

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522043

(P2017-522043A)

(43) 公表日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-510285 (P2017-510285)
 (86) (22) 出願日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月4日 (2017.1.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/004424
 (87) 国際公開番号 W02015/167293
 (87) 国際公開日 平成27年11月5日 (2015.11.5)
 (31) 優先権主張番号 61/986, 742
 (32) 優先日 平成26年4月30日 (2014. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514034870
 ハノル バイオファーマ カンパニーリミ
 テッド
 HANALL BIOPHARMA CO
 ., LTD.
 大韓民国 大田広域市 大徳区 上書洞
 1-ギル 43
 43, Sangseodang 1-g
 il, Daedeok-gu, Dae
 jeon, 306-120 Repub
 lic of Korea

(74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一

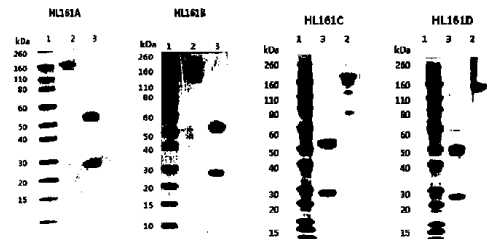
(74) 代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FcRn特異的ヒト抗体及びこれを含む自己免疫疾患治療用組成物

(57) 【要約】

本発明は、IgGに高親和性を有する受容体であるFcRn (Neonatal Fc Receptorの略で、胎児Fc-受容体、FcRP、FcRBまたはBrambell受容体とも呼ばれる) に特異的な抗体である分離した抗-FcRn抗体、これの製造方法、前記抗体を含む自己免疫疾患治療用組成物及び前記抗体を利用した自己免疫疾患の治療及び診断方法に関する。本発明に係るFcRn特異的抗体は、FcRnにIgGと非競合的に結合して血中内病因性自己抗体の量を減少させることによって自己免疫疾患 (auto-immune disease) に対する治療に活用可能である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 1、配列番号 2 4、配列番号 2 7、配列番号 3 0、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 9 及び配列番号 4 2 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列を含む C D R 1 ；

配列番号 2 2、配列番号 2 5、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 4 0 及び配列番号 4 3 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列を含む C D R 2 ；並びに

配列番号 2 3、配列番号 2 6、配列番号 2 9、配列番号 3 2、配列番号 3 5、配列番号 3 8、配列番号 4 1 及び配列番号 4 4 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片。

10

【請求項 2】

配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R 3、

配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R 3、

配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3、または

配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体またはこれの断片。

20

【請求項 3】

配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む C D R 3、

配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R 3、

配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R 3、または

配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体またはこれの断片。

30

【請求項 4】

配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域、

配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域、

40

配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域、並びに

配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域で構成された群から選択された一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体またはこれの断片。

50

【請求項 5】

配列番号 2 1、配列番号 2 4、配列番号 2 7、配列番号 3 0、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 9 及び配列番号 4 2 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ;
配列番号 2 2、配列番号 2 5、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 4 0 及び配列番号 4 3 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 並びに
配列番号 2 3、配列番号 2 6、配列番号 2 9、配列番号 3 2、配列番号 3 5、配列番号 3 8、配列番号 4 1 及び配列番号 4 4 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片。

10

【請求項 6】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 2 0 で構成された群から選択される一つ以上のアミノ酸配列を含む一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片。

【請求項 7】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8 または配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の抗体またはこれの断片。

【請求項 8】

配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 または配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の抗体またはこれの断片。

20

【請求項 9】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、並びに
配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域で構成された群から選択された一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の抗体またはこれの断片。

30

【請求項 1 0】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 2 0 で構成された群から選択される一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片。

40

【請求項 1 1】

p H 6 . 0 または p H 7 . 4 の条件で K D (d i s s o c i a t i o n c o n s t a n t) が 0 . 0 1 ~ 2 n M である F c R n に結合することを特徴とする請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片。

【請求項 1 2】

前記抗体は、モノクローナル抗体、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であることを特徴とする請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片。

【請求項 1 3】

F a b、F (a b ') ₂、F d、F v、s c F v、ドメイン抗体、デュアル - 特異抗体、バイボディ (b i b o d i e s)、ミニボディ、トリボディ、スキャップ (s c a p :

50

sterol regulatory binding protein cleavage activating protein)、二重特異抗体、三重特異抗体、多重特異抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、イントラボディ、ナノボディ、SMIP (small modular immunopharmaceuticals)、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体 (camelized antibody) または VHH を含む抗体を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片。

【請求項 14】

IgD 抗体、IgE 抗体、IgM 抗体、IgG1 抗体、IgG2 抗体、IgG3 抗体、IgG4 抗体を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片。

10

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 16】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17 及び配列番号 19 で構成された群から選択される一つ以上の配列を含む抗 - FcRn 抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 17】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17 及び配列番号 19 で構成された群から選択される一つ以上の配列と 90% 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む抗 - FcRn 抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項 18】

請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の組換え発現ベクターで形質感染された宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の宿主細胞を培養して抗体を生成する工程と；前記生成された抗体を分離及び精製して FcRn に特異的に結合する抗体を回収する工程と、を含む抗 - FcRn 抗体またはこれの断片の製造方法。

30

【請求項 21】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片、及び一つ以上の薬学的に許容可能な担体を含む薬学組成物。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の組成物を患者に投与する工程を含む自己免疫疾患患者を治療する方法。

【請求項 23】

前記自己免疫疾患は、免疫性好中球減少症、ギラン・バレー症候群、てんかん、自己免疫性脳炎、アイザックス症候群、母斑症候群、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、後天性表皮水疱症、妊娠性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性貧血、自己免疫性グレーブス病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、ループス及び特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)、ループス腎炎及び膜性腎症で構成された群から選択されるいずれか一つであることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 24】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片、及び検出ラベルを含む組成物。

50

【請求項 25】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の抗体またはこれの断片を用いることを含むインビトロまたは生体内で FcRn を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IgG に高親和性を有する受容体である FcRn (Neonatal Fc Receptor の略で、胎児 Fc - 受容体、FcRP、FcRB または Brambell 受容体とも呼ばれる) に特異的な抗体である分離された抗 - FcRn 抗体、この製造方法、前記抗体を含む自己免疫疾患治療用組成物及び前記抗体を利用した自己免疫疾患の治療及び診断方法に関する。本発明に係る FcRn 特異的な抗体は、FcRn に IgG と非競合的に結合して血中内病因性自己抗体 (auto-antibody) の量を減少させることによって自己免疫疾患に対する治療に活用可能である。

10

【背景技術】

【0002】

抗体は、特定抗原に結合する免疫タンパク質でヒト及びマウスをはじめとする多くの動物で重鎖 (heavy chain) と軽鎖 (light chain) のポリペプチドが対をなして、各鎖は、可変領域 (variable domain) 及び不変領域 (constant domain) と称する 2 個の区別される領域で構成されている。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗体間に相当な配列多様性を示し、標的抗原に特異的な結合特性を担当して、不変領域は、抗体間配列多様性が少なく、重要な生化学的反応を誘導する多数の天然タンパク質への結合を担当する。

20

【0003】

正常な条件下、血清内で IgG 3 アイソタイプ (isotype) を除いた多くの IgG の半減期はヒトで約 22 ~ 23 日で、これは他の血しょうタンパク質の血清半減期に比べて比較的長い。このような長い IgG の血中半減期によって細胞吸収作用 (pinocytosis) により細胞中に入ってきた IgG は、pH 6.0 条件のエンドソーム (endosome) で Fc ガンマ受容体の一種である新生児 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor, FcRn) に強く結合して分解性リソソーム経路を回避することができ、再び細胞膜に循環すると IgG は弱い塩基性 pH (~ 7.4) の血流内で FcRn から急速に解離する。このような受容体 - 媒介された再循環メカニズム (receptor mediated recycling mechanism) により FcRn はリソソームで IgG の分解を効果的に遮断して IgG の半減期を延長すると知られている (Roopenian et al. J. Immunol. 170: 3528, 2003)。

30

【0004】

FcRn は、ラット新生児の腸で母乳から IgG 抗体の吸収を媒介する機能をして循環系でこの輸送を促進するものとしても明らかになっている。FcRn は、ヒトの胎盤でも分離されたが、FcRn は、母系 IgG の吸収と胎児循環 (fetal circulation) への輸送を媒介すると知られている。成人で、FcRn は、肺、腸、腎臓の上皮組織、鼻、膈、及び胆管枝 (biliary tree) の表面をはじめとする多数の組織で発現する。

40

【0005】

FcRn は典型的に、内皮細胞と上皮細胞のエンドソーム内に居住する非 - 共有ヘテロ二量体である。FcRn は、三つの重鎖アルファドメイン (1、2 と 3) と一つの水溶性軽鎖 2-microglobulin (2m) ドメインを有する膜結合受容体である。構造的に、これは共通軽鎖で 2m を保有する主な組織適合性複合体 (MHC) クラス 1 分子の集団に属する。FcRn 鎖は、1、2 と 3 の三つの重鎖ドメインと 2m 軽鎖ドメイン含み一つの糖鎖を有する細胞外ドメイン (ectodomain)

50

、単一 - 通過膜間 (single-pass transmembrane)、そして相対的に短い細胞質尾 (cytoplasmic tail) で構成されて約 46 kD の分子量を有する。

【0006】

IgG 恒常性 (homeostasis) に対する FcRn の役割を確認するために、マウスの 2m と FcRn 重鎖をエンコードする遺伝子を「ノックアウト (knockout)」させてこれらのタンパク質が発現しないように操作した時、これらのマウスで、IgG の血清半減期と濃度が急激に減少したが、これは IgG 恒常性に対する FcRn 依存性メカニズムを暗示する。また、抗 - ヒト FcRn 抗体が、これらの FcRn ノックアウトマウスで産出されることができて、これらの抗体が FcRn に IgG の結合を予防できることが提案された。FcRn に対する IgG 結合の阻害によって、IgG 血清半減期を減少させて自己抗体による自己免疫疾患を治療することができる可能性は、自己免疫皮膚水疱性疾患のマウスモデルで明らかになった (Liet al. J. Clin. Invest. 115: 3440, 2005)。従って、FcRn と IgG の結合を遮断したり拮抗する作用剤は、IgG によって媒介される自己免疫疾患及び炎症疾患などを治療または予防する方法に利用できる。

10

【0007】

自己免疫疾患は、原因が分からない免疫体系異常で、免疫体系が自己の正常な組織、器官またはその他体内成分などを攻撃することによって発生する疾患を総称であり、神経系、胃腸管系、内分泌系、皮膚、骨格系、血管組織などほぼすべての身体部位で発生し得る全身的な疾患である。全世界の人口の約 5 ~ 8 % で自己免疫疾患が現れると知られているが、自己免疫疾患に対する理解及び診断方法の限界性により有病率が実際の水準より低く報告されると知られている。

20

【0008】

自己免疫疾患の原因は、遺伝的、環境的及び免疫学的な観点から長い間研究が進行されてきたが、依然として明確な疾患の発生原因は明らかになっていない。近年多くの研究によって多数の自己免疫疾患が IgG 形態の自己抗体によって発生すると明らかになって、実際自己免疫疾患の診断及び治療研究で疾患特異的な自己抗体の存在有無と減少による治療効果との関連性が広く糾明されている。従って、現在多数の自己免疫疾患は、疾患特異的な自己抗体の存在及びその病理的役割が多く糾明されていて、該当自己抗体を血中で除去する場合、迅速な疾患治療効果が得られる。

30

【0009】

自己免疫疾患及び同種免疫疾患は、病原性抗体によって媒介される疾患として、免疫性好中球減少症 (immune neutropenia)、ギラン・バレー症候群 (Guillain-Barre syndrome)、テンカン、自己免疫性脳炎 (autoimmune encephalitis)、アイザックス症候群 (Isaac's syndrome)、母斑症候群 (nevus syndrome)、尋常性天疱瘡 (Pemphigus Vulgaris)、落葉性天疱瘡 (Pemphigus foliaceus)、水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid)、後天性表皮水疱症 (epidermolysis bullosa acquisita)、妊娠性類天疱瘡 (pemphigoid gestationis)、粘膜類天疱瘡 (mucous membrane pemphigoid)、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性貧血、自己免疫性グレーブス病 (autoimmune Grave's disease)、グッドパスター症候群 (Goodpasture's syndrome)、重症筋無力症 (myasthenia gravis)、多発性硬化症 (multiple sclerosis)、リウマチ性関節炎 (rheumatoid arthritis)、ループス (狼瘡: lupus) 及び特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, ITP)、ループス腎炎 (lupus nephritis)、膜性腎症 (membranous nephropathy) 等がある。

40

50

【0010】

例えば、重症筋無力症 (*myasthenia gravis*, MG) の場合、随意筋の神経筋接合部に位置したアセチルコリン受容体 (*acetylcholine receptor*, AChR) に対する自己抗体によって該当受容体が破壊または遮断されて随意筋の収縮機能を阻害すると知られていて、このような自己抗体を減少させる場合、筋肉の機能が回復すると知られている。

【0011】

特発性血小板減少性紫斑症 (ITP) の場合は、特定血小板膜糖タンパク質に結合する自己抗体の発生によって末梢の血小板破壊が進行されて発生する疾患である。抗血小板抗体は、血小板をオプソニン化して細網細胞 (例えばマクロファージ) による急速な血小板破壊をもたらす。

10

【0012】

一般に ITP を治療するために免疫系を抑制して血小板の濃度を高める試みが行われている。ITP は、男性より女性で有病率が高く、また成人より小児で多く発生して、有病率は人口 1 万人当たり 1 人である。慢性的 ITP は、成人と小児の両方において主要な血液疾患の一つである。また、米国及び全世界において、巨額の入院費用及び治療費用を発生させる原因になっている。毎年米国で 2 万件の新しい症例が発生して、ITP の治療及び特別療法にかかる費用も莫大である。多くの ITP 小児患者は、非常に低い数の血小板を有して突然の出血 (典型的な症状として、挫傷、皮膚の小さい赤斑点、鼻血、及び歯ぐき出血) が起きる。小児は時には治療しなくても回復する場合があるが、多くの医者が綿密な観察と緩和及びガンマ・グロブリンの点滴静脈注射による治療を推薦している。

20

【0013】

前身性紅斑性ループス腎炎 (*lupus nephritis*) の場合は、自己免疫疾患の一種で抗核抗体 (*antinuclear antibodies*) のような自己抗体の不適切な過剰生産により増加した免疫複合体 (*Immune-Complex*) が全身の臓器に蓄積されて炎症反応を起こすことが重要な病因と知られている。このようなループス患者の約 40 ~ 70 % は腎臓に侵入して、約 30 % はループス腎炎に発展するが、これはループスの病態中悪性予後因子と知られていて、既存の免疫抑制剤による治療法が試みられているが、約 22 % では免疫抑制剤使用時にも寛解が来なく、寛解が来た場合にも免疫抑制剤を減らせば、10 ~ 65 % の患者が再発すると報告されている。結局、重症のループス腎炎 (*WHO class III and IV*) 患者は、10 年後に 5 ~ 10 % が死亡して、5 ~ 15 % は末期腎不全に達することになる深刻な疾患であり、いまだに適切なループス腎炎の治療が行われていない。

30

【0014】

従って、病原性自己抗体を除去して自己免疫疾患を治療する新規作用機序の抗体を介して、尋常性天疱瘡、視神経脊髄炎 (*neuromyelitis optica*)、重症筋無力症のような病原性抗体誘導自己免疫疾患 (*Pathogenic IgG-mediated autoimmune diseases*) を含み、ループス腎炎や膜性腎症のような免疫複合体誘発腎臓系疾患 (*Immune complex-mediated glomerular diseases*) への治療効果の拡張も期待する。

40

【0015】

様々な自己免疫疾患に過量の IgG を点滴静脈投与 (IVIg) して、自己免疫疾患を治療する方法が広く使用されている (*Arnsion, Autoimmunity 42: 553, 2009*)。IVIg 効果は、様々な機序によって説明されるが、それらの中の一つは、FcRn に対する内因性 IgG との競合によって病原性抗体のクリアランス (*clearance*) を増加させる機序としても説明される。大量のヒト免疫グロブリンの静脈投与 (IVIg) は、免疫性 ITP に苦しんでいる小児の血小板数を増加させて、複数の他の自己免疫疾患の治療に有益であることが証明された。多くの研究で、IVIg の自己免疫疾患治療において効果を発揮するメカニズムが糾明された。ITP と関連して、初期研究で IVIg の効果は、主に抗体 - オプソニン化血小板の食菌作用に關与する Fc

50

受容体を遮断して発生すると知らされてきた。その後の研究は、Fc - 欠損IVI Gは、一部のITP患者において血小板数の増加をもたらすことが明らかになり、近年はIVI Gの効果は、血小板貪食の阻害につながるマクロファージ (macrophage) 細胞上のFc RIIb発現を刺激することに起因するとの報告もある。

【0016】

しかし、このようなIVI G治療は、大きい副作用を有して投与に非常に大きい費用がかかる。また、IVI G以外の自己免疫/同種免疫性疾患の治療に使用される他の治療法としては、ポリクローナル抗-D免疫グロブリンと、副腎皮質ステロイド及び化学療法剤を含む免疫抑制剤などを利用する方法、サイトカイン血しょう分離交換法、体外抗体吸着 (例えばProisorbaカラムを使用する方法) または脾臓摘出などの外科的処置などが含まれる。しかし、IVI Gと同様に、このような治療法も充分ではない効力及び高費用のため、その利用が限られてしまう。また、IVI GがFcRn結合を阻害する仮想機序意競合的阻害は、IgGの生理学的pH (すなわち、pH7.2~7.4) でFcRnに対する低い親和性により、病原性抗体のクリアランスの実質的な増加をもたらすために非常に多量のIVI Gが求められるが、IVI Gの典型的な臨床容量は2g/kg程度である。

10

【0017】

IgGのFcRnに対する結合を競合的に抑制することによって、自己免疫疾患を治療する概念を有する阻害剤を利用することは、有望な治療法中一つであるが、現在では内因性IgGのFcRnに対する高親和性及び血中の内因性IgGの濃度によって相当多量の阻害剤が必要で、それによって現在のIVI G治療法と同様の限界を有していると知られている。

20

【0018】

従って、抗-FcRn抗体は、WO2006/118772、WO2007/087289、WO2009/131702、WO2012/167039に開示されているが、FcRnに対する高親和力かつ少ない量で病因性抗体を除去することができて、免疫原性を減らすことができるより向上したヒト抗体に対する開発必要性が切に求められているのが現状である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0019】

前記のような問題を解決しようと、本発明は効果的にITPを含む自己免疫疾患を効率よく根本的に治療できる治療剤を提供するため、FcRnに特異的に結合できる能力を有する抗体及びそのような抗体の製造方法を提供することを目的とする。本発明に係るFcRn特異的抗体は、FcRnに特異的でありpH非依存的に結合してFcRnに対する抗体Fcの結合を非競合的 (non-competitive) に妨害して自己免疫疾患の原因である生体内自己抗体を減少させることによって自己免疫疾患を治療することができる。

本発明のさらに他の目的は、前記のFcRn特異的抗体を含有する免疫性好中球減少症、ギラン・バレー症候群、テンカン、自己免疫性脳炎、アイザックス症候群、母斑症候群、尋常性天疱瘡、落葉性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、後天性表皮水疱症、妊娠性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性貧血、自己免疫性グレーブス病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、ループス及び特発性血小板減少性紫斑病、ループス腎炎、膜性腎症などの自己免疫疾患治療用薬学組成物を提供するところにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0020】

前記目的を達成するために、本発明は、配列番号21、配列番号24、配列番号27、配列番号30、配列番号33、配列番号36、配列番号39及び配列番号42で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列を含むCDR1；

50

配列番号 2 2、配列番号 2 5、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 4 0 及び配列番号 4 3 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び

配列番号 2 3、配列番号 2 6、配列番号 2 9、配列番号 3 2、配列番号 3 5、配列番号 3 8、配列番号 4 1 及び配列番号 4 4 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む F c R n に特異的に結合する分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、配列番号 2 1、配列番号 2 4、配列番号 2 7、配列番号 3 0、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 9 及び配列番号 4 2 で構成された群から選択された一つ

10

以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ;
配列番号 2 2、配列番号 2 5、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 4 0 及び配列番号 4 3 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び

配列番号 2 3、配列番号 2 6、配列番号 2 9、配列番号 3 2、配列番号 3 5、配列番号 3 8、配列番号 4 1 及び配列番号 4 4 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 2 0 で構成された群から選択される一つ以上のアミノ酸配列を含む一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片を提供する。

20

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 2 0 で構成された群から選択される一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含む分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片を提供する。

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

30

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7 及び配列番号 1 9 で構成された群から選択される一つ以上の配列を含む抗 - F c R n 抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7 及び配列番号 1 9 で構成された群から選択される一つ以上の配列と 9 0 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む抗 - F c R n 抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

40

【 0 0 2 7 】

本発明はまた、前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター、及び前記組換え発現ベクターで形質感染された宿主細胞を提供する。本発明は追加的に、前記宿主細胞を培養して抗体を生成する工程と ; 及び前記生成された抗体を分離及び精製して F c R n に特異的に結合する抗体を回収する工程と、を含む抗 - F c R n 抗体またはこれの断片の製造方法を提供する。

【 0 0 2 8 】

本発明はさらに、前記抗体またはこれの断片、及び一つ以上の薬学的に許容可能な担体を含む薬学組成物を提供する。

50

【0029】

本発明はさらに、前記組成物を患者に投与する工程を含む自己免疫疾患患者を治療する方法を提供する。

【0030】

本発明はさらに、前記抗体またはこれの断片、及び検出ラベルを含む組成物を提供する。

【0031】

本発明はさらに、前記抗体またはこれの断片を用いることを含む試験管内または生体内でFcRnを検出する方法を提供する。

【発明の効果】

10

【0032】

IgGに高親和性を有する受容体であるFcRnに特異的な本発明に係る抗体またはこれの断片は、高い親和度及び特異性を有して、免疫原性による問題が殆どなく、FcRnにIgGなどと非競合的に結合して、血中内病理性自己抗体の量を減少させる特性を有しているため、自己免疫疾患の治療及び診断に非常に有用に使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】CHO-S細胞を利用した抗体発現とProtein A精製を介して確保されたHL161A、HL161B、HL161C及びHL161D抗体タンパク質をSDS-PAGEゲル上で還元または非還元状態で分析した結果を示す図面で、それぞれのHL161抗体は、非還元状態で約160kDaの完全な形態のヒトIgG1タイプの構造をなすことを確認して、還元状態で重鎖は、約55kDa、そして軽鎖は、約25kDaで典型的な抗体構造単位からなることを確認した。図1でLane1は、M.W.marker、Lane2は、非還元状態(*NEM-treated)2µg、Lane3は、還元状態2µgを示す。

20

【図2】FcRnに結合する4種のanti-FcRn抗体、HL161A、HL161B、HL161C及びHL161Dのキネティック分析(Kinetic Dissociation, KD)を決定するためにSPR機器を利用した分析結果を示した図面で、Proteon GLC chipとProteon XPR36(Bio-Rad)装置を使用してヒトFcRnとHL161A、HL161B、HL161CまたはHL161D抗体の相互反応をpH6.0及びpH7.4でそれぞれ分析した：

30

【図2A】ヒトFcRnとHL161A抗体の相互反応をpH6.0で分析した結果である。

【図2B】ヒトFcRnとHL161A抗体の相互反応をpH7.4で分析した結果である。

【図2C】ヒトFcRnとHL161B抗体の相互反応をpH6.0で分析した結果である。

【図2D】ヒトFcRnとHL161B抗体の相互反応をpH7.4で分析した結果である。

【図2E】ヒトFcRnとHL161C抗体の相互反応をpH6.0で分析した結果である。

40

【図2F】ヒトFcRnとHL161C抗体の相互反応をpH7.4で分析した結果である。

【図2G】ヒトFcRnとHL161D抗体の相互反応をpH6.0で分析した結果である。

【図2H】ヒトFcRnとHL161D抗体の相互反応をpH7.4で分析した結果である。

【図3】選別された2種の抗体の細胞表面のヒトFcRn(hFcRn)に対する結合能を示した図面で、細胞表面に存在するヒトFcRnに結合する選別されたHL161AとHL161B抗体をヒトFcRnが過発現するHEK293細胞に処理してpH6.0と

50

pH 7.4で細胞表面FcRnに結合する抗体を確認した結果である。HL161AとHL161B抗体のヒトFcRn結合は、各抗体をpH別に細胞に処理した後、Alexa488標識(labeled)された抗-ヒトヤギ抗体(anti-human goat antibody)を使用して蛍光活性化セルソーター(Fluorescent activated cell sorter, FACS)分析を介してMFI値で表現した。

【図4】pH6.0条件でヒトIgGとヒトFcRn発現細胞結合抑制能分析結果で、細胞表面ヒトFcRnに結合する選別された2種の抗体がヒトFcRnに対するヒトIgGの結合を阻害できるかを細胞レベルで観察した結果を示す図面である。ヒトFcRnが過発現するHEK293細胞に結合することが確認されたHL161AとHL161B抗体をそれぞれ200nMから4倍順次希釈を介してAlexa488標識されたヒトIgGのヒトFcRnに対する結合抑制能力に対するプロファイルを確認した。

【図5A-5B】ヒトFcRnが発現する形質感染マウスであるTg32(hFcRn+/+, h2m+/+, mFcRn-/-, m2m-/-)から選別された抗体であるHL161AとHL161B抗体がhIgG1の異化作用に及ぼす影響を確認した結果を示す図面で、0時間に5mg/kgのbiotin-hIgGと495mg/kgのヒトIgGを腹腔投与して体内のIgGを飽和させた。薬物の投与は、biotin-IgGの投与後24、48、72、96時間後に、5、10、及び20mg/kgの容量でヒトIgG1、HL161A、HL161BまたはPBSを1日1回腹腔注射(ip)して取得した結果である。試料採取は、biotin-IgGの投与後、24、48、72、96、120、168時間後に行われ、24、48、72、96時間には、薬物投与前採血をしてELISA法でbiotin-IgGの残存量を確認した。結果は、24時間採血サンプルの残存量を100%にして各時間帯の残存量を相対的な割合で示した。

【図6】ヒトFcRnと96%配列同一性を有するシノモルグス猿を利用して、HL161AとHL161Bの2種の抗体投与による猿IgGの血液内変化量を分析した結果を示す図面で、HL161AとHL161B抗体をシノモルグス猿に5、20mg/kgの容量で週1回静脈投与した結果、猿IgGの場合、0時間対比最大70%まで減少して、29日まで30%程度減少した：

【図6A】HL161AとHL161B抗体濃度別猿血液内IgG減少効果を示したものである。

【図6B】HL161AとHL161B抗体5mg/kg濃度の猿個体別血液内IgG減少効果を示したものである。

【図6C】HL161AとHL161B抗体(20mg/kg濃度)の猿個体別血液内IgG減少効果を示したものである。

【図7A-7B】シノモルグス猿を利用した試験で、HL161A及びHL161Bの薬物動態学的プロファイルを分析した結果を示す図面で、全体的にHL161Aに比べてHL161Bが半減期、AUC及びCmaxが高い傾向を示した。

【図8A-8C】シノモルグス猿を利用した試験で、HL161AとHL161B抗体投与による猿IgM、IgA、そしてアルブミン(albumin)の血液内変化量を分析した結果を示す図面で、いずれも数値的に若干の変化はあったが、シノモルグス猿の正常範囲内の変化であるため、試験物質による影響というよりは個体差による結果であると判断された：

【図8A】猿血液内猿IgM変化を示したものである。

【図8B】猿血液内猿IgA変化を示したものである。

【図8C】猿血液内猿アルブミン変化を示したものである。

【発明を実施するための形態】

【0034】

前記目的を達成するために、本発明では、FcRnに高い親和度(affinity)を有して特異的でpH非依存的に結合することができ、ヒトから由来した配列からなって体内投与時免疫反応誘発が殆どない抗体を提供する。

【0035】

本発明で提供される抗体は、FcRnに対する特異性を有する結合分子である。前記抗体は、モノクロナル抗体（例えば、免疫グロブリンとFc領域を有する全長抗体）、多重エピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、ダイアボディ（diabody）及び単一鎖分子だけでなく抗体断片（例えば、Fab、F(ab')₂及びFv）を含むことができるが、これに制限されない。本発明で提供される抗体は、例えば、ヒトFcRnに対するモノクロナル抗体であり得る。

【0036】

モノクロナル抗体は、マウス抗体を含むことができる。また、モノクロナル抗体は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定種、例えばマウスから由来したり、特定抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体内の相応する配列と同じであったり相同性である一方、鎖の残りは、他の種から由来したり、他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体内の相応する配列と同じであったり相同性である「キメラ」抗体だけでなく目的する生物学的活性を示す限り、このような抗体の断片を含む。「ヒト化抗体」は「キメラ抗体」の下位セットで使用される。

10

【0037】

ヒト化に対する代案として、ヒト抗体が生成できる。「ヒト抗体」は、ヒトによって生産されたり、任意のヒト抗体製造技術を使用して製造された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含み、当業界に公示された種々の技術を使用して製造することができる。ヒト抗体は、抗原試験接種に反応して抗体を生産するように変形されたが、その内因性ロカス（locus）が機能しないトランスジェニック動物、例えば免疫処理されたゼノマウス（xenomouse）に抗原を投与して作られる。本発明で提供される抗体は、例えば、ヒト抗体の形態を有することができる。

20

【0038】

基本4鎖抗体単位は、2個の同じ軽鎖（L）及び2個の同じ重鎖（H）からなる異種4量体糖タンパク質である。軽鎖は、N-末端で可変領域（VL）を有し、続いてその他の端部で不変領域を有する。重鎖は、N-末端で可変領域（VH）を有し、続いてそれぞれ及び鎖に対して3個の不変領域（CH）及びμ及びイソ型に対して4個の不変領域（CH）を有する。

30

【0039】

「可変」は、可変領域の特定の部分が抗体の間で配列が大きく異なることを示す。V領域は、抗原結合を媒介して、その特定抗原に対する特定抗体の特異性を規定する。可変性は、軽鎖及び重鎖可変領域共に超可変領域（HVR）、すなわち、CDRと呼ばれる3個のセグメントに集中する。可変領域のより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。重鎖及び軽鎖可変領域は、N-末端からC-末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4構造を有する。

【0040】

本発明では、ヒト免疫グロブリンと形質転換動物を利用して、ヒトFcRnに親和度と特異性を有する抗体を収得した。形質転換動物は、動物のIg生殖細胞（germline）遺伝子を不活性化させ、ヒトのIg生殖細胞遺伝子ロカスを移植して製造することができる。形質転換動物を利用した場合、動物の免疫体系によって自然に抗体が最適化されて親和度改善（affinity maturation）が必要でなく、速い時間内に免疫原性が低く高い親和度を有する抗体医薬品の開発が可能な長所がある（US20090098134, US20100212035, Menoret et al, Eur J Immunol, 40:2932, 2010）。

40

【0041】

本発明では、ヒト免疫グロブリンと形質転換ラットに対する特許技術を保有しているOMT社（米国）のOmniRatTMを活用した。OmniRatTMは、CH2、CH3ドメインがラット遺伝子でV、D、J領域とCH1ドメインがヒト遺伝子で構成された

50

重鎖を含み、ヒトのカッパ (k a p p a) 軽鎖とラムダ (l a m d a) 軽鎖を含んで効率よくヒト F c R n に対する親和度が高い抗体を選別することができる (M e n o r e t e t a l , E u r J I m m u n o l , 4 0 : 2 9 3 2 , 2 0 1 0) 。

【 0 0 4 2 】

F c R n に対する親和度が高いモノクロナル抗体を得るために、形質転換ラット (O m n i R a t ^{T M}) にヒト F c R n を注射して免疫化させた後、B細胞を抽出して骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを製造した後、製造されたハイブリドーマから生産された抗体を精製した。

【 0 0 4 3 】

本発明に係る抗体は、F c R n との結合に当たり、I g G の非競合的阻害剤として作用する。本発明に係る抗体と F c R n 結合によって F c R n に対する病原性抗体の結合が阻害されて、これにより、個体の体内から病原性抗体の体内から病原性抗体のクリアランス、すなわち除去が促進されて半減期が減少することになる。

10

【 0 0 4 4 】

本発明で使用される「病原性抗体」とは、病的な状態または疾病を引き起こす抗体を意味する。このような抗体は、例えば、抗血小板抗体、抗アセチルコリン抗体、抗核酸抗体、抗リン脂質抗体 (a n t i - p h o s p h o l i p i d a n t i b o d y) 、抗コラーゲン抗体 (a n t i - c o l l a g e n a n t i b o d y) 、抗ガングリオシド抗体 (a n t i - g a n g l i o s i d e a n t i b o d y) 、抗デスモグレイン抗体 (a n t i - d e s m o g l e i n a n t i b o d y) などであってもよいが、これに限定

20

されない。
本発明に係る抗体は、生理学的 pH、すなわち pH 7 . 0 ~ 7 . 4 で病原性抗体と F c R n との結合を非競合的に阻害することができる長所がある。F c R n は、そのリガンド、すなわち I g G に pH 依存的に結合して、酸性でない生理学的 pH では、I g G に対して実質的に親和性を示さない。従って、生理学的 pH で F c R n に特異的に結合する抗 - F c R n 抗体は、I g G と F c R n の結合に非競合的阻害剤として作用して、この場合、F c R n への抗 - F c R n 抗体の結合は、I g G の存在の有無に影響されない。従って、pH 非依存性によって I g G と非競合的に F c R n と結合する本発明に係る抗体は、競合的阻害剤、すなわち I g G と競争的に F c R n に結合する既存の抗体に比べてずっと低い濃度だけでも I g G の F c R n 媒介信号伝達による疾病の治療が可能である長所がある。

30

【 0 0 4 5 】

本発明に係る抗体は、I g G が F c R n に結合できない環境である生理学的 pH、すなわち pH 7 . 0 ~ 7 . 4 でも F c R n に親和性を有して pH 6 . 0 では血中内 I g G より F c R n にさらに高い親和性を有して非競合的阻害剤として作用する。

【 0 0 4 6 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 1、配列番号 2 4、配列番号 2 7、配列番号 3 0、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 9 及び配列番号 4 2 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む C D R 1 ;

40

配列番号 2 2、配列番号 2 5、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 4 0 及び配列番号 4 3 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び

配列番号 2 3、配列番号 2 6、配列番号 2 9、配列番号 3 2、配列番号 3 5、配列番号 3 8、配列番号 4 1 及び配列番号 4 4 で構成された群から選択された一つ以上のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む F c R n に特異的に結合する分離された抗 - F c R n 抗体またはこれの断片に関する。

50

【0047】

本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者は、本発明の要旨を利用して前記配列番号に記載されたアミノ酸配列を一部欠失、付加または置き換えても本発明の目的を達成できる限り、本発明の範囲に含まれる。

【0048】

また、前記配列番号に記載されたヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と特定範囲で同一性を有する配列も本発明の目的を達成できる限り、本発明の範囲に含まれる。「同一性」とは、配列番号1～44からなるグループで選択される一つ以上のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と類似する程度を示すものであって、90%以上同じ配列を含み、好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上同じ配列を含むことができる。同一性の比較は、公示の目視または比較プログラムを利用して行う。市販されるコンピュータプログラムは、2個以上の配列間の同一性を百分率(%)で計算することができる。同一性(%)は、隣接した配列に対して計算されることができる。

10

【0049】

さらに、本発明の目的を達成できる限り、pH6.0とpH7.4の条件でKD(dissociation constant)が0.01～2nMであるFcRnに特異的に結合する抗体も本発明の範囲に含まれることができる。本明細書で使用される「KD」とは、抗体抗原の結合に対する平衡解離定数(equilibrium dissociation constant)を意味して、 $KD = kd / ka$ (kaは、association rate constantを意味し、kdは、dissociation rate constantを意味する)を介して導き出すことができ、kdまたはkaの測定は、25 または37 で実行されることができる。

20

【0050】

一実施例において、本発明の抗体またはこれの断片は、配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3、配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR3、配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号34のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号35のアミノ酸配列を含むCDR3、または配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号40のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号41のアミノ酸配列を含むCDR3を含んでもよい。

30

【0051】

前記配列番号で表されたアミノ酸配列は、重鎖可変領域のCDR1～CDR3に該当するアミノ酸配列であってもよい。

【0052】

さらに他の実施例において、本発明の抗体またはこれの断片は、配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3、配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR3、配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号38のアミノ酸配列を含むCDR3、または配列番号42のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号43のアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号44のアミノ酸配列を含むCDR3を含んでもよい。

40

【0053】

前記配列番号で表されたアミノ酸配列は、軽鎖可変領域のCDR1～CDR3に該当するアミノ酸配列であってもよい。

【0054】

本発明に係る抗体またはこれの断片は、具体的に、配列番号21のアミノ酸配列を含む

50

C D R 1、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域、

配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域、

配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域、及び

配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R 2 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域で構成された群から選択された一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含んでもよい。

【 0 0 5 5 】

一実施例において、本発明に係る抗体またはこれの断片は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 2 0 で構成された群から選択される一つ以上のアミノ酸配列を含む一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含んでもよい。

【 0 0 5 6 】

具体的に、本発明に係る抗体またはこれの断片は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8 または配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び / または配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8 または配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。

【 0 0 5 7 】

本発明に係る抗体またはこれの断片は、具体的に、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び

配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域で構成された群から選択された一つ以上の重鎖及び軽鎖可変領域を含んでもよい。

【 0 0 5 8 】

本発明に係る「断片」または「抗体断片」とは、全長 (a f u l l l e n g t h) 抗体ポリペプチドを含まないが、抗体ポリペプチド分子 (例えば、抗体の重鎖または軽鎖ポリペプチド) 由来ポリペプチドを意味するか、依然として全長抗体ポリペプチドの少なくとも部分を含む。抗体断片は、切断断片に限定されないが、全長抗体ポリペプチドの切断部分を含むポリペプチドをたびたび含む。抗体を参照して使用される用語として断片は、抗体ポリペプチド由来単一鎖ポリペプチド (e . g . 重鎖または軽鎖抗体ポリペプチド) を含む断片を含むので、抗体断片は、それ自体で抗原に結合できないことがある。

【 0 0 5 9 】

本発明に係る抗体は、抗体の断片も含む。本発明での抗体の断片は、単一鎖抗体、二重特異抗体、三重特異抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディのような多重特異

10

20

30

40

50

抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fd、scFv、ドメイン抗体、デュアル-特異抗体、ミニボディ、スキップ (scap:sterol regulatory binding protein cleavage activating protein)、キレート組換え抗体、トリボディ、バイボディ (bibodies)、イントラボディ、ナノボディ、SMIP (small modular immunopharmaceuticals)、結合ドメイン免疫グロブリンと融合タンパク質、ラクダ抗体 (camelized antibody)、含VHH抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、抗体不変領域誘導体、及びFcRnに結合能を保有するタンパク質スキフォールドに基づいた合成抗体を含むか、これに制限されない。

10

【0060】

FcRnに対する結合機能が維持される限り、本発明に係るいかなる形態の抗体の断片も本発明に係る抗体と同じ特性を示す点は、通常の技術者には自明である。

【0061】

また、本発明の抗体または断片の特性が維持される限り、可変領域内での変移が起きた抗体も本発明の権利範囲に含まれる。その例として、可変領域でのアミノ酸の保存的置換が起きた抗体が挙げられる。保存的置換は、本来のアミノ酸配列と類似する特性を有する他のアミノ酸残基への置換を意味するが、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンは、塩基の側鎖を有していて、類似する特性を有し、アスパラギン酸とグルタミン酸は、酸側鎖を有する点で類似する特性を有する。また、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファンは、比電荷極性の側鎖を有する点で特性が類似して、アラニン、バリン、ロイシン、トレオニン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンは、非極性の側鎖を有している点で、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンは、芳香族の側鎖を有している点で類似する特性を有する。従って、前記の通りに類似する特性を有するグループ内でのアミノ酸置換が起きても特別な特性変化が見られない点は、通常の技術者には自明なことであるため、本発明に係る抗体の特性が維持される限り、可変領域内での保存的置換による変移が起きた抗体も本発明の権利範囲に含まれる。

20

【0062】

また、本発明に係る抗体またはその断片は、他の物質と接合された複合体 (conjugate) の形態でも利用可能である。本発明に係る抗体またはその断片と接合して利用できる物質としては、通常自己免疫疾患の治療に利用される治療剤及びFcRnの活性を阻害できる物質、または血液、血清、リンパ、またはその他組織の循環系内でこれの安定化及び/または維持を向上させるモイアティ (moiety) と物理的に連結される。例えば、FcRn-結合抗体は、重合体、例えば、ポリアルキレン酸化物またはポリエチレン酸化物とのような非-抗原性重合体と連結されることができる。適切な重合体は、重量によって実質的に変わる。約200~約35,000 (または、約1,000~約15,000、そして2,000~約12,500) の範囲の平均分子量を有する重合体を利用されることができる。例えば、FcRn-結合抗体は、水溶性重合体、例えば親水性ポリビニール重合体、例えば、ポリビニールアルコールとポリビニルピロリドンに接合されることができる。このような重合体の種類には、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化されたポリオールのようなポリアルキレン酸化物のホモポリマー、共重合体、そしてこれらのブロック共重合体などが代表的な例であるが、これに限定されない。但し、これらのブロック共重合体の水溶解度が維持されなければならない。

30

40

【0063】

他の観点において、本発明は、前記抗体またはこれの断片、及び一つ以上の薬学的に許容可能な担体を含む薬学組成物、自己免疫疾患治療用薬学組成物に関する。また、本発明は、自己免疫疾患の治療を必要とする患者に有効量のFcRnに特異的に結合する抗体またはこれの断片を投与する工程を含む自己免疫疾患の治療方法に関する。

50

【0064】

前記薬学組成物には、薬学的に許容可能な通常の担体及び賦形剤などが追加的に含まれることができる。薬剤学的に許容可能な担体は、本発明に係る抗体などの有効性分と両立可能であるべきで、食塩水、滅菌数、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロス溶液、マルチデキストリン溶液、グリセロール、エタノールおよびこれらの成分のうち一つの成分または二つ以上の成分を混合して使用でき、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など他の通常の添加剤を添加してもよい。また、散剤、精製、カプセル剤、液剤、注射剤、軟こう剤、シロップ剤などの様々な形態で製剤化することができて、単位投与量または多投与量容器、例えば密封されたアンプルおよびビンなどで提供されてもよい。

【0065】

前記薬学的組成物は、IgGとFcRnによって媒介されるいずれの自己免疫疾患に適用されるが、代表的な疾患としては、免疫性好中球減少症、ギラン・バレー症候群、テンカン、自己免疫性脳炎、アイザックス症候群、母斑症候群、尋常性天疱瘡、落葉性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、後天性表皮水疱症、妊娠性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性貧血、自己免疫性グレーブス病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、ループス及び特発性血小板減少性紫斑病、ループス腎炎、膜性腎症などがあるが、これに限定されない。

【0066】

本発明に係る治療方法で、抗体の投与量は、患者の重症度、状態、年齢、疾患経歴などを考慮して適切に決定されるが、例えば1mg/kg～2g/kgの投与量で投与されることができ、前記抗体は、単回または数回投与されることができ、

本発明に係る抗体またはこれの断片を治療が必要な個体に投与することを含む自己免疫性または同種免疫性状態を緩和する方法を提供して、同時に特定抗-FcRn療法も提供する。

【0067】

本発明に係る自己免疫性または同種免疫性状態を緩和する方法または抗-FcRn療法は、本発明に係る薬学組成物を個体に投与することによって達成されてもよいが、本発明に係る薬学的組成物は、経口または、非経口投与が可能で、具体的には、例えば、口腔、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜内、心臓内、経皮、皮下、腹腔内、腸管、舌下または局所投与が可能であるが、これに限定されない。本発明に係る薬学組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食事、投与時間、方法、排泄率および疾病の重症度等によりその範囲が多様であり、本技術分野の通常の専門家が容易に決めることができるが、単回または繰り返し投与されることができ、一般に1～200mg/kg、より好ましくは1～40mg/kgを自己免疫性または同種免疫性症状を有する患者に投与できて、このような投与計画は、好ましくは血清内因性IgG濃度を治療前の値の75%未満に減らすように設計することができ、患者の状態などを勘案して間欠的または慢性的（継続的）投薬方針を適用することができる。

【0068】

本発明はさらに、本発明に係る抗体またはこれの断片を含む診断用組成物及びこれを利用した診断方法を提供する。すなわち、本発明に係るFcRnに結合する抗体またはこれの断片は、試験管内（in vitro）と生体内（in vivo）診断的有用性を有する。

【0069】

さらに他の観点において、本発明は、FcRnに特異的に結合する抗体またはこれの断片を含むFcRn検出用組成物に関する。本発明はさらに、前記FcRnに特異的に結合する抗体またはこれの断片を処理する工程を含む試験管内または生体内でFcRnの存在を検出するための方法に関する。

【0070】

試験管内検出方法は、例えば（1）サンプルをFcRn-結合抗体と接触させる工程；（2）FcRn-結合抗体とサンプルとの間に複合体の形成を検出する工程；及び/また

10

20

30

40

50

は(3)参考サンプル(例えば、対照サンプル)を抗体と接触させる工程；(4)参考サンプルと比較して抗体とサンプルとの間に複合体の形成の程度を決定する工程を含むことができる。対照サンプルまたは個体と比較して、サンプルまたは個体内に複合体の形成における変化、例えば、統計的に有意な変化は、サンプル内にFcRnの存在を意味することになる。

【0071】

生体内検出方法は、(1)FcRn-結合抗体を個体に投与する工程；(2)FcRn-結合抗体と個体との間に複合体の形成を検出する工程を含むことができる。検出は、複合体形成の位置または時点を決定することを含むことができる。FcRn-結合抗体は、結合または結合しなかった抗体の検出を容易にする検出可能物質で、直接的にまたは間接的に標識化されることができる。適切な検出可能物質には、様々な酵素、補綴グループ、蛍光物質、発光物質及び放射性物質が含まれる。FcRn-結合抗体とFcRnとの間に複合体形成は、FcRnに結合した抗体または結合しなかった抗体を測定したり可視化させることによって検出されることができる。伝統的な検出分析、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射性免疫測定法(radioimmunoassay、RIA)または組織免疫組織化学(tissue immunohistochemistry)が利用されることができる。FcRn-結合抗体の標識化に加えて、FcRnの存在は、検出可能物質で標識化された基準及び標識化されなかったFcRn-結合抗体を利用した競合免疫分析(competition immunoassay)によってサンプル内で分析されることができる。このような分析の一つ実例で、生物学的サンプル、標識化された基準、そしてFcRn-結合抗体が結合して、そして標識化されなかった抗体に結合した標識化された基準の量が測定される。サンプル内にFcRnの量は、FcRn-結合抗体に結合した標識化された基準の量と反比例する。

10

20

【0072】

診断目的での使用のために、本発明に係る抗体またはこれの断片は、蛍光団または発色団で標識化されることができる。抗体及び他のタンパク質が、約310nmまでの波長を有する光を吸収するため、蛍光モイアティは、310nm超、好ましくは400nm超の波長で実質的な吸収を有するように選択されなければならない。様々な適切な蛍光物質と発色団は、蛍光発色団群で標識化されることができる。蛍光発色団群中一群の蛍光物質は、キサントレン(xanthene)染料であるが、ここにはフルオレセイン(fluoresceins)とローダミン(rhodamines)が含まれる。他の群の蛍光化合物は、ナプチルアミン(naphthylamine)である。蛍光団または発色団で一度標識されると、抗体は、例えば、蛍光鏡検(microscopy)(例えば、共焦点(confocal)またはデコンボリューション(deconvolution)鏡検)を利用してサンプル内でFcRnの存在または局地化を検出するのに利用されることができる。

30

【0073】

本発明に係る抗体またはこれの断片を利用したFcRnの存在または局地化の可否は、組織学的分析、タンパク質アレイ(arrays)、FACS(蛍光活性化した細胞分類)等の様々な方法によって検出が可能である。

40

【0074】

本発明で生体内FcRnまたはFcRn-発現組織の存在は、in vivo画像検出方法により確認されることができる。前記方法は(1)個体(例えば、自己免疫疾患患者)に、検出可能マーカーに接合された抗-FcRn抗体を投与する工程；(ii)FcRn-発現組織または細胞に対する検出可能マーカーを検出するための手段に前記個体を露出させる工程を含む。例えば、個体は、一例として、NMRまたは他の断層撮影手段によって画像診察される。診断的画像診察に有用なラベルの例として、放射性ラベル、蛍光ラベル、陽電子放出同位元素(positron emitting isotope)、化学発光物質、発光酵素などが挙げられる。放射性標識化された抗体は、試験管内診断検査にも利用されることができる。同位元素-標識化された抗体の特異的な活性は、半減期

50

、放射性ラベルの同位元素純度、そしてラベルが抗体内に統合される方法に左右される。

【0075】

本発明はさらに、FcRnに結合する抗体またはこれの断片、及び診断的用途、例えば、試験管内で、例えば、サンプル、例えば、自己免疫疾患患者から生検または細胞内で、または生体内で、例えば、個体を画像診察することによってFcRnを検出するための、FcRn-結合抗体またはこれの抗原-結合断片の用途に対する使用説明書を含むキットを提供する。前記キットは、少なくとも一つの追加的な試薬、例えばラベルまたは追加の診断剤をさらに含むことができる。生体内利用の場合に、抗体は、製薬学的組成物として調製されることができる。

【0076】

他の観点において、本発明は、前記FcRnに特異的に結合する抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0077】

一実施例において、本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17及び配列番号19で構成された群から選択される一つ以上の配列と90%以上の相同性を示すアミノ酸配列を含む抗-FcRn抗体またはこれの断片をコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。

【0078】

具体的に、本発明に係る抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7または配列番号9及び/または本発明に係る抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17または配列番号19である。

【0079】

さらに他の観点において、本発明は、前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター主細胞を利用してFcRnに特異的に結合する抗体またはこれの断片を製造する方法に関する。

【0080】

一実施例において、前記抗体またはこれの断片は、特に遺伝子組換え法で発現及び精製して製造することが好ましいが、具体的に本発明に係るFcRnに特異的に結合する抗体をコードする可変領域をそれぞれ別々に、または一つの宿主細胞で同時に発現させて製造することが好ましい。

【0081】

本発明で「組換えベクター」とは、適当な宿主細胞で目的タンパク質を発現できる発現ベクターであって、遺伝子挿入物が発現するように作動可能に連結された必須の調節要素を含む遺伝子作製物をいう。本発明で「作動可能に連結された(operably linked)」とは、一般的な機能を行うように核酸発現調節配列と目的するタンパク質をコードする核酸配列が機能的に連結されていることをいう。組換えベクターとの作動的連結は、本発明が属する技術分野で周知の遺伝子組換え技術を利用して製造することができ、部位-特異的DNA切断及び連結は、本発明が属する技術分野で一般に知られた酵素などを使用して容易に行うことができる。

【0082】

本発明で使用されることができる適した発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化(polyadenylation)シグナル及びエンハンサーのような発現調節エレメントの他にも膜標的化または分泌のためのシグナル配列を含むことができる。開始コドン及び終結コドンは、一般に免疫原性標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部と見なされて、遺伝子作製物が投与された時、個体で必ず作用を示すべきであり、コード配列とインフレーム(in frame)になければならない。一般プロモーターは、構成的または誘導性でありうる。原核細胞にはlac、tac、T3及びT7プロモーターがあるが、これに制限されない。真核細胞には猿ウイルス4

10

20

30

40

50

0 (SV40)、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、例えばHIVの長い末端反復部(LTR)プロモーター、モロニー(moloney)ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus, CMV)プロモーター、エプスタインバーウイルス(epstein barr virus, EBV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(rous sarcoma virus, RSV)プロモーターだけでなく、ヒト - アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ヒトメタロチオネイン(metallothionein)由来のプロモーターがあるが、これに制限されない。前記発現ベクターは、ベクターを含有する宿主細胞を選択するための選択マーカーを含むことができる。選択マーカーはベクターで形質感染された細胞を選別するためのもので、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性または表面タンパク質の発現のような選択可能表現型を付与するマーカーが使用されることができる。選択剤が処理された環境で選別マーカーを発現する細胞だけ生存するので、形質感染された細胞が選別可能である。また、ベクターは、複製可能な発現ベクターである場合、複製が開始される特定核酸配列である複製原点(replication origin)を含むことができる。組換え発現ベクターでは、プラスミド、ウイルス、コスミド(cosmids)等様々な形態のベクターを使用することができる。組換えベクターの種類は、原核細胞及び真核細胞の種々の宿主細胞で所望の遺伝子を発現して所望のタンパク質を生産する機能をする限り特に限定されないが、強力な活性を示すプロモーターと強い発現力を保有しながら自然状態と類似した形態の外來タンパク質を大量生産できるベクターが好ましい。

10

20

【0083】

本発明に係る抗体またはこれの断片を発現させるために種々の発現宿主/ベクターの組合せが利用されることができる。核細胞宿主に適した発現ベクターとしては、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス及びレトロウイルスから由来した現調節配列などが使用されるが、これに限定されない。細菌宿主に使用できる発現ベクターには、pET、pRSETR、pBluescript、pGEX2T、pUCベクター、colE1、pCR1、pBR322、pMB9及びこれらの誘導体のように大腸菌(*Escherichia coli*)で得られる細菌性プラスミド、RP4のようにより広い宿主範囲を有するプラスミド、gt10とgt11、NM989のような非常に多様なファージラムダ(phage lambda)誘導体で例示することができるファージDNA、及びM13とフィラメント性一本鎖のDNAファージのようなその他のDNAファージが含まれる。酵母細胞に有用な発現ベクターは、2プラスミド及びその誘導体である。昆虫細胞に有用なベクターはpVL941である。

30

【0084】

前記組換えベクターは、宿主細胞に挿入されて形質感染体を形成するが、適切な宿主細胞は大腸菌、バチルス・ズブチルス(*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス属(*Streptomyces* sp.)、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)、プロテウス・ミラビリス(*Proteus mirabilis*)またはスタフィロコッカス属(*Staphylococcus* sp.)のような原核細胞であってもよい。また、アスペルギルス属(*Aspergillus* sp.)のような真菌、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)、サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces* sp.)及びニューロスポラ・クラッサのような酵母、その他の下等真核細胞、昆虫から由来した細胞のような高等真核生物の細胞のような真核細胞であってもよい。

40

【0085】

前記宿主細胞は、好ましくは植物、ほ乳動物から由来されるが、猿腎臓細胞(COS7)、NSO細胞、SP2/0、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、W138、子ハムスター腎臓(BHK)細胞、MDCK、骨髓腫細胞株、HuT78細胞及びHEK

50

293細胞などが利用可能であるが、これに限定されない。特に好ましくはCHO細胞である。

本発明で宿主細胞での「形質感染」または「形質転換」は、核酸を有機体、細胞、組織または器官に導入するいずれの方法が含まれて、当分野で公示された通り、宿主細胞により適した標準技術を選択して行うことができる。このような方法には電気衝撃遺伝子伝達法(electroporation)、原形質融合、リン酸カルシウム(CaPO₄)沈殿、塩化カルシウム(CaCl₂)沈殿、シリコンカーバイド繊維を利用した攪はん、アグロバクテリアが媒介された形質感染、PEG、デキストランサルフェート、リポフェクタミン及び乾燥/抑制媒介された形質感染方法などが含まれるが、これに制限されない。

10

【0086】

組換えベクターが発現する形質感染体を栄養培地で培養することによって、本発明に係るFcRn特異的抗体を大量生産できて、培地と培養条件は、宿主細胞により慣用できるものを適当に選択利用することができる。培養時細胞の生育とタンパク質の大量生産に適するように温度、培地のpH及び培養時間などの条件を適切に調節することができる。前記通り組換え的に生産された抗体または抗体断片は、培地または細胞分解物から回収できて、通常の生化学分離技術によって分離、精製が可能である(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deuschler, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press, Inc., San Diego, CA(1990))。例示的に、電気泳動、遠心分離、ゲルろ過、沈殿、透析、クロマトグラフィー(イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、免疫吸着クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど)、エレクトロフォーカシング及びこれの様々な変化及び複合方法などが利用可能であるが、これに限定されず、特にプロテインA(Protein A)を利用して分離、精製することが好ましい。

20

【0087】

本発明で選別された抗体がpH7.4条件でそれぞれ約300pM以下と約2nM以下の抗原結合力(KD値)を示し、pH6.0条件ではそれぞれ200pM以下と900pM以下のKD値を示した。このように本発明で選別された抗体は、pH6.0とpH7.4条件で共に0.01~2nMレベルの強いhFcRn結合力を有していて、細胞外部で結合した抗体がエンドソームまで結合を維持することで、抗体とhFcRnとの結合を抑制する効果が優れると判断される。また、このような抗体及びhFcRn結合抑制効果は、ヒトFcRnを発現する細胞株とFACSを利用した抑制能分析でも確認された。

30

【実施例】

【0088】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業者において通常の知識を有する者にとって自明である。

40

【0089】

[実施例1] 形質転換ラットを利用した抗FcRn抗体発現ライブラリー製作

計6匹の形質転換ラット(OmniRat(登録商標)、OMT社)を使用して免疫(Immunization)を行った。免疫原は、ヒトFcRnを使用した。ラットの両側足の裏に0.0075mgずつヒトFcRnを補強剤と共に24日間3日間隔で8回免疫して28日目に最後に5~10µgの免疫原をPBSバッファーに希釈して免疫した。28日目にラット血清を取って抗体価(antibody titer)確認に使用した。31日にラットを安楽死させて膝窩リンパ節(popliteal lymph node)と鼠径リンパ節(inguinal lymph node)をP3X63/AG8.653骨髓腫細胞と融合するために回収した。

50

【0090】

ラット血清上の抗体価を測定するために、ELISA分析を実施した。まず、ヒトFcRnをPBS (pH6.0またはpH7.4)バッファーで希釈して2 μ g/mLの溶液を作った後、96well plateに100 μ Lずつ附着 (coating) した後、4で18時間以上放置した。洗浄 (washing) バッファー (0.05% Tween 20 in PBS) 300 μ Lで3回洗浄して結合しなかったヒトFcRnを除去した後、各wellにblockingバッファー200 μ Lを入れて常温で2時間放置 (incubation) した。分析血清サンプルを1/100に希釈した後、この溶液を2倍連続希釈して計10個の希釈倍率 (1/100~1/256, 000) の分析試料を作った。Blocking後、洗浄バッファー300 μ Lで3回洗浄した後、分析試料を入れて常温で2時間放置した。3回洗浄後、2次測定抗体をPBSバッファーに1:50, 000になるよう希釈してwellに100 μ Lずつ入れて常温で2時間放置した。さらに3回洗浄した後、TMB溶液を100 μ Lずつ入れて常温で10分間反応させた後、1Mの含硫酸 (sulfuric acid) 反応停止液 (stop solution) 50 μ Lを入れて反応を終了させた後、マイクロプレートリーダー (microplate reader) で450nmのOD値を測定した。免疫による抗hFcRn IgG役価は、多くは1/100希釈条件でOD450nm値が1.0以上で免疫しなかったラットの血清に比べて高く測定されて免疫が良好にできたことを確認した。

10

【0091】

ポリエチレングリコールを使用して融合した計3個のハイブリドーマライブラリーA、B、Cを作った。まず形質転換ラット1と5を使用してハイブリドーマライブラリーAを作って、ラット2と6を使用してハイブリドーマライブラリーBを、ラット3と4を利用してハイブリドーマライブラリーCを作った。各ハイブリドーマライブラリー製作のための融合混合液は、7日間HATが含まれた培地で培養して、HATによって融合した細胞だけ選別されるようにした。HAT培地で生き残ったハイブリドーマ細胞は集めてHT培地で6日程度培養した後、上澄み液を取ってラットIgG ELISAキット (RD-biotech社) を利用したラットIgGの定量を測定した。まず、各試料を1:100に希釈してELISA plate wellに100 μ Lずつ入れて、ペルオキシダーゼ (peroxidase) が標識 (conjugation) された抗ラットIgGと混ぜた後、15分常温で反応させた。TMB溶液を100 μ Lずつ入れて常温で10分間反応させた後、1Mの含硫酸反応停止液50 μ Lを入れて反応を終了させた後、マイクロプレートリーダーで450nmでOD値を測定した。

20

30

【0092】

[実施例2] ハイブリドーマライブラリーの抗hFcRn抗体の抗原結合力及びIgG結合妨害能力評価

ヒトFcRnに対する抗体結合力を分析するために前記方法と同じELISA分析 (pH6.0とpH7.4) を実施した。3種のハイブリドーマライブラリー (A、B、C) のhFcRn結合能力評価結果は、pH6.0の条件とpH7.4の条件共にA>C>Bライブラリー順であった。

【0093】

3種のハイブリドーマライブラリー培養上澄み液を利用して5ng/mL、25ng/mLでFACSを利用したhFcRn結合能力評価をpH6.0とpH7.4で行った。ヒトFcRn発現安定化HEK293細胞をフラスコから剥ぎ取った後、反応溶液 (0.05% BSA in PBS, pH6.0 or pH7.4) に混合した。2 \times 10⁶ cells/mLの細胞数になるべく希釈した後、50 μ Lずつ96wellに入れて、これに10ng/mLと50ng/mLに希釈したハイブリドーマライブラリー培養上澄み液を50 μ Lずつwellに入れて混合して抗体を結合させた。A488 rabbit anti-rIgG goat Abを1:200で反応溶液に希釈して100 μ Lずつwellに分注して細胞ペレットに混合して結合反応を進めた後、反応溶液150 μ Lを入れてFACS (BD) で測定判読した。ELISA結果と同様にハイブリドーマ

40

50

イブラリー A が最も抗原結合力 (binding affinity) が高いことを確認することができた。

【0094】

FACS を利用したハイブリドーマライブラリーのヒト FcRn 抑制能評価は、pH 6.0 で実施した。まず、naive HEK293 細胞とヒト FcRn と発現 HEK293 細胞を反応溶液 (0.05% BSA in PBS, pH 6.0) に混合した。1 x 10⁵ 細胞を 96 well に入れた後、それぞれのハイブリドーマライブラリー培養上澄み液は、4 nM とこれを 10 倍に希釈した 0.4 nM 濃度を処理した。hIgG 結合抑制能の可否を確認するために、100 nM A488-hIgG1 を各 well に添加した後、氷で 90 分間反応させた。反応が終わると、反応溶液 100 μL を入れて細胞ペレットを洗浄して、U 字型底試験管に移した後、FACS で測定判読した。ヒト FcRn と発現安定化細胞に 100 nM A488-hIgG1 が残っている量を測定した後、結合抑制能 (%) を求めた。基準対照群 (isotype control) で hIgG1 を使用して、陽性対照群で以前に開発した HL161-1Ag 抗体を使用して抗体結合抑制能を比較評価した。各対照群は、1 μM と 2 μM の濃度で分析して、ハイブリドーマライブラリー試料は、0.4 nM と 4 nM の二つの濃度で測定した。その結果、ハイブリドーマライブラリー A が最も高い結合抑制能効果を示すことを確認した。

10

【0095】

[実施例 3] FACS を利用したハイブリドーマ細胞クローン分離及びヒト抗体確保

最も高いヒト FcRn 結合力と抑制能を示したハイブリドーマライブラリー A を使用して FACS でクローンを分離して計 442 個の単クローンを確保した。再び分離した単クローンを HT 培地で培養後、上澄み液を得て FACS で hFcRn に結合する抗体発現ハイブリドーマクローンを選別した結果、100 個のクローン (M1 ~ M100) が hFcRn 発現 HEK293 細胞に強く結合することを確認することができた。

20

【0096】

FACS 分析を介して選別された 100 個の single クローンの RNA を分離して、シーケンスを分析した。1 次シーケンス分析結果、100 個中 88 個のシーケンスが分析されて、これをアミノ酸配列を基準に計 35 個のグループ (G1 ~ G38) に分けた。培養液を確保することができなかった 2 個のクローン (G33、G35) を除いて 33 個のグループの代表クローンの培養上澄み液を 100 ng/mL 濃度に希釈して hFcRn に対する結合力を ELISA で評価した。

30

【0097】

前の実験と同じに FACS を利用した hFcRn 結合力評価を pH 6.0 と 7.4 条件で実施した。クローン間結合力程度による順位は、pH 別に類似して分析されて、結合強度 (intensity) は様々なレベルで示された。

【0098】

また、前記 33 個のクローンに対する pH 6.0 で hFcRn 抑制能評価を FACS を利用して分析した。測定された MFI 値に基づいて抑制能 (%) を算出した。1667 pM 濃度で抑制能分析結果値を基に計 4 個のグループに分けて、70 ~ 100% であるグループを A、30 ~ 70% であるグループを B、10 ~ 30% であるグループを C、10% 以下であるグループを D と定めた。

40

【0099】

SPR を利用したハイブリドーマクローンのキネティック分析は、ヒト FcRn を固定化した後、ハイブリドーマ培養液を分析試料として使用して進めた。いくつかのクローンを除いた多くのクローンは、10⁶ M 以上の k_{on} 値を示し、k_{off} 値は 10⁻³ M 以下で測定された。結論的に、全てのクローンが、10⁻⁹ ~ 10⁻¹¹ M の KD 値を有することが確認された。

【0100】

35 種のハイブリドーマクローン中 hFcRn 抑制能結果に応じて分けた A と B グループの抗体配列中 CDR シーケンス部位に N-glycosylation または free

50

cysteineが存在しない18種クローンの遺伝子を完全な形態のヒトIgG配列に転換した。

【0101】

まず18種の選別された抗体VHとVLとヒト抗体生殖細胞系列(germline)抗体群のアミノ酸配列相同性をNCBIのウェブページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)のIgBLASTプログラムを利用して調べた。

【0102】

18種のヒト抗体遺伝子をクローニングするために、遺伝子両端に次の通り制限酵素認識部位を挿入した。重鎖可変領域(VH)にはEcoRI/ApaI、軽鎖ラムダ可変領域(VL())にはEcoRI/XhoIを軽鎖カッパ可変領域(VL())にはEcoRI/NheI制限酵素認識部位を入れて設計して、軽鎖可変領域(VL)の場合、遺伝子クローニング時、軽鎖ラムダ可変(VL())遺伝子配列は、ヒト軽鎖不変(LC() constant region)遺伝子、そして軽鎖カッパ可変(VL())遺伝子配列は、ヒト軽鎖不変(LC() constant region)遺伝子に連結した。

10

【0103】

動物細胞で抗体発現のためのpCHO1.0発現ベクタークローニングは、軽鎖と重鎖遺伝子をEcoRV、PacI、AvrIIそしてBstZ17I制限酵素で切断して、それぞれ挿入した。計18種の確認されたヒト抗体遺伝子を含むpCHO1.0発現ベクターは、合成遺伝子配列と一致するかを確認するために、遺伝子塩基配列分析(DNA sequencing)を行った。

20

【0104】

発現用pCHO1.0ベクターには、抗体軽鎖と重鎖遺伝子を共に含む動物細胞発現システムとして完全なヒトIgG形態を発現した。ヒト抗体は、前記各抗体のプラスミドDNAをCHO-S細胞に一時的形質感染させて、培地で分泌された抗体をプロテインAカラムを利用して精製することによって収得した。

【0105】

hFcRnが発現するTg32(hFcRn+/+、h μ 2m+/+、mFcRn-/-、m μ 2m-/-)マウス(Jackson Laboratory)にヒトIgGを注射した後、前記ヒトIgG配列に転換した18種のヒト抗体を投与してヒトIgGの異化作用に影響を与えるかを調べてみた。

30

【0106】

先述の抗原に対する結合力(KD)とFACSを利用したヒトFcRn結合力及び抑制能分析等のin vitro分析結果とTg32マウスを利用したin vivoヒトIgGの異化作用に最も効果的に作用した4種のヒト抗FcRn抗体、HL161A、HL161B、HL161C、そしてHL161D抗体タンパク質を確保した(図1)。また、HL161B抗体の重鎖可変フレームワーク(Framework)領域83番目Asparagine(N)をLysine(K)に置き換えてN-glycosylation siteを除去したHL161BK抗体を確保した。これらのそれぞれの軽鎖と重鎖可変領域の遺伝子塩基配列とアミノ酸配列及びCDR配列は下記の表1、2、3のとおりである。

40

【0107】

【表 1】

選別されたヒトFcRn抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のポリヌクレオチド配列

抗体名	重鎖可変領域配列		軽鎖可変領域配列			
	配列番号	ポリヌクレオチド配列	配列番号	ポリヌクレオチド配列		
HL161A	1	GAAGTGCAGC TGCTGGAATC	11	TCTTACGTGC TGACCCAGCC	10	
		CGGCGGAGGC CTGGTGCAGC		CCCCTCCGTG TCTGTGGCTC		
		CTGGCGGCTC TCTGAGACTG		CTGGCCAGAC CGCCAGAATC		
		TCCTGCGCCG CCTCCGAGTT		ACCTGTGGCG GCAACAACAT		
		CACCTTCGGC AGCTGCGTGA		CGGCTCCACC TCCGTGCACT		
		TGACCTGGGT CCGACAGGCT		GGTATCAGCA GAAGCCCGGC		
		CCCGCAAGG GCCTGGAATG		CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT		
		GGTGTCCGTG ATCTCCGGCT		GCACGACGAC TCCGACCGGC		
		CCGGCGGCTC CACCTACTAC		CTTCTGGCAT CCCTGAGCGG		
		GCCGACTCTG TGAAGGGCCG		TTCTCCGGCT CCAACTCCGG		
		GTTCAACATC TCCCGGACA		CAACACCGCC ACCCTGACCA		
		ACTCCAAGAA CACCCTGTAC		TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC		
		CTGCAGATGA ACTCCCTGCG		GACGAGGCCG ACTACTACTG		
		GGCCGAGGAC ACCGCCGTGT		CCAAGTGC GA GACTCCTCCT		20
		ACTACTGCGC CAAGACCCCC		CCGACCACGT GATCTTCGGC		
		TGGTGGCTGC GGTCCCCTT		GGAGGCACCA AGCTGACCGT		
		CTTCGATTAC TGGGGCCAGG		GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG		
		GCACCCTGGT GACAGTGTCC		CTCCCTCCGT GACCCTG		
		TCC				
		HL161B		3		CAACTGTTGC TCCAGGAATC
CGGTCTTGGT CTTGTAAAGC	CCCCTCCGTG TCCGTGGCTC					
CATCTGAGAC TCTCTCCCTT	CTGGCCAGAC CGCCAGAATC					
ACCTGTACCG TTAGCGGAGG	ACCTGTGGCG GCAACAACAT					
AAGTCTTTCC TCAAGCTTCT	CGGCTCCAAG TCCGTGCACT					
CCTACTGGGT GTGGATCAGA	GGTATCAGCA GAAGCCCGGC					
CAGCCTCCCG GAAAAGGGTT	CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT					
GGAGTGGATT GGCACAATAT	GTACGACGAC TCCGACCGGC					
ACTACTCCGG CAACACTTAC	CCTCTGGCAT CCCTGAGCGG					
TATAACCCCA GCCTGAAGAG	TTCTCCGCCT CCAACTCCGG					
CAGGCTGACT ATCTCTGTCG	CAACACCGCC ACCCTGACCA					
ACACCAGTAA AAATCACTTT	TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC					
TCTCTGAATC TGTCTTCAGT	GACGAGGCCG ACTACTACTG					
GACCGCAGCC GACACCGCCG	CCAAGTGTGG GACTCCTCCT		40			
TGTATTATTG CGCTCGGCGC	CCGACCACGT GGTGTTCCGGC					
GCCGGGATTC TGACAGGCTA	GGAGGCACCA AGCTGACCGT					
TCTGGATTCA TGGGGCCAGG	GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG					
GGACATTGGT TACAGTGTCT	CTCCCTCCGT GACCCTG					
AGT						

HL161D	9	CAGCTGCAGT TGCAGGAGTC AGGCCCCGGT TTGGTTAAGC CTTCTGAAAC CCTTCTCTC ACATGCACAG TATCCGGTGG CTCCATCTCC AGTTCAAGTT ACTACTGGGG ATGGATCCGG CAACCCCCAG GAAAAGGGCT GGAGTGGATT GGCAATATAT ATTACTCTGG GTCCACCTAT TACAACCCTT CCCTGATGAG TAGAGTGACC ATCAGCGTGG ACACAAGCAA AAACCAATTC AGCCTGAAGC TTTCTAGCGT GACCGCTGCC GACACAGCTG TCTATTACTG TGCCCGCCAG CTTAGTTATA ACTGGAATGA TAGGCTGTTT GATTACTGGG GCCAGGGGAC TCTCGTTACA GTCAGCAGC	19	AGCTATGAGC TGACCCAGCC TCTGAGCGTA TCTGTCGCTC TCGGCCAGAC AGCCAGAATT ACCTGTGGCG GCAATAACAT AGGATCCAAA AATGTTCACT GGTATCAGCA AAAACCTGGC CAAGCTCCCG TGCTCGTGAT CTACCGGGAC TCTAACCGAC CCAGTGAAT CCCCGAACGC TTTAGCGGTT CCAACTCTGG AAATACAGCT ACTCTGACTA TCTCCAGGGC TCAGGCCGGG GATGAGGCCG ATTACTACTG CCAGGTGTGG GACTCAAGCA CAGTGGTCTT CGGCGGAGGT ACCAAGTTGA CTGTTCTTGG GCAGCCAAAG GCCGCACCTT CAGTGACCCT G
--------	---	--	----	--

10

20

【 0 1 0 8 】

【表 2】

選別されたヒトFcRn抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列

抗体名	重鎖可変領域配列		軽鎖可変領域配列	
	配列番号	アミノ酸配列	配列番号	アミノ酸配列
HL161A	2	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASEFTFG SCVMTWVRQA PGKGLEWVSV ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKTP WWLRSPFFDY WGQGTLTVSS	12	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGST SVHWYQQKPG QAPVLVHDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVR DSSSDHVIFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161B	4	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSL SFSYVWVIR QPPGKLEWI GTIYYSNTY YNPSLKSRLT ISVDTSKNHF SLNLSVTAA DTAVYYCARR AGILTYGLDS WGQGTLTVSS	14	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFV GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161BK	6	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSL SFSYVWVIR QPPGKLEWI GTIYYSNTY YNPSLKSRLT ISVDTSKNHF SLKLSSVTAA DTAVYYCARR AGILTYGLDS WGQGTLTVSS	16	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFV GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161C	8	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GCYMHWVRQA PGQGLEWMGR INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MDLSRLRSDD TAVYYCARDY SGWSFDYWQG GTLTVSS	18	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQGIS NYLAWFQQKPG GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGTD FTLTISLQS EDFATYYCQQ YDSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFI
HL161D	10	QLQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SSSYYWVIR QPPGKLEWI GNIYYSNSTY YNPSLMSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCARQ LSYNWDRLF DYWGQGLTVT VSS	20	SYELTQPLSV SVALGQTARI TCGGNNIGSK NVHWYQQKPG QAPVLVIYRD SNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRAQAG DEADYYCQVW DSSTVVFVGG TKLTVLGQPK AAPSVTL

10

20

30

【 0 1 0 9 】

40

【表 3】

選別されたヒト FcRn 抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の CDR 配列

抗体	重鎖可変領域 CDR			軽鎖可変領域 CDR		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
配列番号	21	22	23	24	25	26
HL161A	SCVMT	VISGSGGST YYADSVKG	TPWLLRSPF FDY	GGNNIGSTS VH	DDSDRPS	VRDSSSDHV I
配列番号	27	28	29	30	31	32
HL161B (HL161BK)	FSYWV	TIYYSGNTY YNPSLKS	RAGILTGYL DS	GGNNIGSKS VH	DDSDRPS	QVWSSSDH VV
配列番号	33	34	35	36	37	38
HL161C	GCYMH	RINPNSGGT NYAQKFQG	DYSGWSFDY	RASQGISNY LA	AASSLQS	QQYDSYPPT F
配列番号	39	40	41	42	43	44
HL161D	SYWVG	NIYYSGSTY YNPSLMS	QLSYNWDR LFDY	GGNNIGSKN VH	RDSNRPS	QVWDSSTVV

10

20

【0110】

[実施例 4] HL161A / HL161B / HL161C / HL161D の SPR を介した抗体の抗原結合力測定

SPR を介した HL161A、HL161B、HL161C、及び HL161D 抗体の結合力は、水溶性 hFcRn をリガンドで Proteon GLC chip (Bio-Rad) に固定化して親和度を測定する方法で進めた。キネティック分析は、Proteon XPR36 装置を使用して、shFcRn を GLC chip に固定化させて、抗体試料を 5 濃度で反応させた後、センソグラム (sensogram) 結果を確保した。キネティック分析は 1:1 Langmuir binding model を適用して、pH 6.0、pH 7.4 の各条件で 6 回繰り返し分析して、平均 KD 値を求めた。固定化段階により、活性化 (activation) は、EDAC / NHS 0.5X、30 μ L / min、300 sec の条件で chip 活性化を進めた後、固定化は、アセテートバッファー (pH 5.5) を使用して shFcRn を 2 μ g / mL、250 μ L で製造して 30 μ L / min で流しながら固定化レベル 200 ~ 300 RU に該当する時、反応を中止した。以後、非活性化は、エタノールアミン (ethanolamine) を使用して 30 μ L / min、300 sec で進めた。各 HL161 抗体は、10 nM 濃度を基準に 5 nM、2.5 nM、1.25 nM、0.625 nM、0.312 nM など 1/2 ずつ段階希釈して試料を準備した。試料希釈は、分析 pH により 1X PBST (pH 7.4) または、1X PBST (pH 6.0) バッファーを使用して進めた。試料分析条件は、結合は 50 μ L / min、200 sec で反応させて、解離段階は、50 μ L / min、600 sec で進めた後、グリシン (glycine) バッファー (pH 2.5) を使用して 100 μ L / min、18 sec で反応させて再生 (regeneration) した。試料当たり 6 回キネティック分析後、平均抗原結合力 (KD) を測定した。SPR 分析結果として出てきた抗体のキネティックパラメーター (kinetic parameter) は表 4 に示した (図 2A ~ 図 2H)。

30

40

【0111】

【表4】

ヒトFcRn固定化SPR利用抗体キネティック分析結果

抗体	pH6.0			pH7.4		
	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
HL161A	1.81×10^6	3.26×10^{-4}	1.80×10^{-10}	1.32×10^6	3.27×10^{-4}	2.47×10^{-10}
HL161B	9.12×10^5	7.35×10^{-4}	8.07×10^{-10}	7.10×10^5	1.25×10^{-3}	1.76×10^{-9}
HL161C	1.74×10^6	3.32×10^{-4}	1.91×10^{-10}	1.36×10^6	3.16×10^{-4}	2.32×10^{-10}
HL161D	9.70×10^5	1.38×10^{-3}	1.43×10^{-9}	6.99×10^5	1.24×10^{-3}	1.78×10^{-9}
hIgG1	3.2×10^5	4.6×10^{-4}	1.4×10^{-9}	No binding	No binding	No binding

10

【0112】

[実施例5] HL161A / HL161BのFACSを利用した抗体のヒトFcRn結合分析

ヒトFcRnを発現するHEK293安定化細胞を対象にFcRnに対するpH別結合程度をFACSシステムを使用して分析した。FACSを利用したFcRn結合試験は、評価しようとするpHにより反応溶液をpH6.0とpH7.4の条件で実施した。まず100,000個のヒトFcRn安定化HEK293cellをPBSバッファで洗浄して、卓上用マイクロ遠心分離機で4500rpmで5分間遠心分離して細胞ペレットを作った。pH6.0またはpH7.4 PBS / 10mM EDTA 100μLに抗体を添加した。残っている細胞ペレットに反応溶液を入れて混合して細胞計数(cell counting)を行った。細胞懸濁液10μLをslideに入れてTC10機器で細胞数を計数して、 2×10^6 cell/mLになるべく反応溶液で希釈した。各抗体試料は、500nMに希釈した後、pH6.0分析の場合、96well v-bottom plateから20nMに希釈して50μLずつを取って各wellに分注した。pH7.4分析の場合、500nM抗体試料を3倍連続希釈法(3 fold serial dilution)で希釈して最終250nMから0.11nM濃度区間で分析した。 2×10^6 cell/mLに希釈された細胞を50μLずつ入れて混合した。プレート(plate)は、4に設置されたrotatorに定着させて15度角度、10rpmで90分間回転させた。反応が終わると、プレートを取り出して2000rpmで10分間遠心分離させて、上澄み液を除去した。A488 anti-hIgG Goat Abを1:200で反応溶液に希釈して100μLずつwellに分注して混合した。再びプレートは4に設置されたrotatorに定着させて15度角度、10rpmで90分間回転させた。反応が終わると、プレートを取り出して2000rpmで10分間遠心分離させて、上澄み液を除去した。この洗浄過程を再度進めた後、反応溶液100μLを入れて細胞ペレットを解いてblue test tubeに移した。ここに反応溶液200μLを添加した後、FACSで測定判読した。FACS測定条件は、FS 108 volts、SS 426 volts、FL1 324 volts、FL2 300 voltsである。これらの細胞は、BD FACSDivaTM v6.1.3ソフト(BD Bioscience)を利用したFACSで分析された。結果は、平均蛍光強度(Mean Fluorescence Intensity: MFI)として表示された(図3)。HL161AとHL161B抗体は、10nM濃度、pH6.0の条件でそれぞれ10.59と8.34のMFI値を示して、pH7.4の条件の0.11~250nM濃度区間では、MFI値を利用した4因子ロジスティック回帰分析(4 parameter logistic regression)を介してEC50(Effective Concentration 50%)値を分析した結果、それぞれ2.46nMと1.20nM値を示した。

20

30

40

【0113】

[実施例6] HL161A / HL161BのFACSを利用した抗体の抑制能機能分析

50

細胞表面ヒトFcRnに対する結合能分析を進めた2種の抗体を細胞表面にhFcRnが発現するHEK293細胞に処理して、Alexa-Fluor-488蛍光標識されたhIgG1の結合が減少することで、抗体の抑制能効果を確認した。分析過程を詳しく説明すると次のとおりである。

【0114】

Naive HEK293 cellとヒトFcRnと発現安定化HEK293細胞にそれぞれ1 x TE 2 mLを入れて、37、5%CO2培養器で1分間放置した。フラスコから細胞を回収した後、pH6.0の反応溶液8 mLを入れて混合して50 mL conical tubeに移した。2000 rpmで5分間遠心分離して上澄み液を除去して、それぞれの細胞ペレットにpH6.0反応溶液を1 mLずつ入れて混合した後、新しい1.5 mL Eppendorf tubeに移した。再び4000 rpmで5分間遠心分離した後、上澄み液を除去して、残った細胞ペレットにpH6.0反応溶液を添加して混合した細胞懸濁液の細胞数を計測した。最終的に細胞懸濁液を2.5 x 10⁶ cell/mLになるべく反応溶液で希釈した。

10

【0115】

各抗体試料は、400 nMに希釈した後、96 well v-bottom plateで4倍連続希釈法を行った。最終分析濃度が、200 nMから0.01 nMになるべく希釈した試料を各wellに50 μLずつ分注した。これに1 μMでpH6.0の反応溶液に希釈されたAlex488-hIgG1 10 μLずつを分注した。最後に2.5 x 10⁶ cell/mLに希釈された細胞を40 μLずつ入れて混合した。プレートは、4に設置されたrotatorに定着させて15度角度、10 rpmで90分間回転させた。反応が終わると、プレートを取り出して2000 rpmで10分間遠心分離して、上澄み液を除去した。反応溶液100 μLを入れて細胞ペレットを解いてblue test tubeに移した後、反応溶液200 μLを添加してFACSで測定判読した。FACS測定条件は、FS 108 volts、SS 426 volts、FL1 324 volts、FL2 300 voltsである。これらの細胞は、BD FACS DivaTM v6.1.3ソフト(BD Bioscience)を利用したFACSで分析された。結果は、平均蛍光強度(MFI)として表示された。実験群のMFIは、細胞だけを介して測定されたMFI値(background signal)を引いた後、処理した。対照チューブ(Alexa Fluor 488単独、そして競合因子なし)のMFIを100%に換算して競合因子を含むチューブのMFIの百分率を換算した。

20

30

【0116】

【数1】

$$\text{Blocking (\%)} = \left\{ \frac{\text{MFI of hFcRn stable (Competitor + A488-hIgG1)} - \text{MFI of HEK293 (A488-hIgG1)}}{\text{MFI of hFcRn stable (A488-hIgG1)} - \text{MFI of HEK293 (A488-hIgG1)}} \right\} \times 100$$

【0117】

ヒトIgG1の競合因子含むチューブのMFIより低い場合、競合抗体の競合率が高いと判断して、pH6.0の条件、0.01~200 nM濃度区間でHL161AとHL161B抗体の抑制能測定値(%)を利用して4因子ロジスティック回帰分析を実施した。結果的に、HL161AとHL161B抗体のIC50(Inhibitory Concentration 50%)値は、それぞれ0.92 nMと2.24 nM値を示した(図4)。

40

【0118】

[実施例7] mFcRn-/-hFCRN形質転換32(Tg32)マウスでHL161A/HL161Bの効力試験

ヒトFcRnが発現するTg32マウス(Jackson Laboratory)にヒトIgGを注射した後、HL161AとHL161B及びヒトIgGを投与して、ヒト

50

IgGの異化作用に影響を与えるかを調べてみた。

【0119】

HL161AとHL161B抗体とヒトIgG (Greencross, IVglobulinS)を5、10、そして20mg/kg容量で4日投与のために分注して保管して、伝達体と20mg/kg IgG1対照物質としてpH7.4のPBSバッファーを使用した。ヒトFcRn Tg32マウスは、約7日間適応させて使用して、水と飼料は自由に摂取するようにし、温度(23±2)、湿度(55±5%)及び明暗周期(12時間)は、自動調節できるようにした。各群ごとに4匹で実験を進行した。ヒトIgGを追跡物質として使用するために、Biotinが接合されたhIgGをkit (Pierce, Cat. 21327)を使用して製造した。0時間に5mg/kgのbiotin-hIgGと495mg/kgのヒトIgGを腹腔投与して体内のIgGを飽和させた。薬物の投与は、biotin-IgGの投与後、24、48、72、96時間後に、5、10そして20mg/kgの容量で1日1回腹腔注射した。採血は、フォラン液 (foran soln.) (Isoflurane, JW pharmaceutical)を利用して軽く麻酔させた後、ヘパリン処理されたマイクロ-ヘマトクリトチューブ (Heparinized Micro-hematocrit capillary tube, Fisher)を使用して、眼窩静脈叢で採血を行った。biotin-IgGの投与後、24、48、72、96、120、168時間後に行って、24、48、72、96時間には採血後薬物を投与した。0.1mLの全血をEppendorf tubeに受けた後、直ちに遠心分離機で血しょうを分離して分析前までディープフリーザー (deep freezer, Thermo)に-70の状態

10

20

【0120】

採血された血液中biotin-hIgG1量は次のとおりELISA法によって分析された。96 well plate (Costar, Cat. No: 2592)に1.0µg/ml濃度になるべく100µLニュートラアビジン (Neutravidin, Pierce, 31000)を注入した後、4で16時間固定化した。バッファーA (0.05% Tween-20, 10mM PBS, pH7.4)を利用して3回プレートを洗浄後、1% BSAが含まれたPBS (pH7.4)溶液で2時間常温で反応させた。バッファーAを利用して3回プレートを洗浄した後、1µg/mlに該当するように0.5% BSAが含まれたPBS (pH7.4)溶液でニュートラアビジンプレートを製造した。各wellにバッファーB (100mM MES, 150mM NaCl, 0.5% BSA IgG-free, 0.05% Tween-20, pH6.0)を利用して血液試料を500倍から1000倍の範囲に順次希釈を進めて、各150µLずつプレートに注入した。注入された試料は、常温で1時間反応させた。バッファーAを利用して3回プレートを洗浄した後、HRPが接合された抗ヒトIgGヤギ抗体を1nMで製造した後、200µLずつ注入して37で2時間反応させた。氷を利用して冷却されたバッファーBを使用して3回プレートを洗浄後、基質溶液である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (tetramethylbenzidine, RnD, Cat. No: DY999)を100µL注入した後、常温で15分反応させた。1.0M硫酸溶液 (Samchun chemical, Cat. No: S2129)50µLを注入して反応を中止した後、450nmで吸光度を測定した。

30

40

【0121】

24時間 (マウスでbiotin-IgGの概略的なTmaxでありながら、biotin-IgGの異化作用が起きる前の時間)経過後のbiotin-IgGの濃度を100%に固定して、残りの時間の濃度を%で表示した結果は、図10に図示されている。分析結果、伝達体群と20mg/kg IgG1対照物質の半減期は、それぞれ103時間と118時間であった。一方、先のin vitro分析上でヒトFcRn結合力及び抑制能が優れて、ヒトFcRn形質転換Tg32マウスで最も速いIgG異化作用を示したHL161A抗体の血液内IgG半減期は、容量別にそれぞれ30、23、そして18時間であった。それだけでなく、HL161B抗体も容量別にそれぞれ41、22、そして

50

21時間のIgG半減期を示した。これにより、hFcRnにpH非依存的、Fc非競合的な抗体が、内因性抗体の異化作用増加に効力があることを確認した(図5A及び図5B)。

【0122】

[実施例8] 猿でHL161A/HL161Bの効力試験

ヒトFcRnと96%相同性を有するシノモルグス猿を利用してHL161AとHL161B抗体投与による猿IgG、IgA、IgM、アルブミンレベルを確認して薬物動態学的(Pharmacokinetics, PK)プロファイルを確認した。

【0123】

1) 猿血液内IgG抗体変化量分析結果

まず、猿IgGは、ELISA分析を介して変化を測定した。96 well plate (Costar, Cat. No: 2592)に4.0 µg/mL濃度になるべく100 µL抗-ヒトIgG Fc抗体(Bethyl Lab, A80-104A)をローディングした後、4で16時間固定化した。洗浄溶液(0.05% Tween-20, 10 mM PBS, pH 7.4)を利用してプレートを3回洗浄した後、1% BSAが含まれたPBS (pH 7.4)溶液で2時間室温で反応させた。標準品である猿IgGは、3.9~500 ng/mL濃度、そして血液試料は1% BSAが含まれたPBS (pH 7.4)溶液を使用して80,000倍に希釈した後、プレートにローディングして室温で2時間反応させた。洗浄溶液を利用してプレートを3回洗浄した後、hIgGに対する抗体(Biorad, 201005)を20,000倍希に釈して100 µLをローディングして、室温で1時間反応させた。各プレートを洗浄後、基質溶液である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(tetramethylbenzidine, RnD, Cat. No: DY999)を100 µL注入して室温で7分反応させて、1.0 M 硫酸溶液(Samchun chemical, Cat. No: S2129)50 µLを注入して反応を中止した。分析結果は、450と540 nmの吸光度判読機(MD, モデル名: VersaMax)を利用して吸光度(OD)を測定した。結果的に、HL161AとHL161B抗体をシノモルグス猿に5、20 mg/kgの容量で週1回静脈投与した結果、猿IgGは投与容量により容量依存的に減少して、IgG-FcRn相互作用をHL161抗体が効果的に遮断することを確認した。5 mg/kgのHL161Aの場合、最大9日目に47.1%まで減少させて、20 mg/kgは、10日目に29.6%まで減少させた。HL161Bの5 mg/kgの場合、10日目に53.6%まで減少させて、20 mg/kgの場合は、9日目に31%まで減少させて、二つの抗体で類似する結果が確認された(表5と図6A~図6C)。また、HL161AとHL161Bの静脈投与による猿IgGの個体別変化を比較した結果、各個体別に非常に類似するように猿IgGが減少する傾向を示した。

【0124】

10

20

30

【表 5】

HL161AとHL161B投与による猿 IgGの変化 (%)

日	Vehicle	HL161A		HL161B	
		5 mg/kg	20 mg/kg	5 mg/kg	20 mg/kg
0 日	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
0.5 日	99.0±4.8	81.5±1.8	101.5±9.0	94.3±5.4	96.2±3.0
1 日	97.6±15.9	67.2±2.0	86.2±11.9	83.9±24.7	94.1±7.0
2 日	97.8±6.2	63.0±3.3	74.2±14	73.7±11.3	71.7±5.4
3 日	104.5±13.1	61.8±8.0	59.2±11.0	68.3±9.3	61.3±6.0
4 日	100.9±16.7	55.3±4.1	45.1±4.6	65.5±12.2	44.3±5.6
5 日	103.4±12.5	60.8±8.3	38.8±4.9	65.0±11.9	38.4±3.7
6 日	113.3±8.5	64.9±11.7	39.7±6.4	66.4±11.3	39.0±5.4
7 日	116.9±23.3	58.7±4.7	39.6±5.4	61.4±8.0	37.5±3.2
7.5 日	92.4±10.4	51.2±7.2	38.7±7.8	62.8±8.3	39.3±0.4
8 日	94.6±8.7	48.0±9.3	36.1±5.3	60.7±7.5	39.6±5.9
9 日	117.6±14.3	47.1±4.4	33.8±5.0	54.3±6.9	31.0±3.1
10 日	115.1±16.7	49.7±8.9	29.6±5.8	53.6±4.9	32.8±4.3
11 日	114.6±18.9	47.7±4.2	30.4±6.5	54.7±4.2	39.9±9.1
12 日	109.5±13.1	51.7±3.1	32.9±5.7	56.5±4.7	46.7±9.1
13 日	111.1±21.2	52.9±6.4	35.7±.2	58.7±3.8	45.4±7.6
14 日	128.9±17.7	54.7±4.2	37.8±9.6	60.6±4.2	53.8±11.3
17 日	95.6±6.6	59.5±10.3	40.2±7.4	56.7±4.4	48.4±10.0
20 日	92.5±8.4	62.4±6.7	47.6±8.9	61.8±6.0	54.0±9.5
23 日	107.1±15.2	71.9±6.5	61.8±13.3	64.9±4.4	56.8±6.0
26 日	104.0±5.6	77.7±6.8	72.2±22.4	70.8±7.4	62.4±5.8
29 日	102.4±8.3	81.4±6.7	77.9±20.5	74.8±5.1	65.4±10.8

10

20

30

40

50

【0125】

2) 猿血液内HL161A/HL161Bの薬物動態学的プロファイル(Pharmacokinetic profile)分析結果

HL161AとHL161Bの静脈投与後、経時的な血中薬物動態学的プロファイルは、競合的ELISA法を利用して分析した。まず、ニュートラアビジン(Neutralizing antibody) 2 µg/mLの溶液を作った後、96 well plateに100 µLずつ固定化(coating)した後、4 で18時間放置した。洗浄バッファー(0.05% Tween 20を含む10mM PBS, pH 7.4) 300 µLで3回洗浄した後、各wellに1% BSAが含まれたPBS (pH 7.4) 溶液で25 で2時間常温で反応させた。Biotin結合hFcRnをPBSで希釈して1 µg/mLの溶液を作った後、96 well plateに100 µLずつ分注した後、さらに25 で1

時間反応した。洗浄バッファー300 μ Lで3回洗浄して結合しなかったhFcRnを除去した後、基準試料(0.156~20ng/mL)を入れて25 $^{\circ}$ Cで2時間反応した。さらに洗浄バッファーで3回洗浄後、二次抗体(detection antibody)をPBSに1:10,000になるべく希釈してwellに100 μ Lずつ入れて25 $^{\circ}$ Cで1.5時間反応した。最後に3回洗浄した後、TMB溶液を100 μ Lずつ入れて常温で5分間反応させた後、1M硫酸反応停止液50 μ Lを入れて反応を終了させた後、吸光度判読機で450nmの吸光度を測定した。HL161A及びHL161Bの分析結果は表6のとおりであり、容量依存的に増加することを確認することができた。半減期(T_{1/2})は、約6日~12日と一般に知られた抗体の半減期に比べて短く、全体から見てHL161Aに比べてHL161Bが、半減期、AUC及びC_{max}が高く示された(図7A及び図7B)。

10

【0126】

【表6】

HL161AとHL161Bの容量別薬物動態学的プロファイル分析結果

Ab (Dose)	日	C _{max} (mg/ml)	AUC (mg/ml.hr)	T _{1/2} (時間)
HL161A (5 mg/kg)	0-7	157 ± 31	1,601 ± 501	6.9 ± 0.9
	7-14	157 ± 25	1,388 ± 334	10.3 ± 2.8
HL161A (20 mg/kg)	0-7	692 ± 138	13,947 ± 2,459	9.0 ± 0.6
	7-14	724 ± 125	12,699 ± 2,114	7.6 ± 1.6
HL161B (5 mg/kg)	0-7	178 ± 56	2,551 ± 1,356	7.9 ± 1.3
	7-14	187 ± 9	2,772 ± 466	9.4 ± 0.5
HL161B (20 mg/kg)	0-7	823 ± 38	21,867 ± 1,088	11.7 ± 1.0
	7-14	868 ± 66	16,116 ± 1,501	6.8 ± 0.9

20

【0127】

3) 猿血液内IgM及びIgA抗体変化量分析結果

猿血液内IgMとIgAを測定するためのELISA分析は、IgG測定のためのELISA法と類似するように行われた。まず、96 well plateに2.0 μ g/mL濃度になるべく100 μ L抗猿IgM抗体(Alpha Diagnostic, 70033)またはIgA抗体(Alpha Diagnostic, 70043)を分注した後、4 $^{\circ}$ Cで16時間固定化した。洗浄溶液(0.05% Tween-20を含む10mM PBS, pH7.4)を利用してプレートを3回洗浄した後、1%BSAが含まれたPBS(pH7.4)溶液で2時間室温で反応させた。標準品である猿IgMは、7.8~1,000ng/mL濃度区間、そしてIgAは、15.6~2,000ng/mL濃度区間で分析して、血液試料は、1%BSAが含まれたPBS(pH7.4)溶液を使用して10,000または20,000倍に希釈した後、各wellに添加して、室温で2時間反応させた。さらに洗浄溶液を利用してプレートを3回洗浄した後、猿IgMに対する二次抗体(Alpha Diagnostic, 70031)と猿IgAに対する二次抗体(KPL, 074-11-011)をそれぞれ5,000倍に希釈して100 μ Lを室温で1時間反応させた。最後に3回洗浄した後、基質溶液である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(tetramethylbenzidine, RnD, Cat.No: DY999)を100 μ Lを注入して室温で7分反応させて、1.0M硫酸溶液(Samchun chemical, Cat.No: S2129)50 μ Lを注入して反応を中止して、450、540nmの吸光度判読機(MD, モデル名: Versa Max)を利用して吸光度を測定した。

30

40

50

【0128】

4) 猿血液内アルブミン変化量分析結果

血液内猿アルブミン変化量分析は、商用化されたELISAキット(Assay pro, Cat. No: EKA2201-1)を利用して分析した。方法を簡単に要約すると、分析試料である猿血清を4,000倍に希釈した後、猿アルブミンと結合できる抗体が固定化された96well plateに25 μ Lずつ分注した。Biotinが結合した猿アルブミン溶液を25 μ L入れて混ぜて、25 で2時間反応した。洗浄バッファ200 μ Lで3回洗浄後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(streptavidin-peroxidase)が結合した二次抗体を1:100希釈した溶液50 μ Lずつを各wellに入れて、25 で30分間反応した。最後に3回洗浄した後、基質を50 μ Lずつ入れて常温で10分間反応させた後、反応停止液50 μ Lを入れて450nmの吸光度を測定した。結論的に、HL161AとHL161B抗体投与による猿IgM、IgA、そしてアルブミンは、全試験期間中明確な変化が見られなかった(図8A~図8C)。従って、HL161抗体は、IgGにだけ関与して、その他IgMとIgAの濃度には影響を及ぼさず免疫グロブリンと濃度減少による免疫低下に影響が少ないと判断された。また、猿アルブミンの濃度も全試験期間中大きい変化が見られず、HL161AとHL161B抗体がIgG-FcRn相互作用だけを特異的に遮断することを意味する。

10

【0129】

5) 血液生化学的数値及び尿成分分析結果

最後に、抗体投与による血液生化学的検査及び尿検査を試験14日目に試料を利用して実施した。血液生化学的標識因子は、Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Creatine phosphokinase (CPK), Total bilirubin (TBIL), Glucose (GLU), Total cholesterol (TCHO), Triglyceride (TG), Total protein (TP), Albumine (Alb), Albumine/globulin (A/G), Blood urea nitrogen (BUN), Creatinine (CRE), Inorganic phosphorus (IP), Calcium (Ca), Sodium (Na), Kalium (K), Chloride (Cl)をHitachi 7180機器を利用して分析して、尿分析のための標識因子は、Ascorbic acid (ASC)をMission U120機器を利用して変化を測定した。全般的に若干の数値変化はあったが、シノモルグス猿の正常数値範囲内に含まれる数値で測定された。

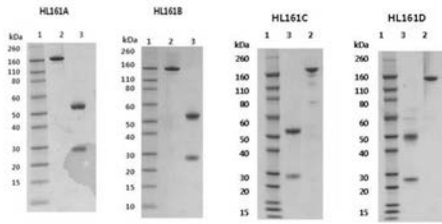
20

30

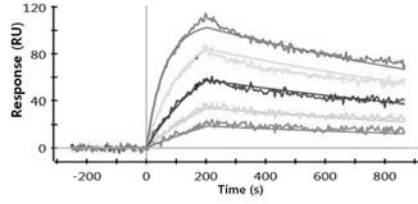
【0130】

以上、本発明の内容の特定の部分を詳述したが、当業界における通常の知識を持った者にとって、このような具体的な記述は単なる好適な実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることはないという点は明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は特許請求の範囲とこれらの等価物により定義されると言える。

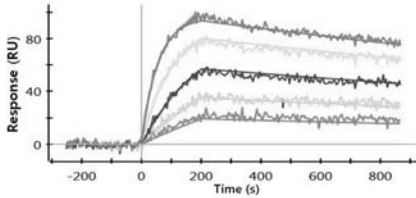
【 図 1 】



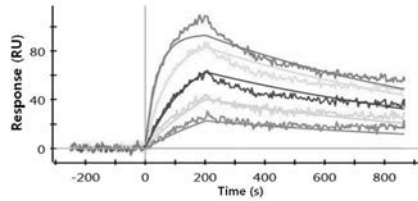
【 図 2 C 】



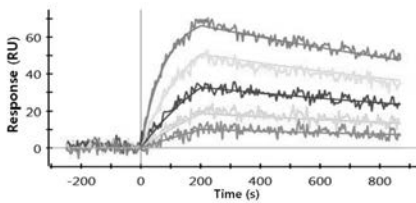
【 図 2 A 】



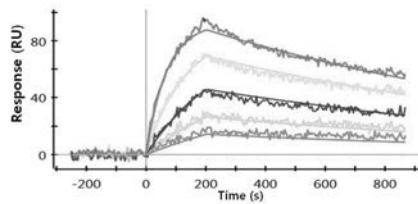
【 図 2 D 】



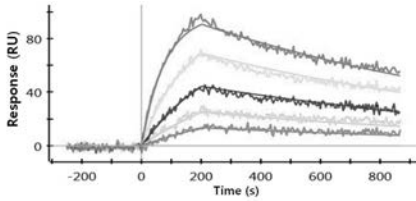
【 図 2 B 】



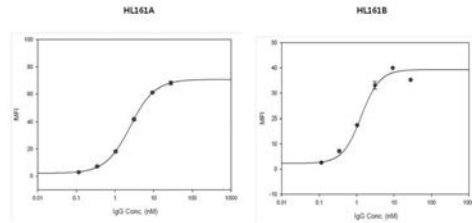
【 図 2 E 】



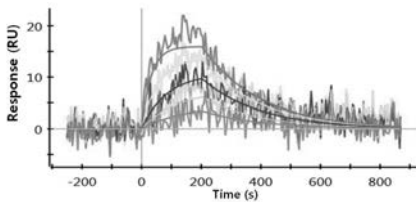
【 図 2 F 】



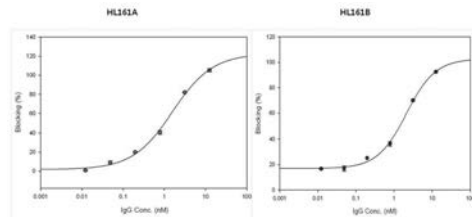
【 図 3 】



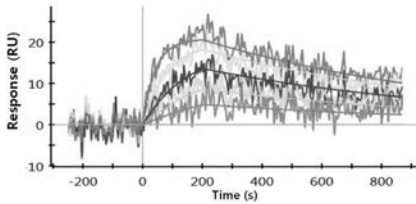
【 図 2 G 】



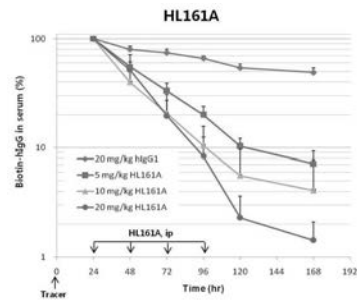
【 図 4 】



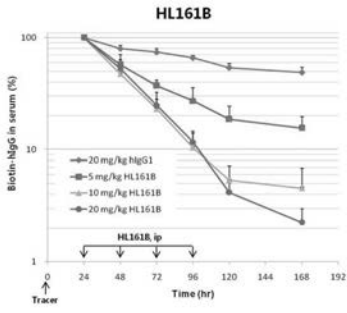
【 図 2 H 】



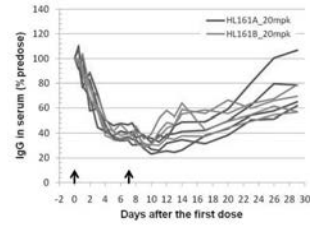
【 図 5 A 】



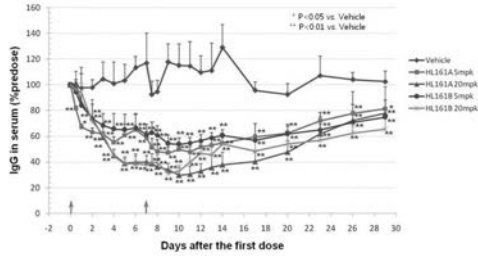
【 5 B 】



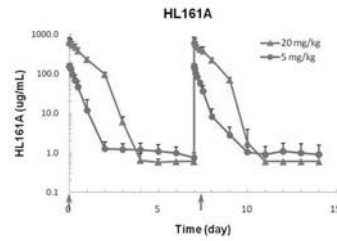
【 6 C 】



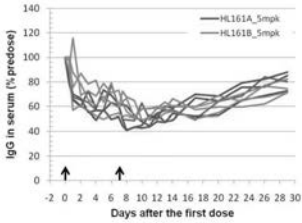
【 6 A 】



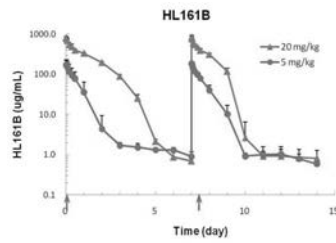
【 7 A 】



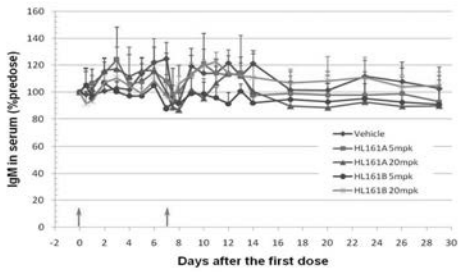
【 6 B 】



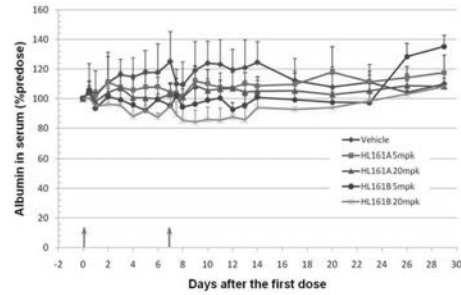
【 7 B 】



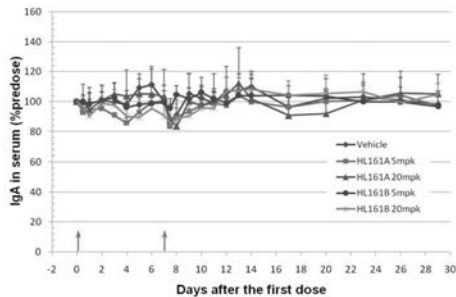
【 8 A 】



【 8 C 】





【 8 B 】



【配列表】

2017522043000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2015/004424
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i, C07K 16/18(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/46; A61K 39/395; C07K 16/42; C07K 16/18; C12N 15/13; C12N 15/63; A61P 37/00; G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: FcRn-specific antibody, pH independent, β 2-microglobulin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007-0092507 A1 (BALTHASAR et al.) 26 April 2007 See abstract and claims 1-6.	4, 9, 16-17
A	CHRISTIANSON et al., 'Monoclonal antibodies directed against human FcRn and their applications', MAbs, Vol.4, Issue No.2, pp.208-216 (2012) See abstract and figure 1.	4, 9, 16-17
A	SCHWAB et al., 'Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system?' Nature Reviews Immunology, Vol.13, No.3, pp.176-189 (E pub. 15 February 2013) See abstract and pages 177 and 181.	4, 9, 16-17
A	RATH et al., 'The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG' Journal of Clinical Immunology, Vol.33, Supplement No.1, pp.S9-S17 (Epub. 05 September 2012) See abstract and page S10.	4, 9, 16-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 08 July 2015 (08.07.2015)	Date of mailing of the international search report 08 July 2015 (08.07.2015)	
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140	Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/KR2015/004424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PRAETOR et al., 'beta2-microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn' Journal of Cell Science, Vol.115, No.11, pp.2389-2397 (2002) See abstract.	4,9,16-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004424

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

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

1. Claims Nos.: 22-23, 25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 22-23, 25 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.: 1-3,5-8,10-14,19-25
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 1-3, 5-8, 10-14 and 21-25 are too broad to make meaningful search as required by PCT Article 6, since said claims do not contain the essential feature of the rest of the CDRs forming the antibody. Claims 19, 20 and 22-23 are unclear since they each refer to a multiple dependent claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. Claims Nos.: 15,18,21,24-25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004424

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0092507 A1	26/04/2007	CA 2637929 A1 EP 1986690 A2 JP 2009-524664 A US 2005-0079169 A1 US 7662928 B2 WO 2007-087289 A2 WO 2007-087289 A3	02/08/2007 05/11/2008 02/07/2009 14/04/2005 16/02/2010 02/08/2007 09/10/2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
	G 0 1 N 33/53	D

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

(74)代理人 100185915

弁理士 長山 弘典

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 キム ソンウク

大韓民国, 1 3 6 2 2, キョンギ - ド, ソンナム - シ, プンダン - グ, クミ - ロ 1 4 4 ボン - ギル, 2 5, 1 0 2 - 3 0 4

(72)発明者 パク スングク

大韓民国, 0 6 3 5 6, ソウル, カンナム - グ, イルウォン - ロ 1 4 - ギル, 2 5, 1 1 1 - 3 0 2

(72)発明者 チョン ジェガブ

大韓民国, 3 4 6 8 6, テジョン, トン - グ, テジョン - ロ 5 4 2 ボン - ギル, 7 8 - 1, 2 0 7 - 1 2 0 4

(72)発明者 アン ヘギョン

大韓民国, 1 6 9 3 8, キョンギ - ド, ヨンイン - シ, スジ - グ, サンヒョン - ロ, 5 9, 1 5 3 - 2 0 4

(72)発明者 キム ミンスン

大韓民国, 1 6 2 2 8, キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - グ, クンギョ - ロ, 2 8 6, 8 0 0 1 - 9 0 2

(72)発明者 キム ウンソン

大韓民国, 0 6 2 2 6, ソウル, カンナム - グ, トゴク - ロ 3 7 ギル, 3 5 - 3, B - 1 0 3

(72)発明者 ヨン ヘヨン

大韓民国, 1 6 6 9 7, キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - グ, メヨン - ロ 3 1 0 ボン -

ギル, 12, 531 - 806

(72)発明者 シン ドンオク

大韓民国, 16498, キョンギ - ド, スウォン - シ, パルタル - グ, クォンワン - ロ 348
ボン - ギル, 17 - 9, 102 - 102

(72)発明者 ソン ヨンジョン

大韓民国, 16485, キョンギ - ド, スウォン - シ, パルタル - グ, チュンブ - デロ 170
ボン - ギル, 17, 102 - 1603

(72)発明者 ユ テヒョン

大韓民国, 16961, キョンギ - ド, ヨンイン - シ, キフン - グ, キフン - ロ 116
ボン - ギル, 60, 513 - 1104

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC15 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA90X AA92X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA08 BB19 CA25 CA44

4C085 AA14 BB11 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017522043A5	公开(公告)日	2018-03-22
申请号	JP2017510285	申请日	2015-04-30
申请(专利权)人(译)	Hanoru生物制药有限责任公司		
[标]发明人	キムソンウク パクスングク チョンジェガブ アンヘギョン キムミンスン キムウンソン ヨンヘヨン シンドンオク ソンヨンジョン ユテヒョン		
发明人	キム ソンウク パク スングク チョン ジェガブ アン ヘギョン キム ミンスン キム ウンソン ヨン ヘヨン シン ドンオク ソン ヨンジョン ユ テヒョン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P37/06 A61P25/08 A61P25/00 A61P17/02 A61P7/06 A61P21/04 A61P19/02 A61P29/00 A61P7/04 A61P13/12 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P7/04 A61P7/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25 /08 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 C07K16/283 C07K2317/21 C07K2317/567 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/566 G01N33/6854 A61K39/395 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/564 G01N2333/70535		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/28.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395.U A61K39/395.N A61P37/06 A61P25/08 A61P25/00 A61P17/02 A61P7/06 A61P21/04 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P7/04 A61P13/12 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064 /DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065 /BA08 4B065/BB19 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	61/986742 2014-04-30 US		
其他公开文献	JP6449441B2 JP2017522043A		
摘要(译)			

本发明的FcRn (新生儿Fc受体, 对IgG具有高亲和力的受体, 胎儿Fc受体, 也称为FcRP, FcRB或Brambell受体) 是对分离的抗 -FcRn抗体, 其制备方法, 包含该抗体的自身免疫性疾病的治疗组合物, 以及使用该抗体的自身免疫性疾病的治疗和诊断方法。 通过以非竞争性方式将FcRn与IgG结合以减少血液中的致病性自身抗体的量, 根据本发明的FcRn特异性抗体可以用于治疗自身免疫疾病。 有。