、2つの鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく。Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組合せのため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、1つだけが正しい二重特異性構造を有する10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成する。通常、アフィニティークロマトグラフィーステップにより行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の手法は、WO93/08829及びTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【0168】

30

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させる。融合体は、ヒンジ、 $\text{C}_{\text{H}}2$ 及び $\text{C}_{\text{H}}3$ 領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含んでいるものであってもよい。いくつかの実施形態において、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域($\text{C}_{\text{H}}1$)は、融合体の少なくとも1つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNA及び、所望であれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトさせる。これは、構築に使用される3つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互の割合の調整に大きな融通性を与える。しかしながら、等比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合、又は該比率が特に重要な場合には、1つの発現ベクターに、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することができる。

40

【0169】

このアプローチのいくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、1つのアームに第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性を与える)で構成される。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が分離の容易な方法を提供するため、この非対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促進することが見出された。このアプローチは、WO94/04690に開示されている。二重特異性抗体を产生するさらなる詳細については、例えば、Sureshら, Methods in Enzymol

50

ogy 121: 210 (1986)を参照されたい。

【0170】

W096/27011又は米国特許第5,731,168号に記載されている別のアプローチによれば、一対の抗体分子間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にするように操作することができる。界面は、抗体定常ドメインのC_H3領域の少なくとも一部を含むことができる。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)で置き換える。大きな側鎖(単数又は複数)と同一又は類似のサイズの代償的な「空洞(cavity)」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さいもの(例えば、アラニン又はスレオニン)で置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作製される。これは、ホモ二量体などの他の望ましくない最終産物と比較してヘテロ二量体の収量を増大させる機構を提供する。

10

【0171】

抗体断片から二重特異性抗体を生成させるための技術は、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は化学結合を用いて調製することができる。Brennan et al., Science 229: 81 (1985)は、F(ab')₂断片を生成するためにインタクト抗体をタンパク質分解で切断する手法を記載する。これらの断片は、隣接ジチオールを安定化し、分子間のジスルフィド形成を防止するために、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次に、生成されたFab'断片は、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換される。次いで、Fab'-TNB誘導体の1つは、二重特異性抗体を形成するためにFab'-TNB誘導体に再変換される。産生された二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用薬剤として使用することができる。

20

【0172】

Fab'断片は大腸菌から直接回収され、二重特異性抗体を形成させるために化学的に結合され得る。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)は、完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記載する。各Fab'断片は、大腸菌から別個に分泌され、二重特異性抗体を形成するために、インビトロで指定性化学カップリングに供された。このようにして形成された二重特異性抗体は、ErbB2受容体及び正常ヒトT細胞を過剰発現する細胞に結合し、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【0173】

30

また、組換え細胞培養から直接的に二価抗体断片を作製し、単離する様々な技術が記載されている。例えば、二価ヘテロ二量体は、ロイシンジッパーを用いて生成されている。Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合により2つの異なる抗体のFab'部分に連結された。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元し、単量体を形成させ、次に、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。Hollinger et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により記載されている「ダイアボディ」技術は、二重特異性/二価抗体断片を作製するための代替の機構を提供している。断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間に対形成を可能にするには短すぎるリンカーにより、軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。したがって、1つの断片のV_H及びV_Lドメインは、別の断片の相補的なV_L及びV_Hドメインと対形成するように強いられ、それによって、2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)二量体の使用により二重特異性/二価抗体断片を作製する別の方策もまた報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

40

【0174】

2を超える原子価を有する抗体もまた企図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0175】

例示的な二重特異性抗体は、2つの異なる抗原に結合することができる。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、第1の抗原であるC1qに結合し、血液脳関門を横断す

50

る輸送を促進する第2の抗原に結合する。血液脳関門を横断する輸送を促進する多数の抗原が、当該技術分野において公知である(例えば、Gabathuler R., *Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases*, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 48-57を参照されたい)。このような第2の抗原としては、限定されないが、トランスフェリン受容体(TR)、インスリン受容体(HIR)、インスリン様増殖因子受容体(IGFR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2(LPR-1及び2)、ジフェリア毒素受容体、例えば、CRM197(ジフェリア毒素の非毒性突然変異体)、ラマ単一ドメイン抗体、例えば、TMEM 30(A)(フリッパー)、タンパク質導入ドメイン、例えば、TAT、Syn-B又はペネトラチン、ポリアルギニン又は全体として正に荷電したペプチド、及びAngiopepペプチド、例えば、ANG1005が挙げられる(例えば、Gabathuler, 2010を参照されたい)。

【 0 1 7 6 】

多価抗体

いくつかの実施形態では、本開示は多価抗体を包含する。多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも速く内在化(及び/又は異化)され得る。本開示の抗C1q抗体又はそれらの抗体断片は、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる、3つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のものである)(例えば、四価抗体)であり得る。多価抗体は、二量体化ドメインと3つ以上の抗原結合部位を含むことができる。いくつかの実施形態において、二量体化ドメインは、Fc領域又はヒンジ領域を含む。このシナリオにおいて、抗体は、Fc領域とアミノ末端でのFc領域に対する3つ以上の抗原結合部位を含む。いくつかの実施形態において、本明細書における多価抗体は、3~約8個、及びいくつかの実施形態において4個の抗原結合部位を含む。多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖(及びいくつかの実施形態において2つのポリペプチド鎖)を含み、ここで、ポリペプチド鎖(単数又は複数)は2つ以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖(単数又は複数)は、VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを含んでもよく、ここで、VD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。同様に、ポリペプチド鎖(単数又は複数)は、V_H-C_H1-フレキシブルリンカー-V_H-C_H1-Fc領域鎖又はV_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc領域鎖を含み得る。本明細書における多価抗体は、少なくとも2つ(及びいくつかの実施形態において4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含むことができる。本明細書における多価抗体は、例えば、約2個~約8個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含んでよい。本明細書において企図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、場合により、CLドメインをさらに含む。

【 0 1 7 7 】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体はまた、本開示の範囲内にある。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体(例えば、本開示の抗C1q抗体又はそれらの抗体断片)で構成される。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の1つは、アビジンに結合し、他方はビオチンに結合することができる。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞へと免疫系細胞を標的化することが提唱され、米国特許第4,676,980号、HIV感染を治療するために使用されている。国際公開第W091/00360、W092/200373及びEP0308936。抗体は、架橋剤を伴うものを含む、合成タンパク質化学において公知の方法を用いてインピトロで調製されてもよいことが企図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて又はチオエーテル結合を形成させることによって構築することができる。この目的に対して適切な試薬の例としては、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、並びに例えば米国特許第4,676,980号で開示されているものが含まれる。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。適切な架橋剤は、当該技術分野において周知であり、いくつかの架橋技術とともに米国特許第4,676,980号に開示されている。

10

20

30

40

50

【0178】

エフェクター機能操作

いくつかの実施形態では、エフェクター機能を改変し、及び/又は抗体の血清半減期を増加させるために、本開示のヒト化抗C1q抗体を修飾することが望ましい場合がある。例えば、定常領域上のFc受容体結合部位を修飾又は突然変異して、Fc RI、Fc RII及び/又はFc RIIIなどの特定のFc受容体に対する結合親和性を除去又は減少させてもよい。いくつかの実施形態において、エフェクター機能は、抗体のFc領域(例えば、IgGのCH2ドメインにおける)のN-グリコシル化を除去することにより損なわれる。いくつかの実施形態において、エフェクター機能は、PCT WO99/58572及びArmour et al., Molecular Immunology 40: 585-593 (2003)、Reddy et al., J. Immunology 164:1925-1933 (2000)に記載されているように、ヒトIgGの233-236、297及び/又は327-331などの領域を修飾することによって損なわれる。10

【0179】

本明細書に記載されている抗補体抗体の定常領域はまた、補体活性化を損なうように修飾され得る。例えば、補体のC1成分の結合後のIgG抗体の補体活性化は、C1結合モチーフ(例えば、C1qの結合モチーフ)における定常領域中のアミノ酸残基を変異させることによって減少させることができる。ヒトIgG1のD270、K322、P329、P331の各々についてのAla突然変異は、C1qに結合し補体を活性化する抗体の能力を有意に減少させることができると報告されている。マウスIgG2bに関して、C1q結合モチーフは、残基E318、K320及びK322を構成する。Idusogie et al. (2000) J. Immunology 164:4178-4184、Duncan et al. (1988) Nature 322: 738-740。マウスIgG2bについて同定されたC1s結合モチーフE318、K320及びK322は、他の抗体アイソタイプ(Duncan et al. (1988) Nature 322:738-740)に対して共通であると考えられるため、IgG2bに対するC1q結合活性は、3つの特定の残基のいずれか1つをその側鎖に不適切な官能性を有する残基で置き換えることによって無効にすることができる。C1q結合を無効にするためにAlaだけでイオン残基を置き換える必要はない。また、C1q結合を無効にするために、3つの残基のいずれか1つに代えて、Gly、Ile、Leu若しくはValなどの他のアルキル置換された非イオン性残基、又はPhe、Tyr、Trp及びProなどの芳香族非極性残基を用いることができる。さらに、C1s結合活性を無効にするために、残基318ではなく、残基320及び322に代えて、Ser、Thr、Cys及びMetなどの極性非イオン性残基を用いることもできる。さらに、補体結合に必要なFc領域の糖修飾の除去は、補体活性化を防止することができる。IgG重鎖のCH2ドメイン上の保存されたアスパラギン(Asn-297)のグリコシル化は、抗体エフェクター機能に不可欠である(Jefferis et al. (1998) Immunol Rev 163:59-76)。Fcグリカンの修飾は、IgGの立体構造を変化させ、補体タンパク質C1qとエフェクター細胞受容体FcRの結合に対するFc親和性を低減させる(Alhorn et al. (2008) PLoS ONE 2008;3:e1413)。Fcグリカンの完全な除去は、CDC及びADCCを無効にする。脱グリコシル化は、他の免疫グロブリンクラス及び他の糖タンパク質に作用することなく、グリコシダーゼ酵素、例えば、全てのIgGサブクラスの重鎖上のアスパラギン結合型グリカンを選択的に消化するストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)の遺伝子endoSによってコードされた108kDa酵素であるエンドグリコシダーゼS(EndoS)を用いて行うことができる(Collin et al. (2001) EMBO J 2001;20:3046-3055)。3040

【0180】

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように、抗体(特に、抗体断片)にサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことができる。本明細書で使用するとき、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」とは、IgG分子のインビボでの血清半減期の増加に関与するIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを指す。

【0181】

他のアミノ酸配列改変

本開示のヒト化抗C1q抗体又はそれらの抗体断片のアミノ酸配列改変も企図される。例えば、抗体又は抗体断片の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望ま50

しい場合がある。抗体又は抗体断片のアミノ酸配列変異体は、該抗体若しくは抗体断片をコードする核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、又はペプチド合成によって調製される。このような変化は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び/又はそれへの挿入及び/又はその置換を含む。欠失、挿入及び置換の任意の組合せは、最終構築物が所望の特徴(すなわち、本開示のC1qタンパク質に結合する又はそれと物理的に相互作用する能力)を有する限り、最終構築物に到達するためになされる。また、アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数又は位置の変化などの抗体の翻訳後プロセスを変更し得る。

【0182】

突然変異誘発に好ましい位置である抗C1q抗体の特定の残基又は領域を同定するために有用な方法は、Cunningham and Wells in Science, 244:1081-1085 (1989)によって記載されているように「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれている。ここで、残基又は標的残基の群は同定され(例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基)、アミノ酸と標的抗原の相互作用に影響を与えるために、中性又は負に荷電したアミノ酸(最も好ましくは、アラニン又はポリアラニン)によって置き換えられる。次に、置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸位置は、置換の部位で又は置換の部位に関してさらなる又は他の変異体を導入することによって改良される。このようにして、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質を予め決定する必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の性能を分析するために、アラニンスキャニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された抗体変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

【0183】

アミノ酸配列挿入は、1残基～100以上の残基を含有するポリペプチドの長さの範囲のアミノ末端(「N」)及び/又はカルボキシ(「C」)末端融合体、並びに1つ又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体又は細胞傷害性ポリペプチドに融合された抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増加させる酵素又はポリペプチドに対する抗体のN末端又はC末端への融合体を含む。

【0184】

別のタイプの変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基によって置き換えられた抗体分子において少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異誘発について最も関心ある部位は超可変領域を含むが、FR変化もまた企図される。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しの下に、以下の表Aに示されている。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表Aにおいて「例示的な置換」と表示され、又はアミノ酸クラスを参照して以下にさらに説明されるようなより実質的な変化が導入されてもよく、生成物がスクリーニングされてもよい。

【0185】

10

20

30

表A:アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

20

【0186】

抗体の生物学的特性における実質的な改変は、(a)例えばシート若しくはらせん立体構造のような置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位での分子の電荷若しくは疎水性、又は(c)側鎖のバルク、の維持に対する置換の効果において有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてグループに分けられる：

- (1)疎水性: ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile
- (2)中性親水性:cys、ser、thr
- (3)酸性:asp、glu
- (4)塩基性:asn、gln、his、lys、arg
- (5)鎖配向に影響を及ぼす残基:gly、pro、及び
- (6)芳香族:trp、tyr、phe。

30

【0187】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴う。

【0188】

また、抗体の適切な立体構造の維持に関与しないいずれかのシステイン残基は、一般に分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防ぐためにセリンで置換されてもよい。逆に、システイン結合(単数又は複数)は、その安定性(特に、抗体がFv断片などの抗体断片である場合)を改善するために抗体に付加されてもよい。

40

【0189】

いくつかの実施形態において、置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化又はヒト抗C1q抗体)の1つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般に、さらなる開発のために選択された得られた変異体(単数又は複数)は、それらが生成される親抗体に対して生物学的特性を改善する。このような置換変異体を生成する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を伴う。簡単に言えば、いくつかの超可変領域部位(例えば、6~7部位)は、各部位で全ての可能なアミノ酸置換を生じさせるために変異される。このように生じさせ

50

た抗体変異体は、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物への融合物として纖維状ファージ粒子から一価の様式で提示される。次に、ファージディスプレイ変異体は、本明細書中に開示されるように、それらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。変更のための候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発は、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定するために行うことができる。あるいは又はさらに、抗体と抗原(例えば、本開示のC1qタンパク質)の間の接触点を同定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することは有益であり得る。このような接触残基及び隣接残基は、本明細書で詳述する技術に従った置換の候補である。このような変異体が生成されると、変異体の一団は、本明細書に記載されるようなスクリーニングに供され、1つ以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体がさらなる開発のために選択され得る。

10

【0190】

抗体の別のタイプのアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変更させる。変更させるとは、抗体に見られる1つ以上の糖部分の欠失、及び/又は抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位の付加を意味する。

【0191】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型又はO結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への糖部分の結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への糖部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、トリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は潜在的なグリコシル化部位を作る。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース又はキシロースのうちの1つの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた使用することができる。

20

【0192】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、(N結合グリコシル化部位について)上記のトリペプチド配列の1つ以上を含むようにアミノ酸配列を変更することによって好都合に達成される。変更はまた、(O結合グリコシル化部位について)元の抗体の配列への1つ以上のセリン又はスレオニン残基の付加又はそれによる置換によってなされ得る。

30

【0193】

抗IgE抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該技術分野において公知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されないが、抗体(例えば、本開示の抗C1q抗体)又は抗体断片の先に調製された変異体又は非変異バージョンのオリゴスクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発及びカセット突然変異誘発による、天然供給源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合)又は調製が含まれる。

【0194】

他の抗体修飾

いくつかの実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体又はそれらの抗体断片は、当該技術分野において公知であり、容易に利用できるさらなる非タンパク性部分を含むようにさらに修飾することができる。いくつかの実施形態において、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物が

40

50

挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中におけるその安定性のために製造に利点を有し得る。ポリマーは任意の分子量であってもよく、分枝又は非分枝であってもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、1を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じ又は異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されないが、改善されるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が規定の条件下での治療に使用されるかどうかなどを含む考慮事項に基づいて決定され得る。このような技術及び他の適切な製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)に開示されている。

【 0 1 9 5 】

10

核酸、ベクター及び宿主細胞

本開示のヒト化抗C1q抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているように、組換え法及び組成物を用いて生成することができる。いくつかの実施形態において、本開示の抗C1q抗体のいずれかをコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗C1q抗体(例えば、該抗体の軽鎖及び/又は重鎖)のVLを含むアミノ酸配列及び/又はVHを含むアミノ酸配列をコードすることができる。いくつかの実施形態において、このような核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。いくつかの実施形態において、そのような核酸を含む宿主細胞も提供される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクター、を含む(例えば、それで形質導入されている)。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、真核生物であり、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞又はリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。

【 0 1 9 6 】

20

本開示の抗C1q抗体を作製する方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、抗体の発現に適した条件下で、抗C1q抗体をコードする核酸を含有する本開示の宿主細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態において、抗体は、その後、宿主細胞(又は宿主細胞培養培地)から回収される。

【 0 1 9 7 】

30

本開示のヒト化抗C1q抗体の組換え産生のために、ヒト化抗C1q抗体をコードする核酸を単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニング及び/又は発現のための1つ以上のベクターに挿入する。このような核酸は、従来の手順を使用して(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離され、配列決定され得る。

【 0 1 9 8 】

本明細書に記載されている、本開示の抗C1q抗体又はそれらの断片ポリペプチド(抗体を含む)のいずれかをコードする核酸配列を含む適切なベクターは、限定されないが、クローニングベクター及び発現ベクターを含む。適切なクローニングベクターは、標準的な技術に従って構築することができ、又は当該技術分野において利用可能な多数のクローニングベクターから選択することができる。使用を意図された宿主細胞に応じて、選択されたクローニングベクターが変化し得る一方で、有用なクローニングベクターは、一般的に自己複製する能力を有し、特定の制限エンドヌクレアーゼの単一の標的を有し得、及び/又はベクターを含むクローンの選択に使用することができるマーカー遺伝子を担持することができる。適切な例としては、プラスミド及び細菌ウイルス、例えば、pUC18、pUC19、Bluescript(例えば、pBS SK+)及びその誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、並びにpSA3及びpAT28などのシャトルベクターが挙げられる。これら及び多くの他のクローニングベクターは、BioRad、Strategene及びInvitrogenなどの市販業者から入手可能である。

【 0 1 9 9 】

40

50

発現ベクターは、一般的に、本開示の核酸を含む複製可能なポリヌクレオチド構築物である。発現ベクターは、エピソームとして又は染色体DNAの不可欠な部分として宿主細胞内で複製することができる。適切な発現ベクターとしては、限定されないが、PCT公開第W 087/04462号に開示されているプラスミド、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、コスマド、及び発現ベクター(単数又は複数)が挙げられる。ベクター成分は、一般的に、限定されないが、以下:シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、適切な転写調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー及びターミネーター)、の1つ以上を含み得る。発現(すなわち、翻訳)に関して、リボソーム結合部位、翻訳開始部位及び終止コドンなどの1つ以上の翻訳調節エレメントも通常必要とされる。

10

【0200】

対象とする核酸を含むベクターは、いくつかの適切な手段のいずれかによって宿主細胞に導入され得、手段としては、エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン又は他の物質を採用するトランスフェクション、微粒子銃、リポフェクション、及び感染(例えば、ベクターがワクシニアウイルスなどの感染性病原体である場合)が含まれる。ベクター又はポリヌクレオチドの導入の選択は、多くの場合、宿主細胞の特徴に依存する。いくつかの実施形態において、ベクターは、本開示の抗C1q抗体をコードする1つ以上のアミノ酸配列を含む核酸を含む。

【0201】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適した宿主細胞には、原核細胞又は真核細胞が含まれる。例えば、本開示の抗C1q抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ない場合、細菌中で産生され得る。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現に関して、(例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号及び第5,840,523号、並びに大腸菌における抗体断片の発現を記載するCharlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254)。発現後、抗体は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離されてもよく、さらに精製することができる。

20

【0202】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物はまた、部分的又は完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、グリコシル化経路が「ヒト化」されている、真菌及び酵母菌株などの抗体をコードするベクター用の適したクローニング又は発現宿主である(例えば、Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) 及びLi et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006))。

30

【0203】

また、グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)から誘導することができる。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が含まれる。特にスプドブテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる多数のバキュロウイルス株が同定されている。植物細胞培養物はまた宿主として利用することができる(例えば、トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)技術を記載する米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号及び第6,417,429号)。

40

【0204】

また、脊椎動物細胞を宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で増殖するよう適合された哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7)、ヒト胚腎臓株(例えば、Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)に記載されている293又は293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)に記載されるTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A

50

)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝臓細胞(Hep G2)、マウス乳房腫瘍(MMT 060562)、例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載されているTRI細胞、MR C 5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR-CHO細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、並びにY0、NS0及びSp2/0などの骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体產生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照されたい。

【0205】

医薬組成物

10

本開示のヒト化抗C1q抗体は、抗体と適切な薬学的に許容される担体又は希釈剤とを組み合わせることによって、治療的使用(例えば、投与による)の様々な製剤に組み込むことができ、又は医薬(例えば、神経変性疾患若しくは自己免疫疾患を治療又は予防するため)の製造に組み込むことができ、固体、半固体、液体又は気体の形態の調製物に製剤化され得る。このような製剤の例としては、限定されないが、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶液、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル、ミクロスフェア及びエアロゾルが挙げられる。医薬組成物は、所望の製剤に応じて、動物又はヒトへの投与のための医薬組成物を製剤化するために通常使用されるビヒクルである、薬学的に許容される希釈剤の非毒性担体を含むことができる。組合せの生物学的活性に影響を与えないように希釈剤が選択される。このような希釈剤の例としては、限定されないが、蒸留水、緩衝水、生理食塩水、PBS、リングル液、デキストロース溶液及びハンクス液が含まれる。本開示の医薬組成物又は製剤は、他の担体、アジュバント又は非毒性、非治療的、非免疫原性安定化剤、賦形剤などをさらに含むことができる。組成物はまた、pH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤、湿潤剤及び界面活性剤などの生理学的条件に近づけるための追加の物質を含むことができる。

20

【0206】

本開示の医薬組成物はまた、例えば、酸化防止剤などの種々の安定化剤のいずれかを含むことができる。医薬組成物がポリペプチドを含む場合、ポリペプチドは、ポリペプチドのインビボでの安定性を増強する、又はそうでなければその薬理学的特性を高める(例えば、ポリペプチドの半減期を増加させる、その毒性を低減させる及び溶解性又は取り込みを高める)様々な周知の化合物と複合体を形成することができる。このような修飾又は錯化剤の例としては、限定されないが、硫酸塩、グルコン酸塩、クエン酸塩及びリン酸塩が挙げられる。組成物のポリペプチドはまた、それらのインビボでの属性を高める分子とともに複合体を形成することができる。このような分子としては、限定されないが、糖質、ポリアミン、アミノ酸、他のペプチド、イオン(例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン)、及び脂質が挙げられる。

30

【0207】

様々なタイプの投与に適した製剤のさらなる例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)に見出すことができる。薬物送達のための方法の簡単な概説については、Langer, Science 249:1527-1533 (1990)を参照されたい。

40

【0208】

経口投与について、有効成分は、カプセル、錠剤及び粉末などの固体剤形、又はエリキシル、シロップ及び懸濁液などの液体剤形で投与することができる。有効成分(単数又は複数)は、グルコース、ラクトース、スクロース、マンニトール、デンブン、セルロース又はセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、サッカリンナトリウム、滑石、炭酸マグネシウムなどの不活性成分及び粉末担体とともにゼラチンカプセルに封入することができる。望ましい色、味、安定性、緩衝能力、分散又は他の公知の望ましい特徴を提供するために添加することができる追加の不活性成分の例は、赤色酸化鉄、シリカゲル、ラウリル硫酸ナトリウム、二酸化チタン及び食用白色インクである。同様の希釈剤を使用して、圧縮錠剤を作製することができる。錠剤とカプセルの両方は、数時間に

50

わたって薬剤の連続放出を提供する徐放製品として製造することができる。圧縮錠剤は、いずれもの不快な味をマスクし、錠剤を大気から保護するために糖衣で被覆され若しくはフィルムで被覆され、又は胃腸管における選択的崩壊に関して腸溶被覆され得る。経口投与用の液体剤形は、患者の許容性を高めるために着色料及び香味料を含有することができる。

【0209】

非経口投与に適した製剤には、水性及び非水性、等張滅菌注射溶液が挙げられ、それには、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質、並びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性無菌懸濁液が含まれ得る。

10

【0210】

医薬組成物を製剤化するために使用される成分は、好ましくは、高純度のものであり、潜在的に有害な夾雑物を実質的に含まない(例えば、少なくともナショナルフード(NF)グレード、一般には、少なくとも分析グレード、より典型的には少なくとも医薬品グレード)。さらに、インビオでの使用に意図された組成物は、通常、無菌である。所与の化合物が使用前に合成されなければならない程度に、得られた生成物は、典型的には、合成又は精製プロセス中に存在し得る、いずれもの潜在的に有毒な作用物質、特にいずれもの内毒素を実質的に含まない。非経口投与用の組成物はまた、無菌であり、実質的に等張性であり、GMP条件下で作製される。

【0211】

製剤は、脳又は中枢神経系における保持及び安定化のために最適化することができる。薬剤が頭蓋区画に投与される場合、薬剤は、区画内に保持され、拡散されず又は他には血液脳関門を通過しないことが望ましい。安定化技術は、分子量の増加を達成するために、架橋、多量体化、又はポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、中性タンパク質担体などの基への連結などを含む。

20

【0212】

保持を増加させるための他の方策には、生分解性又は生侵食性移植植物への本開示のヒト化抗C1q抗体などの抗体の取り込みが含まれる。治療的活性剤の放出速度は、ポリマーマトリックスを通過する輸送速度及び移植植物の生分解によって調節される。また、ポリマー障壁を通過する薬物の輸送は、化合物の溶解度、ポリマーの親水性、ポリマーの架橋の程度、ポリマー障壁が薬物に対してより透過性になるような吸水時のポリマーの膨張、移植植物の形状などにより影響を受ける。移植植物は、移植の部位として選択される領域のサイズ及び形状に見合った大きさのものである。移植植物は、粒子、シート、パッチ、プラーグ、纖維、マイクロカプセルなどであってもよく、挿入の選択部位と適合する任意のサイズ又は形状であってもよい。

30

【0213】

移植植物は、モノリシックであってもよく、すなわち、活性剤をポリマーマトリックスを介して均一に分布させ又はカプセル化させ、この場合、活性剤のリザーバはポリマーマトリックスによってカプセル化される。採用されるポリマー組成物の選択は、投与部位、治療の所望の期間、患者の耐性、治療されるべき疾患の性質などにより変化する。ポリマーの特徴としては、移植部位での生分解性、目的の薬剤との互換性、カプセル化の容易性、生理学的環境における半減期が含まれる。

40

【0214】

採用することができる生分解性ポリマー組成物は、分解したとき、単量体を含む生理学的に許容される分解生成物をもたらす有機エステル又はエーテルであり得る。無水物、アミド、オルトエステルなどは、単独で又は他の単量体と組み合わせて、用途を見出すことができる。ポリマーは、縮合ポリマーである。ポリマーは、架橋又は非架橋であってもよい。特に興味深いのは、ヒドロキシ脂肪族カルボン酸のポリマー、ホモポリマー又はコポリマーのいずれか、及び多糖類である。対象とするポリエステルには、D-乳酸、L-乳酸、ラセミ乳酸、グリコール酸、ポリカプロラクトン及びそれらの組合せのポリマーが含まれ

50

る。L-ラクテート又はD-ラクテートを採用することによって、ゆっくりと生分解するポリマーが達成され、一方、分解は、ラセミ化合物で実質的に高められる。グリコール酸と乳酸のコポリマーは、特に関心が高く、この場合、生分解速度は乳酸に対するグリコール酸の比率によって調節される。最も急速に分解されるコポリマーは、ほぼ同量のグリコール酸と乳酸を有し、この場合、ホモポリマーのいずれかは分解に対してより抵抗性がある。乳酸に対するグリコール酸の比率はまた移植物における脆性に影響し、この場合、より柔軟な移植物はより大きい形状に望ましい。対象とする多糖類には、アルギン酸カルシウム、及び官能化セルロース、特に約5kD～500kDの分子量である、水不溶性によって特徴付けられるカルボキシメチルセルロースエステルなどがある。生分解性ハイドロゲルはまた、本開示の移植物に採用することができる。ハイドロゲルは、典型的には、液体を吸収する能力によって特徴付けられるコポリマー材料である。採用され得る例示的な生分解性ハイドロゲルは、Heller: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, N. A. Peppes ed., Vol. I II, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, pp 137-149に記載されている。
10

【0215】

医薬投与

本開示のヒト化抗C1q抗体を含む本開示の医薬組成物は、公知の方法、例えば、ボーラスとしての静脈内投与に合致させて、又はある期間にわたる持続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、頭蓋内、脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局所又は吸入経路によって使用され得る(例えば、ヒト個体などの抗C1q抗体を用いた治療を必要とする個体に投与され得る)。
20

【0216】

本開示の医薬組成物の用量及び所望の薬物濃度は、想定される特定の用途に応じて変えることができる。適切な用量又は投与経路の決定は、十分に当業者の技術範囲内にある。動物実験は、ヒト治療のための有効な用量の決定に信頼できる指針を提供する。有効な用量の種間スケーリングは、Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46に記載される原理に従って行うことができる。

【0217】

本開示のヒト化抗C1q抗体のいずれかのインビボ投与について、通常の投与量は、投与経路に応じて、1日あたり個体の体重の約10ng/kg～約100mg/kgまで変えてよい。いくつかの実施形態において、用量は約1mg/kg/日～10mg/kg/日である。治療される疾患、障害又は状態の重症度に応じて、数日又はそれより長い期間の反復投与について、治療は、症状の所望の抑制が達成されるまで持続される。
30

【0218】

例示的な投薬計画は、約2mg/kgのヒト化抗C1q抗体の最初の用量を投与し、続く、隔週で約1mg/kgの週1回の維持用量を含むことができる。他の投薬計画は有用であり得、医師が達成したい薬物動態学的崩壊のパターンに応じる。例えば、1週あたり1回～21回の個体への投薬は、本明細書において企図される。特定の実施形態において、約3μg/kg～約2mg/kgの範囲(例えば、約3μg/kg、約10μg/kg、約30μg/kg、約100μg/kg、約300μg/kg、約1mg/kg又は約2mg/kgなど)の投与を用いてよい。特定の実施形態において、投与頻度は、1日3回、1日2回、1日1回、1日おきに1回、週1回、2週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、6週間に1回、7週間に1回、8週間に1回、9週間に1回、10週間に1回、又は月1回、2カ月に1回、3カ月に1回又はそれより長い。治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニターされる。投与されるヒト化抗C1q抗体を含む投与計画は、使用される用量と独立して経時に変えてよい。
40

【0219】

特定のヒト化抗C1q抗体のための用量は、ヒト化抗C1q抗体の1つ以上の投与を与えられた個体において経験的に決定することができる。個体は、ヒト化抗C1q抗体の漸増用量を与えられる。ヒト化抗C1q抗体の有効性を評価するために、神経変性障害、炎症性障害又
50

は自己免疫障害の臨床的症状をモニターすることができる。

【0220】

本開示のヒト化抗C1q抗体の投与は、例えば、レシピエントの生理学的状態、投与の目的が治療的又は予防的であるのかどうか及び当業者に公知の他の因子に応じて、連続的又は間欠的であってもよい。ヒト化抗C1q抗体の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であってもよく、又は間隔を置いた一連の用量であってもよい。

【0221】

特定の用量及び送達の方法に関する指針は文献に提供されており、例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号を参照されたい。異なる製剤が異なる治療及び異なる障害に効果的であり、特定の臓器又は組織を治療することが意図された投与が別の臓器又は組織に対するものとは異なる様式で送達を必要とし得ることは、本開示の範囲内である。さらに、投薬は、1つ以上の別個の投与によって、又は持続注入によって投与されてもよい。状態に応じた数日又はそれより長い期間の反復投与について、治療は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。しかしながら、他の投薬計画が有用であり得る。この治療の進行は従来の技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

10

【0222】

治療用途

本開示は、C1qに結合し、C1qの生物学的活性を中和することができるヒト化抗C1q抗体及びそれらの抗原結合断片を提供する。これらのヒト化抗C1q抗体は、限定されないが、神経変性障害、炎症性障害及び自己免疫障害を含む補体活性化に関連するある範囲の疾患の予防、危険性の減少又は治療に有用である。したがって、本明細書に開示されるように、本開示のヒト化抗C1q抗体は、個体における、限定されないが、神経変性障害、炎症性障害及び自己免疫障害を含む補体活性化に関連する疾患の治療、予防又は危険性の減少に使用され得る。いくつかの実施形態において、個体はこのような疾患を有する。いくつかの実施形態において、個体はヒトである。

20

【0223】

本開示のヒト化抗C1q抗体を用いて治療され得る神経変性障害は、CF1依存性シナプス喪失を含む神経接合部又はシナプスの喪失に関連する障害を含む。このような障害としては、限定されないが、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縫内障、筋緊張性ジストロフィー、ギラン・バレー症候群(GBS)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、脊髄性筋萎縮症、ダウン症候群、パーキンソン病及びハンチントン病が含まれ得る。いくつかの神経変性障害では、シナプス喪失は、補体受容体3(CR3)/C3又は補体受容体CR1に依存する。いくつかの神経変性障害において、シナプス喪失は、病理学的活性依存性のシナプス刈り込みに関連する。いくつかの障害において、シナプスはミクログリアによって貪食される。したがって、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の神経変性障害の1つ以上の症状を治療、予防又は改善するために使用することができる。いくつかの実施形態において、本開示は、例えば、C1qと自己抗体の間の相互作用、C1qとC1rの相互作用及び/又はC1qとC1sの相互作用を阻害するために、本開示のヒト化抗C1q抗体を投与することによって、本開示の神経変性障害を有する個体において、1つ以上の症状を治療、予防又は改善する方法を提供する。

30

【0224】

本開示のヒト化抗C1q抗体を用いて治療され得る炎症性又は自己免疫疾患としては、限定されないが、関節リウマチ(RA)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血及び再灌流後の遠隔組織傷害、心肺バイパス手術中の補体活性化、皮膚筋炎、天疱瘡、ループス腎炎とその結果生じる糸球体腎炎及び血管炎、心肺バイパス、心臓麻痺に誘発される冠動脈内皮機能障害、II型膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、急性腎不全、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質症候群、慢性開放隅角縫内障、急性閉塞隅角縫内障、黄斑変性疾患、加齢黄斑変性(AMD)、(AMD-wet)、地図状萎縮、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症及び虚血関連網膜症、眼内炎、眼内新生血管疾患、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォン・ヒッペル-リンダウ病、眼のヒストプラスマ症、視神経脊髄炎(NMO)、網膜中心静脈閉塞症(CRV

40

50

0)、角膜血管新生、網膜血管新生、レーベル遺伝性視神経症、視神経炎、ベーチェット網膜症、虚血性視神経症、網膜血管炎、ANCA血管炎、プルセル網膜症、シェーグレンドライアイ疾患、ドライAMD、サルコイドーシス、側頭動脈炎、結節性多発動脈炎、並びにアトロ移植、超急性拒絶反応、血液透析、慢性閉塞性肺窮迫症候群(COPD)、喘息及び誤嚥性肺炎が挙げられる。いくつかの実施形態において、自己免疫疾患としては、限定されないが、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、1型真性糖尿病、橋本甲状腺炎、アジソン病、セリアック病、クローン病、悪性貧血、尋常性天疱瘡、白斑、自己免疫性溶血性貧血、腫瘍随伴症候群、血管炎病、低補体血症性蕁麻疹様血管炎(HUV)、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎及びウェゲナー肉芽腫症がさらに挙げられ得る。

【0225】

10

視神経脊髄炎(NMO)などの自己免疫疾患では、自己抗体が補体系を活性化する。NMO患者において、古典的補体経路は、AQP4標的自己抗体などの自己抗体がその自己抗原AQP4に結合することによって誘発される。それによって、AQP4は補体活性化の古典的経路を活性化する。この活性化プロセスの第1のステップでは、補体因子C1qは、自己抗体-自己抗原の免疫複合体に結合する。自己抗体は、天然に存在する抗体、例えば、NMO患者由来の血清抗体(通常、NMO-IgGのと呼ばれる)又はrAb-53などのモノクローナル抗体を含むことができる。

【0226】

したがって、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の炎症性又は自己免疫疾患の1つ以上の症状を治療、予防又は改善するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本開示は、例えば、C1qと自己抗体の間の相互作用、C1qとC1rの相互作用及び/又はC1qとC1sの相互作用を阻害するために、本開示のヒト化抗C1q抗体を投与することによって、本開示の炎症性又は自己免疫疾患有する個体において、1つ以上の症状を治療、予防又は改善する方法を提供する。

20

【0227】

ヒト化抗C1q抗体を用いて治療され得る代謝性疾患としては、限定されないが、糖尿病、例えば、II型糖尿病及び肥満が挙げられる。ヒト化抗C1q抗体の試験に使用することができる代謝性障害のインピトロ及びインピボモデルは、当該技術分野において周知である。したがって、本開示のヒト化抗C1q抗体は、本開示の代謝性疾患の1つ以上の症状を治療、予防又は改善するために使用することができる。いくつかの実施形態において、本開示は、例えば、C1qと自己抗体、例えば抗ガングリオシド自己抗体の間の相互作用、C1qとC1rの相互作用及び/又はC1qとC1sの相互作用を阻害するために、本開示のヒト化抗C1q抗体を投与することによって、本開示の代謝性疾患有する個体において、1つ以上の症状を治療、予防又は改善する方法を提供する。

30

【0228】

併用治療

本開示の抗体は、限定されないが、神経変性障害、炎症性障害及び/又は自己免疫障害の任意の追加治療と併用して使用することができる。

【0229】

40

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、抗C1s若しくは抗C1r抗体などの第2の抗補体因子抗体(例えば、中和抗補体因子抗体)又は第2の抗C1q抗体を併用して治療有効量で投与される。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、第2の抗C1q抗体、抗C1s抗体及び/又は抗C1r抗体などの第2及び第3の中和抗補体因子抗体を用いて、治療有効量で投与される。

【0230】

50

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)の阻害剤を併用して投与される。ADCC阻害剤には、限定されないが、HLA-A、HLA-B又はHLA-Cを認識するキラー細胞Ig様受容体(KIR)及びHLA-Eを認識するC型レクチンCD94/NKG2Aヘテロ二量体などの可溶性NK細胞阻害性受容体(例えば、Lopez-Botet M., T. Bellon, M. Llano, F. Navarro, P. Garcia & M. de Miguel. (2000), Paired inhibitory and trig

gering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.* 61: 7-17, Lanier L.L. (1998) Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* 92: 705-707を参照されたい)、及びカドミウム(例えば、*Immunopharmacology* 1990、Volume 20, Pages 73-8を参照されたい)が含まれ得る。

【0231】

いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、補体活性化の代替経路の阻害剤を併用して投与される。このような阻害剤としては、限定されないが、因子B遮断抗体、因子D遮断抗体、可溶性、膜結合、タグ化又は融合タンパク質形態のCD59、DAF、CR1、CR2、Crry、又はC3の切断をブロックするコンピュタチン様ペプチド、非ペプチドC3aRアンタゴニスト、例えばSB290157、コプラ毒因子又は非特異的補体阻害剤、例えばナファモスタットメシル酸塩(FUTHAN、FUT-175)、アプロチニン、K-76モノカルボン酸(MX-1)及びヘパリンが挙げられ得る(例えば、T.E. Molines & M. Kirschfink, *Molecular Immunology* 43 (2006) 107-121を参照されたい)。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、自己抗体とその自己抗原の間の相互作用の阻害剤を併用して投与される。このような阻害剤は、ペプチド又はRNA由来のミモトープ、例えばAQP4抗原のミモトープなどの精製された可溶性形態の自己抗原又は抗原模倣物を含むことができる。あるいは、このような阻害剤は、古典的補体経路を誘発することなく、自己抗原を認識し、自己抗体の結合を防ぐブロッキング剤を含むことができる。このようなブロッキング剤としては、例えば、自己抗原結合RNAアプタマー又はそれらのFcドメインにおいて機能性C1q結合部位を欠損している抗体(例えば、Fab断片又はC1qに結合しないように他に操作された抗体)が含まれ得る。

10

【0232】

診断用途

本開示のヒト化抗C1q抗体又はそれらの機能的断片はまた診断的有用性を有する。したがって、本開示は、個体における又は個体由来の組織試料におけるC1qの検出などの診断目的で、本開示の抗体又はそれらの機能的断片を使用する方法を提供する。いくつかの実施形態において、個体はヒトである。いくつかの実施形態において、個体は、神経変性障害又は炎症性若しくは自己免疫疾患に罹患しているヒト患者である。いくつかの実施形態において、本開示のヒト化抗C1q抗体は、シナプスとシナプス喪失を検出するために使用される。例えば、シナプス喪失は、アルツハイマー病又は線内障などの神経変性障害に罹患している個体において測定することができる。

20

【0233】

いくつかの実施形態において、診断方法は、本開示のヒト化抗C1q抗体又はその機能的断片を個体に投与するステップ、及び個体のシナプスに結合した抗体を検出するステップを含む。シナプスへの抗体結合は、例えば、陽電子放出断層撮影(PET)、X線コンピュータ断層撮影、単一光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、コンピュータ断層撮影(CT)及びコンピュータ体軸断層撮影(CAT)などの非侵襲性技術によって定量され得る。

30

【0234】

いくつかの実施形態において、診断方法は、生検標本、組織又は細胞などの生物学的試料におけるシナプスを検出するステップを伴う。ヒト化抗C1q抗体又はその機能的断片を生物学的試料と接触させ、シナプスに結合した抗体を検出する。検出方法は、シナプスに結合した抗体の定量化を含んでもよい。生物学的試料中の抗体の検出は、免疫蛍光顕微鏡法、免疫細胞化学、免疫組織化学、ELISA、FACS分析、免疫沈降、又はマイクロポジトロン放射断層撮影を含む、当該技術分野において公知の任意の方法を用いて行うことができる。特定の実施形態において、抗体は例えば、¹⁸Fによって放射線標識され、続いてマイクロポジトロン放射断層撮影分析によって検出される。

40

【0235】

シナプスに結合した抗体の定量化は、個体に存在するシナプスの数の相対的な尺度を提供する。典型的に、シナプスは、ある期間にわたって繰り返して定量化される。シナプス定量化的正確な周期性は、神経変性疾患の性質、疾患の進行の段階、治療法及び多くの他

50

の因子を含む多くの因子に依存する。反復測定は、一般的に、神経変性障害を有する個体における進行性のシナプス喪失を明らかにする。あるいは、相対的なシナプスカウントは、単一時点での罹患個体及び健常な対照個体の集団において比較してもよい。治療を受けている罹患個体において、治療の有効性は、治療された個体におけるシナプス喪失の速度と対照群におけるシナプス喪失の速度を比較することによって評価することができる。対照群のメンバーは、治療なし又はプラセボ対照などの対照治療のいずれかを受けている。

【0236】

キット

本開示はまた、本開示のヒト化抗C1q抗体又はその機能的断片を含むキットを提供する。本開示のキットは、本開示の精製されたヒト化抗C1q抗体を含む1つ以上の容器を含む。いくつかの実施形態において、キットは、本開示の方法に従って使用するための指示をさらに含む。いくつかの実施形態において、これらの指示は、本開示の任意の方法に従って、限定されないが、神経変性障害(例えば、アルツハイマー病)、炎症性疾患、自己免疫疾患及び/又は代謝性障害を含む補体活性化に関連する疾患を治療又は診断するためのヒト化抗C1q抗体の投与の説明を含む。いくつかの実施形態において、指示は、例えば、個体において、組織試料において又は細胞においてC1qを検出する方法の説明を含む。キットは、その個体が疾患及び疾患の段階を有するかどうかを同定することに基づいて、治療に適した個体を選択する説明をさらに含んでもよい。

10

【0237】

指示は、一般的に、意図された治療のための用量、投薬スケジュール及び投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ(例えば、複数用量パッケージ)又はサブユニット用量であってもよい。本開示のキットに付属される指示は、典型的には、ラベル又は添付文書(例えば、キットに含まれる紙シート)の指示書であるが、機械によって読むことができる指示(例えば、磁気又は光学記憶ディスク上に担持された指示)も許容される。

20

【0238】

ラベル又は添付文書は、組成物が、例えば、神経変性疾患を治療するために使用されることを示す。指示は、本明細書に記載されている方法のいずれかを実施するために提供されてもよい。

【0239】

30

本開示のキットは、適切なパッケージの状態にある。適切なパッケージには、限定されないが、バイアル、ボトル、ジャー、フレキシブルパッケージング(例えば、密封されたマイラー(Mylar)又はプラスチックバッグ)などが挙げられる。また、吸入器、経鼻投与デバイス(例えば、アトマイザー)又は注入デバイス、例えばミニポンプなどの特定のデバイスと組み合わせて使用するためのパッケージが企図される。キットは無菌アクセスポートを有してもよい(例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアルであってもよい)。容器はまた無菌アクセスポートを有してもよい(例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアルであってもよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は古典的補体経路の阻害剤である。容器は、第2の薬学的活性剤をさらに含んでもよい。

40

【0240】

キットは、場合により、緩衝液及び解釈的情報などの追加の要素を提供することができる。通常、キットは、容器と、容器上又は容器に関連するラベル若しくは添付文書(単数又は複数)を含む。本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. C1qタンパク質に特異的に結合するヒト化抗体であって、抗体が重鎖可変領域及びヒト重鎖定常領域を含み、重鎖可変領域がFab領域を含み、重鎖定常領域がFc領域を含み、Fab領域がC1qタンパク質に特異的に結合し、Fc領域がC1qタンパク質に結合できない、前記抗体。

2. Fc領域が補体活性を誘導できない、上記1に記載の抗体。

3. Fc領域が抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導できない、上記1又は2に記載の抗体。

50

4. ヒト重鎖定常領域がヒトIgG4重鎖定常領域である、上記1～3のいずれかに記載の抗体。

5. ヒトIgG4重鎖定常領域が、配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、上記4に記載の抗体。

6. ヒトIgG4重鎖定常領域がFc領域を含み、Fc領域が一以上の修飾を含む、上記4に記載の抗体。

7. Fc領域が一以上のアミノ酸置換を含む、上記6に記載の抗体。

8. Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にアミノ酸置換を含む、上記7に記載の抗体。

9. Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換を含む、上記8に記載の抗体。 10

10. Kabat番号付け法に従う248位のアミノ酸置換が、Fc領域のFc受容体との相互作用を阻害する、上記8又は9に記載の抗体。

11. Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にアミノ酸置換を含む、上記7～10のいずれかに記載の抗体。

12. Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にセリンからプロリンへのアミノ酸置換を含む、上記11に記載の抗体。

13. Kabat番号付け法に従う241位のアミノ酸置換が、抗体の腕部のスイッチングを妨げる、上記11又は12に記載の抗体。

14. 抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、上記1～13のいずれかに記載の抗体。 20

15. 軽鎖可変ドメインが配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、上記1～14のいずれかに記載の抗体。

16. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。 30

17. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖可変ドメインが配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

18. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び/又は

b)配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。 40

19. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

20. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号2のアミノ酸配列、又は配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

21. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号3のアミノ酸配列、又は配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

22. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

10

a)配列番号4のアミノ酸配列、又は配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号5～8から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

23. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号5のアミノ酸配列、又は配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

20

を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

24. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号6のアミノ酸配列、又は配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

25. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

30

b)配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

26. ヒト化抗C1q抗体、又はその抗原結合断片であって、抗体が

a)配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列、又は配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び

b)配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含む、前記抗体又はその抗原結合断片。

27. 抗体がヒトC1q及びマウスC1qの両方に特異的に結合する、上記1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

40

28. 抗体がラットC1qに特異的に結合する、上記1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

29. 抗体がヒトC1q、マウスC1q、及びラットC1qに特異的に結合する、上記1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

30. ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生される抗体M1又はその抗C1q結合断片と本質的に同じC1qエピトープに結合する、上記1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

31. ATCC受託番号PTA-120399を有するハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体M1のヒトC1q又はマウスC1qとの結合を阻害する、上記1～26のいずれかに

50

記載の抗体又は抗原結合断片。

3 2 . 抗体がIgGクラスのものである、上記1～3 1のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

3 3 . 抗体がIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプを有する、上記3 2に記載の抗体又は抗原結合断片。

3 4 . 抗体がIgG4アイソタイプを有する、上記3 2に記載の抗体又は抗原結合断片。

3 5 . 抗体がヒトIgG4定常領域を含む、上記3 4に記載の抗体又は抗原結合断片。

3 6 . ヒトIgG4重鎖定常領域が、配列番号37のアミノ酸配列、又は配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、上記3 5に記載の抗体又は抗原結合断片。

10

3 7 . ヒトIgG4重鎖定常領域がFc領域を含む、上記3 5に記載の抗体又は抗原結合断片。

3 8 . Fc領域がC1qタンパク質に結合できない、上記3 7に記載の抗体又は抗原結合断片。

。

3 9 . Fc領域が補体活性を誘導できない、上記3 7又は3 8に記載の抗体又は抗原結合断片。

4 0 . Fc領域が抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導できない、上記3 7～3 9のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

4 1 . Fc領域が一以上の修飾を含む、上記3 7～4 0のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

20

4 2 . Fc領域が一以上のアミノ酸置換を含む、上記4 1に記載の抗体又は抗原結合断片。

4 3 . Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にアミノ酸置換を含む、上記4 2に記載の抗体又は抗原結合断片。

4 4 . Fc領域が、Kabat番号付け法に従う248位にロイシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換を含む、上記4 3に記載の抗体又は抗原結合断片。

4 5 . Kabat番号付け法に従う248位のアミノ酸置換が、Fc領域のFc受容体との相互作用を阻害する、上記4 3又は4 4に記載の抗体又は抗原結合断片。

4 6 . Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にアミノ酸置換を含む、上記4 2～4 5のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

4 7 . Fc領域が、Kabat番号付け法に従う241位にセリンからプロリンへのアミノ酸置換を含む、上記4 6に記載の抗体又は抗原結合断片。

30

4 8 . Kabat番号付け法に従う241位のアミノ酸置換が、抗体の腕部のスイッチングを妨げる、上記4 6又は4 7に記載の抗体又は抗原結合断片。

4 9 . 抗体が二重特異性抗体である、上記1～3 4のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

5 0 . 抗体が脳透過性を増加させるように操作されている、上記1～3 4のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

5 1 . 抗体が第1の抗原及び第2の抗原を認識する二重特異性抗体である、上記1～3 4のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

5 2 . 第1の抗原がC1qタンパク質であり、第2の抗原が血液脳関門を横断する輸送を促進する抗原である、上記5 1に記載の抗体。

40

5 3 . 第2の抗原が、トランスフェリン受容体(TR)、インスリン受容体(HIR)、インスリン様増殖因子受容体(IGFR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2(LPR-1及び2)、ジフテリア毒素受容体、CRM197、ラマ単一ドメイン抗体、TMEM30(A)、タンパク質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、angiopepペプチド、並びにANG1005から選択される、上記5 1又は5 2に記載の抗体。

5 4 . 抗体結合断片がFab、F(ab')₂又はFab'断片である、上記1～5 3のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

5 5 . 抗体断片が、その対応する全長抗体と比較してより良好な脳透過性を有する、上記5 4に記載の抗体又は抗原結合断片。

5 6 . 抗体断片が、その対応する全長抗体と比較してより短い半減期を有する、上記5 4

50

又は 5 5 に記載の抗体又は抗原結合断片。

5 7 . 抗体がヒトC1qに対して約10pM未満～約5pM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する、上記 1 ～ 5 6 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

5 8 . 抗体がマウスC1qに対して約125nM未満～約5pM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する、上記 1 ～ 5 7 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

5 9 . 抗体がC1qに特異的に結合し、C1qの生物学的活性を中和する、上記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

6 0 . 生物学的活性が、(1)自己抗体へのC1q結合、(2)C1rへのC1q結合、(3)C1sへのC1q結合、(4)ホスファチジルセリンへのC1q結合、(5)ペントラキシン-3へのC1q結合、(6)C反応性タンパク質(CRP)へのC1q結合、(7)球状C1q受容体(gC1qR)へのC1q結合、(8)補体受容体1(CR1)へのC1q結合、(9)ベータ-アミロイドへのC1q結合、又は(10)カルレティキュリンへのC1q結合である、上記 5 9 に記載の抗体。

6 1 . 生物学的活性が、(1)古典的補体活性化経路の活性化、(2)抗体及び補体依存性細胞傷害の活性化、(3)CH50溶血、(4)シナプス喪失、(5)B細胞抗体産生、(6)樹状細胞成熟、(7)T細胞増殖、(8)サイトカイン産生、(9)ミクログリア活性化、(10)アルサス反応、(11)シナプス又は神経終末の食作用、又は(12)補体受容体3(CR3/C3)を発現する細胞の活性化である、上記 5 9 又は 6 0 に記載の抗体。

6 2 . CH50溶血が、ヒト、マウス、及び/又はラットCH50溶血を含む、上記 6 1 に記載の抗体。

6 3 . 少なくとも約50%～少なくとも約90%のCH50溶血を中和することができる、上記 6 1 又は 6 2 に記載の抗体。

6 4 . 150ng/未満、100ng未満、50ng未満又は20ng未満の用量で少なくとも50%のCH50溶血を中和することができる、上記 6 1 ～ 6 3 のいずれかに記載の抗体。

6 5 . 抗体がC1qと、20:1～1.0:1又は1.0:1未満の範囲の結合化学量論で結合する、上記 6 1 ～ 6 4 のいずれかに記載の抗体。

6 6 . 上記 1 ～ 6 5 のいずれかに記載の抗体をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

6 7 . 上記 6 6 に記載の核酸配列を含む、単離された宿主細胞。

6 8 . 上記 1 ～ 6 5 のいずれかに記載の抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

6 9 . そのような治療を必要とする個体における補体活性化に関連する疾患を治療又は予防する方法であって、治療有効用量の上記 1 ～ 6 5 のいずれかに記載の抗体を投与することを含む、前記方法。

7 0 . 補体活性化に関連する疾患が神経変性障害である、上記 6 9 に記載の方法。

7 1 . 神経変性障害が、シナプスの喪失又は神経接合部喪失に関連する、上記 7 0 に記載の方法。

7 2 . 神経変性障害が、補体受容体3(CR3)/C3又は補体受容体CR1に依存性であるシナプス喪失に関連する、上記 7 0 又は 7 1 に記載の方法。

7 3 . 神経変性障害が、病理学的活性依存性のシナプス刈り込みに関連する、上記 7 0 ～ 7 2 のいずれかに記載の方法。

7 4 . 神経変性障害が、ミクログリアによるシナプス食作用に関連する、上記 7 0 ～ 7 3 のいずれかに記載の方法。

7 5 . 神経変性障害が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縫内障、筋緊張性ジストロフィー、ギラン・バレー症候群(GBS)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、脊髄性筋萎縮症、ダウン症候群、パーキンソン病、及びハンチントン病から選択される、上記 7 0 ～ 7 4 のいずれかに記載の方法。

7 6 . 補体活性化に関連する疾患が、炎症性疾患、自己免疫疾患、又は代謝性障害である、上記 6 9 に記載の方法。

7 7 . 炎症性疾患、自己免疫疾患又は代謝性障害が、糖尿病、肥満、関節リウマチ(RA)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血及び再灌流後の遠隔組織傷害、心肺バイパス手術中の補

10

20

30

40

50

体活性化、皮膚筋炎、天疱瘡、ループス腎炎とその結果生じる糸球体腎炎及び血管炎、心肺バイパス、心臓麻痺に誘発される冠動脈内皮機能障害、II型膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、急性腎不全、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質症候群、慢性開放隅角縁内障、急性閉塞隅角縁内障、黄斑変性疾患、加齢黄斑変性(AMD)、(AMD-wet)、地図状萎縮、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、虚血関連網膜症、眼内炎、眼内新生血管疾患、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、 Fon - ヒッペル - リンダウ病、眼のヒストプラスマ症、視神経脊髄炎(NMO)、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜血管新生、網膜血管新生、レーベル遺伝性視神経症、視神経炎、ベーチェット網膜症、虚血性視神経症、網膜血管炎、ANCA血管炎、プルチャエル網膜症、シェーグレンドライアイ疾患、ドライAMD、サルコイドーシス、側頭動脈炎、結節性多発動脈炎、多発性硬化症、アロ移植、超急性拒絶反応、血液透析、慢性閉塞性肺窮迫症候群(COPD)、喘息並びに誤嚥性肺炎から選択される、上記 76 に記載の方法。

78. 補体活性化に関連する疾患が、重症筋無力症、1型真性糖尿病、橋本甲状腺炎、アジソン病、セリック病、クローン病、悪性貧血、尋常性天疱瘡、白斑、自己免疫性溶血性貧血、腫瘍随伴症候群、血管炎病、低補体血症性蕁麻疹様血管炎(HUV)、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎及びウェゲナー肉芽腫症から選択される自己免疫疾患である、上記 69 に記載の方法。

79. 上記 1 ~ 65 のいずれかに記載の抗体、及びそのような治療を必要とする個体において補体活性化に関連する疾患を治療又は予防するために該抗体を使用するための指示を含む添付文書を含むキット。

80. 補体活性化に関連する疾患が神経変性障害である、上記 79 に記載のキット。

81. 神経変性障害が、シナプスの喪失又は神経接合部喪失に関連する、上記 80 に記載のキット。

82. 神経変性障害が、補体受容体3(CR3)/C3又は補体受容体CR1に依存性であるシナプス喪失に関連する、上記 80 又は 81 に記載のキット。

83. 神経変性障害が、病理学的活性依存性のシナプス刈り込みに関連する、上記 80 ~ 82 のいずれかに記載のキット。

84. 神経変性障害が、ミクログリアによるシナプス食作用に関連する、上記 80 ~ 83 のいずれかに記載のキット。

85. 神経変性障害が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、縁内障、筋緊張性ジストロフィー、ダウン症候群、パーキンソン病及びハンチントン病から選択される、上記 80 ~ 84 のいずれかに記載のキット。

86. 補体活性化に関連する疾患が、炎症性疾患、自己免疫疾患又は代謝性障害である、上記 79 に記載のキット。

87. 炎症性疾患、自己免疫疾患又は代謝性障害が、糖尿病、肥満、関節リウマチ(RA)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血及び再灌流後の遠隔組織傷害、心肺バイパス手術中の補体活性化、皮膚筋炎、天疱瘡、ループス腎炎とその結果生じる糸球体腎炎及び血管炎、心肺バイパス、心臓麻痺に誘発される冠動脈内皮機能障害、II型膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、急性腎不全、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質症候群、慢性開放隅角縁内障、急性閉塞隅角縁内障、黄斑変性疾患、加齢黄斑変性(AMD)、(AMD-wet)、地図状萎縮、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、虚血関連網膜症、眼内炎、眼内新生血管疾患、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、 Fon - ヒッペル - リンダウ病、眼のヒストプラスマ症、視神経脊髄炎(NMO)、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜血管新生、網膜血管新生、レーベル遺伝性視神経症、視神経炎、ベーチェット網膜症、虚血性視神経症、網膜血管炎、ANCA血管炎、プルチャエル網膜症、シェーグレンドライアイ疾患、ドライAMD、サルコイドーシス、側頭動脈炎、結節性多発動脈炎、多発性硬化症、アロ移植、超急性拒絶反応、血液透析、慢性閉塞性肺窮迫症候群(COPD)、喘息並びに誤嚥性肺炎から選択される、上記 86 に記載のキット。

88. 補体活性化に関連する疾患が、重症筋無力症、1型真性糖尿病、橋本甲状腺炎、アジソン病、セリック病、クローン病、悪性貧血、尋常性天疱瘡、白斑、自己免疫性溶血

10

20

30

40

50

性貧血、腫瘍隨伴症候群、血管炎病、低補体血症性蕁麻疹様血管炎(HUV)、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎及びウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される自己免疫疾患である、上記79に記載のキット。

89. 上記1～65のいずれかに記載の抗体を含む診断用キット。

90. 個体におけるシナプスを検出する方法であって、

a) 上記1～65のいずれかに記載の抗体を個体に投与するステップ、及び

b) シナプスに結合した抗体を検出し、それによって個体におけるシナプスを検出するステップ

を含む、前記方法。

91. シナプスに結合した抗体が、陽電子放出断層撮影(PET)、X線コンピュータ断層撮影、単一光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、コンピュータ断層撮影(CT)及びコンピュータ軸断層撮影(CAT)からなる群から選択される画像技術を用いて検出される、上記90に記載の方法。

10

92. シナプスに結合した抗体の検出が、個体におけるシナプス数の定量的測定をもたらす、上記90又は91に記載の方法。

93. 個体が神経変性疾患又は自己免疫疾患を有する、上記90～92のいずれかに記載の方法。

94. 個体におけるシナプス数が、ある期間にわたって反復して測定され、個体におけるシナプスの喪失が経時的に検出される、上記90～93のいずれかに記載の方法。

95. 経時的なシナプスの喪失が、神経変性疾患又は自己免疫疾患に対する治療の有効性についての尺度である、上記94に記載の方法。

20

96. 生物学的試料におけるシナプスを検出する方法であって、

a) 生物学的試料を上記1～65のいずれかに記載の抗体と接触させるステップ、及び

b) シナプスに結合した抗体を検出し、それによって生物学的試料におけるシナプスを検出するステップ

を含む、前記方法。

97. ステップa)の前に、個体から生物学的試料を得るステップをさらに含む、上記96に記載の方法。

98. 生物学的試料が、生検標本、組織又は細胞を含む、上記96又は97に記載の方法

。

30

99. 抗体が、免疫蛍光顕微鏡法、免疫細胞化学、免疫組織化学、ELISA、FACS分析、免疫沈降、又はマイクロポジトロン放射断層撮影によって検出される、上記96～98のいずれかに記載の方法。

【0241】

本開示は、以下の実施例を参照することによって、より十分に理解される。しかしながら、それらは、いかなる方法においても、本開示のいかなる態様又は範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。開示全体での全ての引用文献は、本明細書に参照により明確に組み込まれる。

【実施例】

【0242】

実施例1：ヒト化抗C1q抗体の產生

導入

この実施例は、(抗ヒトC1q抗体M1を発現する)マウスハイブリドーマM1からの完全ヒト化抗体の作製を記載する。複合ヒト抗体可変領域遺伝子を、選択されたヒト配列セグメントの組み合わせをコードする合成オリゴヌクレオチドを用いて作製した。その後これらをヒトIgG4(S241P L248E)重鎖及びヒト 軽鎖をコードするベクターに組んだ。ヒト化抗体をNS0(マウスミエローマ細胞株)細胞に安定的に発現させ、プロテインA精製し、ビオチン化マウスM1抗体に対する競合ELISAアッセイを用いてヒトC1q抗体に対する結合を試験した。選択された抗体を、ビオチン化キメラ抗体に対する競合ELISAアッセイを用いてマウスC1q抗体に対する結合を試験した。

40

50

【0243】

結果

抗ヒトC1q V領域の配列決定

RNAqueousR-4PCR kit (Ambion cat. no. AM1914)を用いてM1抗体を発現するハイブリドーマ細胞ペレットからRNAを抽出した。最初に、IgG及びIg の両方に対する定常領域プライマーと共に、マウスシグナル配列に対する縮重プライマープールを用いてRT-PCRを行った。重鎖V領域RNAを、6個の縮重プライマープールのセット(HA～HF)を用いて増幅し、軽鎖V領域mRNAを、クラスターの7個の縮重プライマープールのセット(KA～KG)を用いて増幅した。

【0244】

10

VH領域については、増幅産物の予想サイズがIgGプライマープールHB及びHEにおいて見いだされた。V 領域については、増幅産物の予想サイズが プライマープールKC、KE、及び及びKGにおいて見いだされた。成功した増幅産物のそれぞれ由来のPCR産物を、精製して「TA」クローニングベクター(pGEM-T Easy, Promega cat. no. A1360)にクローニングし、配列決定した。合計14のVH及び24のV クローンを配列決定した。

【0245】

単一の機能的VH遺伝子が、IgGプールHB及びHE由来の14クローンにおいて同定された。単一の機能的V 遺伝子が、プライマープールKC由来の9クローンにおいて同定された。Ig Gプライマープールから得られた可変領域の下流の3'コーディング配列は、抗体のアイソタイプがIgGであることと一致していた。

20

【0246】

機能的VH及びV 遺伝子配列は、VH配列の最初の5アミノ酸及びV 配列の最初の2アミノ酸を除いて、ハイブリドーマ配列と同一であった。これらの相違は、配列決定の方法に依存する可能性が高く、またV領域の5'末端に縮重するプライマーでなく、シグナル配列に縮重するプライマーを用いた結果であった。

【0247】

機能的VHのアミノ酸配列は、QVQLQQPGAEVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIH PNSGSINNYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQQGTSVTVSS(配列番号21)である。VHの超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0248】

30

機能的V のアミノ酸配列は、DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFGAGTKLELK (配列番号22)である。V の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0249】

キメラ抗体の構築

マウスM1抗体のVH及びV 配列を、IgG4(S241P L248E)重鎖及び 鎮発現ベクター(図1)へのクローニングのためのフランкиング制限酵素部位を導入するプライマーを用いてPCR増幅した。BamHI、HindIII及びSspI制限部位を、遺伝子をクローニングするためにV 配列から除いた。VH領域をMluI及びHindIII部位を用いてクローニングし、V 領域をBssHII及びBamHI制限部位を用いてクローニングした。両方の構築物を配列決定により確認した。

40

【0250】

複合ヒト可変領域配列の設計

抗体の結合特性に不可欠である可能性が高いV領域の重要な「制約」アミノ酸を特定するため、マウスM1抗体V領域の構造モデルを、Swiss PDBを用いて产生し、分析した。いくつかのフレームワーク残基と共に、(Kabat及びChotiaの定義の両方を用いて)HVRに含まれる多くの残基が重要であると考えられた。M1のVH及びV 配列は、典型的なフレームワーク残基を含み、HVR1、2及び3モチーフは、多くのマウス抗体と同等であった。

【0251】

上記分析から、HVRの外側の代替残基については広い許容範囲であるが、HVR配列内の可

50

能な残基は狭いメニューでのみ、M1の複合ヒト配列が作製され得ると考えられた。予備的な分析は、いくつかのヒト抗体由来の対応配列セグメントが、マウス配列のHVRと同様又は同一のHVRを作製するために組み合され得ることを示唆した。HVRの外側及び隣接Fc領域については、ヒト配列セグメントの大規模な選択が新規なヒト化V領域の可能な構成要素であると特定された。

CD4+ T細胞エピトープ回避

構造分析に基づいて、M1ヒト化変異体を作製するために用いられ得る配列セグメントの大規模な予備セットが選択され、ヒトMHCクラスIIアレルへのペプチド結合の *in silico* 分析について、iTope™技術を用いて(Perry, LCA et al. Drugs R D. 2008;9(6):385-96)、及び既知の抗体配列関連T細胞エピトープのTCED™ T細胞エピトープデータベース(Bryson, CJ et al. BioDrugs. 2010 Feb 1;24(1):1-8)を用いて分析された。ヒトMHCクラスIIへの重要な非ヒト生殖系列バインダーとして同定された、又はTCED™に対して重要なヒットと評価された配列セグメントを除いた。これにより、上記の通り再度分析されたセグメントのセット及びこれらの組み合わせの低減がもたらされ、セグメント間のジャンクションが潜在的なT細胞エピトープを含まないことが確実となった。選択された配列セグメントを、重要なT細胞エピトープを欠く完全なV領域配列に組み立てた。その後、4つの重鎖配列(VH1~VH4)及び4つの軽鎖配列(V1~V4)遺伝子合成を、哺乳動物細胞における発現、及び活性試験のために選択した。

【0252】

ヒト化重鎖及び軽鎖可変ドメインの配列

標準的な技術を用いて、重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(V)変異体をコードするアミノ酸及び核酸配列を決定した。

【0253】

重鎖可変ドメイン変異体1(VH1)のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSY
WMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFESKATITVDKSTSTAYMQLSSLTEDSAVYYCAGERDSTEVLPMDYWG
QGTTVTVSS (配列番号1)である。VH1の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0254】

重鎖可変ドメイン変異体2(VH2)のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSY
WMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFESRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWG
QGTTVTVSS (配列番号2)である。VH2の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0255】

重鎖可変ドメイン変異体3(VH3)のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSY
WMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWG
QGTTVTVSS (配列番号3)である。VH3の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0256】

重鎖可変ドメイン変異体4(VH4)のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSY
WMHWVRQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFESRVITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWG
QGTTVTVSS (配列番号4)である。VH4の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0257】

いくつかの実施形態において、VH1、VH2、VH3、又はVH4のいずれか一つのHVR-H1は、GY
HFTSYWMH (配列番号23)の配列を有し、VH1、VH2、VH3、又はVH4のいずれか一つのHVR-H2は、VIHPNSGSINYNEKFES (配列番号24)の配列を有し、VH1、VH2、VH3、又はVH4のいずれか一つのHVR-H3は、ERDSTEVLPMDY (配列番号25)の配列を有する。

【0258】

重鎖可変ドメイン変異体1(VH1)をコードする核酸配列は、CAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGGGGC
TGAGCTGAAGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGGTTCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTCACCAGCTACTGGATGCACT

10

20

30

40

50

GGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCTCTAAATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAG
AAGTTGAGAGCAAGGCCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGA
GGACTCGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCA (配列番号26)である。

【0259】

重鎖可変ドメイン変異体2(VH2)をコードする核酸配列は、CAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGGGGC
TGAGCTGAAGAACGCTGGGCTTCAGTGAAGGTTCTGCAAGTCTCTGGCTACCATTCACCAGCTACTGGATGCACT
GGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCTCTAAATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAG
AAGTTGAGAGCAGAGCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCA
CGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号27)である。 10

【0260】

重鎖可変ドメイン変異体3(VH3)をコードする核酸配列は、CAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGGGGC
TGAGCTGAAGAACGCTGGGCTTCAGTGAAGGTTCTGCAAGTCTCTGGCTACCATTCACCAGCTACTGGATGCACT
GGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCTCTAAATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAG
AAGTTGAGAGCAGAGTCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCA
CGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号28)である。

【0261】

重鎖可変ドメイン変異体4(VH4)をコードする核酸配列は、CAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGGGGC
TGAGCTGAAGAACGCTGGGCTTCAGTGAAGGTTCTGCAAGTCTCTGGCTACCATTCACCAGCTACTGGATGCACT
GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCTCTAAATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAG
AAGTTGAGAGCAGAGTCACAATTACTGTAGACAAATCCACCAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCA
CGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号29)である。 20

【0262】

軽鎖可変ドメイン変異体1(V 1)のアミノ酸配列は、DVQITQSPSYLAASLGERATINCRASKSI
NKYLAWYQQKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFQGQTKLEIK (配列番号5)である。V 1の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0263】

軽鎖可変ドメイン変異体2(V 2)のアミノ酸配列は、DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSI
NKYLAWYQQKPGKANKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFQGQTKLEIK (配列番号6)である。V 2の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。 30

【0264】

軽鎖可変ドメイン変異体3(V 3)のアミノ酸配列は、DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSI
NKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFQGQTKLEIK (配列番号7)である。V 3の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0265】

軽鎖可変ドメイン変異体4(V 4)のアミノ酸配列は、DIQLTQSPSSLSASLGERATINCRASKSI
NKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFQGQTKLEIK (配列番号8)である。V 4の超可変領域(HVR)は、太字及び下線を付した文字で示す。 40

【0266】

いくつかの実施形態において、V 1、V 2、V 3、又はV 4のいずれか一つのHVR-L1は、RASKSINKYLA (配列番号30)の配列を有し、V 1、V 2、V 3、又はV 4のいずれか一つのHVR-L2は、SGSTLQS (配列番号31)の配列を有し、V 1、V 2、V 3、又はV 4のいずれか一つのHVR-L3は、QQHNEYPLT (配列番号32)の配列を有する。

【0267】

V 軽鎖可変ドメイン変異体1(V 1)をコードする核酸配列は、GATGTCCAGATCACACAGTCTC
CATCTTATCTGCTGCATCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATCTTAGCC
TGGTATCAACAGAAACCTGGAAAATAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTTGCAATCTGGAATTCCAGCAAG 50

GTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACT
GTCACAAACATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (配列番号33)である。

【0268】

Ⅴ 軽鎖可変ドメイン変異体2(V 2)をコードする核酸配列は、GATGTCCAGATCACACAGTCTC
CATCTTCCCTTCTGCATCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCC
TGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTAATAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTGCAATCTGGAATTCCAGCAAG
GTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACT
GTCACAAACATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (配列番号34)である。

【0269】

Ⅴ 軽鎖可変ドメイン変異体3(V 3)をコードする核酸配列は、GATGTCCAGATCACACAGTCTC
CATCTTCCCTTCTGCATCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCC
TGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTGCAATCTGGAATTCCAGCAAG
GTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACT
GTCACAAACATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (配列番号35)である。

【0270】

Ⅴ 軽鎖可変ドメイン変異体4(V 4)をコードする核酸配列は、GATATTCAAGCTCACACAGTCTC
CATCTTCCCTTCTGCATCTCGGAGAAAGAGCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCC
TGGTATCAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTGCAATCTGGAATTCCAGCAAG
GTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACT
GTCACAAACATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (配列番号36)である。

【0271】

ヒトIgG4 (S241P L248E)重鎖定常ドメインの配列

標準的な技術を用いて、ヒトIgG4 (S241P L248E)重鎖定常ドメイン(すなわち、CH1、CH
2、CH3、及びヒンジ領域)をコードするアミノ酸及び核酸配列を決定した。

【0272】

ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖定常ドメインのアミノ酸配列は、ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSLGTKTYTCNVDPKNSNTKVDKRVESKY
PPC₁PPCPA₂PEF₃EGGPSVFLFPPKPKDTLM₄ISRTPEVTCV₅VDV₆SQEDPEVQFNWYVDGVEVHN₇AKTPREEQFN₈STYRV₉
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS₁₀IEKT₁₁ISAKGQPREPQVYTLPPS₁₂QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD₁₃IAVEWES
NGQPENNYK₁₄TPPVLDSDGSFFLYSRLTV₁₅DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN₁₆HTQKSLSLGK (配列番号37)で
ある。241P変異及びL248E変異は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0273】

ヒトIgG4(S241P L248E)CH1のアミノ酸配列は、ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
TVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSLGTKTYTCNVDPKNSNTKVDKRV (配列番号38)である。

【0274】

ヒトIgG4(S241P L248E)ヒンジ領域のアミノ酸配列は、ESKYGPPC₁PPCP (配列番号39)である。
S241P変異は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0275】

ヒトIgG4(S241P L248E)CH2のアミノ酸配列は、APEF₁EGGPSVFLFPPKPKDTLM₂ISRTPEVTCV₃VDV₄
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHN₅AKTPREEQFN₆STYRV₇SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS₈IEKT₉ISAK (配列
番号40)である。L248E変異は、太字及び下線を付した文字で示す。

【0276】

ヒトIgG4(S241P L248E)CH3のアミノ酸配列は、GQP₁REPQVYTLPPS₂QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYK₃TPPVLDSDGSFFLYSRLTV₄DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN₅HTQKSLSLGK (配列番
号41)である。

【0277】

ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖定常ドメインをコードする核酸配列は、GTAAGCTTCTGGGGCA
GGCCGGGCCTGACTTTGGCTGGGGCAGGGAGGGGCTAAGGTGACGCAGGTGCCAGCCAGGTGACACCCAAATGCC
CATGAGCCCAGACACTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCAGCT

10

20

30

40

50

CTGTCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTTGCAGCTTCCACCAAGGGCCATCCGTCTCCCCCTGGCGCCCT
GCTCCAGGAGCACCTCGAGAGCACAGCCGCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGGTGCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGAC
GCACCCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCATCTGTCCTCACCTGGAGGGCTCTGACCACCC
CACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACAGGCTCCGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCAGG
CCCTGCGCATACAGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAACGC
CACCCCCAAGGCCAAACTCTCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCCTCCAGATCTGAGTAACCTCAATCTTCTC
TCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTGCCCTCAGCTCAAGGCG
GGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCAGGGTGTGACGCATCCACCTCCATCTTCCCTA
GCACCTGAGTCGAGGGGGGACCATCAGTCTCCTGTTCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCC
TGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCCCTACCGTCTGCAC
CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGGCCCTCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAGGTGGGACCCACGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGTCACTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGAGTG
ACCGCTGCCAACCTCTGCTTACAGGGCAGCCCCAGAGGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCTACCGAGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCTGGTAAAGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCTACAGCAGGCTAAC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTGGGTAAA (配列番号42)である。

【 0 2 7 8 】

ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖CH1をコードする核酸配列は、CTTCCACCAAGGGCCATCCGCTTC
CCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCGGCTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG (配列番号43)である。

【 0 2 7 9 】

ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖ヒンジをコードする核酸配列は、AGTCCAAATATGGTCCCCATGC
CCACCATGCCAG (配列番号44)である。

【 0 2 8 0 】

ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖CH2をコードする核酸配列は、CACCTGAGTCGAGGGGGGACCATCA GTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGT GAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAG (配列番号45)である。

〔 0 2 8 1 〕

ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖CH3をコードする核酸配列は、GGCAGCCCCGAGAGGCCACAGGTTAC
ACCCCTGCCCTCATCCCAGGAGGAGATGCCAAGAACCGAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCT
CCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGGCCCTCCCTGTCTGGTAAA (配列番号46)である。

〔 0 2 8 2 〕

図2は、M1の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列とヒト化変異体VH1～VH4のアミノ酸配列のアライメント、並びにM1の軽鎖可変領域(V)のアミノ酸配列とV 变異体V 1～V 4のアミノ酸配列のアライメントを示す。

[0 2 8 3]

複合ヒト抗体変異体の構築

M1の全ての変異体VH及びV領域遺伝子を、アニーリングし、ライゲーションし、PCR増

幅した重複オリゴヌクレオチドのシリーズを用いて合成し、任意の制限部位を除いた全長合成V領域を得た。IgG4 (S241 L248E)重鎖及び 軽鎖のために、組み立てた変異体をpANT発現ベクターシステムに直接クローニングした(図1)。VH領域をMluI及びHindIII部位を用いてクローニングし、V 領域をBssHII及びBamHI制限部位を用いてクローニングした。全ての構築物を、配列決定により確認した。

【 0 2 8 4 】

抗体の発現及び精製

合計16のヒト化抗体を、エレクトロポレーションによりNS0細胞に安定的にトランスフェクションした。さらに、二つの対照 - 変異体V 1を有するキメラVH(ChVH)及びキメラV を有する変異体VH1(ChV) - と共にキメラ抗体M1を含めた。安定なトランスフェクタントを200nMメトトレキサート(Sigma Cat. No. M8407)を用いて選択した。各構築物について、メトトレキサート耐性コロニーをIgGELISAを用いてIgG発現レベルについて試験し、最も発現する株を選択し、増殖させて液体窒素下で凍結させた。16のヒト化M1変異体並びにキメラM1、ChVH/V 1及びVH1/ChV 抗体の全てについて、首尾よくトランスフェクション及び安定なクローン選択が達成された。各細胞株の同一性を、ゲノムDNAからの可変ドメインのDNA配列決定によって確かめた。

【 0 2 8 5 】

抗体を、細胞培養上清からプロテインAセファロースカラム(GE Healthcare cat. no. 10034-93)により精製し、PBS、pH 7.4にバッファー交換し、予測アミノ酸配列に基づく透過係数を用いてOD_{280nm}によって定量した。キメラ及びヒト化変異体IgGを、還元SDS-PAGEによって分析した。VH及びV 鎮の予測サイズに対応するバンドを観察し、凝集、分解又は他の異常な特徴のいずれの証拠も観察されなかった(図3)。

【 0 2 8 6 】

ヒトC1q抗原に対する競合ELISA

ヒトC1qに対するヒト化M1変異体への結合を、競合ELISAにより分析した。試験抗体の3倍希釈系(5 μg/ml ~ 0.002 μg/ml)を、一定濃度のビオチン化マウスM1抗体(最終濃度、0.02 μg/ml)と事前混合した後に、1.0 μg/mlのヒトC1qで事前コーティングしたプレート上で振盪しながら1時間37 でインキュベートした。マウスM1抗体の結合を、ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート(Sigma-Aldrich cat. no. S5512)及びTMB (3,3',5,5' - テトラメチルベンジジンtetramethylbenzidine)基質(Thermo Scientific cat. no. 34029)で検出した。反応を1M HClで停止させ、Dynex Technologies MRX TC IIプレートリーダーの450nmの吸光リード及び結合曲線をプロットした。

【 0 2 8 7 】

図4は、作製した全てのヒト化M1変異体が、キメラM1抗体に対して同様の結合プロファイルを有することを示している。結合曲線を用いて、キメラM1のIC50に標準化した各抗体のIC₅₀値(標識した競合物質の結合を50%阻害する試験抗体の濃度)を計算し、NS0トランスフェクタントからの抗体収率も比較した(表1)。

【 0 2 8 8 】

表1:ヒトC1qに対する相対IC₅₀値及びタンパク質発現レベル

抗体	相対IC ₅₀	発現レベル(μg/ml)
キメラM1	1.00	12.6
ChV1/Vκ1	1.09	7.0
VH1/ChVκ	0.92	11.9
VH1/Vκ1	0.90	14.0
VH1/Vκ2	0.84	14.5
VH1/Vκ3	0.91	28.9
VH1/Vκ4	0.80	22.6
VH2/Vκ1	1.15	1.4
VH2/Vκ2	1.12	3.8
VH2/Vκ3	0.75	21.3
VH2/Vκ4	0.72	6.1
VH3/Vκ1	0.65	16.9
VH3/Vκ2	0.82	8.7
VH3/Vκ3	0.63	19.8
VH3/Vκ4	0.83	32.2
VH4/Vκ1	1.03	8.5
VH4/Vκ2	0.84	1.6
VH4/Vκ3	0.77	18.3
VH4/Vκ4	0.92	2.4

表1は、ヒトC1qに対するヒト化M1変異体の結合の計算された相対IC₅₀値及び対応するNS0細胞株のタンパク質発現レベルを示す。

【0289】

全ての試験した変異体についての標準化IC₅₀データは、0.63～1.15の範囲であり、これは全ての完全ヒト化M1抗体のC1qへの結合能が、キメラMの結合能と同等であったことを示唆している。さらに、多くのヒト化変異体は、キメラ抗体に比べて発現レベルの増加を達成した。

マウスC1q抗原に対する競合ELISA

マウスC1qに対するヒト化M1変異体への結合を、4つの選択された抗体、VH1/V 1、VH3/V 3、VH3/V 4及びVH4/V 3について、競合ELISAにより分析した。関連するIgG4 (S241P L248E)抗体も、結合対象として含めた。試験抗体の3倍希釈系(100 μg/ml～0.046 μg/ml)を、一定濃度のビオチン化キメラM1抗体(最終濃度、0.03 μg/ml)と事前混合した後に、5.0 μg/mlのマウスC1qで事前コーティングしたプレート上で振盪しながら1時間37℃でインキュベートした。キメラM1抗体の結合を、ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート(Sigma-Aldrich cat. no. S5512)及びTMB基質(Thermo Scientific cat. no. 34029)で検出した。反応を1M HClで停止させ、Dynex Technologies MRX TC IIプレートリーダーの450nmの吸光リード及び結合曲線をプロットした。

【0290】

図5は、作製した全てのヒト化M1変異体が、キメラM1抗体に対して同様の結合プロファイルを有することを示している。結合曲線を用いて、キメラM1のIC₅₀に標準化した各抗体のIC₅₀値を計算した(表2)。

【0291】

10

20

30

40

表2: マウスC1qに対する結合の相対IC₅₀値

抗体	相対IC ₅₀
キメラM1	1.00
VH1/Vκ1	1.62
VH3/Vκ3	1.50
VH3/Vκ4	1.91
VH4/Vκ3	1.84

10

表2は、マウスC1qに対するヒト化M1変異体の結合の計算した相対IC50値を示す。

【0292】

結論

マウス抗体M1由来のV領域遺伝子をベクターにクローニングし、ヒトIgG4(S241P L248E)重鎖定常領域及び 軽鎖定常領域と組み合わせてマウスV領域を含むキメラ抗体を作製した。さらに、IgG4(S241P L248E)について一連の4つのヒト化VH領域及び4つのヒト化V 領域を設計し構築した。

【0293】

キメラ抗体及びヒト化V領域遺伝子の組み合わせ(計16抗体)をNS0細胞で発現させ、精製し、競合ELISAアッセイにおいてヒトC1qへの結合を試験した。結合データ(表1)を、キメラM1抗体と比較したヒト化M1変異体をランク付けするために用いた。重鎖及び軽鎖バンドの質のSDS-PAGEによる有意な変化は全く検出されなかった。

20

【0294】

実施例2: ヒト化抗C1q抗体VH3/V 3導入の動態学的な特徴づけ

免疫学的バイオセンサー、例えば、リアルタイムで抗原抗体複合体の結合及び解離を測定するBiacoreTM表面プラズモン共鳴(SPR)装置は、結合動態の解明を可能とする。解離速度及びその後の最適化は、生物医薬抗体の開発にとって特に重要である。

【0295】

Biacoreは、SPRを用いて表面結合分子「リガンド」と溶液中のその結合パートナー「アナライト」の相互作用をリアルタイムで測定する。SPRは、全内部反射の条件で光が層に反射される場合の、金属層の表面に生じる電子の電荷密度波現象である。生成される表面プラズモンは、反射された光から金属層の逆側の培地の屈折率の何らかの変化に感受性である。表面で生じるタンパク質 - タンパク質相互作用は、培地の屈折率に影響し、それゆえ検出され得る。分子のリガンド修飾センサー表面への結合は応答を生成し、これが検出される結合したアナライトの量のわずかな変化(低ピコグラムレベルまで)を可能とする結合質量に比例する。この技術は、 10^{-5} M ~ 10^{-12} Mを超える親和定数(K_D)、 10^3 M⁻¹s⁻¹ ~ 10^7 M⁻¹s⁻¹の会合速度定数(k_a)、及び 10^{-1} s⁻¹ ~ 10^{-6} s⁻¹の解離速度定数(k_d)を測定するために用いられ得る。

30

【0296】

この技術は、わずかな量の物質のみを必要とし、相互作用する生物分子の両方が、非標識形態で用いられ得る。実験設計は重要であるが、本技術のいくつかの特徴、及び一つのタンパク質を表面に付着させなければならないという事実のため、誤解させる結果が生じ得る(Huber and Mueller, Curr Pharm Des. 2006;12(31):3999-4021; and Lakey and Rargett, Curr Opin Struct Biol., 1998. 8(1): p. 119-123)。

40

【0297】

この実施例は、高解像度のための、Biacore T200表面プラズモン共鳴装置を用いた、ヒト化抗C1q抗体VH3/V 3(いずれもFab断片及び全長IgG)とC1qタンパク質の相互作用の動態学的な特徴づけを記載する。

【0298】

材料及び方法

50

サンプル

この実施例で用いた試薬は、表3に記載する。

【0299】

表3:サンプル

サンプル	濃度(mg/ml)と容量
IgG-VH3/V κ 3	1.2 mg/ml で 400 μ l
Fab-VH3/V κ 3	0.3 mg/ml で 450 μ l
マウス C1q	1.0 mg/ml で 4 x 50 μ l
ヒト C1q	1.0 mg/ml で 10 x 50 μ l

10

マウス及びヒトC1qを、一旦解凍した後は +4°で保管した以外は-80°で保管した。Fab及びIgG VH3/V κ 3を +4°で保管した。一旦希釈したら、C1q溶液を氷上で保ち、24時間以内に用いた。

【0300】

装置

Biacore T200 Evaluation Software V1.1 (Uppsala, Sweden)を実行するBiacore T200装置(SN: CN 12231)を用いた。

【0301】

20

材料

以下の材料を、以下の通りBiacoreから得た：

Biacore Preventative Maintenance Kit 2:BR-1006-51, Lot No. 164110

Series S CM5センサーチップ: BR-1006-68, Lot No. 10102398

アミンカップリングキット: BR-1000-50, Lot No. 2027942/41

10 mM アセテート pH 5.0: BR-1003-51, Lot No. 21702813

HBS-EP ランニングバッファー: BR-1006-69, Lot No. 2027942/59

BSAは、Sigma (A3294)から得た。

【0302】

手順

30

全ての実施例を、Biacore ‘wizard’ softwareを用いて展開した。以下のBiacore法を用いた：

固定

動態 / 親和性

脱着及び洗浄

【0303】

結果

VH3/V κ 3 Fab 調製

抗C1qヒト化抗体VH3/V κ 3のFab断片を、Fab Micro Preparation Kitを用いて製造業者の指示に従って調製した。全長IgG VH3/V κ 3の開始濃度は1.88 mg/mlであった。十分な量のFab断片を得るために、各全長IgGの225 μ gの6反応を消化し、プールし、かつ精製した。精製したFab及び全長IgGを、Superdex 200 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare Cat. No. 28-9909-44)を用いて、1x PBSをランニングバッファーとして用いてサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。予測アミノ酸配列に基づく透過係数(EC_{0.1%})を用いてOD_{280 nm}によってサンプルを定量した(EC_{0.1%}) = IgG VH3/V κ 3については1.45、及びFab VH3/V κ 3については1.4)。両方のサンプルを、非還元及び還元SDS-PAGEによって分析した(図6)。図6は、ゲルろ過精製抗体のクマシープルー染色SDS-PAGEゲルを示す。各サンプル1 μ gをNuPage 4-12% Bis-Trisゲル(Invitrogen Cat. No. NP0322BOX)に供し、200Vで35分間泳動した。サイズマーカー(M)は、事前染色タンパク質スタンダードのFermentas PageRuler Plus (Cat. No. SM1811)である。レーン1は還元VH3/V κ 3 Fabを示し

40

50

、レーン2は非還元VH3/V 3 Fabを示し、レーン3は還元VH3/V 3 IgGを示しレーン4は非還元VH3/V 3 IgGを示す。

【0304】

抗原調製

マウスC1q(mC1q)及びヒトC1q(hC1q)抗原のサンプルを-80°で保管し、最初の解凍時に複数の一定分量を調製し、再凍結し、-80°で保管した。HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4及び150 mM NaCl、3 mM EDTA及び0.05% (v/v) P20)へのアナライトのさらなる希釈を、動態学的なランのために実施した。

【0305】

装置の準備

10

いずれかのサンプルを流す前に、そして試験の間、システムチェック(Biacore Preventative Maintenance Kit 2)を実施した。全ての試験をパスし(試薬ポンプ、屈折系、注入、ノイズ、混合及びバッファーセレクター)、これは製造業者によって設定された基準まで装置が稼働していたことを示す。

【0306】

システム準備

CM5チップの挿入時に、システムがプライムされ、その後BIA標準化溶液で標準化された(Biacore Preventative Maintenance Kit 2)。全てのサンプルを、10°でインキュベートしたサンプルラックと共に25°で供した。チップを、ランニングバッファーとしてHBS-EPを用いるシステムに加えた後に固定化し、チップ表面を50mM NaOHの2回の注入でプライムした。

20

【0307】

固定状況

安定性に関する懸念のため、2つのチップを準備した：一つはリガンドとしてhC1q及びmC1qを有するもので(チップA11)、一つはリガンドとしてIgG及びFab(チップA13)を有するものである。m/h C1qの固定を、10 mMアセテートバッファー、pH 5.5中で5 μg/mlのタンパク質濃度で実施し、IgG及びFabの固定を、10 mMアセテートバッファー、pH 5.5中で0.5~2 μg/mlのタンパク質濃度で、いずれもCM5シリーズSセンサーチップ(Biacore)上で行った。動態学的分析において用いたチップA11及びA13の最終応答レベルを、表4に示す。

【0308】

30

表4:最終応答レベル (RU)

	F _c 1	F _c 2	F _c 3	F _c 4
A11	ブランク	hC1q 808.3	mC1q 801.3	mC1q 824.1
A13	ブランク	Fab 10.4	IgG 12.8	IgG 51.9

【0309】

40

表4は、各フローセル(Fc)において、チップA11及びA13から達成された最終固定レベルを示す。

【0310】

動態学的実験について、固定 / キャプチャーされたリガンドの量は、チップの表面の質量転移効果を避けるために制限されるべきであり、表面は理想的には100~150応答ユニット(RUs)のアナライト最大結合応答(R_{max})を有するべきである。したがって、固定化するためのリガンドの量は、式1を用いて計算される：

【数1】

$$\text{アナライト結合能(RU)} = \frac{\text{アナライト Mw}}{\text{リガンド Mw}} \times \text{固定化リガンド(RU)} \times Sm$$

【0311】

平均MWでmC1q及びhC1qの両方について410kDa、IgGについて150kDa(抗体についての推定値)、及びFabについて50 kDa(推定)が用いられた。R_{max}について100 RU、及び化学量論(Sm)において1を目標とすると、固定するためのC1qの理想的な標的量は、~820 RUであろう。Fab及びIgG固定化表面への結合に関連する懸念のために、固定化リガンドの量を最大限低く保った(ビアコア固定ソフトウェアにおいて10 RUの制限)。 10

【0312】

非特異的結合(NSB)対照

非特異的結合は、リガンド(非特異的であり検出するのが難しい)、キャプチャタンパク質、又はセンサーチップ表面と相互作用するアナライト又はアナライト汚染物質のいずれかに起因し得る。相対的な高濃度(500 nM)の、mC1q及びhC1qの両方の300秒注入後にブランクFc₁表面の応答を分析した場合、有意な非特異的結合(NSB)が観察された。したがって、追加のブロッキング工程、50 μg/ml BSA(10 mMアセテートpH 4.25)のポストリガンド固定を含めた(Moore et al., MAbs. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9)。BSAブロッキング工程も、参照チャネルにおいて反復した(Fc1)、両方について、固定化レベルは~8000 RUであった。CM5表面で500nMでFab、又はIgGを用いるとNSBは観察されず、動態学的ランにおいて用いた濃度では、BSAブロッキングした表面に対するNSBは認められなかった。 20

【0313】

再生スカウティング

必要であれば、1 M NaCl / 50 mM NaOHの一回注入又は二回の連続30秒注入が、全ての表面を再生するために用いられた。次の結合サイクルを開始する前に、表面の安定化を可能とする最後の再生中の後に、180秒のウェイト工程を導入した。 30

【0314】

表面性能

表面の性能を、動態学的ランの最初、散在的、及び終了時にアナライトの反復対照注入によって分析した。安定的な結合が、典型的に動態学的ランを通して観察され、これは動態学的分析のためのシステムの適合性を強調している。 30

【0315】

質量移行対照

解離速度が、チップ表面までの及びチップ表面からのアナライトの輸送速度に関連する重要な要素を含む場合、質量輸送制限が生じる。質量輸送が有意であると認められる場合、得られる動態学的分析は、不正確であり得る。固定化リガンドの密度を低下させること、又はフロー速度を増加させることによって、質量輸送制限を低減し得る。低密度表面及び同様のMW抗原を用いる以前の実験から、40 μL/minのフロー速度がこの試験のために選択された。 40

【0316】

連結反応対照

連結反応対照実験を、リガンド - アナライト相互作用を評価し、1と1の結合モデルからの偏差をチェックするために用いた。アナライトを異なる時間(コンタクト時間)で表面に注入し、解離速度を分析して、コンタクト時間に応じて異なるかを決定した。そのような関係が観察される場合、最初の結合事象の後に第二の相互作用事象が生じ、これが表面の安定化複合体をもたらすことを示唆している。

【0317】

単一hC1q結合二抗体に関連する結合活性は、抗体をリガンドとして用いた場合に予想され得る。したがって、より複雑なデータ分析モデルを支持する証拠をもたらすために、連 50

結反応対照を実施した。

【0318】

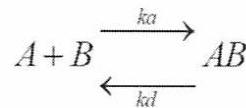
動態学的解析

最初にリガンド／複合体相互作用についてA 1:1結合モデルを仮定した(式2を参照されたい)。リガンド活性及びベースライン(BSAプロック表面)のドリフトのため、選択された動態学的解析のための全体的な解析に対して、パラメーター R_{max} を局部的に設定した。必要であれば、不均一リガンド(式3を参照されたい)及び2価結合(式4を参照されたい)などのさらなるモデルを、適合の良好性について評価した。

【0319】

式2：1対1結合：

【数2】



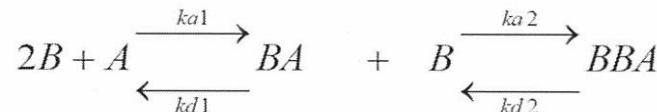
式3：不均一リガンド：

【数3】



式4：2価(結合活性)：

【数4】



【0320】

抗体の特徴づけ

両方のC1q複合体を、結合活性に対する懸念に基づいて固定化し(すなわち、C1qに結合する2つの固定化抗体)、mC1q抗体を用いて非常に高いレベルの、それよりは低い程度でhC1qのCM5表面へのNSBが観察された(電荷媒介推定 C1q: pI 8-9)。C1q複合体の安定性及び再生条件に対する不確かさのため、単一サイクル動態(SCK)を、推定動態学的定数を導くために最初に用いた。完全動態学的解析をSCKの後に実施した。動態学的ランの間に実施したリガンド安定性対照注入は、用いた再生条件がリガンドを不活性化していたこと、又はリガンド自身が動態学的解析に必要な48時間の間²⁵で不安定であったことを示唆した。mC1qによって示されたFabに対するより低い親和性は、表面の再生なしで動態学的解析を行うことを可能にした。

【0321】

安定性の問題のため、潜在的な結合活性を除くためにリガンドの量を最小限にしながら、Fab及びIgGの両方を動態学的解析のリガンドとして用いた。

【0322】

潜在的な質量移行効果を最小化するために40 μ L/minの流速で動態学的データを得た。プランク(抗原なし)の2反復及び単一濃度のアナライトを、動態学的サイクルに対する表面及びアナライトの両方の安定性をチェックするために動態学的ランにプログラミングした。最初の動態学的ランのために、3.33倍希釈アナライトをランした。次のランに対する動態学的解析のために、2倍希釈範囲を選択した。

【0323】

会合フェーズを500秒間モニターし、いくつかの高濃度のアナライトを定常状態に達さ

10

20

30

40

50

せた。動態学的サイクルの解離フェーズの間の有意なシグナル減少(10%)を観察するために、解離を最大10800秒モニターし、動態の正確な分析の為に十分な解離を起こさせた。参照チャネル F_c 1からのシグナルを、 F_c 2、 F_c 3、及び F_c 4のシグナルから引いた。

【 0 3 2 4 】

様々なアッセイフォーマットにおけるmC1qとVH3/V 3のFabフラグメントの相互作用の動態学的パラメータを表5に示す。アナライトとして用いた場合のmC1qの K_D 値は123 nMであり、リガンドとして用いた場合のmC1qの K_D 値は677nMであった。報告したKD値の差は、タンパク質の二次又は三次構造に変化をもたらす相互作用の様式又はmC1qの複数ユニットの表面への化学的結合の効果に由来し得る。

【 0 3 2 5 】

10

表 5:マウス C1q を用いる動態学的解析

リガンド	アナライト	k_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/S)	SE (k_d)	R_{max} (RU)	SE (R_{max})	Chi^2 (RU ²)	K_D (nM)
mC1q	Fab	6.23×10^3	1.4×10^2	4.6×10^{-3}	1.7×10^{-5}	37.0	0.6	0.8	747.9
	VH3/V κ 3	6.9×10^3	2.4×10^2	4.1×10^{-3}	1.0×10^{-4}	33.4	0.5	0.9	606.6
	平均	6.5×10^3		4.3×10^{-3}		35.2			677.3
	Std	5.0×10^2		3.1×10^{-4}		2.6			99.9
Fab	mC1q	4.5×10^5	2.6×10^4	5.6×10^{-2}	3.4×10^{-3}	88.6	0.6	1.9	125.6
		1.7×10^5	1.8×10^3	9.1×10^{-3}	5.4×10^{-5}	50.0	0.3	5.6	121.2
	平均	3.1×10^5		3.2×10^{-2}		69.3			123.4
	Std	2.0×10^5		3.3×10^{-2}		27.3			3.1

【 0 3 2 6 】

表5は、Biacore T200を用いて決定したmC1qとFabの1対1相互作用の動態学的パラメータを示す。 Chi^2 値は、会合及び解離データが、どの程度提案結合モデルと適合しているかを示す。値が低いほど、適合が優れている。速度定数に対する会合SE値は、データを記載したモデルに適合するのに付随する不正確性を表しており、真の動態学的値の全体的な不正確性を表しているものではない。平均応答データは、平均動態学的値、及び2つの独立解析に由来する関連するSDを表す。

【 0 3 2 7 】

hC1qに対するIgG及びFabの両方の相互作用の動態学的パラメータは、低ピコモラー範囲であった(1対1モデルについては表6、及び不均一モデルについては表7)。結合活性を除くために、hC1qを最初リガンドとして用いたが、これは解析を単一サイクル動態に限定し、複数サブユニットタンパク質の表面への化学的結合に関連するhC1q構造の異なる形態を表し得る、例えば不均一リガンド結合モデル(式3)などのより複雑なモデルの使用を限定する。hC1qをアナライトとして用いた場合は、IgG及びFabの両方が結合活性を除くために可能な限り低い濃度で固定化された。データを、1対1モデル及びより複雑な二価アナライトモデルを用いて解析した(式4)。複合モデルフィッティングはフィッティングの測定基準を優位に改善しなかったし、連結反応対照は時間依存的解離フェーズを示さなかった。結果は、低リガンド密度では、結合活性によらない結合が支配的であったことを示した。hC1qをアナライトとして用いた場合には、全長VH3/V 3 IgGに対するKD値は5.8 pMであり、VH3/V 3 Fabに対するKD値は8.6であった。この技術では、解離速度は正確に測定するためには遅すぎたことに留意されたい。より長い解離時間は、システム(BSAブロッキング層)の安定性及び結合活性を避けるために用いた低レベルの結合によって制限された。これらの結果は、hC1qをリガンドとして用いた場合に得られた結果とよく相關していた。

【 0 3 2 8 】

20

30

40

表6:ヒトC1qを用いた動態学的解析

リガンド	アナライト	k_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/S)	SE (k_d)	R_{max} (RU)	SE (R_{max})	Chi^2 (RU ²)	K_D (pM)
hC1q	Fab VH3/V κ 3	5.2×10^4	82	4.6×10^{-8}	1.3×10^{-7}	154.9	0.033	14.8	0.87
	IgG VH3/V κ 3	3.9×10^4	96	3.1×10^{-7}	5.3×10^{-8}	387.9	0.11	206	7.9
Fab VH3/V κ 3	hC1q	1.1×10^6	190	9.1×10^{-6}	1.4×10^{-8}	13.5	0.0015	0.0773	8.6
IgG VH3/V κ 3	hC1q	9.6×10^5	360	6.4×10^{-6}	2.9×10^{-8}	6.5	1.5×10^{-3}	0.076	6.7
		1.1×10^6	190	5.1×10^{-6}	1.4×10^{-8}	17.4	0.002	0.143	4.9
	平均	1.0×10^6		5.8×10^{-6}					5.8
	Std	6.2×10^4		9.1×10^{-7}					1.3

【0329】

表6は、Biacore T200を用いて決定したhC1qとFab、又はIgGの1対1相互作用の動態学的パラメータを示す。説明は表5と同様である。赤で強調したデータは、貧弱な適合基準を示し、したがってこれらのデータを、より複雑なモデルを用いて解析した(表7)。

【0330】

表7:不均一リガンド相互作用の動態学的解析

リガンド	アナライト	k_a1 (1/Ms)	k_d1 (1/S)	k_a2 (1/Ms)	k_d2 (1/S)	R_{max1} (RU)	R_{max2} (RU)	Chi^2 (RU ²)	K_D1 (nM)	K_D2 (nM)
hC1q	Fab VH3/V κ 3	1.3×10^5	2.3×10^{-5}	1.8×10^4	6.3×10^{-8}	80.3	78.7	0.1	175.0	3.4
	IgG VH3/V κ 3	2.0×10^5	4.6×10^{-6}	1.6×10^4	1.1×10^{-7}	152.6	247.1	2.41	22.7	7.3

【0331】

表7は、Biacore T200を用いて決定したhC1qとFab、又はIgGの不均一リガンド相互作用の動態学的パラメータを示す。説明は表5と同様である。

データの不均一リガンドモデルへの適合は、表面への複数サブユニットタンパク質の固定化の予測不均一性を表す。

【0332】

結論

hC1q及びmC1qとVH3/V κ 3の全長IgG及びFab断片との相互作用を、両方の種をリガンドとして用いて解析した。安定性及びCM5デキストラン表面へのC1q複合体の化学的結合の問題により、IgG及びFab表面の開発が必要であった。結果は、該表面で観察された結合モードが主に1対1であったこと、すなわち動態学的プロフィールが結合活性のサインを示さなかつことを示した。VH3/V κ 3の全長IgG及びFab断片の両方が、hC1qに対して低ピコモラーランクでタイトな結合を示したが(それぞれ5.8及び8.6 pM)、VH3/V κ 3のFab断片に対してmC1qに対する低アフィニティーが観察された(123 nM)。

【0333】

実施例3:ヒト化抗C1q抗体は補体媒介溶血を阻害する

ヒト化抗C1q抗体を、ヒト及びロバ溶血アッセイ(CH50)で、そのC1q抗体を中和し、その下流補体カスケードの活性化の阻害について試験した。

10

20

30

40

50

【0334】

本実施例で用いたヒト化抗C1q抗体は、実施例1で記載した通りに產生した。実施例1由來の以下のヒト化抗体を用いた：抗体VH1/V 1 (2B12)、抗体VH3/V 3 (5H7)、抗体VH3/V 4 (3F1)、抗体VH4/V 3 (1D3)。マウスモノクローナル抗体M1(ANN-005)及びキメラM1抗体(3E2)も対照として用いた。

【0335】

CH50アッセイを、Current Protocols in Immunology (1994) Supplement 9 Unit 13.1で記載したのと本質的に同様に実施した。手短には、5マイクロリットル(μl)のヒト血清(Cedarlane, Burlington, NC)、又は0.625 μlのWistarラット血清を50 μlのGVBバッファー(Cedarlane, Burlington, NC)に希釈し、GVBバッファーに希釈した50 μlのヒト化抗体(1 μg)に添加した。抗体:血清混合物を30分間氷上で事前インキュベートし、その後ラット及びヒトアッセイの両方について100 μlのEA細胞(2x10⁸/ml)に添加した。EA細胞は、Current Protocols using Sheeps blood in Alsever's (Cedarlane Cat #CL2581)及びhemolysin (Cedarlane Cat #CL9000)で特定されているのと全く同様に作製した。EA細胞、血清及び抗体混合物を37 °Cで30分間インキュベートし、その後氷上に置いた。次に1.2mlの0.15 M NaClを混合物に添加し、サンプルのOD₄₁₂を分光光度計において測定し、細胞溶解の量を決定した。対照マウスIgG1抗体(Abcam ab18447)に対する試験抗体のパーセント阻害を決定した。

【0336】

4つのC1q結合抗体(2B12, 5H7, 3F1, and 1D3)を、用量応答形式でヒトCH50溶血アッセイにおいてそのC1q中和活性について試験した(図7A)。抗体のそれぞれを、約10:1～約1:1の範囲の化学量論での抗C1q抗体のC1qへの結合をもたらす有効用量範囲に相当する3.9 ng、15.9 ng、62.5 ng、及び260 ngの用量で試験した。マウス抗C1q抗体M1 (ANN-005)及びキメラM1抗体(3E2)を参照として用いた。VH3/V 3抗体(5H7)は、マウスM1抗体及びキメラM1抗体の両方と同程度までCH50溶血を用量応答的に阻害した(図7A)。さらに、約60 ngのVH3/V 3抗体 (5H7)、VH4/V 3抗体(1D3)、及びVH1/V 1抗体(2B12)が、観察された50%の溶血を阻害するために必要であった(図7A)。約250 ngのVH3/V 4 (3F1)が、観察された約95%の溶血を阻害するために必要であった(図7A)。

【0337】

4つのC1q結合抗体(2B12, 5H7, 3F1, and 1D3)も、ラットCH50溶血アッセイにおいてそのC1q中和活性について試験した(図7B)。抗体のそれぞれを、約10:1～約1:1の範囲の化学量論での抗C1q抗体のC1qへの結合をもたらす有効用量範囲に相当する3.9 ng、15.9 ng、62.5 ng、及び260 ngの用量で試験した。試験を、用量応答形式で行った。マウス抗C1q抗体M1 (ANN-005)及びキメラM1抗体(3E2)を参照として用いた。VH1/V 1抗体(2B12)は、マウスM1抗体及びキメラM1抗体の両方と同程度までCH50溶血を用量応答的に阻害した(図7A)。さらに、約60 ngのVH1/V 1抗体(2B12)、抗体VH3/V 4 (3F1)、VH3/V 3抗体(5H7)、及びVH4/V 3抗体(1D3)が、観察された約50%～約80%の溶血を阻害するために必要であった(図7B)。

【0338】

上記発明を、理解の明確化のために例証及び例を用いてある程度詳細に記載したが、記載及び例は、本発明の範囲を限定するものと理解されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許及び科学文献は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【0339】

実施例4：ヒト化抗C1抗体の薬理動態、血清C1qレベルに対する薬力学的效果、及びex-vivo補体媒介溶血を評価するためのサルにおける静脈内投与試験

カニクイザルに、15及び100 mg/Kgの用量で単一静脈内ボーラス注射(I.V.)によりヒト化抗C1q抗体VH3/V 3 (5H7)を投与した(用量当たりN=2、用量あたり1匹の雄及び1匹の雌サル)。

【0340】

血液サンプルを、以下の時点-1日目:試験前、投与の0.5、2、4、8、12、24、72、96及

10

20

30

40

50

び120時間後及び7、9、12、15、18及び21日目に回収した。血液サンプルを凝結させ、血清を遠心により分離し、その後-80°で解析まで凍結した。

【0341】

サルサンプルからのVH3/V 3 (5H7)の血清レベルの決定：血清抗C1q抗体のレベルを、hC1qをキャプチャアナライトとして用いる直接ELISAを用いて測定し、その後ヒト5H7抗体で検出した。Black 96 well ELISA plate(Corning, Cat# 3925)を、2 μg/mLのヒトC1q (Complement Technology A099)でコーティングした。4Cでの一晩インキュベーションの後、プレートをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS) (Thermo Scientific 28372)で3回洗浄し、3% BSAを含むDPBSで4°で一晩ブロッキングした。翌日、ブロッキング溶液を除き、5H7スタンダード又は希釈範囲の個々の血清サンプル(2000 ~ 2000000倍)を、アッセイバッファーである0.3% BSA及び0.1% tweenを含むDPBS(KPL Inc. 51-12-10)中でサンプルあたり50 μLプレートに添加した。サンプルを、300rpmで浸透しながら1時間室温でインキュベートした。その後、アルカリホスファターゼ(Jackson Immuno research, 109-055-098)とコンジュゲートした50 μLのヤギ抗ヒトFC抗体を、アッセイバッファーにおいて0.5 μg/mLの濃度で添加した。室温で1時間インキュベーションした後、プレートを3回0.05% tweenを含むDPBS中で洗浄した。各洗浄は、プレートシェイカーにおいて300rpmで浸透しながら10分間であった。その後プレートをタップドライし、アルカリホスファターゼ基質(Life Technologies, #T2214)を用いて20分間のインキュベーションにより展開した。発光カウントを、Perkin Elmer envision readerにより読んだ。標準曲線を4PL対数適合を用いて適合させ、未知のシグナルカウントを μg/ml濃度に変換し、Graphpad Prismを用いてプロットした。

【0342】

サルサンプルからの血清C1qレベルの決定：C1qの血清レベルを、二つの異なるhC1q特異的ELISAアッセイを用いて決定した。両方のELISAアッセイにおいて、C1qのコラーゲン尾部に結合する抗体であるJL1を、キャプチャ抗体として用いた(Abcam ab71940)。第一のアッセイでは、5H7と同じ部位に結合するVH3/V 3 (5H7)又はM1のマウス版を、遊離のC1qレベルを単離するために検出抗体として用いた。第二のアッセイでは、遊離及び血清サンプルのANXに結合した両方のC1qを測定するために検出抗体として用いた。

【0343】

Black 96 well ELISA plate(Corning, Cat# 3925)を、1 μg/mLのJL1でコーティングした。4Cでの一晩インキュベーションの後、プレートをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS) (Thermo Scientific 28372)で3回洗浄し、3% BSAを含むDPBSで4°で一晩ブロッキングした。翌日、ブロッキング溶液を除き、C1qスタンダード又は1000 × ~ 100000 × の希釈範囲の個々の血清サンプルを、アッセイバッファーである0.3% BSA及び0.1% tweenを含むDPBS(KPL Inc. 51-12-10)中でサンプルあたり50 μL供した。室温で1時間インキュベートした後、50 μLの各アルカリホスファターゼコンジュゲート抗体M1又はJL1をアッセイバッファー中終濃度200 ~ 400 ng/mLで添加した。サンプルを4°で一晩浸透しながらインキュベートした。翌日、0.05% tweenを含むDPBSでプレートを三回洗浄した。各洗浄は、プレートシェイカーにおいて300rpmで浸透しながら10分間であった。その後プレートをタップドライし、アルカリホスファターゼ基質(Life Technologies, #T2214)を用いて20分間のインキュベーションにより展開した。発光カウントを、Perkin Elmer envision readerにより読んだ。標準曲線を4PL対数適合を用いて適合させ、未知のシグナルカウントを濃度及び希釈相関に変換し、その後Graphpad Prismを用いてプロットした。

【0344】

サル血清サンプルにおけるex-vivo溶血活性の決定：溶血アッセイは、以下の改変を有する実施例3のものと同様であった。本試験のサル血清サンプルは、GVB ++バッファー溶液(Complement Technology Cat# B100)の1:50希釈であり、同容量の1700万細胞/mLの抗体感作ヒツジ赤血球細胞(Complement Technology Cat# B201)と混合した。サンプルを37°Cで1時間インキュベートした。コントロールウェルをベースライン(いかなる血清も含まないバッファーのみ)、及び100%溶血(脱イオン水を用いる)を決定するために設定した。その

後、サンプルを遠心沈殿し、上清を清澄ELISAプレートに移し、415nmで吸光を測定した。全てのサンプルの吸光度は、ベースラインを引き、100%溶血(脱イオン水)に標準化した。1:50希釈で、血清サンプルは水で観察された溶血の50~70%を示した。%溶血を、以下のベースライン標準化に従って個々のサルについてプロットした。

【0345】

血清5H7レベルの用量依存的増加が、15 mg/Kg 用量での~250 μ g/mL、及び100 mg/Kg 用量での~2000 μ g/mLの最大容量でのIV投与の後に観察された。持続的な5H7血清レベルは、100 mg/Kg用量での20日間のサンプリングの間明らかであったが、血清5H7レベルは、15 mg/Kg用量の4日後に検出下限以下のレベルまで低下した(図8)。血清C1qレベル(JL1-M1 アッセイ)は15 mg/Kg用量で5日間>90%低減し、投与の開始後5~11日でベースラインまで戻った。対照的に、100 mg/Kg用量は、投与の開始後最大20日間、血清C1qレベルの持続的な低減をもたらした(図9A)。血清C1qの同様のパターンの低減及び時間経過が、JL1-JL1 アッセイで観察された(図9B)。一方は5H7と同じC1qの部位に結合する検出抗体を有し、他方はC1qの独立した部位に対する検出抗体を有する2回の独立したELISAアッセイにおいて血清C1qの顕著なかつ持続性の低減が観察され、これは5H7による処置の後に血清C1qレベルが排除されることを示唆している。血清C1qレベルの低減と一致して、ex-vivo溶血の持続的な低減が、100 mg/Kg用量で投与開始後最大20日間観察された(図10)。ANXの15 mg/Kg 用量では、溶血は5日間にわたり>90%低減され、投与開始の5~11日後、ベースラインまで戻った(図10)。

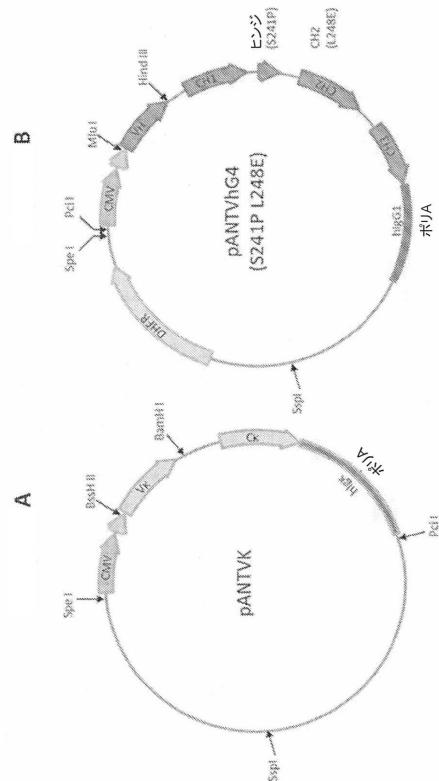
【0346】

これらの結果は、抗C1q抗体VH3/V 3 (5H7)が、顕著な薬理動態暴露及び時間経過とともに、血清C1qレベルの持続的な低減及びカニクイザルにおける溶血を示している。

10

20

【図1】



【図2 A】

A

M1抗C1qの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列ヒト化VH変異体1~2のアミノ酸配列のアライメント
VH変異体1:

M1_VH	1 QVQIACQPGKAEVLYPGAGSVRLSCKSGGYHFTSYMMHWWKQRPQGQGLEWIGV	50
VH1	1 ACQPGKAEVLYPGAGSVRLSCKSGGYHFTSYMMHWWKQRPQGQGLEWIGV	50
M1_VH	51 IHPNPGSINYYNEKPEKSKATLTVDSGSFSTAYMQQSLSTSESDAVYYCGER	100
VH1	51 IHPNPGSINYYNEKPEKSKATLTVDSGSFSTAYMQQSLSTSESDAVYYCGER	100
M1_VH	101 DSTEVLPLMHDYNGQGTSTVVS	121
VH1	101 DSTEVLPLMHDYNGQGTSTVVS	121

M1_VHは、M1抗体のVHを指し、VH1はVH変異体1を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

VH変異体2:

M1_VH	1 QVQIACQPGKAEVLYPGAGSVRLSCKSGGYHFTSYMMHWWKQRPQGQGLEWIGV	50
VH2	1 QVQIACQPGKAEVLYPGAGSVRLSCKSGGYHFTSYMMHWWKQRPQGQGLEWIGV	50
M1_VH	51 IHPNPGSINYYNEKPEKSKATLTVDSGSFSTAYMQQSLSTSESDAVYYCGER	100
VH2	51 IHPNPGSINYYNEKPEKSKATLTVDSGSFSTAYMQQSLSTSESDAVYYCGER	100
M1_VH	101 DSTEVLPLMHDYNGQGTSTVVS	121
VH2	101 DSTEVLPLMHDYNGQGTSTVVS	121

M1_VHは、M1抗体のVHを指し、VH2はVH変異体2を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

【図2B】

B

M1抗C1qの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列とヒト化VH変異体3~4のアミノ酸配列のアライメント
VH変異体3:

M1_VH	1 QWQLOQPGAEILVKPGASVKLSCCKSGYRPTSYRQDVKRPTQGLENLIGV	50
VR3	1 QWQLOQPGAEILVKPGASVKLSCCKSGYRPTSYRQDVKRPTQGLENLIGV	50
M1_VH	51 IHPNGGSINYYKEFESKATLTVWDSSTAYQQLSSLTSEDAVYYCAGER	100
VH3	51 IHPNGGSINYYKEFESKATLTVWDSSTAYQQLSSLTSEDAVYYCAGER	100
M1_VH	101 DSTEYLPFMEDYHQGGTSTVTVSS 121	
VR3	101 DSTEYLPFMEDYHQGGTSTVTVSS 121	

M1_VHは、M1抗体のVHを指し、VH3はVH変異体3を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

VH変異体4:

M1_VH	1 QWQLOQPGAEILVKPGASVKLSCCKSGYRPTSYRQDVKRPTQGLENLIGV	50
VR4	1 QWQLOQPGAEILVKPGASVKLSCCKSGYRPTSYRQDVKRPTQGLENLIGV	50
M1_VH	51 IHPNGGSINYYKEFESKATLTVWDSSTAYQQLSSLTSEDAVYYCAGER	100
VH4	51 IHPNGGSINYYKEFESKATLTVWDSSTAYQQLSSLTSEDAVYYCAGER	100
M1_VH	101 DSTEYLPFMEDYHQGGTSTVTVSS 121	
VR4	101 DSTEYLPFMEDYHQGGTSTVTVSS 121	

M1_VHは、M1抗体のVHを指し、VH4はVH変異体4を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

【図2C】

C

M1抗C1qのカッパ軽鎖可変領域(Vκ)のアミノ酸配列とヒト化Vκ変異体1~2のアミノ酸配列のアライメント
Vκ変異体1:

M1_VK	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
VK1	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
M1_VK	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
VK1	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
M1_VK	101 GTKLSEIK 107	
VK1	101 GTKLSEIK 107	

M1_VKは、M1抗体のVκを指し、VK1はVκ変異体1を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

Vκ変異体2:

M1_VK	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
VK2	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
M1_VK	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
VK2	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
M1_VK	101 GTKLSEIK 107	
VK2	101 GTKLSEIK 107	

M1_VKは、M1抗体のVκを指し、VK2はVκ変異体2を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

【図2D】

D

M1抗C1qのカッパ軽鎖可変領域(Vκ)のアミノ酸配列とヒト化Vκ変異体3~4のアミノ酸配列のアライメント
Vκ変異体3:

M1_VK	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
VR3	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
M1_VK	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
VR3	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
M1_VK	101 GTKLSEIK 107	
VR3	101 GTKLSEIK 107	

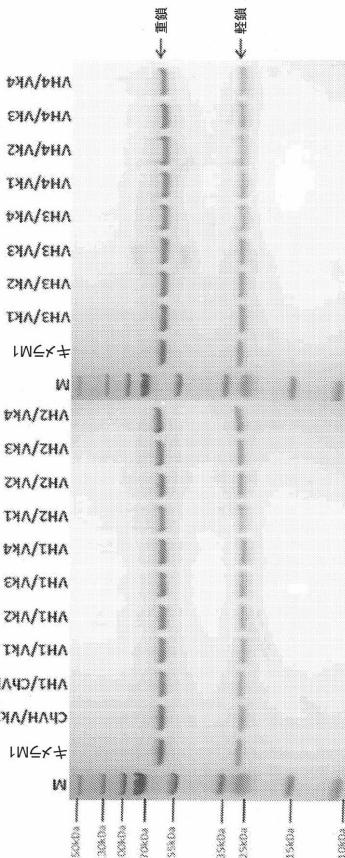
M1_VKは、M1抗体のVκを指し、VR3はVκ変異体3を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

Vκ変異体4:

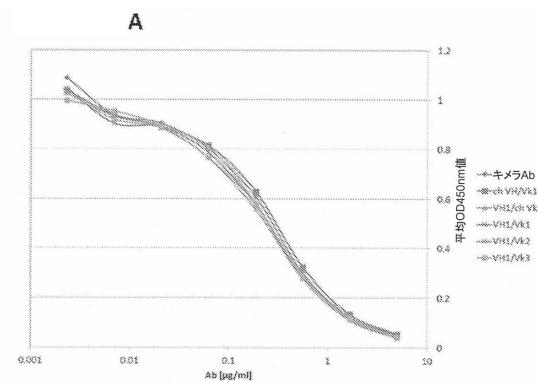
M1_VK	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
VR4	1 DPGQTQSPSPYLAAGIGETITINCRAKSINKYLALYQDKPDKTKLILYS	50
M1_VK	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
VR4	51 GSTLQSGS1PFRF3SGSGSGTDFPLTITISLEPEDFAMYCQQHNEYPLTFGA	100
M1_VK	101 GTKLSEIK 107	
VR4	101 GTKLSEIK 107	

M1_VKは、M1抗体のVκを指し、VR4はVκ変異体4を指す。三つのCDR配列を太字で示す。

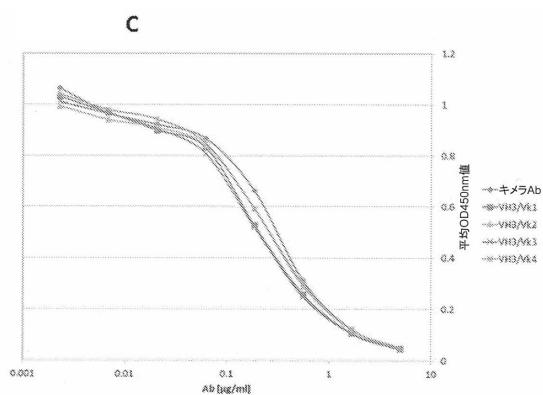
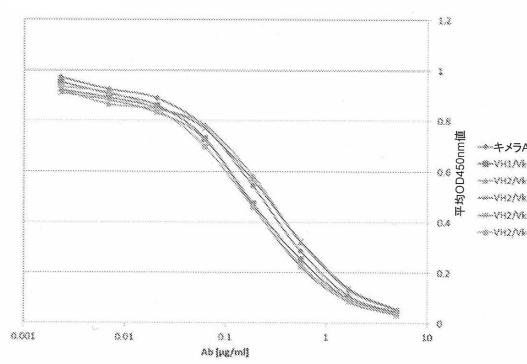
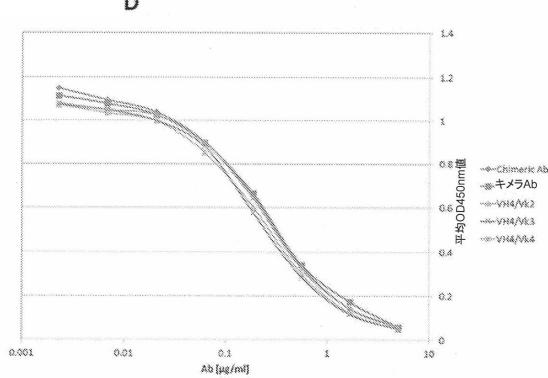
【図3】



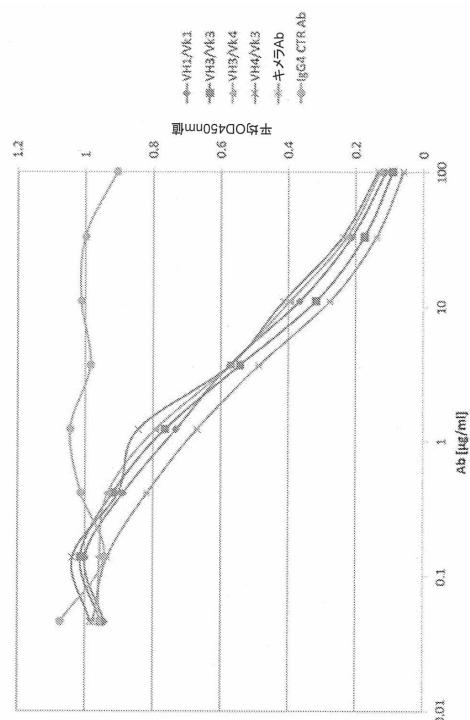
【図4 A - B】



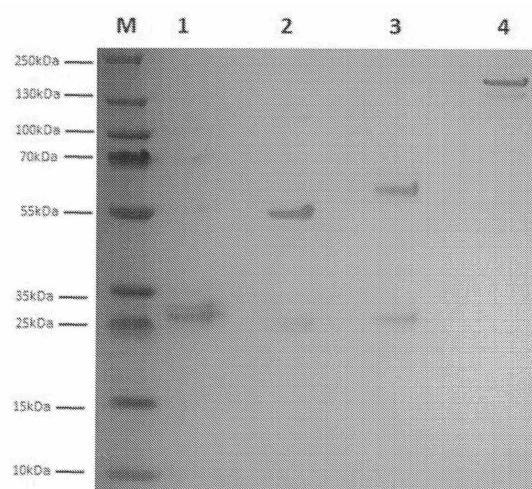
【図4 C - D】

**B****D**

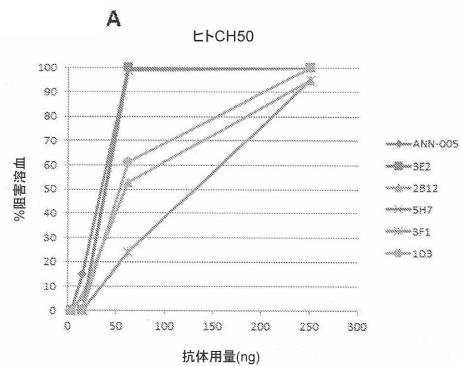
【図5】



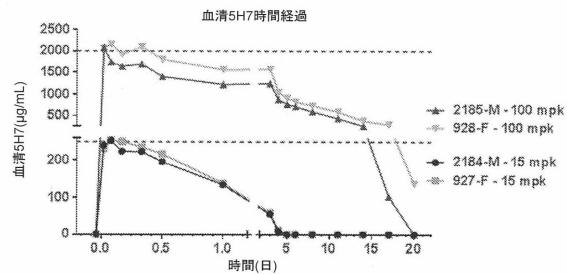
【図6】



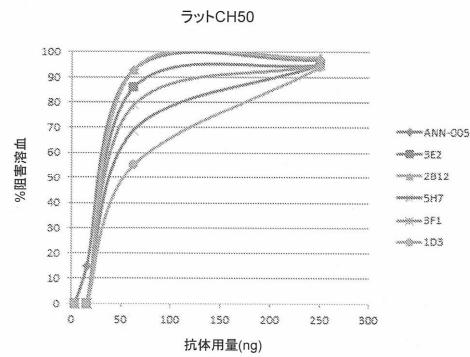
【図7】



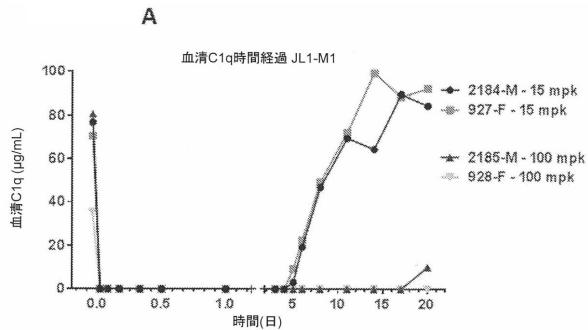
【図8】



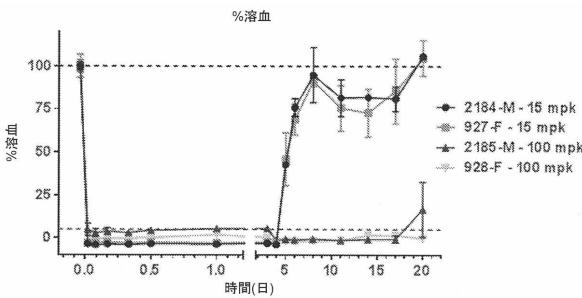
B



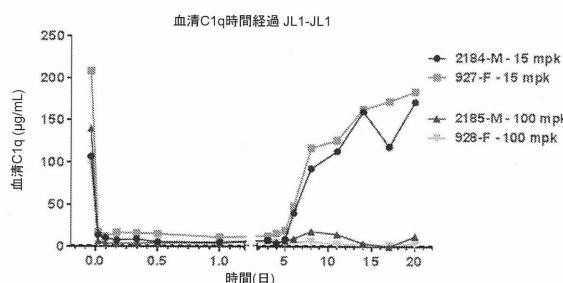
【図9】



【図10】



B



【配列表】

0006951246000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3
A 6 1 P	27/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/04	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
			G 0 1 N	33/53	Y
			C 1 2 Q	1/04	

(72)発明者 レヴィテン,マイケル

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州,パロ アルト,ブライアント ストリート 3
1 6 6

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 國際公開第2014/169076 (WO, A1)

J. Immunol., 2000年, Vol.164, pp.1925-1933

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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