

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7586833号  
(P7586833)

(45)発行日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(24)登録日 令和6年11月11日(2024.11.11)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/42 (2006.01)	C 0 7 K	16/42	Z N A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
請求項の数 31 (全112頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-559827(P2021-559827)	(73)特許権者	517303085	
(86)(22)出願日	令和2年4月9日(2020.4.9)		アルジェニクス ビーバイ	
(65)公表番号	特表2022-528927(P2022-528927 A)		ベルギー 9 0 5 2 ヘント インダスト	
			リエパーク ズウィジナルデ 7	
(43)公表日	令和4年6月16日(2022.6.16)	(74)代理人	100097456	
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/060240		弁理士 石川 徹	
(87)国際公開番号	WO2020/208177	(72)発明者	マイケル サウンダース	
(87)国際公開日	令和2年10月15日(2020.10.15)		ベルギー ビー 9 0 5 2 ヘント イン	
審査請求日	令和5年4月7日(2023.4.7)		ダストリエパーク ズウィジナルデ 7	
(31)優先権主張番号	1905150.7	(72)発明者	レネ ビジリマナ	
(32)優先日	平成31年4月11日(2019.4.11)		ベルギー ビー 9 0 5 2 ヘント イン	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(72)発明者	ダストリエパーク ズウィジナルデ 7	
			クリストフ ブランシェット	
			ベルギー ビー 9 0 5 2 ヘント イン	
			ダストリエパーク ズウィジナルデ 7	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗 I g E 抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IgEに結合する抗体であって、該抗体は、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合するバリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含み、該バリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、それぞれ、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む、前記抗体。

【請求項 2】

前記バリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、野生型IgG Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

前記バリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、野生型ヒトIgG Fcドメインと比べて増大した親和性でヒトFcRnに結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項 4】

前記バリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比べて増大した親和性でヒトFcRnに結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項 5】

前記バリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、pH 6.0及びpH 7.4で、増大した親和性でヒトFcRnに結合する、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 6】

pH 6.0でのヒトFcRnに対する前記バリエントFcドメイン又はそのFcRn結合断片の結合

親和性が、 $K_D$  15nMよりも強い、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項7】

pH 7.4でのヒトFcRnに対する前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片の結合親和性が、 $K_D$  320nMよりも強い、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項8】

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、アミノ酸置換M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434Fを含む、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項9】

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、それぞれ、EU位置252、308、及び434のアミノ酸Y、P、及びYの組合せを含まないか、又はアミノ酸置換：M252Y、V308P、及びN434Yの組合せを含まない、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体。

10

【請求項10】

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、バリエーションヒトFcドメイン又はそのFcRn結合断片である、及び/又は

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、バリエーションIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である、及び/又は

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、バリエーションIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である、請求項1～9のいずれか一項記載の抗体。

【請求項11】

前記バリエーションFcドメインが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる、請求項1～10のいずれか一項記載の抗体。

20

【請求項12】

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、バリエーションFc領域内に含まれ、該バリエーションFc領域が、2つのFcドメイン又はそのFcRn結合断片からなり、

任意に、該バリエーションFc領域の該2つのFcドメイン又はFcRn結合断片が同一である、請求項1～11のいずれか一項記載の抗体。

【請求項13】

(i) 前記バリエーションFc領域が、CD16aに対する増大した親和性を有する；

(ii) 前記バリエーションFc領域のFcドメインが、EU位置297にN-結合型グリカンを含む；

30

(iii) 前記バリエーションFc領域のFcドメインが、EU位置297に脱フコシル化N-結合型グリカンを含む；又は

(iv) 前記バリエーションFc領域のFcドメインが、該FcドメインのEU位置297にバイセクティングGlcNAcを有するN-結合型グリカンを含む、請求項12記載の抗体。

【請求項14】

(i) 前記抗体が、IgEのCH3ドメインに結合する；

(ii) 前記抗体が、IgEのFc RIへの結合を阻害する；

(iii) 前記抗体が、肥満細胞又は好塩基球の脱顆粒を阻害する；及び/又は

(iv) 前記抗体が、アナフィラキシー性ではない、請求項1～13のいずれか一項記載の抗体。

40

【請求項15】

前記抗体が、中性pHよりも酸性pHで低い抗原結合活性を示し、

任意に、酸性pHでの抗原結合活性と中性pHでの抗原結合活性の比が、 $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ によって測定したとき、少なくとも2であり、

任意に、1以上のCDRが1以上のHis置換を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の抗体。

【請求項16】

前記抗体がIgG抗体である、請求項1～15のいずれか一項記載の抗体。

【請求項17】

50

前記抗体がIgG1抗体である、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体。

【請求項18】

前記抗体が、

【化1】

配列番号:180 [FSHFSGSNHDYFDY]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3;

【化2】

配列番号:152 [EIDPGTFTTNYNEKFKA]

10

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2;

【化3】

配列番号:179 [WYHLE]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1;

【化4】

配列番号:157 [QQSWSWPTT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3;

【化5】

配列番号:156 [YASESIS]

20

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

【化6】

配列番号:155 [RASQSIGTNIH]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

を含む、請求項1～17のいずれか一項記載の抗体。

【請求項19】

前記抗体が、配列番号186のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号158のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、95%、98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、請求項18記載の抗体。

30

【請求項20】

請求項1～19のいずれか一項記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド(単数)又はポリヌクレオチド(複数)。

【請求項21】

前記抗体の発現を可能にする調節配列に機能的に連結された請求項20記載のポリヌクレオチド(単数)又はポリヌクレオチド(複数)を含む、発現ベクター。

【請求項22】

40

請求項21記載の発現ベクターを含有する、宿主細胞又は無細胞発現系。

【請求項23】

組換え抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、請求項22記載の宿主細胞又は無細胞発現系を該抗体又は抗原結合断片の発現を可能にする条件下で培養すること、及び該発現された抗体又は抗原結合断片を回収することを含む、前記方法。

【請求項24】

請求項1～19のいずれか一項記載の抗体及び少なくとも1つの医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項25】

医薬として使用するための、請求項1～19のいずれか一項記載の抗体を含む医薬組成物

50

又は請求項24記載の医薬組成物。

【請求項26】

対象の抗体媒介性障害を治療する方法に使用するための、請求項1～19のいずれか一項記載の抗体を含む医薬組成物又は請求項24記載の医薬組成物であって、

該方法が、それを必要としている患者に、治療有効量の該医薬組成物を投与することを  
含む、前記医薬組成物。

【請求項27】

前記抗体媒介性障害が、自己免疫疾患であり、

任意に、該自己免疫疾患が、同種異系脾臓移植拒絶反応、円形脱毛症、アミロイド症、  
強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、アルツハイマー病、抗好中球  
細胞質自己抗体(ANCA)、自己免疫性血球減少症、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血  
性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性心筋炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性卵巣  
炎及び精巣炎、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性蕁麻疹、ベーチェット病、水疱性類  
天疱瘡、心筋症、キャスルマン症候群、セリアックスプルー-皮膚炎、慢性疲労免疫機能  
不全症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、慢性誘発性蕁麻疹、慢性自発性蕁麻疹  
、チャージ-ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クロー  
ン病、皮膚筋炎、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、第VIII因子欠乏症、  
線維筋痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、グッドパスチャ  
ー症候群、移植片対宿主病(GVHD)、橋本甲状腺炎、血友病A、特発性肺線維症、特発性血  
小板減少性紫斑病(ITP)、IgAニューロパチー、IgM多発ニューロパチー、免疫媒介性血小  
板減少症、若年性関節炎、川崎病、扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、  
メニエール病、混合性結合組織疾患、菌状息肉腫、多発性硬化症、1型真性糖尿病、多巣  
性運動ニューロパチー(MMN)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天  
疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多内分泌腺症候群、リウマチ性多発  
筋痛、多発性筋炎及び皮膚筋炎、多発性神経炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性  
胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サ  
ルコイドーシス、強皮症、シャープ症候群、シェーグレン症候群、固形臓器移植片拒絶反  
応、スティッフマン症候群、全身エリテマトーデス、高安動脈炎、中毒性表皮壊死症(TEN  
)、スティーブンス-ジョンソン症候群(SJS)、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血栓性血小板  
減少性紫斑病、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、疱疹状皮膚炎型血管炎  
、抗好中球細胞質抗体関連血管炎、白斑、並びにウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択  
される、請求項26記載の使用のための医薬組成物。

【請求項28】

前記自己免疫疾患が、慢性自発性蕁麻疹又は水疱性類天疱瘡である、請求項27記載の使  
用のための医薬組成物。

【請求項29】

治療のための医薬の製造における請求項1～19のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項30】

対象における抗体媒介性障害を治療するための医薬の製造における請求項1～19のい  
ずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項31】

慢性自発性蕁麻疹又は水疱性類天疱瘡を治療するための医薬の製造における請求項1～  
19のいずれか一項記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、IgEに結合する抗体及び自己免疫疾患、特に、水疱性類天疱瘡(BP)及び慢性  
自発性蕁麻疹(CSU)の治療におけるその使用に関する。抗IgE抗体は、野生型Fcドメイン  
と比べて増大した親和性でFc受容体FcRnに結合するバリエーションFcドメインを含む。抗IgE

10

20

30

40

50

抗体は、ABDEG(商標)技術を組み込んでいるバリエーションFcドメインを含むことができ、ここで、バリエーションABDEG(商標) Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する。FcRnは、IgG自己抗体を含むIgG抗体の血漿再循環に重要である。したがって、本発明の抗IgE抗体は、自己免疫疾患の治療におけるIgE及びIgG自己抗体の二重標的化を提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

(発明の背景)

免疫グロブリンE(IgE)は、1966年に最初に発見された。これは、最も存在量の少ない免疫グロブリンクラス又はアイソタイプである。IgE分子は、主に、肥満細胞及び好塩基球上の受容体、具体的には、Fc RI受容体とのその高親和性会合により、ヒトアレルギーにおいて中心的な役割を果たす。IgE分子へのアレルゲン結合は、Fc RI受容体架橋を引き起こし、それにより、「脱顆粒」と呼ばれるプロセスにおけるエフェクター細胞からのヒスタミン及び他の炎症性メディエータの放出が誘発される。IgE媒介性刺激は、炎症応答を生じる数多くのサイトカイン及び他の因子の合成も引き起こす。IgEは、B細胞、マクロファージ、及び血小板を含む細胞型に位置する低親和性受容体(Fc RII又はCD23)とも会合する。

#### 【0003】

喘息、アレルギー性鼻炎、及び他のアレルギー性障害などの疾患においてIgE分子により果たされる中心的な役割を考慮して、IgEは、長い間、これらの疾患の魅力的な治療標的となっている。IgEを標的とする薬剤、例えば、抗体を開発する上での課題は、それ自体、IgE受容体複合体を架橋しない薬剤を産生することである、すなわち、該薬剤は、非アナフィラキシー誘発性でなければならない。喘息及びアレルギー性障害などの疾患において、肥満細胞及び好塩基球の脱顆粒の誘因は、特異的IgE抗体の外因性リガンドである。つい最近、自己抗原を認識するIgE抗体も、その同族リガンドに応答して脱顆粒を誘発することができることが明らかになった。したがって、IgEは、いくつかの形態の慢性蕁麻疹(CSU及びCIndUを含む)、並びに水疱性類天疱瘡などの自己免疫疾患において役割を果たすことができる。数多くの他の自己免疫疾患も、自己抗原を認識するIgE抗体が関与する可能性がある(Maurerらの文献、Frontiers in Immunology(2018)9: 1-17;及びSanjuanらの文献 JACI 137(6): 1651-1661を参照されたい)。

#### 【0004】

オマリズマブは、IgEに対する高い結合親和性を有するヒト化モノクローナル抗IgE抗体である(総説については、Kawakiらの文献、J. Immunol.(2016) 197(11): 4187-9192;及びSchulman E.S.の文献、Am J Respir Crit Care Med.(2001) 164: S6-S11を参照されたい)。オマリズマブは、血清IgE分子に結合することにより、アレルギー応答を阻害し、それにより、IgEとIgE受容体との相互作用を妨げる。Fc RIに結合したIgEを架橋することができる他の抗IgE抗体とは異なり、オマリズマブは、アナフィラキシー効果を引き起こさない。オマリズマブは、遊離IgEのC 3(又はCH3)ドメインに結合し、それがFc RIに結合するのを妨げる。血清IgEを枯渇させることにより、オマリズマブは、肥満細胞及び好塩基球並びに抗原提示細胞上でのFc RIの発現も下方調節する。その後、これにより、これらの細胞の脱顆粒に対する感受性が低くなり、そのため、肥満細胞及び好塩基球の活性化が制限される。遊離IgEの枯渇並びに肥満細胞及び好塩基球上でのFc RIの下方調節に加えて、オマリズマブは、種々の他の機構を介して、その治療効果を発揮し得ることが示唆されている。

#### 【0005】

オマリズマブは、アレルギー性喘息の治療において、US及びEUで初めて承認された。2014年に、これは、慢性自発性蕁麻疹(CSU)を有する患者での使用が承認された。CSUは、消耗性の高い皮膚病である。これは、6週間を超える期間の痒みを伴う膨疹及び潮紅皮膚反応、血管性浮腫、又はその両方の存在を特徴とする。CSUで観察される膨疹及び血管性浮腫は、皮膚肥満細胞の脱顆粒を伴うように見え、これにより、血小板活性化因子及び

10

20

30

40

50

他のアラキドン酸代謝物質の生成とともに、ヒスタミン、プロテアーゼ、及びサイトカインが放出される。これらのメディエータは、血管拡張を誘導し、血管透過性を増大させ、腫脹、発赤、及び痒みをもたらす感覚神経終末を刺激する。病変部位又は膨疹は、浮腫、肥満細胞脱顆粒、並びに細胞 - CD4+リンパ球、単球、好中球、好酸球、及び好塩基球の血管周囲浸潤を特徴とする。CSUを有する患者の約半数は、抗ヒスタミン薬でうまく治療することができる。しかしながら、抗ヒスタミン薬が機能しない患者では、オマリズマブが二次治療として承認されている(総説については、Ferrer M.の文献、Clin Transl Allergy(2015) 5:30; Kolchirらの文献、J Allergy Clin Immunol.(2017) 139: 1772-81; Kaplan A.P.の文献、Allergy Asthma Immunol Res.(2017) 9(6): 477-482を参照されたい)。

10

#### 【0006】

オマリズマブがCSUを有する患者でその治療効果を発揮する機能を解明するために、多くの研究が実施されている(Changらの文献、J Allergy Clin Immunol.(2015) 135: 337-42;及びKaplanらの文献、Allergy(2017) 72(4): 519-533を参照されたい)。IgEは、明らかに、CSUの発病において重要な役割を果たしており、累積証拠により、IgEが、肥満細胞上のFc RIへの結合によって、これらの細胞の増殖及び生存を促進し、それにより、肥満細胞プールを拡大することができることが示されている。IgEとFc RIのエンゲージメントは、肥満細胞の放出閾値を減少させ、様々な刺激に対するその感受性を増大させることもできる。オマリズマブによるこれらの効果の逆転は、少なくとも一部は、CSUの治療におけるその有効性の主な原因である可能性が高い。

20

#### 【0007】

上記に加えて、CSUは、重要な自己免疫成分を有することが観察されている。実際、自己免疫プロセスは、CSUのほとんどの症例の主な原因であり得ることが示唆されている。CSU患者は、高い頻度で全IgEレベルの増加を示し、関連自己免疫疾患、特に、橋本甲状腺炎などの甲状腺自己免疫障害を有する。研究により、CSU患者血清中の甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)及びdsDNAに対する自己反応性IgE分子の存在が報告されている。それゆえ、オマリズマブは、少なくとも一部は、自己反応性IgE抗体を阻害することにより、その治療効果を発揮する可能性が高い。

#### 【0008】

CSUに加えて、自己反応性IgEの病態生理学的役割は、SLEなどの全身症状及びグレーブス病などの組織特異的疾患を含む、いくつかの他の自己免疫疾患で観察されている。IgE自己抗体が重要な役割を果たすと考えられる1つの疾患は、水疱性類天疱瘡(BP)である。BPは、最も一般的な皮膚の抗体媒介性自己免疫水疱形成疾患である。この疾患は、主に高齢者で生じ(UKにおける提示の中央値年齢は80歳である)、緊満性水疱及び蕁麻疹型プラークを特徴とする。BP患者に関する研究により、患者の約50%が血液好酸球増加症を有し、約70%が上昇した血清IgEを有することが明らかになった。さらに、患者の70%超は、表皮と真皮の基底膜との間の接着分子として作用するXVII型コラーゲン(COL17)タンパク質である抗原BP180(又はBPAg2)に対する血清IgEを有する。第二の自己抗原も、BP患者における自己反応性IgEの標的として同定されている。この自己抗原は、ヘミデスモソームに局在する細胞接着結合プラークタンパク質であるBP230(又はBP抗原1もしくはBPAG1/BPAG1e)である(Hammersらの文献、Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.(2016) 11: 175-197; Saniklidouらの文献、Arch Dermatol Res.(2018) 310(1): 11-28を参照されたい)。BPの治療用に未だ正式に認可されていないが、オマリズマブは、一部のヒト対象におけるBPの症状を治療するのに有効であることが証明されている(Fairleyらの文献、J. Allergy Clin Immunol.(2009) 123: 704-705; Dufourらの文献、Br J. Dermatol.(2012) 166: 1140-1142; Yuらの文献、J. Am. Acad. Dermatol.(2014) 71(3): 468-474)。

30

40

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

(発明の概要)

50

アレルギー疾患と自己免疫疾患の両方におけるIgE免疫グロブリンの重要性を考慮すると、IgEを標的とする改善された薬剤、例えば、抗体を開発する必要がある。本発明は、新規の抗IgE抗体の提供によって、この問題に対処する。

【0010】

さらに、本発明は、自己反応性IgE抗体と自己反応性IgG抗体の両方によって引き起こされる自己免疫疾患の治療に特に適している抗IgE抗体を提供しようとするものである。上記のように、CSU及びBPは、自己反応性IgE抗体が病態生理学において重要な役割を果たす自己免疫疾患の2つの例である。これらの疾患の両方において、自己抗原に対する自己反応性IgG抗体も、一部の患者で同定されている。

【0011】

CSUにおいて、高親和性IgE受容体Fc RIに結合するIgG自己抗体は、35%～40%の患者で観察されている。IgEそれ自体に結合するIgG自己抗体も、5%～10%の患者で観察されている。抗Fc RI IgG自己抗体の直接的な結合によるか又は抗IgE IgG自己抗体の間接的な結合による肥満細胞及び好塩基球上のFc RI受容体の架橋は、これらの疾患の発病において重要な役割を果たす可能性が高い。

【0012】

BPは、IgG自己抗体、例えば、上記のBP180抗原に結合するIgG自己抗体の存在によっても特徴付けられる。BP180のNC16Aドメインに対するIgE自己抗体は、試験された血清の77%で見られ、抗BP180 NC16A IgG自己抗体の頻度と同等であった。自己反応性抗BP180 IgE自己抗体とともに、BPを有する患者で同定された抗BP180 IgG自己抗体は、疾患進行の原因となる役割を果たすと考えられる。IgG自己抗体は、基底膜帯でBP180に結合し、補体活性化及び好中球の動員を誘導する。好中球はBP180の切断を誘導し、切断されたBP180はIgE自己抗体によって連結され、好酸球及び肥満細胞の活性化並びに疾患の悪化をもたらす。

【0013】

上記のことを考慮して、本発明者らは、自己反応性IgEとIgG病原性成分の両方を有する疾患を治療するための有効な戦略としてのIgE及びIgG自己抗体の二重標的化の可能性を検討した。本明細書で報告されているように、本発明の抗体は、IgEに対する結合特異性を示し、ネイティブなIgG分子よりも高い親和性でFc受容体FcRnに結合することにより、IgGレベルを激減させる能力を有する。これらの抗体は、BP及びCSUなどの自己免疫疾患の治療に対する2方面からのアプローチを提供する。

【0014】

第一の態様において、本発明は、IgEに結合する抗体を提供し、ここで、該抗体は、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合するバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。

【0015】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型IgG Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG Fcドメインと比べて増大した親和性でヒトFcRnに結合する。好ましい実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比べて増大した親和性でヒトFcRnに結合する。

【0016】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、pH 6.0で、増大した親和性でヒトFcRnに結合する。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、pH 7.4で、増大した親和性でヒトFcRnに結合する。好ましい実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、pH 6.0及びpH 7.4で、増大した親和性でヒトFcRnに結合する。

【0017】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトI

10

20

30

40

50

gG1 Fcドメインと比較したとき、pH 6.0で少なくとも20倍増大している結合親和性でヒトFcRnに結合する。好ましい実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比較したとき、pH 6.0で少なくとも30倍増大している結合親和性でヒトFcRnに結合する。

#### 【0018】

ある実施態様において、pH 6.0でのヒトFcRnに対するバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片の結合親和性は、 $K_D$  15nMよりも強い。ある実施態様において、pH 7.4でのヒトFcRnに対するバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片の結合親和性は、 $K_D$  320nMよりも強い。

#### 【0019】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、対応する野生型Fcドメインと比較したとき、少なくとも1つのアミノ酸置換、少なくとも2つのアミノ酸置換、少なくとも3つのアミノ酸置換を含む。バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、以下のもの：237M; 238A; 239K; 248I; 250A; 250F; 250I; 250M; 250Q; 250S; 250V; 250W; 250Y; 252F; 252W; 252Y; 254T; 255E; 256D; 256E; 256Q; 257A; 257G; 257I; 257L; 257M; 257N; 257S; 257T; 257V; 258H; 265A; 270F; 286A; 286E; 289H; 297A; 298G; 303A; 305A; 307A; 307D; 307F; 307G; 307H; 307I; 307K; 307L; 307M; 307N; 307P; 307Q; 307R; 307S; 307V; 307W; 307Y; 308A; 308F; 308I; 308L; 308M; 308P; 308Q; 308T; 309A; 309D; 309E; 309P; 309R; 311A; 311H; 311I; 312A; 312H; 314K; 314R; 315A; 315H; 317A; 325G; 332V; 334L; 360H; 376A; 378V; 380A; 382A; 384A; 385D; 385H; 386P; 387E; 389A; 389S; 424A; 428A; 428D; 428F; 428G; 428H; 428I; 428K; 428L; 428N; 428P; 428Q; 428S; 428T; 428V; 428W; 428Y; 433K; 434A; 434F; 434H; 434S; 434W; 434Y; 436H; 436I、及び436Fから選択される少なくとも1つのアミノ酸、少なくとも2つのアミノ酸、又は少なくとも3つのアミノ酸を含むことができ、ここで、該位置は、EU付番に従って規定される。

#### 【0020】

好ましい実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。

#### 【0021】

バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、G237M; P238A; S239K; K248I; T250A; T250F; T250I; T250M; T250Q; T250S; T250V; T250W; T250Y; M252F; M252W; M252Y; S254T; R255E; T256D; T256E; T256Q; P257A; P257G; P257I; P257L; P257M; P257N; P257S; P257T; P257V; E258H; D265A; D270F; N286A; N286E; T289H; N297A; S298G; V303A; V305A; T307A; T307D; T307F; T307G; T307H; T307I; T307K; T307L; T307M; T307N; T307P; T307Q; T307R; T307S; T307V; T307W; T307Y; V308A; V308F; V308I; V308L; V308M; V308P; V308Q; V308T; V309A; V309D; V309E; V309P; V309R; Q311A; Q311H; Q311I; D312A; D312H; L314K; L314R; N315A; N315H; K317A; N325G; I332V; K334L; K360H; D376A; A378V; E380A; E382A; N384A; G385D; G385H; Q386P; P387E; N389A; N389S; S424A; M428A; M428D; M428F; M428G; M428H; M428I; M428K; M428L; M428N; M428P; M428Q; M428S; M428T; M428V; M428W; M428Y; H433K; N434A; N434F; N434H; N434S; N434W; N434Y; Y436H; Y436I、及びY436Fから選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸置換を含むことができ、ここで、該位置は、EU付番に従って規定される。

#### 【0022】

好ましい実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、アミノ酸置換M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434Fを含む。

#### 【0023】

10

20

30

40

50



ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置252、308、及び434に、アミノ酸Y、P、及びYの組合せを含まない。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、アミノ酸置換：M252Y、V308P、及びN434Yの組合せを含まない。

【0024】

また本明細書に提供されるのは、IgEに結合する抗体であり、ここで、該抗体は、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含み、該バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。

【0025】

本明細書に記載される全ての抗IgE抗体に関するある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションヒトFcドメイン又はそのFcRn結合断片である。バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片であってもよい。バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片、好ましくは、バリエーションヒトIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片であってもよい。

【0026】

本明細書に記載される全ての抗IgE抗体に関するある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、対応する野生型Fcドメインと比較したとき、20以下、10以下、又は5以下のアミノ酸置換からなる。

【0027】

ある好ましい実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号1、配列番号2、もしくは配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。さらに好ましい実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。

【0028】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションFc領域内に含まれ、該バリエーションFc領域は、2つのFcドメイン又はそのFcRn結合断片からなる。バリエーションFc領域の2つのFcドメイン又はFcRn結合断片は、同一であってもよい。そのような実施態様において、バリエーションFc領域の2つのFcドメインは、各々、配列番号1、配列番号2、もしくは配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなることができる。或いは、バリエーションFc領域の2つのFcドメインは、各々、配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなることができる。

【0029】

抗IgE抗体がバリエーションFc領域を含む実施態様について、バリエーションFc領域は、CD16aに対する増大した親和性を有することができる。ある実施態様において、バリエーションFc領域のFcドメインは、EU位置297にN-結合型グリカンを含まない。或いは、バリエーションFc領域のFcドメインは、EU位置297に脱フコシル化N-結合型グリカンを含む。或いは、バリエーションFc領域のFcドメインは、FcドメインのEU位置297にバイセクティングGlcNAcを有するN-結合型グリカンを含む。

【0030】

本明細書に提供される抗IgE抗体は、IgEのCH3ドメインに結合することができる。IgEへの結合は、Fc RIへのIgEの結合を阻害し、かつ/又は肥満細胞もしくは好塩基球の脱顆粒を阻害することができる。好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、アナフィラキシー性ではない。

【0031】

ある好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、該抗体が中性pHよりも酸性pHで低い抗原結合活性を示すようなpH依存的標的結合を示す。酸性pHでの抗原結合活性と中性pHでの抗原結合活性の比は、KD(酸性pH)/KD(中性pH)によって測定したとき、少なくとも2、

10

20

30

40

50

少なくとも3、少なくとも5、少なくとも10であり得る。ある実施態様において、pH依存性抗IgE抗体は、1以上のHis置換を含む1以上のCDRを含む。

【0032】

本明細書に提供される抗IgE抗体は、IgG抗体、好ましくは、IgG1抗体であることができる。ある実施態様において、抗IgE抗体は、非ヒト抗体、例えば、ラクダ科動物由来抗体のヒト化又は生殖系列化バリエーションである。ある実施態様において、抗IgE抗体は、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体のCDR、VH、及び/又はVL配列を含む。

【0033】

さらに本明細書に提供されるのは、抗IgE抗体をコードするポリヌクレオチド、及び該抗体の発現を可能にする調節配列に機能的に連結された該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターである。また提供されるのは、発現ベクターを含有する宿主細胞又は無細胞発現系である。さらに提供されるのは、組換え抗体を産生する方法であって、宿主細胞又は無細胞発現系を該抗体の発現を可能にする条件下で培養すること、及び発現された抗体を回収することを含む、方法である。

10

【0034】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗IgE抗体及び少なくとも1つの医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。抗IgE抗体及びそれを含む医薬組成物は、医薬品として使用するためのものであり得る。

【0035】

またさらなる態様において、本発明は、対象、好ましくは、ヒト対象の抗体媒介性障害を治療する方法を提供する。該方法は、それを必要としている患者に、上記の本発明の態様による抗IgE抗体又は医薬組成物の治療有効量を投与することを含む。

20

【0036】

抗体媒介性障害は、IgE媒介性障害であり得る。その代わりに又はそれに加えて、抗体媒介性障害は、自己免疫疾患であり得る。自己免疫疾患は、同種異系膵島移植拒絶反応、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、アルツハイマー病、抗好中球細胞質自己抗体(ANCA)、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性筋炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性卵巣炎及び精巣炎、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性蕁麻疹、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャスルマン症候群、セリアックスブルー-皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、慢性誘発性蕁麻疹、慢性自発性蕁麻疹、チャージ-ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、皮膚筋炎、拡張型心筋症、円板状狼瘡、後天性表皮水疱症、本態性混合型クリオグロブリン血症、第VIII因子欠乏症、線維筋痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、グッドパスチャー症候群、移植片対宿主病(GVHD)、橋本甲状腺炎、血友病A、特発性膜性ニューロパチー、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgAニューロパチー、IgM多発ニューロパチー、免疫媒介性血小板減少症、若年性関節炎、川崎病、扁平苔癬、硬化性苔癬、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、メニエール病、混合性結合組織疾患、粘膜類天疱瘡、多発性硬化症、1型真性糖尿病、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、重症筋無力症、傍腫瘍性水疱性類天疱瘡、妊娠性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多内分泌腺症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎及び皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、再発性多発性軟骨炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、固形臓器移植片拒絶反応、スティッフマン症候群、全身エリテマトーデス、高安動脈炎、中毒性表皮壊死症(TEN)、スティーブンス-ジョンソン症候群(SJS)、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血栓性血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、疱疹状皮膚炎型血管炎、抗好中球細胞質抗体関連血管炎、白斑、並びにウェグナー肉芽腫症からなる群から選択され得る。

30

40

【0037】

好ましい実施態様において、自己免疫疾患は、慢性自発性蕁麻疹又は水疱性類天疱瘡で

50

ある。したがって、本明細書に提供されるのは、慢性自発性蕁麻疹又は水疱性類天疱瘡の治療において使用するための本発明の抗IgE抗体又は医薬組成物である。

【0038】

ある実施態様において、抗IgE抗体又は医薬組成物は、追加の治療剤と同時に又は連続的に対象に投与され得る。

【図面の簡単な説明】

【0039】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、免疫ラマの免疫前(PRE)及び免疫後(POST)血清をヒトIgEへの結合について試験した結果を示している。

10

【図2】図2は、ELISAによって測定したときのヒトIgEへの抗IgE mAbの結合を示している。結合は、pH 5.5及びpH 7.4で測定された。(A)クローン3D6;(B)クローン16E4;(C)クローン3A1;(D)クローン3D1;(E)クローン13E4;(F)クローン18B9;(G)クローン20D5;(H)クローン18E2。

【図3】図3は、ELISAによって測定したときの、hFc RI へのhIgEの結合を阻害する抗IgE mAbの能力を示している。結合は、pH 6及びpH 7.4で測定された。(A)クローン3D6;(B)クローン16E4;(C)クローン3A1;(D)クローン3D1;(E)クローン13E4;(F)クローン18B9;(G)クローン20D5;(H)クローン18E2。

【図4】図4は、SPR解析によって決定したときの、hFc RI へのhIgEの結合を阻害する抗IgE mAbの能力を示している。結合は、pH 6及びpH 7.4で測定された。(A)クローン3D6;(B)クローン16E4;(C)クローン3A1;(D)クローン3D1;(E)クローン13E4;(F)クローン18B9;(G)クローン20D5。

20

【図5】図5は、ELISAによって測定したときの、カニクイザルIgEへの抗IgE mAbの結合を示している。結合は、pH 5.5及びpH 7.4で測定された。(A)クローン3D6;(B)クローン16E4;(C)クローン3A1;(D)クローン3D1;(E)クローン13E4;(F)クローン18B9;(G)クローン20D5;(H)クローン18E2。

【図6】図6は、ELISAによって測定したときの、ヒトIgEへの抗IgE ABDEG(商標) mAbの結合を示している。結合は、pH 5.5及びpH 7.4で測定された。(A)クローン18B9His;(B)クローン18E2His2;(C)クローン13E4。

【図7】図7は、ABDEG(商標)技術を欠く対応する抗IgE mAbと比較したとき、より高い親和性でFcRnに結合する抗IgE ABDEG(商標) mAbの能力を示している。エフガルチギモド(ABDEG(商標)技術を組み込んでいる単離されたバリエーションFcドメイン分子)が比較用に含まれた。(A)pH 6.0でのクローン18B9Hisの結合;(B)pH 7.0でのクローン18B9Hisの結合;(C)pH 6.0でのクローン18E2His2の結合;(D)pH 7.0でのクローン18E2His2の結合;(E)pH 6.0でのクローン13E4の結合;(F)pH 7.0でのクローン13E4の結合。

30

【図8】図8は、競合ELISAによって測定したときの、FcRnへの結合をネイティブなIgG3と競合する抗IgE ABDEG(商標) mAbの能力を示している。(A)クローン18B9His;(B)クローン18E2His2;(C)クローン13E4。

【図9】図9は、hFc RI を発現する肥満細胞へのIgE結合を阻害する抗IgE mAb(ABDEG(商標)ありとABDEG(商標)なしの両方)の能力を示している。(A)クローン18B9His;(B)クローン18E2His2;(C)クローン13E4。

40

【図10】図10は、ELISAによって測定したときの、肥満細胞上のhFc RI に予め結合したhIgEに結合する抗IgE mAb(ABDEG(商標)ありとABDEG(商標)なしの両方)の能力を示している。(A)クローン13E4;(B)クローン18B9His;(C)クローン18E2His2。

【図11】図11は、IgG(A)レベルとIgE(B)レベルの両方をインビボで激減させる抗IgE ABDEG(商標) mAbの能力を示している。使用された対照は:オマリズマブ(Fcドメイン中にABDEG(商標)置換を有さない抗IgE抗体)及びHEL-hIgG1-ABDEG(ABDEG(商標)置換を組み込んでいるが、IgEに対する結合特異性を有さないIgG1抗体)であった。

【図12】図12は、抗IgE抗体クローンCL-2C(リゲリズマブ)のpH依存性バリエーションを人為作製するために使用された方法の概略を示している。

50

【図 1 3】図13は、IgEへのpH依存的結合を示すCL-2Cバリエーションクローンについてスクリーニングした後のV (A)及びVH(B)ドメインの様々なCDR位置におけるヒスチジン残基の分布を示している。

【図 1 4】図14は、hFc RI を発現する肥満細胞へのIgE結合を阻害する抗IgE ABDEG (商標) mAbの能力を示している。

【図 1 5】図15は、肥満細胞活性化アッセイで様々な抗IgE抗体を試験した結果を示している。Fc RI 受容体をロードするように、骨髓由来肥満細胞をIgEで感作した。その後、Fc RI に結合したIgEを架橋し、肥満細胞活性化を誘発するこれらの抗体の能力を試験するために、肥満細胞を様々な抗IgE抗体とともにインキュベートした。(A)は、20 µg/ml抗体による肥満細胞刺激を示し;(B)は、200 µg/ml抗体による肥満細胞刺激を示し;(C)は、増加する濃度のクローン13E4-hIgG1-ABDEG(商標); 18B9-hIgG1-ABDEG(商標); 及び18E2His2-MG-ABDEG(商標)抗体による肥満細胞刺激を示している。

10

【図 1 6】図16は、インビボでのアナフィラキシー反応の誘導について様々な抗IgE抗体を試験した結果を示している。組換えヒトIgEで感作したマウスを様々な抗IgE抗体で刺激し、刺激後のマウスの温度を15分間隔で2時間にわたって記録した。(A)及び(B)は、15 mg/kgの用量で投与された抗体についての実験の時間経過にわたる体温変化を示しており;(C)は、50mg/kgの用量で投与された抗体についての実験の時間経過にわたる体温変化を示している。

【図 1 7】図17は、水疱性類天疱瘡のインビボモデルでABDEG(商標)抗体を試験した結果を示している。ノックインヒトNC16Aマウスに、抗IgE-ABDEG(商標)抗体の存在下又は非存在下で、抗hNC16A IgG又は抗hNC16A IgEのいずれかを注射した。(A)は、抗hNC16A IgGが注射されたマウスにおける皮膚疾患スコアに対する効果を示しており、(B)は、HEL-ABDEG(商標)抗体で処置された又は処置されなかったマウスにおける抗hNC16A IgGレベルに対する効果を示している。(C)は、抗hNC16A IgEが注射されたマウスにおける皮膚疾患スコアに対する効果を示しており、(D)は、抗IgE-ABDEG(商標)抗体で処置された又は処置されなかったマウスにおける好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)活性に対する効果を示している。\*p < 0.001。

20

【発明を実施するための形態】

【0040】

(詳細な説明)

30

(A.定義)

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術的及び科学的用語は全て、本発明の技術分野の専門家によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0041】

「抗体」- 本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、全長抗体及び限定されないが、修飾抗体、ヒト化抗体、生殖系列化抗体(下記の定義を参照)を含む、そのバリエーションを包含することが意図される。「抗体」という用語は、典型的には、2つの重鎖と2つの軽鎖の組合せを有する免疫グロブリンポリペプチドを指すために本明細書で使用され、ここで、該ポリペプチドは、対象となる抗原(本明細書においては、IgE)に対する顕著な特異的免疫反応活性を有する。IgGクラスの抗体について、抗体は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一の軽ポリペプチド鎖及び分子量53,000~70,000の2つの同一の重鎖を含む。これら4つの鎖は、「Y」字の形状でジスルフィド結合により接続されており、ここで、軽鎖は重鎖を挟み、「Y」字の口部分で始まって、可変領域を通じて伸びている。抗体の軽鎖は、カッパ又はラムダ(、)のいずれかに分類される。各々の重鎖クラスは、カッパ軽鎖又はラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。一般に、軽鎖及び重鎖は、互いに共有結合しており、2つの重鎖の「テール」部分は、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、B細胞、又は遺伝子改変宿主細胞のいずれかによって生成されるとき、共有結合的ジスルフィド連結又は非共有結合的連結によって互いに結合する。重鎖において、アミノ酸配列は、Y字の形状のフォーク型端部のN-末端から各々の鎖の下端のC-末端まで続いている。

40

50

## 【 0 0 4 2 】

当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロン(  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  )に分類され、その中にいくつかのサブクラス(例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$ )があることを認識しているであろう。抗体の「クラス」を、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgD、又はIgEとして決定することが、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などは、十分に特徴付けられており、機能特化を付与することが知られている。本明細書で使用される「抗体」という用語は、抗体の任意のクラス又はサブクラス由来の抗体を包含する。

## 【 0 0 4 3 】

「可変領域」又は「可変ドメイン」 - 「可変領域」及び「可変ドメイン」という用語は、本明細書で互換的に使用され、等価な意味を有することが意図される。「可変」という用語は、可変ドメインVH及びVLのある部分が抗体間で配列が広範囲に異なるという事実を指し、その標的抗原に対する各々の特定の抗体の結合及び特異性に関して使用される。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインの全体を通して一様には分布していない。それは、抗原結合部位の部分形成するVLドメイン及びVHドメインの各々の中の「超可変ループ」と呼ばれる3つのセグメントに集中している。Vラムダ軽鎖ドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループは、本明細書において、L1( )、L2( )、及びL3( )と称され、VLドメイン中の残基24～33(9、10、又は11個のアミノ酸残基からなるL1( )、49～53(3個の残基からなるL2( )、及び90～96(5個の残基からなるL3( ))を含むものとして定義することができる(Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。Vカッ

20

パ軽鎖ドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループは、本明細書において、L1( )、L2( )、及びL3( )と称され、VLドメイン中の残基25～33(6、7、8、11、12、又は13個の残基からなるL1( )、49～53(3個の残基からなるL2( )、及び90～97(6個の残基からなるL3( ))を含むものとして定義することができる(Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。VHドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループは、本明細書において、H1、H2、及びH3と称され、VHドメイン中の残基25～33(7、8、又は9個の残基からなるH1)、52～56(3又は4個の残基からなるH2)、及び91～105(長さに大きなばらつきがあるH3)を含むものとして定義することができる(Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。

## 【 0 0 4 4 】

別途示されない限り、L1、L2、及びL3という用語は、それぞれ、VLドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループを指し、VカッパアイソタイプとVラムダアイソタイプの両方から得られる超可変ループを包含する。H1、H2、及びH3という用語は、それぞれ、VHドメインの第一、第二、及び第三の超可変ループを指し、 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、又は $\epsilon$ を含む、既知の重鎖アイソタイプのいずれかから得られる超可変ループを包含する。

## 【 0 0 4 5 】

超可変ループL1、L2、L3、H1、H2、及びH3は、各々、以下で定義される「相補性決定領域」又は「CDR」の部分を含むことができる。「超可変ループ」及び「相補性決定領域」という用語は、厳密には同義ではないが、それは、超可変ループ(HV)が構造に基づいて定義されるのに対し、相補性決定領域(CDR)は配列可変性に基づいて定義されており(Kabatらの文献、免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983)、かつHV及びCDRの境界がいくつかのVH及びVLドメインで異なるからである。

## 【 0 0 4 6 】

VL及びVHドメインのCDRは、通常、以下のアミノ酸:軽鎖可変ドメイン中の残基24～34(LCDR1)、50～56(LCDR2)、及び89～97(LCDR3)、並びに重鎖可変ドメイン中の残基31～35又は31～35b(HCDR1)、50～65(HCDR2)、及び95～102(HCDR3)を含むものとして定義することができる;(Kabatらの文献、免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Servi

10

20

30

40

50

ce, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))。したがって、HVは、対応するCDR内に含まれることができ、別途示されない限り、VH及びVLドメインの「超可変ループ」に対する本明細書中の言及は、対応するCDRも包含すると解釈されるべきであり、逆もまた同様である。

#### 【0047】

可変ドメインのより高度に保存された部分は、以下で定義されるように、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、3つの超可変ループによって接続された、主としてβ-シート形状を取っている4つのFR(それぞれ、FR1、FR2、FR3、及びFR4)を含む。各々の鎖の超可変ループは、FRによりごく接近して結び付けられ、他の鎖由来の超可変ループとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。抗体の構造解析により、配列と相補性決定領域によって形成される結合部位の形状の関係性が明らかになった(Chothiaらの文献、J. Mol. Biol. 227: 799-817(1992)); Tramontanoらの文献、J. Mol. Biol. 215:175-182(1990))。その高度な配列可変性にもかかわらず、これら6つのループのうちの5つは、「カノニカル構造」と呼ばれる、主鎖立体構造の小さいレパートリーのみを採用する。これらの立体構造は、まず第一に、ループの長さにより決定され、第二に、そのパッキング、水素結合、又は通常でない主鎖立体構造を取る能力によって立体構造を決定するループ中及びフレームワーク領域中の特定の位置での重要残基の存在により決定される。

#### 【0048】

「CDR」- 本明細書で使用される場合、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続的な抗原結合部位を意味する。これらの特定の領域は、Kabatらの文献、J. Biol. Chem. 252, 6609-6616(1977)及びKabatらの文献、免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Protein of Immunological Interest)(1991)、並びにChothiaらの文献、J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)、並びにMacCallumらの文献、J. Mol. Biol. 262:732-745(1996)によって記載されており、ここで、これらの定義は、互いに比較したとき、アミノ酸残基の重複又は部分集合を含む。上で引用された参考文献の各々によって定義されるCDRを包含するアミノ酸残基が比較のために示されている。好ましくは、「CDR」という用語は、配列比較に基づいてKabatにより定義されたCDRである。

表1: CDR定義

【表1】

	CDR 定義		
	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	MacCallum <sup>3</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	30-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	47-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	93-101
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	30-36
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	46-55
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-96

<sup>1</sup> 残基の付番はKabatらの文献(上記)の命名体系に従う

<sup>2</sup> 残基の付番はChothiaらの文献(上記)の命名体系に従う

<sup>3</sup> 残基の付番はMacCallumらの文献(上記)の命名体系に従う

#### 【0049】

「フレームワーク領域」- 本明細書で使用される「フレームワーク領域」又は「FR領域」という用語は、(例えば、CDRのKabat定義を用いて)可変領域の部分であるが、CDRの部分ではないアミノ酸残基を含む。それゆえ、可変領域フレームワークは、約100～120アミノ酸の長さであるが、CDRの外側のアミノ酸しか含まない。重鎖可変ドメインの具体

的な例について、及びKabatらによって定義されるCDRについて、フレームワーク領域1は、アミノ酸1～30を包含する可変領域のドメインに対応し；フレームワーク領域2は、アミノ酸36～49を包含する可変領域のドメインに対応し；フレームワーク領域3は、アミノ酸66～94を包含する可変領域のドメインに対応し、フレームワーク領域4は、アミノ酸103から可変領域の末端までの可変領域のドメインに対応する。軽鎖のフレームワーク領域は、軽鎖可変領域CDRの各々によって同様に隔てられる。同様に、Chothiaら又はMcCallumらによるCDRの定義を用いて、フレームワーク領域境界は、上記のようなそれぞれのCDR末端によって隔てられる。好ましい実施態様において、CDRは、Kabatによって定義されている通りである。

#### 【0050】

天然の抗体において、各々の単量体抗体上に存在する6つのCDRは、抗体が水性環境中でその3次元形状を取る場合に、抗原結合部位を形成するように特異的に配置されている、アミノ酸の短い非連続的な配列である。重及び軽可変ドメインの残りの部分は、アミノ酸配列に関してより低い分子間可変性を示し、フレームワーク領域と呼ばれる。フレームワーク領域は、主として $\beta$ -シート立体配置を取っており、CDRは、 $\beta$ -シート構造に接続し、場合によっては、その部分を形成するループを形成する。したがって、これらのフレームワーク領域は、6つのCDRを鎖間の非共有結合的相互作用によって正しい方向に位置決めさせる足場を形成するように作用する。位置決めされたCDRによって形成される抗原結合部位は、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を規定する。この相補的な表面は、抗体と免疫反応性抗原エピトープとの非共有結合を促進する。CDRの位置は、当業者により容易に同定されることができる。

#### 【0051】

「定常領域」- 本明細書で使用される場合、「定常領域」という用語は、可変ドメイン又は可変領域の外側の抗体分子の部分の部分を指す。免疫グロブリン軽鎖は、通常は「CL」又は「CL1ドメイン」と呼ばれる、単ドメイン「定常領域」を有する。このドメインは、VLドメインのC末端にある。免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリンのクラス(  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  )によって、その定常領域が異なる。重鎖 $\gamma$ 、 $\mu$ 、及び $\delta$ は、CH1ドメインとCH2ドメインを隔てる可撓性ヒンジ領域とともに、3つの免疫グロブリンドメイン(CH1、CH2、及びCH3と呼ばれる)からなる定常領域を有する。重鎖 $\mu$ 及び $\delta$ は、4つのドメイン(CH1～CH4)からなる定常領域を有する。重鎖の定常ドメインは、VHドメインのC末端に位置する。

#### 【0052】

重及び軽免疫グロブリン鎖におけるアミノ酸の付番は、Y字の形状のフォーク型端部のN-末端から各々の鎖の下端のC-末端まで続いている。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の定常ドメインを規定するために、様々な付番方式が使用される。EU付番方式によれば、IgG分子の重鎖定常ドメインは、次のように特定される：CH1 - アミノ酸残基118～215；CH2 - アミノ酸残基231～340；CH3 - アミノ酸残基341～446。Kabat付番方式によれば、IgG分子の重鎖定常ドメインは、次のように特定される：CH1 - アミノ酸残基114～223；CH2 - アミノ酸残基244～360；CH3 - アミノ酸残基361～477。

#### 【0053】

「Fcドメイン」- 本明細書で使用される場合、「Fcドメイン」は、CH2及びCH3ドメインを含む免疫グロブリン重鎖の定常領域の部分を規定する。これは、通常、パパイン切断部位のすぐ上流のヒンジ領域から始まり、抗体のC-末端で終わる単一の免疫グロブリン重鎖の部分を規定する。Fcドメインは、通常、ヒンジ領域由来のいくつかの残基を含む。したがって、完全なFcドメインは、通常、ヒンジ(例えば、上、中央、及び/又は下のヒンジ領域)ドメイン、CH2ドメイン、並びにCH3ドメインの少なくとも一部を含む。

#### 【0054】

「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに接続する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、約25残基を含み、可撓性であり、したがって、2つのN-末端抗原結合領域が独立に動くことを可能にする。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン：上部、中央、及

10

20

30

40

50

び下部ヒンジドメインに細分することができる(Roux K.H.らの文献、J. Immunol. 161: 4083-90 1998)。「完全ヒト」ヒンジ領域を含む本発明の抗体は、下の表2に示されるヒンジ領域配列のうちの1つを含有することができる。

表2:ヒトヒンジ配列

【表 2】

IgG	上のヒンジ	中央のヒンジ	下のヒンジ
IgG1	EPKSCDKTHT (配列番号:159)	CPPCP (配列番号:160)	APELLGGP (配列番号:161)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (配列番号:162)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub> (配列番号:163)	APELLGGP (配列番号:164)
IgG4	ESKYGPP (配列番号:165)	CPSCP (配列番号:166)	APEFLGGP (配列番号:167)
IgG2	ERK (配列番号:168)	CCVECPPPCP (配列番号:169)	APPVAGP (配列番号:170)

10

【0055】

「バリエーションFcドメイン」 - 本明細書で使用される場合、「バリエーションFcドメイン」という用語は、野生型Fcドメイン、例えば、天然又は「野生型」ヒトIgGのFcドメインに対する1以上の改変を有するFcドメインを指す。改変としては、アミノ酸の置換、付加、及び/もしくは欠失、追加の部分の連結、並びに/又はネイティブなグリカンの改変を挙げることができる。

20

【0056】

「Fc領域」 - 本明細書で使用される場合、「Fc領域」という用語は、2つの重鎖のFcドメインによって形成されるネイティブな免疫グロブリンの部分の部分を指す。ネイティブな又は野生型のFc領域は、通常、ホモ二量体である。

【0057】

「バリエーションFc領域」 - 本明細書で使用される場合、「バリエーションFc領域」という用語は、Fcドメインの少なくとも1つが、野生型Fc領域、例えば、天然のヒトIgGのFc領域の野生型ドメインに対する1以上の改変を有するFc領域を指す。ある実施態様において、この用語は、構成要素のFcドメインの各々が同じであるホモ二量体Fc領域を包含する。ある実施態様において、この用語は、構成要素のFcドメインの各々が異なるヘテロ二量体Fc領域を包含する。ヘテロ二量体実施態様について、Fcドメインのうちの1つ又は両方がバリエーションFcドメインであってもよい。

30

【0058】

「FcRn結合断片」 - 本明細書で使用される場合、「FcRn結合断片」という用語は、FcRn結合を付与するのに十分であるFcドメイン又はFc領域の一部を指す。

【0059】

「特異性」及び「多重特異性抗体」 - 本明細書に記載される抗体は、特定の標的抗原であるIgEに結合する。抗体は、その標的抗原に「特異的に結合する」ことが好ましく、ここで、「特異的に結合する」という用語は、所与の標的、例えば、IgEと優先的に免疫反応する任意の抗体の能力を指す。本発明の抗体は、単一特異的であり、特定の標的に特異的に結合する1以上の結合部位を含有することができる。抗体は、「多重特異性抗体」フォーマット、例えば、二重特異性抗体へと組み込むことができ、ここで、多重特異性抗体は、2以上の標的抗原に結合する。多重特異性を達成するために、「多重特異性抗体」は、通常、異なるVH-VL対を有する重鎖及び軽鎖ポリペプチドの異なる組合せ又は対合を含むように人為作製される。多重特異性、特に、二重特異性抗体は、ネイティブな抗体、例えば、Fc領域にコンジュゲートされた異なる特異性のFabアームを有するY字形の抗体の全体的な立体構造を取るよう人為作製することができる。或いは、多重特異性抗体、例

40

50



えば、二重特異性抗体は、非ネイティブな立体構造を取るようにより人為作製することができ、例えば、この場合、異なる特異性を有する可変ドメイン又は可変ドメイン対は、Fc領域の反対の末端に位置付けられる。

【0060】

「修飾抗体」- 本明細書で使用される場合、「修飾抗体」という用語は、天然ではないように改変されている合形成態の抗体を含む。例としては、少なくとも2つの重鎖部分を含むが、2つの完全な重鎖を含まない抗体(例えば、ドメイン欠失抗体又はミニボディ); 2以上の異なる抗原に又は単一の抗原上の異なるエピトープに結合するように改変された多重特異的形態の抗体(例えば、二重特異性、三重特異性など); scFv分子に接続された重鎖分子などを含む。scFv分子は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。さらに、「修飾抗体」という用語は、多価形態の抗体(例えば、3コピー以上の同じ抗原に結合する三価、四価などの抗体)が挙げられる。

10

【0061】

「修飾抗体」という用語は、本明細書で構造的に定義された本発明の抗体のアミノ酸配列バリエーションを指すために、本明細書で使用することもできる。抗体は、それが由来した抗体と比較してアミノ酸配列が異なるバリエーション抗体を産生するように修飾され得ることが当業者によって理解されるであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基における保守的置換又は変化をもたらすヌクレオチド又はアミノ酸置換を(例えば、CDR及び/又はフレームワーク残基中で)行うことができる。アミノ酸置換は、1以上のアミノ酸と天然又は非天然アミノ酸との置換を含むことができる。

20

【0062】

本発明による修飾抗体は、本発明によって定義されたバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片に連結された本発明で定義された任意の好適な抗原結合断片を含むことができる。

【0063】

「抗原結合断片」- 本明細書で使用される「抗原結合断片」という用語は、無傷の又は完全な抗体よりも少ないアミノ酸残基を含む一方で、抗原結合活性を保持している全長抗体又は抗体鎖の部分(part)又は部分(portion)である断片を指す。抗体の抗原結合断片には、抗体(例えば、IgE)と同じ抗原に対する特異的な免疫反応活性を示すペプチド断片が含まれる。本明細書で使用される「抗原結合断片」という用語は、抗体軽鎖可変ドメイン(VL); 抗体重鎖可変ドメイン(VH); VH-VLドメイン対; 単鎖抗体(scFv); F(ab')<sub>2</sub>断片; Fab断片; Fd断片; Fv断片; 一腕(一価)抗体; ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、又はそのような抗原結合断片の組合せ、アセンブリ、もしくはコンジュゲーションによって形成される任意の抗原結合分子から選択される抗体断片を包含することが意図される。本明細書で使用される「抗原結合断片」という用語は、ユニボディ; ドメイン抗体; 及びナノボディ; からなる群から選択される抗体断片を包含することもできる。断片は、例えば、無傷のもしくは完全な抗体もしくは抗体鎖の化学的もしくは酵素的処理によるか、又は組換え手段によって得ることができる。

30

【0064】

「ヒト化置換」- 本明細書で使用される場合、「ヒト化置換」という用語は、抗体のVH又はVLドメイン中の特定の位置に存在するアミノ酸残基が参照ヒトVH又はVLドメイン中の等価な位置に生じるアミノ酸残基と置き換えられるアミノ酸置換を指す。参照ヒトVH又はVLドメインは、ヒト生殖系列によってコードされるVH又はVLドメインであってもよい。ヒト化置換は、本明細書で定義される抗体のフレームワーク領域及び/又はCDR中で行われてもよい。

40

【0065】

「ヒト化バリエーション」- 本明細書で使用される場合、「ヒト化バリエーション」又は「ヒト化抗体」という用語は、参照抗体と比較して1以上の「ヒト化置換」を含有するバリエーション抗体を指し、ここで、該参照抗体の部分(例えば、少なくとも1つのCDRを含有するVHドメイン及び/もしくはVLドメイン又はその部分)は、非ヒト種に由来するアミノ酸を有し

50

、該「ヒト化置換」は、非ヒト種に由来するアミノ酸配列内で生じる。

【0066】

「生殖系列化バリエーション」 - 「生殖系列化バリエーション」又は「生殖系列化抗体」という用語は、「ヒト化置換」が抗体のVH又はVLドメイン中の特定の位置に存在する1以上のアミノ酸残基とヒト生殖系列によってコードされる参照ヒトVH又はVLドメイン中の等価な位置に生じるアミノ酸残基との置換をもたらす「ヒト化バリエーション」を具体的に指すために本明細書で使用される。任意の所与の「生殖系列化バリエーション」について、生殖系列化バリエーションへと置換される置換アミノ酸残基は、ヒト生殖系列によってコードされる単一のVH又はVLドメインから独占的に又は優先的に取得されることが一般的である。「ヒト化バリエーション」及び「生殖系列化バリエーション」という用語は、多くの場合、互換的に使用

10

【0067】

「親和性バリエーション」 - 本明細書で使用される場合、「親和性バリエーション」という用語は、参照抗体と比較してアミノ酸配列の1以上の変化を示すバリエーション抗体を指し、ここで、該親和性バリエーションは、参照抗体と比較して標的抗原に対する改変された親和性を示す。例えば、親和性バリエーションは、参照IgE抗体と比較したとき、標的、例えば、IgEに対する変化した親和性を示す。好ましくは、親和性バリエーションは、参照抗体と比較したとき、標的抗原に対する改善された親和性を示す。親和性バリエーションは、通常、参照抗体と比較したとき、CDR中のアミノ酸配列の1以上の変化を示す。そのような置換は、CDR中の所与の位置に存在するもとのアミノ酸と、天然のアミノ酸残基又は非天然のアミノ酸残基であり得る異なるアミノ酸残基との置換をもたらすことができる。アミノ酸置換は、保存的であっても非保存的であってもよい。

20

【0068】

「人為作製された」 - 本明細書で使用される場合、「人為作製された」という用語は、合成手段による(例えば、組換え技法、インビトロペプチド合成による、ペプチドの酵素的もしくは化学的カップリングによる、又はこれらの技法のいくつかの組合せによる)核酸又はポリペプチド分子の操作を含む。好ましくは、本発明の抗体は、例えば、抗原結合、安定性/半減期、又はエフェクター機能などの1以上の特性を改善するように、人為作製されているヒト化抗体を含めて、改変される。

30

【0069】

「FcRn」 - 本明細書で使用される場合、「FcRn」という用語は、新生児Fc受容体を指す。例示的なFcRn分子としては、RefSeq NM\_004107に示されているようなFCGRT遺伝子によってコードされたヒトFcRnが挙げられる。

【0070】

「CD16」 - 本明細書で使用される場合、「CD16」という用語は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)に必要とされるFc RIII Fc受容体を指す。例示的なCD16分子としては、RefSeq NM\_000569に示されているようなヒトCD16aが挙げられる。

40

【0071】

「N-結合型グリカン」 - 本明細書で使用される場合、「N-結合型グリカン」という用語は、Fc領域のCH2ドメインに存在する配列(すなわち、Asn-X-Ser又はAsn-X-Thr配列(ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である))中のアスパラギンの側鎖中の窒素(N)に付着したN-結合型グリカンを指す。そのようなN-グリカンは、例えば、引用により完全に本明細書中に組み込まれるDrickamer K及びTaylor MEの文献(2006)、糖鎖生物学入門(Introduction to Glycobiology)、第2版に完全に記載されている。

【0072】

「脱フコシル化された」 - 本明細書で使用される場合、「脱フコシル化された」という

50

用語は、引用により完全に本明細書中に組み込まれる米国特許第8067232号に記載されているようなコアフコース分子を欠くN-結合型グリカンを指す。

【0073】

「バイセクティングGlcNac」 - 本明細書で使用される場合、「バイセクティングGlcNac」という用語は、引用により完全に本明細書中に組み込まれる米国特許第8021856号に記載されているような、コアマンノース分子に連結されたN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)分子を有するN-結合型グリカンを指す。

【0074】

「IgE」 - 本明細書で使用される場合、「IgE」という用語は、「免疫グロブリンE」分子又は「クラスE免疫グロブリン」を指す。IgEは、ヒト血清中で最も存在量の少ない免疫グロブリンアイソタイプである。IgE免疫グロブリンは、免疫グロブリンの他のクラス又はアイソタイプに共通する四量体構造を取る。しかしながら、IgEは、4つの定常領域: C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、及びC<sub>4</sub>(本明細書において、CH1、CH2、CH3、及びCH4とも呼ばれる)を含むその重鎖を特徴とする。本明細書の別所で説明されているように、IgEは、肥満細胞及び好塩基球上の高親和性Fc受容体に結合することにより、アレルギー及び過敏症において重要な役割を果たす。この高親和性受容体Fc<sub>RI</sub>は、1つのIgE結合サブユニット、1つのサブユニット、及びジスルフィド結合サブユニットの二量体を含む、多サブユニット構造を有する。低親和性IgE受容体Fc<sub>RII</sub>(CD23としても知られる)は、B細胞上で構成的に発現されており、かつIL-4に応答して、マクロファージ、好酸球、血小板、及び一部のT細胞で発現されることができる。

【0075】

オマリズマブ - オマリズマブは、IgEに結合する組換えヒト化モノクローナル抗体である。これは、5%のマウス配列と95%のヒト配列を含有する。これは、ゾレア(登録商標)としてNovartisにより市販されており、アレルギー性喘息及び慢性自発性蕁麻疹(CSU)の治療用に承認されている。オマリズマブのCDR、VH及びVL配列は、下の表3に示されている。

表3 オマリズマブのCDR、VH及びVL配列

【表3】

	配列	配列番号
VH CDR1	SGYSWN	143
VH CDR2	SITYDGSTNYPNPSVKG	144
VH CDR3	GSHYFGHWHFAV	145
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGYSITSGYSWNWIRQAP GKGLEWVASITYDGSTNYPNPSVKGGRITISRDDSKNTFYLMNSL RAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGTLLTVSS	146
VL CDR1	RASQSVDDYDGDSYMN	147
VL CDR2	AASYLES	148
VL CDR3	QQSHEDPYT	149
VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGDSYMNWYQQK PGKAPKLLIYAASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK	150

【0076】

オマリズマブは、IgEの受容体結合部分、すなわち、CH3又はC<sub>3</sub>ドメイン内の領域に結合する。オマリズマブによって認識されるエピトープは、高親和性IgE受容体と低親和性IgE受容体の両方の結合領域を包含するので、オマリズマブは、両方のタイプの受容体に結合するIgEの能力を消失させる。重要なことに、オマリズマブは、細胞表面に既に結合しているIgE分子を架橋することができない。すなわち、これは、非アナフィラキシー誘発性である。一方のIgE重鎖の1つのCH3ドメインへのFc<sub>RI</sub>の結合は、もう一方のIgE

重鎖のCH3領域へのオマリズマブの結合を阻害又は妨害する。したがって、オマリズマブは、循環中にあるIgEにしか結合することができない。循環中では、IgEの各々の分子がオマリズマブの2つの分子によって同時に結合されることができる。

【 0 0 7 7 】

リゲリズマブ - リゲリズマブは、IgEに結合する第二のヒト化モノクローナル抗体である。これは、オマリズマブと同じIgEの領域に結合するが、より高い親和性でIgEに結合する。リゲリズマブのCDR、VH及びVL配列は、下の表4に示されている。

表4 リゲリズマブのCDR、VH及びVL配列

【表 4】

	配列	配列番号
VH CDR1	WYWLE	151
VH CDR2	EIDPGTFTTNYNEKFKA	152
VH CDR3	FSHFSGSNYDYFDY	153
VH	QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCASGYTFSWYWLEWVRQAP GHGLEWMGEIDPGTFTTNYNEKFARVFTADTSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCARFSHFSGSNYDYFDYWGGGTLVTVSS	154
VL CDR1	RASQSIGTNIH	155
VL CDR2	YASESIS	156
VL CDR3	QQSWSWPTT	157
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAP RLLIYYASESISGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQ SWSWPTTFGGGKVEIK	158

【 0 0 7 8 】

「抗体媒介性障害」 - 本明細書で使用される場合、「抗体媒介性障害」という用語は、対象における抗体の存在によって生じるか又は悪化する任意の疾患又は障害を指す。

【 0 0 7 9 】

「治療する、治療すること、及び治療」 - 本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、及び「治療」という用語は、本明細書に記載される治療的又は予防的手段を指す。「治療」の方法は、抗体媒介性疾患もしくは障害(例えば、自己免疫疾患)又は再発性疾患もしくは障害を予防するか、治癒させるか、遅延させるか、その重症度を軽減するか、又はその1以上の症状を改善するために、或いはそのような治療の非存在下で期待される以上に対象の生存期間を延長するために、対象、例えば、該疾患もしくは障害を有するか又はそのような疾患もしくは障害を有する素因がある対象への本発明による抗体の投与を利用する。

【 0 0 8 0 】

「対象」 - 本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意のヒト又は非ヒト動物を指す。ある実施態様において、「対象」という用語は、任意のヒト又は非ヒト哺乳動物を指す。好ましい実施態様において、対象は、ヒトである。ある実施態様において、対象は、成人である。本明細書で使用される場合、「成人」は、少なくとも18歳のヒトである。

【 0 0 8 1 】

(B.バリエーションFcドメインを有する抗IgE抗体)

(i)バリエーションFcドメイン及びそのFcRn結合断片

第一の態様において、本発明は、IgEに結合する抗体(すなわち、抗IgE抗体)を提供し、ここで、該抗体は、少なくとも1つのバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。このバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性で新生児Fc受容体FcRnに結合する能力を特徴とする。言い換えると、本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片とFcRnとの間の結

合親和性は、野生型FcドメインとFcRnとの間の結合親和性と比較してより高い。

【0082】

FcRn受容体は、サルベージ受容体経路によって血漿中のIgG濃度を調節する際に重要な役割を果たす。FcRn機能のモデルは、次の通りである。細胞外環境の中性付近のpHは、通常、FcRn-IgG相互作用に対して許容性がないので、循環中のIgGは、おそらくは流体相ピノサイトーシスによって、細胞に取り込まれる。取込み後の酸性の初期エンドソーム中のFcRnに結合するIgGは、再循環(又はトランスサイトーシス)され、エキソサイトーシスによって細胞表面で放出される。対照的に、FcRnに結合しないIgGは、リソソーム経路に入り、分解される。

【0083】

FcRnにより高い親和性で結合することにより、本発明の抗IgE抗体は、内在性IgG分子の再循環を妨害し、それにより、内在性IgG抗体、例えば、IgG自己抗体のレベルを低下させることができる。したがって、本発明の抗IgE抗体は、内在性IgE(可変領域を介する抗原結合による)と内在性IgG(バリエーションFcドメインを介するFcRnへの結合を競合することによる)の両方を標的とすることになる。

【0084】

バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性で、FcRnに結合する。ある実施態様において、バリエーションFcドメインの結合親和性が比較される野生型Fcドメインは、バリエーションFcドメインが由来する野生型Fcドメインであってもよい。上記のように、本発明との関連におけるバリエーションFcドメインは、野生型Fcドメイン、例えば、天然又は「野生型」ヒトIgGのFcドメインと比べて1以上の改変を有するFcドメインを指す。改変としては、アミノ酸の置換、付加、及び/もしくは欠失、追加の部分の連結、並びに/又はネイティブなグリカンの改変を挙げることができる。バリエーションFcドメインが由来する天然又は野生型FcドメインがヒトIgG1 Fcドメインである場合、該バリエーションFcドメインは、野生型ヒトIgG1 Fcドメインよりも高い親和性でFcRnに結合することができる。

【0085】

バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片によって示されるFcRnに対する増大した親和性は、必ずしもバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片が由来するFcドメインではない野生型Fcドメインと比べたものであってもよい。例えば、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合することができる。野生型ヒトIgGは、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4であることができる。好ましい実施態様において、本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG1 Fcドメイン又は野生型ヒトIgG3 Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する。好ましい実施態様において、本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する。

【0086】

本発明の抗IgE抗体は、ヒト疾患の治療、特に、自己免疫疾患を有する患者からのIgG自己抗体の除去において使用することが意図されるので、バリエーションFc領域又はそのFcRn結合断片は、通常、より高い親和性でヒトFcRnに結合する。言い換えると、本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFc領域又はFcRn結合断片は、ヒトFcRnへの結合をネイティブな又は内在性の患者IgG抗体と競合する。

【0087】

IgG FcドメインとFcRnとの間の相互作用はpH依存的である。結合親和性は、通常、酸性pH(すなわち、初期エンドソーム区画で見られるpH)でより強く、中性pH(すなわち、血漿pH)でより弱い。本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、酸性pH、例えば、pH 6.0で、増大した親和性でFcRnに結合することができる。その代わりに又はそれに加えて、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、中性pH、例えば、pH 7.4で、増大した親和性でFcRnに結合することができる。好まし

10

20

30

40

50

い実施態様において、本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、pH 6.0とpH 7.4の両方で、増大した親和性でFcRnに結合する。ある実施態様において、該バリエーションFcドメイン及び/又はFcRn結合断片は、野生型Fcドメイン、特に、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比較して低下したpH依存度でFcRnに結合する。該バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片が低下したpH依存度でFcRn結合する実施態様について、結合親和性がpH 6.0及びpH 7.4で増大していることがなお好ましい。

【0088】

本明細書で説明されているように、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片とFcRnとの間の結合親和性は、本発明の抗体がFcRnへの結合を内在性IgG、特に、IgG自己抗体と競合するように増大している。

【0089】

Vaccaroらの文献(インピボの抗体レベルを調節するための免疫グロブリンGのFc領域の改変(Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody level)、Nature Biotechnology(2005) 23(10): 1283-1288)、Ulrichsらの文献(新生児Fc受容体アンタゴニストエフガルチギモドはヒトで安全かつ持続的にIgGを低下させる(Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans)、J. Clinical Investigation.(2018) 128(10): 4372-4386)で報告されているように、及び同じく本明細書で報告されているように、ABDEG(商標)突然変異(M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F)を有するバリエーションFcドメインを含むバリエーションFc領域は、増大した親和性でヒトFcRnに結合し、それにより、内在性IgGレベルを低下させることができる。Vaccaroらの文献(引用により本明細書中に引用されている)では、野生型ヒトIgG1の $K_D$  370nMという結合親和性(表面プラズモン共鳴解析により測定)と比較して、バリエーションABDEG(商標) Fc領域のpH 6.0での $K_D$  15.5nMというヒトFcRnに対する結合親和性が報告されている。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、pH 6.0で、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比較して、少なくとも20倍増大している親和性でヒトFcRnに結合する。ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、pH 6.0で、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比較して、少なくとも25倍、好ましくは、少なくとも30倍増大している親和性でヒトFcRnに結合する。バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片の結合親和性は、該Fcドメイン(又は断片)の親和性が全長IgG分子との関連において試験される場合、野生型ヒトIgG1 Fcドメインの結合親和性と比較されてもよい。

【0090】

Ulrichsらの文献で報告されているように、FcRnアンタゴニストのエフガルチギモドは、それぞれ、pH 6.0及びpH 7.4で、14.2nM及び320nMというヒトFcRnに対する平衡解離定数( $K_D$ )を有する。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、pH 6.0で、 $K_D$  15nMよりも強い結合親和性でヒトFcRnに結合する。その代わりに又はそれに加えて、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、pH 7.4で、 $K_D$  320nMよりも強い結合親和性でヒトFcRnに結合することができる。バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片の結合親和性は、該バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片がバリエーションFc領域(すなわち、2つのFcドメインを含む)との関連において試験されるときに決定することができる。

【0091】

バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、野生型Fcドメインと比べて、1以上の改変を含む。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、野生型Fcドメインと比べて、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、ある実施態様において、野生型Fcドメインと比べて、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つのアミノ酸置換を含むことができる。

【0092】

バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片における改変の数は、対応する野生型Fcドメイン又はFcRn結合断片と比べて限定することができる。例えば、バリエーションFcドメ

10

20

30

40

50

イン又はFcRn結合断片におけるアミノ酸置換の総数は、対応する野生型Fcドメイン又はFcRn結合断片と比べて限定することができる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、対応する野生型Fcドメインと比較して、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下、10以下、11以下、12以下、15以下、20以下の改変からなる。改変は、アミノ酸の置換、付加、及び/もしくは欠失、追加の部分の連結、並びに/又はネイティブなグリカンの改変から選択することができる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、対応する野生型Fcドメインと比較して、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下、10以下、11以下、12以下、15以下、20以下のアミノ酸置換からなる。

【0093】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも1つのアミノ酸置換、ただし、合計20以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも2つのアミノ酸置換、ただし、合計20以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも1つのアミノ酸置換、ただし、合計10以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも2つのアミノ酸置換、ただし、合計10以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも1つのアミノ酸置換、ただし、合計5以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも2つのアミノ酸置換、ただし、合計5以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。

【0094】

本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメインが由来する野生型Fcドメインは、IgG Fcドメインであってもよい。そのような実施態様において、該バリエーションFcドメインは、バリエーションIgG Fcドメインである。好ましい実施態様において、該バリエーションFcドメインは、バリエーションIgG1 Fcドメインである、すなわち、該バリエーションFcドメインは、野生型IgG1ドメインと比べて、1以上の改変を保有する。

【0095】

本発明の抗IgE抗体は、ヒト患者で使用するものであり得るので、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、好ましくは、ヒトFcドメインのバリエーション形態である、すなわち、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションヒトFcドメイン又はそのFcRn結合断片である。バリエーションFcドメインの目的は、FcRnへの結合をネイティブなIgG抗体と競合させることであるので、バリエーションFcドメインは、ヒトバリエーションIgGドメイン、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4から選択されるヒトバリエーションIgGドメインであることが好ましい。特に好ましい実施態様において、バリエーションFcドメインは、バリエーションIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である。

【0096】

本発明の抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、該バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片が、FcRn、好ましくは、ヒトFcRnに対する必要不可欠な増大した結合親和性を示すという条件で、任意の非ネイティブなアミノ酸残基を含むことができる。本明細書で使用される場合、「非ネイティブなアミノ酸」という用語は、それがバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片にある位置で天然には生じないアミノ酸を意味する。

【0097】

バリエーションFcドメインを有し、かつFcRnに対する増大した結合親和性を示す抗体は、文献中で報告されている。これらのバリエーションFcドメインは、Fcドメイン内の特定の位置に様々な非ネイティブなアミノ酸を有するものとして報告されている。本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン及びFcRn結合断片は、FcRnに対するFcドメイン

結合親和性を増大させることができるものとして文献に記載されている非ネイティブなアミノ酸及び/又はアミノ酸置換のいずれかを含むことができる。本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン及びFcRn結合断片は、FcRnに対するFcドメイン結合親和性を増大させることができるものとして文献に記載されている非ネイティブなアミノ酸及び/又はアミノ酸置換の任意の組合せを含むこともできる。本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片に含めることができるアミノ酸置換の非限定的な例は、その内容全体が引用により本明細書中に組み込まれる、Yeungらの文献(ヒト新生児Fc受容体に対するヒトIgG1親和性の改変: 霊長類における薬物動態に対する親和性改善の影響(Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates.) J. Immunol.(2009) 182: 7663-7671)、及び国際特許出願WO2011/122011号にも報告されている。

10

**【0098】**

ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、以下のもの: 237M; 238A; 239K; 248I; 250A; 250F; 250I; 250M; 250Q; 250S; 250V; 250W; 250Y; 252F; 252W; 252Y; 254T; 255E; 256D; 256E; 256Q; 257A; 257G; 257I; 257L; 257M; 257N; 257S; 257T; 257V; 258H; 265A; 270F; 286A; 286E; 289H; 297A; 298G; 303A; 305A; 307A; 307D; 307F; 307G; 307H; 307I; 307K; 307L; 307M; 307N; 307P; 307Q; 307R; 307S; 307V; 307W; 307Y; 308A; 308F; 308I; 308L; 308M; 308P; 308Q; 308T; 309A; 309D; 309E; 309P; 309R; 311A; 311H; 311I; 312A; 312H; 314K; 314R; 315A; 315H; 317A; 325G; 332V; 334L; 360H; 376A; 378V; 380A; 382A; 384A; 385D; 385H; 386P; 387E; 389A; 389S; 424A; 428A; 428D; 428F; 428G; 428H; 428I; 428K; 428L; 428N; 428P; 428Q; 428S; 428T; 428V; 428W; 428Y; 433K; 434A; 434F; 434H; 434S; 434W; 434Y; 436H; 436I、及び436Fから選択される少なくとも1つのアミノ酸を含み、ここで、該位置は、EU付番によって規定されている。EU付番は、Edelman, G.M.らの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 78-85(1969);及びKabatらの文献、「免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、U.S. Dept. Health and Human Services、第5版、1991に記載されているFc領域の慣例を指す。本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、以下のもの: 237M; 238A; 239K; 248I; 250A; 250F; 250I; 250M; 250Q; 250S; 250V; 250W; 250Y; 252F; 252W; 252Y; 254T; 255E; 256D; 256E; 256Q; 257A; 257G; 257I; 257L; 257M; 257N; 257S; 257T; 257V; 258H; 265A; 270F; 286A; 286E; 289H; 297A; 298G; 303A; 305A; 307A; 307D; 307F; 307G; 307H; 307I; 307K; 307L; 307M; 307N; 307P; 307Q; 307R; 307S; 307V; 307W; 307Y; 308A; 308F; 308I; 308L; 308M; 308P; 308Q; 308T; 309A; 309D; 309E; 309P; 309R; 311A; 311H; 311I; 312A; 312H; 314K; 314R; 315A; 315H; 317A; 325G; 332V; 334L; 360H; 376A; 378V; 380A; 382A; 384A; 385D; 385H; 386P; 387E; 389A; 389S; 424A; 428A; 428D; 428F; 428G; 428H; 428I; 428K; 428L; 428N; 428P; 428Q; 428S; 428T; 428V; 428W; 428Y; 433K; 434A; 434F; 434H; 434S; 434W; 434Y; 436H; 436I、及び436Fから選択される2つ、3つ、4つ、又は5つのアミノ酸を含むことができ、ここで、該位置は、EU付番によって規定され、かつ任意の組合せが想定される。

20

30

40

**【0099】**

ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、以下のもの:

- (i)それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436のY、T、E、K、F、及びY;
- (ii)それぞれ、EU位置250及び428のQ及びL;
- (iii)それぞれ、EU位置308及び434のP及びA;
- (iv)それぞれ、EU位置308及び434のP及びY;又は
- (v)それぞれ、EU位置252、286、及び434のY、E、及びY

50



から選択されるアミノ酸の組合せを含む。

【 0 1 0 0 】

ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、G237M; P238A; S239K; K248I; T250A; T250F; T250I; T250M; T250Q; T250S; T250V; T250W; T250Y; M252F; M252W; M252Y; S254T; R255E; T256D; T256E; T256Q; P257A; P257G; P257I; P257L; P257M; P257N; P257S; P257T; P257V; E258H; D265A; D270F; N286A; N286E; T289H; N297A; S298G; V303A; V305A; T307A; T307D; T307F; T307G; T307H; T307I; T307K; T307L; T307M; T307N; T307P; T307Q; T307R; T307S; T307V; T307W; T307Y; V308A; V308F; V308I; V308L; V308M; V308P; V308Q; V308T; V309A; V309D; V309E; V309P; V309R; Q311A; Q311H; Q311I; D312A; D312H; L314K; L314R; N315A; N315H; K317A; N325G; I332V; K334L; K360H; D376A; A378V; E380A; E382A; N384A; G385D; G385H; Q386P; P387E; N389A; N389S; S424A; M428A; M428D; M428F; M428G; M428H; M428I; M428K; M428L; M428N; M428P; M428Q; M428S; M428T; M428V; M428W; M428Y; H433K; N434A; N434F; N434H; N434S; N434W; N434Y; Y436H; Y436I、及びY436Fから選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、ここで、該位置は、EU付番によって規定される。本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、以下のもの：G237M; P238A; S239K; K248I; T250A; T250F; T250I; T250M; T250Q; T250S; T250V; T250W; T250Y; M252F; M252W; M252Y; S254T; R255E; T256D; T256E; T256Q; P257A; P257G; P257I; P257L; P257M; P257N; P257S; P257T; P257V; E258H; D265A; D270F; N286A; N286E; T289H; N297A; S298G; V303A; V305A; T307A; T307D; T307F; T307G; T307H; T307I; T307K; T307L; T307M; T307N; T307P; T307Q; T307R; T307S; T307V; T307W; T307Y; V308A; V308F; V308I; V308L; V308M; V308P; V308Q; V308T; V309A; V309D; V309E; V309P; V309R; Q311A; Q311H; Q311I; D312A; D312H; L314K; L314R; N315A; N315H; K317A; N325G; I332V; K334L; K360H; D376A; A378V; E380A; E382A; N384A; G385D; G385H; Q386P; P387E; N389A; N389S; S424A; M428A; M428D; M428F; M428G; M428H; M428I; M428K; M428L; M428N; M428P; M428Q; M428S; M428T; M428V; M428W; M428Y; H433K; N434A; N434F; N434H; N434S; N434W; N434Y; Y436H; Y436I、及びY436Fから選択される2つ、3つ、4つ、又は5つのアミノ酸を含むことができ、ここで、該位置は、EU付番によって規定され、かつ置換の任意の組合せが想定される。

【 0 1 0 1 】

ある実施態様において、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、以下のもの：

(i) M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434F;

(ii) T250Q及びM428L;

(iii) V308P及びN434A;

(iv) V308P及びN434Y;又は

(v) M252Y、N286E、及びN434Y

から選択されるアミノ酸置換の組合せを含む。

【 0 1 0 2 】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置252、308、及び434のアミノ酸Y、P、及びYの組合せを含まない。ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、アミノ酸置換：M252Y、V308P、及びN434Yの組合せを含まない。

【 0 1 0 3 】

ある実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、2つのFcドメイン又はそのFcRn結合断片からなるバリエーションFc領域を含み、ここで、該Fcドメイン又はFcRn結合断片の少なくとも1つは、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片である。ある

実施態様において、バリエーションFc領域の2つのバリエーションFcドメインは異なり、ヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体実施態様について、Fcドメイン又はそのFcRn結合断片の一方又は両方は、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片であってもよい。ある実施態様において、バリエーションFc領域の2つのバリエーションFcドメインは同一であり、ホモ二量体を形成する。

【0104】

(ii) ABDEG(商標)を組み込んでいるバリエーションFcドメイン及びそのFcRn結合断片

好ましい実施態様において、本発明は、IgEに結合する抗体(すなわち、抗IgE抗体)を提供し、ここで、該抗体は、ABDEG(商標)技術を組み込んでいる少なくとも1つのバリエーションFcドメインを含む。Vaccaroらの文献(Nat. Biotechnology(2005) 23(10):1283-8)で報告されているように、ABDEG(商標)抗体(つまり、「IgG分解を増強する抗体」)は、改変又はバリエーションFc領域を含む。この改変又はバリエーションFc領域は、野生型抗体のFc領域と比較してより高い親和性及び低下したpH依存度で新生児Fc受容体FcRnに結合することができる。

【0105】

上で説明されているように、FcRn受容体は、サルベージ受容体経路によって血漿中のIgG濃度を調節する際に重要な役割を果たす。より高い親和性でFcRnに結合することにより、ABDEG(商標)抗体は、内在性免疫グロブリンの再循環を妨害し、それにより、内在性免疫グロブリン、例えば、自己抗体のレベルを低下させることができる。ABDEG(商標)技術を組み込んでいるABDEG(商標)抗体及びFcRnアンタゴニストが自己免疫疾患などの抗体媒介性疾患の治療について記載されている(引用により本明細書中に組み込まれるWO2006/130834号及びWO2015/100299号を参照されたい)。

【0106】

ABDEG(商標)抗体のFcドメインアミノ酸「シグナチャー」は、十分に特徴付けられている。それゆえ、好ましい実施態様において、本発明は、IgEに結合する抗体を提供し、ここで、該抗体は、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含み、該バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。このバリエーションFcドメインは、本明細書において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメインと呼ばれる。

【0107】

上記のように、ABDEG(商標)抗体のバリエーションFcドメインは、Fc受容体FcRn、特に、ヒトFcRnに対する結合親和性を増大させるように改変される。バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する。そのような実施態様において、野生型Fcドメインは、バリエーションFcドメインが由来する由来の野生型Fcドメインであってもよい。例えば、バリエーションABDEG(商標) FcドメインがヒトIgG1 Fcドメインに由来する場合、該バリエーションFcドメインは、ヒトIgG1 Fcドメインよりも高い親和性でFcRnに結合することができる。

【0108】

ある実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型IgG Fcドメイン、好ましくは、野生型ヒトIgG Fcドメインと比べて増大した親和性で、FcRn、好ましくは、ヒトFcRnに結合する。好ましい実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、野生型ヒトIgG1 Fcドメイン又は野生型ヒトIgG3 Fcドメインと比べて増大した親和性で、FcRn、好ましくは、ヒトFcRnに結合する。ヒトIgG自己抗体を枯渇させる際に使用することが意図される本発明の抗IgE抗体について、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片(その起源を問わない)は、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比べて増大した親和性でヒトFcRnに結合することが好ましい。

【0109】

本明細書に記載される抗IgE抗体のバリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、任意の好適な野生型免疫グロブリンFcドメインに由来するバリエーションFcドメ

10

20

30

40

50

イン又はFcRn結合断片であってもよい。ある実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である。野生型IgGドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む、任意のサブクラスのIgGであってもよい。野生型IgGドメインは、好ましくは、ヒトのものである。

#### 【0110】

好ましい実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、バリエーションIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である。そのような実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメインは、本明細書に記載されるABDEG(商標)アミノ酸シグナチャー、具体的には、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436のアミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含むか又は該アミノ酸からなる野生型IgG1ドメインのアミノ酸配列を有する。野生型IgG1ドメインは、好ましくは、ヒトのものである。

10

#### 【0111】

ある実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、対応する野生型Fcドメインと比較して、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下、10以下、11以下、12以下、15以下、20以下の改変からなる。改変は、アミノ酸の置換、付加、及び/もしくは欠失、追加の部分の連結、並びに/又はネイティブなグリカンの改変から選択することができる。ある実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、対応する野生型Fcドメインと比較して、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下、10以下、11以下、12以下、15以下、20以下のアミノ酸置換からなる。

20

#### 【0112】

ある実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも5つのアミノ酸置換、ただし、合計20以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。ある実施態様において、バリエーションABDEG(商標) Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、少なくとも5つのアミノ酸置換、ただし、合計10以下のアミノ酸置換を含むか又は該アミノ酸置換からなる。

#### 【0113】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436のアミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを除いて、対応する野生型Fcドメイン又はFcRn結合断片と同一である。

30

#### 【0114】

本明細書に記載される抗IgE抗体に含めるためのバリエーションFcドメインの非限定的な例は、下の表5に示されている。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、重鎖CH1ドメインに連結されており、重鎖定常領域は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。

40

表5. バリエーションFcドメイン及びバリエーションFcドメインを組み込んでいる重鎖定常領域の非限定的な例のアミノ酸配列

【表 5】

配列番号	アミノ酸配列
1	CPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPG
2	DKTHTCPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPGK
3	DKTHTCPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPG
4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>YITRE</u> PEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPGK
5	CPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

10

20

30

40

50

	VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPG
6	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> GGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPGK
7	DKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> GGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPG
8	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA <u>A</u> GGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITRE</u> PEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPGK
<p>EU位置252、254、256、433、及び434のABDEG(商標)アミノ酸は、太字で示され、かつ下線が引かれている。位置234及び235のアミノ酸は、下線が引かれている。</p> <p>NB配列番号1～3及び5～7は、バリエーションFcドメインを表し;配列番号: 4及び8は、バリエーションFcドメインに加えて、CH1ドメイン配列を組み入れている。</p>	

10

20

30

## 【 0 1 1 5 】

バリエーションFcドメインが、ABDEG(商標)突然変異に加えて、1以上の非天然のアミノ酸残基を含む実施態様について、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、それぞれ、EU位置234及び235にアミノ酸A、Aを含むことができる。

## 【 0 1 1 6 】

ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号6に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFcドメインは、重鎖CH1ドメインに連結されており、重鎖定常領域は、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。

## 【 0 1 1 7 】

上記のように、ある実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、2つのFcドメイン又はそのFcRn結合断片からなるバリエーションFc領域を含み、ここで、該Fcドメイン又はFcRn結合

40

50

断片の少なくとも1つは、本明細書に記載されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片である。ある実施態様において、バリエーションFc領域の2つのバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片の各々は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。ある実施態様において、バリエーションFc領域の2つのバリエーションFcドメインは異なり、ヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体の実施態様について、該Fcドメイン又はそのFcRn結合断片の一方又は両方がバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片であってもよい。代替の実施態様において、バリエーションFc領域の2つのバリエーションFcドメインは同一であり、ホモ二量体を形成する。ある実施態様において、バリエーションFc領域中のバリエーションFcドメインの各々のアミノ酸配列は、配列番号1、2、もしくは3に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、バリエーションFc領域中のバリエーションFcドメインの各々のアミノ酸配列は、配列番号5、6、もしくは7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。

10

**【0118】**

バリエーションFcドメインが、ABDEG(商標)突然変異に加えて、1以上の非天然のアミノ酸残基を含む実施態様について、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、FcRn結合を増大させ、それにより、抗体薬物動態を改善することが報告されている1以上の追加のFc置換を含むことができる。そのような置換は、例えば、その内容が完全に本明細書中に組み込まれる、Zalevskyらの文献(2010) Nat. Biotechnol. 28(2):157-9; Hintonらの文献(2006) J Immunol. 176:346-356; Yeungらの文献(2009) J Immunol. 182:7663-7671; Presta LG.(2008) Curr. Op. Immunol. 20:460-470;及びVaccaroらの文献(2005) Nat. Biotechnol. 23(10):1283-88で報告されている。

20

**【0119】**

バリエーションFcドメインが、ABDEG(商標)突然変異に加えて、1以上の非天然のアミノ酸残基を含む実施態様について、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、Kabatの文献に記載されているEUインデックスによって付番された234、235、236、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、326、327、328、329、330、332、333、及び334からなる群から選択される1以上の位置に、非天然のアミノ酸残基を含むことができる。任意に、バリエーションFcドメインは、当業者に公知の追加の及び/又は代替の位置に、非天然のアミノ酸残基を含むことができる(例えば、その内容が引用により本明細書中に完全に組み込まれる、米国特許第5,624,821号;第6,277,375号;第6,737,056号;PCT特許公開WO 01/58957号; WO 02/06919号; WO 04/016750号; WO 04/029207号; WO 04/035752号、及びWO 05/040217号を参照されたい)。

30

**【0120】**

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片は、Kabatの文献に記載されているEUインデックスによって付番された234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、236E、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247V、247G、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、269H、269Y、269F、269R、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、269G、297S、297D、297E、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、313F、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、332D、332S、332W、332F、3

40

50

32E、332N、332Q、332T、332H、332Y、及び332Aからなる群から選択される少なくとも1つの追加の非天然のアミノ酸残基を含む。任意に、Fcドメイン又はそのFcRn結合断片は、当業者に公知の追加の及び/又は代わりの非天然のアミノ酸残基を含むことができる(例えば、その内容が引用により本明細書中に完全に組み込まれる、米国特許第5,624,821号;第6,277,375号;第6,737,056号;PCT特許公開WO 01/58957号; WO 02/06919号; WO 04/016750号; WO 04/029207号; WO 04/035752号、及びWO 05/040217号を参照されたい)。

#### 【0121】

バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片に組み込まれ得る追加のFcドメイン改変には、限定されるものではないが、その内容が引用により本明細書中に完全に組み込まれる、Ghetieらの文献、1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncanらの文献、1988, Nature 332:563-564; Lundらの文献、1991, J. Immunol., 147:2657-2662; Lundらの文献、1992, Mol. Immunol., 29:53-59; Alegreらの文献、1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchinsらの文献、1995, Proc Natl. Acad Sci USA, 92:11980-11984; Jefferisらの文献、1995, Immunol Lett., 44:111-117; Lundらの文献、1995, Fa seb J., 9:115-119; Jefferisらの文献、1996, Immunol Lett., 54:101-104; Lundらの文献、1996, J. Immunol., 157:4963-4969; Armourらの文献、1999, Eur J Immunol. 29:2613-2624; Idusogieらの文献、2000, J. Immunol., 164:4178-4184; R eddyらの文献、2000, J. Immunol., 164:1925-1933; Xuらの文献、2000, Cell Immunol., 200:16-26; Idusogieらの文献、2001, J. Immunol., 166:2571-2575; Shi eldsらの文献、2001, J Biol. Chem., 276:6591-6604; Jefferisらの文献、2002, Immunol Lett., 82:57-65; Prestaらの文献、2002, Biochem Soc Trans., 30:487-490);米国特許第5,624,821号;第5,885,573号;第5,677,425号;第6,165,745号;第6,277,375号;第5,869,046号;第6,121,022号;第5,624,821号;第5,648,260号;第6,528,624号;第6,194,551号;第6,737,056号;第6,821,505号;第6,277,375号;米国特許公開2004/0002587号及びPCT公開WO 94/29351号; WO 99/58572号; WO 00/42072号; WO 02/060919号; WO 04/029207号; WO 04/099249号; WO 04/063351号に開示されているものも含まれる。

#### 【0122】

本明細書に記載されているように、本発明の抗IgE抗体に組み込まれるバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片は、身体からの病原性IgG自己抗体のクリアランスを助けることができる。この効果は、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片によって達成されるFcRn受容体への抗IgE抗体のより高い親和性結合によって媒介される。自己免疫疾患で観察される病原性IgG抗体は、これらの疾患の病原性誘因であるか、又は疾患進行に寄与し、細胞性Fc受容体の不適切な活性化を介して疾患を媒介するかのいずれかであると考えられている。凝集した自己抗体及び/又は自己抗原と複合体を形成した自己抗体(免疫複合体)は、活性化Fc受容体に結合し、数多くの自己免疫疾患(これは、一つには、自己組織に対する免疫媒介性炎症の理由で起こる)を引き起こす(例えば、引用により本明細書中に完全に組み込まれる、Clarksonらの文献、NEJM 314(9), 1236-1239(2013)); US20040010124A1号; US20040047862A1号;及びUS2004/0265321A1号を参照されたい)。

#### 【0123】

したがって、抗体媒介性障害(例えば、自己免疫疾患)を治療するために、有害な自己抗体を除去することとこれらの抗体の免疫複合体と活性化Fc受容体(例えば、Fc 受容体、例えば、CD16a)との相互作用を遮断することの両方が有利である。したがって、ある実施態様において、抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域は、CD16a(例えば、ヒトCD16a)への増大した結合を示す。これは、抗IgE抗体がFcRn阻害による除去について標的とされている自己抗体の免疫複合体誘導性炎症応答にさらに拮抗することを可能にするという点で特に有利である。CD16a(例えば、ヒトCD16a)に対する親和性を増大させる当技術分野で認識されている任意の手段を利用することができる。ある実施態

様において、抗IgE抗体は、N-結合型グリカン(例えば、EU位置297に)含むバリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域を含む。この場合、グリカン構造を改変することにより、CD16aに対する抗IgE抗体の結合親和性を増大させることが可能である。Fc領域のN-結合型グリカンの改変は、当技術分野で周知である。例えば、脱フコシル化N-結合型グリカン又はバイセクティングGlcNac構造を有するN-グリカンは、CD16aに対する増大した親和性を示すことが示されている。したがって、ある実施態様において、N-結合型グリカンは、脱フコシル化されている。脱フコシル化は、当技術分野で認識されている任意の手段を用いて達成することができる。例えば、フコースがバリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域のEU位置297のN-結合型グリカンに付加されないように、抗IgE抗体をフコシルトランスフェラーゼを欠く細胞で発現させることができる(例えば、その内容が引用により完全に本明細書中に組み込まれるUS 8,067,232号を参照されたい)。ある実施態様において、N-結合型グリカンは、バイセクティングGlcNac構造を有する。バイセクティングGlcNac構造は、当技術分野で認識されている任意の手段を用いて達成することができる。例えば、バイセクティングGlcNacがバリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域のEU位置297のN-結合型グリカンに付加されるように、抗IgE抗体を 1-4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)を発現する細胞で発現させることができる(例えば、その内容が引用により完全に本明細書中に組み込まれるUS 8,021,856号を参照されたい)。それに加えて又はその代わりに、N-結合型グリカン構造の改変は、酵素的手段によってインピットロ達成することもできる。

【0124】

本明細書に開示される本発明のIgE抗体の製造可能性を高めるために、バリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域は、任意の非ジスルフィド結合システイン残基を含まないことが好ましい。したがって、ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域は、遊離システイン残基を含まない。

【0125】

ある実施態様において、バリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域は、さらなるFc受容体に対する改変された(例えば、増大した又は減少した)結合親和性を有する。バリエーションFcドメイン又はバリエーションFc領域は、Fc 受容体、例えば、Fc RI(CD64)、Fc RIIA(CD32)、Fc RIIB(CD32)、Fc RIIB(CD16a)、及びFc RIIB(CD16b)のうちの1つ又は複数に対する改変された(例えば、増大した又は減少した)結合親和性を有することができる。さらなるFc受容体に対する親和性を改変する当技術分野で認識されている任意の手段を利用することができる。

【0126】

(iii)IgEに結合する抗体

本発明の抗IgE抗体は、該抗体が上記のような少なくとも1つのバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片を含むという条件で、IgEに対する免疫反応性を示す任意の好適な抗体のフォーマットを取ることができる。これに関して、「抗体」という用語は、そのヒト化及び生殖系列化バリエーションを含む二価の四量体抗体を包含し、かつ非ネイティブな免疫グロブリン構造を有する修飾抗体も包含するように広く解釈されるべきである。

【0127】

本発明の抗IgE抗体は、上記のバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片に加えて、任意の抗原結合断片又は領域を含むことができる。ある実施態様において、該抗原結合断片又は領域は、VH-VLドメイン対、scFv断片、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、抗IgE抗体は、本明細書で定義されるバリエーションFc領域又はFcRn結合断片を有する二価IgGである。ある実施態様において、抗IgE抗体は、本明細書で定義されるバリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片を有する一価IgGである。一価抗IgE抗体は、Fc RI受容体を架橋する能力を有さない場合があるという点で有利であり得る。

【0128】

本明細書に記載される抗体は、ヒトへの治療的使用が意図されており、それゆえ、通常



、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMタイプのもの、多くはIgGタイプのものであり、この場合、これは、4つのサブクラスIgG1、IgG2a及びb、IgG3、又はIgG4のいずれかに属することができる。好ましい実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、IgG抗体、任意に、IgG1抗体である。抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)であることができ、ただし、これらは、その標的に対する適切な免疫学的特異性を示す。モノクローナル抗体が好ましいが、それは、これが極めて特異的であり、単一の抗原性部位に対するものであるからである。

【0129】

本明細書に記載される抗IgE抗体は、高いヒト相同性を示すことができる。高いヒト相同性を有するそのような抗体分子は、ヒト生殖系列配列に対する十分に高い%配列同一性を示すネイティブな非ヒト抗体のVH及びVLドメインを含む抗体を含むことができる。ある実施態様において、抗体分子は、非ヒト抗体のヒト化又は生殖系列化バリエーションである。

10

【0130】

本明細書に記載される抗IgE抗体は、好ましくは、その受容体Fc RIへのIgEの結合を阻害する。ある実施態様において、該抗IgE抗体は、Fc RIとFc RIIの両方へのIgEの結合を示す。該抗IgE抗体は、IgE重鎖のCH3ドメイン内に位置するエピトープに結合することができる。本明細書に記載される抗IgE抗体は、好ましくは、Fc RIと既に会合しているIgE、すなわち、膜局在性IgEに結合しない。好ましい実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、アナフィラキシー性ではない。

【0131】

20

(iv)pH依存性抗体

本明細書に記載される抗IgE抗体はいずれも、pH依存的抗原結合、すなわち、IgEへのpH依存的結合を示すことができる。

【0132】

抗原に結合している抗体は、細胞内に取り込まれ、エンドソーム-リソソーム分解経路に輸送される。初期エンドソーム中でその抗原から解離することができる抗体は、再循環されて、細胞表面に戻るることができる。エンドソーム区画中でその抗原に高い親和性で結合する抗体は、通常、分解のためにリソソームに輸送される。抗体が、血漿pHと比較して、初期エンドソームpHでその抗原に対するより低い結合親和性を有するようなpH依存的抗原結合活性を有する場合、抗体は、より効率的に細胞表面に再循環されることが以前に示されている。これは、抗体血漿半減期を延長し、同じ抗体が複数の抗原に結合するのを可能にすることができる。この理由から、本明細書に記載される抗IgE抗体がpH依存的抗原結合を示すことが有利である。本発明によるpH依存性抗IgE抗体は、循環中のこれらの自己抗体に結合し、IgE自己抗体を内在化させることにより、血清IgE自己抗体を排除する能力を有する。IgE自己抗体は、酸性のエンドソーム区画中で放出され、分解のためにリソソームに輸送されることができる。本発明の遊離の抗IgE抗体は、さらなるIgE自己抗体に結合して、それを内在化させることができるように、細胞表面へ再循環されることができる。

30

【0133】

本発明の抗IgE抗体は、内因性のpH依存的抗原結合活性を保有し得る、すなわち、それは、この性質について選択されたものであり得る。その代わりに又はそれに加えて、本明細書に記載される抗IgE抗体は、pH依存的標的結合を示すように改変することができる。抗体分子中のpH依存的抗原結合活性を改変する方法は、例えば、引用により本明細書中に組み込まれるEP2275443号に記載されている。抗体分子中のpH依存的抗原結合を改変する方法は、引用により本明細書中に組み込まれるWO2018/206748号にも記載されている。本明細書に記載される抗体は、pH依存的結合を達成するように、任意の技法によって修飾することができる。例えば、該抗体は、pH依存的抗原結合を示すように、EP2275443号又はWO2018/206748号に記載されている方法に従って修飾することができる。

40

【0134】

本明細書に記載される抗IgE抗体のpH依存的実施態様について、抗原結合活性は、血漿

50

pHでの抗原結合活性と比較して、エンドソームpHでより低い。エンドソームpHが、通常、酸性pHであるのに対し、血漿pHは、通常、中性pHである。したがって、本明細書に記載される抗体は、その抗原結合活性が、中性pHでの抗原結合活性と比較して、酸性pHでより低いようなpH依存的抗原結合を示し得る。エンドソームpH又は「酸性pH」は、約pH 4.0～約pH 6.5、好ましくは、約pH 5.5～約pH 6.5、好ましくは、約pH 5.5～約pH 6.0、好ましくは、pH 5.5、pH 5.6、pH 5.7、又はpH 5.8というpHであり得る。血漿pH又は「中性pH」は、約pH 6.9～約pH 8.0、好ましくは、約pH 7.0～約pH 8.0、好ましくは、約pH 7.0～約pH 7.4、好ましくは、pH 7.0又はpH 7.4というpHであり得る。

【0135】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、pH 5.8での抗原結合活性がpH 7.4での抗原結合活性と比較してより低いようなpH依存的結合を示す。pH依存性抗IgE抗体は、酸性pH又はpH 5.8での抗体-抗原相互作用の解離定数(KD)が中性pH又はpH 7.4での抗体-抗原相互作用の解離定数(KD)よりも高いことを特徴とし得る。ある実施態様において、抗IgE抗体は、pH 5.8での抗原に対するKDとpH 7.4での抗原に対するKDの比( $KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)$ )が、2以上、4以上、6以上、8以上、10以上、12以上となるようなpH依存的結合を示す。

10

【0136】

抗体分子のpH依存的抗原結合活性は、酸性pHでの抗原結合能を損なう及び/又は中性pHでの抗原結合能を増大させるように抗体分子を修飾することにより改変することができる。例えば、抗体分子は、抗体分子の少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンと置換することによるか、又は少なくとも1つのヒスチジンを抗体分子に挿入することにより修飾することができる。そのようなヒスチジン突然変異(置換又は挿入)部位は、特に限定されず、突然変異又は挿入前と比較して、エンドソームpH(例えば、pH 5.8)での抗原結合活性が血漿pH(例えば、pH 7.4)での抗原結合活性よりも低い限り、任意の部位が許容される。

20

【0137】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、可変ドメインへの1以上の置換の導入によって、pH依存的抗原結合を示すように改変することができる。好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、抗体の1以上のCDRへの1以上の置換の導入によって、pH依存的抗原結合を示すように改変される。置換は、pH依存的抗原結合を付与するために、1以上のHis残基を、可変ドメイン、好ましくは、重鎖及び/又は軽鎖CDRの1以上の部位に導入することができる。

30

【0138】

抗体が3つの重鎖CDR配列と3つの軽鎖CDR配列を含む本発明の実施態様について、組み合わせられる6つのCDRは、合計1～10個のHis置換、任意に、1～5個のHis置換、任意に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のHis置換からなることができる。抗IgE抗体は、引用により本明細書中に組み込まれるWO2018/206748号に記載されている方法に従って改変することができる。非ヒスチジン置換を、本明細書に記載されるpH依存性抗体の可変ドメイン、特に、CDRに組み込むこともできる。

【0139】

好ましい実施態様において、本明細書に列挙されている特定のCDR、VH、及び/又はVLドメイン配列を有する例示的な抗IgE抗体は、それがpH依存的抗原結合を示すように改変される。例えば、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体のCDR配列は、pH依存的抗原結合を示す抗体を産生するための1以上のヒスチジン置換の導入によって修飾することができる。

40

【0140】

(v)ラクダ科動物由来抗IgE抗体

本発明の抗IgE抗体は、ラクダ科動物由来であってもよい。ラクダ科動物由来抗体は、重鎖のみの抗体、すなわち、VHH抗体であってもよく、又は従来のヘテロ四量体抗体であってもよい。好ましい実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、ラクダ科動物のヘテロ

50

四量体抗体に由来する。

【0141】

例えば、抗体分子は、ラクダ科動物を、IgE、好ましくは、ヒトIgEで免疫する工程を含む方法によって得られる免疫ライブラリーから選択することができる。ラクダ科動物を、IgEタンパク質もしくはそのポリペプチド断片で、又は該タンパク質もしくはそのポリペプチド断片を発現するmRNA分子もしくはcDNA分子で免疫することができる。抗体をラクダ科動物種で産生し、好ましい標的に対する抗体をラクダ科動物免疫ライブラリーから選択する方法は、例えば、引用により本明細書中に組み込まれる、国際特許出願WO2010/001251号に記載されている。

【0142】

ある実施態様において、抗体分子は、ラクダ科ファミリーの種のVHドメイン又はVLドメインから得られる少なくとも1つの超可変ループ又は相補性決定領域を含むという点で、ラクダ科動物由来であり得る。特に、抗体分子は、IgEによる非近交系のラクダ科動物、例えば、ラマの能動免疫によって得られるVH及び/もしくはVLドメイン、又はそのCDRを含むことができる。

【0143】

これに関連した「から得られる」という用語は、抗体分子のHV又はCDRがもとはラクダ科免疫グロブリン遺伝子によってコードされていたアミノ酸配列(又はそのマイナーバリエーション)を具体化するという意味で構造的関係性を意味する。しかしながら、これは、抗体分子を調製するために使用される産生プロセスに関して、必ずしも特定の関係性を意味するものではない。

【0144】

ラクダ科動物由来抗体分子は、とりわけ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコ、又はラクダを含む、任意のラクダ科動物種に由来することができる。

【0145】

ラクダ科動物由来VH及びVLドメイン、又はそのCDRを含む抗体分子は、通常、組換え発現されたポリペプチドであり、キメラポリペプチドであってもよい。「キメラポリペプチド」という用語は、それ以外の場合には隣接して生じることがない2以上のペプチド断片の並置によって作り出される人工的な(非天然の)ポリペプチドを指す。この定義に含まれるのは、2以上の種、例えば、ラクダ科動物及びヒトによってコードされるペプチド断片の並置によって作り出される「種」キメラポリペプチドである。

【0146】

ある実施態様において、VHドメイン全体及び/又はVLドメイン全体は、ラクダ科ファミリーの種から得ることができる。ラクダ科動物由来VHドメイン及び/又はラクダ科動物由来VLドメインは、その後、1以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失がラクダ科動物アミノ酸配列に導入されるタンパク質エンジニアリングに供することができる。これらの人為操作される変化は、好ましくは、ラクダ科動物配列に対するアミノ酸置換を含む。そのような変化には、ラクダ科動物によってコードされるVH又はVLドメイン中の1以上のアミノ酸残基がヒトによってコードされる相同なVH又はVLドメイン由来の等価な残基と置き換えられる、「ヒト化」又は「生殖系列化」が含まれる。

【0147】

ラクダ科動物(例えば、ラマ)の能動免疫によって得られる単離されたラクダ科動物VH及びVLドメインは、本発明に従って抗体分子を人為作製する土台として使用することができる。無傷のラクダ科動物VH及びVLドメインから出発して、出発ラクダ科動物配列から逸脱する1以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を人為作製することが可能である。ある実施態様において、そのような置換、挿入、又は欠失は、VHドメイン及び/又はVLドメインのフレームワーク領域中に存在していてもよい。

【0148】

他の実施態様において、ラクダ科動物由来VH及びVLドメイン(又はその人為操作されるバリエーション)及び非ラクダ科抗体由来の1以上の定常ドメイン、例えば、ヒトによってコー

10

20

30

40

50

ドされる定常ドメイン(又はその人為操作されるバリエーション)を含む「キメラ」抗体分子が提供される。そのような実施態様において、VHドメインとVLドメインは両方ともラクダ科動物の同じ種から得られることが好ましく、例えば、(人為操作されるアミノ酸配列バリエーションの導入の前に)、VHとVLは両方ともラマ(Lama glama)に由来するものであってもよく、又はVHとVLは両方ともアルパカ(Lama pacos)に由来するものであってもよい。そのような実施態様において、VHドメインとVLドメインは両方とも、単一の動物、特に、対象となる抗原で能動免疫された単一の動物に由来してもよい。

【0149】

ラクダ科VH及び/又はVLドメインの一次アミノ酸配列の変化を人為操作する代わりとして、個々のラクダ科動物由来超可変ループもしくはCDR、又はその組合せをラクダ科動物VH/VLドメインから単離し、CDRグラフトイングにより、代替りの(すなわち、非ラクダ科)フレームワーク、例えば、ヒトVH/VLフレームワークに移すことができる。

【0150】

非限定的な実施態様において、本発明の抗IgE抗体分子は、CH1ドメイン及び/又はCLドメイン(それぞれ、重鎖及び軽鎖由来)を含むことができ、そのアミノ酸配列は、完全に又は実質的にヒトのものである。ヒトでの治療的使用が意図される抗体分子について、抗体の定常領域全体、又はその少なくとも一部が完全に又は実質的にヒトのアミノ酸配列を有することが典型的である。本明細書に記載されているように、本発明の抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン及び/又はバリエーションFc領域は、バリエーションヒトFcドメイン及び/又はバリエーションヒトFc領域であることができる。そのヒト化及び生殖系列化バリエーションを含む、ラクダ科動物由来IgE抗体のCDR又は抗原結合ドメインは、上の(i)節及び(ii)節に記載されているバリエーションヒトFcドメイン又はバリエーションヒトFc領域のいずれかと組み合わせることができる。

【0151】

CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及びCLドメイン(及び存在する場合、CH4ドメイン)の1つもしくは複数又は任意の組合せは、そのアミノ酸配列に関して、完全に又は実質的にヒトのものであることができる。CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及び/又はCLドメイン(及び/又は存在する場合、CH4ドメイン)は、ヒト抗体、好ましくは、ヒトIgG抗体、より好ましくは、サブタイプIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のヒトIgG1抗体に由来するものであることができる。本明細書に記載されているように、本発明の抗IgE抗体のバリエーションFcドメイン及びバリエーションFc領域は、バリエーションヒトIgG Fcドメイン又はバリエーションヒトIgG Fc領域、例えば、バリエーションヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 Fcドメイン又はFc領域であることができる。そのヒト化及び生殖系列化バリエーションを含む、ラクダ科動物由来IgE抗体のCDR又は抗原結合ドメインは、上の(i)節及び(ii)節に記載されているバリエーションヒトFcドメイン又はバリエーションヒトFc領域のいずれかと組み合わせることができる。

【0152】

有利には、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及びCLドメイン(及び存在する場合、CH4ドメイン)は全て、実質的にヒトのアミノ酸配列を有することができる。ヒト化もしくはキメラ抗体、又は抗体断片の定常領域との関連において、「実質的にヒトの」という用語は、ヒト定常領域との少なくとも90%、又は少なくとも92%、又は少なくとも95%、又は少なくとも97%、又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を指す。これに関連した「ヒトアミノ酸配列」という用語は、再配列され、かつ体細胞突然変異した生殖系列の遺伝子を含む、ヒト免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を指す。

【0153】

(vi)例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体

ある実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、以下のもの:

(i)配列番号11を含むHCDR3;配列番号10を含むHCDR2;配列番号9を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;

10

20

30

40

50

(ii)配列番号14を含むHCDR3;配列番号13を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号58を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号57を含むLCDR1;  
 (iii)配列番号17を含むHCDR3;配列番号16を含むHCDR2;配列番号15を含むHCDR1;配列番号61を含むLCDR3;配列番号60を含むLCDR2;及び配列番号59を含むLCDR1;  
 (iv)配列番号19を含むHCDR3;配列番号18を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号61を含むLCDR3;配列番号60を含むLCDR2;及び配列番号59を含むLCDR1;  
 (v)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号63を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号62を含むLCDR1;  
 (vi)配列番号24を含むHCDR3;配列番号23を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号66を含むLCDR3;配列番号65を含むLCDR2;及び配列番号64を含むLCDR1;  
 (vii)配列番号27を含むHCDR3;配列番号26を含むHCDR2;配列番号25を含むHCDR1;配列番号66を含むLCDR3;配列番号67を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;  
 (viii)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号68を含むLCDR1;  
 (ix)配列番号30を含むHCDR3;配列番号29を含むHCDR2;配列番号28を含むHCDR1;配列番号72を含むLCDR3;配列番号71を含むLCDR2;及び配列番号70を含むLCDR1;  
 (x)配列番号33を含むHCDR3;配列番号32を含むHCDR2;配列番号31を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;  
 (xi)配列番号22を含むHCDR3;配列番号23を含むHCDR2;配列番号34を含むHCDR1;配列番号63を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号62を含むLCDR1;  
 (xii)配列番号37を含むHCDR3;配列番号36を含むHCDR2;配列番号35を含むHCDR1;配列番号75を含むLCDR3;配列番号74を含むLCDR2;及び配列番号73を含むLCDR1;  
 (xiii)配列番号38を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号63を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号62を含むLCDR1;  
 (xiv)配列番号40を含むHCDR3;配列番号39を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号78を含むLCDR3;配列番号77を含むLCDR2;及び配列番号76を含むLCDR1;  
 (xv)配列番号43を含むHCDR3;配列番号42を含むHCDR2;配列番号41を含むHCDR1;配列番号81を含むLCDR3;配列番号80を含むLCDR2;及び配列番号79を含むLCDR1;  
 (xvi)配列番号14を含むHCDR3;配列番号13を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号82を含むLCDR1;  
 (xvii)配列番号45を含むHCDR3;配列番号44を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号66を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;  
 (xviii)配列番号48を含むHCDR3;配列番号47を含むHCDR2;配列番号46を含むHCDR1;配列番号85を含むLCDR3;配列番号84を含むLCDR2;及び配列番号83を含むLCDR1;  
 (xix)配列番号50を含むHCDR3;配列番号49を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号88を含むLCDR3;配列番号87を含むLCDR2;及び配列番号86を含むLCDR1;並びに  
 (xx)配列番号53を含むHCDR3;配列番号52を含むHCDR2;配列番号51を含むHCDR1;配列番号91を含むLCDR3;配列番号90を含むLCDR2;及び配列番号89を含むLCDR1  
 から選択される可変重鎖CDR3(HCDR3)、可変重鎖CDR2(HCDR2)、及び可変重鎖CDR1(HCDR1)、可変軽鎖CDR3(LCDR3)、可変軽鎖CDR2(LCDR2)、及び可変軽鎖CDR1(LCDR1)の組合せを含む抗体から選択される。

#### 【 0 1 5 4 】

ある実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、以下のもの:

- (i)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号132を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号68を含むLCDR1;
- (ii)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号135を含むLCDR1;
- (iii)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号132を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号135を含むLCDR1;
- (iv)配列番号24を含むHCDR3;配列番号23を含むHCDR2;配列番号133を含むHCDR1;配

10

20

30

40

50

列番号66を含むLCDR3;配列番号65を含むLCDR2;及び配列番号64を含むLCDR1;  
(v)配列番号24を含むHCDR3;配列番号23を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列  
番号66を含むLCDR3;配列番号65を含むLCDR2;及び配列番号64を含むLCDR1;  
(vi)配列番号19を含むHCDR3;配列番号18を含むHCDR2;配列番号134を含むHCDR1;配  
列番号61を含むLCDR3;配列番号60を含むLCDR2;及び配列番号59を含むLCDR1;並びに  
(vii)配列番号19を含むHCDR3;配列番号18を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配  
列番号136を含むLCDR3;配列番号60を含むLCDR2;及び配列番号59を含むLCDR1  
から選択される可変重鎖CDR3(HCDR3)、可変重鎖CDR2(HCDR2)、及び可変重鎖CDR1(  
HCDR1)、可変軽鎖CDR3(LCDR3)、可変軽鎖CDR2(LCDR2)、及び可変軽鎖CDR1(LCD  
R1)の組合せを含む抗体から選択される。

10

【0155】

好ましい実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、

-

【化1】

配列番号:22 [[GTSYSGSYYYTDPFFGS]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3;

-

【化2】

配列番号:21[SIYHDGSHTYYADFKVKG]

20

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2;

-

【化3】

配列番号:132[SYVMH]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1;

-

【化4】

配列番号:56[QSADSSGNPV]

30

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3;

-

【化5】

配列番号:69[DDRRPS]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

-

【化6】

配列番号:135[QGDRLGSRYIH]

40

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む。

【0156】

好ましい実施態様において、本発明の抗IgE抗体は、

【化7】

配列番号:22 [[GTSYSGSYYYTDPFFGS]

を含む可変重鎖CDR3;

50

## 【化 8】

配列番号: 21 [SIYHDGSHTYYADFVKG]

を含む可変重鎖CDR2;

## 【化 9】

配列番号: 20 [SYVMS]

を含む可変重鎖CDR1;

## 【化 10】

配列番号: 56 [QSADSSGNPV]

10

を含む可変軽鎖CDR3;

## 【化 11】

配列番号: 69 [DDDRRPS]

を含む可変軽鎖CDR2;及び

## 【化 12】

配列番号: 135 [QGDRLGSRVH]

を含む可変軽鎖CDR1

20

:を含む。

## 【0157】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、以下のもの:

(i) 配列番号92のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号93のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(ii) 配列番号94のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号95のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

30

(iii) 配列番号96のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号97のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(iv) 配列番号98のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号99のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(v) 配列番号100のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号101のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

40

(vi) 配列番号102のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号103のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(vii) 配列番号104のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号105のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の

50

(xx)配列番号130のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99

50



％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号131のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメインから選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含む抗体から選択される。

# 【0158】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、以下のもの：

(i)配列番号137のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号107のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；

10

(ii)配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；

(iii)配列番号137のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；

(iv)配列番号139のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号103のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；

20

(v)配列番号102のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号140のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；

(vi)配列番号139のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号140のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；

30

(vii)配列番号141のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号99のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン；及び

(viii)配列番号98のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号142のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン

から選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含む抗体から選択される。

40

# 【0159】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号137のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号138のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80％、90％、95％、98％、99％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

# 【0160】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号173のアミノ酸配列もしくはそれ

50

と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号174のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

【0161】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号173のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)及び配列番号174のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

【0162】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号106のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号138のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

【0163】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号215のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号174のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

【0164】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号215のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)及び配列番号174のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

【0165】

抗体又は抗原結合断片のドメインが参照配列に対する特定のパーセンテージ配列同一性によって規定される実施態様について、VH及び/又はVLドメインは、ばらつきがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するCDR配列と同一のCDR配列を保持し得る。

【0166】

上で列挙されている具体的なCDR、VH、及び/又はVLドメインのいずれかを有する例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、上の(i)及び(ii)節に記載されている実施態様によるバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片のいずれかを含有する。上で列挙されている具体的なCDR、VH、及び/又はVLドメインのいずれかを有する例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、上の(i)及び(ii)節に記載されている実施態様によるバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片のいずれかを含有する。

【0167】

ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、バリエーションIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片、好ましくは、バリエーションIgG1ドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、バリエーションヒトIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片、好ましくは、バリエーションヒトIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。

【0168】

ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含むバリエーションヒトIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。ある実

10

20

30

40

50

施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含むバリエーションヒトIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、2つの同一のバリエーションヒトIgG Fcドメインを含むか又は該ドメインからなるバリエーションヒトIgG Fc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、2つの同一のバリエーションヒトIgG1 Fcドメインを含むか又は該ドメインからなるバリエーションヒトIgG1 Fc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。

10

#### 【0169】

ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、配列番号1、2、もしくは3のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるバリエーションFcドメインを含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、2つのバリエーションFcドメインからなるバリエーションFc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、配列番号1、2、もしくは3のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、配列番号5、6、もしくは7のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるバリエーションFcドメインを含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、2つのバリエーションFcドメインからなるバリエーションFc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、配列番号5、6、もしくは7のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含む。

20

#### 【0170】

本明細書に記載される例示的なラクダ科動物由来抗IgE抗体は、pH依存的抗原結合を示す。ある実施態様において、抗IgE抗体は、可変ドメインへの1以上の置換の導入によって、pH依存的抗原結合を示すように改変することができる。好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、抗体の1以上のCDRへの1以上の置換の導入によって、pH依存的抗原結合を示すように改変される。置換は、pH依存的抗原結合を付与するために、1以上のHis残基を、可変ドメイン、好ましくは、重鎖及び/又は軽鎖CDRの1以上の部位に導入することができる。組み合わせられる6つの重鎖及び軽鎖CDRは、合計1～10個のHis置換、任意に、1～5個のHis置換、任意に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のHis置換からなることができる。抗IgE抗体は、WO2018/206748号に記載されている方法に従って改変することができる。非ヒスチジン置換を、本明細書に記載されるpH依存性抗体の可変ドメイン、特に、CDRに組み込むこともできる。

30

40

#### 【0171】

(vii)例示的な抗IgE抗体

本明細書の別所に記載されているように、IgEに結合する抗体は、当技術分野で公知である。本発明の抗IgE抗体は、IgE、好ましくは、ヒトIgEに対する結合特異性を示すことが知られている任意の抗IgE抗体のCDR、VH、及び/又はVLドメインアミノ酸配列を含み得る。

#### 【0172】

IgEに結合することが知られている例示的な抗体としては、オマリズマブ及びリゲリズマブが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗IgE抗体は、オマリズマブ又はリゲリズマブに由来するCDR、VH、及び/又はVLアミノ酸配列を含み得る。

50

## 【0173】

それゆえ、ある実施態様において、抗IgE抗体は、以下のもの：

(i)配列番号145を含むHCDR3;配列番号144を含むHCDR2;配列番号143を含むHCDR1;配列番号149を含むLCDR3;配列番号148を含むLCDR2;及び配列番号147を含むLCDR1;並びに

(ii)配列番号153を含むHCDR3;配列番号152を含むHCDR2;配列番号151を含むHCDR1;配列番号157を含むLCDR3;配列番号156を含むLCDR2;及び配列番号155を含むLCDR1;から選択される可変重鎖CDR3(HCDR3)、可変重鎖CDR2(HCDR2)、及び可変重鎖CDR1(HCDR1)、可変軽鎖CDR3(LCDR3)、可変軽鎖CDR2(LCDR2)、及び可変軽鎖CDR1(LCDR1)の組合せを含む抗体から選択される。

10

## 【0174】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、以下のもの：

(i)配列番号146のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号150のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;並びに

(ii)配列番号154のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号158のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン

20

から選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含む抗体から選択される。

## 【0175】

抗体又は抗原結合断片のドメインが参照配列に対する特定のパーセンテージ配列同一性によって規定される実施態様について、VH及び/又はVLドメインは、ばらつきがフレームワーク領域内にのみ存在するように、参照配列中に存在するCDR配列と同一のCDR配列を保持し得る。

## 【0176】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号146のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)及び配列番号150のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメインを含む。

30

## 【0177】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号154のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)及び配列番号158のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメインを含む。

## 【0178】

上で列挙されているCDR、VH、及び/又はVLアミノ酸配列を有する抗IgE抗体は、上の(iii)節に記載されているように、pH依存性となるように改変することができる。本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、可変ドメインへの1以上の置換の導入によって、pH依存性抗原結合を示すように改変することができる。好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、抗体の1以上のCDRへの1以上の置換の導入によって、pH依存性抗原結合を示すように改変される。置換は、pH依存性抗原結合を付与するために、1以上のHis残基を、可変ドメイン、好ましくは、重鎖及び/又は軽鎖CDRの1以上の部位に導入することができる。組み合わせられる6つの重鎖及び軽鎖CDRは、合計1~10個のHis置換、任意に、1~5個のHis置換、任意に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のHis置換からなることができる。抗IgE抗体は、WO2018/206748号に記載されている方法に従って改変することができる。非ヒスチジン置換を、本明細書に記載されるpH依存性抗体の可変ドメイン、特に、CDRに組み込むこともできる。

40

## 【0179】

本発明による例示的なpH依存性抗IgE抗体は、具体的なCDR、VH、及び/又はVL配列を

50

参照して、以下に記載されている。

【0180】

ある実施態様において、本発明のpH依存性抗IgE抗体は、

【化13】

配列番号: 197 [ATHYFGHWHFAV]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3;

【化14】

配列番号: 198 [SIHYDHSTNYPNPSVKG]

10

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2;

【化15】

配列番号: 195 [SGHRWE]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1;

【化16】

配列番号: 201 [QQNAEDPYT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3;

【化17】

配列番号: 200 [WGSYLRS]

20

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

【化18】

配列番号: 203 [RASQSVDYDGDHYMN]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む。

【0181】

ある実施態様において、本発明のpH依存性抗IgE抗体は、

【化19】

配列番号: 199 [ATHYFGHHHFAV]

30

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3;

【化20】

配列番号: 196 [SIHYDGSTNYPNPSVKG]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2;

【化21】

配列番号: 195 [SGHRWE]

40

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1;

【化22】

配列番号: 201 [QQNAEDPYT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3;

【化23】

配列番号: 200 [WGSYLRS]

50

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び  
【化24】

配列番号: 147 [RASQSVDYDGDSYMN]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1  
:を含む。

【0182】

ある実施態様において、本発明のpH依存性抗IgE抗体は、

【化25】

配列番号: 180 [FSHFSGSNHDYFDY]

10

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3;  
【化26】

配列番号: 152 [EIDPGTFTTNYNEKFA]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2;  
【化27】

配列番号: 179 [WYHLE]

20

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1;  
【化28】

配列番号: 157 [QQSWSWPTT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3;  
【化29】

配列番号: 156 [YASESIS]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び  
【化30】

配列番号: 155 [RASQSIGTNIH]

30

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1  
:を含む。

【0183】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号206のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号211のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

40

【0184】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号206のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号211のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

【0185】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号207のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号209のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

50

## 【0186】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号207のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号209のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

## 【0187】

ある実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号186のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号158のアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

10

## 【0188】

好ましい実施態様において、抗IgE抗体は、配列番号186のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号158のアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる可変軽鎖ドメイン(VL)を含むか又はこれらからなる。

## 【0189】

上で列挙されている具体的なCDR、VH、及び/又はVLドメインのいずれかを有する例示的な抗IgE抗体は、上の(i)及び(ii)節に記載されている実施態様によるバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片のいずれかを含み得る。上で列挙されている具体的なCDR、VH、及び/又はVLドメインのいずれかを有する例示的な抗IgE抗体は、上の(i)及び(ii)節に記載されている実施態様によるバリエーションFc領域又はそのFcRn結合断片のいずれかを含み得る。

20

## 【0190】

ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、バリエーションIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片、好ましくは、バリエーションIgG1ドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、バリエーションヒトIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片、好ましくは、バリエーションヒトIgG1ドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。

## 【0191】

ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含むバリエーションヒトIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含むバリエーションヒトIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、2つの同一のバリエーションヒトIgG Fcドメインを含むか又は該ドメインからなるバリエーションヒトIgG Fc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、2つの同一のバリエーションヒトIgG1 Fcドメインを含むか又は該ドメインからなるバリエーションヒトIgG1 Fc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436に、アミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む。

30

40

## 【0192】

ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、配列番号1、2、もしくは3のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるバリエーションFcドメインを含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、2つのバリエーションFcドメインからなるバリエーションFc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、配列番号1、2、もしくは3のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、配列番号5、6、もしくは7のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるバリエーションFcドメインを含む。ある実施態様にお

50

いて、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、2つのバリエーションFcドメインからなるバリエーションFc領域を含み、ここで、各々のバリエーションFcドメインは、配列番号5、6、もしくは7のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される例示的な抗IgE抗体は、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含む。

#### 【0193】

(B.抗IgE抗体をコードするポリヌクレオチド)

本発明はまた、本発明の抗IgE抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチド分子を提供し、宿主細胞又は無細胞発現系における該抗体又はその断片の発現を可能にする調節配列に機能的に連結された本発明の該ヌクレオチド配列を含有する発現ベクター、及びこの発現ベクターを含有する宿主細胞又は無細胞発現系も提供する。

#### 【0194】

本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド分子には、例えば、組換えDNA分子が含まれる。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、又は「ポリヌクレオチド分子」という用語は、本明細書で互換的に使用され、一本鎖又は二本鎖のいずれかの任意のDNA又はRNA分子、及び一本鎖の場合、その相補的配列の分子を指す。核酸分子を議論する際、特定の核酸分子の配列又は構造は、5'から3'への方向に配列を提供する通常の慣例に従って、本明細書に記載され得る。本発明のいくつかの実施態様において、核酸又はポリヌクレオチドは「単離されて」いる。この用語は、核酸分子に適用されるとき、それが由来した生物の天然のゲノム中で直接隣接している配列から分離されている核酸分子を指す。例えば、「単離された核酸」は、プラスミド又はウイルスベクターなどのベクターに挿入されているか、或いは原核もしくは真核細胞又は非ヒト宿主生物のゲノムDNAに組み込まれているDNA分子を含むことができる。RNAに適用されるとき、「単離されたポリヌクレオチド」は、主に、上で定義された単離されたDNA分子によってコードされるRNA分子を指す。或いは、この用語は、その天然状態で(すなわち、細胞又は組織中で)関連しているであろう他の核酸から精製/分離されているRNA分子を指すことができる。単離されたポリヌクレオチド(DNA又はRNAのいずれか)は、生物学的又は合成的手段により直接産生され、その産生の間に存在する他の構成要素から分離された分子をさらに表すことができる。

#### 【0195】

本発明による抗体の組換え産生のために、それをコードする組換えポリヌクレオチドを(標準的な分子生物学技法を用いて)調製し、選ばれた宿主細胞又は無細胞発現系における発現のための複製可能なベクターに挿入することができる。好適な宿主細胞は、原核生物、酵母、高等真核生物細胞、具体的には、哺乳動物であることができる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651);ヒト胎児腎臓株(懸濁培養での増殖用にサブクローニングされた293又は293細胞、Grahamらの文献、J. Gen. Virol. 36:59(1977));ベイビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO、Urlaubらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));マウスセルトリ細胞(TM4、Matherの文献、Biol. Reprod. 23:243-251(1980));マウス骨髄腫細胞SP2/0-AG14(ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287)又はNS0(HPAカルチャーコレクション第85110503号);サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34);バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065);マウス乳腺腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL51);TRI細胞(Matherらの文献、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5細胞;FS4細胞;及びヒト肝癌株(Hep G2)、並びにDSMのPERC-6細胞株である。これらの宿主細胞の各々で使用するのに好適な発現ベクターも当該技術分野で一般に公知である。

#### 【0196】



「宿主細胞」という用語は、一般に、培養細胞株を指すことに留意すべきである。本発明による抗体をコードする発現ベクターが導入されているヒト全体は、「宿主細胞」の定義から明白に除外される。

【0197】

(C.抗体産生)

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗IgE抗体を産生する方法であって、該抗体の発現を可能にする条件下で該抗体をコードするポリヌクレオチド(例えば、発現ベクター)を含有する宿主細胞(又は無細胞発現系)を培養すること、及び発現された抗体を回収することを含む、方法も提供する。この組換え発現プロセスは、ヒトでの治療的使用が意図されるモノクローナル抗体を含む、本発明による抗IgEの大規模製造に使用することができる。インビボでの治療的使用に好適な組換え抗体の大規模製造のための好適なベクター、細胞株、及び製造プロセスは、一般に、当技術分野で入手可能であり、かつ当業者に周知である。

【0198】

(D.医薬組成物)

本発明の範囲には、1以上の医薬として許容し得る担体又は賦形剤とともに製剤化された、本発明の抗IgEのうちの1つ又は組合せを含有する医薬組成物が含まれる。そのような組成物は、(例えば、2以上の異なる)抗IgE抗体のうちの1つ又は組合せを含むことができる。ヒトでの治療的使用のためのモノクローナル抗体を製剤化するための技法は、当技術分野で周知であり、例えば、その内容が本明細書中に完全に組み込まれる、Wangらの文献、Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp1-26, 2007で概説されている。

【0199】

組成物を製剤化するために使用し得る医薬として許容し得る賦形剤としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、人血清アルブミン、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば、プロタミン硫酸塩、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム)、ポリエチレングリコール、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂:が挙げられるが、これらに限定されない。

【0200】

ある実施態様において、医薬組成物は、限定されないが、筋肉内、静脈内、皮内、腹腔内注射、皮下、硬膜外、経鼻、口腔、直腸、局所、吸入、口腔内(例えば、舌下)、及び経皮投与を含む、任意の好適な投与経路を介する対象への投与のために製剤化される。好ましい実施態様において、該組成物は、静脈内又は皮下投与のために製剤化される。

【0201】

(E.治療方法)

本明細書に記載される抗IgE抗体及び医薬組成物は、治療方法における使用が意図される。したがって、本発明は、医薬として使用するための本発明の第一の態様による抗IgE抗体又はそれを含む医薬組成物を提供する。

【0202】

さらに提供されるのは、対象の抗体媒介性障害を治療する方法であって、それを必要としている患者に、本発明の第一の態様による抗IgE抗体又はそれを含む医薬組成物の治療有効量を投与することを含む、方法である。本発明は、それを必要としている対象における抗体媒介性障害の治療において使用するための本発明の第一の態様による抗IgE抗体又はそれを含む医薬組成物も提供する。対象は、好ましくは、ヒトである。本発明の抗IgE抗体及び医薬組成物に関して本明細書に記載される実施態様は全て、本明細書に記載される方法に等しく適用される。

【0203】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、本明細書に記載される方法に従って治療される抗体媒介性障害は、IgE媒介性障害である。ある実施態様において、抗体媒介性障害は、自己免疫障害である。本明細書に記載される方法に従って治療し得る自己免疫障害又は疾患としては、同種異系脾臓移植拒絶反応、円形脱毛症、アミロイド症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、アルツハイマー病、抗好中球細胞質自己抗体(ANCA)、自己免疫性血球減少症、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性筋炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性卵巣炎及び精巣炎、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性蕁麻疹、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャスルマン症候群、セリアックスプルー-皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、慢性誘発性蕁麻疹、慢性自発性蕁麻疹、チャージ-ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、皮膚筋炎、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、第VIII因子欠乏症、線維筋痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、グッドパスチャー症候群、移植片対宿主病(GVHD)、橋本甲状腺炎、血友病A、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgAニューロパチー、IgM多発ニューロパチー、免疫媒介性血小板減少症、若年性関節炎、川崎病、扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、メニエール病、混合性結合組織疾患、菌状息肉腫、多発性硬化症、1型真性糖尿病、多発性運動ニューロパチー(MMN)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多内分泌腺症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎及び皮膚筋炎、多発性神経炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シャープ症候群、シェーグレン症候群、固形臓器移植片拒絶反応、スティッフマン症候群、全身エリテマトーデス、高安動脈炎、中毒性表皮壊死症(TEN)、スティーブンス-ジョンソン症候群(SJS)、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血栓性血小板減少性紫斑病、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、疱疹状皮膚炎型血管炎、抗好中球細胞質抗体関連血管炎、白斑、並びにウェゲナー肉芽腫症が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0204】

好ましい実施態様において、本明細書に記載される方法は、慢性自発性蕁麻疹又は水疱性類天疱瘡の治療のためのものである。本明細書の別所で説明されているように、これらの障害は、自己反応性IgE抗体及び/又は自己反応性IgG抗体の両方の存在を特徴とする。したがって、本発明の抗IgE抗体は、両方の形態の自己反応性抗体を標的とし、それにより、CSU又はBP患者におけるIgE自己抗体レベルとIgG自己抗体レベルの両方を激減させることができるので、本明細書に記載される抗IgE抗体は、これら2つの自己免疫障害の治療に特に適している。IgE及び/又はIgG自己抗体の両方が関係するさらなる適応としては、全身エリテマトーデス、ループス腎炎、自己免疫ぶどう膜炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、チャージ-ストラウス症候群、ウェゲナー肉芽腫症、及び甲状腺自己免疫疾患、例えば、グレーブス病及び橋本甲状腺炎が挙げられる。

#### 【0205】

本明細書に記載される方法は、さらなる治療剤の投与を含み得る。

#### 【0206】

方法が慢性自発性蕁麻疹を治療するためのものである実施態様について、該方法は、抗ヒスタミン、シクロスポリン、ダブソン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、コルヒチン、メトトレキサート、IVIg、コルチコステロイド、H2受容体アンタゴニスト、又はロイコトリエンアンタゴニストから選択される1以上のさらなる治療剤の投与を含み得る。方法が水疱性類天疱瘡を治療するためのものである実施態様について、該方法は、コルチコステロイド、リツキシマブ、又は免疫抑制物質、例えば、アザチオプリン、ミコフェノレート、ダブソン、メトトレキサート、クロランブシル、及びシクロホスファミドから選択される1以上のさらなる治療剤の投与を含み得る。

#### 【0207】

本明細書に記載される方法に従って治療される患者又は対象は、既に治療を受けていて

もよいし、又は以前の治療に失敗していてもよい。例えば、本明細書に記載される方法に従って治療される患者又は対象は、コルチコステロイド、免疫抑制物質、IVIg、抗ヒスタミン、及び/もしくはオマリズマブなどの治療を受けていてもよいし、又は該治療を既に受けたことがあってもよい。

【0208】

(引用による組み込み)

様々な刊行物が前述の説明において及び以下の実施例の全体を通して引用されており、これらは各々、引用により完全に本明細書中に組み込まれる。

【実施例】

【0209】

10

(実施例)

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照して、さらに理解される。

【0210】

(実施例1. ラマにおける抗IgE抗体の産生)

(A. ラマの免疫)

不完全フロイントアジュバントと混合した後、4頭のラマを、首への筋肉内注射によって、組換えヒト免疫グロブリンE(hIgE)(Abcam製のプロテインL精製IgE; cat# ab65866)で免疫した。免疫スキームは、表6にまとめられている。

表6: 免疫スケジュール及び組織回収のまとめ

【表6】

20

週	日付	日	抗原の量	組織回収
0	1/11/2012			免疫前血清
1	1/11/2012	1	100µg	
2	8/11/2012	8	100µg	
3	15/11/2012	15	50µg	
4	22/11/2012	22	50µg	
5	29/12/2012	28	50µg	
6	6/11/2012	34	50µg	
7	10/11/2012	38		400 mlの免疫血液 10 mlの免疫血液(血漿)
12(*)	17/01/2013		50µg	
13(*)	24/01/2013		50µg	
14(*)	29/01/2013			400 ml の免疫血液 + 免疫血清

30

(\*) ラマのAdelio及びShanioをhIgEの2回の注射で追加免疫した。

【0211】

最後の免疫から4~5日後、免疫ラマ由来の400mLの血液を回収して、PBMCを単離し、RNA抽出を可能にした。免疫ラマの免疫応答を決定するために、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)設定を使用した。

40

【0212】

ELISAを実施するために、Maxisorpプレートを、1 µg/mlのhIgEで、4、O/Nでコーティングした。プレートをPBS-Tweenで洗浄し、PBS+1%カゼインで2時間ブロッキングした。免疫前及び免疫後のラマ血清の連続希釈物をプレートのウェルに添加し、1時間インキュベートした。コーティングしたhIgEに結合したラマ免疫グロブリン(Ig)をマウス抗ラマVH特異的抗体(27E10)で検出した。検出は、抗マウスIgG-HRP(DAMPO)で実現した。最後に、TMBの添加後、反応を0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、吸光度を450nmで測定した(Tecan Sunrise, Magellanソフトウェア)。全ての免疫ラマがhIgEに対する特異的免疫応答を示した(図1を参照)。

【0213】

50

## (B.ライブラリー構築(Fab))

Fabライブラリーを次のように構築した: Qiagen製のRneasy Midiキットを用いて、mRNAを免疫ラマの血液から単離されたPBMCから精製した。RNAの完全性をExperion Std Sens Analysis Kitによって確認した。mRNAをランダムヘキサマープライマーで逆転写させて、cDNAを得た。重鎖及び軽鎖ライブラリーの構築のために、2段階PCRを使用した。まず、非タグ化プライマーをcDNAに対して直接用いて、VH-CH1、VL-CL、及びVk-Ckを増幅させた。その後、PCR産物を精製し、タグ化プライマーとともに第二のPCRで用いて、VH-CH、VL、及びVkを増幅させた。軽鎖(V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub> 又はV<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>)を同じラマに由来する重鎖(VH-CH)ライブラリーに再クローニングして、Fabライブラリーを作成した。

表7: 作製されたライブラリーのサイズ(CFU)

10

【表 7】

	Vk-Ck	Vλ-CL	VH-CH1	Fab ライブラリー VH-CH/Vk-Ck	Fab ライブラリー VH-CH/Vλ-CL
<b>ADELIO</b>	3.0x10 <sup>9</sup>	6x10 <sup>8</sup>	1.2 x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	8.0x10 <sup>8</sup>
<b>FENJO</b>	8.8x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	8.8x10 <sup>8</sup>
<b>MAIKO</b>	5.6x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	7.6x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>
<b>SHANIO</b>	2.2x10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.2x10 <sup>9</sup>

## 【 0 2 1 4 】

特異的なhlgE Fab断片を発現するファージの濃縮を、固定化されたhlgEに対する3ラウンドの選択によって実施した。ファージ選択後の溶出のタイプだけが異なる2つの異なる選択方法を使用した。

20

## 【 0 2 1 5 】

hlgEに特異的な適当なFabクローンの最初の選択をバイオパニングアプローチによって実施した。簡潔に述べると、hlgEをMaxisorp ELISAプレート上に固定化し、その後、TBS pH7.4中のFabファージライブラリー(Input)を添加した。未結合のファージを複数の洗浄工程によって除去した。最後に、結合したファージをトリプシン又はTBS pH 5.5で溶出させた。選択されたファージを増幅させるために、大腸菌(E.coli)を溶出された材料で感染させた。このプロセスは、hlgEに対する高い親和性を有するFabを発現するファージ集団の濃縮をもたらした。選択ラウンドの最後に、溶出されたファージの数を感染した大腸菌の力価測定によって推定し、アンピシリン及びグルコースを含む固体LB培地を含有するペトリ皿の上にスポットした(10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-6</sup>)。両方のラマ由来のラムダ及びカッパライブラリーの第一の選択ラウンドは、hlgEに対する特異的ファージのわずかな濃縮をもたらした。第二及び第三の選択ラウンドは、おそらくhlgEに対するより高い親和性を有するFabを発現するファージの濃縮をもたらした。2つの異なる選択作戦を実施した:

30

・作戦1: 3つ全ての選択ラウンドを、Abcamで購入したhlgEを用いて行った(cat# ab65866)。1~9で始まるクローンをこの作戦で得た。

・作戦2: 第一の選択ラウンドを、Abcam hlgEを用いて行った。第二及び第三の選択ラウンドを、Kerafastで購入したhlgE:(cat # EX0011)を用いて行った。10~20で始まるクローンをこの作戦で得た。

40

## 【 0 2 1 6 】

表3~5は、様々な選択ラウンドに使用されたコーティング量を示している。単一クローンの作製の結果として、マスタープレートが作製された。これらのマスタープレートから、ペリプラズムマスタープレート(PMP)を産生した。Fabフォーマットの抗体断片は、IPTGによる誘導によって、大腸菌のペリプラズム空間に分泌させることができる。このために、マスタープレート由来の単一のクローンをまず96ウェルフォーマット(ディープウェル)で増幅させ、Fabの産生をIPTGとの終夜インキュベーションによって誘導した。翌日、細菌を2サイクルの凍結/融解(-80 °C 及び-20 °C)によって溶解させた。遠心分離後、上清(ペリプラズム抽出物)を回収し、その結合能力を試験する(ELISA及びBiacore)ために、別々の96ウェルプレートに移した。

50

表8:第一の選択ラウンド(R1)

【表 8】

	ファージ ( $\mu$ l)	hIgEコーティング ( $\mu$ g/ml)	溶出
R1a	10	50	トリプシン
R1b	10	5	トリプシン
R1c	10	50	pH5.5
R1d	10	5	pH5.5

表9:第二の選択ラウンド(R2)

【表 9】

	ファージ ( $\mu$ l)	hIgEコーティング ( $\mu$ g/ml)	溶出
R2a	5	20	トリプシン
R2b	5	2	トリプシン
R2c	5	20	pH5.5
R2d	5	2	pH5.5

表10:第三の選択ラウンド(R3)

【表 10】

	ファージ ( $\mu$ l)	コーティング ( $\mu$ g/ml)	溶出
R3a	1	2	トリプシン
R3b	1	0,2	トリプシン
R3c	1	2	pH5.5
R3d	1	0,2	pH5.5

## 【0217】

(C. ELISAによるFabペリプラズム抽出物のスクリーニング)

hIgEへのFabの結合能力を試験するために、ELISA結合アッセイを確立した。簡潔に述べると、MaxisorpプレートをhIgE(1  $\mu$ g/mL)でコーティングし、その後、PBS 1%カゼインでブロッキングした後、Fab-Mycを含有するペリプラズム抽出物(PBS中、希釈1/4)とともにインキュベートした。抗Myc-HRP抗体を用いて、バインダーの検出を実施した。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。

## 【0218】

(D. 競合ELISAによるFabペリプラズム抽出物のスクリーニング)

IgE-Fc RI 相互作用を遮断するFabを同定するために、競合ELISA結合アッセイを確立した。簡潔に述べると、Maxisorpプレートを1  $\mu$ g/mLの可溶性Fc RI (R&D system, cat #6678-FC)でコーティングし、その後、PBS 1%カゼインでブロッキングした。ビオチン化hIgEをペリプラズム抽出物(PBS中、希釈1/4)とともにプレインキュベートした後、Fc RI をコーティングしたウェルに添加した。ストレプトアビジン-HRP試薬を用いて、hIgE結合を検出した。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。

## 【0219】

(E. SPRによるpH依存的結合Fabペリプラズム抽出物のスクリーニング)

hIgEへの結合能力を、pH 7.4及びpH 5.5で、Biacore T3000で解析した。このために、CM5チップに、2000RUでhIgEをコーティングした。ペリプラズム抽出物(HBSEP pH7.4バッファー又はHBSEP pH5.5中、希釈1/10)をhIgEでコーティングしたチップに注入した。生データを、ブランク減算を用いて、BIA評価ソフトウェアにより解析した。

## 【0220】

pH依存性IgE結合クローンのCDR、VH、及びVL配列は、下の表11~13に示されている。

10

20

30

40

50

表11: IgEに結合するFabの重鎖CDR配列

【表11】

Fabクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
3D6	SYVMT	9	SIYSDGNTYYADSVKG	10	DLKARYSGSYHDEGYDY	11
16E4	SYVMS	12	SIYSDGSYAYYADSVKG	13	DLKARYSGTYHDEGYDY	14
3A1	NYAMS	15	AIWNNGGSTYYAESMKG	16	DLLVAARGGMDY	17
3D1	SYVMS	12	SIYSDGRGSKTFYADSVKG	18	DLLVAARGSM	19
13E4	SYVMS	20	SIYHDSHTYYADFVKG	21	GTSYSGSYYYTDPFFGS	22
18B9	SYVMS	20	SIYSDGSHTYYADSVKG	23	NLEHYSGSYYYTDPRYDY	24
20D5	SYVMT	25	SIYSDGSHTYYADSVKD	26	DAEYYSGSYYYTDTKYDY	27
18E2	SYVMS	20	SIYHDSHTYYADFVKG	21	GTSYSGSYYYTDPFFGS	22
14F10	DYDMS	28	IISWNGGSTDYAESMKG	29	HSVGRNGYDY	30
15C3	NYVMS	31	SIYSDGGYTYADSVKG	32	DLKPRNSGTYHDEGYDD	33
15D12	TYVMS	34	SIYSDGSHTYYADSVKG	23	GTSYSGSYYYTDPFFGS	22
17A10	TSYYAWN	35	VIAYDGGSTDYSPSLKS	36	DYRINSDYAGGYDY	37
17G12	SYVMS	20	SIYHDSHTYYADFVKG	21	GTSYSASYYYTDPFFGS	38
17H2	SYVMS	12	SISSDGSNPYYADSVKG	39	DTLTGASYSDSLYDY	40
19H2	SYAMS	41	SIYSSSNTYYADSVKG	42	TTLRLTYSDYRYDY	43
20A1	SYVMS	12	SIYSDGSYAYYADSVKG	13	DLKARYSGTYHDEGYDY	14
20D2	SYVMS	12	SIYSDDSNTDYADSVKG	44	ATGTVGYSDYFYDY	45
20G5	DYAMS	46	GISWKGGIYYAESMEG	47	ALGTVASGGQYDY	48
21A1	SYVMS	12	SISSDGSNTYYADSVKG	49	DDNSGSDYEFGYDY	50
4D8	SSYYDWT	51	VIHYDGSITYYSPSLKS	52	SYSSSPWDYDY	53

表12: IgEに結合するFabの軽鎖CDR配列

10

20

30

40

50

【表 1 2】

Fabクローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
3D6	QGGSLGSSYAH	54	DDDSRPS	55	QSADSSGNPV	56
16E4	QGGSLGATYAY	57	DDDSRPS	55	QSAYSNGNAV	58
3A1	QGGTLGSYGAH	59	GDNSRPS	60	QSFYSGNAV	61
3D1	QGGTLGSYGAH	59	GDNSRPS	60	QSFYSGNAV	61
13E4	QGGSLGSNYAY	62	DDDSRPS	55	QSADSNNGNAV	63
18B9	QGGSLGSSYVH	64	DGDSRPS	65	QSADSSGNAV	66
20D5	QGGSLGSSYAH	54	ADDSRPS	67	QSADSSGNAV	66
18E2	QGDRLGSRYY	68	DDDRRPS	69	QSADSSGNPV	56
14F10	QGGSLGTSYAY	70	DDNRPSP	71	QSEDTSSNFV	72
15C3	QGGSLGSSYAH	54	DDDSRPS	55	QSADSSGNPV	56
15D12	QGGSLGSNYAY	62	DDDSRPS	55	QSADSNNGNAV	63
17A10	TGSSSNIGGGYYLS	73	NANRRAS	74	GCYDSSLSTPV	75
17G12	QGGSLGSNYAY	62	DDDSRPS	55	QSADSNNGNAV	63
17H2	QGGSLGGSYAH	76	DDTSRPS	77	QSSYSSGNPV	78
19H2	QGDNLGNVYVQ	79	DDNRRPS	80	QASDSSGNAV	81
20A1	QGGNLGSSYAH	82	DDDSRPS	55	QSADSSGNPV	56
20D2	QGGSLGSSYAH	54	DDDSRPS	55	QSADSSGNAV	66
20G5	AGTSNDVGYGNYVS	83	DVNKRAS	84	ASYRTNNNVV	85
21A1	QGDNFGSYYAS	86	KDSERPS	87	LSYDNNNGAPV	88
4D8	AGTSSDIGGNSVS	89	EVNKRAS	90	ASYRNSNNVV	91

表13: IgEに結合するFabのVH及びVL配列

10

20

30

40

【表 1 3】

(56)

JP 7586833 B2 2024.11.19

Fabクローン	VH	配列 番号	VL	配列 番号
3D6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YYMTWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGSNTYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLHLQMNSLKSEDTA VYYCAKDLKARYSGSYHDEGYDYWGQGTV TVSS	92	QSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSSYAHWY QQKPGQAPVLIYDDDSRPSGIPERFSGSSGGRA TLTISGAQAEDEGDYYCQSADSSGNPVPVFGGGTKLT VL	93
16E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YYMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGSYAYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAV YYCAKDLKARYSGTYHDEGYDYWGQGTV VSS	94	SSALTQPSALSVTLGQSAKITCQGGSLGATYAYWY QQKPGQAPVLIYDDDSRPSGIPERFSGSSGGRA TLTISGAQAEDEGDYYCQSAYSNGNAVFGGGTHLT VL	95
3A1	EVQVQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD NYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGSTYY AESMKGRFTISRDNAKNMLYLQMNSLKSEDT AVYYCAKDLLVAARGGMDYWGKGLTVTVSS	96	SSALTQPSAVSVSLEQTARITCQGGTLGSYGAWY QQKPGQAPVLLIYGDNSRPSGIPERFSGTRSGGTA TLTISGAQAEDEADYYCQSFYSGNAVFGGGTHLT VL	97
3D1	QLQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YYMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGRGSKTF YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDT AVYFCAKDLLVAARGMDYWGQGTVTVSS	98	NFMLTQPSAVSVSLEQTARITCQGGTLGSYGAWY QQKPGQAPVLLIYGDNSRPSGIPERFSGTRSGGTA TLTISGAQAEDEADYYCQSFYSGNAVFGGGTHLT VL	99
13E4	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YYMSWVRQAPGKGLEWVSSIYHDGSHYYA DFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAV YYCASGTSYSGSYYYTDPFFGSGWGQGTV VSS	100	HSAVTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSNYAYWY QQKPGQAPVLIYDDDSRPSGIPERFSGSSGGTA TLTISGAQAEDEGDYYCQSADSNGNNAVFGGGTHLT VL	101
18B9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YYMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGSHYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAV	102	SSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSSYVHWY QQKPGQAPVLIYDGDSRPSGIPERFSGSSGGTA TLTISGAQAEDEDDYYCQSADSSGNNAVFGGGTHLT	103

10

20

30

40

50



	YYCAKNLEHYSGSYYYTDPRYDYGQGTQV TVSS		VL	
20D5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSS YVMTWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGSHYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCAKDAEYYSGSYYYTDTKYDYGWGGGTQV TVSS	104	SSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSSYAHWY QKPGQAPVLVIYDDSRPSGIPERFSGSSGGTA LTISGAQAEDGDYCYQCSADSSGNPVFGGGTHLT VL	105
18E2	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YVMSWVRQAPGKGLEWVSSIYHDGSHYYA DFVKGRTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCASGTSYSGSYYYTDPFFGSGWGGGTQVT VSS	106	NFMLTQPSALSVTLGQTARITCQGDRLGSRYYWY QKPPQAPVLVIHDDRRRPSGIPERFSGSSGGTA LTISGAQAEDGDYCYQCSADSSGNPVFGGGTHLT VL	107
14F10	EVQVQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD DYDMSWVRQAPGKGLEWVSIISWNGGSTDY AESMKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDT AVYFCAKHSVGRNGYDYGWGGGTQVTVSS	108	NFMLTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGTSYAYWY QKAGQAPVVIYDDNRPSGIPERFSGSSGGTA LTISGAQAEDGDYCYQCSADSSGNPVFGGGTHLT VL	109
15C3	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN YVMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGGYTYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCAKDLKPRNSGTYHDEGYDDWGGGTQVT VSS	110	SSELTQASALSVTLGQTAKITCQGGSLGSSYAHWY QKPGQAPVLVIYDDSRPSGIPERFSGSSGGRA LTISGAQAEDGDYCYQCSADSSGNPVFGGGTKLT VL	111
15D12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST YVMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSDGSHYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTA MYYCTTGTSYSGSYYYTDPFFGSGWGGGTQVI VSS	112	HSVLTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSNYAYWY QKPGQAPVLVIYDDSRPSGIPERFSGSSGGTA LTISGAQAEDGDYCYQCSADSSGNPVFGGGTHLT VM	113
17A10	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITT SYYAWNWIROPKPGKLEWVGVIAYDGGSTDY SPSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDTA VYYCARDYRINSYAGGYDYWGQGTQVTVS	114	QPVNLQLSSMSGSPGQTVTITCTGSSSNIGGGYYL SWYQQLPGTAPKLLYNANNRASGVPNRFGSKTG SLASLTITGLQAEADYCYCGCYDSSSLSTPVFGGTT KLIVL	115

10

20

30

40

50

	S				
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YMSWVRQAPGKGLWVSSIHGSHYYA DFVKGRTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCASGTSYSASYYYTDPFFGSGWGQTQVT VSS	116	SYELTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSSYAHWY QOKPGQAPVLVIYDDDSRPSGIPERFSGSSGGTA TLTISGAQAEDEGDYYCQASDSNGNAVFGGGTHLT VL	117	
17G12					
	QVQVEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYMSWVRQAPGKGLWVSSISSDGSNPYY ADSVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTA VYYCAKDTLTGASYSDSLIDYVWGGQTQVT SS	118	SSALTQPSALSVTLGQTADITCQGGSLGSSYAHWY QOKPGQAPMLVIYDDTSRPSGIPERFSGSSGDRV TLTISGAQAEDEGDYYCQSSYSSGNPVPFGGGTKLT VL	119	
17H2					
	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLWVSSIYSYSSNTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAVY YCAKTTLSRLTYSDYRYDYWGQGTQVTSS	120	SYELTQPSALSVTLRQTAKITCQGGNLGNVYQWY QOKPGQAPELVIYDDNRPSGIPERFSGSSGGTA TLTISGAQAEDEGDYYCQASDSNGNAVVGGGTHLII L	121	
19H2					
	QLQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YMSWVRQAPGKGLWVSSISDGSYAYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCAKDLKARYSGTYHDEGYDYWGQGTQVT VSS	122	QSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGNLGSSYAHWY QOKPGQAPVLVIYDDDSRPSGIPERFSGSSGGTA TLIISGAQAEDEGDYYCQASDSNGNPVPFGGGTKLT VL	123	
20A1					
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YMSWVRQAPGKGLERVSSIYSDDSNTDYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCAKATGTVGYYSDYFYDYWGQGTQVTVS S	124	NFMLTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGSSYAHWY QOKPGQAPVLVIYDDDSRPSGIPERFSGSSGGTA TLTISGAQAEDEGDYYCQASDSNGNAVFGGGTHLT VL	125	
20D2					
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDD YAMSWVRQAPGKGLWVSGISWKGGIYYAE SMEGRTISRDNAKNTLYQMNSLKSEDTAV YYCAKALGTVASGQDYWGQGTQVTSS	126	SSALTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSNDVYGNVY SWYQQLPGMAPKLLIYDVNKRASGITDRFSGSKSG NTASLTISGLQSEDEADYYCASYRTNNNVFGGGT KVTVL	127	
20G5					
21A1	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	128	SYELTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGSYASWY	129	

10

20

30

40

50

	YYMSWVRQAPGKGLEWVFSISSDGSNTYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAV YYCAKDDNSGSDYEFGYDWGQGTQVTYSS		QQKSGQAPVRVIYKDSERPSGIPERFSGSSGDTA TLTISGAQFEDEADYYCLSYDNNGAPVFGGKLT VL	
4D8	ELQLVESGPGLVKPSQTLTLCTVSGASITSS YYDWTWIRQPPGKGLEWMGVHYDGGSTYYS PSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAV YYCTQSYSSSPWDYDYWGQGTQVTYSS	130	QAVLTQPPSVSGTLGKTLTISCAGTSSDIGGYNVS WYQQPLPGTAPKLLIYEVNKRASGIPDRFSGSKSGN TASLSISGLQSEDEADYYCASYRNSNNVFGGGTH LTVL	131

【 0 2 2 1 】

(実施例2.抗IgE Fabクローンのさらなる特徴解析)

(A. Fabクローンのシーケンシング及び再フォーマット化)

以下の8つのFabクローン: 3D6、16E4、3A1、3D1、13E4、18B9、20D5、及び18E2を、さらなる特徴解析のために、ヒトhIgG1 Fcに再クローニングした。

【 0 2 2 2 】

このために、各々のクローンのVH及びVLを、特異的プライマーを用いてPCR増幅させ、電気泳動によって分離し、精製し、制限酵素(BsmBi)で消化した。消化及び浄化後、DNA(VH又はVL)のライゲーションを行って、ヒトラムダもしくはカッパ軽鎖(V については

pUPEX116.08、V<sub>H</sub>についてはpUPEX116.09)又はヒトIgG1重鎖(CH1-CH2-CH3、pUPEX116.07)の定常ドメインを含有する予めBsmBiで消化したベクターに入れた。熱ショック及びアンピシリン(ベクターの耐性遺伝子)を含むアガロースプレート上への移し替えによって、ライゲーションされた産物の各々の形質転換を行い、Top10細菌に入れた。各々のクローン(HC及びLC)について、4~8個のコロニーを拾い、シーケンシングに送った。適切な挿入物を示すクローンを選択し、DNA配列を精製する(MidiPrep)ために増幅させた。

#### 【0223】

8つのヒトIgG1抗体の産生を、重鎖DNA発現ベクターと軽鎖DNA発現ベクターを1/1の比で含有する混合物によるHEK293E細胞のトランスフェクション(ポリエチレンイミン(PEI)を使用)によって実施した。細胞に6日間発現させた後、プロテイン-Aセファロースビーズを用いて、ヒトモノクローナル抗体を細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を実施して、抗体の純度及び完全性を評価した。

#### 【0224】

(B.抗hIgEモノクローナル抗体の特徴解析)

ELISAとT3000 Biacoreを用いるSPRとを用いて、抗hIgE mAbパネルの結合特性を評価した。

#### 【0225】

(i.結合ELISA)

hIgEの配列をWGSデータベースから取得した。モタビズマブ抗体のVH及びhIgEの定常重鎖(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)をコードするDNAを合成し、発現ベクターに再クローニングした。モタビズマブ軽鎖の可変及び定常ヒトV<sub>H</sub>と一緒に、IgEベクターをCHO K1細胞にトランスフェクトし、組換えモタビズマブヒトIgE(rMota-hIgE)を産生した。MabSelect(商標) SuRe(商標)を用いて、hIgEを精製した。rMota-hIgEを用いて、ELISAにより、8つの抗hIgE mAbの相対的結合特性を評価した。簡潔に述べると、Maxisorpプレートを組換えヒト呼吸器合胞体ウイルスタンパク質F(RSV-F)(0.5 µg/mL)でコーティングし、その後、3%BSA及び0.05%Tweenを含むPBSでブロッキングした。1 µg/mLのrMota-hIgEを捕捉した後、抗hIgE mAbの連続希釈物とともにインキュベートした。pH 7.4又はpH 5.5での数回の洗浄工程の後、抗ヒトFc-HRP抗体を用いて、結合したmAbの検出を実施した。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。再クローニングされた抗体は全て、ヒトIgEに結合することができた(図2を参照)。

#### 【0226】

(ii.競合ELISA)

初期のスクリーニング時に使用された設定とちょうど同じ設定において、8つの異なる抗hIgE抗体によるhFc<sub>RI</sub>へのhIgE結合の阻害をpH 7.4及びpH 6でELISAによって解析した。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のIC<sub>50</sub>値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対応答可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、図3及び表14に示されている。クローン13E4は、pH 7.4でhIgEに対する最大の親和性を示した。3つのクローン: 3D6、16E4、及び18B9は、hIgEに対する最大のpH依存的示差親和性を示した。

表14: ELISAによるFc<sub>RI</sub>へのhIgE結合の阻害のIC<sub>50</sub>(nM)

10

20

30

40

50

【表 1 4】

抗体	IC50 (nM) (pH 7.4)	IC50 (nM) (pH 6)	比 pH 6/7.4
3D6	75.43	214.4	2.8
16E4	57.98	156.3	2.7
3A1	152	148.4	1.0
3D1	90.34	118.4	1.3
13E4	10.32	12.89	1.2
18B9	41.9	112.2	2.7
20D5	35.19	39.15	1.1
18E2	36.88	87.76	2.4

10

## 【 0 2 2 7】

(iii. SPR解析: Fc RIへのIgE結合の競合)

ヒト抗hIgE IgG1 mAbの結合能力をBiacore T3000で解析した。このために、競合アプローチを設定した。CM5チップに、1500RUでhFc RI をコーティングした。固定濃度のhIgE(1 µg/mL)を連続濃度のヒトIgG1抗体パネルとともにブレインキュベートした後、hFc RI でコーティングしたチップに注入した。このアッセイをHBS-EP pH7.4又はHBS-EP pH 5.5中で実施した。生データを、ブランク減算(2-1)を用いて、BIA評価ソフトウェアにより解析した。RU値をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のIC50値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対応答可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、下の図4及び表15に示されている。競合ELISAで観察されたように、最大効力を有する抗体は、クローン13E4である。このアプローチにおいて、クローン3D6は、最大のpH依存度を示した。

20

表15: BiacoreによるFc RIへのhIgE結合の阻害のIC50(nM)

【表 1 5】

抗体	IC50 (nM) (pH 7.4)	IC50 (nM) (pH 6)	比 pH 6/7.4
3D6	4.366	8.041	1.8
16E4	4.251	5.167	1.2
3A1	4.759	6.912	1.5
3D1	5.308	4.442	0.8
13E4	1.621	1.543	1.0
18B9	4.091	5.646	1.4
20D5	3.385	3.830	1.1
18E2	NA	NA	

30

## 【 0 2 2 8】

(C. カニクイザルIgE(cIgE)に交差反応するクローンの同定)

cIgEの配列をWGSデータベースから取得した。この配列は、完全なFc(C 1 ~ C 4)で85%の同一性を示した。モタビズマブ抗体のVH及びcIgEの定常重鎖(C 1 ~ C 4)をコードするDNAを合成し、発現ベクターに再クローニングした。モタビズマブのVLをコードするDNAを、Vカッパ定常領域を含有する発現ベクターにクローニングした。プラスミドをCHO K1細胞にトランスフェクトした。MabSelect(商標) SuRe(商標)を用いて、cIgEを精製した。ELISAとT3000 Biacoreを用いるSPRとを用いて、抗hIgE mAbパネルの交差反応性を評価した。

40

## 【 0 2 2 9】

(i. 結合ELISA)

hIgEに使用された設定と同様の設定において、8つの抗hIgE mAbの相対的結合特性をELISAによって解析した。簡潔に述べると、MaxisorpプレートをRSV-F(0.5 µg/mL)でコ

50

ーティングし、その後、3%BSA及び0.05%Tweenを含むPBSでブロッキングした。1 µg/mlのrMota-cIgEを捕捉した後、抗hIgE mAbの連続希釈物とともにインキュベートした。pH 7.4又はpH 5.5での数回の洗浄工程の後、結合したmAbの検出を、抗ヒトFc-HRP抗体を用いて行った。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。8つのクローンは、様々な親和性でcIgEに結合することができる(図5を参照)。クローン3D6及び13E4は、cIgEに対するpH依存的結合親和性を有する。

【0230】

(実施例3.ヒスチジン改変によるIgE/Fc RI 相互作用を遮断するpH依存性抗IgE抗体の同定)

10

(A. pH依存的IgE結合の改変)

pH依存度を増大させるために、3つの抗体を選択した。ヒスチジン突然変異を、引用により本明細書中に組み込まれるWO2018/206748号に記載されているように、合理的な位置選択によってCDR配列に導入して、突然変異させた。

【0231】

突然変異クローンのCDR、VH、及びVL配列は、下の表16、17、及び18に記載されている。

表16: hIgEに対するpH依存的親和性を増大させるために産生された抗体の重鎖CDR配列

20

30

40

50

【表 1 6】

抗体 クローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
18E2	SYVMS	20	SIYHDGSHTYYADFVKG	21	GTSYSGSYYYTDPFFGS	22
VH18E2_S35H	SYVMH	132	SIYHDGSHTYYADFVKG	21	GTSYSGSYYYTDPFFGS	22
18B9	SYVMS	20	SIYSDGSHTYYADSVKG	23	NLEHYSGSYYYTDPRYDY	24
VH18B9_S35H	SYVMH	133	SIYSDGSHTYYADSVKG	23	NLEHYSGSYYYTDPRYDY	24
3D1	SYVMS	12	SIYSDGRGSKTFYADSVKG	18	DLLVAARGSM	19
VH3D1_S35H	SYVMH	134	SIYSDGRGSKTFYADSVKG	18	DLLVAARGSM	19

表17: hIgEに対するpH依存的親和性を増大させるために産生された抗体の軽鎖CDR配列

10

20

30

40

【表 1 7】

抗体 クローン	CDR1	配列 番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
18E2	QGDRLGSRYY	68	DDRRPS	69	QSADSSGNPV	56
VL18E2_Y34H	QGDRLGSRYYH	135	DDRRPS	69	QSADSSGNPV	56
18B9	QGGSLGSSYYH	64	DGDSRPS	65	QSADSSGNV	66
VL18B9_Y49H	QGGSLGSSYYH	64	DGDSRPS	65	QSADSSGNV	66
3D1	QGGTLGSYG	59	GDNSRPS	60	QSFDYSGNAV	61
VL3D1_Y49H VL3D1_Q89H	QGGTLGSYG	59	GDNSRPS	60	HSFDYSGNAV	136

表18: hIgEに対するpH依存的親和性を増大させるために選択された抗体のVH及びVL配列

10

20

30

40

50



【表 1 8】

抗体 クローン	VH	配列番号	VL	配列番号
18E2	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVM <del>HW</del> VRQAPGKGLEWV SSIH <del>HD</del> GSHTYYAD <del>FD</del> VKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKS <del>ED</del> TA <del>VY</del> YCAS GTSYSGSYYYTDPFFGSWGQGTQV TVSS	106	NFMLTQPSALSVTLGQTARITCQGDRLG SRYI <del>HW</del> YQQKPPQAPVLVIHDD <del>DR</del> RRPSGI PERFSGSSGGTATLTISGAQAE <del>DD</del> GDY YQCSADSSGNP <del>V</del> FGGGTHLTVL	107
VH18E2_S35 H	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVM <del>HW</del> VRQAPGKGLEW VSSIH <del>HD</del> GSHTYYAD <del>FD</del> VKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKS <del>ED</del> TA <del>VY</del> YCAS GTSYSGSYYYTDPFFGSWGQGTQV TVSS	137	NFMLTQPSALSVTLGQTARITCQGDRLG SRYI <del>HW</del> YQQKPPQAPVLVIHDD <del>DR</del> RRPSGI PERFSGSSGGTATLTISGAQAE <del>DD</del> GDY YQCSADSSGNP <del>V</del> FGGGTHLTVL	107
VL18E2_Y34 H	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVM <del>HW</del> VRQAPGKGLEWV SSIH <del>HD</del> GSHTYYAD <del>FD</del> VKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKS <del>ED</del> TA <del>VY</del> YCAS GTSYSGSYYYTDPFFGSWGQGTQV TVSS	106	NFMLTQPSALSVTLGQTARITCQGDRLG SRYI <del>HW</del> YQQKPPQAPVLVIHDD <del>DR</del> RRPSG IPERFSGSSGGTATLTISGAQAE <del>DD</del> GDY YQCSADSSGNP <del>V</del> FGGGTHLTVL	138
18E2_VH_S3 5H_VL_Y34 H	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVM <del>HW</del> VRQAPGKGLEW VSSIH <del>HD</del> GSHTYYAD <del>FD</del> VKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKS <del>ED</del> TA <del>VY</del> YCAS GTSYSGSYYYTDPFFGSWGQGTQV TVSS	137	NFMLTQPSALSVTLGQTARITCQGDRLG SRYI <del>HW</del> YQQKPPQAPVLVIHDD <del>DR</del> RRPSG IPERFSGSSGGTATLTISGAQAE <del>DD</del> GDY YQCSADSSGNP <del>V</del> FGGGTHLTVL	138
18B9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVM <del>HW</del> VRQAPGKGLEWV SSIYSDGSHTYYAD <del>SV</del> VKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKS <del>ED</del> TA <del>VY</del> YCAK NLEHYSGSYYTDP <del>RYD</del> YWGQGTQ VTSS	102	SSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGS SYVHWYQQKPGQAPVLVIYGD <del>SR</del> PSGI PERFSGSSGGTATLTISGAQAE <del>DE</del> DDY YQCSADSSGN <del>V</del> FGGGTHLTVL	103

10

20

30

40

VH18B9_S35 H	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEW VSSYSDGSHTYYADSVKGRFTISR NAKNTLYQMNSLKSEDTAVYYCAK NLEHYSGSYYYTDPYDYWGQGTQ VTSS	139	SSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGS SYVHWYQQKPGQAPVLIYDGSRP PERFSGSSGGTATLTISGAQAEDEDDY YQCSADSSSGNAVFVGGGTHLTVL	103
VL18B9_Y49 H	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEW SSYSDGSHTYYADSVKGRFTISR NAKNTLYQMNSLKSEDTAVYYCAK NLEHYSGSYYYTDPYDYWGQGTQ VTSS	102	SSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGS SYVHWYQQKPGQAPVLIYDGSRP PERFSGSSGGTATLTISGAQAEDEDDY YQCSADSSSGNAVFVGGGTHLTVL	140
18B9_VH_S3 5H_VL_Y49 H	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEW VSSYSDGSHTYYADSVKGRFTISR NAKNTLYQMNSLKSEDTAVYYCAK NLEHYSGSYYYTDPYDYWGQGTQ VTSS	139	SSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGSLGS SYVHWYQQKPGQAPVLIYDGSRP PERFSGSSGGTATLTISGAQAEDEDDY YQCSADSSSGNAVFVGGGTHLTVL	140
3D1	QLQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEW SSYSDGRGSKTFYADSVKGRFTISR DNAKNTLYQMNSLKSEDTAVYFCA KDLLVAARGSMIDYWGQGTQVTSS	98	NFMLTQPSAVSVSLEQTARITCQGGTLG SYGAHWYQQKPGQAPVLIYDGSRP GIPERFSGTRSGGTATLTISGAQAEDEAD YYCQSFSDYSGNAVFVGGGTHLTVL	99
VH3D1_S35 H	QLQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEW VSSYSDGRGSKTFYADSVKGRFTISR DNAKNTLYQMNSLKSEDTAVYFC AKDLLVAARGSMIDYWGQGTQVTVS S	141	NFMLTQPSAVSVSLEQTARITCQGGTLG SYGAHWYQQKPGQAPVLIYDGSRP GIPERFSGTRSGGTATLTISGAQAEDEAD YYCQSFSDYSGNAVFVGGGTHLTVL	99
VL3D1_Y49 H VL3D1_Q89 H	QLQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEW SSYSDGRGSKTFYADSVKGRFTISR DNAKNTLYQMNSLKSEDTAVYFCA KDLLVAARGSMIDYWGQGTQVTSS	98	NFMLTQPSAVSVSLEQTARITCQGGTLG SYGAHWYQQKPGQAPVLIYDGSRP GIPERFSGTRSGGTATLTISGAQAEDEAD YYCHSFSDYSGNAVFVGGGTHLTVL	142

10

20

30

40

## 【 0 2 3 2 】

T3000 Biacoreを用いるSPRを用いて、突然変異クローンの結合能力を評価した。先に記載した競合アプローチを使用した。生データを、ブランク減算(2-1)を用いて、BIA評価ソフトウェアにより解析した。RU値をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のIC50値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対応答可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、下の表19に示されている。

表19: pH依存性改変抗hIgEクローンのIC50

【表 19】

	IC50 $\mu\text{g/ml}$ (pH 7.4)	IC50 $\mu\text{g/ml}$ (pH 5.5)
18E2	0.628	0.484
VH18E2_S35H	0.811	3.729
VL18E2_Y34H	1.102	5.183
18E2_VH_S35H_VL_Y34H	1.562	9.856
18B9	0.662	1.073
VH18B9_S35H	21.670	22.280
VL18B9_Y49H	0.749	4.057
18B9_VH_S35H_VL_Y49H	26.260	24.630
3D1	1.363	11.660
VH3D1_S35H	15.540	23.040
VL3D1_Y49H VL3D1_Q89H	4.410	15.170

10

## 【0233】

結果は、次のようにまとめることができる：

・突然変異S35Hは、pH 7.4でIgE結合に影響を及ぼさないが、クローン18E2におけるpH依存度を増大させる。対照的に、この突然変異は、クローン18B9及び3D1のIgE結合を消失させる。

20

・クローン18E2について、最も優れたpH依存性バインダーは、pH 5.5でのIC50とpH 7.4でのIC50の間で6.3の比を有する18E2\_VH\_S35H\_VL\_Y34Hである。しかしながら、pH 7.4での親和性は、WTクローンと比較して、2.5倍低下している。

・クローン18B9について、最も優れたpH依存性バインダーは、pH 5.5でのIC50とpH 7.4でのIC50の間で5.4の比を有するVL18B9\_Y49Hである。pH 7.4での親和性は、影響を受けない。

・クローンWT 3D1は、pH 5.5でのIC50とpH 7.4でのIC50の間で8.6の比を有する最も優れたpH依存的親和性を示した。His突然変異は、pH 7.4でのIgE結合に影響を及ぼし、WT抗体と比較して、pH 5.5でのIC50とpH 7.4でのIC50の間の比を増大させない。

30

## 【0234】

(実施例4.抗hIgE-ABDEG 抗体の産生及び特徴解析)

(A.ヒトIgG1 Fc-ABDEG(商標)ヒトIgG1 Fc-LALA-ABDEG(商標)への抗IgE Fabの再フォーマット化)

3つのFabクローン：13E4；18E2\_VH\_S35H\_VL\_Y34H(18E2His2)；及びVL18B9\_Y49H(18B9His)を、ABDEG(商標)突然変異を含有するヒトhIgG1 Fcに再クローニングした。このために、BsmBI制限部位を含有する各々のクローンのVHのDNA列を注文した。消化及び浄化後、DNAのライゲーションを行って、ABDEG(商標)突然変異を有するヒトIgG1重鎖の定常ドメインを含有する予めBsmBiで消化したベクター(CH1-CH2-CH3、pUP EX32a)又はLALA及びABDEG(商標)突然変異を有するヒトIgG1重鎖の定常ドメインを含有する予めBsmBiで消化したベクター(CH1-CH2-CH3、pUPEX94)に入れた。熱ショック及びアンピシリン(ベクターの耐性遺伝子)を含むアガロースプレート上への形質転換細菌の移し替えによって、ライゲーションされた産物の各々の形質転換を行い、Top10細菌に入れた。クローン(HC及びLC)毎に、4～8個のコロニーを拾い、シーケンシングに送った。適切な挿入物を示すクローンを選択し、DNA配列を精製する(MidiPrep)ために増幅させた。

40

## 【0235】

3つのヒトIgG1-ABDEG(商標)抗体の産生を、ポリエチレンイミン(PEI)によって1つの軽鎖につき1つの重鎖の比でHEK293E細胞に組み込まれるトランスフェクションにより行った。6日後、プロテイン-Aセファロースビーズを用いて、ヒトモノクローナル抗体を細

50

胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を行い、抗体(150kDa)の純度及び完全性を評価した。

#### 【 0 2 3 6 】

(B.抗IgE-ABDEG(商標)抗体の特徴解析)

ELISAとT3000 Biacoreを用いるSPRとを用いて、抗hIgE-ABDEG(商標)mAbの結合特性を評価した。

#### 【 0 2 3 7 】

(i. IgE結合ELISA)

上で使用された設定とちょうど同じ設定において、3つの抗hIgE-ABDEG(商標)抗体の相対的結合特性をELISAによって解析した。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした(図6を参照)。

・3つのクローンは全て、hIgEに結合し、hIgEへの結合をFc RIAと競合することができた。

・クローン13E4は、hIgEに対する最も高い親和性を有していた。

・クローン18E2His2は、最も高いpH依存度を示した。

#### 【 0 2 3 8 】

(ii. IgE競合ELISA)

上で使用された設定とちょうど同じ設定において、抗hIgE-ABDEG(商標)抗体によるhFc RI へのhIgE結合の阻害をpH 7.4及びpH 6でELISAによって解析した。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のIC50値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対阻害可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、下の表20に示されている。

表20: IgE競合ELISAのIC50。ABDEG(商標)機能は、IgE結合に影響を及ぼさない。

#### 【表 2 0】

	IC50 (ng/ml) (pH 7.4)	IC50 (ng/ml) (pH 6)
18B9His-hIgG1-WT	190	3017
18B9His-hIgG1-ABDEG	130	2547
18E2His2-hIgG1-WT	2482	77189
18E2His2-hIgG1-ABDEG	1494	26592
13E4-hIgG1-WT	6.815	11.42
13E4-hIgG1-ABDEG	6.502	10.65

・3つのクローンは、IgE:Fc RI 相互作用を阻害することができた。

・クローン13E4は、IgE:Fc RI 相互作用を阻害するための最も効力のあるクローンであった。

#### 【 0 2 3 9 】

(iii. IgE:Fc RI 相互作用の競合についてのSPR解析)

上記のように、競合アプローチを用いて、ヒトIgG1 mAb抗hIgEの結合能力をBiacore T3000で解析した。このアッセイをHBS-EP pH7.4又はHBS-EP pH 5.5中で実施した。生データを、ブランク減算(2-1)を用いて、BIA評価ソフトウェアにより解析した。RU値をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のIC50値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対応答可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果を以下の表21に示す。得られた結果は、競合ELISAで観察されたデータを裏付けた。

表21: IgE競合のIC50、SPR解析

10

20

30

40

50

【表 2 1】

	IC50 (μg/ml) (pH 7.4)	IC50 (μg/ml) (pH 6)
18B9His-hlgG1-WT	2.7	58.5
18B9His-hlgG1-ABDEG	2.9	52.9
18E2His2-hlgG1-WT	6.0	6312
18E2His2-hlgG1-ABDEG	5.8	7323
13E4-hlgG1-WT	2.3	2.5
13E4-hlgG1-ABDEG	3.0	3.2

10

## 【0 2 4 0】

3つのクローンは、IgE:Fc RI 相互作用を阻害することができた。最も効力のあるクローンはクローン13E4である一方、最も高い結合pH依存度を有するクローンは18E2His2であった。

## 【0 2 4 1】

(iv. FcRn結合ELISA)

ABDEG(商標)を備えた完全抗体のFcRnへの結合能力を試験するために、ELISA結合アッセイを確立した。簡潔に述べると、Maxisorpプレートをニュートラアビジン(1 μg/mL、ThermoFisher Cat# 31000)でコーティングし、その後、PBS1%カゼインでブロッキングした。ビオチン化ヒトFcRn(0.5 μg/mL、ImmuniTrack, cat# ITF01)を添加した後、hIgEとともにプレインキュベートされた又はプレインキュベートされていない抗hIgG1-ABDEG抗体の連続希釈物とともにインキュベートした。ヤギF(ab')<sub>2</sub>抗ヒトIgG-Fc-HRP(1/20,000、Abcam cat# ab98595)を用いて、バインダーの検出を実施した。アッセイをpH 6及びpH7で実施した。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。結果は、図7に示されている。ABDEG(商標)突然変異を備えたヒトIgG1 Fcに再フォーマット化された抗体は、pH 6及びpH 7でヒトIgG1 Fc WTよりも高いFcRnに対する親和性を有していた。

20

## 【0 2 4 2】

(v. IgG3競合ELISA)

ABDEG(商標)を備えた完全抗体におけるABDEG(商標)の機能性をインビトロアッセイで試験するために、競合ELISA結合アッセイを確立した。手短に述べると、Maxisorpプレートをニュートラアビジン(1 μg/mL、ThermoFisher Cat# 31000)でコーティングし、その後、PBS1%カゼインでブロッキングした。ビオチン化ヒトFcRn(0.5 μg/mL、ImmuniTrack, cat# ITF01)、組換えhIgG3(自家生産)、及びhIgEとともにプレインキュベートされた又はインキュベートされていない抗hIgG1-ABDEG抗体の連続希釈物の混合物をプレートに添加した。マウス抗ヒトIgG3(ThermoFisher Cat# MH1732)ヤギF(ab')<sub>2</sub>抗ヒトIgG-Fc-HRP(1/20,000、Abcam cat# ab98595)を用いて、結合したIgG3の検出を実施した。アッセイをpH 6で実施した。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。結果は、図8に示されている。

30

## 【0 2 4 3】

(実施例5. Fc RI+細胞へのIgE結合の阻害)

hFc RI +細胞へのIgE結合を阻害する抗hIgE-ABDEG(商標)抗体の能力を解析した。骨髓細胞をTg hIgE/hFc RI マウスから単離した。これらの細胞を、マウスIL-3の存在下、インビトロで30日間、肥満細胞に分化させた。骨髓由来肥満細胞を抗IgE-ABDEG(商標) mAbの連続希釈物の存在下でヒトIgEとともにインキュベートした。残存するhIgE結合をフローサイトメトリーによって測定した。FlowJoソフトウェアを用いて計算された蛍光強度中央値をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の化合物のIC50値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対阻害可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、図9に示されている。

40

・3つのクローンは、hFc RI +細胞へのhIgE結合を阻害することができた。

50

- ・クローン13E4は、最も高い効力を示した。
- ・Fc断片中のABDEG(商標)突然変異は、様々なクローンの抗IgE機能に影響を及ぼさない。

#### 【0244】

(実施例6. Fc RI+細胞に予め結合したIgEへの抗IgE抗体結合)

(A. IgE架橋ELISA)

Fc RI と関連したヒトIgEへの抗体結合をELISAによって解析した。簡潔に述べると、MaxisorpプレートをhFc RI (0.5 µg/mL)でコーティングし、その後、1%BSA及び0.05%Tweenを含むPBSでブロッキングした。3 µg/mlのrMota-clgEを捕捉した後、抗hlgE mAbの連続希釈物とともにインキュベートした。数回の洗浄工程の後、結合したmAbの検出を、抗ヒトFc-HRP抗体を用いて行った。Tecan装置を用いて、吸光度を450nm(基準620nm)で測定した。最後に、生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした(図10を参照)。

- ・クローン13E4及び18B9Hisは、hFc RI +と関連したIgEに結合することができた。
- ・クローン18E2His2は、hFc RI +と関連したIgEに結合しない。

#### 【0245】

(B.好塩基球活性化試験)

ヒト好塩基球に予め結合したヒトIgEへの抗体結合をフローサイトメトリーによって解析した。血液をイエダニアレルギーを有するドナーから得た。好塩基球活性化を抗hlgE-ABDEG(商標)抗体の存在下でFLOW CAST(登録商標)キット(BUHLMANN)に従って測定した。結果をフローサイトメトリーによって解析し、生データをFlowJoソフトウェアを用いて処理した。好塩基球細胞は、CCR3+細胞として同定した。活性化好塩基球は、CCR3+CD63+細胞として定義した。活性化好塩基球のパーセンテージ(%)は、下の表22に示されている。

- ・クローン13E4及び18B9Hisは、好塩基球活性化を誘導する。
- ・クローン18E2His2は、好塩基球活性化を誘導しない。

表22:好塩基球活性化試験

【表22】

	活性化好塩基球の%
無関係な抗体	3
18B9His-hlgG1-WT	32
18B9His-hlgG1-ABDEG	29
18E2His2-hlgG1-WT	5
18E2His2-hlgG1-ABDEG	4
13E4-hlgG1-WT	18
13E4-hlgG1-ABDEG	17

#### 【0246】

(実施例7.抗IgE-ABDEG(商標)抗体による非疾患モデルにおけるIgE及びIgGのクリアランス)

IgE及びIgGクリアランスを増大させる抗hlgE-ABDEG(商標)抗体の能力をマウスにおいてインビボで解析した。抗hlgE-ABDEG mAbを注射する2時間前に、rMota-hlgEをC75BL6マウスに注射した。血液をマウスから回収し、hlgE及びマウスIgGレベルをELISAによって測定した(図11を参照)。

- ・ABDEG(商標)突然変異を備えた非IgE結合クローン(HEL-hlgG1-ABDEG)は、IgG枯渇を誘導したが、IgE枯渇を誘導しなかった。
- ・オマリズマブは、IgE枯渇もIgG枯渇も誘導することができなかった。
- ・クローン18E2His2-hlgG1-ABDEGは、IgG枯渇及びIgE枯渇を誘導した。

#### 【0247】

(実施例8 ラマ抗IgE Fabクローンの生殖系列化)

実施例2及び3由来の選択された抗IgE Fabクローンを、ラマCDR配列をヒトフレームワーク配列に移植することによる生殖系列化に供した。生殖系列化されたFabクローンは: 13E4; 18E2\_VH\_35H\_VL\_Y34H(18E2His2); VL18E2\_Y34H; VH18E2\_S35H;及びVL18B9\_Y49H(18B9His)であった。生殖系列化クローンのVH及びVL配列は、下の表23に示されている。

表23 生殖系列化抗IgE FabクローンのVH及びVL配列

【表 2 3】

抗体クローン	VH	配列番号	VL	配列番号
13E4_MG	EVQLLES GGG L V Q P G G S L RLSCAASGFTFSSYVMSW VRQAPGKGLEWVSSIYHD GSHTYYAD FV K G R F T I S R DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGT SYSGSYYY TDPFFGSWGQGT L V T V S S	171	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGGSLGSNYAYWYQ QKPGQAPVLVIYDDSRP SGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCQSA DSNGNAVFGGGTQLTLV	172
18E2His2_MG	EVQLLES GGG L V Q P G G S L RLSCAASGFTFSSYVMHW VRQAPGKGLEWVSSIYHD GSHTYYAD FV K G R F T I S R DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGT SYSGSYYY TDPFFGSWGQGT L V T V S S	173	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGDRLGSRYYHWYQ QKPGQAPVLVIYDDRRP SGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCQSA DSSGNPVFGGGTQLTLV	174
18E2_VL Y34H_MG	QLLES GGG L V Q P G G S L R L SCAASGFTFSSYVMSWVR QAPGKGLEWVSSIYHDGS HTYYAD FV K G R F T I S R D N SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGT SYSGSYYYTD PFFGSWGQGT L V T V S S	215	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGDRLGSRYYHWYQ QKPGQAPVLVIYDDRRP SGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCQSA DSSGNPVFGGGTQLTLV	174
18E2_VH S35H_MG	EVQLLES GGG L V Q P G G S L RLSCAASGFTFSSYVMSW VRQAPGKGLEWVSSIYHD GSHTYYAD FV K G R F T I S R DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGT SYSGSYYY TDPFFGSWGQGT L V T V S S	173	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGDRLGSRYYHWYQ QKPGQAPVLVIYDDRRP SGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCQSA DSSGNPVFGGGTQLTLV	216
18B9His_MG	EVQLLES GGG L V Q P G G S L RLSCAASGFTFSSYVMSW VRQAPGKGLEWVSSIYSD GSHTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKNLEHYSGSY YDPRYDYWGQGT L V T V S S	175	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGGSLGSSYVHWYQ QKPGQAPVLVIYDGDSP SGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCQSA DSSGNNAVFGGGTQLTLV	176

MGは、生殖系列化バリエーションを表す

【 0 2 4 8 】

(競合ELISA)

初期のスクリーニング時に使用された設定とちょうど同じ設定において、5つの異なる抗hIgE生殖系列化クローンによるhFc RI へのhIgE結合の阻害をpH 7.4及びpH 6でELISAによって解析した。生データ(OD値)をGraphPad Prism 7.01でプロットした。各々の抗体のIC50値を、非線形回帰(対数(アゴニスト)対応答可変勾配(4パラメータ))を用いて計算した。結果は、下の表24に示されている。全てのクローンが依然としてIgEに結合することができた。先に観察されたように、クローン13E4は、pH 7.4でhIgEに対する最も高い親和性を示した。クローン18E2VHS35HVL Y34HMG(生殖系列化18E2His2)は、hIgEに対する最も高いpH依存的示差親和性を示した。

表24 ELISAによるFc RIへのhIgE結合の阻害のIC50(ng/ml)

10

20

30

40

50

【表 2 4】

生殖系列化クローン	IC50 (ng/ml) (pH 7.4)	IC50 (ng/ml) (pH 6)
13E4_MG	24.21	63.31
18E2_VHS35H_VLY34H_MG	3911	~ 11280286
18E2_VLY34H_MG	705.6	61380
18E2_VHS35H_MG	65.68	671.3
VL18B9_Y49H_MG	176.5	1739

10

MGは、生殖系列化バリエーションを表す

## 【0 2 4 9】

(実施例9 抗IgE抗体CL-2CのpH依存性バリエーションの人為作製)

クローンCL-2Cの抗IgE FabのpH依存性バリエーションを図12に模式的に示されている方法に従って人為作製した。この方法の様々な段階は、以下で詳細に説明されている。

## 【0 2 5 0】

(A. 遺伝子断片の設計)

クローンCL-2CのVH及びVL(V )ドメインのタンパク質配列は、引用により本明細書中に組み込まれる米国特許US7531169号に記載されている。これらのVH及びVLドメインから始めて、図12に示されている模式図の第一の工程に示されているアプローチに従って、ヒスチジン突然変異をCDR領域中の各々の位置(VH及びVL)に導入した。Kabat付番方式を用いて、可変ドメインのアミノ酸残基を付番した。好適なクローニング部位と一緒にV 及びVH可変領域のCDR中に所望の突然変異を有する遺伝子断片を設計した。フレームワーク領域3(FR3)をFR3aとFR3bに分割し、その間にクローニング部位を入れた(図12に示されている)。

20

## 【0 2 5 1】

(B. ライブラリー構築)

ライブラリー構築への第一の工程として、V 突然変異体(V m)サブライブラリーを、BsmBI消化されたV 遺伝子断片のApaLI/XhoI pCB13-CKファージミドベクターへのクローニングによって構築した。このV サブライブラリーから始めて、2つのアプローチ(以下で説明されているA及びB)を用いて、最終的なFabライブラリーを作製した。

30

## 【0 2 5 2】

アプローチAに従って、SfiI/NheI消化されたV mサブライブラリー(hCH1を含有する)への2つのSfiI/BsmBI(NheI互換性あり)消化された突然変異体VH(VHm)遺伝子断片のクローニングによって、3重ライゲーションを実施した。アプローチBに従って、4点ライゲーションによるpCB13-CKから抽出されたhCH1 NheI/NotIを有するSfiI/BsmBI消化されたVHm-遺伝子断片のSfiI/NotI消化されたV m サブライブラリーへの複合クローニングによって、ライゲーションを実施した。ライゲーションに続いて、TG1大腸菌エレクトロコンピテント細胞への形質転換を行った。最終的なFabライブラリーは、CDR中に最大4つのHis突然変異(HCDR1又はHCDR2中に0~1個及びHCDR3中に0~1個、LCDR1又はLCDR2中に0~1個、LCDR3中に0~1個)を含有していた。アプローチAとBの両方からの最終的なV ライブラリー(M13Rを使用)及びVHライブラリー(PelB3を使用)のうちの32個のランダムなクローンに対して配列解析を実施した。ライゲーションに続いて、TG1大腸菌エレクトロコンピテント細胞への形質転換を行った。VHm又はV mサブライブラリーは、最大2つのHis突然変異(CDR1又はCDR2中に0~1個のHis及びCDR3中に0~1個のHis)を含有していた。対照Fabは、1V lig01A(WT V )及び1VHlig01A(WT VH)の個別のクローニングによって作製した。アプローチAから、シーケンシングされた32個のV クローンのうちの25個(78%)は、正しいV-領域配列を示した。アプローチBから、これは、32個のクローンのうちの24個(75%)について当てはまった。アプローチAから、シー

40

50



クエンシングされた32個のVHクローンのうちの17個(53%)は、正しいV-領域配列を示した。アプローチBから、これは、32個のクローンのうちの16個(50%)について当てはまった。

【0253】

(C.選択)

両方のアプローチからのFabライブラリーを用いてFabファージディスプレイを実施し、解離速度洗浄(可溶性標的の存在下での洗浄)とpH溶出を組み合わせ、増大したストリレンジンシーで選択を実施した。溶出ファージを大腸菌TG1細胞の感染に使用した。数回の選択ラウンドからの溶出ファージの産出物をプレーティングして、単一コロニーを得た。個々のクローンが無作為に拾い、6つのマスタープレートを作製した。

10

【0254】

(D. IgE結合ELISAによるスクリーニング)

ペリプラズム抽出物(PERIと呼ばれる分泌された単量体Fabを含有する粗画分)を、作製された全てのマスタープレートから得られた1mlの大腸菌培養物(IPTGで誘導)から産生した。上の実施例2に記載されているプロトコルに正確に従って、hIgE結合ELISAを実施した。hIgEへのpH依存的結合を示すクローンのシークエンシングにより、His突然変異に富むV<sub>H</sub>及びVH中の位置が明らかになった。これらの結果は、図13に模式的に示されている。

【0255】

(E.再フォーマット化)

さらなる特徴解析のために、下の表25に示されている8つのV<sub>H</sub>及び5つのVH列を、ヒト定常ドメイン(ヒトhIgG1)を含有する哺乳動物発現ベクターに再クローニングした。

20

表25

【表25】

	選択された V <sub>K</sub>	選択された V <sub>H</sub>
HIS 位置	VK28H94H	VH33H100CH
	VK50H92D89H	VH33H100BH
	VK50H94H	VH33H100AH
	VK50H92D94H	VH58H100BH
	VK50H	
	VK94H	
	VKWT	VHWT

30

【0256】

各々のVH及びVLについて、DNA列断片を設計し、Geneartから注文し、その後、制限酵素(BsmBi)で消化した。消化及び浄化後、DNA(VH又はVL)のライゲーションを行って、ヒトカッパ軽鎖の定常ドメインを含有する予めBsmBiで消化したベクター(V<sub>H</sub>についてのpUPEX116.08)又はヒトIgG1-ABDEG(商標)重鎖の定常ドメインを含有する予めBsmBiで消化したベクター(CH1-CH2-CH3、pUPEX32a)に入れた。ライゲーションされた産物を熱ショックによって形質転換して、Top10細菌に入れ、アンピシリン(ベクターの耐性遺伝子)を含むアガロスプレート上に移した。各々のクローン(HC及びLC)について、4~8個のコロニーを拾い、シークエンシングに送った。適切な挿入物を示すクローンを選択し、DNA配列を精製する(MidiPrep)ために増幅させた。

40

【0257】

全てのV<sub>H</sub>と全てのVHとの組合せから得られる35個のヒトIgG1抗体の産生をHEK293E細胞のトランスフェクション(重鎖DNA発現ベクターと軽鎖DNA発現ベクターを1/1の比で含有する混合物とともにポリエチレンイミン(PEI)を使用)によって実施した。細胞にタンパク質を6日間発現させた後、ヒトモノクローナル抗体を、プロテイン-Aセファロース

50

ビーズを用いて、細胞上清から精製した。最後に、SDS-PAGE解析を実施して、抗体の純度及び完全性を評価した。

【 0 2 5 8 】

(F. pH改変抗hIgE抗体の特徴解析)

改変CL-2C抗体パネルのhIgE結合特性を、実施例2に記載されているプロトコルに従って、SPR解析(Biacore 3000を使用)によって及びIgE結合ELISAによって評価した。

【 0 2 5 9 】

(i. SPR解析)

SPR解析の結果は、下の表26に示されている。pH 5.5で測定された $K_D$ とpH 7.4で測定された $K_D$ の比をCL-2C抗体の各々について計算した。

表26 Biacoreによって測定されたhIgEへのpH改変CL-2C抗体の結合

10

20

30

40

50

【表 2 6】

抗体	V <sub>K</sub>	V <sub>H</sub>	KD 比 pH5.5/pH 7.4
CL-2C mAb 1	Vk28H94H	VH58H100BH	4.6
CL-2C mAb 2		VH33H100CH	8.5
CL-2C mAb 3		VH33H100BH	8.4
CL-2C mAb 4		VH33H100AH	3.3
CL-2C mAb 5		VHWT	0.3
CL-2C mAb 6	Vk50H92D89H	VH58H100BH	6.1
CL-2C mAb 7		VH33H100CH	7.9
CL-2C mAb 8		VH33H100BH	2.8
CL-2C mAb 9		VH33H100AH	2.5
CL-2C mAb 10		VHWT	0.7
CL-2C mAb 11	Vk50H94H	VH58H100BH	6.0
CL-2C mAb 12		VH33H100CH	3.9
CL-2C mAb 13		VH33H100BH	17.3
CL-2C mAb 14		VH33H100AH	3.2
CL-2C mAb 15		VHWT	1.1
CL-2C mAb 16	Vk50H92D94H	VH58H100BH	4.7
CL-2C mAb 17		VH33H100CH	7.1
CL-2C mAb 18		VH33H100BH	0.2
CL-2C mAb 19		VH33H100AH	5.2
CL-2C mAb 20		VHWT	1.1
CL-2C mAb 26	Vk50H	VH58H100BH	8.9
CL-2C mAb 27		VH33H100CH	7.4
CL-2C mAb 28		VH33H100BH	9.0
CL-2C mAb 29		VH33H100AH	3.8
CL-2C mAb 30		VHWT	1.0
CL-2C mAb 31	Vk94H	VH58H100BH	5.5
CL-2C mAb 32		VH33H100CH	6.2
CL-2C mAb 33		VH33H100BH	7.0
CL-2C mAb 34		VH33H100AH	3.0
CL-2C mAb 35		VHWT	0.6
CL-2C mAb 36	VkWT	VH58H100BH	4.3
CL-2C mAb 37		VH33H100CH	11.1
CL-2C mAb 38		VH33H100BH	6.5
CL-2C mAb 39		VH33H100AH	4.6
CL-2C mAb 40		VHWT	0.6

## 【 0 2 6 0】

全てのクローンがpH依存性であるとは限らないことが分かった。SPR解析により、CL-2C mAb13は、最大のpH依存度を示した。

## 【 0 2 6 1】

(ii. IgE結合ELISA)

hIgE結合ELISAの結果は、下の表27に示されている。pH 7.4で測定されたOD450とpH 6で測定されたOD450の比をCL-2C抗体の各々について計算した。

表27 ELISAによって測定されたhIgEへのpH改変CL-2C抗体の結合

10

20

30

40

50

【表 2 7】

抗体	V <sub>K</sub>	V <sub>H</sub>	比 OD450 pH7.4 / pH 6
CL-2C mAb 1	VK28H94H	VH58H100BH	6.94
CL-2C mAb 2		VH33H100CH	7.11
CL-2C mAb 3		VH33H100BH	6.44
CL-2C mAb 4		VH33H100AH	5.26
CL-2C mAb 5		VHWT	0.73
CL-2C mAb 6	VK50H92D89H	VH58H100BH	10.22
CL-2C mAb 7		VH33H100CH	1.43
CL-2C mAb 8		VH33H100BH	1.12
CL-2C mAb 9		VH33H100AH	1.45
CL-2C mAb 10		VHWT	2.77
CL-2C mAb 11	VK50H94H	VH58H100BH	5.90
CL-2C mAb 12		VH33H100CH	1.54
CL-2C mAb 13		VH33H100BH	1.28
CL-2C mAb 14		VH33H100AH	1.53
CL-2C mAb 15		VHWT	4.07
CL-2C mAb 16	VK50H92D94H	VH58H100BH	2.24
CL-2C mAb 17		VH33H100CH	1.03
CL-2C mAb 18		VH33H100BH	0.97
CL-2C mAb 19		VH33H100AH	1.04
CL-2C mAb 20		VHWT	5.46
CL-2C mAb 26	VK50H	VH58H100BH	44.56
CL-2C mAb 27		VH33H100CH	19.40
CL-2C mAb 28		VH33H100BH	5.54
CL-2C mAb 29		VH33H100AH	15.28
CL-2C mAb 30		VHWT	13.97
CL-2C mAb 31	VK94H	VH58H100BH	10.94
CL-2C mAb 32		VH33H100CH	4.13

CL-2C mAb 33		VH33H100BH	2.61
CL-2C mAb 34		VH33H100AH	5.50
CL-2C mAb 35		VHWT	0.69
CL-2C mAb 36	VKWT	VH58H100BH	10.71
CL-2C mAb 37		VH33H100CH	10.34
CL-2C mAb 38		VH33H100BH	4.48
CL-2C mAb 39		VH33H100AH	7.59
CL-2C mAb 40		VHWT	1.00

Biacoreの結果と同様、全てのクローンがpH依存性であるとは限らないことが分かった。ELISA解析により、CL-2C mAb26は、最大のpH依存度を示した。

【 0 2 6 3 】

pH改変CL-2C抗体バリエーションのCDR、VHドメイン、及びVLドメイン配列は、下の表28、29、及び30に示されている。

表28 pH改変VHドメインの重鎖CDR配列

【表 2 8 】

抗体 VH ドメイン	CDR1	配列 番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
VH58H100BH	WYWLE	151	EIDPGTFTTHYNEKFKA	177	FSHFSGSHYDYFDY	178
VH33H100CH	WYHLE	179	EIDPGTFTTNVNEKFKA	152	FSHFSGSNHDIYFDY	180
VH33H100BH	WYHLE	179	EIDPGTFTTNVNEKFKA	152	FSHFSGSHYDYFDY	178
VH33H100AH	WYHLE	179	EIDPGTFTTNVNEKFKA	152	FSHFSGHNYDYFDY	181

表29 pH改変VLドメインの軽鎖CDR配列

10

20

30

40

50

【表 2 9】

抗体	CDR1	配列 番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
VK28H94H	RASQHIGTNIH	182	YASESIS	156	QQSWSHPTT	183
VK50H92D89H	RASQSIGTNIH	155	HASESIS	184	HQSDSWPTT	214
VK50H94H	RASQSIGTNIH	155	HASESIS	184	QQSWSHPTT	183
VK50H92D94H	RASQSIGTNIH	155	HASESIS	184	QQSDSHPTT	213
VK50H	RASQSIGTNIH	155	HASESIS	184	QQSWSWPTT	183
VK94H	RASQSIGTNIH	155	YASESIS	156	QQSWSHPTT	183

表30 pH改変抗体のVH及びVLドメイン配列

10

20

30

40

50

【表 3 0】

VH	配列	配列番号	VL	配列	配列番号
VH58H 100BH	QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCKASGYT FSWYHLEWVRQAPGHGLEWMGEIDPGT FTTHYNEKFARVTFADTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARFHFSGSHDYFDY WGQGTLVTVSS	185	VK28H 94H	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKP GQAPRLIIYASESISGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQSWSHPTTFGGGTKEIK	189
VH33H 100CH	QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCKASGYT FSWYHLEWVRQAPGHGLEWMGEIDPGT FTTNYNEKFARVTFADTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARFHFSGSNHDYFDY WGQGTLVTVSS	186	VK50H 92D89H	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKP GQAPRLIIYASESISGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSE DFAVYYCHQSDSWPTTFGGGTKEIK	190
VH33H 100BH	QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCKASGYT FSWYHLEWVRQAPGHGLEWMGEIDPGT FTTNYNEKFARVTFADTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARFHFSGSHDYFDY WGQGTLVTVSS	187	VK50H 94H	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKP GQAPRLIIYASESISGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQSWSHPTTFGGGTKEIK	191
VH33H 100AH	QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCKASGYT FSWYHLEWVRQAPGHGLEWMGEIDPGT FTTNYNEKFARVTFADTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARFHFSGSHDYFDY WGQGTLVTVSS	188	VK50H 92D94H	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKP GQAPRLIIYASESISGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQSDSHPTTFGGGTKEIK	192
			VK50H	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKP GQAPRLIIYASESISGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQSWPTTFGGGTKEIK	193
			VK94H	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKP GQAPRLIIYASESISGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQSWSHPTTFGGGTKEIK	194

## 【0264】

(実施例10 抗IgE抗体オマリズマブのpH依存性バリエーションの人為作製)

pH依存性バリエーションの作製の前に、オマリズマブ抗体を親和性成熟のプロセスに供した。これらの方法は、以下で詳細に記載されている。

## 【0265】

(オマリズマブ親和性成熟)

(A.ライブラリー作製)

オマリズマブVH及びVLドメインのCDR領域における重要な残基を突然変異誘発に供した。CDRアミノ酸残基の付番をKabat付番方式に従って実施した。CDRサブライブラリー

10

20

30

40

50

当たり最大6つの残基を突然変異させた( $6.40 \times 10^7$ という理論上の多様性を生じる)。ライブラリー設計は、天然の抗体配列に基づく溶媒露出残基及び/又は高変動性をベースにした。

【0266】

(B. 親Fabの作製)

2  $\mu$ gのオマリズマブVHWT cDNAをNcoI/NheIで消化し、2  $\mu$ gのオマリズマブVkWTをApaI/BswIで消化した。試料を1%アガロースゲル中で分離し、pCB13.ck4とのさなるライゲーションのために精製した。43ngのオマリズマブVHWT及びオマリズマブVkWT DNA断片を、それぞれ、NcoI/NheI及びApaI/BsiWIで消化した200ngのpCB13 Ck4ベクターとライゲーションした。精製した10  $\mu$ lのライゲーション液の形質転換を、25  $\mu$ lのECC TG1細胞(Lucigen Cat nr 60502 2)を用いて実施した。

10

【0267】

(C. バリエーションFabライブラリー作製)

Vk及びVH遺伝子バリエーションを、8つの重複するオリゴヌクレオチドを用いるPCR及び遺伝子アセンブリプロトコルによって作製した。NcoI/NheI消化したVLWT pCB13へのNcoI/NheI消化したVHのライゲーション及びApaI/BsiWI消化したVHWTpCB13へのApaI/BsiWI消化したVLのライゲーションによって、ライブラリーを作製した。ライブラリーをECC TG1細胞(Lucigen Cat nr 60502 2)へと形質転換した。

【0268】

(D. 選択)

20

上記のように作製されたFabライブラリーを用いて、Fabファージディスプレイを実施した。増大したストリンジェンシー及び解離速度洗浄(可溶性標的の存在下での洗浄)で、選択を実施した。溶出ファージを大腸菌TG1細胞の感染に使用した。数回の選択ラウンドからの溶出ファージの産出物をプレーティングして、単一コロニーを得た。個々のクローンを無作為に拾い、マスタープレート(MP)に入れた。

【0269】

(E. hIgE結合のスクリーニング)

ペリプラズム抽出物(PERIと呼ばれる分泌された単量体Fabを含有する粗画分)を、作製された全てのマスタープレートから得られた1mlの大腸菌培養物(IPTGで誘導)から産生した。hIgEへのFabペリプラズム抽出物の結合を実施例2に記載されているSPR解析によって評価した。結果は、下の表31に示されている。

30

表31 Biacoreによって測定されたhIgEへの親和性成熟オマリズマブ抗体の結合

40

50



【表 3 1】

VH ID	VL ID	ネイティブな IgE (Abcam)		組換え IgE (argenx)		解離速度向上比		
		pH 7.4		pH 7.4		IgE (abcam)	IgE (argenx)	平均
		kd (1/s)	R0 (RU)	kd (1/s)	R0 (RU)			
VH15	VL3	3.50E-04	235.19	2.69E-04	284.68	14.83	18.03	16.43
VH11	VL3	4.12E-04	190.02	3.21E-04	231.8	12.6	15.11	13.85
VH14	VL3	4.75E-04	235.86	3.66E-04	290.2	10.93	13.25	12.09
VH13	VL3	4.46E-04	235.08	3.45E-04	290.48	11.64	14.06	12.85
VH17	VL3	7.99E-04	262.74	6.16E-04	321.98	6.5	7.87	7.18
VH18	VL3	6.47E-04	227.47	5.34E-04	274.71	8.02	9.08	8.55
VH16	VL3	6.79E-04	261.73	5.26E-04	317.15	7.64	9.22	8.43
VH7	VLWT	1.46E-03	253.32	6.78E-04	260.04	3.55	7.15	5.35
VH5	VL4	2.14E-03	212.18	1.49E-03	268.21	2.43	3.26	2.84
VH15	VLWT	2.01E-03	217.55	1.57E-03	268.12	2.58	3.09	2.84
VH3	VL3	4.81E-04	193.93	3.52E-04	229.27	10.79	13.78	12.28
VH13	VLWT	2.47E-03	208.11	1.97E-03	255.78	2.1	2.46	2.28
VH5	VL3	5.58E-04	236.53	4.32E-04	284.16	9.3	11.23	10.26
VH14	VLWT	2.64E-03	224.11	2.16E-03	272.85	1.97	2.25	2.11
VHWT	VLWT	5.19E-03	186.94	4.85E-03	204.67	1	1	1

## 【 0 2 7 0 】

1つの特定のクローンVH15VL3は、最も高い親和性増加を示し、さらなるpH改変のために選択された。

## 【 0 2 7 1 】

(オマリズマブpH改変)

(A. pH依存性オマリズマブ抗体バリエーションの産生)

CL-2Cについて実施例9に記載されているものと同様のアプローチにおいて、ヒスチジン突然変異をオマリズマブ親抗体のVH及びVLドメインのCDR領域中の各々の位置に導入した。

## 【 0 2 7 2 】

このアプローチを用いて、VHドメイン中の2つの突然変異及びVLドメイン中の2つの突然変異を、pH依存性クローンにおけるその集積に基づいて選択した：

VH: CDR2中のG55H及びCDR3中のW100bH

V : CDR1中のD28H及びCDR1中のS31H

## 【 0 2 7 3 】

上記の同定されたヒスチジン「ホットスポット」をオマリズマブの親和性成熟バリエーション - VH15VL3に挿入した。全てのV と全てのVHとの組合せから得られる16種のヒトIgG1抗体の産生を先に記載されている通りに実施した。

## 【 0 2 7 4 】

(B. pH依存性オマリズマブ抗体バリエーションの特徴解析)

改変されたオマリズマブ抗体パネルのhIgE結合特性を、実施例2に記載されているプロトコルに従って、SPR解析(Biacore 3000を使用)、IgE結合ELISA、及びIgE競合ELISAによって評価した。

## 【 0 2 7 5 】

10

20

30

40

50

(i. SPR解析)

SPR解析の結果は、下の表32に示されている。

表32 Biacoreによって測定されたhIgEへのpH改変オマリズマブ抗体の結合

【表 3 2】

抗体		pH 6.0			pH 7.4			比 pH 7.4/pH6.0
		ka (1/Ms)	kd (s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (s)	KD (nM)	
OMA VH15	VL3	2.81E+05	2.90E-04	1.03	1.30E+05	1.14E-08	0.0000874	
	VL3D25H	2.81E+05	7.36E-04	2.62	2.64E+05	4.41E-05	0.1675	15.6
	VL3S31H	2.61E+05	2.28E-03	8.93	3.10E+05	1.66E-04	0.534	16.7
	VL3D28HS31H	3.10E+05	3.98E-03	12.85	3.02E+05	3.34E-04	1.1	11.7
OmaVH15G55H	VL3	2.91E+05	5.24E-04	1.805	3.23E+05	1.05E-04	0.3255	5.6
	VL3D25H	2.65E+05	1.17E-03	4.395	2.83E+05	2.06E-04	0.7275	6.0
	VL3S31H	3.29E+05	2.97E-03	9.07	3.01E+05	4.02E-04	1.335	6.8

10

20

30

40

50

	VL3D28HS31H	3.26E+05	5.27E-03	16.05	2.86E+05	7.22E-04	2.52	6.4
Oma VH15W100b	VL3	2.94E+05	8.75E-03	29.75	3.51E+05	1.03E-03	2.93	10.2
	VL3D25H	2.32E+05	1.48E-02	64.45	2.13E+05	1.82E-03	8.59	7.5
	VL3S31H	2.06E+05	3.75E-02	190.5	3.98E+05	2.44E-03	6.125	31.1
	VL3D28HS31H	4.53E+05	8.95E-02	206	2.90E+05	2.51E-03	8.78	23.5
OmaVH15G55HW100b	VL3	1.70E+05	2.54E-02	149.5	2.61E+05	2.26E-03	8.685	17.2
	VL3D25H	1.23E+05	6.48E-02	136.5	2.00E+05	3.03E-03	15.2	9.0
	VL3S31H	2.43E+05	9.86E-02	312	2.53E+05	3.91E-03	15.4	20.3
	VL3D28HS31H	0.00E+00	0.00E+0 0	0	1.09E+03	3.56E-03		
対照	18E2VLHis_MG hlgG1-ABDEG	4.30E+05	6.15E-02	205	3.92E+05	2.23E-03	5.91	34.7
	オマリズマブ hlgG1-WT	3.28E+05	3.54E-03	10.82 5	3.03E+05	1.35E-03	4.445	2.4

## 【 0 2 7 6 】

これらの結果から、全てのクローンがpH依存性であるとは限らないことが明らかにされた。OmaVH15W100b-VL3S31Hは、Biacoreによって測定したとき、最も高いpH依存度を示した。

## 【 0 2 7 7 】

(ii. IgE結合ELISA)

hlgE結合ELISAの結果は、下の表33に示されている。

表33 ELISAによって測定されたhlgEへのpH改変オマリズマブ抗体の結合

10

20

30

40

50

【表 3 3】

		EC50 (ng/ml)			
抗体		pH 7.4	pH 5.5	比 EC50 pH 5.5/7.4	比 EC50 pH 7.4/5.5
OMA VH15	VL3	20.2	21.74	1.1	0.93
	VL3D28H	16.28	16.42	1.0	0.99
	VL3S31H	20.04	17.86	0.9	1.12
	VL3D28HS31H	15.34	17.77	1.2	0.86
オマリズマブ		29.55	33.52	1.1	0.88
OmaVH15G55H	VL3	25.51	22.02	0.9	1.16
	VL3D28H	26.43	25.07	0.9	1.05
	VL3S31H	15.3	22.96	1.5	0.67
	VL3D28HS31H	15.41	22.96	1.5	0.67
オマリズマブ		29.24	40.71	1.4	0.72
18E2VL		19.96	32.25	1.6	0.62
Oma VH15W100b	VL3	17.42	32.65	1.9	0.53
	VL3D28H	15.04	/		
	VL3S31H	15.25	/		
	VL3D28HS31H	15.61	/		
オマリズマブ		24.39	34.12	1.4	0.71
CL-2C mAb37		14.85	37.26	2.5	0.40
OmaVH15G55HW100b	VL3	16.41	221	13.5	0.07
	VL3D28H	13.53	130	9.6	0.10
	VL3S31H	19.13	/		
	VL3D28HS31H	/	/		
18E2VL		16.34	26.88	1.6	0.61

## 【 0 2 7 8 】

SPR解析で見られた結果と同様に、全てのクローンがpH依存性であるとは限らなかった。OmaVH15W100b-VL3D28H、OmaVH15W100b-VL3S31H、OmaVH15W100b-VL3D28HS31H、OmaVH15G55hW100b-VL3S31H、及びOmaVH15G55hW100b-VL3D28HS31Hは、hIgE結合ELISAによって測定したとき、最も高いpH依存度を示した。

## 【 0 2 7 9 】

(iii. IgE競合ELISA)

hIgE競合ELISAの結果は、下の表34に示されている。

表34 競合ELISAによって測定されたhIgEに対するpH改変オマリズマブ抗体の活性

10

20

30

40

50

【表 3 4】

		IC50 (nM)
OMA VH15	VL3	0.08025
	VL3D28H	0.1366
	VL3S31H	0.2063
	VL3D28HS31H	0.7218
OmaVH15G55H	VL3	0.07529
	VL3D28H	0.1869
	VL3S31H	0.4848
	VL3D28HS31H	2.629
Oma VH15W100b	VL3	1.402
	VL3D28H	35.05
	VL3S31H	/
	VL3D28HS31H	585.1
OmaVH15G55HW100b	VL3	23.23
	VL3D28H	171.6
	VL3S31H	446.5
	VL3D28HS31H	9.487
オマリズマブ		1.133
18E2VL		6.057
CL-2C mAb37		0.4834

## 【0280】

この実験において、OMAVH15VL3は、最も高い親和性を示した。ヒスチジン改変は、OMAVH15VL3がFc RI へのIgE結合を阻害する能力に影響を及ぼすことが分かった。

## 【0281】

クローンVH15VL3及びそのpH改変バリエーションのCDR、VH、及びVL配列は、下の表35、36、及び37に示されている。

表35 改変VHドメインの重鎖CDR配列

10

20

30

40

50

【 表 3 5 】

抗体 VH ドメイン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
OMA VH15	SGHRWE	195	SIHYDGGSTNYPNPSVKG	196	ATHYFGHWHFAV	197
OmaVH15G55H	SGHRWE	195	SIHYDHSTNYPNPSVKG	198	ATHYFGHWHFAV	197
Oma VH15W100b	SGHRWE	195	SIHYDGGSTNYPNPSVKG	196	ATHYFGHHHFAV	199
OmaVH15G55HW100b	SGHRWE	195	SIHYDHSTNYPNPSVKG	198	ATHYFGHHHFAV	199

表36 改変VLドメインの軽鎖CDR配列

10

20

30

40

50

【表 3 6】

抗体	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
VL3	RASQSVDYDGDSYMN	147	WGSYLR	200	QQNAEDPYT	201
VL3D28H	RASQSVDYHGDSYMN	202	WGSYLR	200	QQNAEDPYT	201
VL3S31H	RASQSVDYDGDHVMN	203	WGSYLR	200	QQNAEDPYT	201
VL3D28HS31H	RASQSVDYHGDHVMN	204	WGSYLR	200	QQNAEDPYT	201

表37 改変オマリズマブ抗体のVH及びVLドメイン配列

10

20

30

40

50

【表 3 7】

VH	配列	配列番号	VL	配列	配列番号
OMA VH15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAVSGYSITSGHRWEWIRQAP GKGLEWVASIHVDGSTNYNPS VKGRITISRDDSKNTFYLMNS LRAEDTAVYYCARATHYFGHH HFAVWGQGLTVTVSS	205	OMA VL3	DIQLTQSPSSLSASVGDRTTICRAS QSVDDYDGDHYNWYQQKPGKAPK LLIEWGSLRSGVPSRFSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQNAEDP YTFGQGTKEIK	209
OmaVH15G55H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAVSGYSITSGHRWEWIRQAP GKGLEWVASIHVDHSTNYNPS VKGRITISRDDSKNTFYLMNS LRAEDTAVYYCARATHYFGHH HFAVWGQGLTVTVSS	206	OmaVL3D28H	DIQLTQSPSSLSASVGDRTTICRAS QSVDDYHGDHYNWYQQKPGKAPK LLIEWGSLRSGVPSRFSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQNAEDP YTFGQGTKEIK	210
OmaVH15W100b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAVSGYSITSGHRWEWIRQAP GKGLEWVASIHVDGSTNYNPS VKGRITISRDDSKNTFYLMNS LRAEDTAVYYCARATHYFGHH HFAVWGQGLTVTVSS	207	OmaVL3S31H	DIQLTQSPSSLSASVGDRTTICRAS QSVDDYDGDHYNWYQQKPGKAPK LLIEWGSLRSGVPSRFSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQNAEDP YTFGQGTKEIK	211
OmaVH15G55H W100b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAVSGYSITSGHRWEWIRQAP GKGLEWVASIHVDHSTNYNPS VKGRITISRDDSKNTFYLMNS LRAEDTAVYYCARATHYFGHH HFAVWGQGLTVTVSS	208	OmaVL3D28H S31H	DIQLTQSPSSLSASVGDRTTICRAS QSVDDYHGDHYNWYQQKPGKAPK LLIEWGSLRSGVPSRFSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQNAEDP YTFGQGTKEIK	212

## 【0282】

(実施例11 Fc RI +細胞へのIgE結合の阻害)

ヒト肥満細胞を、KITとFc RIを共発現し、Fc RIの架橋によって脱顆粒することができるまで、CD34+血液前駆細胞(健常ドナー)から、SCF、IL-6、及びIL-3とともに12週間培養した。キメラNP特異的IgE(ヒト定常領域;マウス可変領域)を、JW8/5/13細胞(Sigma)を用いて産生し、オマリズマブ結合セファロースを用いて精製した。NP特異的IgEをAPCにカップリングさせた。ヒト肥満細胞を様々な濃度の様々な抗IgE mAbとともにプレインキュベートした後、APC-hIgEを添加した。APC蛍光を1時間後に解析して、IgE+肥満細胞のパーセンテージ(%)を決定した。結果は、図14に示されている。18E2His2-MG-

10

20

30

40

50



hIgG1-ABDEGは、ヒト肥満細胞に対する最大の競合能力を示した。OMAVH15G55H-V L3S31Hは、ヒト肥満細胞に対する最小の競合能力を示した。

【 0 2 8 3 】

(実施例12 抗IgE-ABDEG(商標)抗体の安全性試験)

本明細書中の別所に記載されているように、抗IgE抗体は、細胞表面のFc RI に既に結合しているIgEの架橋などの望ましくない特性を示すことがある。この架橋は、肥満細胞及び好塩基球活性化などの下流の効果をもたらし、望ましくないアナフィラキシーを開始することがある。受容体に結合したIgEに結合し、それにより、下流の事象を誘発する本明細書に記載される様々な抗IgE抗体の能力を下記のように評価した。

【 0 2 8 4 】

(A.肥満細胞活性化アッセイ)

骨髓細胞をhIgE/hFc RI マウスから単離した。細胞をRPMI + 10%FBS + Glut + Pen /Strep + 30ng/mL IL-3中で16日間分化させた。96ウェル中、100  $\mu$ Lの3E+06/mLの骨髓肥満細胞を3  $\mu$ g/mLのIgEで2.5時間感作させて、受容体Fc RI をロードした。余分なIgEを除去した後、様々な濃度の抗IgE抗体を感作細胞に30分間添加した。100  $\mu$ Lの細胞上清を200  $\mu$ Lの氷冷FACSバッファーに移して、脱顆粒反応及びCD63リサイクリングを停止させた。cKit+ CD49b-(肥満細胞) CD63+ 細胞(活性化マーカー)を調べることにより、活性化肥満細胞を同定した。結果は、図15に示されている。パートAは、20  $\mu$ g/mLの抗体による刺激を示し、パートBは、200  $\mu$ g/mLの抗体による刺激を示す。抗体13E4-hIgG1-ABDEG(商標)及び18B9-hIgG1-ABDEGを例外として、様々な被験抗IgE抗体は、基本的には、最も高い被験濃度でも肥満細胞の活性化を示さなかった。

【 0 2 8 5 】

(B.好塩基球活性化試験)

ヒト好塩基球に予め結合したヒトIgEへの抗体結合をフローサイトメトリーによって解析した。血液をイエダニアレルギーを有するドナーから得た。好塩基球活性化を様々な抗hIgE-ABDEG(商標)抗体の存在下でFLOW CAST(登録商標)キット(BUHLMANN)に従って測定した。結果をフローサイトメトリーによって解析し、生データをFlowJoソフトウェアを用いて処理した。好塩基球細胞は、CCR3+細胞として同定した。活性化好塩基球は、CCR3+CD63+細胞として定義した。活性化好塩基球のパーセンテージ(%)及び刺激指数(SI)は、下の表38に示されている。2を上回るSI(投与後に活性化した%対基底状態で活性化した%)及び5%を上回る好塩基球活性化が陽性とみなされる。

表38 抗IgE抗体による好塩基球活性化

10

20

30

40

50

【表 3 8】

抗体	刺激濃度 (μg/mL)	%CD63+	SI
18B9-His-WT	100	37,0	16,09
	20	12,6	5,48
13E4-ABDEG (商標)	100	68,6	27,44
	20	61,3	24,52
18E2VLHis-ABDEG (商標)	100	3,1	1,24
	20	3,7	1,48
18E2VHHis-ABDEG (商標)	100	4,8	1,92
	20	3,5	1,40
18E2His2-ABDEG (商標)	100	4,3	1,72
	20	4,0	1,60

## 【 0 2 8 6 】

肥満細胞活性化実験で見られた結果と同様に、クローン18B9及び13E4をベースにした抗体は、ある程度の好塩基球活性化を示した。様々な他の被験抗IgE ABDEG(商標)抗体は、好塩基球を活性化しなかった。

## 【 0 2 8 7 】

(C.インビボアナフィラキシー)

インビボでのアナフィラキシー反応の可能性を評価するために、マウスを様々な抗IgE抗体で刺激した。-1日目に、hFc RI /hIgEマウスを15mg/kgの組換えヒトIgEのi.p.注射によって感作した。1日後、マウスを50mg/kg又は15mg/kgの抗IgEクローンでi.v.刺激した。体温を15分毎に2時間測定した。結果は、図16に示されている。パートA及びBは、15mg/kgの用量で投与された抗体についての実験の時間経過にわたる体温変化を示している。パートCは、50mg/kgの用量で投与された抗体についての実験の時間経過にわたる体温変化を示している。

## 【 0 2 8 8 】

(実施例13 IgG及びIgE自己抗体によって誘導される水疱性類天疱瘡疾患モデルの阻害)

マウス水疱性類天疱瘡BP疾患モデルを用いて、インビボで疾患を修飾するABDEG(商標)抗体の能力を評価した。

## 【 0 2 8 9 】

(A. IgG媒介性BP疾患)

8週齢のヒトNC16Aノックインマウスに、抗hNC16A IgG(250 μg/g体重)をHEL-ABDEG(商標)(50 μg/g体重)の非存在下又は存在下でi.p.注射し、注射から48時間後に調べた。結果は、図17のパート(A)及び(B)に示されている。HEL-ABDEG(商標)は、皮膚疾患の重症度を有意に低下させ(図17Aを参照)、これは、循環中の抗NC16A IgGのレベルの有意な低下と関連していた(図17Bを参照)。各々の群について、\*p < 0.001、n=6。

## 【 0 2 9 0 】

(B. IgE媒介性BP疾患)

8週齢のhFc RI/hNC16Aマウスの耳介に、抗hNC16A IgE又は対照IgE(100ng/g体重)を注射し、その後、18E2VLHis-ABDEG(商標)(50 μg/g体重)をi.p.注射した。マウスをIgE注射から48時間後に調べた。結果は、図17のパート(C)及び(D)に示されている。1

8E2VLHis-ABDEG(商標)で処置されたマウスは、臨床的疾患活性の有意な低下を示し(図17Cを参照)、これは、皮膚タンパク質抽出物における好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)活性のレベルの有意な低下(IgEの低下を示す)と関連していた(図17Dを参照)。各々の群について、\* $p < 0.01$ 、 $n=3 \sim 5$ 。

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様1)

IgEに結合する抗体であって、野生型Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合するバリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含む、前記抗体。

(態様2)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が野生型IgG Fcドメインと比べて増大した親和性でFcRnに結合する、態様1記載の抗体。

10

(態様3)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が野生型ヒトIgG Fcドメイン、好ましくは、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比べて増大した親和性でヒトFcRnに結合する、態様1記載の抗体。

(態様4)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、pH 6.0及びpH 7.4で、増大した親和性でヒトFcRnに結合する、態様1～3のいずれか一項記載の抗体。

(態様5)

pH 6.0でのヒトFcRnに対する前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片の結合親和性が、野生型ヒトIgG1 Fcドメインと比べて、少なくとも20倍、好ましくは、少なくとも30倍増大している、態様1～4のいずれか一項記載の抗体。

20

(態様6)

pH 6.0でのヒトFcRnに対する前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片の結合親和性が $K_D$  15nMよりも強い、態様1～5のいずれか一項記載の抗体。

(態様7)

pH 7.4でのヒトFcRnに対する前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片の結合親和性が $K_D$  320nMよりも強い、態様1～6のいずれか一項記載の抗体。

(態様8)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、対応する野生型Fcドメインと比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、態様1～7のいずれか一項記載の抗体。

30

(態様9)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、以下のもの: 237M; 238A; 239K; 248I; 250A; 250F; 250I; 250M; 250Q; 250S; 250V; 250W; 250Y; 252F; 252W; 252Y; 254T; 255E; 256D; 256E; 256Q; 257A; 257G; 257I; 257L; 257M; 257N; 257S; 257T; 257V; 258H; 265A; 270F; 286A; 286E; 289H; 297A; 298G; 303A; 305A; 307A; 307D; 307F; 307G; 307H; 307I; 307K; 307L; 307M; 307N; 307P; 307Q; 307R; 307S; 307V; 307W; 307Y; 308A; 308F; 308I; 308L; 308M; 308P; 308Q; 308T; 309A; 309D; 309E; 309P; 309R; 311A; 311H; 311I; 312A; 312H; 314K; 314R; 315A; 315H; 317A; 325G; 332V; 334L; 360H; 376A; 378V; 380A; 382A; 384A; 385D; 385H; 386P; 387E; 389A; 389S; 424A; 428A; 428D; 428F; 428G; 428H; 428I; 428K; 428L; 428N; 428P; 428Q; 428S; 428T; 428V; 428W; 428Y; 433K; 434A; 434F; 434H; 434S; 434W; 434Y; 436H; 436I、及び436Fから選択される少なくとも1つのアミノ酸を含み、ここで、該位置がEU付番に従って規定される、態様1～8のいずれか一項記載の抗体。

40

(態様10)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、

(i)それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436のアミノ酸Y、T、E、K、F、及びY;

(ii)それぞれ、EU位置250及び428のアミノ酸Q及びL;

50

(iii)それぞれ、EU位置308及び434のアミノ酸P及びA;

(iv)それぞれ、EU位置308及び434のアミノ酸P及びY;又は

(v)それぞれ、EU位置252、286、及び434のアミノ酸Y、E、及びY

を含む、態様1～9のいずれか一項記載の抗体。

(態様11)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436のアミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む、態様10記載の抗体。

(態様12)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、G237M; P238A; S239K; K248I; T250A; T250F; T250I; T250M; T250Q; T250S; T250V; T250W; T250Y; M252F; M252W; M252Y; S254T; R255E; T256D; T256E; T256Q; P257A; P257G; P257I; P257L; P257M; P257N; P257S; P257T; P257V; E258H; D265A; D270F; N286A; N286E; T289H; N297A; S298G; V303A; V305A; T307A; T307D; T307F; T307G; T307H; T307I; T307K; T307L; T307M; T307N; T307P; T307Q; T307R; T307S; T307V; T307W; T307Y; V308A; V308F; V308I; V308L; V308M; V308P; V308Q; V308T; V309A; V309D; V309E; V309P; V309R; Q311A; Q311H; Q311I; D312A; D312H; L314K; L314R; N315A; N315H; K317A; N325G; I332V; K334L; K360H; D376A; A378V; E380A; E382A; N384A; G385D; G385H; Q386P; P387E; N389A; N389S; S424A; M428A; M428D; M428F; M428G; M428H; M428I; M428K; M428L; M428N; M428P; M428Q; M428S; M428T; M428V; M428W; M428Y; H433K; N434A; N434F; N434H; N434S; N434W; N434Y; Y436H; Y436I、及びY436Fから選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、ここで、該位置がEU付番に従って規定される、態様1～11のいずれか一項記載の抗体。

(態様13)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、アミノ酸置換:

(i)M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434F;

(ii)T250Q及びM428L;

(iii)V308P及びN434A;

(iv)V308P及びN434Y;又は

(v)M252Y、N286E、及びN434Y

を含む、態様1～12のいずれか一項記載の抗体。

(態様14)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、アミノ酸置換M252Y、S254T、T256E、H433K、及びN434Fを含む、態様13記載の抗体。

(態様15)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、それぞれ、EU位置252、308、及び434のアミノ酸Y、P、及びYの組合せを含まないか、又はアミノ酸置換: M252Y、V308P、及びN434Yの組合せを含まない、態様1～14のいずれか一項記載の抗体。

(態様16)

IgEに結合する抗体であって、バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片を含み、該バリエーションFcドメイン又はFcRn結合断片が、それぞれ、EU位置252、254、256、433、434、及び436にアミノ酸Y、T、E、K、F、及びYを含む、前記抗体。

(態様17)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片がバリエーションヒトFcドメイン又はそのFcRn結合断片である、態様1～16のいずれか一項記載の抗体。

(態様18)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片がバリエーションIgG Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である、態様1～17のいずれか一項記載の抗体。

(態様19)

10

20

30

40

50

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片がバリエーションIgG1 Fcドメイン又はそのFcRn結合断片である、態様1～18のいずれか一項記載の抗体。

(態様20)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、対応する野生型Fcドメインと比較して、20以下のアミノ酸置換からなる、態様1～19のいずれか一項記載の抗体。

(態様21)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、対応する野生型Fcドメインと比較して、10以下のアミノ酸置換からなる、態様1～19のいずれか一項記載の抗体。

(態様22)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片が、対応する野生型Fcドメインと比較して、5以下のアミノ酸置換からなる、態様1～19のいずれか一項記載の抗体。

(態様23)

前記バリエーションFcドメインが、配列番号1、配列番号2、もしくは配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる、態様1～22のいずれか一項記載の抗体。

(態様24)

前記バリエーションFcドメインが、配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる、態様1～22のいずれか一項記載の抗体。

(態様25)

前記バリエーションFcドメイン又はそのFcRn結合断片がバリエーションFc領域内に含まれ、該バリエーションFc領域が2つのFcドメイン又はそのFcRn結合断片からなる、態様1～24のいずれか一項記載の抗体。

(態様26)

前記バリエーションFc領域の2つのFcドメイン又はFcRn結合断片が同一である、態様25記載の抗体。

(態様27)

前記バリエーションFc領域の2つのFcドメインが各々配列番号1、配列番号2、もしくは配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる、態様26記載の抗体。

(態様28)

前記バリエーションFc領域の2つのFcドメインが各々配列番号5、配列番号6、もしくは配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなる、態様26記載の抗体。

(態様29)

前記バリエーションFc領域がCD16aに対する増大した親和性を有する、態様25～28のいずれか一項記載の抗体。

(態様30)

前記バリエーションFc領域のFcドメインがEU位置297にN-結合型グリカンを含まない、態様25～28のいずれか一項記載の抗体。

(態様31)

前記バリエーションFc領域のFcドメインがEU位置297に脱フコシル化N-結合型グリカンを含む、態様25～28のいずれか一項記載の抗体。

(態様32)

前記バリエーションFc領域のFcドメインが該FcドメインのEU位置297にバイセクティングGlcNAcを有するN-結合型グリカンを含む、態様25～28のいずれか一項記載の抗体。

(態様33)

前記抗体がIgEのCH3ドメインに結合する、態様1～32のいずれか一項記載の抗体。

(態様34)

前記抗体がIgEのFc RIへの結合を阻害する、態様1～33のいずれか一項記載の抗体。

10

20

30

40

50

( 態様 3 5 )

前記抗体が肥満細胞又は好塩基球の脱顆粒を阻害する、態様1～34のいずれか一項記載の抗体。

( 態様 3 6 )

前記抗体がアナフィラキシー性ではない、態様1～35のいずれか一項記載の抗体。

( 態様 3 7 )

前記抗体が中性pHよりも酸性pHで低い抗原結合活性を示す、態様1～36のいずれか一項記載の抗体。

( 態様 3 8 )

酸性pHでの抗原結合活性と中性pHでの抗原結合活性の比が、 $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ によって測定したとき、少なくとも2である、態様37記載の抗体。

( 態様 3 9 )

1以上のCDRが1以上のHis置換を含む、態様37又は態様38記載の抗体。

( 態様 4 0 )

前記抗体がIgG抗体、好ましくは、IgG1抗体である、態様1～39のいずれか一項記載の抗体。

( 態様 4 1 )

前記抗体が非ヒト抗体のヒト化又は生殖系列化バリエーションである、態様1～40のいずれか一項記載の抗体。

( 態様 4 2 )

前記非ヒト抗体がラクダ科動物由来である、態様41記載の抗体。

( 態様 4 3 )

前記抗体が可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含み、ここで、該VH及びVLドメインが、

(i)配列番号11を含むHCDR3;配列番号10を含むHCDR2;配列番号9を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;

(ii)配列番号14を含むHCDR3;配列番号13を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号58を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号57を含むLCDR1;

(iii)配列番号17を含むHCDR3;配列番号16を含むHCDR2;配列番号15を含むHCDR1;配列番号61を含むLCDR3;配列番号60を含むLCDR2;及び配列番号59を含むLCDR1;

(iv)配列番号19を含むHCDR3;配列番号18を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号61を含むLCDR3;配列番号60を含むLCDR2;及び配列番号59を含むLCDR1;

(v)配列番号27を含むHCDR3;配列番号26を含むHCDR2;配列番号25を含むHCDR1;配列番号66を含むLCDR3;配列番号67を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;

(vi)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号68を含むLCDR1;

(vii)配列番号30を含むHCDR3;配列番号29を含むHCDR2;配列番号28を含むHCDR1;配列番号72を含むLCDR3;配列番号71を含むLCDR2;及び配列番号70を含むLCDR1;

(viii)配列番号33を含むHCDR3;配列番号32を含むHCDR2;配列番号31を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;

(ix)配列番号22を含むHCDR3;配列番号23を含むHCDR2;配列番号34を含むHCDR1;配列番号63を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号62を含むLCDR1;

(x)配列番号37を含むHCDR3;配列番号36を含むHCDR2;配列番号35を含むHCDR1;配列番号75を含むLCDR3;配列番号74を含むLCDR2;及び配列番号73を含むLCDR1;

(xi)配列番号38を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号63を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号62を含むLCDR1;

(xii)配列番号40を含むHCDR3;配列番号39を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号78を含むLCDR3;配列番号77を含むLCDR2;及び配列番号76を含むLCDR1;

(xiii)配列番号43を含むHCDR3;配列番号42を含むHCDR2;配列番号41を含むHCDR1;配列番号81を含むLCDR3;配列番号80を含むLCDR2;及び配列番号79を含むLCDR1;

10

20

30

40

50

(xiv)配列番号14を含むHCDR3;配列番号13を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号82を含むLCDR1;  
(xv)配列番号45を含むHCDR3;配列番号44を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号66を含むLCDR3;配列番号55を含むLCDR2;及び配列番号54を含むLCDR1;  
(xvi)配列番号48を含むHCDR3;配列番号47を含むHCDR2;配列番号46を含むHCDR1;配列番号85を含むLCDR3;配列番号84を含むLCDR2;及び配列番号83を含むLCDR1;  
(xvii)配列番号50を含むHCDR3;配列番号49を含むHCDR2;配列番号12を含むHCDR1;配列番号88を含むLCDR3;配列番号87を含むLCDR2;及び配列番号86を含むLCDR1;並びに  
(xviii)配列番号53を含むHCDR3;配列番号52を含むHCDR2;配列番号51を含むHCDR1;配列番号91を含むLCDR3;配列番号90を含むLCDR2;及び配列番号89を含むLCDR1;  
:からなる群から選択されるCDR配列を含む、態様1~42のいずれか一項記載の抗体。

10

( 態様 4 4 )

前記抗体が、

- (i)配列番号92のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号93のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (ii)配列番号94のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号95のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (iii)配列番号96のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号97のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (iv)配列番号98のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号99のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (v)配列番号104のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号105のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (vi)配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号107のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (vii)配列番号108のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号109のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (viii)配列番号110のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号111のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (ix)配列番号112のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号113のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;
- (x)配列番号114のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%

20

30

40

50

の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号115のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xi)配列番号116のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号117のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xii)配列番号118のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号119のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xiii)配列番号120のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号121のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xiv)配列番号122のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号123のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xv)配列番号124のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号125のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xvi)配列番号126のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号127のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;

(xvii)配列番号128のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号129のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;及び

(xviii)配列番号130のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号131のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン

からなる群から選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様1~43のいずれか一項記載の抗体。

(態様45)

前記抗体が可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含み、ここで、該VH及びVLドメインが、

(i)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号132を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号68を含むLCDR1;

(ii)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号20を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号135を含むLCDR1;並びに

(iii)配列番号22を含むHCDR3;配列番号21を含むHCDR2;配列番号132を含むHCDR1;配列番号56を含むLCDR3;配列番号69を含むLCDR2;及び配列番号135を含むLCDR1

からなる群から選択されるCDR配列を含む、態様1~42のいずれか一項記載の抗体。

(態様46)

前記抗体が、

(i)配列番号137のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%



の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号107のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン:

(ii)配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン;及び

(iii)配列番号137のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVHドメイン、及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は該アミノ酸配列からなるVLドメイン

:からなる群から選択される可変重鎖ドメイン(VH)及び可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様1~45のいずれか一項記載の抗体。

(態様47)

前記抗体が、

(化1)

配列番号:22[GTSYSGSYYYTDPFFGS]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3:

(化2)

配列番号:21[SIYHDGSHTYYADFKG]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2:

(化3)

配列番号:132[SYVMH]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1:

(化4)

配列番号:56[QSADSSGNPV]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3:

(化5)

配列番号:69[DDRRPS]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

(化6)

配列番号:135[QGDRLGSRVH]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む、態様1~42のいずれか一項記載の抗体。

(態様48)

前記抗体が、配列番号137のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様47記載の抗体。

(態様49)

前記抗体が、配列番号173のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号1

10

20

30

40

50

74のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様47記載の抗体。

(態様50)

前記抗体が、

(化7)

配列番号: 22 [GTSYSGSYYYTDPFFGS]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3:

(化8)

配列番号: 21 [SIYHDGSHTYYADFKVG]

10

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2:

(化9)

配列番号: 20 [SYVMS]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1:

(化10)

配列番号: 56 [QSADSSGNPV]

20

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3:

(化11)

配列番号: 69 [DDDRRPS]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2:及び

(化12)

配列番号: 135 [QGDRLGSRVYIH]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む、態様1~42のいずれか一項記載の抗体。

(態様51)

前記抗体が、配列番号106のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号138のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様50記載の抗体。

(態様52)

前記抗体が、配列番号215のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号174のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様50記載の抗体。

(態様53)

前記抗体が、

(化13)

配列番号: 145 [GSHYFGHWHFAV]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3:

(化14)

配列番号: 144 [SITYDGSTNYNPSVKG]

50

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2:

(化15)

配列番号:143 [SGYSWN]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1:

(化16)

配列番号:149 [QQSHEDPYT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3:

(化17)

配列番号:148 [AASYLES]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

(化18)

配列番号:147 [RASQSVDDYDGDSYMN]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む、態様1～41のいずれか一項記載の抗体。

(態様54)

前記抗体が、配列番号146のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号150のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様53記載の抗体。

(態様55)

前記抗体が、

(化19)

配列番号:197 [ATHYFGHWHFAV]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3:

(化20)

配列番号:198 [SIHYDHSTNYPNPSVKG]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2:

(化21)

配列番号:195 [SGHRWE]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1:

(化22)

配列番号:201 [QQNAEDPYT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3:

(化23)

配列番号:200 [WGSYLRS]

10

20

30

40

50

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び  
(化24)

配列番号: 203 [RASQSVDDYDGDHYMN]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1  
:を含む、態様1～41のいずれか一項記載の抗体。  
(態様56)

前記抗体が、配列番号206のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号211のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様55記載の抗体。

10

(態様57)  
前記抗体が、  
(化25)

配列番号: 199 [ATHYFGHHHFAV]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3;  
(化26)

配列番号: 196 [SIHYDGSTNYPNPSVKG]

20

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2;  
(化27)

配列番号: 195 [SGHRWE]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1;  
(化28)

配列番号: 201 [QQNAEDPYT]

30

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3;  
(化29)

配列番号: 200 [WGSYLRS]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び  
(化30)

配列番号: 147 [RASQSVDDYDGD SYMN]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1  
:を含む、態様1～41のいずれか一項記載の抗体。  
(態様58)

40

前記抗体が、配列番号207のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号209のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様57記載の抗体。

(態様59)  
前記抗体が、  
(化31)

50

配列番号: 153 [FSHFSGSNYDYFDY]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3:

(化32)

配列番号: 152 [EIDPGTFTTNYNEKFA]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2:

(化33)

配列番号: 151 [WYWLE]

10

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1:

(化34)

配列番号: 157 [QQSWSWPTT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3:

(化35)

配列番号: 156 [YASESIS]

20

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

(化36)

配列番号: 155 [RASQSIGTNIH]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む、態様1~41のいずれか一項記載の抗体。

(態様60)

30

前記抗体が、配列番号154のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号158のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様59記載の抗体。

(態様61)

前記抗体が、

(化37)

配列番号: 180 [FSHFSGSNHDYFDY]

40

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR3:

(化38)

配列番号: 152 [EIDPGTFTTNYNEKFA]

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR2:

(化39)

配列番号: 179 [WYHLE]

50

を含むか又はこれからなる可変重鎖CDR1:

(化40)

配列番号: 157 [QQSWSWPTT]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR3:

(化41)

配列番号: 156 [YASESIS]

10

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR2;及び

(化42)

配列番号: 155 [RASQSIGTNIH]

を含むか又はこれからなる可変軽鎖CDR1

:を含む、態様1～41のいずれか一項記載の抗体。

(態様62)

前記抗体が、配列番号186のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖ドメイン(VH)、及び配列番号158のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖ドメイン(VL)を含む、態様61記載の抗体。

20

(態様63)

態様1～62のいずれか一項記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド(単数)又はポリヌクレオチド(複数)。

(態様64)

前記抗体の発現を可能にする調節配列に機能的に連結された態様63記載のポリヌクレオチド(単数)又はポリヌクレオチド(複数)を含む発現ベクター。

(態様65)

態様64記載の発現ベクターを含有する宿主細胞又は無細胞発現系。

30

(態様66)

組換え抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、態様65記載の宿主細胞又は無細胞発現系を該抗体又は抗原結合断片の発現を可能にする条件下で培養すること及び発現された抗体又は抗原結合断片を回収することを含む、前記方法。

(態様67)

態様1～62のいずれか一項記載の抗体及び少なくとも1つの医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含む医薬組成物。

(態様68)

医薬として使用するための、態様1～62のいずれか一項記載の抗体又は態様67記載の医薬組成物。

40

(態様69)

対象の抗体媒介性障害を治療する方法であって、それを必要としている患者に、態様1～62のいずれか一項記載の抗体又は態様67記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む、前記方法。

(態様70)

前記抗体媒介性障害がIgE媒介性障害である、態様69記載の方法。

(態様71)

前記抗体媒介性障害が自己免疫疾患である、態様69又は態様70記載の方法。

(態様72)

前記自己免疫疾患が、同種異系臍島移植拒絶反応、円形脱毛症、アミロイド症、強直性

50

脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、アルツハイマー病、抗好中球細胞質自己抗体(ANCA)、自己免疫性血球減少症、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性心筋炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性卵巣炎及び精巣炎、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性蕁麻疹、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャスルマン症候群、セリアックスブルー-皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、慢性誘発性蕁麻疹、慢性自発性蕁麻疹、チャーク-ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、皮膚筋炎、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、第VIII因子欠乏症、線維筋痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、グッドパスチャー症候群、移植片対宿主病(GVHD)、橋本甲状腺炎、血友病A、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgAニューロパチー、IgM多発ニューロパチー、免疫媒介性血小板減少症、若年性関節炎、川崎病、扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、メニエール病、混合性結合組織疾患、菌状息肉腫、多発性硬化症、1型真性糖尿病、多巣性運動ニューロパチー(MMN)、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多内分泌腺症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎及び皮膚筋炎、多発性神経炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シャープ症候群、シェーグレン症候群、固形臓器移植片拒絶反応、スティッフマン症候群、全身エリテマトーデス、高安動脈炎、中毒性表皮壊死症(TEN)、スティブンス-ジョンソン症候群(SJS)、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血栓性血小板減少性紫斑病、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、疱疹状皮膚炎型血管炎、抗好中球細胞質抗体関連血管炎、白斑、並びにウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される、態様71記載の方法。

(態様73)

前記自己免疫疾患が慢性自発性蕁麻疹である、態様72記載の方法。

(態様74)

前記自己免疫疾患が水疱性類天疱瘡である、態様72記載の方法。

(態様75)

前記抗体が追加の治療剤と同時に又は連続的に前記対象に投与される、態様69~74のいずれか一項記載の方法。

(態様76)

慢性自発性蕁麻疹又は水疱性類天疱瘡の治療において使用するための、態様1~62のいずれか一項記載の抗体又は態様67記載の医薬組成物。

10

20

30

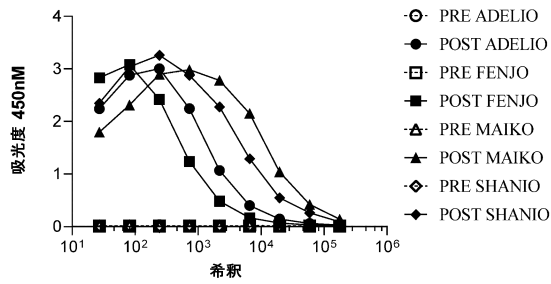
40

50

【図面】

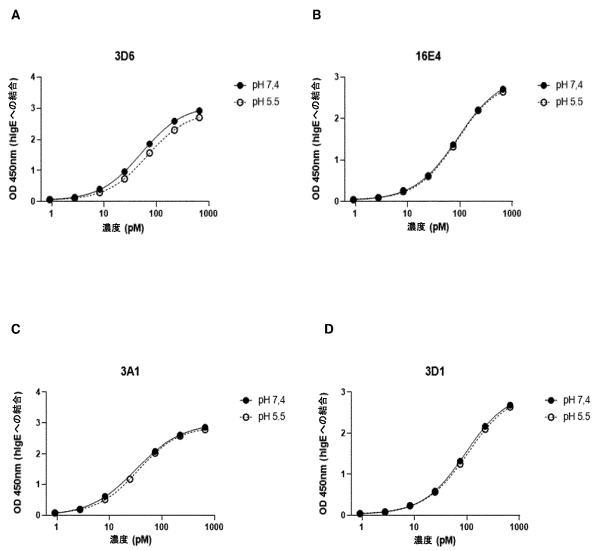
【図 1】

図 1



【図 2 A - D】

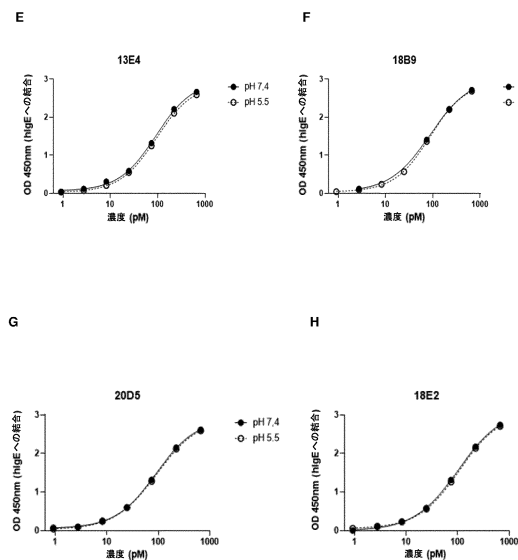
図 2



10

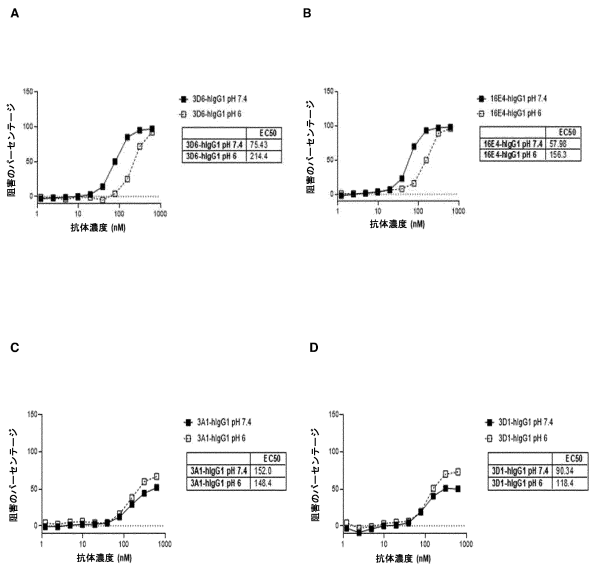
【図 2 E - H】

図 2 続き



【図 3 A - D】

図 3



30

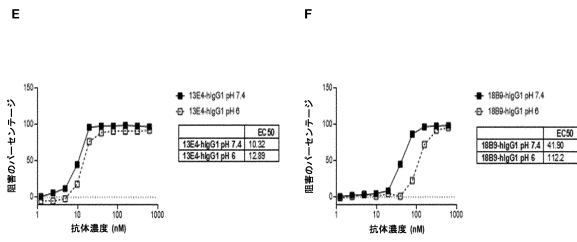
40

50



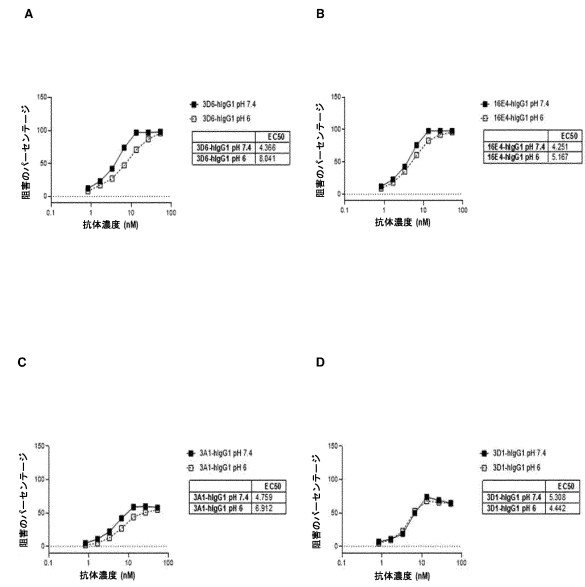
## 【図 3 E - H】

図 3 続き



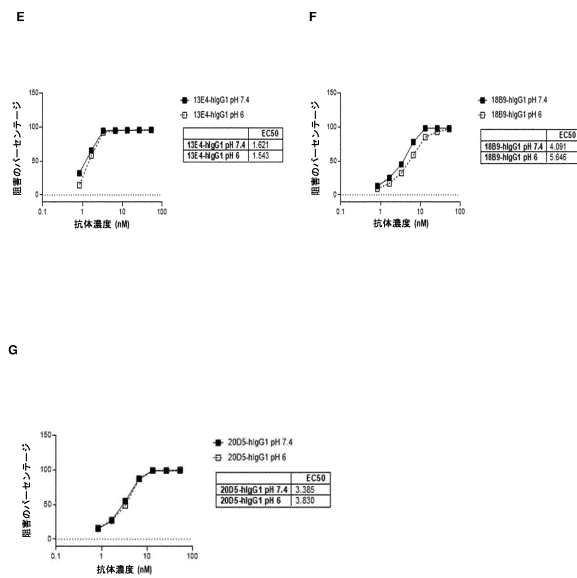
## 【図 4 A - D】

図 4



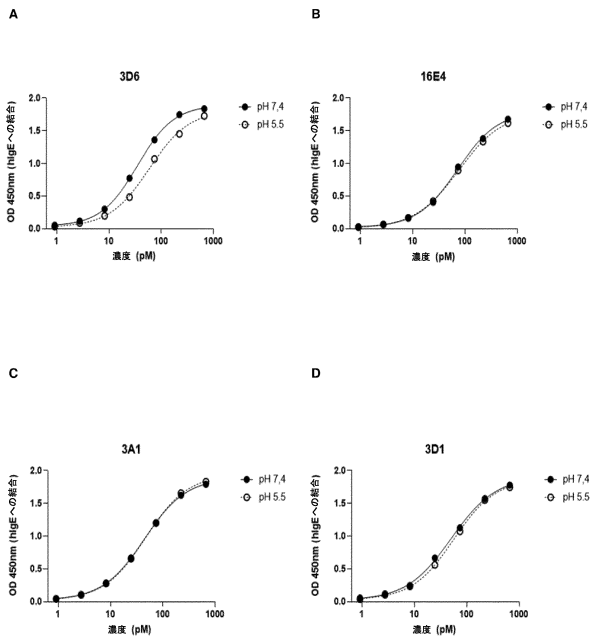
## 【図 4 E - G】

図 4 続き



## 【図 5 A - D】

図 5



10

20

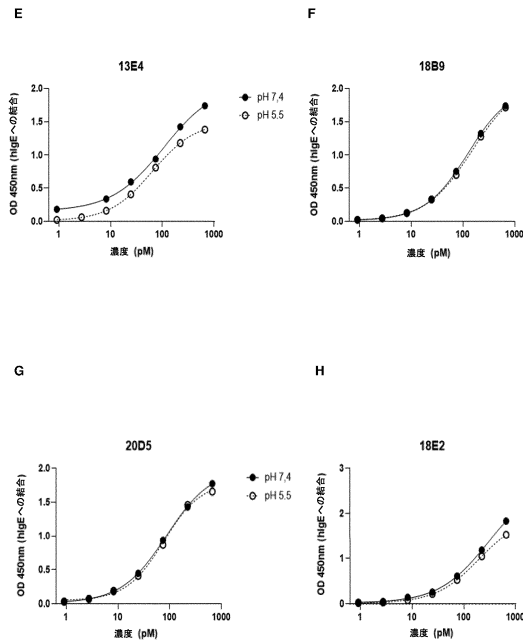
30

40

50

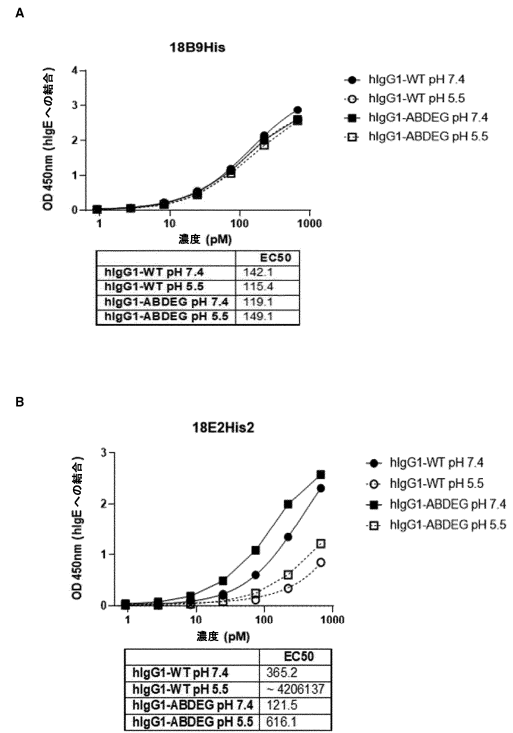
## 【図 5 E - H】

図 5 続き



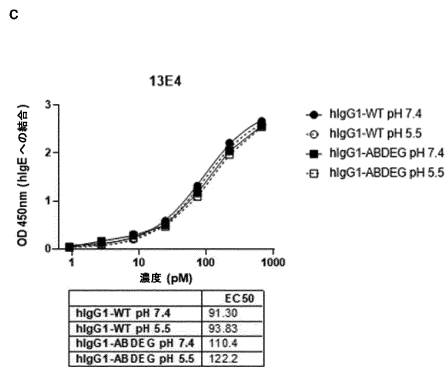
## 【図 6 A - B】

図 6



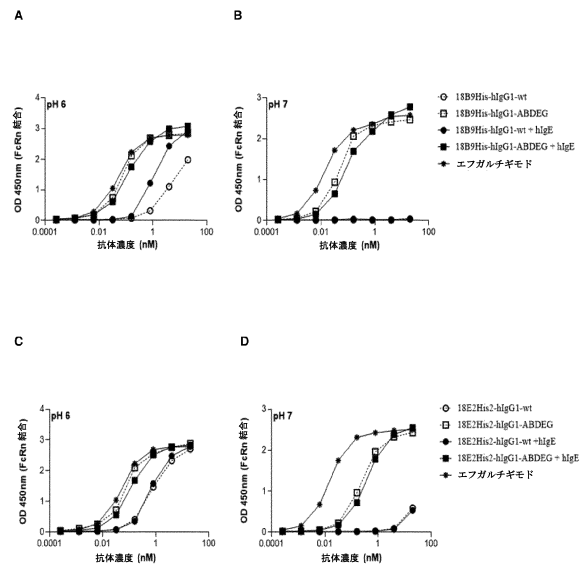
## 【図 6 C】

図 6 続き



## 【図 7 A - D】

図 7



10

20

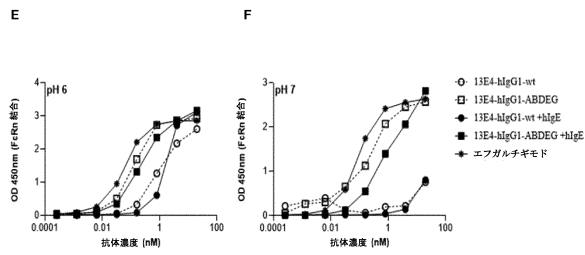
30

40

50

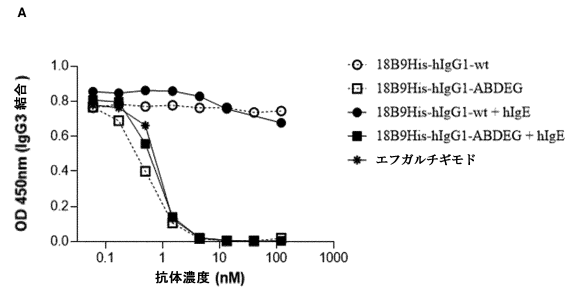
【 図 7 E - F 】

図 7 続き

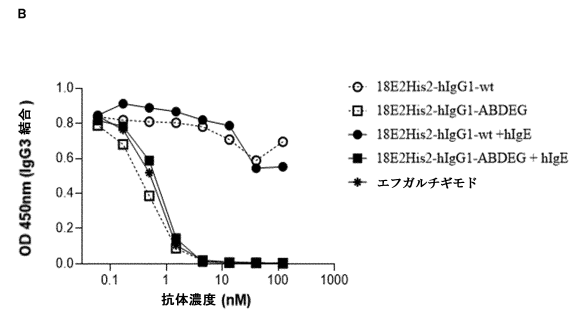


【 図 8 A - B 】

図 8



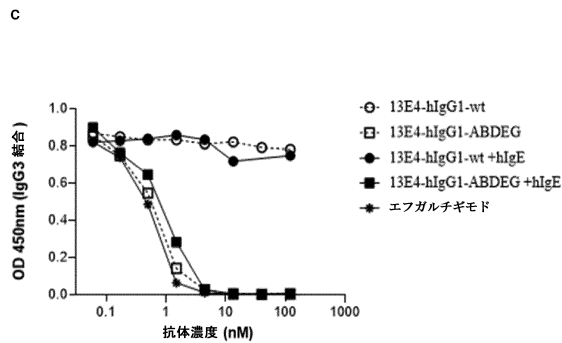
10



20

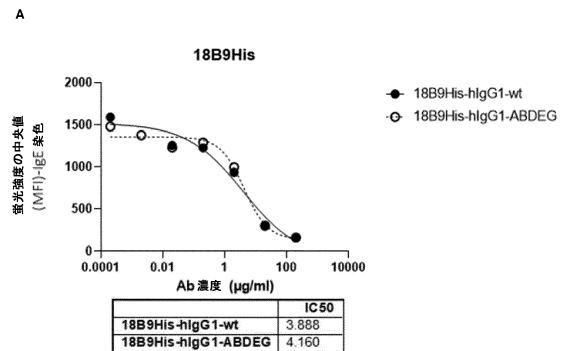
【 図 8 C 】

図 8 続き

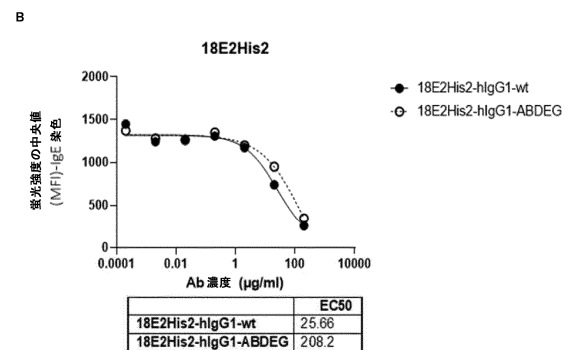


【 図 9 A - B 】

図 9



30



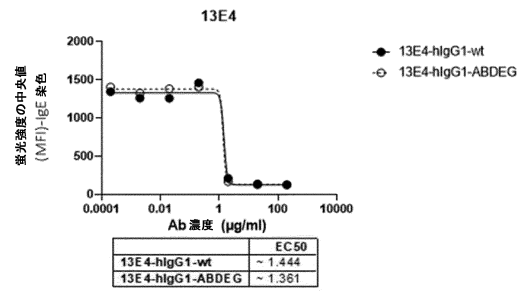
40

50

## 【 図 9 C 】

図 9 続き

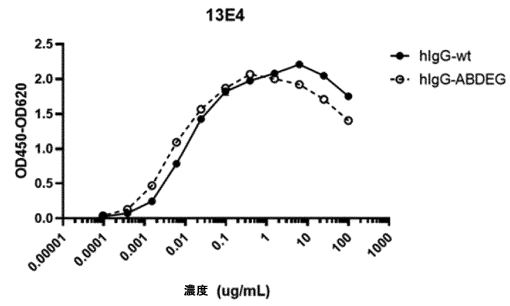
C



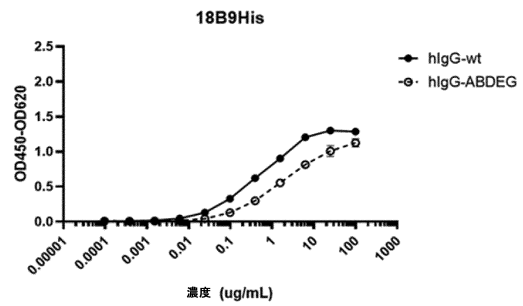
## 【 図 10 A - B 】

図 10

A



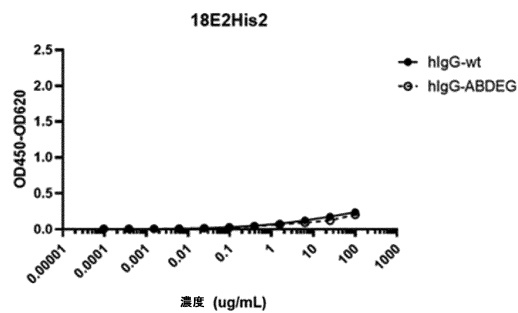
B



## 【 図 10 C 】

図 10 続き

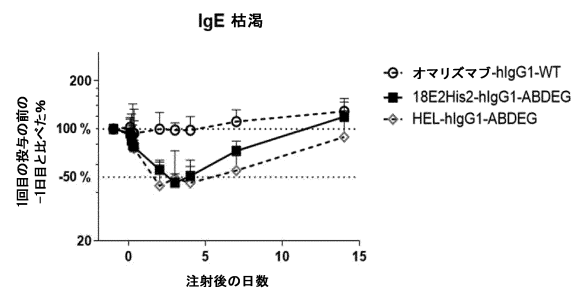
C



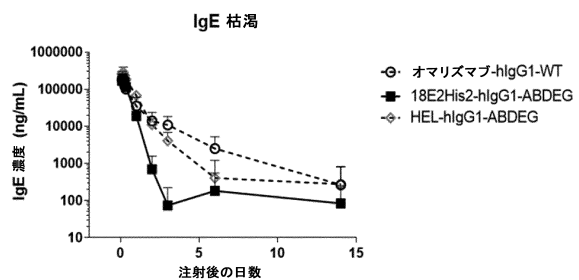
## 【 図 11 】

図 11

A



B



10

20

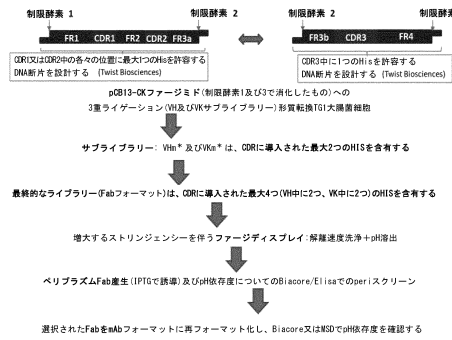
30

40

50

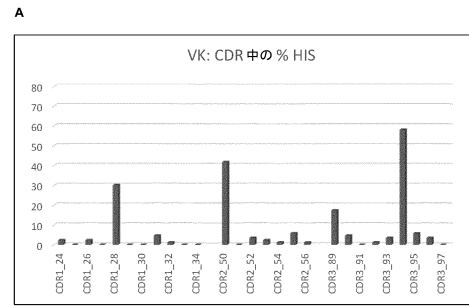
【 1 2 】

図 12

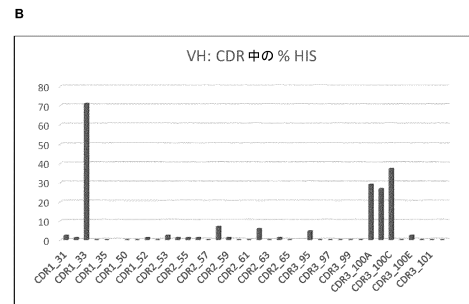


【 1 3 】

図 13



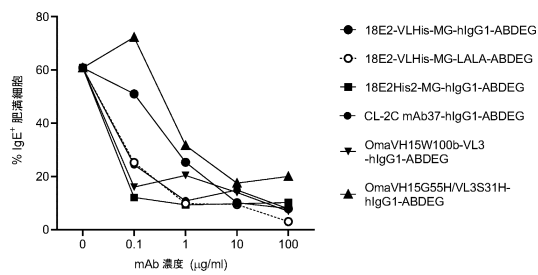
10



20

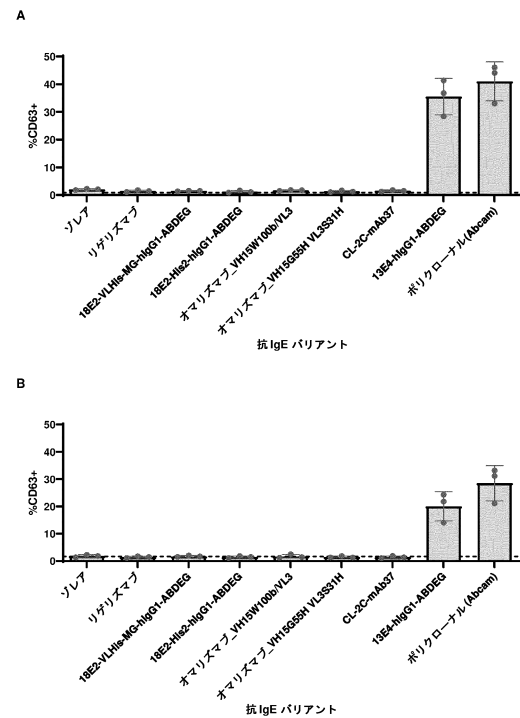
【 1 4 】

図 14

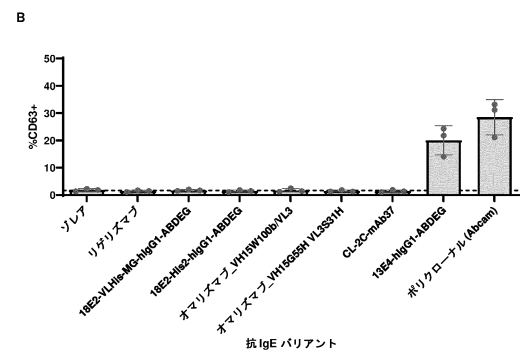


【 1 5 A - B 】

図 15



30



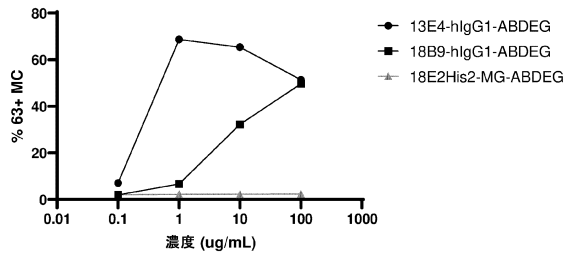
40

50

【図 1 5 C】

図 15 続き

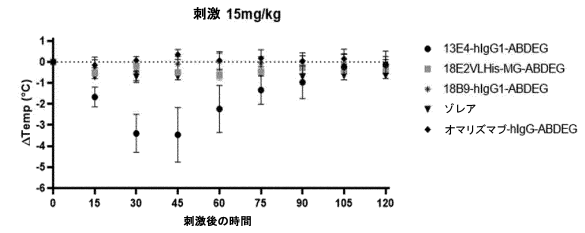
C



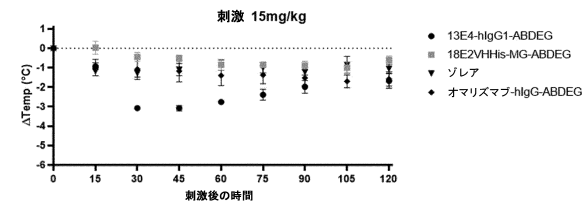
【図 1 6 A - B】

図 16

A



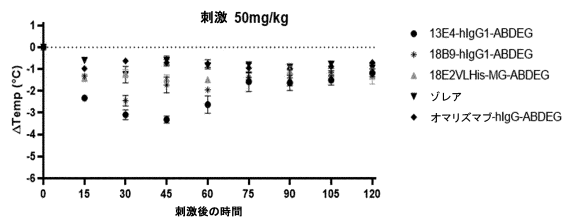
B



【図 1 6 C】

図 16 続き

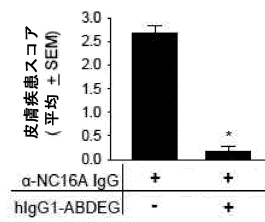
C



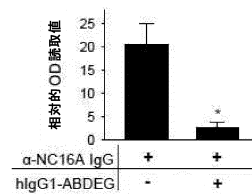
【図 1 7 A - B】

図 17

A. 疾患活性



B. 抗NC16A IgG レベル



10

20

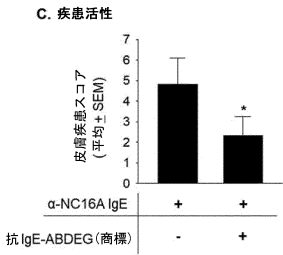
30

40

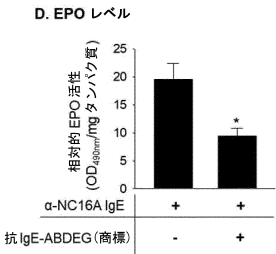
50

【図 17 C - D】

図 17 続き



10



20

【配列表】

0007586833000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/04	

(72)発明者 マリジン クロムヘッケ

ベルギー ビー 9 0 5 2 ヘント インダストリエパーク ズウィジナルデ 7

(72)発明者 コナー マクガイアー

ベルギー ビー 9 0 5 2 ヘント インダストリエパーク ズウィジナルデ 7

審査官 西村 亜希子

## (56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 2 2 9 6 5 ( U S , A 1 )

特表 2 0 1 7 - 5 0 1 7 2 5 ( J P , A )

特表 2 0 1 8 - 5 0 9 4 1 3 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 8 / 2 0 6 7 4 8 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 1 9 2 8 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 1 - 5 2 6 4 9 3 ( J P , A )

ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOLOGY RESEARCH : AAIR , 2015年 , VOL:7, NR:6 , PAGE(S):  
583-589JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY , 2012年04月 , VOL:129, NR:4 , P  
AGE(S):1102-1115

JOURNAL OF VIROLOGY , 2001年12月15日 , VOL:75, NR:24 , PAGE(S):12161-12168

NATURE BIOTECHNOLOGY , 2005年10月 , VOL:23, NR:10 , PAGE(S):1283-1288

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 /

C 0 7 K 1 6 /

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q