(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7438975号
(P7438975)

(45)発行日　令和6年2月27日(2024.2.27)

(24)登録日　令和6年2月16日(2024.2.16)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ　15/19　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/19	ＺＮＡ	
Ｃ０７Ｋ　14/52　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	14/52		
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ１２Ｐ　21/00　(2006.01)	Ｃ１２Ｐ	21/00	Ｃ	
Ａ６１Ｋ　38/16　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	38/16		

ＦＩ

請求項の数　20　（全74頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-559959(P2020-559959)
(86)(22)出願日　令和1年12月4日(2019.12.4)
(86)国際出願番号　PCT/JP2019/047382
(87)国際公開番号　WO2020/116498
(87)国際公開日　令和2年6月11日(2020.6.11)
審査請求日　令和4年11月29日(2022.11.29)
(31)優先権主張番号　特願2018-227353(P2018-227353)
(32)優先日　平成30年12月4日(2018.12.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000003311
中外製薬株式会社
東京都北区浮間５丁目５番１号
(74)代理人　100102118
弁理士　春名 雅夫
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＸＣＲ３リガンド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＤＰＰＩＶに対する耐性を有し、且つＣＸＣＲ３を発現する細胞を遊走させる活性を有する、ＣＸＣＲ３リガンドであって、

前記ＣＸＣＲ３リガンドは、

ヒトＣＸＣＬ１０改変体であって、

(ａ１) Ｖ-Ｘ１-Ｌ（Ｘ１はＶ、Ｆ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｔ、Ｗ、またはＹである）、

(ａ２) Ｘ２-Ｖ-Ｐ（Ｘ２はＡ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、またはＷである）、もしくは

(ａ３) Ｖ-Ｘ３-Ｐ（Ｘ３はＡ、Ｆ、Ｇ、Ｉ、Ｍ、Ｐ、Ｔ、またはＶである）

のいずれかの配列をＮ末端に有する、ＣＸＣＲ３リガンド；または

ヒトＣＸＣＬ１１改変体またはヒトＩＴＩＰ改変体であって、

(ａ４) Ｘ４-Ｆ-Ｐ（Ｘ４はＡ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹである）

の配列をＮ末端に有する、ＣＸＣＲ３リガンド。

【請求項２】

前記ＣＸＣＲ３リガンドのＣＸＣＲ３を発現する細胞を遊走させる活性は、天然ヒトＣＸＣＬ１０のＣＸＣＲ３を発現する細胞を遊走させる活性の３０％以上である、または天然ヒトＣＸＣＬ１１もしくはヒトＩＴＩＰのＣＸＣＲ３を発現する細胞を遊走させる活性の２５％以上である、請求項１に記載のＣＸＣＲ３リガンド。

【請求項３】

前記ＣＸＣＲ３リガンドのＣＸＣＲ３を発現する細胞を遊走させる活性が最大となるときの前

記CXCR3リガンド濃度は、天然ヒトCXCL10、天然ヒトCXCL11およびヒトITIPから選ばれる少なくとも一種類のタンパク質のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性が最大となるときの当該タンパク質の濃度より低い、請求項１または２に記載のCXCR3リガンド。
【請求項４】
前記CXCR3リガンドは、
ヒトCXCL10改変体であって、
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はV、F、G、I、L、M、T、W、またはYである）、
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）、もしくは
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）のいずれかの配列をN末端に有し；または
ヒトCXCL11改変体またはヒトITIP改変体であって、
(b4) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）の配列をN末端に有する、請求項１～３のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
【請求項５】
ヒトCXCL10改変体であって、
(a1) V-X1-L（X1はV、F、G、I、L、M、T、W、またはYである）、
(a2) X2-V-P（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）、もしくは
(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）
のいずれかの配列をN末端に有し；または
ヒトCXCL11改変体またはヒトITIPであって、
(a4) X4-F-P（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）
の配列をN末端に有する、CXCR3リガンド。
【請求項６】
ヒトCXCL10改変体であって、
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はV、F、G、I、L、M、T、W、またはYである）、
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）、もしくは
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）
のいずれかの配列をN末端に有し；または
ヒトCXCL11改変体またはヒトITIP改変体であって、
(b4) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）の配列をN末端に有する、請求項５に記載のCXCR3リガンド。
【請求項７】
前記(b1)から(b5)の配列のC末端に、C-X-Cモチーフを有する、請求項４または請求項６に記載のCXCR3リガンド。
【請求項８】
前記CXCR3リガンドは、前記C-X-Cモチーフの C末端に更に下記(c1)から(c5)：
(c1) 配列番号：６０の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c2) 配列番号：６１の12番アミノ酸から73番アミノ酸までの配列；
(c3) 配列番号：６２の12番アミノ酸から103番アミノ酸までの配列；
(c4) 配列番号：１の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c5) 配列番号：６３の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
のいずれかを有する、請求項７に記載のCXCR3リガンド。
【請求項９】
前記CXCR3リガンドの配列は、下記(d1)から(d7)：
(d1) 配列番号：５、６、８、１０、１１、１６～２０、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３５、３７、３９、４２、４３、４５、４８、５０、５４、５５、１１０～１１２、１１４、１１９、１２０、１２２、１２４～１２６、１２８、１６７～１６９、１７１、１７６、１７７、１７９、１８１～１８３および１８５のいずれか一つで示す配列；

(d2) 配列番号：６０と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d3) 配列番号：６１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d4) 配列番号：６２と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d5) 配列番号：６３と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d6) 配列番号：１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d7) 配列番号：１、５、６、８、１０、１１、１６～２０、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３５、３７、３９、４２、４３、４５、４８、５０、５４、５５、６０～６３、１１０～１１２、１１４、１１９、１２０、１２２、１２４～１２６、１２８、１６７～１６９、１７１、１７６、１７７、１７９、１８１～１８３および１８５から選ばれる一つの配列に対して、アミノ酸の置換、挿入または欠失を１０個以下含む配列；
のいずれかである、請求項１～８のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
【請求項１０】
前記CXCR3リガンドが、カバットナンバリングによるアミノ酸位置７５位におけるアミノ酸のRからAへの置換を有する、請求項１～９のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
【請求項１１】
請求項１～１０のいずれか一つに記載のCXCR3リガンドを含む融合タンパク質。
【請求項１２】
請求項１～１０のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド、または請求項１１に記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。
【請求項１３】
N末端から2番目のアミノ酸がPあるいはAである親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法であって、当該方法は下記のいずれかを含む：
前記親CXCR3リガンドが、天然ヒトCXCL10又はその改変体であり、
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換する、
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加する、または
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入する、
方法。
【請求項１４】
前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
DPPIVに対する耐性を有するCXCR3リガンドを製造する方法であって、当該方法はN末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドに対し、
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換する、
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加する、または
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入する
のいずれかの改変を行い、
前記親CXCR3リガンドが、天然ヒトCXCL10又はその改変体である、方法。
【請求項１６】
前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
N末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法であって、当該方法は下記を含む：

前記親CXCR3リガンドが、天然ヒトCXCL11若しくはその改変体又はヒトITIP若しくはその改変体であり、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加する
方法。
【請求項１８】
前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、F-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）である、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
DPPIVに対する耐性を有するCXCR3リガンドを製造する方法であって、当該方法はN末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドに対し、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加する改変を行い、
前記親CXCR3リガンドが、天然ヒトCXCL11若しくはその改変体又はヒトITIP若しくはその改変体である、方法。
【請求項２０】
前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、F-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）である、請求項１９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、CXCR3リガンド、CXCR3リガンドの製造方法、CXCR3リガンドの使用、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
ケモカイン受容体CXCR3（Chemokine receptor CXCR3、G protein-coupled receptor 9 (GPR9)、CD183とも呼ばれる）は、CXCケモカインレセプターファミリーに属し、ケモカインCXCL9、CXCL10及びCXCL11に結合するＧタンパク質共役受容体である。CXCR3は、主に活性化したＴヘルパー１型（Th1）リンパ球や細胞傷害性T細胞で発現するが、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、樹状細胞及びBリンパ球サブセットにも存在している。ケモカインCXCL9、CXCL10及びCXCL11は、天然に存在する３種のCXCR3リガンドである。CXCR3とそのリガンドの相互作用は、受容体を持つ細胞の、身体の特定部位、特に炎症、免疫障害及び免疫機能障害部位へのガイドに関わっている。
【０００３】
CXCL10（C-X-C motif chemokine 10）は、「IP10（interferon gamma-induced protein 10）」や「small inducible cytokine B10」とも呼ばれており、CXCサブファミリーに属するケモカインの一種である。
【０００４】
C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) はCXCR3を介してT細胞の遊走活性を促進することが知られている（非特許文献１）。さらにマウスの腫瘍中にCXCL10を直接投与すると、腫瘍中のT細胞が増加する事が報告されている（非特許文献２）。
【０００５】
一方、CXCL10はDipeptidyl Peptidase-4 (DPPIV、DPP4)により、N末端の2アミノ酸が切断される事が知られている（非特許文献１）。切断されたCXCL10はヒト血中にも存在し、さらにヒト腫瘍中においても存在する事が報告されていることから、ヒト血中及び腫瘍中においてCXCL10がDPPIVにより切断されている事を示している（非特許文献３、４）。さらにDPPIVにより切断されたCXCL10は遊走活性が著しく減弱する事が報告されている事から、CXCL10の不活化メカニズムの1つとして考えられる（非特許文献１）。CXCL10はその立体構造が解かれており（非特許文献５、６）、構造予測されたCXCR3との複合体モデルも報告されている（非特許文献７）。この複合体モデルではCXCL10のN末端がCXCR3内部に入り込むように配置しており、この相互作用がCXCR3の活性化に重要であると考えられている。

【０００６】
C-X-Cモチーフケモカイン11（C-X-C motif chemokine 11、C-X-C motif chemokine ligand 11、CXCL11）は、C-X-Cケモカインの一種であり、I-TAC（Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractantまたはIP-9（Interferon-gamma-inducible protein 9）とも呼ばれ、天然のCXCL11は天然CXCL10や天然CXCL9より強くCXCR3に結合するとされている（非特許文献８、９）。天然のヒトCXCL11のN末端配列も、DPPIVにより切断されることが知られている（非特許文献１）。
C-X-Cモチーフケモカイン9（C-X-C motif chemokine 9、 C-X-C motif chemokine ligand 9、CXCL9）は、C-X-Cケモカインの一種であり、Monokine induced by gamma interferon (MIG)とも呼ばれ、天然のヒトCXCL9のN末端配列も、DPPIVにより切断されることが知られている（非特許文献１）。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００７】
【文献】Proost P, Blood. 2001 Dec 15;98(13):3554-61.
【文献】Wang P, Cancer Immunol Immunother. 2010 Nov;59(11):1715-26.
【文献】Decalf J, EMBO Mol Med. 2016 Jun 1;8(6):679-83.
【文献】Rainczuk A, Int J Cancer. 2014 Feb 1;134(3):530-41.
【文献】Booth V, Biochemistry. 2002 Aug 20;41(33):10418-25.
【文献】Swaminathan GJ, Structure. 2003 May;11(5):521-32.
【文献】Trotta T, Mol Immunol. 2009 Dec;47(2-3):332-9.
【文献】Cole KE, The Journal of Experimental Medicine. 187 (12): 2009-21.
【文献】Tensen CP, The Journal of Investigative Dermatology. 112 (5): 716-22.
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
本開示は、DPPIVに対する耐性及びCXCR3発現細胞遊走活性を有するCXCR3リガンドおよび同CXCR3リガンドを使用する方法、同CXCR3リガンドの製造方法を提供する。本開示はまた、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法を提供する。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本発明者らは、DPPIVに対する耐性及びCXCR3発現細胞遊走活性を有するCXCR3リガンドを見出して本開示を完成させた。具体的に、DPPIVに対する耐性及びCXCR3発現細胞遊走活性に重要なN末端アミノ酸改変及びN末端アミノ酸配列を見出した。
【００１０】
本開示は、具体的には以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[A-1] DPPIVに対する耐性を有し、且つCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性を有する、CXCR3リガンド。
[A-2] 前記CXCR3リガンドは、C-X-Cモチーフを有する、[A-1]に記載のCXCR3リガンド。
[A-3] 前記C-X-Cモチーフに含まれる二つのシステインは、それぞれ前記CXCR3リガンドに含まれるC-X-Cモチーフ以外のシステインとジスルフィド結合を形成する、[A-2]に記載のCXCR3リガンド。
[A-4] 前記CXCR3 リガンドは下記(a1)から(a7)：
(a1) V-X1-L（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；
(a2) X2-V-P（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(a4) P-L-S；

(a5) X4-F-P（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；
(a6) F-X5-M（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(a7) F-X6-P（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、[A-1]から[A-3]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-5] 前記CXCR3リガンドは下記(b1)から(b7)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；
(b6) F-X5-M-F-K-R-G-R（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b7) F-X6-P-M-F-K-R-G-R（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、[A-1]から[A-4]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-6] 前記CXCR3リガンドは下記(a1)から(a5)：
(a1) V-X1-L（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(a2) X2-V-P（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(a4) P-L-S；
(a5) X4-F-P（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、[A-1]から[A-3]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-7] 前記CXCR3リガンドは下記(b1)から(b5)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、[A-1]から[A-3]のいずれか、または[A-6]に記載のCXCR3リガンド。
[A-8] 前記C-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、またはC-S-C（Cys-Ser-Cys）である、[A-2]から[A-7]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-9] 前記CXCR3リガンドは、前記C-X-Cモチーフの C末端に更に下記(c1)から(c5)：
(c1) 配列番号：６０の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c2) 配列番号：６１の12番アミノ酸から73番アミノ酸までの配列；
(c3) 配列番号：６２の12番アミノ酸から103番アミノ酸までの配列；
(c4) 配列番号：１の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c5) 配列番号：６３の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
のいずれかを有する、[A-2]から[A-8]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。

[A-10] 前記CXCR3リガンドの配列は、下記(d1)から(d7)：
(d1) 配列番号：２～５７、９２～１４７、１４９～２０４のいずれか一つで示す配列；
(d2) 配列番号：６０と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d3) 配列番号：６１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d4) 配列番号：６２と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d5) 配列番号：６３と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d6) 配列番号：１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d7) 配列番号１～５７、６０～６３、９２～１４７、１４９～２０４から選ばれる一つの配列に対して、アミノ酸の置換、挿入または欠失を１０個以下含む配列；
のいずれかである、[A-1]から[A-9]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-11] 前記DPPIVに対する耐性は、0.2mg/mlの前記CXCR3リガンドまたはCXCR3リガンド-ヒトFcの融合タンパク質と、200 nM のヒトDPPIVの存在下において、37℃で1時間処理後に、前記CXCR3リガンドのN末端2残基が脱落しないことを指す、[A-1]から[A-10]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-12] 前記CXCR3リガンドのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性は、天然ヒトCXCL10のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の30%以上である、もしくは天然ヒトCXCL11のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上である、[A-1]から[A-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-13] 前記CXCR3リガンドのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性が最大となるときの前記CXCR3リガンド濃度は、天然ヒトCXCL10および／または天然ヒトCXCL11のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性が最大となるときの天然ヒトCXCL10および／または天然ヒトCXCL11濃度より低い、[A-1]から[A-12]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[A-14] 前記CXCR3を発現する細胞は、CXCR3を発現するtransfectantもしくは生体から単離された細胞である、[A-1]から[A-13]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
【００１１】
本開示はまた、以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[B-1] 下記(a1)から(a7)：
(a1) V-X1-L（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；
(a2) X2-V-P（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(a4) P-L-S；
(a5) X4-F-P（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；
(a6) F-X5-M（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(a7) F-X6-P（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、CXCR3リガンド。
[B-2] 下記(b1)から(b7)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；

(b6) F-X5-M-F-K-R-G-R（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b7) F-X6-P-M-F-K-R-G-R（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、[B-1]に記載のCXCR3リガンド。
[B-3] 前記(a1)から(a7)の配列よりC末端側に、C-X-Cモチーフを有する、[B-1]または[B-2]に記載のCXCR3リガンド。
[B-4] 前記(b1)から(b7)の配列のC末端に、C-X-Cモチーフを有する、[B-2]に記載のCXCR3リガンド。
[B-5] 下記(a1)から(a5)：
(a1) V-X1-L（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(a2) X2-V-P（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(a4) P-L-S；
(a5) X4-F-P（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する、CXCR3リガンド。
[B-6] 下記(b1)から(b5)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれか配列をN末端に有する、[B-5]に記載のCXCR3リガンド。
[B-7] 前記(a1)から(a5)の配列よりC末端側に、C-X-Cモチーフを有する、[B-5]または[B-6]に記載のCXCR3リガンド。
[B-8] 前記(b1)から(b5)の配列のC末端に、C-X-Cモチーフを有する、[B-6]に記載のCXCR3リガンド。
[B-9] 前記C-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、またはC-S-C（Cys-Ser-Cys）である、[B-3]、[B-4]、[B-7]、[B-8]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[B-10] 前記CXCR3リガンドは、前記C-X-Cモチーフの C末端に更に下記(c1)から(c5)：
(c1) 配列番号：６０の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c2) 配列番号：６１の12番アミノ酸から73番アミノ酸までの配列；
(c3) 配列番号：６２の12番アミノ酸から103番アミノ酸までの配列；
(c4) 配列番号：１の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c5) 配列番号：６３の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
のいずれかを有する、[B-3]、[B-4]、[B-7]、[B-8]、[B-9]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
[B-11] 前記CXCR3リガンドの配列は、下記(d1)から(d7)：
(d1) 配列番号：２～５７、９２～１４７、１４９～２０４のいずれか一つで示す配列；
(d2) 配列番号：６０と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d3) 配列番号：６１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d4) 配列番号：６２と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d5) 配列番号：６３と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d6) 配列番号：１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d7) 配列番号１～５７、６０～６３、９２～１４７、１４９～２０４から選ばれる一つの配列に対して、アミノ酸の置換、挿入または欠失を１０個以下含む配列；
のいずれかである、[B-1]から[B-10]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド。
【００１２】

本開示はまた、以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[C-1] [A-1]から[B-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンドをエンコードする、単離された核酸。
[C-2] [C-1]に記載の核酸を含む宿主細胞。
[C-3] [A-1]から[B-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンドの製造方法であって、CXCR3リガンドが製造されるように[C-2]に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。
[C-4] 前記宿主細胞から前記CXCR3リガンドを回収する工程を更に含む、[C-3]に記載の方法。
[C-5] [A-1]から[B-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンドを含む融合タンパク質。
[C-6] [A-1]から[B-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンドと抗体Fc領域が融合されている、[C-5]に記載の融合タンパク質。
[C-7] [A-1]から[B-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンドと完全抗体または抗体断片が融合されている、[C-5]に記載の融合タンパク質。
[C-8] 前記CXCR3リガンドと前記抗体Fc領域、または前記CXCR3リガンドと前記完全抗体または抗体断片は、リンカーを介して融合されている、[C-6]または[C-7]に記載の融合タンパク質。
[C-9] [A-1]から [B-11]のいずれか一つに記載のCXCR3リガンド、または[C-5]から[C-8]のいずれか一つに記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。
【００１３】
本開示はまた、以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[D-1] N末端から2番目のアミノ酸がPあるいはAである親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法であって、当該方法は下記のいずれかを含む：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを付加する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを挿入する；
(4) 前記親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる；
方法。
[D-2] N末端から2番目のアミノ酸がPあるいはAである親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法であって、当該方法は下記のいずれかを含む：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入する；
(4) 前記親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる；
方法。
[D-3] 前記親CXCR3リガンドは更にC-X-Cモチーフを有する、[D-1]または[D-2]に記載の方法。
[D-4] 前記C-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、またはC-S-C（Cys-Ser-Cys）である、[D-3]に記載の方法。
[D-5] 前記親CXCR3リガンドは、天然ヒトCXCL10またはその改変体、天然ヒトCXCL11またはその改変体、天然ヒトCXCL9またはその改変体のいずれかである、[D-1]から[D-4]のいずれか一つに記載の方法。
[D-6] 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目のアミノ酸はVである、[D-1]から[D-5]に記載の方法。
[D-7] 前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）また

はV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）である、[D-1]から[D-6]のいずれか一つに記載の方法。
[D-8] 前記C-X-Cモチーフは前記Ｎ末端配列「V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）」または「V-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）」のC末端に位置する、[D-7]に記載の方法。
【００１４】
本開示はまた、以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[E-1] DPPIVに対する耐性を有するCXCR3リガンドを製造する方法であって、当該方法はN末端から2番目のアミノ酸がPまたはAである親CXCR3リガンドに対し、下記のいずれか：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを付加する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを挿入する；
(4) 前記親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる；
の改変を行う、方法。
[E-2] DPPIVに対する耐性を有するCXCR3リガンドを製造する方法であって、当該方法はN末端から2番目のアミノ酸がPまたはAである親CXCR3リガンドに対し、下記のいずれか：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入する；
(4) 前記親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる；
の改変を行う、方法
[E-3] 前記親CXCR3リガンドは更にC-X-Cモチーフを有する、[E-1]または[E-2]に記載の方法。
[E-4] 前記C-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、またはC-S-C（Cys-Ser-Cys）である、[E-3]に記載の方法。
[E-5] 前記親CXCR3リガンドは、天然ヒトCXCL10またはその改変体、天然ヒトCXCL11またはその改変体、天然ヒトCXCL9またはその改変体のいずれかである、[E-1]から[E-4]のいずれか一つに記載の方法。
[E-6] 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目のアミノ酸はVである、[E-1]から[E-5]に記載の方法。
[E-7] 前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）である、[E-1]から[E-6]のいずれか一つに記載の方法。
[E-8] 前記親C-X-Cモチーフは前記Ｎ末端配列「V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）」または「V-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）」のC末端に位置する、[E-7]に記載の方法。
[E-9] [E-1]から[E-8]のいずれか一つに記載の方法により製造された、CXCR3リガンド。
【００１５】
本開示はまた、以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[F-1] N末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法であって、当該方法は下記のいずれかを含む：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYを付加する；

(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYに置換する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYを挿入する；
方法。
[F-2] N末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法であって、当該方法は、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加することを含む、方法。
[F-3] 前記親CXCR3リガンドは更にC-X-Cモチーフを有する、[F-1]または[F-2]に記載の方法。
[F-4] 前記C-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、またはC-S-C（Cys-Ser-Cys）である、[F-3]に記載の方法。
[F-5] 前記親CXCR3リガンドは、天然ヒトCXCL10またはその改変体、天然ヒトCXCL11またはその改変体、天然ヒトCXCL9またはその改変体のいずれかである、[F-1]から[F-4]のいずれか一つに記載の方法。
[F-6] 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目のアミノ酸はFである、[F-1]から[F-5]に記載の方法。
[F-7] 前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、F-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）である、[F-1]から[F-6]のいずれか一つに記載の方法。
[F-8] 前記C-X-Cモチーフは前記Ｎ末端配列「F-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）」のC末端に位置する、[F-7]に記載の方法。
【００１６】
本開示はまた、以下に例示的に記載する態様を包含するものである。
[G-1] DPPIVに対する耐性を有するCXCR3リガンドを製造する方法であって、当該方法はN末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドに対し、下記のいずれか：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYを付加する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYに置換する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYを挿入する；
の改変を行う、方法。
[G-2] DPPIVに対する耐性を有するCXCR3リガンドを製造する方法であって、当該方法はN末端から2番目のアミノ酸がPである親CXCR3リガンドに対し、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加する改変を行う、方法。
[G-3] 前記親CXCR3リガンドは更にC-X-Cモチーフを有する、[G-1]または[G-2]に記載の方法。
[G-4] 前記C-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、またはC-S-C（Cys-Ser-Cys）である、[G-3]に記載の方法。
[G-5] 前記親CXCR3リガンドは、天然ヒトCXCL10またはその改変体、天然ヒトCXCL11またはその改変体、天然ヒトCXCL9またはその改変体のいずれかである、[G-1]から[G-4]のいずれか一つに記載の方法。
[G-6] 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目のアミノ酸はFである、[G-1]から[G-5]に記載の方法。
[G-7] 前記親CXCR3リガンドのN末端配列は、F-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）である、[G-1]から[G-6]のいずれか一つに記載の方法。
[G-8] 前記親C-X-Cモチーフは前記Ｎ末端配列「F-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）」のC末端に位置する、[G-7]に記載の方法。
[G-9] [G-1]から[G-8]のいずれか一つに記載の方法により製造された、CXCR3リガンド。

【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１Ａ】hCXCL10改変体Fc fusionの模式図。
【図１Ｂ】hCXCL10改変体作製のための、DPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変位置を示す図。
【図２】hCXCL10 (PeproTech, cat 300-12)とhCXCL10R75Aの細胞遊走活性を示す図。
【図３ａ】各hCXCL10改変体Fc fusionの細胞遊走活性を示す図。
【図３ｂ】各hCXCL10改変体Fc fusionの細胞遊走活性を示す図。
【図４Ａ】hCXCL11またはhITIP改変体Fc fusionの模式図。
【図４Ｂ】hCXCL11またはhITIP改変体作製のための、DPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変位置を示す図。
【図５】DPPIV処理前後のhCXCL10改変体の細胞遊走活性比較を示す図。
【図６－１】各hCXCL11改変体Fc fusionの細胞遊走活性を示す図。
【図６－２】図６－１の続きを示す。
【図６－３】図６－２の続きを示す。図６－１から図６－３で示す活性は、同じ回の実験によるものである。
【図７ａ】各hITIP改変体Fc fusionの細胞遊走活性を示す図。
【図７ｂ】各hITIP改変体Fc fusionの細胞遊走活性を示す図。
【図７ｃ】各hITIP改変体Fc fusionの細胞遊走活性を示す図。

【発明を実施するための形態】
【００１８】
以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明する本開示の理解を容易にするために提供される。

アミノ酸

本明細書において、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸は1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記されている。
【００１９】

アミノ酸の改変

CXCR3リガンドのアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct（Protein Express））等も好適に用いられる。
【００２０】
本明細書において、アミノ酸の改変部位を表す際に用いられる「および/または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わされたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「33位、55位、および/または96位のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；
(a) 33位、(b)55位、(c)96位、(d)33位および55位、(e)33位および96位、(f)55位および96位、(g)33位および55位および96位。あるいは、「33位、55位、および/または96位のアミノ酸が置換されている」は、「33位、55位、および96位からなる群から選択される少なくとも1つ（１つ、２つ、または３つ）の位置のアミノ酸が置換されている」と同義である。

【００２１】
本明細書において、アミノ酸の置換を表す表現として、特定の位置を表す数字の前後に改変前と改変後のアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードを併記した表現が適宜使用され得る。例えば、CXCR3リガンドに含まれるアミノ酸の置換を加える際に用いられるP2AまたはPro2Alaという改変は、CXCR3リガンドのN末端から2位のProのAlaへの置換を表す。すなわち、数字はCXCR3リガンドのN末端から数えた場合のアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の1文字コード又は3文字コードは置換前のアミノ酸、その後に記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を表す。
【００２２】
本明細書において、アミノ酸の挿入を表す表現として、特定の挿入位置の後に、「ins」及び挿入されたアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードを併記した表現が適宜使用され得る。挿入位置を表すのに、当該挿入位置の前後のアミノ酸の1文字コードまたは3文字コード及び位置を併記した表現が適宜使用され得る。例えば、CXCR3リガンドに含まれるアミノ酸配列にアミノ酸を挿入する際に用いられるV1_P2insAまたはVal1_Pro2insAlaという改変は、CXCR3リガンドのN末端から1位のアミノ酸Valと2位のアミノ酸Proの間へのAlaの挿入を表す。CXCR3リガンドのN末端から1位のアミノ酸ValよりN末端にアミノ酸を挿入する際に、例えば、G-1_V1insAまたはGly-1_Val1insAlaという表記で、CXCR3リガンドのN末端1位のVal、及び当該ValのN末端隣りに位置するシグナル配列中のGlyの間へのAlaの挿入を表し、シグナル配列中のGlyはCXCR3リガンドのN末端より更にN末端の1位のアミノ酸であるため、位置を「-1」と表記する。
【００２３】
CXCR3
ケモカイン受容体CXCR3（Chemokine receptor CXCR3、G protein-coupled receptor 9 (GPR9)、CD183とも呼ばれる）は、CXCケモカインファミリーに属し、ケモカインCXCL9、CXCL10及びCXCL11に結合するＧタンパク質共役受容体である。CXCR3は、主に活性化したＴヘルパー１型（Ｔｈ１）リンパ球で発現するが、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、樹状細胞及びＢリンパ球サブセットにも存在している。ケモカインCXCL9、CXCL10及びCXCL11は、天然に存在する３種のCXCR3リガンドである。CXCR3とそのリガンドの相互作用（以後、CXCR3系（ａｘｉｓ）と称する）は、受容体を持つ細胞の、身体の特定部位、特に炎症、免疫障害及び免疫機能障害部位へのガイドに関わっている。本明細書における用語「CXCR3」は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型CXCR3を意味する。ヒトCXCR3の全アミノ酸配列は、Refseq:NP_001495（配列番号：８８）で示される。
【００２４】
ケモカイン、CXCケモカイン
ケモカインは、7～16 kDaの間の均質な血清タンパク質のファミリーであり、元来、白血球の遊走を誘導するその能力を特徴とした。ほとんどのケモカインは、４つの特徴的なシステイン（Cys）を有し、最初の２つのシステインによって示されるモチーフによって、C-X-C（又はアルファ、CXC）、C-C（又はベータ）、C（又はガンマ）及びCX3C（又はデルタ）のケモカインクラスに分類されている。２つのジスルフィド結合は、第１と第３のシステインの間、及び第２と第４のシステインの間に形成される。一般に、ジスルフィド架橋は必要であると考えられ、Clark-Lewisと共同研究者らは、少なくともCXCL10についてジスルフィド結合は、ケモカイン活性に決定的であることを報告した（Clark-Lewis et al., J. Biol. Chem. 269:16075-16081, 1994）。
さらに、C-X-C（又はアルファ、CXC）のサブファミリーは、第１のシステインに先行するELRモチーフ（Glu-Leu-Arg）の存在によって２つの群：ELR-CXCケモカイン及び非ELR-CXCケモカインに分類されている（たとえば、Clark-Lewis, 上記、 及びBelperio et al., J. Leukoc. Biol. 68:1-8, 2000を参照）。CXCL10、CXCL11、CXCL9は全て非ELR-CXCケモカインである。

【００２５】

CXCL10

CXCモチーフケモカイン10（C-X-C motif chemokine 10、C-X-C motif chemokine ligand 10、CXCL10）は、C-X-Cケモカインの一種であり、インターフェロン誘導性のタンパク質-10（IP-10）とも呼ばれる。インターフェロン-γ及びＴＮＦ-αによって誘導され、角化細胞、内皮細胞、線維芽細胞及び単球によって産生される。CXCL10は、組織炎症部位への活性化Ｔ細胞の動員において役割を担っていると考えられる（Dufour, et al., J Immunol., 168:3195-204, 2002）。さらに、CXCL10は、過敏反応に役割を担っている可能性がある。また、炎症性脱髄神経障害の発生にも役割を担っている可能性がある（Kieseier, et al., Brain 125:823-34, 2002）。

【００２６】

研究によって、CXCL10は、移植に続く幹細胞の生着（Nagasawa, T., Int. J. Hematol. 72:408-11, 2000）、幹細胞の動員（Gazitt, Y., J. Hematother Stem Cell Res 10:229-36, 2001; Hattori et al., Blood 97:3354-59, 2001）及び抗腫瘍免疫の亢進（Nomura et al., Int. J. Cancer 91:597-606, 2001; Mach and Dranoff, Curr. Opin. Immunol. 12:571-75, 2000）に有用である可能性があることが示されている。たとえば、当業者に既知の報告の中で、ケモカインの生物活性が議論されている（Bruce, L. et al., Methods in Molecular Biology (2000) vol. 138, pp129-134, Raphaele, B. et al., Methods in Molecular Biology (2000) vol. 138, pp143-148, Paul D. Ponath et al., Methods in Molecular Biology (2000) vol. 138, pp113-120）。CXCL10の生理活性は、細胞表面に発現するケモカイン受容体CXCR3との結合により発揮される（Booth V. et al, Biochemistry. 41 (33): 10418-25.）。

【００２７】

本明細書でいう用語「CXCL10」は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型CXCL10のことをいう。この用語は、「全長」のプロセシングを受けていないものではなく、細胞中でのプロセシングの結果により、細胞外に分泌される成熟されたCXCL10を指す。本明細書において、プロセシングを受けていないものは、CXCL10前駆体と呼ばれる。この用語はまた、自然に生じるCXCL10の変異体、例えば、スプライス変異体や対立遺伝子変異体も包含する。天然のヒトCXCL10は、CXCL10前駆体（Refseq Accession number: NP_001556）として発現された後、配列番号：６０で示される配列のタンパク質として細胞外に分泌される。また、アカゲザルCXCL10前駆体の全アミノ酸配列は、Refseq Accession number: AKK95955で示されており、マウスCXCL10前駆体の全アミノ酸配列は、Refseq Accession number: NP_067249である。

天然型CXCL10または自然に生じるCXCL10の変異体に人工的なアミノ酸改変を加えたものは、「CXCL10改変体」と呼ばれる。

【００２８】

CXCL11

C-X-Cモチーフケモカイン11（C-X-C motif chemokine 11、C-X-C motif chemokine ligand 11、CXCL11）は、C-X-Cケモカインの一種であり、I-TAC（Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractantまたはIP-9（Interferon-gamma-inducible protein 9）とも呼ばれる。CXCL11の遺伝子発現は、IFN-γ及びIFN-βにより強く誘導され、IFN-αにも誘導される（Rani M.R., The Journal of Biological Chemistry. 271 (37): 22878-84.）。

【００２９】

CXCL11はT細胞を活性化する生物的活性を有している。CXCL11は、細胞表面に発現されるケモカイン受容体CXCR3に結合することにより生物的活性を発揮すると知られており、天然のCXCL11は天然CXCL10や天然CXCL9より強くCXCR3に結合するとされている（Cole K.E., The Journal of Experimental Medicine. 187 (12): 2009-21.; Tensen C.P., The Journal of Investigative Dermatology. 112 (5): 716-22.）。

【００３０】
本明細書でいう用語「CXCL11」は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型CXCL11のことをいう。この用語は、「全長」のプロセシングを受けていないものではなく、細胞中でのプロセシングの結果により、細胞外に分泌される成熟されたCXCL11を指す。本明細書において、プロセシングを受けていないものは、CXCL11前駆体と呼ばれる。この用語はまた、自然に生じるCXCL11の変異体、例えば、スプライス変異体や対立遺伝子変異体も包含する。天然のヒトCXCL11は、CXCL11前駆体（Refseq Accession number: NP_005400）として発現された後、配列番号：６１で示される配列のタンパク質として細胞外に分泌される。
天然型CXCL11または自然に生じるCXCL11の変異体に人工的なアミノ酸改変を加えたものは、「CXCL11改変体」と呼ばれる。
【００３１】
CXCL9
C-X-Cモチーフケモカイン9（C-X-C motif chemokine 9、 C-X-C motif chemokine ligand 9、CXCL9）は、C-X-Cケモカインの一種であり、Monokine induced by gamma interferon (MIG)とも呼ばれる。 CXCL9はIFN-γにより誘導されるT-cell chemoattractantであり、細胞表面に発現されるケモカイン受容体CXCR3に結合することにより生物的活性を発揮すると知られている。
【００３２】
本明細書でいう用語「CXCL9」は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型CXCL9のことをいう。この用語は、「全長」のプロセシングを受けていないものではなく、細胞中でのプロセシングの結果により、細胞外に分泌される成熟されたCXCL9を指す。本明細書において、プロセシングを受けていないものは、CXCL9前駆体と呼ばれる。この用語はまた、自然に生じるCXCL9の変異体、例えば、スプライス変異体や対立遺伝子変異体も包含する。天然のヒトCXCL9は、CXCL9前駆体（Refseq Accession number: NP_002407）として発現された後、配列番号：６２で示される配列のタンパク質として細胞外に分泌される。
天然型CXCL9または自然に生じるCXCL9の変異体に人工的なアミノ酸改変を加えたものは、「CXCL9改変体」と呼ばれる。
【００３３】
CXCL10、CXCL11、CXCL9等の一部をお互いに融合させてキメラタンパク質を作製することが出来る。例えば、ヒトCXCL11（配列番号：61）のアミノ酸残基1番目から24番目までとヒトCXCL10改変体（配列番号：1）のアミノ酸残基25番目から77番目までを結合したヒトCXCL10-ヒトCXCL11 キメラタンパク質（hITIP）（配列番号：63）を作成することが出来る。このようなキメラタンパク質も、CXCR3に結合可能な限り、CXCR3リガンドと呼ぶことができる。また、このようなキメラタンパク質も、DPPIVによりN末端の2アミノ酸が切断されることがある。
ヒトCXCL11（配列番号：61）のアミノ酸残基1番目から24番目までとヒトCXCL10改変体（配列番号：1）のアミノ酸残基25番目から77番目までを結合したヒトCXCL10-ヒトCXCL11 キメラタンパク質（hITIP）（配列番号：63）に更にアミノ酸改変を加えたものは、「hITIP改変体」と呼ばれる。
【００３４】
CXCR3リガンドとCXCR3の結合性の測定方法
CXCR3リガンドとCXCR3の結合活性の評価は、FACS、ELISAフォーマット、ALPHAスクリーン(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)や表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用したBIACORE法、BLI（Bio-Layer Interferometry）法（Octet）等、周知の方法によって確認することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

例えば、ドナービーズにビオチン標識されたCXCR3リガンドが結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたCXCR3ペプチドが結合される。CXCR3ペプチドとしてN末端の細胞外ドメイン領域(1-53番目、配列番号：８９)やその一部の断片(22-42、配列番号：９０、 Biochemistry (2002) 41, 10418-10425)が使用可能である。また、CXCR3の27位Y残基、または／および29位Y残基は硫酸化修飾を受けているものがより望ましい(MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Aug. 2006, p. 5838-5849)。競合するタグ化されていないCXCR3リガンドの非存在下では、CXCR3リガンドとCXCR3ペプチドは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていないCXCR3リガンドは、タグ化されたCXCR3リガンドとCXCR3ペプチド間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。CXCL10等のCXCR3リガンドをSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。CXCR3ペプチドをGSTでタグ化する方法としては、CXCR3ペプチドをコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子を発現可能なベクターを保持した細胞等においてGST融合CXCR3ペプチドを発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM（GraphPad社、San Diego）等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合（one-site competition）モデルに適合させることにより好適に解析される。

【００３５】

相互作用を観察する物質の一方（CXCR3リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト、CXCR3リガンドを固定する場合アナライトとして全長CXCR3または前記のCXCR3ペプチドを使用できる）をセンサーチップの表面に流しCXCR3リガンドとアナライトが結合すると、固定化されているCXCR3リガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd）が、当該定数の比から解離定数（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法や平衡値解析法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010において、平衡値解析法の例はMethods Enzymol.2000;323:325-40.において記載されている。同様な方法で、全長CXCR3または前記のCXCR3ペプチドをセンサーチップの金薄膜上に固定し、CXCR3リガンドをアナライトとして流すことで、CXCR3リガンドとCXCR3の結合を測定することもできる。センサーチップの金薄膜上に固定する全長CXCR3または前記のCXCR3ペプチドは、精製されたものであってもよいし、それらを発現する細胞や、その細胞膜分画とすることもできる。

本開示のCXCR3リガンドは、全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドに１００μＭ、１０μＭ、１μＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、５ｎＭ、１ｎＭ、５００ｐＭ、４００ｐＭ、３５０ｐＭ、３００ｐＭ、２５０ｐＭ、２００ｐＭ、１５０ｐＭ、１００ｐＭ

、５０ｐＭ、２５ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭ、０．５ｐＭ、または０．１ｐＭ以下の解離定数（ＫＤ）で特異的に結合することができる。

【００３６】

あるいは固定化した全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドに対するCXCR3リガンドの結合活性がELISAの原理に基づいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルに全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドが固定化される。CXCR3リガンド溶液をウェル内の固定化全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドに接触させ、固定化全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドに結合するCXCR3リガンドを、当該CXCR3リガンドに結合する抗体で検出される。また、ELISAプレートのウェルにCXCR3リガンドが固定化され、全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチド溶液をウェル内の固定化CXCR3リガンドに接触させ、固定化CXCR3リガンドに結合する全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドを、全長CXCR3あるいは前記CXCR3ペプチドに結合する抗体で検出される。

【００３７】

CXCR3リガンドとCXCR3の結合性を測定する方法として、放射性同位元素を用いてCXCR3リガンドを標記する方法もある。具体的に、放射性同位体でラベルされたCXCR3リガンドを用意し、CXCR3 発現細胞に加えてインキュベートする。インキュベート後のサンプルをfilterに通すことで、CXCR3に結合したCXCR3リガンドを細胞ごとfilterに吸着させる。Filterを乾燥させ、放射線量を計測することで、filterに吸着したCXCR3リガンドの量を測定することが出来る。この方法をCXCL10に適用した報告がある(MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Aug. 2006, p. 5838-5849 Vol. 26, No. 15、THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 278, No. 19, Issue of May 9, pp. 17066-17074, 2003)。

また、15NラベルしたCXCR3リガンドの15N-1H HSQC NMRスペクトル、2D NOESY NMRスペクトルを測定し、CXCR3ペプチドの添加前後で得られるNMRスペクトルを比較することで、CXCR3リガンド中のCXCR3結合に関わる残基や結合の強度を解析することもできる(Biochemistry, 2002, 41, 10418-10425)。

【００３８】

CXCR3リガンド

本明細書の用語「CXCR3リガンド」は、CXCR3に結合可能な分子のことを言う。例えば、CXCR3のリガンド結合部位と相互作用する部位を含むタンパク質は、本開示におけるCXCR3リガンドに含まれる。この用語は、「全長」のプロセシングを受けていないものではなく、細胞中でのプロセシングの結果により、細胞外に分泌される成熟されたCXCR3リガンドを指す。本明細書において、プロセシングを受けていないものは、CXCR3リガンド前駆体と呼ばれる。

【００３９】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、DPPIVに対する耐性、且つCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性を有する。

【００４０】

DPPIV（Dipeptidyl peptidase IV、Dipeptidyl peptidase 4、DPP4；EC3.4.14.5）は、腸管ホルモンであるインクレチンの不活化を行う酵素（セリンプロテアーゼ）であり、細胞膜上をはじめ可溶性タンパク質として血液中にも存在している。アデノシンデアミナーゼ（ADA、adenosine deaminase; EC 3.5.4.4）と結合して細胞内情報伝達を調節する働きも有しているため、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADABP、adenosine deaminase binding protein）とも呼ばれる。DPPIVは、アミノ基側末端から2番目にプロリンあるいはアラニン残基を有するペプチドからジペプチドを切り出す働きがある。

ヒトのDPPIVは766個のアミノ酸から構成される110kDaのタンパク質であり、そのアミノ酸配列はRefseq accession number: NP_001926.2 で示される。

【００４１】

対象タンパク質がDPPIVにより切断されるかについての評価は、DPPIVと対象タンパク

質をインキュベートした後、LC/MS解析によって評価することが出来る。具体的には、0.2 mg/mlの対象タンパク質と終濃度200 nM のDPPIVを37℃で1時間反応させたのち、LC/MSによる質量分析を行い、反応により対象タンパク質の質量が減少する場合、対象タンパク質がDPPIVにより切断されたことが示唆される。また、タンパク質の質量が減少した場合に減少分の質量と対象タンパク質Ｎ末端２アミノ酸の理論質量が一致した場合、対象タンパク質のＮ末端2アミノ酸がDPPIVにより切り落とされたことが示唆される。本開示のCXCR3リガンドに対してこのようなDPPIV切断評価を行うとき、DPPIVと一緒にインキュベートするタンパク質はCXCR3リガンドそのものでも良く、CXCR3リガンドと他のポリペプチド（例えば、抗体Fc領域）を融合させた融合タンパク質でも良い。

本開示における「DPPIVに対する耐性」は、対象タンパク質のDPPIVにより切断されない性質を言う。より具体的には、上記のような切断評価を行うときに、DPPIV処理後の対象タンパク質の質量が減少しないことを指す。更に具体的には、上記のような切断評価を行うときに、DPPIV処理後の対象タンパク質の質量減少が対象タンパク質のＮ末端２アミノ酸の理論質量と一致しないことを指す。

【００４２】

対象タンパク質のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性は、CXCR3を発現するtransfectantもしくは生体から単離された細胞を用いて測定することが出来る。具体的な方法の一例として、マウスCXCR3（mCXCR3）を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞(以下BaF3/mCXCR3)またはヒトCXCR3（hCXCR3）を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞(以下BaF3/hCXCR3)とHTS Transwell^{TM}-96 Permeable Supports with 5.0μm Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387、Corning) を用い、対象タンパク質をアナライトとする。分析対象となる各アナライトの溶液中終濃度が33nM, 100 nM, 300 nM, 1000 nMから選ばれる濃度になるように調整された後、それぞれ235 μLの溶液がLower chamberに移される。その後、Upper chamberにBaF3/mCXCR3またはBaF3/hCXCR3細胞を2.0×10^5 cells/wellとなるように75 μL/wellで播き、6時間または3時間反応が行われる。反応は5%炭酸ガス、37℃条件下で行われる。3時間、6時間、または18時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μLをOptiPlate-96（Cat. 6005299、PerkinElmer）に移し、CellTiter-Glo^{TM} Luminescent Cell Viability Assay溶液（Cat. G7571、Promega）を100 μL加える。室温で10分反応させた後、SpectraMax M3 マルチモードマイクロプレートリーダー（Molecular Devices）で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度が評価される。Lower chamberへ遊走した細胞の量は発光強度で反映される。

【００４３】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性は、天然ヒトCXCL10のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の30%以上である。具体的には、天然ヒトCXCL10をコントロールとして前記CXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の分析系に含め、測定に使用されるCXCR3細胞の状態を揃えるために、活性を対比したいCXCR3リガンドとコントロールの、同じ実験回から得られる発光強度を比較することが好ましい。天然ヒトCXCL10のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の30%以上は、前記CXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の分析系中のアナライト濃度を制限するものではないが、100 nM, 300 nM, 1000 nMの少なくとも一つの濃度において天然ヒトCXCL10のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の30%以上を指すことが出来る。

CXCR3リガンドを含む融合タンパク質をCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性分析のアナライトとするとき、コントロールとなる天然ヒトCXCL10についても、CXCR3リガンドを含む融合タンパク質と同様な分子フォーマットにする（本明細書で提供されるCXCR3リガンドの代わりに天然ヒトCXCL10を使用し融合タンパク質のコントロールを作製する）ことが好ましい。

【００４４】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドのCXCR3を発現する細胞

を遊走させる活性は、天然ヒトCXCL11のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上である。具体的には、天然ヒトCXCL11をコントロールとして前記CXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の分析系に含め、測定に使用されるCXCR3細胞の状態を揃えるために、活性を対比したいCXCR3リガンドとコントロールの、同じ実験回から得られる発光強度を比較することが好ましい。天然ヒトCXCL11のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上は、前記CXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の分析系中のアナライト濃度を制限するものではないが、33 nM, 100 nM, 300 nMの少なくとも一つの濃度において天然ヒトCXCL11のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上を指すことが出来る。

CXCR3リガンドを含む融合タンパク質をCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性分析のアナライトとするとき、コントロールとなる天然ヒトCXCL11についても、CXCR3リガンドを含む融合タンパク質と同様な分子フォーマットにする（本明細書で提供されるCXCR3リガンドの代わりに天然ヒトCXCL11を使用し融合タンパク質のコントロールを作製する）ことが好ましい。

【００４５】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性は、hITIPのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上である。具体的には、hITIPをコントロールとして前記CXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の分析系に含め、測定に使用されるCXCR3細胞の状態を揃えるために、活性を対比したいCXCR3リガンドとコントロールの、同じ実験回から得られる発光強度を比較することが好ましい。hITIPのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上は、前記CXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の分析系中のアナライト濃度を制限するものではないが、33 nM, 100 nM, 300 nMの少なくとも一つの濃度においてhITIPのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性の25%以上を指すことが出来る。

CXCR3リガンドを含む融合タンパク質をCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性分析のアナライトとするとき、コントロールとなるhITIPについても、CXCR3リガンドを含む融合タンパク質と同様な分子フォーマットにする（本明細書で提供されるCXCR3リガンドの代わりにhITIPを使用し融合タンパク質のコントロールを作製する）ことが好ましい。

【００４６】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドのCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性が最大となるときのCXCR3リガンド濃度は、天然ヒトCXCL10、天然ヒトCXCL11、hITIPから選ばれる少なくとも一種類のタンパク質のCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性が最大となるときの当該タンパク質の濃度より低い。

【００４７】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、N末端から2番目のアミノ酸がPではない。特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、N末端から2番目のアミノ酸がAではない。

【００４８】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは下記(a1)から(a7)：

(a1) V-X1-L（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；

(a2) X2-V-P（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；

(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；

(a4) P-L-S；

(a5) X4-F-P（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；

(a6) F-X5-M（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；

(a7) F-X6-P（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYであ

る）；
のいずれかの配列をN末端に有する。
【００４９】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、下記(b1)から(b7)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；
(b6) F-X5-M-F-K-R-G-R（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b7) F-X6-P-M-F-K-R-G-R（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する。
【００５０】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは下記(a1)から(a5)：
(a1) V-X1-L（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(a2) X2-V-P（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(a3) V-X3-P（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(a4) P-L-S；
(a5) X4-F-P（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する。
【００５１】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは下記(b1)から(b5)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれかの配列をN末端に有する。
【００５２】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、C-X-Cモチーフを有する。C-X-Cモチーフに含まれる二つのシステインは、それぞれCXCR3リガンドに含まれるC-X-Cモチーフ以外のシステインとジスルフィド結合を形成することが出来る。CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、およびC-S-C（Cys-Ser-Cys）から選ぶことができる。
【００５３】
CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフはまた、下記(b1)から(b7)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYである）；

(b6) F-X5-M-F-K-R-G-R（X5はA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYである）；
(b7) F-X6-P-M-F-K-R-G-R（X6はA、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYである）；
のいずれかのN末端配列のC末端となりに位置することができる。

【００５４】

CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフはまた、下記(b1)から(b5)：
(b1) V-X1-L-S-R-T-V-R（X1はF、G、I、L、M、T、V、W、またはYである）；
(b2) X2-V-P-L-S-R-T-V-R（X2はA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWである）；
(b3) V-X3-P-L-S-R-T-V-R（X3はA、F、G、I、M、P、T、またはVである）；
(b4) P-L-S-R-T-V-R；
(b5) X4-F-P-M-F-K-R-G-R（X4はA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYである）；
のいずれかの配列のC末端となりに位置することができる。

【００５５】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、C-X-Cモチーフの C末端に更に下記(c1)から(c5)：
(c1) 配列番号：６０の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c2) 配列番号：６１の12番アミノ酸から73番アミノ酸までの配列；
(c3) 配列番号：６２の12番アミノ酸から103番アミノ酸までの配列；
(c4) 配列番号：１の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c5) 配列番号：６３の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
のいずれかを有することができる。

【００５６】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、CXCL10改変体、CXCL11改変体、CXCL9改変体、hITIP改変体及びそれらの改変体から作製されたキメラタンパク質のいずれかである。

【００５７】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、下記(d1)から(d7)：
(d1) 配列番号：２～５７、９２～１４７、１４９～２０４のいずれか一つで示す配列；
(d2) 配列番号：６０と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d3) 配列番号：６１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d4) 配列番号：６２と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d5) 配列番号：６３と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d6) 配列番号：１と９０％以上の配列同一性を示す配列；
(d7) 配列番号１～５７、６０～６３、９２～１４７、１４９～２０４から選ばれる一つの配列に対して、アミノ酸の置換、挿入または欠失を１０個以下含む配列；
のいずれかである。

【００５８】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドは、配列番号：１、６０～６３のいずれか一つの配列と９０％以上の配列同一性、９５％以上の配列同一性、９６％以上の配列同一性、９７％以上の配列同一性、９８％以上の配列同一性、または９９％以上の配列同一性を示す配列である。

【００５９】

<u>CXCR3リガンド変異体</u>

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドのアミノ酸配列変異体も、考慮の内である。CXCR3リガンドのアミノ酸配列変異体は、CXCR3リガンドをコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入すること、または、ペプチド合成によって、調製されてもよい。そのような修飾は、例えば、CXCR3リガンドのアミノ酸配列からの欠失、および／または抗体のアミノ酸配列中への挿入、および／または抗体のアミノ酸配列中の

残基の置換を含む。最終構築物が所望の特徴（例えば、DPPIVに対する耐性、またはCXCR3発現細胞を遊走させる活性）を備えることを前提に、欠失、挿入、および置換の任意の組合せが、最終構築物に至るために行われ得る。

【００６０】

置換、挿入、および欠失変異体

特定の態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換を有するCXCR3リガンド変異体が提供される。保存的置換を、表１の「好ましい置換」の見出しの下に示す。より実質的な変更を、表１の「例示的な置換」の見出しの下に提供するとともに、アミノ酸側鎖のクラスに言及しつつ下で詳述する。アミノ酸置換は目的のCXCR3リガンドに導入されてもよく、産物は、例えば、保持／改善されたDPPIVに対する耐性、またはCXCR3発現細胞を遊走させる活性などの、所望の活性についてスクリーニングされてもよい。

【００６１】

【表１】

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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; 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

【００６２】

アミノ酸は、共通の側鎖特性によって群に分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン (Met)、アラニン (Ala)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)；
(2) 中性の親水性：システイン (Cys)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)；
(3) 酸性：アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)；
(4) 塩基性：ヒスチジン (His)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)；
(5) 鎖配向に影響する残基：グリシン (Gly)、プロリン (Pro)；
(6) 芳香族性：トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)。
非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラスのものに交換することをいう。

【００６３】

特定の態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変がCXCR3リガンドの能力を実質的に減少させない限り、1つまたは複数の改変が行われ得る。上記のCXCRリガンド変異体の特定の態様において、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、もしくは10つのアミノ酸改変を含む。

【００６４】

アミノ酸配列同一性

参照ポリペプチド配列に対する「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を得るように配列を整列させてかつ必要ならギャップを導入した後の、かつ、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとしたときの、参照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、百分率比として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決める目的のアラインメントは、当該技術分野における技術の範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) ソフトウェア、またはGENETYX（登録商標）（株式会社ゼネティックス）などの、公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントをとるための適切なパラメーターを決定することができる。

【００６５】

ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社の著作であり、そのソースコードは米国著作権庁 (U.S. Copyright Office, Wasington D.C., 20559) に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、ジェネンテック社 (Genentech, Inc., South San Francisco, California) から公に入手可能であるし、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、Digital UNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされる。すべての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、またはそれとの、またはそれに対する%アミノ酸配列同一性（あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、またはそれとの、またはそれに対する、ある%アミノ酸配列同一性を有するまたは含む所与のアミノ酸配列A、ということもできる）は、次のように計算される：分率X／Yの100倍。ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2によって、当該プログラムのAおよびBのアラインメントにおいて同一である一致としてスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはB中のアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、AのBへの%アミノ酸配列同一性は、BのAへの%アミノ酸配列同一性と等しくないことが、理解されるであろう。別段特に明示しない限り、本明細書で用いられるすべての%アミノ酸配列同一性値は、直前の段落で述べたとおりALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られるものである。

【００６６】

CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法

本開示はまた、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に関する。
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法は、親CXCR3リガンドのN末端付近配列を改変することを含む。

【００６７】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸がPあるいはAである。特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から1番目のアミノ酸がVである。より具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はV-P-LまたはV-A-Lである。更に具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はV-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）である。

【００６８】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸がPである。特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から1番目のアミノ酸がFである。より具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はF-P-Mである。更に具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はF-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）である。

【００６９】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドは、C-X-Cモチーフを有する。C-X-Cモチーフに含まれる二つのシステインは、それぞれ親CXCR3リガンドに含まれるC-X-Cモチーフ以外のシステインとジスルフィド結合を形成することが出来る。親CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、およびC-S-C（Cys-Ser-Cys）から選ぶことができる。具体的な態様において、親CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフは、N末端配列V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）またはF-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）のC末端となりに位置することができる。

【００７０】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドは、C-X-CモチーフのC末端に更に下記(c1)から(c5)：

(c1) 配列番号：６０の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c2) 配列番号：６１の12番アミノ酸から73番アミノ酸までの配列；
(c3) 配列番号：６２の12番アミノ酸から103番アミノ酸までの配列；
(c4) 配列番号：１の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c5) 配列番号：６３の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；

のいずれかを有することができる。

【００７１】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法に使用される親CXCR3リガンドは、天然CXCL10、天然CXCL11、天然CXCL9、CXCL10改変体、CXCL11改変体、CXCL9改変体及びこれらから作製されたキメラタンパク質から選ばれる。

【００７２】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法は、下記のいずれかを含む：

(1) 親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを付加する；
(3) 親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを挿入する；
(4) 親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる。
言い換えれば、本明細書は、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与するための、下記のいずれか：
(1) 親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYに置換すること；
(2) 親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを付加すること；
(3) 親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを挿入すること；
(4) 親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させること；
の使用を提供する。

【００７３】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法は、下記のいずれかを含む：
(1) 親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加する；
(3) 親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入する；
(4) 親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる。
言い換えれば、本明細書は、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与するための、下記のいずれか：
(1) 親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換すること；
(2) 親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加すること；
(3) 親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入すること；
(4) 親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させること；
の使用を提供する。

【００７４】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法は、下記のいずれかを含む：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYを付加する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYに置換する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYを挿入する。
言い換えれば、本明細書は、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与するための、下記のいずれか：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYを付加すること；

(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYに置換すること；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、D、E、F、G、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYを挿入すること；
の使用を提供する。

【００７５】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与する方法は、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加することを含む。

言い換えれば、本明細書は、CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与するための、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加することの使用を提供する。

【００７６】

CXCR3リガンドを含む融合タンパク質

本開示の一態様では、CXCR3リガンドを含む融合タンパク質に関する。具体的な態様において、本開示の融合タンパク質は、CXCR3リガンドをN末端に含む融合タンパク質に関する。本開示の融合タンパク質は、CXCR3リガンドと抗体が融合されたものでもよく、CXCR3リガンドと抗体Fc領域やアルブミン等の他種タンパク質と融合されたものでも良い。具体的な一例として、例えば、CXCR3リガンドのC末端に、抗体（全長抗体や抗体断片を含む）や抗体Fc領域、アルブミン等の他種タンパク質が融合された融合タンパク質が挙げられる。CXCR3リガンドを含む融合タンパク質は、融合させたタンパク質に結合する物質を利用して精製することができる。たとえば、抗体Fc領域と融合させた場合、固定化プロテインAへの吸着を利用してCXCR3リガンドを回収することができる。

【００７７】

本開示中の融合タンパク質において、CXCR3リガンドと融合相手をリンカー介して融合させることが出来る。CXCR3リガンドと融合相手を融合させるとき用いられるリンカーとして、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、または合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996参照）に開示されるリンカー等を用いることができる。

ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。例として、それだけに限定されないが、例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser
Gly・Ser（GS）
Ser・Gly（SG）
Gly・Gly・Ser（GGS）
Gly・Ser・Gly（GSG）
Ser・Gly・Gly（SGG）
Gly・Ser・Ser（GSS）
Ser・Ser・Gly（SSG）
Ser・Gly・Ser（SGS）
Gly・Gly・Gly・Ser（GGGS、配列番号：６４）
Gly・Gly・Ser・Gly（GGSG、配列番号：６５）
Gly・Ser・Gly・Gly（GSGG、配列番号：６６）
Ser・Gly・Gly・Gly（SGGG、配列番号：６７）
Gly・Ser・Ser・Gly（GSSG、配列番号：６８）
Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（GGGGS、配列番号：６９）
Gly・Gly・Gly・Ser・Gly（GGGSG、配列番号：７０）
Gly・Gly・Ser・Gly・Gly（GGSGG、配列番号：７１）
Gly・Ser・Gly・Gly・Gly（GSGGG、配列番号：７２）
Gly・Ser・Gly・Gly・Ser（GSGGS、配列番号：７３）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（SGGGG、配列番号：７４）
Gly・Ser・Ser・Gly・Gly（GSSGG、配列番号：７５）
Gly・Ser・Gly・Ser・Gly（GSGSG、配列番号：７６）
Ser・Gly・Gly・Ser・Gly（SGGSG、配列番号：７７）
Gly・Ser・Ser・Ser・Gly（GSSSG、配列番号：７８）
Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（GGGGGS、配列番号：７９）
Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（SGGGGG、配列番号：８０）
Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（GGGGGGS、配列番号：８１）
Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（SGGGGGG、配列番号：８２）
(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（GGGGS、配列番号：６９）)n
(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（SGGGG、配列番号：７４）)n

［nは１以上の整数である］等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

【００７８】

合成化合物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ－EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ－DST）、ビス［2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（BSOCOES）、ビス［2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

【００７９】

抗体

本明細書で用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

【００８０】

抗体断片

「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部分を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab’-SH、F(ab')2；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【００８１】

Fc領域

本明細書で用語「Fc領域」は、少なくとも定常領域の一部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然型配列のFc領域および変異体Fc領域を含む。一態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。ただし、Fc領域のC末端のリジン（Lys447）またはグリシン‐リジン（Gly446-Lys447）は、存在していてもしていなくてもよい。本明細書では別段特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991 に記載の、EUナンバリングシステム（EUインデックスとも呼ばれる）にしたがう。本発明において、Fc領域は、各種の改変を含むことができる。たとえば、Fcがヘテロ会合化した分子の収量を高めるための改変や、FcγRとの結合を抑制するための改変が公知である。

【００８２】

核酸／ポリヌクレオチド

「単離された」核酸は／ポリヌクレオチド、そのもともとの環境の成分から分離された核酸／ポリヌクレオチド分子のことをいう。単離された核酸／ポリヌクレオチドは、その核酸／ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞の中に含まれた核酸／ポリヌクレオチド分子を含むが、その核酸／ポリヌクレオチド分子は染色体外に存在しているかまたは本来の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置に存在している。

【００８３】

本開示はまた、CXCR3リガンドをエンコードする核酸／ポリヌクレオチド、あるいは当該CXCR3リガンドを含む融合タンパク質をエンコードする核酸／ポリヌクレオチドにも関する。

「CXCR3リガンドをコードする核酸／ポリヌクレオチド」は、CXCR3リガンドをコードする1つまたは複数の核酸分子のことをいい、1つのベクターまたは別々のベクターに乗っている核酸分子、および、宿主細胞中の1つまたは複数の位置に存在している核酸分子を含む。

【００８４】

ベクター

本明細書で用いられる用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる、核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。あるベクターは、自身が動作的に連結された核酸の、発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」とも称される。

【００８５】

宿主細胞

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書では含まれる。

【００８６】

本開示はまた、CXCR3リガンドをエンコードする核酸／ポリヌクレオチド、あるいは当該CXCR3リガンドを含む融合タンパク質をエンコードする核酸／ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関する。

【００８７】

CXCR3リガンドの製造方法

本開示におけるポリヌクレオチドは、通常、適当なベクターへ担持（挿入）され、宿主細胞へ導入される。該ベクターとしては、挿入した核酸を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製）などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。

本開示のCXCR3リガンドまたはCXCR3リガンドを含む融合タンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でリガンド結合分子を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本開示のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987)

Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11）。

上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。CXCR3リガンドまたは融合タンパク質を発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ドロソフィラS2、スポドプテラSF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

宿主細胞において発現したCXCR3リガンドまたは融合タンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のリガンド結合分子または融合タンパク質に組み込むことができる。これらのシグナルは目的のリガンド結合分子または融合タンパク質に対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。具体的な例として、シグナル配列MNQTAILICCLIFLTLSGIQG（配列番号：８３）、MKKSGVLFLLGIILLVLIGVQG（配列番号：８４）、MSVKGMAIALAVILCATVVQG（配列番号：８５）、またはMGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：１４８）を使用することが出来る。

上記製造方法におけるCXCR3リガンドまたは融合タンパク質の回収は、本開示のCXCR3リガンドまたは融合タンパク質が培地に分泌される場合は、培地を回収する。本開示のCXCR3リガンドまたは融合タンパク質が細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にCXCR3リガンドまたは融合タンパク質を回収する。

組換え細胞培養物から本開示のCXCR3リガンドまたは融合タンパク質を回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

【００８８】

本明細書で提供されるCXCR3リガンドはまた、親CXCR3リガンドにDPPIVに対する耐性を付与することにより製造することが出来る。特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法は、親CXCR3リガンドのN末端付近配列を改変することを含む。

【００８９】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸がPあるいはAである。特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から1番目のアミノ酸がVである。より具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はV-P-LまたはV-A-Lである。更に具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はV-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）である。

【００９０】

特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸がPである。特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端から1番目のアミノ酸がFである。より具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はF-P-Mである。更に具体的な態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドのN末端配列はF-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）である。

【００９１】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドは、C-X-Cモチーフを有する。C-X-Cモチーフに含まれる二つのシステインは、それぞれ親CXCR3リガンドに含まれるC-X-Cモチーフ以外のシステインとジスルフィド結合を形成することが出来る。親CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフは、C-T-C（Cys-Thr-Cys）、C-L-C（Cys-Leu-Cys）、およびC-S-C（Cys-Ser-Cys）から選ぶことができる。具体的な態様において、親CXCR3リガンド中のC-X-Cモチーフは、N末端配列V-P-L-S-R-T-V-R（配列番号：８６）またはV-A-L-S-R-T-V-R（配列番号：８７）またはF-P-M-F-K-R-G-R（配列番号：９１）のC末端となりに位置することができる。
【００９２】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドは、C-X-CモチーフのC末端に更に下記(c1)から(c5)：
(c1) 配列番号：６０の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c2) 配列番号：６１の12番アミノ酸から73番アミノ酸までの配列；
(c3) 配列番号：６２の12番アミノ酸から103番アミノ酸までの配列；
(c4) 配列番号：１の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
(c5) 配列番号：６３の12番アミノ酸から77番アミノ酸までの配列；
のいずれかを有することができる。
【００９３】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法に使用される親CXCR3リガンドは、天然CXCL10、天然CXCL11、天然CXCL9、CXCL10改変体、CXCL11改変体、CXCL9改変体及びこれらから作製されたキメラタンパク質から選ばれる。
【００９４】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法は、下記のいずれかを含む：
(1) 親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、K、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを付加する；
(3) 親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、またはYを挿入する；
(4) 親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる。
【００９５】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法は、下記のいずれかを含む：
(1) 親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPまたはAからF、G、I、L、M、T、V、W、またはYに置換する；
(2) 親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、G、I、L、N、Q、S、T、またはWを付加する；
(3) 親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、F、G、I、M、P、T、またはVを挿入する；
(4) 親CXCR3リガンドのN末端のVを欠失させる。
【００９６】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法は、下記のいずれかを含む：
(1) 前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、またはYを付加する；
(2) 前記親CXCR3リガンドのN末端から2番目のアミノ酸をPからA、D、E、G、H、I、M、N、Q、R、S、T、V、W、またはYに置換する；
(3) 前記親CXCR3リガンドのN末端1番目、2番目のアミノ酸の間に、A、D、E、F、G

、H、L、M、N、P、Q、S、T、W、またはYを挿入する。
【００９７】
特定の態様において、本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法は、前記親CXCR3リガンドのN末端に、更にA、D、E、G、M、N、Q、S、T、V、またはYを付加することを含む。
本明細書で提供されるCXCR3リガンドの製造方法は、具体的な態様において、さらに付加的に、前記改変を含むCXCR3リガンドを回収する工程、あるいは単離する工程を含むこともできる。
【００９８】
治療
本明細書で用いられる「治療」（および、その文法上の派生語、例えば「治療する」、「治療すること」など）は、治療される個体の自然経過を改変することを企図した臨床的介入を意味し、予防のためにも、臨床的病態の経過の間にも実施され得る。治療の望ましい効果は、これらに限定されるものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患による任意の直接的または間接的な病理的影響の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の低減、疾患状態の回復または緩和、および寛解または改善された予後を含む。いくつかの態様において、本開示のCXCR3リガンドは、疾患の発症を遅らせる、または疾患の進行を遅くするために用いられる。
【００９９】
医薬組成物
用語「薬学的製剤」または「医薬組成物」は、その中に含まれた有効成分の生物学的活性が効果を発揮し得るような形態にある調製物であって、かつ製剤が投与される被験体に許容できない程度に毒性のある追加の要素を含んでいない、調製物のことをいう。
【０１００】
薬学的に許容される担体
「薬学的に許容される担体」は、被験体に対して無毒な、薬学的製剤中の有効成分以外の成分のことをいう。薬学的に許容される担体は、これらに限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を含む。
【０１０１】
CXCR3リガンドまたはCXCR3リガンドを含む融合タンパク質を含む医薬組成物
また本開示は、本開示のCXCR3リガンドおよび医薬的に許容される担体を含む医薬組成物（薬剤）、本開示のCXCR3リガンドを含む融合タンパク質と医薬的に許容される担体を含む医薬組成物（薬剤）にも関する。
【０１０２】
本開示において、「CXCR3リガンドを含む医薬組成物」との用語は、「CXCR3リガンドを治療対象に投与することを含む疾患の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「疾患を治療するための医薬の製造におけるCXCR3リガンドの使用」と言い換えることも可能である。「CXCR3リガンドを含む医薬組成物」との用語を、「疾患を治療するためのCXCR3リガンドの使用」と言い換えることも可能である。
「CXCR3リガンドを含む融合タンパク質を含む医薬組成物」との用語は、「CXCR3リガンドを含む融合タンパク質を治療対象に投与することを含む疾患の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「疾患を治療するための医薬の製造におけるCXCR3リガンドを含む融合タンパク質の使用」と言い換えることも可能である。「CXCR3リガンドを含む融合タンパク質を含む医薬組成物」との用語を、「疾患を治療するためのCXCR3リガンドを含む融合タンパク質の使用」と言い換えることも可能である。
【０１０３】
本開示のいくつかの実施態様において、CXCR3リガンドを含む組成物を個体に投与することが出来る。本開示のいくつかの実施態様において、CXCR3リガンドを含む融合タンパク質を個体に投与することが出来る。
【０１０４】

本開示の医薬組成物は、当業者に公知の方法を用いて製剤化され得る。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用され得る。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化され得る。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定される。

【０１０５】

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施にしたがって処方され得る。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適切な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）、HCO-50等）が併用され得る。

油性液としてはゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールも併用され得る。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合され得る。調製された注射液は通常、適切なアンプルに充填される。

【０１０６】

本開示の医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物が投与される。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与され得る。

投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択され得る。CXCR3リガンドを含有する医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲に設定され得る。または、例えば、患者あたり0.001～100000 mgの投与量が設定され得るが、本開示はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することが可能である。

【実施例】

【０１０７】

以下は、本開示の方法および組成物の実施例である。上述の一般的な記載に照らし、種々の他の態様が実施され得ることが、理解されるであろう。

【０１０８】

<u>実施例１．ヒトCXCL10（hCXCL10）改変体およびhCXCL10改変体Fc fusion の構築</u>

ヒトCXCL10（hCXCL10、Refseq: NP_001556.2, Uniprot ID: P02778）を、Furinプロテアーゼに耐性を有するように変異させたhCXCL10改変体hCXCL10R75A（配列番号：1）、および、hCXCL10R75AのDipeptidyl peptidase IV（DPPIV）認識・切断サイトおよびその周辺にアミノ酸改変が導入されたヒトCXCL10改変体が構築された（DPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変位置を図１Ｂ、設計されたヒトCXCL10改変体の名称、配列等を表２（表２－１、表２－２）に示す）。

【０１０９】

【表２－１】

配列名	配列番号	改変パターン	改変、挿入アミノ酸残基	改変	N末端配列	対応するhCXCL10改変体Fc fusion
hCXCL10R75A	1				VPLS...	hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0001	2	a	A	P2A	VALS...	hCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0002	3	a	D	P2D	VDLS...	hCXCL10R75A.0002-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0003	4	a	E	P2E	VELS...	hCXCL10R75A.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0004	5	a	F	P2F	VFLS...	hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0005	6	a	G	P2G	VGLS...	hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0006	7	a	H	P2H	VHLS...	hCXCL10R75A.0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0007	8	a	I	P2I	VILS...	hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0008	9	a	K	P2K	VKLS...	hCXCL10R75A.0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0009	10	a	L	P2L	VLLS...	hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0010	11	a	M	P2M	VMLS...	hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0011	12	a	N	P2N	VNLS...	hCXCL10R75A.0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0012	13	a	Q	P2Q	VQLS...	hCXCL10R75A.0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0013	14	a	R	P2R	VRLS...	hCXCL10R75A.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0014	15	a	S	P2S	VSLS...	hCXCL10R75A.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0015	16	a	T	P2T	VTLS...	hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0016	17	a	V	P2V	VVLS...	hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0017	18	a	W	P2W	VWLS...	hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0018	19	a	Y	P2Y	VYLS...	hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0019	20	b	A	G-1_V1insA	AVPL...	hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0020	21	b	D	G-1_V1insD	DVPL...	hCXCL10R75A.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0021	22	b	E	G-1_V1insE	EVPL...	hCXCL10R75A.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0022	23	b	F	G-1_V1insF	FVPL...	hCXCL10R75A.0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0023	24	b	G	G-1_V1insG	GVPL...	hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0024	25	b	H	G-1_V1insH	HVPL...	hCXCL10R75A.0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0025	26	b	I	G-1_V1insI	IVPL...	hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0026	27	b	K	G-1_V1insK	KVPL...	hCXCL10R75A.0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0027	28	b	L	G-1_V1insL	LVPL...	hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0028	29	b	M	G-1_V1insM	MVPL...	hCXCL10R75A.0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0029	30	b	N	G-1_V1insN	NVPL...	hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

【表２－２】

hCXCL10R75A.0030	31	b	P	G-1_V1insP	PVPL...	hCXCL10R75A.0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0031	32	b	Q	G-1_V1insQ	QVPL...	hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0032	33	b	R	G-1_V1insR	RVPL...	hCXCL10R75A.0032-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0033	34	b	S	G-1_V1insS	SVPL...	hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0034	35	b	T	G-1_V1insT	TVPL...	hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0035	36	b	V	V1dup or G-1_V1insV or V1_P2insV	VVPL...	hCXCL10R75A.0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0036	37	b	W	G-1_V1insW	WVPL...	hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0037	38	b	Y	G-1_V1insY	YVPL...	hCXCL10R75A.0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0038	39	c	A	V1_P2insA	VAPL...	hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0039	40	c	D	V1_P2insD	VDPL...	hCXCL10R75A.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0040	41	c	E	V1_P2insE	VEPL...	hCXCL10R75A.0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0041	42	c	F	V1_P2insF	VFPL...	hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0042	43	c	G	V1_P2insG	VGPL...	hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0043	44	c	H	V1_P2insH	VHPL...	hCXCL10R75A.0043-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0044	45	c	I	V1_P2insI	VIPL...	hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0045	46	c	K	V1_P2insK	VKPL...	hCXCL10R75A.0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0046	47	c	L	V1_P2insL	VLPL...	hCXCL10R75A.0046-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0047	48	c	M	V1_P2insM	VMPL...	hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0048	49	c	N	V1_P2insN	VNPL...	hCXCL10R75A.0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0049	50	c	P	P2dup or V1_P2insP or P2_L3insP	VPPL...	hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0050	51	c	Q	V1_P2insQ	VQPL...	hCXCL10R75A.0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0051	52	c	R	V1_P2insR	VRPL...	hCXCL10R75A.0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0052	53	c	S	V1_P2insS	VSPL...	hCXCL10R75A.0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0053	54	c	T	V1_P2insT	VTPL...	hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0054	55	c	V	V1dup or G-1_V1insV or V1_P2insV	VVPL...	hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0055	56	c	W	V1_P2insW	VWPL...	hCXCL10R75A.0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0056	57	c	Y	V1_P2insY	VYPL...	hCXCL10R75A.0056-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

【０１１０】

各種hCXCL10改変体の精製を容易にするため、hCXCL10改変体とヒトIgG1抗体Fc domainを融合させたhCXCL10改変体Fc fusion が構築された。hCXCL10改変体Fc fusionの模式図を図１Ａに示す。

前記hCXCL10改変体とヒトIgG1抗体(hIgG1)のFc domain改変体であるG1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R （G1T4k.one（配列番号：58）、VHn-G1T4h.one.H435R（配列番号：59））を融合したhCXCL10改変体Fc fusionが調製された。具体的には、各hCXCL10改変体のC末端とG1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R中のG1T4k.oneのN末端を連結させたペプチド鎖の遺伝子をコードする発現ベクターが当業者公知の方法で

作製され、これらのペプチド鎖がVHn-G1T4h.one.H435R と組み合わせられ、hIgG1 Fc domain改変体にhCXCL10改変体が１つ結合されたhCXCL10改変体Fc fusionが当業者公知の方法でExpi 293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現され、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製された。

本試験で使用しているFc domain改変体は、Fcがヘテロ会合化した分子の収量を高めるための変異、および、FcγRの結合を抑える変異が導入されている。

【０１１１】

実施例２． hCXCL10改変体Fc fusion の細胞遊走活性評価

実施例１で調製されたhCXCL10改変体Fc fusionがCXCL10受容体を発現する細胞の遊走を引き起こすか（細胞遊走活性）が評価された。細胞遊走活性のポジティブコントロールとしてhCXCL10R75Aが使用された。hCXCL10R75Aは当業者公知の方法でExpi293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現され、ヘパリンセファロース(HiTrap Heparin HP Column GEヘルスケア)、SPセファロース(HiTrap SP HP Column GEヘルスケア)、ゲル濾過(HiLoadSuperdex75pg GEヘルスケア)を用いた当業者公知の方法により精製が行われた。

【０１１２】

細胞遊走活性は、マウスCXCR3（mCXCR3）を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞(以下BaF3/mCXCR3)とHTS Transwell^{TM}-96 Permeable Supports with 5.0μm Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387、Corning) を用いて評価された。

アナライトとして、hCXCL10 (PeproTech, cat 300-12)、hCXCL10R75A 、および実施例１で調製された下記hCXCL10改変体Fc fusionが使用された：

hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0002-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R。

【０１１３】

分析対象となる各アナライトの溶液中終濃度が100 nM, 300 nM, 1000 nMになるように調整された後、それぞれ235 μLの溶液がLower chamberに移された。その後、Upper chamberにBaF3/mCXCR3細胞を2.0×10^5 cells/wellとなるように75 μL/wellで播き、6時間または3時間反応が行われた。反応は5%炭酸ガス、37℃条件下で行われた。3または6時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μLをOptiPlate-96（Cat. 6005299、PerkinElmer）に移し、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay溶液（Cat. G7571、Promega）を100 μL加えた。室温で10分反応させた後、SpectraMax M3 マルチモードマイクロプレートリーダー（Molecular Devices）で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度が評価された。

【０１１４】

Lower chamberへ遊走した細胞の量は発光強度で反映される。hCXCL10 (PeproTech, cat 300-12)とhCXCL10R75Aの細胞遊走活性の比較と、hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rとその他のhCXCL10改変体Fc fusionの細胞遊走活性の比較がそれぞれ行われた。

hCXCL10 (PeproTech, cat 300-12)とhCXCL10R75Aの細胞遊走活性の比較は６時間反応後に行われ、結果は図２、表３に示される。hCXCL10 (PeproTech, cat 300-12)とhCXCL10R75Aは共に濃度依存的な細胞遊走活性を示し、その依存性に大差はなかった。このことから、Furinプロテアーゼに耐性を有するように改変されたhCXCL10R75Aは野生型と同様の活性を持つことが示された。

【０１１５】

【表３】

アナライト名	アナライト濃度	発光値
hCXCL10 (PeproTech)	1 nM	257
	1.5 nM	1252
	3 nM	1677
	5 nM	4118
	10 nM	7094
	15 nM	16110
	30 nM	31321
	50 nM	41726
	100 nM	28288
	150 nM	21343
	300 nM	6822
	500 nM	1587
	1000 nM	634
hCXCL10R75A	1 nM	207
	1.5 nM	389
	3 nM	1185
	5 nM	1677
	10 nM	4354
	15 nM	7024
	30 nM	22026
	50 nM	30392
	100 nM	34130
	150 nM	22345
	300 nM	11163
	500 nM	7751
	1000 nM	1599
cell only	0 nM	275

【０１１６】

hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rとその他のhCXCL10改変体Fc fusionの細胞遊走活性の比較は３時間反応後に行われ、結果は図３、表４（表４a、表４ｂ－１、表４ｂ－２）に示される。hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rと比較して、

hCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rは100 nM, 300 nM, 1000 nMの各濃度において同濃度のhCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rの30%以上の細胞遊走活性を保持していた。このことから、これらヒトCXCL10改変体Fc fusionに含まれるヒトCXCL10改変体は十分な活性を持つことが示された。

【０１１７】

【表４ａ】

アナライト名	アナライト濃度	発光値	活性維持率*
hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	50291	
	300 nM	63662	
	1000 nM	64934	
hCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	25665	51%
	300 nM	55400	87%
	1000 nM	72476	112%
hCXCL10R75A.0002-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	365	1%
	300 nM	524	1%
	1000 nM	3078	5%
hCXCL10R75A.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	402	1%
	300 nM	1319	2%
	1000 nM	6634	10%
hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	60499	120%
	300 nM	91666	144%
	1000 nM	64738	100%
hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	29314	58%
	300 nM	49215	77%
	1000 nM	62988	97%
hCXCL10R75A.0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	13034	26%
	300 nM	31410	49%
	1000 nM	25422	39%
hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	61004	121%
	300 nM	91432	144%
	1000 nM	86763	134%
hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	67910	135%
	300 nM	89121	140%
	1000 nM	50563	78%
hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	44181	88%
	300 nM	70501	111%
	1000 nM	76518	118%
hCXCL10R75A.0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	6447	13%
	300 nM	27284	43%
	1000 nM	70810	109%
hCXCL10R75A.0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	12277	24%
	300 nM	41113	65%
	1000 nM	80105	123%
hCXCL10R75A.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	3951	8%
	300 nM	26601	42%
	1000 nM	82839	128%
hCXCL10R75A.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	7581	15%
	300 nM	30656	48%
	1000 nM	59567	92%
hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	43622	87%
	300 nM	67799	106%
	1000 nM	85480	132%
hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	48930	97%
	300 nM	69864	110%
	1000 nM	79077	122%
hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	38888	77%
	300 nM	82142	129%
	1000 nM	68224	105%
hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	49213	98%
	300 nM	84292	132%
	1000 nM	77813	120%
cell only	0 nM	1348	-

活性維持率*: hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R の対応する濃度におけるシグナル値に対する割合

【０１１８】

【表４ｂ－１】

アナライト名	アナライト濃度	発光値	活性維持率*
hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	30093	
	300 nM	52215	
	1000 nM	70794	
hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	19969	66%
	300 nM	48281	92%
	1000 nM	70794	100%
hCXCL10R75A.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	503	2%
	300 nM	1296	2%
	1000 nM	13592	19%
hCXCL10R75A.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	531	2%
	300 nM	671	1%
	1000 nM	10553	15%
hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	27473	91%
	300 nM	55608	106%
	1000 nM	74001	105%
hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	29422	98%
	300 nM	62870	120%
	1000 nM	87538	124%
hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	36702	122%
	300 nM	67093	128%
	1000 nM	76975	109%
hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	22048	73%
	300 nM	48887	94%
	1000 nM	74244	105%
hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	26942	90%
	300 nM	47666	91%
	1000 nM	74663	105%
hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	23828	79%
	300 nM	47833	92%
	1000 nM	72566	103%
hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	26755	89%
	300 nM	52616	101%
	1000 nM	68706	97%
hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	25990	86%
	300 nM	77812	149%
	1000 nM	82063	116%
hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	15307	51%
	300 nM	52204	100%
	1000 nM	79611	112%
hCXCL10R75A.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	373	1%
	300 nM	559	1%
	1000 nM	4633	7%
hCXCL10R75A.0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	336	1%
	300 nM	653	1%
	1000 nM	6339	9%
hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	42584	142%
	300 nM	73123	140%
	1000 nM	83769	118%
hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	40067	133%
	300 nM	59914	115%
	1000 nM	78325	111%
hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	31472	105%
	300 nM	73850	141%
	1000 nM	91553	129%

【表４ｂ－２】

hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	28498	95%
	300 nM	66644	128%
	1000 nM	85941	121%
hCXCL10R75A.0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	4559	15%
	300 nM	33606	64%
	1000 nM	40822	58%
hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	48792	162%
	300 nM	71949	138%
	1000 nM	80469	114%
hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	10497	35%
	300 nM	47981	92%
	1000 nM	78791	111%
hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	100 nM	28405	94%
	300 nM	67371	129%
	1000 nM	73636	104%
cell only	0 nM	792	-

活性維持率*: hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R の対応する濃度におけるシグナル値に対する割合

【０１１９】

実施例３． hCXCL10改変体Fc fusionのDPPIV切断耐性評価

実施例２で細胞遊走を引き起こしたhCXCL10改変体Fc fusionがDPPIVにより切断されるかが検証された。プロテアーゼとしてヒトに由来するDipeptidyl peptidase IV（human DPPIV, hDPPIV）（Biolegend, 764102）が用いられた。プロテアーゼによるhCXCL10改変体Fc fusionの切断は脱糖鎖処理後のLC/MS解析によって評価された。終濃度0.2 mg/mlのhCXCL10改変体Fc fusionと終濃度200 nM のhDPPIVを37℃で1時間反応させたのち、当業者公知の方法でLC/MSによる質量分析が行われ、hCXCL10改変体Fc fusionの切断が評価された。hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435RおよびhCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rではプロテアーゼ処理により、hCXCL10改変体Fc fusion中のhCXCL10改変体含有ペプチド鎖の質量が減少し、その質量はそれぞれのhCXCL10改変体含有ペプチド鎖のN末端2残基が脱落した配列の理論質量と一致した。このことから、hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435RおよびhCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rに含まれるヒトCXCL10改変体（hCXCL10R75A、hCXCL10R75A.0001）はhDPPIVによりN末端2残基が切断されることが示唆された。

【０１２０】

一方で、hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435RはhDDPIV処理による質量変化がなかった(表5)。この結果から、これらのhCXCL10改変体Fc fusionに含まれるhCXCL10改変体はhDPPIV切断耐性を示すことが示唆された。

【０１２１】

【表５】

#	試料名	hCXCL10-hIgG1抗体Fc domain 融合タンパク質名	融合タンパク質 理論質量 (Da)	測定値 (Da) (DPPIV 処理前)	測定値 (Da) (DPPIV 処理後)	Δmass (Da)	コメント
1	hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A-G1T4k.one	34627	34626	34431	195	N末端VPの脱離が示唆された
2	hCXCL10R75A.0001-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0001-G1T4k.one	34601	34601	34430	171	N末端VAの脱離が示唆された
3	hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0004-G1T4k.one	34678	34677	34676	1	–
4	hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0005-G1T4k.one	34587	34586	34587	−1	–
5	hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0007-G1T4k.one	34644	34643	34642	1	–
6	hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0009-G1T4k.one	34644	34643	34642	1	–
7	hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0010-G1T4k.one	34662	34661	34662	−1	–
8	hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0015-G1T4k.one	34631	34630	34630	0	–
9	hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one	34629	34629	34628	1	–
10	hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0017-G1T4k.one	34717	34716	34716	0	–
11	hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0018-G1T4k.one	34694	34693	34693	0	–
12	hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0019-G1T4k.one	34699	34698	34697	1	–
13	hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0023-G1T4k.one	34685	34684	34683	1	–
14	hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0025-G1T4k.one	34741	34740	34740	0	–
15	hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0027-G1T4k.one	34741	34740	34739	1	–
16	hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0029-G1T4k.one	34742	34741	34742	−1	–
17	hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0031-G1T4k.one	34739	34738	34738	0	–
18	hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0033-G1T4k.one	34715	34715	34713	2	–
19	hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0034-G1T4k.one	34729	34728	34728	0	–
20	hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0036-G1T4k.one	34814	34813	34813	0	–
21	hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0038-G1T4k.one	34699	34698	34698	0	–
22	hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0041-G1T4k.one	34775	34774	34774	0	–
23	hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0042-G1T4k.one	34685	34685	34684	1	–
24	hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0044-G1T4k.one	34741	34741	34741	0	–
25	hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0047-G1T4k.one	34759	34758	34758	0	–
26	hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0049-G1T4k.one	34725	34725	34724	1	–
27	hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0053-G1T4k.one	34729	34726	34728	−2	–
28	hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	hCXCL10R75A.0054-G1T4k.one	34727	34727	34727	0	–

【０１２２】

hCXCL10R75AはhDPPIVによりN末端2残基が切断されることから、上記hDDPIV処理による質量変化が見られなかったhCXCL10改変体に含まれるDPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変は、hCXCL10にDPPIV耐性をもたらすために有用な改変であることが示唆された。

【０１２３】

実施例４．ヒトCXCL11（hCXCL11）改変体およびhCXCL11 Fc fusion の構築

ヒトCXCL11（hCXCL11、Refseq: NP_005400.1, Uniprot ID: O14625）（配列番号：６１）、および、hCXCL11のDipeptidyl peptidase IV（DPPIV）認識・切断サ

イトおよびその周辺にアミノ酸改変が導入されたhCXCL11改変体が構築された（DPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変位置を図４Ｂ、設計されたhCXCL11改変体の名称、配列等を表６に示す）。
各種hCXCL11改変体の精製を容易にするため、hCXCL11改変体とヒトIgG1抗体Fc domainを融合させたhCXCL11改変体Fc fusionが構築された。これらの模式図を図４Ａに示す。

【０１２４】

前記hCXCL11改変体とヒトIgG1抗体(hIgG1)のFc domain改変体であるG1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R （G1T4k.one（配列番号：58）、VHn-G1T4h.one.H435R（配列番号：59））を融合したhCXCL11改変体Fc fusionが調製された。具体的には、各hCXCL11改変体のC末端とG1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R中のG1T4k.oneのN末端を連結させたペプチド鎖の遺伝子をコードする発現ベクターが当業者公知の方法で作製され、これらのペプチド鎖がVHn-G1T4h.one.H435R と組み合わせられ、hIgG1 Fc domain改変体にhCXCL11改変体が１つ結合されたhCXCL11改変体Fc fusionが当業者公知の方法でExpi 293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現され、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製された。

【０１２５】

本試験で使用しているFc domain改変体は、Fcがヘテロ会合化した分子の収量を高めるための変異、および、FcγRの結合を抑える変異が導入されている。

【０１２６】

【表６】

配列名	配列番号	改変パターン	改変、挿入アミノ酸残基	改変	N末端配列	対応するhCXCL11改変体Fc fusion
hCXCL11	61				FPMF...	hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0003	92	a	A	P2A	FAMF...	hCXCL11.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0004	93	a	D	P2D	FDMF...	hCXCL11.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0005	94	a	E	P2E	FEMF...	hCXCL11.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0006	95	a	F	P2F	FFMF...	hCXCL11.0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0007	96	a	G	P2G	FGMF...	hCXCL11.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0008	97	a	H	P2H	FHMF...	hCXCL11.0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0009	98	a	I	P2I	FIMF...	hCXCL11.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0010	99	a	K	P2K	FKMF...	hCXCL11.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0011	100	a	L	P2L	FLMF...	hCXCL11.0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0012	101	a	M	P2M	FMMF...	hCXCL11.0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0013	102	a	N	P2N	FNMF...	hCXCL11.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0014	103	a	Q	P2Q	FQMF...	hCXCL11.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0015	104	a	R	P2R	FRMF...	hCXCL11.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0016	105	a	S	P2S	FSMF...	hCXCL11.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0017	106	a	T	P2T	FTMF...	hCXCL11.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0018	107	a	V	P2V	FVMF...	hCXCL11.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0019	108	a	W	P2W	FWMF...	hCXCL11.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0020	109	a	Y	P2Y	FYMF...	hCXCL11.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0021	110	b	A	S-1_F1insA	AFPM...	hCXCL11.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0022	111	b	D	S-1_F1insD	DFPM...	hCXCL11.0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0023	112	b	E	S-1_F1insE	EFPM...	hCXCL11.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0024	113	b	F	S-1_F1insF	FFPM...	hCXCL11.0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0025	114	b	G	S-1_F1insG	GFPM...	hCXCL11.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0026	115	b	H	S-1_F1insH	HFPM...	hCXCL11.0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0027	116	b	I	S-1_F1insI	IFPM...	hCXCL11.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0028	117	b	K	S-1_F1insK	KFPM...	hCXCL11.0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0029	118	b	L	S-1_F1insL	LFPM...	hCXCL11.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0030	119	b	M	S-1_F1insM	MFPM...	hCXCL11.0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

hCXCL11.0031	120	b	N	S-1_F1insN	NFPM...	hCXCL11.0031-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0032	121	b	P	S-1_F1insP	PFPM...	hCXCL11.0032-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0033	122	b	Q	S-1_F1insQ	QFPM...	hCXCL11.0033-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0034	123	b	R	S-1_F1insR	RFPM...	hCXCL11.0034-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0035	124	b	S	S-1_F1insS	SFPM...	hCXCL11.0035-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0036	125	b	T	S-1_F1insT	TFPM...	hCXCL11.0036-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0037	126	b	V	S-1_F1insV	VFPM...	hCXCL11.0037-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0038	127	b	W	S-1_F1insW	WFPM...	hCXCL11.0038-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0039	128	b	Y	S-1_F1insY	YFPM...	hCXCL11.0039-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0040	129	c	A	F1_P2insA	FAPM...	hCXCL11.0040-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0041	130	c	D	F1_P2insD	FDPM...	hCXCL11.0041-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0042	131	c	E	F1_P2insE	FEPM...	hCXCL11.0042-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0043	132	c	F	F1_P2insF	FFPM...	hCXCL11.0043-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0044	133	c	G	F1_P2insG	FGPM...	hCXCL11.0044-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0045	134	c	H	F1_P2insH	FHPM...	hCXCL11.0045-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0046	135	c	I	F1_P2insI	FIPM...	hCXCL11.0046-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0047	136	c	K	F1_P2insK	FKPM...	hCXCL11.0047-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0048	137	c	L	F1_P2insL	FLPM...	hCXCL11.0048-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0049	138	c	M	F1_P2insM	FMPM...	hCXCL11.0049-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0050	139	c	N	F1_P2insN	FNPM...	hCXCL11.0050-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0051	140	c	P	F1_P2insP	FPPM...	hCXCL11.0051-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0052	141	c	Q	F1_P2insQ	FQPM...	hCXCL11.0052-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0053	142	c	R	F1_P2insR	FRPM...	hCXCL11.0053-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0054	143	c	S	F1_P2insS	FSPM...	hCXCL11.0054-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0055	144	c	T	F1_P2insT	FTPM...	hCXCL11.0055-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0056	145	c	V	F1_P2insV	FVPM...	hCXCL11.0056-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0057	146	c	W	F1_P2insW	FWPM...	hCXCL11.0057-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL11.0058	147	c	Y	F1_P2insY	FYPM...	hCXCL11.0058-G1T4k.one/VHn-G1T4h.one.H435R

【０１２７】

実施例５．ヒトCXCL10-ヒトCXCL11 キメラタンパク質（hITIP）およびhITIP Fc fusion の構築

hCXCL11（配列番号：61）のアミノ酸残基1番目から24番目までとhCXCL10改変体（配列番号：1）のアミノ酸残基25番目から77番目までを結合したヒトCXCL10, ヒトCXCL11 キメラタンパク質（hITIP）（配列番号：63）、および、hITIPのDipeptidyl peptidase IV（DPPIV）認識・切断サイトおよびその周辺にアミノ酸改変が導入されたhITIP改変体が構築された（DPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変位置を図４Ｂ、設計されたhITIP改変体の名称、配列等を表７に示す）。

【０１２８】
各種hITIP改変体の精製を容易にするため、hITIP改変体とヒトIgG1抗体Fc domainを融合させたhITIP改変体Fc fusionが構築された。これらの模式図を図４Ａに示す。
【０１２９】
前記hITIP改変体とヒトIgG1抗体(hIgG1)のFc domain改変体であるG1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R （G1T4k.one（配列番号：58）、VHn-G1T4h.one.H435R（配列番号：59））を融合したhITIP改変体Fc fusionが調製された。具体的には、各hITIP改変体のC末端とG1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R中のG1T4k.oneのN末端を連結させたペプチド鎖の遺伝子をコードする発現ベクターが当業者公知の方法で作製され、これらのペプチド鎖がVHn-G1T4h.one.H435R と組み合わせられ、hIgG1 Fc domain改変体にhITIP改変体が１つ結合されたhITIP改変体Fc fusionが当業者公知の方法でExpi 293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現され、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製された。
【０１３０】
本試験で使用しているFc domain改変体は、Fcがヘテロ会合化した分子の収量を高めるための変異、および、FcγRの結合を抑える変異が導入されている。
【０１３１】

【表７】

配列名	配列番号	改変パターン	改変、挿入アミノ酸残基	改変	N末端配列	対応するhITIP改変体Fc fusion
hITIP	63				FPMF...	hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0003	149	a	A	P2A	FAMF...	hITIP0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0004	150	a	D	P2D	FDMF...	hITIP0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0005	151	a	E	P2E	FEMF...	hITIP0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0006	152	a	F	P2F	FFMF...	hITIP0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0007	153	a	G	P2G	FGMF...	hITIP0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0008	154	a	H	P2H	FHMF...	hITIP0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0009	155	a	I	P2I	FIMF...	hITIP0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0010	156	a	K	P2K	FKMF...	hITIP0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0011	157	a	L	P2L	FLMF...	hITIP0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0012	158	a	M	P2M	FMMF...	hITIP0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0013	159	a	N	P2N	FNMF...	hITIP0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0014	160	a	Q	P2Q	FQMF...	hITIP0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0015	161	a	R	P2R	FRMF...	hITIP0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0016	162	a	S	P2S	FSMF...	hITIP0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0017	163	a	T	P2T	FTMF...	hITIP0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0018	164	a	V	P2V	FVMF...	hITIP0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0019	165	a	W	P2W	FWMF...	hITIP0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0020	166	a	Y	P2Y	FYMF...	hITIP0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0021	167	b	A	S-1_F1insA	AFPM...	hITIP0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0022	168	b	D	S-1_F1insD	DFPM...	hITIP0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0023	169	b	E	S-1_F1insE	EFPM...	hITIP0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0024	170	b	F	S-1_F1insF	FFPM...	hITIP0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0025	171	b	G	S-1_F1insG	GFPM...	hITIP0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0026	172	b	H	S-1_F1insH	HFPM...	hITIP0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0027	173	b	I	S-1_F1insI	IFPM...	hITIP0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0028	174	b	K	S-1_F1insK	KFPM...	hITIP0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0029	175	b	L	S-1_F1insL	LFPM...	hITIP0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0030	176	b	M	S-1_F1insM	MFPM...	hITIP0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

hITIP0031	177	b	N	S-1_F1insN	NFPM...	hITIP0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0032	178	b	P	S-1_F1insP	PFPM...	hITIP0032-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0033	179	b	Q	S-1_F1insQ	QFPM...	hITIP0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0034	180	b	R	S-1_F1insR	RFPM...	hITIP0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0035	181	b	S	S-1_F1insS	SFPM...	hITIP0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0036	182	b	T	S-1_F1insT	TFPM...	hITIP0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0037	183	b	V	S-1_F1insV	VFPM...	hITIP0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0038	184	b	W	S-1_F1insW	WFPM...	hITIP0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0039	185	b	Y	S-1_F1insY	YFPM...	hITIP0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0040	186	c	A	F1_P2insA	FAPM...	hITIP0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0041	187	c	D	F1_P2insD	FDPM...	hITIP0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0042	188	c	E	F1_P2insE	FEPM...	hITIP0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0043	189	c	F	F1_P2insF	FFPM...	hITIP0043-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0044	190	c	G	F1_P2insG	FGPM...	hITIP0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0045	191	c	H	F1_P2insH	FHPM...	hITIP0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0046	192	c	I	F1_P2insI	FIPM...	hITIP0046-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0047	193	c	K	F1_P2insK	FKPM...	hITIP0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0048	194	c	L	F1_P2insL	FLPM...	hITIP0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0049	195	c	M	F1_P2insM	FMPM...	hITIP0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0050	196	c	N	F1_P2insN	FNPM...	hITIP0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0051	197	c	P	F1_P2insP	FPPM...	hITIP0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0052	198	c	Q	F1_P2insQ	FQPM...	hITIP0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0053	199	c	R	F1_P2insR	FRPM...	hITIP0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0054	200	c	S	F1_P2insS	FSPM...	hITIP0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0055	201	c	T	F1_P2insT	FTPM...	hITIP0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0056	202	c	V	F1_P2insV	FVPM...	hITIP0056-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0057	203	c	W	F1_P2insW	FWPM...	hITIP0057-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0058	204	c	Y	F1_P2insY	FYPM...	hITIP0058-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

【０１３２】

実施例６．　DPPIV処理したhCXCL10改変体の細胞遊走活性評価

実施例3でhDPPIVによりN末端2残基の切断が確認されなかったhCXCL10改変体のいくつかについて、これらの改変体がDPPIV処理後もCXCR3を発現する細胞の遊走を引き起こすか（細胞遊走活性）が評価された。

【０１３３】

プロテアーゼとしてヒトに由来するDipeptidyl peptidase IV（human DPPIV, hDPP IV）（Biolegend, 764102）が用いられた。終濃度12 μMのhCXCL10改変体は終濃度400 nM のhDPPIVによりPBS中で37℃、1時間の条件で処理された。DPPIV処理された

hCXCL10改変体がCXCR3を発現する細胞の遊走を引き起こすか（細胞遊走活性）が評価された。細胞遊走活性は、マウスCXCR3（mCXCR3）を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞(以下BaF3/mCXCR3)とHTS Transwell^{TM}-96 Permeable Supports with 5.0μm Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387、Corning) を用いて評価された。

アナライトとして、DPPIV処理された下記hCXCL10改変体が使用された：hCXCL10R75A、hCXCL10R75A.0041、hCXCL10R75A.0042、hCXCL10R75A.0028。

【０１３４】

hCXCL10R75A、hCXCL10R75A.0041、hCXCL10R75A.0042およびhCXCL10R75A.0028は当業者公知の方法でExpi293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現され、ヘパリンセファロース(HiTrap Heparin HP Column GEヘルスケア)、ゲル濾過(HiLoadSuperdex75pg GEヘルスケア)を用いた当業者公知の方法により精製が行われた。

【０１３５】

分析対象となる各アナライトの溶液中終濃度が1 nMから600 nMになるように調整された後、それぞれ235 μLの溶液がLower chamberに移された。その後、Upper chamberにBaF3/mCXCR3細胞を2.0×10^{5} cells/wellとなるように75 μL/wellで播き、6時間反応が行われた。反応は5%炭酸ガス、37℃条件下で行われた。6時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μLをOptiPlate-96（Cat. 6005299、PerkinElmer）に移し、CellTiter-Glo^{TM} Luminescent Cell Viability Assay溶液（Cat. G7571、Promega）を100 μL加えた。室温で10分反応させた後、2104 EnVision^{TM} マルチラベルリーダー（PerkinElmer）で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度が評価された。

【０１３６】

Lower chamberへ遊走した細胞の量は発光強度で反映される。hCXCL10改変体の細胞遊走活性の比較が行われた。

【０１３７】

hCXCL10改変体の細胞遊走活性の比較は6時間反応後に行われ、結果は図５、表８に示される。DPPIV処理されたhCXCL10R75Aは1 nMから100 nMの範囲においてDPPIV処理されていないhCXCL10R75Aと比較して大きく低減した細胞遊走活性を示した。一方で、それぞれDPPIV処理されたhCXCL10R75A.0041、hCXCL10R75A.0042およびhCXCL10R75A.0028 は各濃度において同濃度のDPPIV処理されていないそれぞれの改変体と比較して同等の細胞遊走活性を示した。このことから、これらhCXCL10改変体はDPPIV処理された後にも十分な活性を持つことが示された。

【０１３８】

【表８】

アナライト名	DPPIV	アナライト濃度	発光値
hCXCL10R75A	-	1 nM	384286
		2 nM	909013
		5 nM	2360051
		9 nM	3925789
		19 nM	5869969
		38 nM	10112159
		75 nM	13262058
		150 nM	9680211
		300 nM	3833908
		600 nM	1126521
hCXCL10R75A.0041	-	1 nM	170183
		2 nM	386200
		5 nM	918247
		9 nM	2393740
		19 nM	4359804
		38 nM	11026260
		75 nM	20180488
		150 nM	19195381
		300 nM	10637776
		600 nM	2996213
hCXCL10R75A.0042	-	1 nM	749550
		2 nM	1053748
		5 nM	1360707
		9 nM	2158386
		19 nM	3573993
		38 nM	10150885
		75 nM	15774662
		150 nM	14178170
		300 nM	8071032
		600 nM	1378453
hCXCL10R75A.0028	-	1 nM	440800
		2 nM	550618
		5 nM	688390
		9 nM	1199380
		19 nM	2142287
		38 nM	7149151
		75 nM	16018027
		150 nM	16362897
		300 nM	12306411
		600 nM	2138988

hCXCL10R75A	+	1 nM	78153
		2 nM	73792
		5 nM	74832
		9 nM	84037
		19 nM	82833
		38 nM	107446
		75 nM	410388
		150 nM	1698455
		300 nM	3724658
		600 nM	5453426
hCXCL10R75A.0041	+	1 nM	201203
		2 nM	306204
		5 nM	2158532
		9 nM	3647332
		19 nM	2236899
		38 nM	6118440
		75 nM	20570790
		150 nM	23888168
		300 nM	16714552
		600 nM	3369186
hCXCL10R75A.0042	+	1 nM	984135
		2 nM	1606332
		5 nM	2383033
		9 nM	3822807
		19 nM	5869317
		38 nM	12182978
		75 nM	15343371
		150 nM	11965440
		300 nM	6283371
		600 nM	1624949
hCXCL10R75A.0028	+	1 nM	288701
		2 nM	497223
		5 nM	1222920
		9 nM	2507969
		19 nM	3806319
		38 nM	11819096
		75 nM	16814895
		150 nM	15895458
		300 nM	11558694
		600 nM	3804462
Cell only	-	0 nM	99402

【０１３９】

実施例７．hCXCL11改変体Fc fusion の細胞遊走活性評価

実施例４で調製されたhCXCL11改変体Fc fusionがCXCR3を発現する細胞の遊走を引き起こすか（細胞遊走活性）が評価された。細胞遊走活性は、ヒトCXCR3（hCXCR3）を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞(以下BaF3/hCXCR3)とHTS Transwell^{TM}-96 Permeable Supports with 5.0μm Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387、Corning) を用いて評価された。

【０１４０】

アナライトとして、実施例４で調製された下記hCXCL11改変体Fc fusionが使用された

：
hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0032-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0046-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hCXCL11.0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0056-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0057-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0058-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

【０１４１】

分析対象となる各アナライトの溶液中終濃度が33 nM, 100 nM, 300 nMになるように調整された後、それぞれ235 μLの溶液がLower chamberに移された。その後、Upper chamberにBaF3/hCXCR3細胞を2.0×10^5 cells/wellとなるように75 μL/wellで播き、18時間反応が行われた。反応は5%炭酸ガス、37℃条件下で行われた。18時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μLをOptiPlate-96（Cat. 6005299、PerkinElmer）に移し、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay溶液（Cat. G7571、Promega）を100 μL加えた。室温で10分反応させた後、2104 EnVision™ マルチラベルリーダー（PerkinElmer）で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度が評価された。

【０１４２】

Lower chamberへ遊走した細胞の量は発光強度で反映される。hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rとその他のhCXCL11改変体Fc fusionの細胞遊走活性の比較が行われた。

【０１４３】

hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rとその他のhCXCL11改変体Fc fusionの細胞遊走活性の比較は18時間反応後に行われ、結果は図６（図６－１、図６－２、図６－３）、表９に示される。hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rと比較して、

hCXCL11.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0032-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hCXCL11.0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rは33 nM, 100 nM, 300 nMの各濃度において同濃度のhCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rの25%以上の細胞遊走活性を保持していた。このことから、これらhCXCL11改変体Fc fusionに含まれるhCXCL11改変体は十分な活性を持つことが示された。

【０１４４】

【表９】

アナライト名	アナライト濃度	発光値	活性維持率*
hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7680512	
	100 nM	16701834	
	300 nM	12424624	
hCXCL11.0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3761418	49%
	100 nM	11666034	70%
	300 nM	11205876	90%
hCXCL11.0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3145358	41%
	100 nM	9439905	57%
	300 nM	5240261	42%
hCXCL11.0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3107148	40%
	100 nM	9594341	57%
	300 nM	6032127	49%
hCXCL11.0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	325725	4%
	100 nM	4545172	27%
	300 nM	9793195	79%
hCXCL11.0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3474336	45%
	100 nM	10168584	61%
	300 nM	9705698	78%
hCXCL11.0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3403401	44%
	100 nM	12154445	73%
	300 nM	13423586	108%
hCXCL11.0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	966221	13%
	100 nM	6792509	41%
	300 nM	13486638	109%
hCXCL11.0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	524466	7%
	100 nM	4931525	30%
	300 nM	7782022	63%
hCXCL11.0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	261903	3%
	100 nM	4015832	24%
	300 nM	9604642	77%
hCXCL11.0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1333862	17%
	100 nM	7602984	46%
	300 nM	11766181	95%
hCXCL11.0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5487357	71%
	100 nM	13055822	78%
	300 nM	10050371	81%

hCXCL11.0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8071684	105%
	100 nM	14827193	89%
	300 nM	7512090	60%
hCXCL11.0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2619355	34%
	100 nM	12251752	73%
	300 nM	12226549	98%
hCXCL11.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4954461	65%
	100 nM	12478741	75%
	300 nM	8570401	69%
hCXCL11.0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4718379	61%
	100 nM	12382919	74%
	300 nM	8542065	69%
hCXCL11.0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1845181	24%
	100 nM	8322700	50%
	300 nM	10085156	81%
hCXCL11.0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	324679	4%
	100 nM	4663405	28%
	300 nM	11500114	93%
hCXCL11.0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2147154	28%
	100 nM	10335154	62%
	300 nM	11840783	95%
hCXCL11.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8264372	108%
	100 nM	15582696	93%
	300 nM	10374927	84%
hCXCL11.0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	13708021	178%
	100 nM	14788901	89%
	300 nM	6063758	49%
hCXCL11.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	14492680	189%
	100 nM	16351578	98%
	300 nM	5977170	48%
hCXCL11.0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2468213	32%
	100 nM	12017591	72%
	300 nM	13078459	105%
hCXCL11.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7106015	93%
	100 nM	16854099	101%
	300 nM	11417885	92%
hCXCL11.0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5461231	71%
	100 nM	12896605	77%
	300 nM	9918162	80%

hCXCL11.0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5181305	67%
	100 nM	16650755	100%
	300 nM	12691313	102%
hCXCL11.0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1997904	26%
	100 nM	8871909	53%
	300 nM	11143349	90%
hCXCL11.0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4066987	53%
	100 nM	15360335	92%
	300 nM	13405229	108%
hCXCL11.0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8745532	114%
	100 nM	16405096	98%
	300 nM	10632773	86%
hCXCL11.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	12690483	165%
	100 nM	15076138	90%
	300 nM	6388637	51%
hCXCL11.0032-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2501343	33%
	100 nM	11321789	68%
	300 nM	13074388	105%
hCXCL11.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	15304363	199%
	100 nM	15347940	92%
	300 nM	3463231	28%
hCXCL11.0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1485580	19%
	100 nM	7452490	45%
	300 nM	9628060	77%
hCXCL11.0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	12340990	161%
	100 nM	15832089	95%
	300 nM	5229763	42%
hCXCL11.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	10717177	140%
	100 nM	17569742	105%
	300 nM	6589358	53%
hCXCL11.0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8513395	111%
	100 nM	18473079	111%
	300 nM	9070191	73%
hCXCL11.0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4627890	60%
	100 nM	13910020	83%
	300 nM	12340351	99%
hCXCL11.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7856054	102%
	100 nM	14332028	86%
	300 nM	9320232	75%

hCXCL11.0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6255008	81%
	100 nM	13071383	78%
	300 nM	5049092	41%
hCXCL11.0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1921985	25%
	100 nM	9373409	56%
	300 nM	5161844	42%
hCXCL11.0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4702516	61%
	100 nM	11224123	67%
	300 nM	7225056	58%
hCXCL11.0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5237460	68%
	100 nM	12713748	76%
	300 nM	8901072	72%
hCXCL11.0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4668626	61%
	100 nM	12595408	75%
	300 nM	8297150	67%
hCXCL11.0046-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	760233	10%
	100 nM	6035270	36%
	300 nM	8054240	65%
hCXCL11.0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	390951	5%
	100 nM	3715751	22%
	300 nM	6480925	52%
hCXCL11.0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3972971	52%
	100 nM	12539456	75%
	300 nM	8954633	72%
hCXCL11.0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5103080	66%
	100 nM	15010561	90%
	300 nM	9323596	75%
hCXCL11.0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2316728	30%
	100 nM	8492561	51%
	300 nM	7921116	64%
hCXCL11.0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6461187	84%
	100 nM	14895200	89%
	300 nM	10154195	82%
hCXCL11.0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5884538	77%
	100 nM	15088702	90%
	300 nM	8326367	67%

hCXCL11.0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	595479	8%
	100 nM	4263268	26%
	300 nM	7431787	60%
hCXCL11.0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3242951	42%
	100 nM	10496671	63%
	300 nM	6335806	51%
hCXCL11.0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2977345	39%
	100 nM	9651636	58%
	300 nM	5268238	42%
hCXCL11.0056-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	643342	8%
	100 nM	5573043	33%
	300 nM	7330097	59%
hCXCL11.0057-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	500643	7%
	100 nM	6205724	37%
	300 nM	10672011	86%
hCXCL11.0058-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1124561	15%
	100 nM	7072332	42%
	300 nM	10398939	84%
cell only	0 nM	52468	-

活性維持率*: hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rの対応する濃度におけるシグナル値に対する割合

【０１４５】

実施例８． hITIP改変体Fc fusion の細胞遊走活性評価

実施例５で調製されたhITIP改変体Fc fusionがCXCR3を発現する細胞の遊走を引き起こすか（細胞遊走活性）が評価された。細胞遊走活性は、ヒトCXCR3（hCXCR3）を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞(以下BaF3/hCXCR3)とHTS Transwell™-96 Permeable Supports with 5.0μm Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387、Corning) を用いて評価された。

【０１４６】

アナライトとして、実施例５で調製された下記hITIP改変体Fc fusionが使用された：
hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hITIP0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0046-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0056-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0057-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0058-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

【０１４７】

分析対象となる各アナライトの溶液中終濃度が33 nM, 100 nM, 300 nMになるように調整された後、それぞれ235 μLの溶液がLower chamberに移された。その後、Upper chamberにBaF3/hCXCR3細胞を2.0×10^5 cells/wellとなるように75 μL/wellで播き、18時間反応が行われた。反応は5%炭酸ガス、37℃条件下で行われた。18時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μLをOptiPlate-96（Cat. 6005299、PerkinElmer）に移し、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay溶液（Cat. G7571、Promega）を100 μL加えた。室温で10分反応させた後、2104 EnVision™ マルチラベルリーダー（PerkinElmer）で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度が評価された。

【０１４８】

Lower chamberへ遊走した細胞の量は発光強度で反映される。hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rとその他のhITIP改変体Fc fusionの細胞遊走活性の比較が行われた。

【０１４９】

hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rとその他のhITIP改変体Fc fusionの細胞遊走活性の比較は18時間反応後に行われ、結果は図７（図７a、図７b、図７c）、表１０に示される。

hITIP0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0057-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hITIP0058-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rは33 nM, 100 nM, 300 nMの各濃度において同濃度のhITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rの25%以上の細胞

遊走活性を保持していた。このことから、これらhITIP改変体Fc fusionに含まれるhITIP改変体は十分な活性を持つことが示された。

【０１５０】

【表１０】

Sample set_1			
アナライト名	アナライト濃度	発光値	活性維持率*
hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	11255810	
	100 nM	16333190	
	300 nM	10853981	
hITIP0003-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6184897	55%
	100 nM	13130438	80%
	300 nM	9909618	91%
hITIP0004-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1864821	17%
	100 nM	8714209	53%
	300 nM	7226926	67%
hITIP0005-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	802531	7%
	100 nM	7331671	45%
	300 nM	7271155	67%
hITIP0006-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1230226	11%
	100 nM	6851471	42%
	300 nM	11591358	107%
hITIP0007-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2479379	22%
	100 nM	10108277	62%
	300 nM	9182812	85%
hITIP0008-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5585908	50%
	100 nM	14059020	86%
	300 nM	11481733	106%
hITIP0009-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3141421	28%
	100 nM	10831129	66%
	300 nM	11479957	106%
hITIP0010-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	104208	1%
	100 nM	2139235	13%
	300 nM	9641767	89%
hITIP0011-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2012679	18%
	100 nM	9741847	60%
	300 nM	9395780	87%
hITIP0012-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4553615	40%
	100 nM	11974754	73%
	300 nM	9283034	86%

hITIP0013-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8489369	75%
	100 nM	12237110	75%
	300 nM	7711718	71%
hITIP0014-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8972343	80%
	100 nM	13028436	80%
	300 nM	8481716	78%
hITIP0015-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6378932	57%
	100 nM	11292522	69%
	300 nM	11163432	103%
hITIP0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6656446	59%
	100 nM	11995226	73%
	300 nM	7646801	70%
hITIP0017-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7957520	71%
	100 nM	11671324	71%
	300 nM	6762275	62%
hITIP0018-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6897647	61%
	100 nM	12083915	74%
	300 nM	7743185	71%
hITIP0019-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3893156	35%
	100 nM	10537283	65%
	300 nM	11047471	102%
hITIP0020-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4898429	44%
	100 nM	12726742	78%
	300 nM	9561501	88%

Sample set_2			
アナライト名	アナライト濃度	発光値	活性維持率*
hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	14416819	
	100 nM	15131844	
	300 nM	5642551	
hITIP0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	13956263	97%
	100 nM	13254701	88%
	300 nM	4839338	86%
hITIP0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	15061363	104%
	100 nM	12879459	85%
	300 nM	4246847	75%
hITIP0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	15979606	111%
	100 nM	12935580	85%
	300 nM	3156988	56%
hITIP0024-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	9470253	66%
	100 nM	13585196	90%
	300 nM	6872305	122%
hITIP0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	15422760	107%
	100 nM	14866297	98%
	300 nM	2767805	49%
hITIP0026-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	10128027	70%
	100 nM	11888103	79%
	300 nM	6631111	118%
hITIP0027-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	13086406	91%
	100 nM	14555849	96%
	300 nM	5126848	91%
hITIP0028-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2744330	19%
	100 nM	9691581	64%
	300 nM	9498848	168%
hITIP0029-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	10941109	76%
	100 nM	15408714	102%
	300 nM	6128140	109%
hITIP0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	11055133	77%
	100 nM	13666700	90%
	300 nM	7108276	126%

hITIP0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	14905473	103%
	100 nM	12274657	81%
	300 nM	3921392	69%
hITIP0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	15539594	108%
	100 nM	12523151	83%
	300 nM	4770826	85%
hITIP0034-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3014026	21%
	100 nM	6337835	42%
	300 nM	7730336	137%
hITIP0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	14479491	100%
	100 nM	12391946	82%
	300 nM	5087719	90%
hITIP0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	13125449	91%
	100 nM	14230048	94%
	300 nM	5303773	94%
hITIP0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	13362538	93%
	100 nM	14557898	96%
	300 nM	5896904	105%
hITIP0038-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8778686	61%
	100 nM	12447834	82%
	300 nM	9021217	160%
hITIP0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	8218579	57%
	100 nM	10785484	71%
	300 nM	6753122	120%
hITIP0040-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6641961	46%
	100 nM	10152246	67%
	300 nM	5422998	96%
hITIP0041-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	3911869	27%
	100 nM	8945206	59%
	300 nM	7154135	127%
hITIP0042-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	11287798	78%
	100 nM	10640127	70%
	300 nM	5991955	106%

Sample set_3			
アナライト名	アナライト濃度	発光値	活性維持率*
hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	14582717	
	100 nM	16151041	
	300 nM	7844794	
hITIP0044-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	10045938	69%
	100 nM	12391082	77%
	300 nM	6527919	83%
hITIP0045-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7976121	55%
	100 nM	12629509	78%
	300 nM	8864666	113%
hITIP0046-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2230683	15%
	100 nM	9165961	57%
	300 nM	8091881	103%
hITIP0047-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	158870	1%
	100 nM	2192199	14%
	300 nM	8023795	102%
hITIP0048-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7012064	48%
	100 nM	13095826	81%
	300 nM	9972870	127%
hITIP0049-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	7019689	48%
	100 nM	13895669	86%
	300 nM	11446853	146%
hITIP0050-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	2605315	18%
	100 nM	9676705	60%
	300 nM	7018480	89%
hITIP0051-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	11235454	77%
	100 nM	13839262	86%
	300 nM	7446291	95%
hITIP0052-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	11235767	77%
	100 nM	14357609	89%
	300 nM	8783137	112%
hITIP0053-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1289632	9%
	100 nM	4047257	25%
	300 nM	6884729	88%

hITIP0054-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6461440	44%
	100 nM	10787916	67%
	300 nM	6726740	86%
hITIP0055-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	6716736	46%
	100 nM	10851741	67%
	300 nM	7652397	98%
hITIP0056-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	1586824	11%
	100 nM	7566720	47%
	300 nM	7679419	98%
hITIP0057-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	4605304	32%
	100 nM	7485005	46%
	300 nM	7123475	91%
hITIP0058-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R	33 nM	5163373	35%
	100 nM	10015503	62%
	300 nM	9561334	122%
cell only	0 nM	31290	-

活性維持率*: hITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rの対応する濃度における
シグナル値に対する割合

【０１５１】

実施例９．hCXCL11改変体Fc fusionおよびh ITIP改変体Fc fusionのDPPIV切断耐性評価

実施例７、８で細胞遊走を引き起こしたhCXCL11改変体Fc fusionおよびh ITIP改変体Fc fusionがDipeptidyl peptidase IV (DPPIV)により切断されるかが検証された。DPPIVとしてヒトに由来するhuman DPPIV(hDPPIV）（Biolegend, 764102）が用いられた。DPPIVによるhCXCL11改変体Fc fusionおよびh ITIP改変体Fc fusionの切断は脱N-型糖鎖、還元処理後のLC/MS分析によって評価された。終濃度0.2 mg/ml(3.3 μM)のhCXCL11改変体Fc fusionおよびh ITIP改変体Fc fusionと終濃度200 nM のhDPPIVをPBS中で37℃で1時間反応させたのち、当業者公知の方法でLC/MSによる分析が行われ、hCXCL11改変体Fc fusionおよびh ITIP改変体Fc fusionの切断が評価された。

【０１５２】

hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435RおよびhITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435RではDPPIV処理により、それぞれhCXCL11改変体含有ペプチド鎖およびhITIP改変体含有ペプチド鎖の質量が減少し、その質量はそれぞれのhCXCL11改変体含有ペプチド鎖およびhITIP改変体含有ペプチド鎖のN末端2残基が脱落した配列の理論質量に相当するものであった。このことから、hCXCL11-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435RおよびhITIP-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435Rに含まれるhCXCL11およびhITIPはhDPPIVによりN末端2残基が切断されることが示唆された。

一方で、

hCXCL11.0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、

hCXCL11.0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hCXCL11.0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0021-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0022-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0023-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0025-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0030-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0031-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0033-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0035-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0036-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0037-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
hITIP0039-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R、
はhDDPIV処理によるペプチド結合の切断を示唆する質量変化はなかった。この結果から、これらのhCXCL11改変体Fc fusionおよびヒトITIP改変体Fc fusionに含まれるhCXCL11改変体およびヒトITIPはhDPPIV切断耐性を示すことが示唆された。

【０１５３】

hCXCL11およびヒトITIPはhDPPIVによりN末端2残基が切断されることから、上記hDDPIV処理による質量変化が見られなかったhCXCL11改変体およびヒトITIP改変体に含まれるDPPIV認識・切断サイトおよびその周辺のアミノ酸改変は、hCXCL11およびヒトITIPにDPPIV耐性をもたらすために有用な改変であることが示唆された。

【０１５４】

前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本開示の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

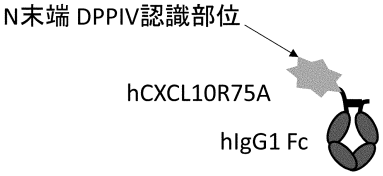
【産業上の利用可能性】

【０１５５】

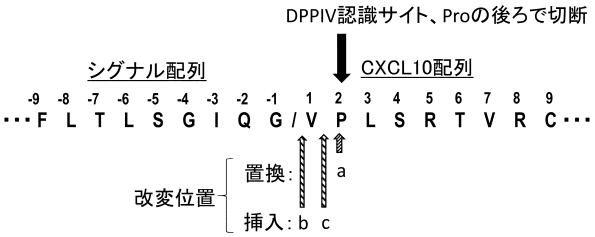
本開示により、DPPIVに対する耐性且つCXCR3を発現する細胞を遊走させる活性を有するCXCR3リガンドが初めて開示された。このようなCXCR3リガンドは、CXCR3を発現する細胞を遊走させることによる疾患治療／予防に有用である。

【図面】

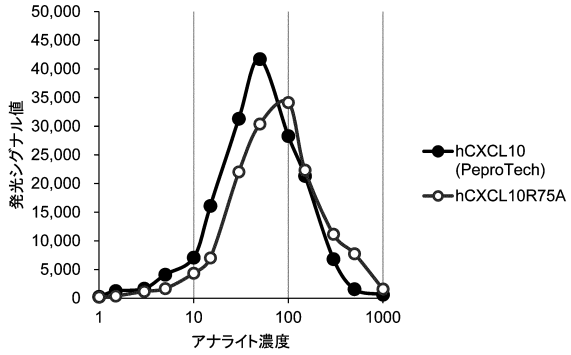
【図１Ａ】



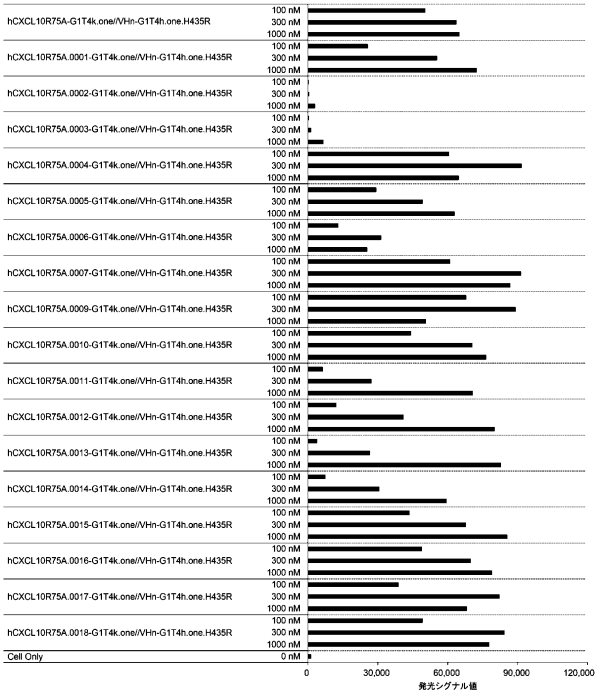
【図１Ｂ】



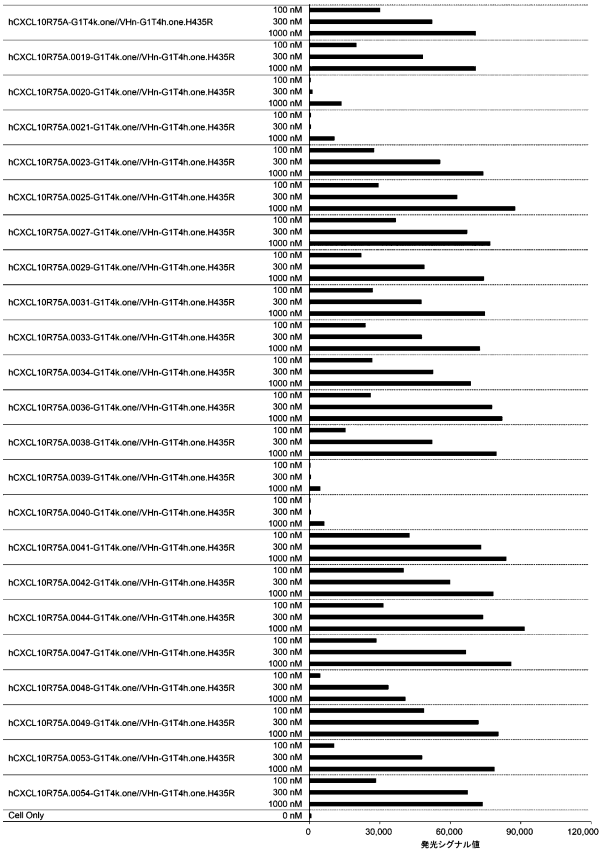
【図２】



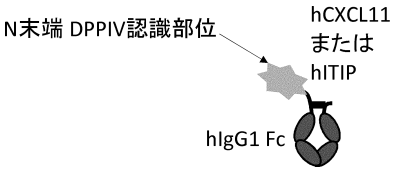
【図３ａ】



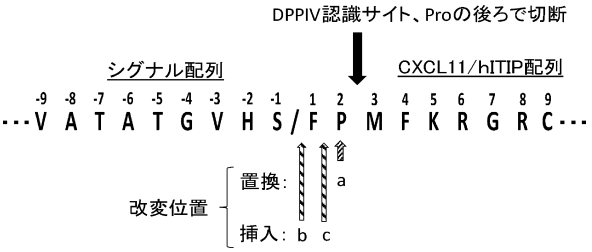
【図３ｂ】



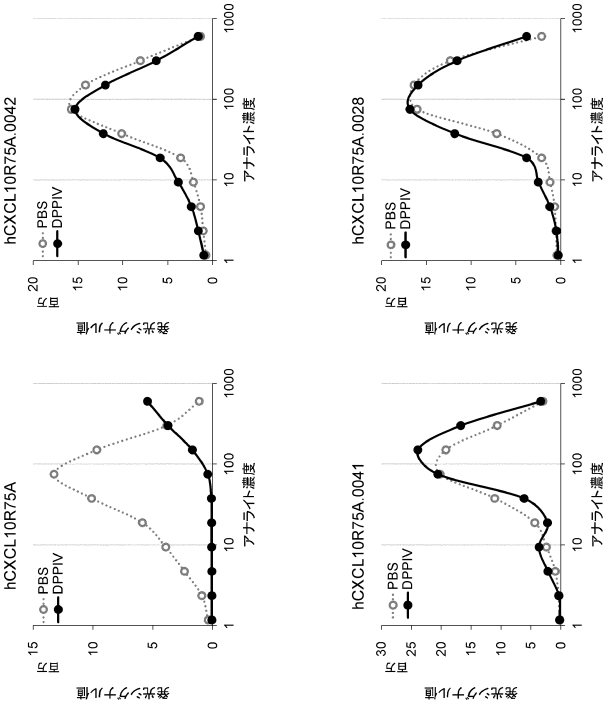
【図４Ａ】



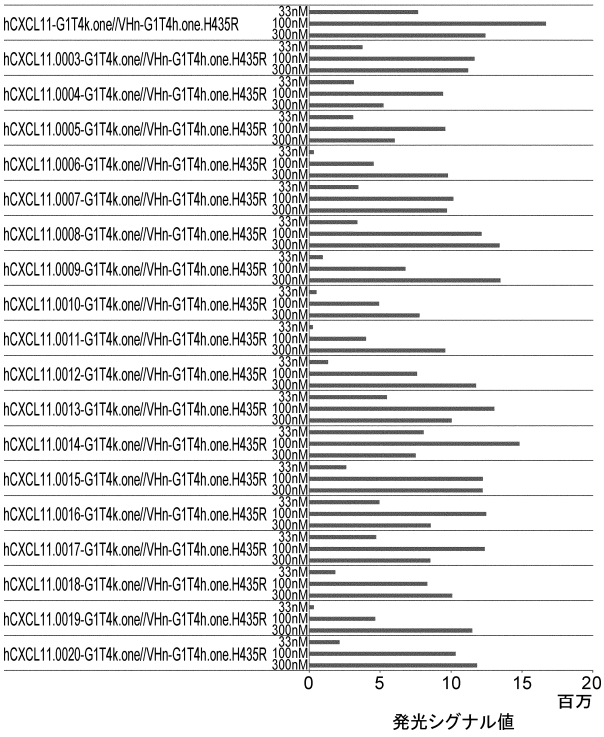
【図４Ｂ】



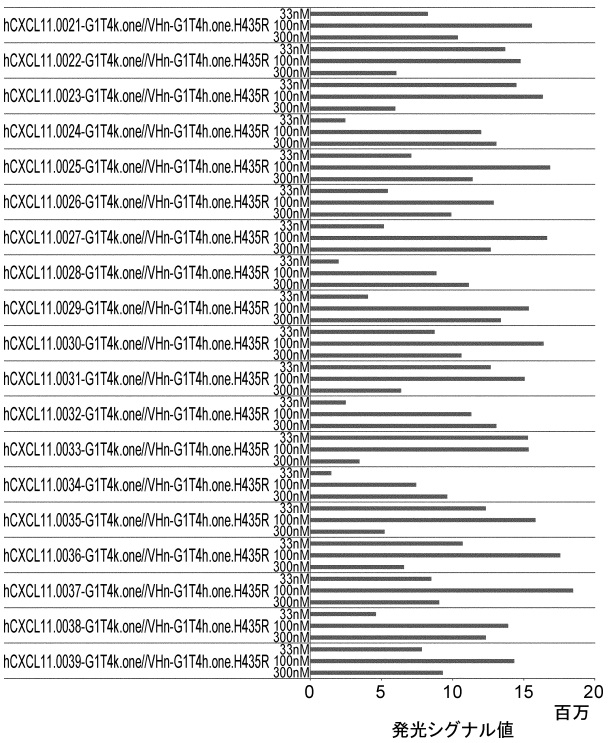
【図５】



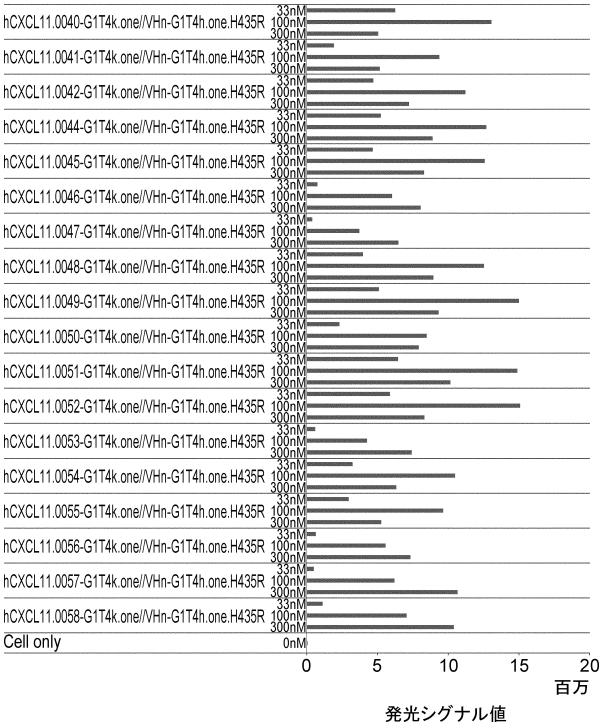
【図６－１】



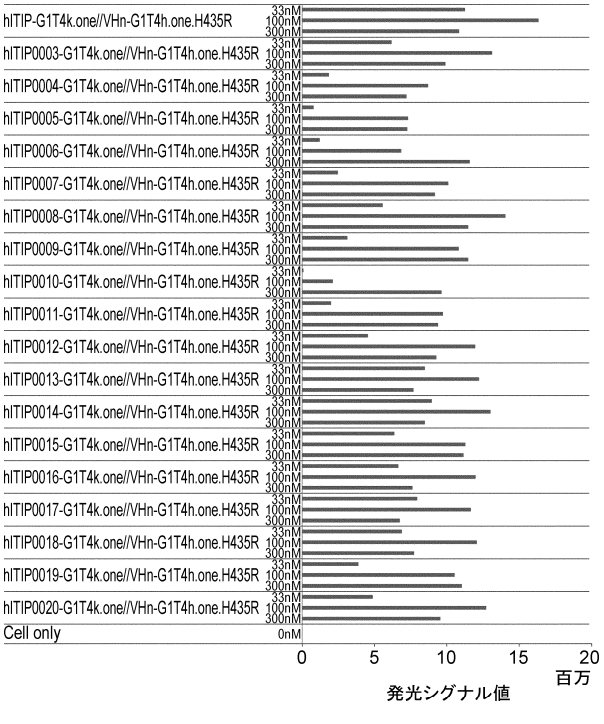
【図６－２】



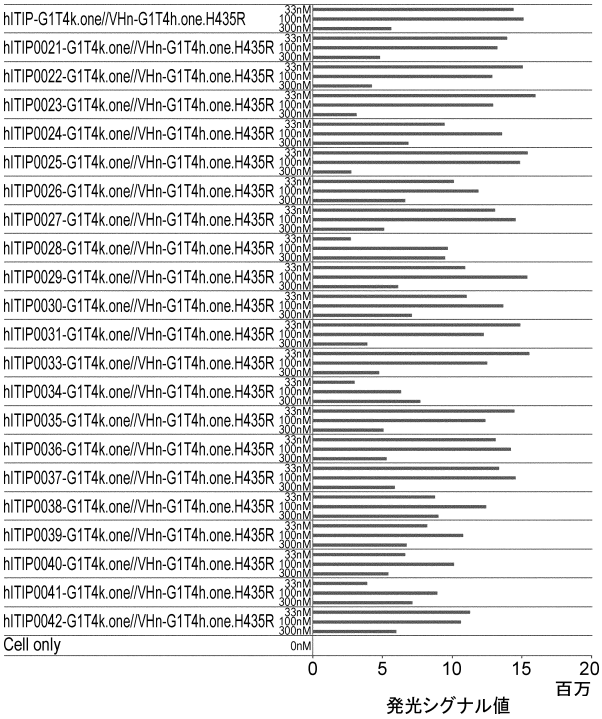
【図６－３】



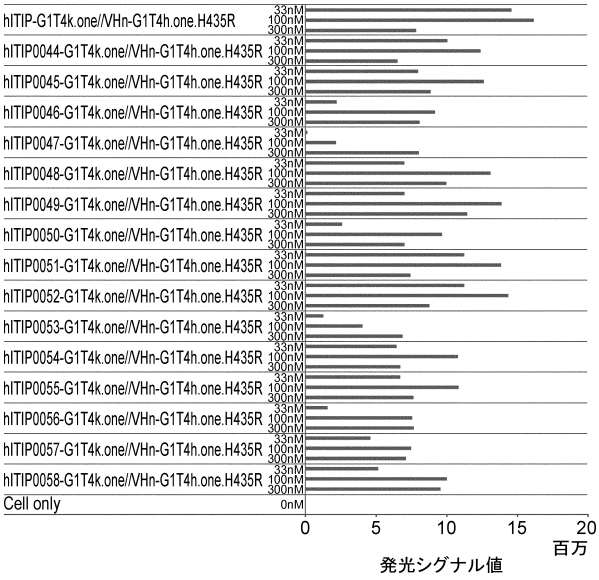
【図７ａ】



【図７ｂ】



【図７ｃ】



【配列表】

0007438975000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)

ＦＩ
Ａ６１Ｐ　43/00　１１１

(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　山本 陽平
静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内
(72)発明者　櫻井 実香
静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内
(72)発明者　原谷 健太
静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内
審査官　菅原 洋平

(56)参考文献
米国特許第０６５６２３４７（ＵＳ，Ｂ１）
国際公開第２００３／０８２３３５（WO，Ａ１）
米国特許第０６５３４６２６（ＵＳ，Ｂ１）
国際公開第２０１８／０９７３０８（WO，Ａ１）
特表２００７－５２５１８８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｐ　２１／００
Ａ６１Ｐ　２９／００
Ａ６１Ｐ　３７／０２
Ａ６１Ｐ　４３／００
Ａ６１Ｋ　４７／６８
Ａ６１Ｋ　３８／１７
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）