

明 細 書

発明の名称：分子の *in vivo* 薬物動態を予測する方法

技術分野

[0001] 本発明は、分子の *in vitro* 薬物動態を測定する方法、分子の *in vivo* 薬物動態を予測する方法、分子のスクリーニング方法などに関する。

背景技術

[0002] 抗体医薬品などの医薬品の開発過程で必要となる薬物動態 (Pharmacokinetics; PK) の評価には、サルやマウスなどの実験動物が用いられている。しかしながら、実験動物を用いて多数の検体を評価することは困難であり、予め検体数を絞り込んだのちに *in vivo* 薬物動態の評価が行われている。また倫理的観点からは、実験動物の使用数を削減することが求められている。これらの点から *in vitro* アッセイの結果に基づき *in vivo* 薬物動態を予測する方法の重要性が高まっている。

[0003] 従来から、*in vivo* 薬物動態を予測する方法として、細胞を用いた *in vitro* アッセイの結果を利用する方法が知られている（非特許文献 1～3）。

Grevysらは、ヒト微小血管内皮細胞株 (HMEC1) にヒト胎児性Fc受容体 (FcRn) を発現させた細胞 (HMEC1-hFcRn) を用い、HERAアッセイ (human endothelial cell-based recycling assay) と名付けた手法により、*in vitro* でIgG抗体がFcRnを介して細胞外に排出される量を測定し、トランスジェニックマウスにおける半減期を予測する方法を開示している（非特許文献 1）。

Jaramilloらは、Madin-Darbyイヌ腎臓 (MDCK) 細胞にヒトFcRnまたはラットFcRnを発現させた細胞を用い、抗体がFcRnを介して当該細胞を透過する活性、すなわちトランスサイトーシス活性を測定したこと、それにより抗体の *in vivo* クリアランスのランク付けを行ったことを開示している（非特許文献 2）。

Chungらも、Jaramilloらの方法と同様に、MDCK細胞にヒトFcRnを発現させた細胞を用いてトランスサイトーシス活性をし、その測定結果とヒトにおけ

るin vivoクリアランスとの間に相関関係が見られたことを開示している（非特許文献3）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Grevys et al, Nat Commun. 2018. Vol. 9: 621

非特許文献2：Jaramillo et al, MAbs. 2017. Vol. 9: 781

非特許文献3：Chung et al. J Immunol Methods. 2018. Vol. 462: 101

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 細胞を用いたin vitroアッセイの結果に基づきin vivo薬物動態を予測する従来の方法は、精度が不十分であった。

例えば、Grevysらの方法では、in vitroの測定結果から算出したHERAスコア $((R_X/R_{WT})/(RA_X/RA_{WT}))$ ：Rは所定の時間内に細胞に取り込まれたタンパク質が細胞外に放出される量を表し、RAは残存量を表し、Xは目的のタンパク質（変異体）を表し、WTは結果の標準化に用いた親タンパク質を表す。）とin vivo薬物動態との相関がみられたのは、比較する抗体同士の薬物動態の差が大きい場合に限られる。また、11日を超えるような、長い血中半減期を有する抗体のin vivo薬物動態を予測できることは示されていない。

またJaramilloらの方法では、Fc改変抗体の場合には、in vitroのトランスサイトーシス活性（flux）の逆数とin vivoクリアランスとの間に相関関係が見られたものの、in vivoクリアランスの差が小さい抗体同士を比較する場合、in vitroの測定結果からin vivoクリアランスを予測できる精度は得られていなかった（非特許文献2の図6 A参照）。また、抗原が異なる抗体について分析した結果では、in vitroのデータとin vivoのデータとの間に相関関係は見られなかった（非特許文献2の図6 B参照）。

Chungらの方法においても、in vivoクリアランスの差が小さい抗体同士を比較する場合、in vitroの測定結果からin vivoクリアランスを予測できる精

度は得られていなかった。

したがって、本発明の目的は、in vitro薬物動態の測定結果に基づき、従来よりも高い感度で、より正確に、分子のin vivo薬物動態を予測する方法などを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、従来の方法ではin vitro薬物動態に基づくin vivo薬物動態の予測精度が不十分である原因を鋭意検討した。その結果、従来の方法では、細胞への分子の取り込みが十分でないために予測精度が低くなっており、細胞への分子の取り込み量を増やすことにより、予測精度が向上することを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づきさらに研究を重ねることにより、本発明を完成させた。

[0007] すなわち、本発明は、以下の発明を提供する。

[1] 分子のin vitro薬物動態を測定する方法であって、以下の工程、

(a) 分子とFcRnを発現する細胞とを水性媒体中で接触させることにより、取り込み量が0.068 pmol/ 2×10^5 cellsより高くなるように前記分子を前記細胞に取り込ませる工程であって、下記(i)～(iii)から選択される少なくとも1つの特徴を有する、工程、

(i) 前記分子と前記細胞との接触時間が5時間以上である、

(ii) 前記分子と接触させた後の前記細胞を酸性条件下で洗浄しない、および

(iii) 前記細胞が、前記分子の標的を細胞表面に発現している、ならびに

(b) 前記分子のin vitro薬物動態を測定する工程、
を含み、

前記分子は、FcRn結合ドメインを含む、前記方法。

[2] 分子が、FcRn結合ドメインおよび標的結合ドメインを含む抗体である、[1]に記載の方法。

[3] 前記細胞が、FcRnを発現するように形質転換された細胞である、[1]

〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕前記細胞が、前記分子の標的を細胞表面に発現するように形質転換された細胞である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕前記細胞が、CHO細胞、HEK293細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、MDCK細胞、HMEC1細胞、HELA細胞、HepG2細胞、またはBaF細胞である、〔3〕または〔4〕に記載の方法。

〔6〕前記細胞が、肝臓実質細胞、肝臓非実質細胞、肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、末梢血単核球PBMC、マクロファージ、単核球、B細胞、T細胞、血小板、NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球、顆粒球、または樹状細胞である、〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔7〕取り込み量が $0.10 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように前記分子を前記細胞に取り込ませる、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法。

〔8〕*in vitro*薬物動態が、細胞内から培養液中への排出量、細胞内から培養液中への排出速度、内在化速度、トランスサイトシス量、 K_p 値、細胞内分子減少速度、FcRnまたは標的への結合速度、あるいはFcRnまたは標的からの解離速度である、〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕FcRnが、ヒトFcRn、サルFcRn、ミニブタFcRn、ラットFcRn、マウスFcRn、ウサギFcRn、イヌFcRn、またはモルモットFcRnである、〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕以下の工程、

（c）工程（b）で得られた測定結果から、*in vitro*評価パラメーターを算出する工程

をさらに含む、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の方法。

〔11〕*in vitro*評価パラメーターが、クリアランスインデックスまたはHERAスコアである、〔10〕に記載の方法。

〔12〕前記分子を含む医薬品の品質確保または薬効の予測のために使用される、〔1〕～〔11〕のいずれかに記載の方法。

〔13〕前記分子の標的が、膜タンパク質である、〔1〕～〔12〕のい

れかに記載の方法。

[14] 前記分子の標的が、ヒトIL6受容体である、[13]に記載の方法。

[15] 分子のin vivo薬物動態を予測する方法であって、

(a') [1] ~ [14] のいずれかに記載の方法により、in vitro薬物動態を測定する工程、および

(b') 工程(a') で得られた測定値またはin vitro評価パラメーターから、前記分子を生体に投与した場合のin vivo薬物動態を予測する工程を含む、前記方法。

[16] in vivo薬物動態が、バイオアベイラビリティ、分布容積、血中非結合形分率、クリアランス、尿中排泄率、血中濃度半減期、または平均滞留時間である、[15]に記載の方法。

[17] 生体が、ヒト、サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはモルモットである、[15] または [16] に記載の方法。

[18] 動物を用いた薬物動態試験の代替として使用される、[15] ~ [17] のいずれかに記載の方法。

[19] 分子のスクリーニング方法であって、

(a'') 同一の標的に結合する異なる2以上の分子を準備する工程、

(b'') 工程(a'') で準備した2以上の分子それぞれについて、[1] ~ [14] のいずれかに記載の方法により、in vitro薬物動態を測定する工程、および

(c'') 工程(b'') で得られた、2以上の分子それぞれについての測定値またはin vitro評価パラメーターを相互に比較し、望ましい値を示した分子を選択する工程を含む、前記方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、in vitro薬物動態の測定結果に基づき、従来よりも高い感度で、より正確に、分子のin vivo薬物動態を予測することができる。そのため、医薬品の開発段階初期において、簡便に、高精度で、多数の候補物質

のin vivo薬物動態を予測することが可能となる。

また本発明は、in vivo薬物動態試験の回数を削減することにより、実験動物の使用数削減に貢献することができる。

さらに本発明は、所望の薬物動態を有する薬剤を効率よくスクリーニングする方法を提供することにより、より薬理効果の高い医薬品の開発に貢献することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]異なるFc領域を有する抗体（H237-G1d、H237-F1847m、H237-F1886m、H237-F1927m、およびH237-F890）のマウス血漿中薬物動態評価の結果を示す。

各抗体1 mg/kgおよびサングロポール1000 mg/kgをヒトFcRnトランスジェニックマウス（Tg32）に投与した後、28日目まで採血し、血漿中の抗体濃度をECLAッセイで測定した。黒色実線黒色丸印はH237-G1d、黒色短破線黒色三角印はH237-F1847m、黒色実線白色丸印はH237-F1886m、黒色長破線黒色四角印はH237-F1927m、黒色実線白色三角印はH237-F890をそれぞれ示す。

[図2]異なるFc領域を有する抗体のin vitroにおける細胞への取り込み量を測定した結果を示す。各抗体をhFcRn-hIL6R-CHO細胞またはhFcRn-CHO細胞に37℃で24時間取り込ませ、冷2% FBS含有PBSで洗浄した後の、細胞への取り込み量を示す。

[図3-1]異なるFc領域を有する抗体の細胞への取り込みを経時的に測定した結果を示す。(a) 細胞をFBS-PBSで洗浄した場合の測定結果。抗体を細胞に取り込ませた後、細胞をFBS-PBSで洗浄した。細胞表面に結合している抗体と内在化した抗体の両方が検出される。(b) 細胞を酸性培地で洗浄した場合の測定結果。抗体を細胞に取り込ませた後、酸性培地で洗浄した。細胞表面に結合している抗体は除去され、内在化した抗体のみが検出される。黒色実線黒色丸印はH237-G1d、黒色短破線黒色三角印はH237-F1847m、黒色実線白色丸印はH237-F1886m、黒色長破線黒色四角印はH237-F1927m、黒色実線白色三角印はH237-F890をそれぞれ示す。

[図3-2]異なるFc領域を有する抗体の細胞への取り込みを経時的に測定した結

果を示す。(c) (a)および(b)の測定結果を用いて、Integration plot解析を行った結果を示す。黒色実線黒色丸印はH237-G1d、黒色短破線黒色三角印はH237-F1847m、黒色実線白色丸印はH237-F1886m、黒色長破線黒色四角印はH237-F1927m、黒色実線白色三角印はH237-F890をそれぞれ示す。

[図4]異なるFc領域を有する抗体の細胞内残存量および培地中への排出量の経時的な推移を示す。各抗体を細胞に37℃で24時間取り込ませた後、新鮮な培地に交換し、さらに4時間までインキュベーションした時の、細胞内の抗体残存量(a)および培地中に排出された抗体量(b)を経時的に測定した。黒色実線黒色丸印はH237-G1d、黒色短破線黒色三角印はH237-F1847m、黒色実線白色丸印はH237-F1886m、黒色長破線黒色四角印はH237-F1927m、黒色実線白色三角印はH237-F890をそれぞれ示す。

[図5]実施例4において算出したクリアランスインデックスと、マウスにおける血漿中半減期(a)またはクリアランス(b)との相関を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。ただし、本発明はこれに限定されるものではなく、記述した範囲内で種々の変形を加えた態様で実施できるものである。なお、本明細書において特記しない限り、数値範囲を表す「A～B」は、「A以上（Aを含みかつAより大きい）、B以下（Bを含みかつBより小さい）」を意味する。また、本明細書において特記しない限り、「Aおよび／またはB」は、「A、B、またはそれらの両方」を意味する。また、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

[0011] 1. 分子のin vitro薬物動態を測定する方法

本発明の第一の態様は、分子のin vitro薬物動態を測定する方法に関する（以下、本発明の測定方法とも称する）。

[0012] 本明細書中、「in vivo薬物動態」とは、薬剤（すなわち、本発明における分子）が投与された後、生体内で吸収、分布、代謝、および排泄という一連の過程を経た、生体内の当該薬剤の濃度（量）の推移をいう。

薬剤が投与された後、生体内では、吸収 (absorption)、分布 (distribution)、代謝 (metabolism)、および排泄 (excretion) の過程が並行して進行する。これらの過程を分解して記述するための基本的な薬物動態 (PK) パラメーターとして、(1) バイオアベイラビリティ (bioavailability: F)、(2) 分布容積 (volume of distribution: V_d または V)、(3) 血中非結合分率 (fraction unbound in blood: f_uB)、(4) クリアランス (clearance: CL)、および (5) 尿中排泄率 (cumulative amount of drug excreted in urine: A_e) が確立されている (計量生物学 Vol. 36, Special Issue, S 3-S 18 (2015))。バイオアベイラビリティの指標として、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC)、最高血中濃度 (C_{max})、最高血中濃度到達時間 (T_{max}) などが知られている。分布容積の指標として、定常状態における分布容積 (V_{ss}) などが知られている。その他の PK パラメーターとして、血中濃度半減期 ($t_{1/2}$)、平均滞留時間 (MRT)、1次モーメント時間曲線下面積 (AUMC)、消失速度定数 (k_{el})、投与後ゼロ時点濃度 (C_0) などが知られている。

[0013] 本明細書中、「in vitro 薬物動態」とは、生体外の人工的に構成された条件下において、対象分子を細胞と接触させることにより測定される、当該分子の挙動をいう。「in vitro 薬物動態」は、例えば、細胞内から細胞外への排出量、細胞内から細胞外への排出速度、内在化速度、トランスサイトシス量、 K_p 値、細胞内分子減少速度、FcRn または標的への結合速度、あるいは FcRn または標的からの解離速度によって表され得るが、これらに限定されない。

細胞内から細胞外への排出量 (Efflux 量) は、対象分子を細胞と所定の時間接触させた後、水性媒体 (例えば培地、緩衝液など) を対象分子を含まないものに交換したのち、水性媒体中の対象分子を検出することにより、細胞から細胞外に排出される対象分子の量を測定することで決定される。

細胞内から細胞外への排出速度 (Efflux 速度) は、単位時間あたりの対象分子の Efflux 量を測定することで決定される。

内在化速度は、対象分子を細胞と所定の時間接触させ、単位時間あたりに

細胞外から（例えば培地、緩衝液などから）細胞に取り込まれる対象分子の量を測定することで決定される。好ましい態様において、対象分子と所定の時間接触させた細胞は、対象分子の量の測定前に、酸性（pH 6.0未満、例えばpH 5.5以下、pH 5.0以下、pH 4.5以下、pH 4.0以下、pH 3.5以下、またはpH 3.0以下）の水性媒体で洗浄され、細胞表面に結合している対象分子が除去される。それにより、細胞内に取り込まれた（内在化された）対象分子の量をより正確に測定することができる。

トランスサイトーシス量は、細胞シートに対して一方の側から他方の側への透過量を測定することで決定される。例えば、トランズウェル（登録商標）システム（Corning）などを用いて測定することができる（非特許文献2および3参照）。

Kp値は、in vivo薬物動態に関しては組織－血漿間薬物濃度比（すなわち、組織と血漿との間の対象分子の濃度の比率）として知られているが、本明細書中においてin vitro薬物動態に関しては、細胞と水性媒体（例えば培地）との間の対象分子の濃度の比率をいう。Kp値は、細胞中の量および水性媒体中の量を測定することで決定される。本明細書中、in vitro薬物動態としてのKp値は、（細胞中の量）／（水性媒体中の量）により算出される値である。

細胞内分子減少速度は、対象分子を細胞と所定の時間接触させた後、水性媒体（例えば培地、緩衝液など）を対象分子を含まないものに交換したのち、細胞内の対象分子を検出することにより、単位時間あたりに細胞から減少する対象分子の量を測定することで決定される。

FcRnまたは標的への結合速度は、対象分子を細胞と所定の短い時間（例えば数秒間～数分間）接触させ、単位時間あたりにFcRnまたは標的に結合した対象分子の量を測定することで決定される。

FcRnまたは標的からの解離速度は、対象分子を細胞と所定の時間（例えば平衡状態に達するのに十分な時間）接触させた後、水性媒体（例えば培地、緩衝液など）を対象分子を含まないものに交換したのち、水性媒体中の対象

分子を検出することにより、単位時間あたりに水性媒体中に排出される対象分子の量を測定することで決定される。好ましい実施形態において、対象分子と細胞との接触および対象分子の水性媒体中への放出は、対象分子の細胞内への内在化が抑制される温度（例えば4℃又はそれ以下の温度）で行うことができる。

[0014] 本明細書中、「分子」（「本発明における分子」ともいう。）は、本発明の測定方法に用いられる細胞に取り込まれ、かつ、細胞内では細胞内小器官であるエンドソーム上の胎児性Fc受容体（FcRn）分子を介して細胞外へ排出される性質を有する。かかる性質は、分子がFcRn結合ドメインを含むことによる。

[0015] FcRnは、IgG抗体のFc領域を認識する受容体の一つである。FcRnは胎児期の胎盤に発現して母親から胎児へのIgGのトランスサイトーシスを担うほか、成体においても血管内皮、腸管上皮細胞、および血球系の細胞等に発現し、IgGやアルブミンの細胞内からのエキソサイトーシスやトランスサイトーシスを担うことが知られている（Nature Reviews Immunology Vol. 7, p. 715-725 (2007)）。

ヒトFcRnは $\beta 2m$ サブユニットと呼ばれる軽鎖と、膜貫通領域を持つ α サブユニットと呼ばれる重鎖からなる二量体タンパク質であり、その構造は主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子に類似している。このFcRn二量体は更にダイマー化し、一分子のIgGと結合する（Annual Review of Cell and Developmental Biology Vol. 12, p. 181-220 (1996)）。FcRnは、他のIgG抗体Fc受容体とは異なり、自身の $\alpha 2$ ドメイン上のアニオン残基とIgGのCH2-CH3ヒンジ領域との静電的相互作用を介したpH依存的な結合性を示すことが知られている（Nature Reviews Immunology Vol. 7, p. 715-725 (2007)）。

pH6.5未満であるエンドソーム内においては、ピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれたIgGはFcRnと高親和性で結合し、ライソソームでの分解から逃れ、その後中性条件下（pH7.4）の細胞表面へ移動したところで解離する。このpH依存的な結合様式が、IgGのトランスサイトーシスやエキソサイトーシ

スを可能にしており、母親からの胎児へのIgGの輸送や、生体内IgGの血中半減期延長（約20日）に寄与している（Protein Cell Vol. 9(1), p. 15-32 (2018)）。

[0016] FcRn結合ドメインとしては、例えば、抗体の重鎖定常領域（Fc領域）およびその断片が挙げられる。また、FcRn結合ドメインの別の例として、アルブミンおよびその断片が挙げられる。アルブミンがFcRnに結合することは文献（J. Exp. Med. (2003) 197(3), 315-322）により知られている。

FcRn結合ドメインは、pH6.5未満であるエンドソーム内のpH環境下でFcRnと結合し得る限り、変異を含んでいてもよい。変異を含むFc結合ドメインとしては、例えば、WO 2012/133782 A1、WO 2013/046704 A2、およびWO 2017/046994 A1に記載された抗体の変異Fc領域が挙げられるが、これらに限定されない。

[0017] 本発明における分子は、標的と結合する性質（すなわち標的結合活性）または標的における反応を触媒する性質（すなわち酵素活性または触媒活性）をさらに有していてもよい。標的結合活性を有する分子は、アゴニストまたはアンタゴニストとして機能してもよい。これらの性質を有する場合、分子は、標的結合ドメインまたは触媒ドメインを有する。好ましい実施形態において、本発明における分子は、標的結合ドメインを含む。それにより、標的を細胞表面に発現している細胞への取り込み量が増加し得る。

[0018] 本明細書中、「標的」は、本発明における分子と結合する別の分子または構造体、あるいは本発明における分子による触媒作用を受ける別の分子または構造体をいう。「標的」には、タンパク質、核酸、糖鎖などが含まれる。また「標的」は、本発明における分子との関係から抗原、受容体、基質などと呼ばれる場合もある。

[0019] 標的結合ドメインは、標的と結合することができる限り、その構造は特に限定されず、どのような構造のドメインも使用され得る。標的結合ドメインとしては、例えば、抗体の抗原結合ドメイン、生体内の多様な細胞膜タンパクに含まれる35アミノ酸程度のモジュール（Aドメイン）を含むAvimer（国際

公開W02004/044011、W02005/040229)、細胞膜に発現する糖タンパク質であるfibronectin中の10Fn3ドメインを含むAdnectin(国際公開W02002/032925)、Protein Aの58アミノ酸からなるIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody(国際公開W01995/001937)、33アミノ酸の繰り返し配列であるアンキリン反復(ankyrin repeat: AR)を骨格として含むDARPin(Designed Ankyrin Repeat proteins)(国際公開W02002/020565)、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン(neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL))等のリポカリンを骨格として含むAnticalin(国際公開W02003/029462)、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムにおいて機能するタンパク質で、ロイシン残基に富んだリピート(leucine-rich-repeat (LRR))モジュールを含む可変性リンパ球受容体(variable lymphocyte receptor (VLR))(国際公開W02008/016854)などが挙げられる。

本明細書中、抗原結合ドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。好ましくは、抗原結合ドメインは抗体軽鎖可変領域(VL)と抗体重鎖可変領域(VH)とを含む。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv(single chain Fv)」、「単鎖抗体(single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2(single chain Fv 2)」、「Fab」または「F(ab')₂」等が好適に挙げられる。

特定の態様において、標的結合ドメインは、抗体の重鎖および／または軽鎖の可変領域を含む。好ましい態様において、標的結合ドメインは、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含むか、またはそれらからなる。

[0020] 触媒ドメインとしては、酵素における触媒ドメインが挙げられる。

[0021] 好ましい態様において、本発明における分子は、FcRn結合ドメインおよび標的結合ドメインを含み、より好ましくは、抗体のFc領域ならびに重鎖および軽鎖の可変領域を含む。

[0022] 本発明における分子には、医薬品およびその候補品が含まれ、例えば、実施例に記載された分子である抗体などのタンパク質の他、ペプチド化合物、核酸、トキシン、ウイルス、ナノ粒子・マイクロ粒子などのDDS製剤などが挙

げられるが、FcRnに結合することができる限り、これらに限定されない。本発明における分子を調製する場合、その種類に応じて、当該技術分野において知られた技術を用いて常法により調製すればよい。本発明の測定方法によれば、これらの分子について本願実施例と同様にin vitro薬物動態を測定することができ、そのin vivo薬物動態を予測することができる。

[0023] 本明細書中、「タンパク質」とは、ペプチド結合を介して連結されたアミノ酸のポリマーであり、ペプチド化合物も含まれ得る。タンパク質は、天然に存在するものであっても、組換えタンパク質などの天然に存在しないものであってもよい。タンパク質としては、例えば、サイトカイン、生理活性ペプチド、生体酵素、抗体、またはそれらの変異体が挙げられる。

[0024] 本明細書中、「抗体」とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプ（すなわちIgG、IgA、IgD、IgE、およびIgM）およびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のサブクラスが知られている。好ましい態様において、本発明の測定方法における抗体は、IgGである。

[0025] 抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また本発明においては、異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などを使用することができる。また抗体は、二重特異性抗体（バイスペシフィック抗体）であってもよい。抗体は、「FcRn結合ドメイン」を含む限り、抗体の断片であってもよい。そのような抗体の断片としては、例えば、Fc断片、scFv-CH1-Fcなどが挙げられる。

抗体の「FcRn結合ドメイン」は、FcRnに結合することができればよく、例

えば、抗体の重鎖定常領域（Fc領域）が挙げられる。

本発明における分子としての抗体は、「抗原結合ドメイン」を含むことが好ましく、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含むことがより好ましい。それにより、細胞が抗原を細胞表面に発現している場合、本発明における分子の細胞への取り込み量が増加し得る。

これらの抗体を作製する方法は当業者において公知である（例えば、WO 2013/081143など）。

[0026] 本明細書中、「抗原」は、抗原結合ドメインが結合するエпитープを含む限りその構造は特に限定されない。抗原は無機物であってもよいし、有機物であってもよい。いくつかの態様において、抗原としては、17-IA、4-1BB、4 Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-V/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2、BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン（Osteogenin）、BMP-4、BMP-2b、BMP-5、BMP-6、Vg r-1、BMP-7（OP-1）、BMP-8（BMP-8a、OP-2）、BMPR、BMPR-IA（ALK-3）、BMPR-IB（ALK-6）、BRK-2、RPK-1、BMPR-II（BRK-3）、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3（C3）、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原（CEA）、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシン

S、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、PD1、PDL1、LAG3、TIM3、galectin-9、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子 (Decay accelerating factor)、des(1-3)-IGF-I (脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/C26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクトリン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIc、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (

MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-cap またはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-23、IL-27、インターフェロン (INF) -アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、インテグリンアルファ5 (アルファV)、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP (TGF-1)、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイス-Y抗原、ルイス-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクトリン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAd

CAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALL OPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン (Muc1)、MUC18、ミューラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニューロツリン、神経成長因子 (NGF)、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ (PLAP)、PIGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレキシシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシシンA鎖、レラキシシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス (RSV) F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72 (腫瘍関連糖タンパク質-72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体 (例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI (ALK-5)、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpe、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUND)、TNFRSF11A (RANK ODF R、TRANCE R)、TNF

RSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、Hv α A、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LT β R TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEMリガンド、LT γ)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITRリガンド AITRリガンド、TL6)、TNFSF1A (TNF- α コネクチン (Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF- β LT α 、TNFSF1)、TNFSF3 (LT β TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40リガンド gp34、TXGP1)、TNFSF5 (CD40リガンドCD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6 (Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンド CD70)、TNFSF8 (CD30リガンドCD153)、TNFSF9 (4-1BBリガンド CD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL-R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TLR (Toll-like receptor) 1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9

B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、 $A\beta$ 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、factor H、properdin、sclerostin、fibrinogen、fibrin、prothrombin、thrombin、組織因子、factor V、factor Va、factor VII、factor VIIa、factor VIII、factor VIIa、factor IX、factor IXa、factor X、factor Xa、factor XI、factor Xia、factor XII、factor XIIa、factor XIII、factor XIIa、TFPI、antithrombin III、EPCR、トロンボモデュリン、TAPI、tPA、plasminogen、plasmin、PAI-1、PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pなどが挙げられる。いくつかの態様において、抗原としては、ホルモンおよび成長因子のための受容体などが挙げられる。

[0027] 二重特異性抗体等のように抗体が抗原分子中の複数のエпитープに結合する場合、当該抗体と複合体を形成することが可能な抗原は上記に例示される抗原のいずれか、またはその組合せ、換言すれば単量体またはヘテロ多量体であり得る。ヘテロ多量体の非限定な例として、IL-12p40およびIL-12p35を含むIL-12、IL-12p40および（IL-30Bとも呼ばれる）IL-23p19を含むIL-23、もしくはEBI-3およびIL27p28を含むIL-23、もしくはIL-12p35およびEBI-3を含むIL-35等のヘテロ二量体、が挙げられる。

[0028] 上記の抗原の例示には受容体も記載されるが、これらの受容体は血漿中等の生体液中に可溶型で存在する場合がある。そのような可溶型受容体も、本発明における抗原に含まれる。可溶型受容体の非限定な一態様として、例えば、Mullbergら（J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968）によって記載されているような可溶型IL-6Rが例示される（例えば、WO 2013/081143に記載の配列番号：1で表されるIL-6Rポリペプチド配列のうち、1から357番目のア

ミノ酸からなるタンパク質)。

[0029] 上記の抗原の例示には可溶型抗原も記載されるが、当該抗原が存在する溶液に限定はなく生体液、すなわち生体内の脈管又は組織・細胞の間を満たす全ての液体に本可溶型抗原は存在し得る。非限定な一態様では、抗体が結合する抗原は、細胞外液に存在することができる。細胞外液とは、脊椎動物では血漿、組織間液、リンパ液、密な結合組織、脳脊髄液、髄液、穿刺液、または関節液等の骨および軟骨中の成分、肺胞液（気管支肺胞洗浄液）、腹水、胸水、心嚢水、嚢胞液、または眼房水（房水）等の細胞透過液（細胞の能動輸送・分泌活動の結果生じた各種腺腔内の液、および消化管腔その他の体腔内液）の総称をいう。

[0030] 上記の抗原の例示には可溶型抗原と膜型抗原が含まれるが、各抗原がいずれに該当するかは当業者にとって周知である。例えば、UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>)、Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>)などのウェブサイトにおいて、個々の抗原を検索することにより分類することができる。

[0031] 本発明における分子が抗体である場合、抗体は、好ましくはIgGであり得る。特定の実施形態において、本発明における分子は、抗IL-6R抗体であり、より詳細にはヒト化抗IL-6R抗体であり得る。

[0032] 本発明において「核酸」とは、DNA、RNA、それらの類縁体をいい、天然の核酸であっても合成された核酸であってもよい。類縁体としては、PNA、LNA等の人工核酸が挙げられる。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。また核酸は、修飾体であってもよい。修飾体としては、ヌクレオシド間結合、塩基および／または糖において化学的に修飾されたもの、5'末端および／または3'末端に修飾基を有するものなどが挙げられる。ヌクレオシド間結合の修飾としては、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、メチルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合、およびメチルホスホノチオエート結合のいずれか、またはそれらの組み合わせへの変更が挙げられる。塩基の修飾としては、5-プロ

ピニルウラシル、2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。糖の修飾としては、2'-フルオロリボース、2'-O-メチルリボースへなどへの変更が挙げられる。

核酸は、その機能または用途に応じて、siRNA、アンチセンスRNA、miRNA、shRNA、リボザイム、またはアプタマーと呼ばれることもある。本発明において用いられる核酸には、Toll 様受容体9 (TLR9) に作用して自然免疫を活性化させるCpGオリゴヌクレオチドも含まれる。

核酸の塩基長は、Stabilinを介して細胞に取り込まれ得る長さであればよく、例えば4~100塩基長、10~50塩基長、10~40塩基長、または10~30塩基長の範囲である。

[0033] 一実施形態において、本発明における分子が核酸である場合、その標的（または受容体）はStabilinであり得る。

本明細書中、Stabilinとは、核酸受容体として知られる膜貫通タンパク質のファミリーに属するタンパク質をいう。哺乳動物においては、Stabilin-1およびStabilin-2の2種類の相同体が知られており、本発明においてStabilinはそれらのいずれであってもよい。ヒトにおいては、Stabilin-1 (NCBI accession number: NP_055951.2) およびStabilin-2 (NCBI accession number: NP_060034.9) が知られており、LSEC、脾臓、副腎皮質、リンパ節、および類洞マクロファージにおいて発現していることが報告されている。

[0034] 本発明において「ペプチド化合物」とは、アミノ酸あるいはアミノ酸類縁体がアミド結合あるいはエステル結合して形成される化合物である。ペプチド化合物の分子形は直鎖状、環状、あるいは直鎖部を有する環状のものが挙げられる。

アミド結合あるいはエステル結合の数（アミノ酸又はアミノ酸類縁体の数・長さ）は特に限定されないが、直鎖部を有する場合、環状部と直鎖部を併せて30残基以内が好ましい。環化部位と直鎖部位を併せた総アミノ酸数は13残基以下であることがより好ましい。高い代謝安定性を獲得するためには、総アミノ酸数が9以上であることがより好ましい。上記に加えて環状部

を構成するアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数は5～12であることが好ましい。さらに、上の記載に加えて環状部を構成するアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数はより好ましくは5～11、さらに7～11残基が好ましい。特に9～11残基が好ましい。直鎖部のアミノ酸及びアミノ酸類縁体の数（ユニットの数）は0～8であることが好ましい。さらに、0～3が好ましい。尚、本願では特に限定しない限り、アミノ酸にはアミノ酸類縁体も含まれる場合があるものとする。

[0035] なお、本明細書において、ペプチド化合物を構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」を、それぞれ、「アミノ酸残基」、「アミノ酸類縁体残基」ということがある。

アミノ酸とは α 、 β および γ アミノ酸であり、天然型アミノ酸（本願では天然型アミノ酸とはタンパク質に含まれる20種類のアミノ酸を指す。具体的にはGly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、His、Glu、Asp、Gln、Asn、Cys、Met、Lys、Arg、Proを指す。）に限定されず、非天然型アミノ酸であってもよい。 α -アミノ酸の場合、L型アミノ酸でもD型アミノ酸でもよく、 α 、 α -ジアルキルアミノ酸でもよい。アミノ酸側鎖の選択は特に制限を設けないが、水素原子の他にも例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基から自由に選択される。それぞれには置換基が付与されていてもよく、それら置換基も例えば、N原子、O原子、S原子、B原子、Si原子、P原子を含む任意の官能基の中から自由に選択される（すなわち、置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基など）。

ペプチド化合物を構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」にはそれぞれに対応する全ての同位体を含む。「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」の同位体は、少なくとも1つの原子が、原子番号（陽子数）が同じで、質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる原子で置換されたものである。本発明ペプ

チド化合物を構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」に含まれる同位体の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれ、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 等が含まれる。

[0036] ペプチド化合物を検出するために蛍光標識キットAlexa Fluor(R) 488 Protein Labeling Kit (Invitrogen) を用いる場合には、アミノ基を有するアミノ酸を有することが望ましい。そのようなアミノ酸としてLys (リシン) が挙げられる。他に、チオール基を有するアミノ酸もチオール反応性蛍光色素により標識できる。このようなアミノ酸としてCys (システイン) が挙げられる。

[0037] 本発明における分子がペプチド化合物である場合、好ましくは、その標的(または受容体)はPEPT1またはPEPT2である。

[0038] ナノ粒子・マイクロ粒子は薬物送達(薬物送達システム、Drug Delivery System、通称DDS)を目的とする製剤に用いられることが知られている。例としてはリポソーム、ミセル、デンドリマー、ナノエマルジョン、鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、PLGA粒子が挙げられる(Organ Biology Vol.24 No.1 2017、54-60)がこれに限定されるものではない。

好ましい実施形態において、本発明における分子には、特定の細胞に特異的に結合する分子を結合させたナノ粒子・マイクロ粒子が含まれる。例えば、当該細胞の表面抗原に対する抗原結合分子をこれらの粒子に結合させることができる。また、例えば、FcRn結合ドメインを含む分子をこれらの粒子に結合させることができる。一実施形態において、本発明における分子は、FcRn結合ドメインおよび／または標的結合ドメインを含む抗体を結合させたナノ粒子・マイクロ粒子であり得る。

[0039] 本発明において「トキシン」は、細胞傷害剤、毒素、または放射性同位元素を特定の細胞に特異的に送達し、傷害することができるものであれば特に限定されない。例えば、当該細胞に特異的に結合する分子(例えば当該細胞の細胞表面抗原に対する抗原結合分子)に、細胞傷害剤、毒素、または放射

性同位元素を結合させた分子を作製することができる。「細胞に特異的に結合する分子」としては、上記の抗体、核酸、ペプチド化合物などが挙げられる。このような分子を用いることで、当該細胞に対し、効率よく細胞傷害剤、毒素、または放射性同位元素を送達することができる。その結果、当該細胞を特異的に傷害することができる。

細胞傷害剤の例として、メイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、および欧州特許第0,425,235号B1参照）；例えばモノメチルオーリスタチン薬剤部分DEおよびDF（MMAEおよびMMAF）（米国特許第5,635,483号および第5,780,588号および第7,498,298号参照）などのオーリスタチン；ドラスタチン；カリケアマイシンまたはその誘導体（米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、および第5,877,296号；Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；ならびにLode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998) 参照）；ダウノマイシンまたはドキソルビシンなどのアントラサイクリン（Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)；および米国特許第6,630,579号参照）；メトトレキサート；ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセルなどのタキサン；トリコテセン；ならびにCC1065が挙げられる。

毒素の例としては、これらに限定されるものではないが以下を含む酵素的に活性な毒素またはその断片が挙げられる：ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、

ツルレイシ(momordica charantia) 阻害剤、クルシン (curcin)、クロチン、サボンソウ (saponaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、ならびにトリコテセン。

放射性同位元素の例としては、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb およびLuの放射性同位体が挙げられる。

[0040] 本発明における分子として、ウイルスを用いることもできる。本発明の測定方法によれば、例えば、以下に示すウイルスまたはウイルスタンパク質もしくはその一部のin vitroにおける動態を測定することができる。ウイルスとしては、遺伝子治療に用いられるウイルス、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、エプスタイン・バーウイルスなど (Adv Biomed Res. (2012) 1: 27. doi:10.4103/2277-9175.98152)、薬物送達用ウイルス、例えばRed clover necrotic mosaic virus (RCNMV)など (Methods Mol Biol. 2011;726:207-221) が挙げられる。ウイルスタンパク質またはその一部としては、HIV-1のtatタンパクの部分ペプチド、ヒトパピローマウイルスのL2ペプチド、HBVのエンベロープLタンパクなどが挙げられる。

[0041] 一態様において、本発明の測定方法は、以下の工程

(a) 分子とFcRnを発現する細胞とを水性媒体中で接触させることにより、取り込み量が $0.068 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように前記分子を前記細胞に取り込ませる工程、および

(b) 前記分子のin vitro薬物動態を測定する工程、を含む。

[0042] 本発明の測定方法において、工程(b)は、工程(a)が完了した後に開始されなくともよい。すなわち、工程(b)は、工程(a)において本発明における分子の細胞への取り込みを終了した後に開始されてもよいし、工程(a)において当該分子が細胞に取り込まれ得る状態に置かれたときに開始されてもよい。

- [0043] 本発明の測定方法において使用される細胞は、対象分子との接触をin vitroで行うことができ、かつFcRnを発現するものであれば特に限定されず、例えば、生体から採取された細胞、初代培養細胞、または株化細胞であり得る。FcRnの発現は、蛍光標識した抗FcRn抗体で細胞を染色し、FACSにより蛍光を測定し、ヒストグラムが対照抗体（例えばアイソタイプコントロール抗体）よりも高蛍光強度側にシフトすることにより確認される。より定量的な評価を行う場合には、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS）により細胞を分析し、FcRn由来のペプチドの存在量を測定してもよい。
- [0044] 好ましい態様において、FcRnは、in vivo薬物動態を予測したい生物種のFcRnとすることができ、例えば、ヒトFcRn、サルFcRn、ミニブタFcRn、ラットFcRn、マウスFcRn、ウサギFcRn、イヌFcRn、モルモットFcRn、ハムスターFcRn、チンパンジーFcRn、マーモセットFcRn、フェレットFcRn、またはネコFcRnであり得る。
- [0045] 一実施形態において、細胞は、FcRnを発現するように形質転換された細胞であり得る。そのような形質転換は、例えば、FcRnをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入することにより行うことができる。プロモーターとしては、一般的な動物細胞での発現に用いられるプロモーターを使用することができ、例えばCMV、PGK、RSV、CAG、EF-1 alpha、SV40、TRE、Oct3/4、Nanogなどのプロモーターが挙げられる（PLoS One, 2010; 5(5): e10611）。それらを使用することで、十分な量のFcRnを発現させることができる。
- [0046] 一実施形態において、細胞は、本発明における分子の標的を細胞表面に発現するように形質転換された細胞であり得る。標的がタンパク質である場合、そのような形質転換は、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを細胞に導入することにより行うことができる。標的の発現量が多いほど、本発明における分子の細胞への取り込み量をより増加させることができる。プロモーターとしては、FcRnを発現させる場合と同様のものを使用することができ、それにより十分な量の標的を発現させることができる。
- [0047] 上記形質転換された細胞の作製に用いられる細胞は、トランスフェクショ

ン、形質導入などの外来遺伝子を細胞に導入する形質転換技術を適用できる細胞であれば特に限定されない。そのような細胞としては、例えば、CHO細胞、HEK293細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、MDCK細胞、HMEC1細胞、HELA細胞、He pG2細胞、またはBaF細胞が挙げられ、特定の実施形態においてはCHO細胞であり得る。

[0048] 一実施形態において、細胞は、内在性のFcRnを発現している細胞、すなわち、外来性のFcRnを強制発現させる操作を受けることなくFcRnを発現している細胞であり得る。そのような細胞としては、例えば、肝臓実質細胞、肝臓非実質細胞、肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、末梢血単核球PBMC、マクロファージ、単核球、B細胞、T細胞、血小板、NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球、顆粒球、または樹状細胞が挙げられる。

[0049] 一実施形態において、細胞は、本発明における分子の標的である内在性のタンパク質を細胞表面に発現している細胞、すなわち、外来性の標的タンパク質を強制発現させる操作を受けることなく標的タンパク質を細胞表面に発現している細胞であり得る。そのような細胞は、標的タンパク質に応じて適宜選択され得る。

[0050] 一実施形態において、細胞として、エンドサイトーシス活性の高い細胞または細胞株を使用してもよい。それにより、本発明における分子の細胞への取り込み量が増加し得る。そのような細胞または細胞株としては、例えば、マクロファージ、好中球、好酸球、単球などの貪食細胞またはその株化細胞が挙げられる。貪食細胞は、貪食作用が強く、高い取り込み能を有する。マクロファージには、例えば、肝臓のクッパー細胞、肺胞マクロファージ、脳のミクログリアなどが含まれる。

[0051] 好ましい実施形態において、細胞は、FcRnを発現するように形質転換された細胞であり、より好ましくは、FcRnを発現するように形質転換されており、かつ本発明における分子の標的を細胞表面に発現するように形質転換された細胞であり得る。

[0052] 本明細書中、「水性媒体」とは、水を必須構成成分とする液体を意味する

。水性媒体は、本発明の測定方法において使用される細胞がエンドサイトーシスなどの細胞機能を失わず、本発明における分子が安定に存在できるものであれば、特に制限はない。水性媒体としては、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの緩衝液、Dulbecco's Modified Eagle培地（DMEM）などの液体培地が挙げられる。好ましい実施形態において、水性媒体は、細胞に対する負荷を軽減する観点から、液体培地であり得る。

[0053] 工程（a）の一実施形態において、本発明における分子の細胞への取り込みは、使用される細胞がエンドサイトーシスなどの細胞機能を失わない条件下で、水性媒体中で当該分子と細胞とを接触させることによって行い得る。そのような条件は、使用する細胞に応じて適宜設定することができる。例えば、CHO細胞などの哺乳動物由来の細胞を使用する場合、液体培地中、30～40℃、好ましくは36～38℃でインキュベーションを行うことができる。

工程（a）の特定の実施形態において、本発明における分子の細胞への取り込みは、対象分子の細胞内への内在化が抑制される温度（例えば4℃又はそれ以下の温度）で、水性媒体中で当該分子と細胞とを接触させることによって行い得る。それにより、細胞表面に結合しているが内在化していない当該分子を測定対象とすることができ、例えば、FcRnまたは標的からの解離速度をより正確に測定し得る。

[0054] 本発明における分子の細胞への取り込みは、取り込み量が $0.068 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように行う。取り込み量の測定は、測定される各in vitro薬物動態に応じて、本発明における分子と細胞とを所定の時間接触させた後、細胞に取り込まれなかった当該分子を含む水性媒体を除去し、細胞に内在化した当該分子および／または細胞表面に結合している当該分子の量を測定することにより行う。取り込み量の測定には、当該分子に応じて適切な測定手段を用いることができ、例えば、蛍光色素などの標識を利用する測定手段、ELISA法（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）などの当該分子に対する抗体を利用する測定手段、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS）によ

り当該分子またはその断片を定量する測定手段などが挙げられる。ELISA法またはLC-MSによる測定方法を用いる場合、細胞を可溶化し、細胞溶解液中に含まれる当該分子の濃度を定量すればよく、当該分野において一般的に用いられている技術を用いて常法により行うことができる。

[0055] 一実施形態において、取り込み量の測定は、本発明における分子に付加した標識を利用して行われ得る。例えば、本発明における分子がタンパク質である場合、当該タンパク質に蛍光色素などの標識を付加し、当該標識を利用して当該タンパク質の存在量を測定することができる。タンパク質の標識方法は、特定の方法に限定されず、当該分野において一般的に用いられている技術を用いて常法により行うことができる。タンパク質を標識する方法としては、例えば、蛍光標識、ビオチン標識、ペプチド性のタグによる標識 (His tag、FLAG tag、HA tagなど)、金コロイドによる標識、磁気ビーズによる標識、RI (Radio Isotope; 放射性同位元素) 標識、および酵素標識 (HRP (Horse Radish Peroxydase)、AP (Alkaline Phosphatase) など) が挙げられる。一般的に用いられる蛍光標識としては、例えば、Rhodamin、VioBlue、DyLight 405、DY-405、Alexa Fluor 405、AMCA、AMCA-X、Pacific Blue、DY-415、Royal Blue、ATTO 425、Cy2、ATTO 465、DY-475XL、NorthernLights 493、DY-490、DyLight 488、Alexa Fluor 488、5-FITC、5-FAM、DY-495-X5、DY-495、Fluorescein、FITC、ATTO 488、HiLyte Flour 488、MFP488、ATTO 495、およびOyster 500が挙げられる。

[0056] 取り込み量が $0.068 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高いと、in vitro薬物動態からin vivo薬物動態を予測する精度が向上し得る。好ましい態様において、本発明における分子の細胞への取り込みは、取り込み量が $0.070 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように、 $0.080 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように、 $0.090 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように、または $0.10 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように行われる。取り込み量の上限は、特に限定されないが、例えば、 $0.42 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、 $0.40 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、 $0.30 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、 $0.20 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、または $0.16 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満であ

り得る。本発明における分子の細胞への取り込みは、取り込み量が、例えば、 $0.068 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高く、好ましくは $0.070 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高く、 $0.080 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高く、 $0.090 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高く、または $0.10 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高く、かつ $0.42 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、好ましくは、 $0.40 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、 $0.30 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、 $0.20 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満、または $0.16 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 未満となるように行われ得る。

[0057] 一実施形態において、本発明における分子はタンパク質であり、工程（a）は、当該分子に付加した蛍光色素を利用して測定した取り込み量が $0.068 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように行われ得る。

[0058] 一態様において、工程（a）は、下記（i）～（iii）から選択される少なくとも1つの特徴を有する：

（i）前記分子と前記細胞との接触時間が5時間以上である、

（ii）前記分子と接触させた後の前記細胞を酸性条件下で洗浄しない、および

（iii）前記細胞が、前記分子の標的を細胞表面に発現している。

[0059] （i）に関し、接触時間は、5時間以上、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間以上であり得る。接触時間の上限は、本発明における分子が安定に存在し、エンドサイトーシスなどの細胞機能が失われない限り、特に限定されない。接触時間は、例えば、72時間以下、48時間以下、または36時間以下であり得る。したがって、接触時間は、5時間以上（例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間以上）、かつ72時間以下（例えば、48時間以下、または36時間以下）であり得る。

[0060] （ii）に関し、工程（b）のin vitro薬物動態の測定の前に細胞を洗浄する場合があるが（例えば、in vitro薬物動態として、細胞内から細胞外への排出量、細胞内から細胞外への排出速度、細胞内分子減少速度、あるいはFcRnまたは標的からの解離速度を測定する場合）、その際に、酸性条件下で洗

浄すると、細胞表面に結合した分子が除去され得る。したがって、酸性条件下で洗浄しないことにより、本発明における分子の細胞への取り込み量を増加させることができる。ここで酸性条件とは、pH 6.0未満、例えばpH 5.5以下、pH 5.0以下、pH 4.5以下、pH 4.0以下、pH 3.5以下、またはpH 3.0以下をいう。またこの態様においては、本発明における分子と細胞との接触時間は、本発明における分子が安定に存在し、エンドサイトーシスなどの細胞機能が失われない限り、特に限定されないが、例えば、5時間以上、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間以上、72時間以下、48時間以下、または36時間以下であり得る。

[0061] (iii) に関し、細胞は、本発明における分子の標的を細胞表面に発現するように形質転換された細胞、または、そのような形質転換がなされておらず、本発明における分子の標的である内在性のタンパク質を細胞表面に発現している細胞のいずれであってもよい。本発明における分子が細胞表面に存在する標的に結合することで、当該分子の細胞への取り込み量を増加させることができる。標的の発現量は、多いほど好ましく、例えば、プロモーターとして一般的な動物細胞での発現に用いられるプロモーター、例えばCMV、PGK、RSV、CAG、EF-1 alpha、SV40、TRE、Oct3/4、Nanogなどのプロモーターなどを使用することで、十分な量の標的を発現させることができる。

[0062] 一態様において、工程(a)に下記(iv)～(vii)から選択される少なくとも1つの工程を含めることにより、本発明における分子の細胞への取り込み量を増加させ得る：

(iv) 水性媒体のpHを5.0～6.0に調整する工程、

(v) 前記分子が抗体である場合において、当該抗体とその抗原との間で免疫複合体(IC)を形成させる工程、

(vi) 前記分子がFc領域を含む場合において、水性媒体に抗Fc抗体を添加する工程、および

(vii) 水性媒体に取り込み促進剤を添加する工程。

[0063] (i v) に関し、pHを5.0～6.0に調整した水性媒体中では、本発明における分子が正電荷を帯びることで細胞内に入りやすくなる。また、本発明における分子がFc領域を含む場合、Fc領域のFcRnに対する結合力はpH6.5未満であるエンドソーム内のpH環境下で高くなるため、細胞内に入りやすくなる。そのため、水性媒体のpHを5.0～6.0に調整することにより、本発明における分子の細胞への取り込み量を増加させ得る。したがって、好ましい実施形態において、本発明における分子はFc領域を含み、工程(a)は工程(i v)を含み得る。

[0064] (v) に関し、抗体と抗原との複合体、すなわち免疫複合体は、細胞に取り込まれやすいことが知られている(J Immunol. 1962 Oct;89:471-82およびInt Arch Allergy Appl Immunol. 1974;46(2):230-48)。本発明における分子が抗体である場合、当該分子を含む免疫複合体を細胞と接触させることにより、当該分子の細胞への取り込み量を増加させ得る。

[0065] (v i) に関し、本発明における分子のFc領域に抗Fc抗体が結合することで、複数の分子が会合し、それにより細胞に取り込まれやすくなることが知られている(J Immunol. 2013 Jun 15;190(12):6694-706)。本発明における分子がFc領域を含む場合、抗Fc抗体の添加により会合した当該分子を細胞と接触させることにより、当該分子の細胞への取り込み量を増加させ得る。

[0066] (v i i) に関し、取り込み促進剤としては、タンパク質に対する取り込み促進剤が挙げられる。タンパク質に対する取り込み促進剤の例としては、BioPORTER(登録商標)タンパク質運搬試薬(Genlantis Inc.)、PULSin(登録商標)Kit (Polyplus-transfection(登録商標) SA)、Pro-DeliverIN (OZ Biosciences)、L17E Cytosolic Delivery Peptide ((株)ペプチド研究所)などが挙げられる。

取り込み促進剤には、エンドサイトーシス促進剤も含まれる。エンドサイトーシス促進剤としては、例えば、オカダ酸(Drug Delivery System 2016年31巻1号 p. 83-84)などが挙げられる。

取り込み促進剤には、本発明における分子の細胞からの排出を阻害する物

質も含まれる。そのような物質としては、例えば、ABCトランスポーター（ATP-binding cassette transporters）の阻害剤が挙げられる。ABCトランスポーターの阻害剤としては、当該分野において一般的に使用されるものを利用することができ、例えば、MRP2の阻害剤として知られるMK571、Ceefourin™ 1（abcam社製）、Ceefourin™ 2（abcam社製）、エリスロマイシン、チエニルブチルイソチオシアネートなどが挙げられる。

[0067] 工程（a）においては、水性媒体中に、薬学的に活性な成分をさらに添加してもよい。それにより、当該成分の存在下における本発明における分子の*in vitro*薬物動態を評価することができる。薬学的に活性な成分は、当該分子と*in vivo*において併用され得る薬剤であれば特に限定されず、例えば、癌、自己免疫疾患、感染症、神経疾患、骨粗鬆症、変形性膝関節症/肩関節周囲炎、血友病Aなどの疾患の治療剤が挙げられる。

[0068] 工程（b）における*in vitro*薬物動態の測定では、*in vitro*薬物動態の種類に応じて、適切な数値が測定される。測定は、特定の時点で行ってもよいし、経時的に複数回行ってもよい。

[0069] 一実施形態において、*in vitro*薬物動態が細胞内から細胞外への排出量（Efflux量）によって表される場合、排出量は、工程（a）の後、培地などの水性媒体を本発明における分子を含まないものに交換したのち、水性媒体中の当該分子を検出することにより、細胞から細胞外に排出される当該分子の量を測定することで決定される。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態が細胞内から細胞外への排出速度（Efflux速度）である場合、排出速度は、工程（a）の後、培地などの水性媒体を本発明における分子を含まないものに交換したのち、水性媒体中の当該分子を検出することにより、単位時間あたりの当該分子の排出量を測定することで決定される。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態が細胞内分子減少速度によって表される場合、細胞内分子減少速度は、工程（a）の後、培地などの水性媒体を本発明における分子を含まないものに交換したのち、細胞内の当該分子を

検出することにより、単位時間あたりに細胞から減少する当該分子の量を測定することで決定される。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態がFcRnまたは標的からの解離速度によって表される場合、FcRnまたは標的からの解離速度は、工程（a）の後、培地などの水性媒体を本発明における分子を含まないものに交換したのち、水性媒体中の当該分子を検出することにより、単位時間あたりに水性媒体中に排出される当該分子の量を測定することで決定される。

[0070] 工程（b）は、工程（a）において、本発明における分子を細胞に取り込ませる段階において*in vitro*薬物動態を測定する工程であってもよい。そのようにして測定される*in vitro*薬物動態としては、例えば、内在化速度、トランスサイトosis量、K_p値、FcRnまたは標的への結合速度などが挙げられる。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態が内在化速度によって表される場合、内在化速度は、工程（a）において本発明における分子が細胞に取り込まれ得る状態に置かれたのち、単位時間あたりに細胞外から細胞に取り込まれる当該分子の量を測定することで決定される。好ましい態様において、本発明における分子と所定の時間接触させた細胞は、当該分子の量の測定前に、酸性（pH 6.0未満、例えばpH 5.5以下、pH 5.0以下、pH 4.5以下、pH 4.0以下、pH 3.5以下、またはpH 3.0以下）の水性媒体で洗浄され、細胞表面に結合している当該分子が除去される。また例えば、取り込みの開始後に経時的に細胞に取り込まれた分子の量を測定し、得られた測定値を用いてIntegration plot解析を行い、初期の傾きから内在化速度を算出することができる。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態がトランスサイトosis量によって表される場合、トランスサイトosis量は、工程（a）において本発明における分子が細胞に取り込まれ得る状態に置かれたのち、当該分子が細胞を透過する量を測定することで決定される。この目的のために、シート状に培養した細胞を用いることができる。トランスサイトosis量測定に用いられ

得る市販の製品（例えばトランズウェル(登録商標)パーミアブルサポート（Corning）など）を用いてもよい。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態がKp値によって表される場合、Kp値は、工程（a）において本発明における分子が細胞に取り込まれ得る状態に置かれ、所定の時間が経過したのち、当該分子の細胞中の量および水性媒体中の量を測定することで決定される。Kp値は、（細胞中の量）／（水性媒体中の量）により算出される。

一実施形態において、*in vitro*薬物動態がFcRnまたは標的への結合速度によって表される場合、FcRnまたは標的への結合速度は、工程（a）において本発明における分子が細胞に取り込まれ得る状態に置かれたのち、単位時間あたりにFcRnまたは標的に結合した当該分子の量を測定することで決定される。

[0071] 一態様において、本発明の測定方法は、以下の工程、
（c）工程（b）で得られた測定結果から、*in vitro*評価パラメーターを算出する工程
をさらに含み得る。

[0072] 本明細書中、「*in vitro*評価パラメーター」とは、*in vitro*薬物動態として測定された数値から算出される指標を意味する。*in vitro*評価パラメーターを算出することにより、*in vitro*薬物動態の評価および*in vivo*薬物動態の予測が容易になる。

[0073] *in vitro*評価パラメーターとしては、例えば、「クリアランスインデックス」、「HERAインデックス」などの指標が挙げられる。

[0074] 「クリアランスインデックス」は、細胞内から細胞外への排出量（Efflux量）に基づき、以下の3通りの方法のいずれかにより算出される。

Method1：排出開始後0分における細胞内の分子の量および排出開始後240分における細胞外の分子の量を測定し、（240分における細胞外の分子の量）／（0分における細胞内の分子の量）により算出される値をクリアランスインデックスとする。

Method2：排出開始後0分における細胞内の分子の量ならびに排出開始後120分および240分における細胞外の分子の量を測定し、（120分および240分における細胞外の分子の量の平均値）／（0分における細胞内の分子の量）により算出される値をクリアランスインデックスとする。

Method3：排出開始後0分における細胞内の分子の量ならびに排出開始後60分、120分および240分における細胞外の分子の量を測定し、（60分、120分および240分における細胞外の分子の量の平均値）／（0分における細胞内の分子の量）により算出される値をクリアランスインデックスとする。

[0075] 好ましい実施形態において、in vitro評価パラメーターとして、Method3によるクリアランスインデックスが算出される。

[0076] 「HERAインデックス」は、細胞内から細胞外への排出量（Efflux量）に基づき、以下の方法により算出される。

本発明における分子と細胞とをpH6.0の緩衝液中で4時間インキュベーションすることにより、当該分子を細胞内へ取り込ませる。その後、細胞を洗浄し、pH7.4の緩衝液を添加して、細胞から当該分子を排出させる。緩衝液中に排出された分子の量（Rx）および細胞内に残存する分子の量（RAx）を測定する。参照分子（例えば、本発明における分子が変異型タンパク質である場合には野生型タンパク質）についても同様に、排出量（Rwt）および残存量（RAwt）を測定する。（Rx／Rwt）／（RAx／RAwt）により算出される値をHERAスコアとする（非特許文献1）。

[0077] 好ましい実施形態において、本発明の測定方法は、抗体のin vitro薬物動態を測定する方法であって、以下の工程、

（a）抗体とFcRnを発現する細胞とを水性媒体中で接触させることにより、取り込み量が0.068 pmol/2×10⁵cellsより高くなるように前記抗体を前記細胞に取り込ませる工程であって、下記（i）～（iii）の特徴を有する、工程、

（i）前記抗体と前記細胞との接触時間が24時間以上である、

（ii）前記抗体と接触させた後の前記細胞を酸性条件下で洗浄しない、お

よび

(i i i) 前記細胞が、前記抗体の標的を細胞表面に発現している、

(b) 前記抗体の *in vitro* 薬物動態を測定する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で得られた測定結果から、*in vitro* 評価パラメーターを算出する工程

を含み、

前記抗体は、FcRn結合ドメインおよび標的結合ドメインを含み、

in vitro 薬物動態は、細胞内から細胞外への排出量であり、

in vitro 評価パラメーターは、クリアランスインデックスである、前記方法であり得る。

[0078] 本発明の測定方法は、本発明における分子を含む医薬品の品質確保または薬効の予測のために使用され得る。

[0079] 一実施形態において、医薬品の品質確保のために、例えば、本発明の方法を、医薬品の規格試験として、医薬品の製造工程の一部に組み込むことができる。*in vitro* 薬物動態の測定値または *in vitro* 評価パラメーターが含まれるべき範囲を規格として定め、当該規格を満たす製品を製造することで、医薬品の品質を一定に保つことができる。

[0080] 一実施形態において、本発明の測定方法により *in vitro* 薬物動態を測定することにより、薬効を予測し得る。例えば、いくつかの自己免疫性疾患においては、自己抗原に対する自己抗体が増加し末梢を攻撃することで自己免疫反応を起こすことが知られている。細胞内に取り込まれた自己抗体が、FcRnを介して細胞外に排出されることを阻害することで自己抗体を減少させる試みとして、ヒト血漿由来IgGを大量に静注する免疫グロブリン製剤（例えば、ハイゼントラ（登録商標）（CSFベーリング社））の使用が報告されており、またFcRn阻害薬が自己免疫疾患治療薬として開発される可能性も報告されている（日薬理誌（Folia Pharmacol. Jpn.）136, 280～284（2010））。したがって、本発明の測定方法により対象分子の *in vitro* 薬物動態を測定し、それに基づき当該分子のFcRnとの結合性を評価することで、薬効を予測できる場

合がある。

また本発明の測定方法によりin vitro薬物動態を測定し、それに基づきin vivo薬物動態を予測することにより、薬効を予測し得る（後述の11）。

特定の実施形態において、薬効の予測は、薬物間相互作用の予測であり得る。例えば、工程（a）において本発明における分子と薬学的に活性な他の成分とを細胞と接触させ、当該成分の存在下でのin vitro薬物動態を測定することにより、当該成分が当該分子の薬効にどのような影響を与えるかを予測することができる。

[0081] 11. 分子のin vivo薬物動態を予測する方法

本発明の第二の態様は、分子のin vivo薬物動態を予測する方法に関する（以下、本発明の予測方法と称する）。

[0082] 本発明の予測方法は、以下の工程

（a'）本発明の測定方法により、in vitro薬物動態を測定する工程、および

（b'）工程（a'）で得られた測定値またはin vitro評価パラメーターから、前記分子を生体に投与した場合のin vivo薬物動態を予測する工程を含む。

[0083] 工程（a'）は、上記1の記載に従って行われる。

[0084] 工程（b'）では、工程（a'）で得られた測定値またはin vitro評価パラメーターから、あらかじめ算出しておいたin vitro薬物動態の測定値またはin vitro評価パラメーターとin vivo薬物動態との間の相関関係に基づき、in vivo薬物動態を予測する。相関関係は、以下に示すマウスを用いた場合の具体例と同様にして、各分子、生物種、ならびにin vitro薬物動態およびin vivo薬物動態の種類に応じて決定される。

[0085] ここでは、参照分子について、in vitro薬物動態として細胞内から細胞外への排出量を測定し、in vitro評価パラメーターとしてクリアランスインデックス（Method3）を算出し、in vivo薬物動態として血漿中半減期またはクリアランスを予測する例を示す。参照分子は、本発明における分子と同じ種

類の分子（例えば、タンパク質、ペプチド化合物、核酸、トキシン、ウイルス、ナノ粒子・マイクロ粒子などのDDS製剤など）であって、同じ標的を有する分子から選択される。例えば、本発明における分子と参照分子とが抗体である場合、それらは同じ抗原（好ましくは同じエпитープ）に結合する。参照分子は、例えば、本発明における分子が人工物（例えば、変異型タンパク質、変異型ペプチド化合物、変異型核酸など）である場合、その作製において基準とした分子（例えば、野生型タンパク質、野生型ペプチド化合物、野生型核酸など）および／または当該人工物と同様にして作製された別の分子であり得る。相関関係の決定のために使用される参照分子は、1つ以上であり、好ましくは2つ以上（例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上、10個以上）である。

- [0086] 参照分子の*in vitro*薬物動態は、本発明における分子と同様に、本発明の測定方法によって測定される。必要に応じて、*in vitro*薬物動態の測定結果から*in vitro*評価パラメーターが算出される。
- [0087] *in vivo*薬物動態については、FcRnを発現するマウスに参照分子を尾静脈投与し、投与から28日後まで血漿中抗体濃度を経時的に測定し、ノンコンパートメントモデル解析により血漿中半減期またはクリアランスを算出する。
- [0088] 参照分子について、*in vitro*薬物動態の測定値または*in vitro*評価パラメーターの値と、血漿中半減期またはクリアランスの値とをプロットする。取得したデータに基づき、回帰直線を作成してもよい。このようにして*in vitro*薬物動態の測定値または*in vitro*評価パラメーターと*in vivo*薬物動態との間の相関関係を算出することができる。
- [0089] 本発明の予測方法における*in vivo*薬物動態は、特に限定されず、例えば、バイオアベイラビリティ、分布容積、血中非結合形分率、クリアランス、尿中排泄率、血中濃度半減期、または平均滞留時間であり得る。好ましい態様において、*in vivo*薬物動態は、クリアランスまたは血中濃度半減期であり、*in vitro*評価パラメーターはクリアランスインデックスである。
- [0090] 一実施形態において、生体は、ヒト、サル、ミニブタ、ラット、マウス、

ウサギ、イヌ、モルモット、ハムスター、チンパンジー、マーモセット、フェレット、またはネコであり得る。本発明の予測方法が、実験動物の使用数の削減を目的として使用される場合、生体は、非ヒト動物であり、例えば、サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはモルモットであり得る。

[0091] 本発明の予測方法によれば、*in vitro*の試験により、血漿中半減期、クリアランスなどの*in vivo*薬物動態を予測することができる。したがって、本発明の予測方法は、動物を用いた*in vivo*薬物動態試験の代替として使用される。その結果、*in vivo*薬物動態試験回数および実験動物の使用数を削減することができ、本発明は動物倫理の観点からも有用である。

[0092] III. 分子のスクリーニング方法

本発明の第三の態様は、分子のスクリーニング方法に関する（以下、本発明のスクリーニング方法と称する）。

[0093] 本発明のスクリーニング方法は、以下の工程

(a'') 同一の標的に結合する異なる2以上の分子を準備する工程、

(b'') 工程(a'')で準備した2以上の分子それぞれについて、本発明の測定方法により、*in vitro*薬物動態を測定する工程、および

(c'') 工程(b'')で得られた、2以上の分子それぞれについての測定値または*in vitro*評価パラメーターを相互に比較し、望ましい値を示した分子を選択する工程

を含む。

[0094] 工程(a'')における2以上の分子は、それぞれが上記Iに記載した本発明における分子である。当該2以上の分子は、同じ種類の分子であり、同じ標的を有し、かつ互いに異なる分子である。例えば、当該2以上の分子が抗体である場合、それらは、同じ親抗体由来の互いに異なる改変体であり得る。

[0095] 工程(b'')は、2以上の分子それぞれについて、上記Iの記載に従って行われる。

[0096] 工程(c'')において、望ましい*in vitro*薬物動態の測定値または*in vi*

tro評価パラメーターの値を示した分子を選択する。望ましい値は、in vitro薬物動態の種類によって変わり得るが、例えば、FcRnまたは標的との結合活性がより高いことを示す値であり得る。in vitro薬物動態が、細胞内から細胞外への排出量、細胞内から細胞外への排出速度、トランスサイトーシス量、または細胞内分子減少速度である場合、値が高いほどFcRnとの結合活性が高いことを示す。またin vitro薬物動態が、内在化速度であり、細胞が標的を発現している場合、値が高いほど標的との結合活性が高いことを示す。選択された各分子は、その特徴に応じた用途（医薬品など）に用いることができ、さらなる試験に供されてもよい。

[0097] 本発明のスクリーニング方法によれば、in vivo薬物動態試験を行うことなく、所望の特徴を有する分子を選択することができる。その結果、in vivo薬物動態試験回数および実験動物の使用数を削減することができ、本発明は動物倫理の観点からも有用である。

[0098] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

[0099] 本発明を実施例によりさらに詳しく説明する。

実施例

[0100] 実施例 1 各Fc改変体のマウス血漿中薬物動態評価

(1-1) 取り込み評価に用いた抗体のFc領域の特性

WO 2012/133782 A1、WO 2013/046704 A2、WO 2017/046994 A1、WO 2009/125825 A1に記載のFcを持つ抗IL-6R抗体である、H237-G1d、H237-F1847m、H237-F1886m、H237-F1927m、H237-F890を用いた。

H237-G1dの重鎖配列はWO 2012/133782 A1の配列番号：79のアミノ酸配列である。

H237-F1847mの重鎖配列はWO 2017/046994 A1の配列番号：50のアミノ酸配列である。

H237-F1886mの重鎖配列はWO 2017/046994 A1の配列番号：52のアミノ酸配列である。

H237-F1927mの重鎖配列はW0 2017/046994 A1の配列番号：54のアミノ酸配列である。

H237-F890の重鎖配列はW0 2013/046704 A2の配列番号：6のアミノ酸配列である。

これらの軽鎖配列はいずれもW0 2009/125825 A1の配列番号：27のアミノ酸配列である。

[0101] (1-2) マウスにおける血漿中薬物動態評価

マウスFcRnノックアウト／ヒトFcRnトランスジェニックマウス (Tg#32、雄性)に、H237-G1d、H237-F1847m、H237-F1886m、H237-F1927m、およびH237-F890のいずれか1つの抗体1 mg/kgと、Sanglopor (乾燥pH4処理人免疫グロブリン、CSLベ어링) 1000 mg/kgとを尾静脈投与し、5分後から28日後まで経時的に頸静脈採血を行った。得られた血液を遠心分離(12000rpm、4℃、5分)し、血漿を得た。血漿中抗体濃度は、投与抗体に対する捕獲抗体・検出抗体を使った電気化学発光免疫測定法 (ECL) を用いて測定した。また、得られたPKプロファイルを用いて、Non-compartment model解析を行い、半減期およびクリアランスを算出した。

[0102] 結果を図1に示す。H237-F1847m、H237-F1886m、およびH237-F1927mは、H237-G1dおよびH237-F890に比べて消失相における傾きが緩やかであり、血漿からの消失がより緩やかな傾向を示した。算出したPKパラメータを表1に示す。終末相における半減期はH237-F1886mが最も長く、H237-F1927mおよびH237-F1847mもH237-G1dに比べて長かった。H237-F890は最も短い半減期を示した。また、クリアランスは、H237-F1886mが最も小さく、H237-F1927mおよびH237-F1886mもH237-G1dに比べて小さかった。

[0103]

[表1]

表1：血漿中における各抗体の半減期およびクリアランス

	Half-life (day)	Clearance (mL/day/kg)
G1d	12.3	9.50
F1847m	17.2	6.02
F1886m	22.2	4.05
F1927m	19.6	5.16
F890	8.54	8.44

[0104] 実施例2 各Fc改変体の細胞取り込み比較

(2-1) Fc領域改変抗体のAlexa647標識

Alexa flour 647 labeling kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、添付のプロトコルにしたがってH237-G1d、H237-F1847m、H237-F1886m、H237-F1927m、およびH237-F890をAlexa647 (AF647) で標識した。各抗体の濃度、および蛍光物質の標識効率、吸光度をNanodrop (Thermo Fisher Scientific) で測定し、添付のプロトコルに記載の計算式にしたがって算出した。

[0105] (2-2) Fc領域改変抗体のhFcRn-hIL6R-CHO細胞およびhFcRn-CHO細胞における取り込み評価

完全培地 (CHO-S-SFM II (Invitrogen)) 中に 2×10^5 個のヒトFcRnおよびヒトIL-6Rを強制発現させたCHO細胞 (hFcRn-hIL6R-CHO細胞 (Chiome Bioscience)) ; CHO細胞にCMVプロモーターを含む発現ベクター (pcDNA3.1 vector, Invitrogen) を導入して作製された。) またはヒトFcRnのみを強制発現させたCHO細胞 (hFcRn-CHO細胞 (Chiome Bioscience)) ; CHO細胞にCMVプロモーターを含む発現ベクター (pcDNA3.1 vector, Invitrogen) を導入して作製された。) を含む細胞溶液 $50 \mu\text{L}$ に、AF647標識した抗体を終濃度が $50 \mu\text{g/mL}$ になるように添加し、96-wellプレート中 $100 \mu\text{L/well}$ とした。その後、CO₂インキュベーター内で37℃で24時間反応させた。その後氷冷し、細胞を冷2% FBS含有PBS (FBS-PBS) で洗浄した。細胞の蛍光強度はFACS CantoII (Becton, Dickinson

and Company) を用いて測定した。

アッセイを行った細胞に加えて、Quantum MESF (Bangs Laboratories) を用い、添付のプロトコルにしたがって、蛍光標識された標品ビーズの蛍光強度も測定した。添付のプロトコルにしたがって、各標品の幾何平均蛍光強度から検量線を描き、各抗体を取り込ませた試料の幾何平均蛍光強度から、各抗体の取り込み量を算出した。

[0106] 結果を図2に示す。各抗体の取り込み量は、hFcRn-CHO細胞に比べてhFcRn-hIL6R-CHO細胞において、2.2～36倍の範囲で増加した。

[0107] 実施例3 各Fc改変体の経時的な細胞取り込み評価

2x10⁵個のhFcRn-hIL6R-CHO細胞を含む細胞溶液50 μ Lに、AF647標識した抗体を終濃度が50 μ g/mLになるように添加し、96-wellプレート中100 μ L/wellとした。その後、プレートを攪拌しながら37°Cで最大24時間まで経時的に反応させた。その後氷冷し、冷2% FBS含有PBSを加え、細胞をFBS-PBSもしくはpH3.0に調整した培地 (Acid) で1回洗浄した。その後、遠心 (1000g, 3min) により細胞を回収した。細胞の蛍光強度は、FACS CantoIIを用いて測定した。

アッセイを行った細胞に加えて、Quantum MESF (Bangs Laboratories) を用い、添付のプロトコルにしたがって、蛍光標識された標品ビーズの蛍光強度も測定した。添付のプロトコルにしたがって、各標品の幾何平均蛍光強度から検量線を描き、各抗体を取り込ませた試料の幾何平均蛍光強度から、各抗体の取り込み量を算出した。

[0108] 結果を図3(a)および(b)に示す。各抗体で時間依存的な取り込み量の増大が見られた。H237-F890およびH237-F1886mは、FBS-PBS洗浄およびAcid洗浄のいずれにおいても、H237-G1d、H237-F1847m、およびH237-F1927mに比べて、やや高い取り込み量を示した。

得られた抗体取り込み量の測定値を用いてIntegration plot解析を行い、初期の傾きから内在化速度を算出した。Integration plot解析の結果を図3(c)に示す。また算出された内在化速度を表2に示す。H237-F890は、H237-G1d、H237-F1847m、H237-F1886m、およびH237-F1927mに比べて、やや高い値を示し

た。

[0109] [表2]

表2：各抗体の内在化速度 (kint)

	kint (1/day)
G1d	20.5
F1847m	19.1
F1886m	24.0
F1927m	32.5
F890	63.0

[0110] 実施例4 各Fc改変体の細胞内抗体量および培地中への排出 (efflux) 量の経時的評価

(4-1) 細胞内抗体量および培地中への排出量の経時的評価

2x10⁵個のhFcRn-hIL6R-CHO細胞を含む細胞溶液50 μLに、AF647標識した抗体を終濃度が50 μg/mLになるように添加し、96-wellプレート中100 μL/wellとした。その後、37℃で24時間インキュベーションした。その後氷冷し、冷2% BSA含有培地の添加と除去を行い、新鮮な2%BSA含有培地を100 μL加え、37℃で最大4時間まで反応させ、経時的にサンプリングした。各時点の試料を遠心した後、上清を回収するとともに、細胞をFBS-PBSで洗浄した。上清中の抗体濃度は、電気化学発光免疫測定法 (ECL) を用いて測定した。また、細胞の蛍光強度は、FACS CantoIIを用いて測定し、標品ビーズの蛍光強度から細胞に含まれる抗体量を算出した。

[0111] 結果を図4(a)に示す。いずれの抗体についても、時間依存的な細胞内抗体量の減少が確認された。H237-F890の細胞内抗体量は、高い値で推移した。

また、培地中に排出された抗体量の時間推移を図4(b)に示す。いずれの抗体も排出の開始後30分前後まで、急速に排出され、その後プラトーに達することが確認された。排出の開始後10分までは、いずれの抗体についてのグラフも同様の傾きを示したが、60分以降は、各抗体で培地中抗体量に差が見られ、H237-F1886mが最も多く、H237-G1dが最も少ない量を示した。

[0112] (4-2) クリアランスインデックスの算出

排出開始後0分における細胞内抗体量、および各時点までに培地中に排出された抗体量を用いて、以下に示す3通りの計算式でクリアランスインデックスを算出した。

Method1: (240分における培地中の抗体量) / (0分における細胞内の抗体量)

Method2: (120分および240分における培地中の抗体量の平均) / (0分における細胞内の抗体量)

Method3: (60分、120分、および240分における培地中の抗体量) / (0分における細胞内の抗体量)

上記の各方法で算出したクリアランスインデックスの値を表4に示す。いずれの抗体においても、0.30~0.70程度の数値となった。各抗体について3つの方法で算出した値は、概ね同程度の値を示した。抗体間の値の大小も、3つの方法で同じ傾向を示した。

[0113] [表3]

表3: 各抗体のクリアランスインデックス

	G1d	F1847m	F1886m	F1927m	F890
Method1	0.46	0.49	0.71	0.56	0.28
Method2	0.45	0.50	0.71	0.56	0.39
Method3	0.49	0.63	0.73	0.62	0.41

[0114] 実施例5 クリアランスインデックスとin vivo薬物動態との相関

実施例4で算出したクリアランスインデックスと実施例1で測定したin vivoにおける半減期またはクリアランスとの相関を評価した。結果を図5に示す。in vivoにおける半減期およびクリアランスのいずれも、クリアランスインデックスとの間に強い相関が見られた(それぞれ $R^2=0.961$ および $R^2=0.822$)。したがって、Method1~3により算出されるクリアランスインデックスにより、in vivoにおける血漿中半減期またはクリアランスを予測可能であることが示された。

産業上の利用可能性

[0115] 本発明によれば、従来よりも簡便に、高精度で、多数の医薬品候補物質の *in vivo* 薬物動態を予測することが可能となる。また本発明は、実験動物の使用数削減、より薬理効果の高い医薬品の開発などに貢献することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 分子のin vitro薬物動態を測定する方法であって、以下の工程、
- (a) 分子とFcRnを発現する細胞とを水性媒体中で接触させることにより、取り込み量が $0.068 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように前記分子を前記細胞に取り込ませる工程であって、下記(i)～(iii)から選択される少なくとも1つの特徴を有する、工程、
 - (i) 前記分子と前記細胞との接触時間が5時間以上である、
 - (ii) 前記分子と接触させた後の前記細胞を酸性条件下で洗浄しない、および
 - (iii) 前記細胞が、前記分子の標的を細胞表面に発現している、ならびに
 - (b) 前記分子のin vitro薬物動態を測定する工程、
- を含み、
- 前記分子は、FcRn結合ドメインを含む、前記方法。
- [請求項2] 分子が、FcRn結合ドメインおよび標的結合ドメインを含む抗体である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記細胞が、FcRnを発現するように形質転換された細胞である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記細胞が、前記分子の標的を細胞表面に発現するように形質転換された細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記細胞が、CHO細胞、HEK293細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、MDCK細胞、HMEC1細胞、HELA細胞、HepG2細胞、またはBaF細胞である、請求項3または4に記載の方法。
- [請求項6] 前記細胞が、肝臓実質細胞、肝臓非実質細胞、肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、末梢血単核球PBMC、マクロファージ、単核球、B細胞、T細胞、血小板、NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球、顆粒球、または樹状細胞である、請求項1または2に記載の方法。

- [請求項7] 取り込み量が $0.10 \text{ pmol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ より高くなるように前記分子を前記細胞に取り込ませる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] *in vitro*薬物動態が、細胞内から培養液中への排出量、細胞内から培養液中への排出速度、内在化速度、トランスサイトーシス量、K_p値、細胞内分子減少速度、FcRnまたは標的への結合速度、あるいはFcRnまたは標的からの解離速度である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] FcRnが、ヒトFcRn、サルFcRn、ミニブタFcRn、ラットFcRn、マウスFcRn、ウサギFcRn、イヌFcRn、またはモルモットFcRnである、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 以下の工程、
(c) 工程(b)で得られた測定結果から、*in vitro*評価パラメーターを算出する工程
をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] *in vitro*評価パラメーターが、クリアランスインデックスまたはHERAスコアである、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 前記分子を含む医薬品の品質確保または薬効の予測のために使用される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項13] 前記分子の標的が、膜タンパク質である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] 前記分子の標的が、ヒトIL6受容体である、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 分子の*in vivo*薬物動態を予測する方法であって、
(a') 請求項1～14のいずれか一項に記載の方法により、*in vitro*薬物動態を測定する工程、および
(b') 工程(a')で得られた測定値または*in vitro*評価パラメーターから、前記分子を生体に投与した場合の*in vivo*薬物動態を予測

する工程

を含む、前記方法。

[請求項16] *in vivo*薬物動態が、バイオアベイラビリティ、分布容積、血中非結合形分率、クリアランス、尿中排泄率、血中濃度半減期、または平均滞留時間である、請求項15に記載の方法。

[請求項17] 生体が、ヒト、サル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはモルモットである、請求項15または16に記載の方法。

[請求項18] 動物を用いた薬物動態試験の代替として使用される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 分子のスクリーニング方法であって、
(a'') 同一の標的に結合する異なる2以上の分子を準備する工程、
(b'') 工程(a'')で準備した2以上の分子それぞれについて、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法により、*in vitro*薬物動態を測定する工程、および
(c'') 工程(b'')で得られた、2以上の分子それぞれについての測定値または*in vitro*評価パラメーターを相互に比較し、望ましい値を示した分子を選択する工程
を含む、前記方法。