

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6228014号
(P6228014)

(45) 発行日 平成29年11月8日 (2017. 11. 8)

(24) 登録日 平成29年10月20日 (2017. 10. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 P 19/02 (2006. 01)

A 6 1 P 29/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 19/02

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 35/00

請求項の数 28 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-553476 (P2013-553476)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月6日 (2012. 2. 6)
 (65) 公表番号 特表2014-510519 (P2014-510519A)
 (43) 公表日 平成26年5月1日 (2014. 5. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/023949
 (87) 国際公開番号 W02012/109133
 (87) 国際公開日 平成24年8月16日 (2012. 8. 16)
 審査請求日 平成26年11月18日 (2014. 11. 18)
 審判番号 不服2016-11611 (P2016-11611/J1)
 審判請求日 平成28年8月3日 (2016. 8. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/440, 297
 (32) 優先日 平成23年2月7日 (2011. 2. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505098937
 リサーチ ディベロップメント ファウン
 デーション
 アメリカ合衆国 ネバダ州 カーソン シ
 ティー ノース ディビジョン ストリー
 ト 402
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 操作された免疫グロブリンFcポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトFc RIIaポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体のヒトIgG Fcドメインを含むポリペプチドであって、ここで、該Fcドメインは、298位および299位のアミノ酸でのS298Gアミノ酸置換およびT299Aアミノ酸置換、ならびに以下：

a) E382V、N390DおよびM428L；

b) H268P、E294K、N361S、E382VおよびM428L

からなる群より選択される少なくとも1つのさらなる置換を含み、

ヒトFc RIIbポリペプチドと比較した該ヒトFc RIIaポリペプチドに対する該ポリペプチドの相対的な親和性が、S298G置換およびT299A置換のみを含むグリコシル化されていないFcドメインのそれと比較して少なくとも2.4倍増大している、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記Fcドメインが、置換S298G、T299A、E382V、N390DおよびM428Lを含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記Fcドメインが、配列番号7を含む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記Fcドメインが、置換S298G、T299A、H268P、E294K、N36

10

20

1 S、E 3 8 2 V および M 4 2 8 L を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記 F c ドメインが、配列番号 4 を含む、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

非 F c R 結合ドメインをさらに含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記非 F c R 結合ドメインが抗体の抗原結合部位である、請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記非 F c 結合領域が抗体の抗原結合部位ではない、請求項 6 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 9】

前記非 F c 結合領域が細胞表面タンパク質に結合する、請求項 8 に記載のポリペプチド

。

【請求項 10】

前記細胞表面タンパク質が受容体である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記受容体がチロシンキナーゼである、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記非 F c 結合領域が複数のチロシンキナーゼ受容体に結合する、請求項 11 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 に記載のポリペプチドのいずれかをコードする核酸。

【請求項 14】

前記核酸が DNA セグメントである、請求項 13 に記載の核酸。

【請求項 15】

前記核酸が発現ベクターである、請求項 13 に記載の核酸。

【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 17】

前記細胞が前記核酸を発現する、請求項 16 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 18】

請求項 16 または 17 に記載の宿主細胞のインビトロ集団であって、ここで、該集団は、異なる F c ドメインを発現する複数の宿主細胞を含む、インビトロ集団。

【請求項 19】

任意の 2 つの異なる F c ドメインのアミノ酸配列が同一性において 20 % 未満異なる、請求項 18 に記載の宿主細胞集団。

【請求項 20】

グリコシル化されていないポリペプチドを調製するための方法であって、

a) 請求項 17 に記載の宿主細胞を得る工程；

b) グリコシル化されていないポリペプチドの発現を促進する条件下で、培養物中で該宿主細胞をインキュベーションする工程；および

40

c) 該宿主細胞から、発現されたポリペプチドを精製する工程を包含する、方法。

【請求項 21】

前記宿主細胞が原核生物細胞である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

標的化された細胞表面ポリペプチドを発現する標的細胞に対して樹状細胞 (DC) 媒介性の細胞の殺傷を誘導するための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む組成物であって、

a) 該組成物は、該標的細胞と接触させられ；かつ

50

b) 該標的細胞は、該標的細胞の殺傷を促進する条件下で樹状細胞に曝されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2 3】

疾患の処置において使用するための、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 2 4】

前記疾患が標的細胞に対して樹状細胞 (DC) 媒介性の細胞の殺傷を誘導することによって処置される疾患である、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記疾患が過剰増殖性障害である、請求項 2 4 に記載の組成物。

10

【請求項 2 6】

前記過剰増殖性障害が、癌、関節炎、免疫疾患および炎症性疾患である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

疾患を処置するための医薬の調製における、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 2 8】

前記疾患が、癌、関節炎、免疫疾患および炎症性疾患である、請求項 2 7 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は一般的に、タンパク質工学の分野に関する。より具体的には、本発明は、細菌の中で発現されたコンビナトリアル抗体Fcライブラリーをスクリーニングするための改良された方法と組成物に関係する。

【背景技術】

【0002】

2. 関連技術についての記載

現在、組み換え体である治療用抗体は、100億ドル/年を優に上回る売り上げがあり、20.9%の年間成長率が見込まれており、2010年には250億ドル/年にまで拡大すると予測される。モノクローナル抗体(mAb)には、現在病院にある組み換え体タンパク質の大部分が含まれ、世界中にある企業により資金提供を受けた研究において150を超える製品がある(非特許文献1)。治療の目的に関して、mAb市場は、腫瘍学および関節炎、免疫疾患および炎症性疾患について大変に注目を集めており、製品は、これらの治療領域内で、予測期間にわたり重要な増殖ドライバー(growth driver)であり続けるように設計される。1つのグループとして、遺伝子操作されたmAbは、一般的には、低分子薬物よりもFDAによる認可が得られる可能性が高い。少なくとも50のバイオテクノロジー企業と、あらゆる主要な製薬会社が、環境が整った活性のある抗体発見プログラムを有している。

30

40

【0003】

mAbの単離および産生のための最初の方法は、MilsteinおよびKohler(非特許文献2)によって1975年に最初に報告され、これには、マウスのリンパ球と骨髄腫細胞を融合させ、それによりマウスハイブリドーマを得る工程が含まれる。治療用のマウスmAbは1980年代の初期に臨床試験に入った。しかし、ヒト抗マウス抗体(HAMA)を患者が産生することが原因で、効率的かつ迅速なクリアランスが行われないという問題が明らかになった。これらの問題、ならびにこの技術に関して時間とコストがかかることが、mAb生産技術の進展への推進力となった。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、免疫化された動物のリンパ球からのモノクローナル抗体遺伝子の直接のクローニング、および断片抗体のコンビナトリアルライブラリーの細菌の中での発現を容易にした

50

(非特許文献3)。後に、相補性決定領域3(CDR3)が再配列された自然なままの遺伝子を使用したインビトロでのクローニング技術により、ライブラリー全体が作製された(Griffiths and Duncan, 1998; Hoogenboomら、1998)。結果として、所望される特異性を持つ抗体断片の単離は、もはや対応する抗原の免疫原性には依存しない。さらに、合成のコンビナトリアルライブラリーにおける抗原特異性の範囲は、免疫化されたマウスから作製されたハイブリドーマのパネルにおいて見られる抗原特異性の範囲よりも大きかった。これらの利点が、低分子化合物(ハプテン)(Hoogenboom and Winter, 1992)、分子複合体(Chamessら、2000)、不安定な化合物(Kjaerら、1998)、および細胞表面タンパク質(Desaiら、1998)を含む複数の特有の抗原に対する抗体断片の開発を容易にした。

10

【0004】

微生物の細胞の中では、フローサイトメトリーによるディスプレイスクリーニングを行うことができる。具体的には、Anchored Periplasmic Expression(APEX)は、E. coliの内膜のペリプラズム側の表面上に抗体断片を固定すること、その後の、外膜の崩壊、蛍光標識された標的とのインキュベーション、およびスフェロプラストの選別にに基づく(特許文献1)。APEXは、抗体断片の親和性成熟に使用された(Harveyら、2004; Harveyら、2006)。1つの研究では、わずか2回のスクリーニングの後に、200倍を上回る親和性の改善が得られた。

【0005】

20

抗体治療薬の効力の根底にある1つの重要な機構は、標的抗原(または細胞)に対して免疫細胞を動員する抗体の能力である。したがって、抗体のFc領域が、免疫学的細胞の動員および抗体依存性細胞傷害性(ADCC)に重要である。具体的には、抗体により誘発されるADCC応答の性質は、Fc領域と多くの細胞のタイプの表面上にある受容体(FcR)との相互作用に依存する。ヒトは、5つの異なるクラスのFc受容体を含む。加えて、特定のクラスに属している様々なFcRのハプロタイプまたは遺伝的バリエーションが知られている。FcRに対する抗体の結合が、他の免疫学的細胞を動員するその能力と動員される細胞のタイプを決定する。したがって、特定の種類の細胞だけを動員することができるように抗体を操作する能力が治療に極めて重要であり得る。

【0006】

30

しかし、本発明者が知る限りは、Fcドメインを操作するこれまでの試みは、哺乳動物により発現されたIgG分子を使用して行われてきた。哺乳動物の抗体はグリコシル化される。炭水化物鎖がFc領域に結合させられ、タンパク質のコンフォメーションを変化させて、その抗体がFcRに結合できるようにする。対照的に、細菌の中で産生されたグリコシル化されていない抗体はFcRに結合することができず、したがって、ADCCを誘発することができない。ADCCを誘発することができるようグリコシル化されていない抗体を操作し、それにより、細菌による発現により得られる低い生産コストの利益を得ることが所望される。

【0007】

第2に、そして最も重要であるのは、操作されたFc領域を持つ哺乳動物の抗体が、目的の特定のFcRに対する結合の増大を示し、加えて、これらはなおも通常の親和性で他のFcRに結合できることである。したがって、そのような抗体は、免疫系により自然に産生された分子よりも選択性が高いにも関わらず、それでもなおこれらは、望ましくない免疫学的応答を媒介する可能性がある。

40

【0008】

それにも関わらず、今日利用できる全てのハイスループット抗体スクリーニング技術は、抗体断片の微生物による発現に頼る。ライブラリーの構築およびスクリーニングにおけるインタクティブなIgGまたは全長のIgGではなく抗体断片の使用は、はるかに大きなIgGの微生物の中での発現に関連する限界により決定されている。IgGライブラリーは、これまでは、細菌または酵母のような微生物を使用して発現またはスクリーニングされる

50

ことはなかった。結果として、抗原結合タンパク質の単離は、もっぱら、より小さく、生産がはるかに容易である抗体断片を使用して行われている。一旦単離されれば、そのような抗体断片は、全長の免疫グロブリンを発現するベクターに融合させられ、これがその後、哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）の中で優先的に発現させられる。

【0009】

E. coli は、ジスルフィド結合を持つタンパク質の折り畳みには適さない還元性の細胞質を持つ。これは、折り畳まれていない状態または不正確に折り畳まれた状態で蓄積する (Baneyx and Mujacic, 2004)。細胞質とは対照的に、E. coli のペリプラズムは酸化された状態で維持され、これがタンパク質のジスルフィド結合の形成を可能にする。特に、ペリプラズムでの発現は、抗体断片（例えば、Fv、scFv、Fab、または F(ab')₂ (Kipriyanov and Little, 1999) の発現のための使用に成功している。これらの断片は、抗原結合活性を保持したまま、大量に、比較的迅速に作製することができる。しかし、抗体断片は Fc ドメインを欠くので、これらは Fc Rn 受容体には結合せず、迅速に除去される。したがって、これらが治療用タンパク質として適していることはわずかしかない (Knightら、1995)。最近までは、全長の抗体は不溶性凝集物として E. coli の中で発現させ、その後、インビトロで再度折り畳むことしかできなかった (Bossら、1984; Cabillyら、1984)。現在の技術を用いても、何百万または何千万もの抗体を個々に折り畳むことができないので、このアプローチは明らかに、抗体ライブラリーのハイスループットスクリーニングには適さない。さらなる問題は、E. coli により発現された抗体はグリコシル化されないもので、これらは、補体因子 1q (C1q) または Fc、および多くの他の Fc 受容体に結合することができないことである。しかし、グリコシル化されていない Fc ドメインは、新生児の Fc 受容体 (Fc Rn) に効率よく結合することができる。結果として、細菌により発現されたグリコシル化されていない抗体は、ヒト細胞の中で産生された完全にグリコシル化された IgG のものと類似する血清持続および薬物動態を示す。それにも関わらず、グリコシル化されていない抗体は補体活性化を誘発することができず、マクロファージのような免疫細胞の動員も媒介できないので、これまでのところは多くの治療的用途については有効ではない。

【0010】

ヒトには、主要な Fc R が 5 つ存在する。IgG 抗体は、これらの全ての受容体に様々な親和性で結合する。注目すべきことに、それらの 5 つの Fc R のうち、4 つが、活性化応答または炎症促進性応答を誘導する一方で、1 つの Fc R I I b は、抗炎症性応答または阻害応答を誘導する。自然に産生される全ての抗体、およびまた、組織培養物によって産生されたグリコシル化された組換え抗体は、活性化 Fc R と阻害性 Fc R の両方に結合する Fc ドメインを含む。抗体が活性化 ADC C を誘導する能力は、活性化 Fc R と阻害性 Fc R I I b に対する結合親和性の比 (A / I 比) に依存する (Boruchovら、2005; Kaler gisら、2002)。活性化 Fc R への結合を増大させ、かつ Fc R I I b への結合を減少させる、グリコシル化された抗体内の変異を操作することによって A / I 比を高める試みは、後者が活性化 Fc R と 96 % 相同であるので、大部分に対してほとんど成果がなかった。様々な Fc R エフェクター機能として、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 (ADC C)、サイトカインの放出、食作用および成熟が挙げられる。選択的エフェクター機能を有するように操作された Fc ドメインは、生理学的利点をもたらす可能性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献 1】米国特許第 7, 094, 571 号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献 1】Pavlou および Belsey, Eur. J. Pharm. Biop

10

20

30

40

50

h a r m . (2 0 0 5) 5 9 : 3 8 9 ~ 3 9 6

【非特許文献2】K o h l e r およびM i l s t e i n、N a t u r e (1 9 7 5) 2 5 6 : 4 9 5 ~ 4 9 7

【非特許文献3】O r l a n d i ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 8 9) 8 6 : 3 8 3 3 ~ 3 8 3 7

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

発明の要旨

本開示は、Fc受容体に結合するグリコシル化されていない抗体Fcドメインを含む化合物および方法を提供する。上で述べたように、本発明のFcドメインは、多種多様の状況、特に、標的細胞に対して樹状細胞(DC)媒介性の細胞の殺傷を誘導することが望まれる疾患(例えば、腫瘍学(癌治療)を含むがこれに限定されない過剰増殖性障害、関節炎、免疫疾患および炎症性疾患)の処置において臨床有用性を有する抗体の調製において有用性が見出され得ると想定される。

【0014】

いくつかの実施形態においては、抗体に由来するグリコシル化されていないFcドメイン(「抗体Fcドメイン」)を有するポリペプチドを含む組成物が存在する。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインは野生型Fcドメインのバリエーションであり、その結果、そのようなバリエーションが、Fcドメインが1つ以上のFc受容体に特異的に結合することを可能にする。いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドは、野生型Fcドメインのグリコシル化されたバージョン(「グリコシル化された野生型Fcドメイン」)を持つポリペプチドが結合できるFc受容体のサブセットだけに結合することができる。特異的な実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドはFcRIIaに特異的に結合することができる。いくつかの場合には、これは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドの2倍以内の親和性または結合能力を有する。他の実施形態においては、さらに、またはあるいは、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドと比較して、有意に低下した親和性または結合能力(50倍以上の低下)を有する。特定の実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドは、その相同な活性化受容体であるFcRIIaに対する親和性と比較して、FcRIIbに対して有意に低下した親和性またはFcRIIbへの有意に低下した結合能力を有する。ポリペプチドが、(いずれも、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドと比較して)匹敵する(2倍以内)のFcRIに対する親和性または結合能力を有し得ること、ならびに、FcRIIbに対する有意に低下した親和性または結合能力を有し得ることが想定される。

【0015】

本明細書中で使用される場合は、用語「親和性」は、2つの作用物質の可逆的結合についての平衡定数をいい、これはKdとして表わされる。結合ドメインのその標的に対する親和性は、例えば、約100ナノモル濃度(nM)~約0.1nM、約100nM~約1ピコモル濃度(pM)、または約100nM~約1フェムトモル濃度(fM)であり得る。あるいはこれは、100nM~1nMの間、または0.1nM~10nMの間であり得る。さらに、2つの作用物質間の親和性が上記で議論した親和性範囲内にある場合は、上記作用物質は特異的に結合すると想定される。

【0016】

抗体Fcドメインは、IgA、IgM、IgE、IgD、またはIgG抗体のFcドメイン、あるいはそれらのバリエーションであり得る。特定の実施形態においては、上記ドメインはIgG抗体のFcドメイン(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3

10

20

30

40

50

、またはIgG4抗体のFcドメイン)である。さらに、上記抗体Fcドメインは、ヒトFcドメインと定義され得る。この場合、ヒトFcドメインは1つ以上のヒトFc受容体に特異的に結合する。特定の態様においては、Fcドメインは、IgG1 Fcドメイン(例えば、抗HER2抗体のFcドメイン、より具体的には、トラツズマブのFcドメイン)であり得る。いくつかの実施形態においては、ポリペプチド全体がグリコシル化されていないか、または他の実施形態においては、ポリペプチドの一部(例えば、Fcドメイン)だけがグリコシル化されないことが想定される。ポリペプチドに、Fcドメインに加えて抗体に由来する1つ以上の領域が含まれる場合があることもまた想定される。ポリペプチドには、抗体由来の抗原結合ドメイン(antigen binding domain)が含まれ得る。さらに、複数のポリペプチドが抗体または抗体様タンパク質を形成し得る。

10

【0017】

いくつかの実施形態においては、ヒトFcRポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインを含むポリペプチドが存在し、ここで、そのFcドメインは、特定のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態においては、複数のアミノ酸置換が存在する。グリコシル化されていないヒトFcドメインの中に置換を持つ実施形態には、298位および299位のアミノ酸でのアミノ酸置換、ならびに以下の位置: 382位; 382位および263位; 382位、390位および428位; 392位、382位、397位および428位; 315位、382位および428位または268位、294位、361位、382位および428位での少なくとも1つのさらなる置換を有するヒトFcドメインを持つポリペプチドが含まれる。本発明者らは、本開示全体を通じて使用されるFc残基のナンバリングシステムが、KabataらのEUインデックスであることを注意する。

20

【0018】

いくつかの場合には、298位のアミノ酸の置換がグリシン(S298G)であり、299位のアミノ酸の置換がアラニン(T299A)であることが想定される。

【0019】

上記さらなるアミノ酸置換が、382位のアミノ酸の置換である場合、好ましい置換は、バリン(E382V)である。

【0020】

上記さらなる置換が、382位および263位のアミノ酸の置換である場合、好ましい実施形態においては、382位のアミノ酸の置換は、バリン(E382V)であり、263位のアミノ酸の置換は、グルタミン酸(V263E)である。

30

【0021】

上記さらなる置換が、382位、390位および428位のアミノ酸の置換である場合、好ましい実施形態においては、382位のアミノ酸の置換は、バリン(E382V)であり、390位のアミノ酸の置換は、アスパラギン酸(N390D)であり、428位のアミノ酸の置換は、ロイシン(M428L)である。

【0022】

上記さらなるアミノ酸置換が、392位、382位、397位および428位のアミノ酸の置換である場合、好ましい実施形態においては、382位のアミノ酸の置換は、バリン(E382V)であり、392位のアミノ酸の置換は、グルタミン酸(K392E)であり、397位のアミノ酸の置換は、メチオニン(V392M)であり、428位のアミノ酸の置換は、ロイシン(M428L)である。

40

【0023】

上記さらなるアミノ酸置換が、315位、382位および428位のアミノ酸の置換である場合、好ましい実施形態においては、315位のアミノ酸の置換は、アスパラギン酸(N315D)であり、382位のアミノ酸の置換は、バリン(E382V)であり、428位のアミノ酸の置換は、ロイシン(M428L)である。

【0024】

50

上記さらなる置換が、268位、294位、361位、382位および428位のアミノ酸の置換である場合、好ましい実施形態においては、268位のアミノ酸の置換は、プロリン(H268P)であり、294位の置換は、リジン(E294K)であり、361位のアミノ酸の置換は、セリン(N361S)であり、382位のアミノ酸の置換は、バリン(E382V)であり、428位のアミノ酸の置換は、ロイシン(M428L)である。

【0025】

いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、382位と428位のアミノ酸に置換を持つグリコシル化されていないヒトFcドメインを有し、上方CH2領域に少なくとも1つのさらなる置換をもまた有する。

【0026】

1つ以上の特定のヒトFcRポリペプチドに特異的に結合することができるグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドが、複数の実施形態に含まれる。いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインは、FcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、またはFcRIのうちの1つ以上に結合できるように変異させられている。これらの特定のヒトFcRポリペプチドの1つ以上に対する結合が、グリコシル化されたFc領域を持つ場合に見られる結合の10%以内、20%以内、30%以内、40%以内、50%以内、60%以内、70%以内、80%以内、90%以内、または100%以内(または、これらの中で導くことができる任意の範囲)であること、あるいは、結合が、野生型のグリコシル化されたFcドメインと比較して少なくともまたは多くても50%、60%、70%、80%、90%、または100%(または、これらの中で導くことができる任意の範囲)変化する(増大するまたは減少する)ことが想定される。あるいは、変異したグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドとグリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドとの間での相対的な結合能力は、X倍の差(増大または減少)として表わすことができる。例えば、少なくとも、または多くとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差、あるいはこれらから導くことができる任意の範囲であり得る。

【0027】

いくつかの実施形態においては、変異したグリコシル化されていないFcドメインを持つポリペプチドは、FcRIポリペプチドに特異的に結合することができる。いくつかの場合には、これは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドによる結合レベルの2倍以内のレベルで結合する。他の実施形態においては、結合レベルは、グリコシル化された野生型Fcドメインの少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍以内である。例えば、特定のFc受容体と、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドまたはグリコシル化された野生型Fcドメインを持つポリペプチドのいずれかについての K_D 値は、本明細書中に記載される実施形態においては、少なくとも2倍または3倍以内である。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、グリコシル化されていない野生型抗体Fcドメインを持つポリペプチドと比較して、pH依存性のFcRn結合において少なくとも2倍の減少を有する。さらなる実施形態においては、

【0028】

いくつかの実施形態においては、本明細書中に記載されるポリペプチドにはリンカーが含まれ得る。さらなる実施形態においては、上記リンカーは結合体化可能なリンカーである。いくつかの実施形態においては、上記ポリペプチドに、抗体に由来するFcドメインが含まれる。これには、抗体に由来する他の領域(例えば、別の結合ドメイン)が含まれる場合がある。特定の実施形態においては、このさらなる結合ドメインはFcR結合ドメインではない。いくつかの実施形態においては、これに、抗体に由来する抗原結合部位またはドメインが含まれ得る。これには、抗体に由来する可変領域全体またはその一部が含まれるであろう。他の実施形態においては、ポリペプチドには、抗体に由来するFcドメ

10

20

30

40

50

インが含まれるが、別の結合ドメインは非 F c R 結合ドメインである。いくつかの実施形態においては、非 F c 結合領域は抗体の抗原結合部位ではないが、細胞表面タンパク質に特異的に結合する。いくつかの場合には、非 F c 結合領域が認識する細胞表面タンパク質は受容体である。いくつかの実施形態においては、細胞表面受容体はチロシンキナーゼである。さらなる実施形態においては、ポリペプチドは複数のチロシンキナーゼ受容体に結合できる非 F c 結合領域を有する。いくつかの実施形態においては、そのような非 F c 結合領域は、V E G F 受容体、P D G F 受容体、E G F R 受容体、E r b B - 2 受容体、E G F 受容体、H G F 受容体、および他の S r c 様チロシンキナーゼ受容体、またはそれらの組み合わせのうちの 1 つ以上に結合することができる。ポリペプチドが、これらの受容体チロシンキナーゼの 1 つ以上を認識する抗原結合領域を有することもまた具体的に想定される。

10

【 0 0 2 9 】

他のポリペプチドとしては、F c R I ポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない F c ドメインと第 2 の結合ドメインを有しているポリペプチドが挙げられる。ここでは、第 2 の結合ドメインは、細胞表面分子に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態においては、第 2 の結合ドメインは、抗体の抗原結合ドメイン（「抗体抗原結合ドメイン」）である。いくつかの場合には、第 2 の結合ドメインは抗体抗原結合ドメインではない。いくつかの実施形態においては、第 2 の結合ドメインは、タンパク質様分子である細胞表面分子に特異的に結合することができる。第 2 の結合ドメインは細胞表面受容体のリガンドである場合があり、またこれは、細胞表面リガンドの受容体である場合もある。

20

【 0 0 3 0 】

複数の実施形態は、本明細書中に開示されるポリペプチドのいずれかをコードする核酸にも関係する。この核酸は単離することができる場合があり、および / または組み換え体である場合もある。これは、単離されたおよび / または組み換え体である核酸セグメントであり得る。いくつかの実施形態においては、核酸は D N A であり、他の実施形態においては、核酸は R N A である。特定の実施形態においては、核酸は D N A セグメントである。他の実施形態においては、核酸は、ヒト F c R ポリペプチドに特異的に結合する、1 つ以上の置換を持つ F c 結合ドメインを有しているポリペプチドのうちのいずれかを発現することができる発現ベクターである。核酸は、ポリペプチドが生産される方法に応じてグリコシル化される場合も、またグリコシル化されない場合もある、1 つ以上の上記で議論されたポリペプチドをコードし得る。

30

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態においては、ヒト F c R ポリペプチドに特異的に結合することができる F c ドメインを持つポリペプチドをコードする核酸が存在する。上記核酸は、ポリペプチド（特に、ポリペプチドのグリコシル化されていないバージョン）を発現することができる宿主細胞中に配置され得る。宿主細胞は原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。あるいは、宿主細胞は真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞）であり得る。いくつかの実施形態においては、宿主細胞に第 1 の発現ベクターが含まれるが、さらに、これには、第 2 の発現ベクターも含まれる場合がある。いくつかの抗体は複数のポリペプチドからなるので、いくつかの実施形態においては、これらのポリペプチドを発現する宿主細胞が想定される。例えば、いくつかの実施形態においては、免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードする第 2 の発現ベクターを含む宿主細胞が存在する。

40

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態においては、宿主細胞の集団が存在する。この場合、上記集団には、異なる F c ドメインを有しているポリペプチドを発現する複数の宿主細胞が含まれる。任意の 2 つの異なる F c ドメインのアミノ酸配列は、同一性において 2 0 % 未満、1 5 %、1 0 %、5 %、またはそれ未満異なることが想定される。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態においては、本明細書中で記載されるポリペプチド（グリコシル化

50

されていないFc領域を有しているポリペプチド)を作製する方法、およびこれらのポリペプチドを使用する方法が存在する。これらの方法のうちのいずれかが、本明細書中に記載される任意のポリペプチドに関して実施され得る。

【0034】

いくつかの実施形態においては、以下の工程を含む、グリコシル化されていないポリペプチドを調製するための方法が存在する：a) FcRポリペプチドに結合することができるFcドメインを含むグリコシル化されていない抗体を発現することができる宿主細胞を得る工程(ここでは、このFcドメインには、上述した置換、すなわち、298位と299位のアミノ酸での置換、ならびに以下の位置または複数の位置：382位；382位と263位；382位と390位と428位；392位と382位と397位と428位；315位と382位と428位または268位と294位と361位と382位と428位での少なくとも1つの追加の置換が含まれる)；b) 上記宿主細胞を、グリコシル化されていない抗体の発現を促進する条件下にて培養物中でインキュベーションする工程；ならびに、c) 上記宿主細胞から発現された抗体を精製する工程。いくつかの実施形態においては、宿主細胞は原核生物細胞(例えば、細菌細胞)である。さらなる実施形態においては、複数の方法に、上清から発現された抗体を回収する工程が含まれ、これは、精製の前に行われる場合がある。

10

【0035】

いくつかの実施形態においては、複数の方法に、上清から抗体を精製する工程が含まれる。これには、上清に由来する抗体について、濾過、HPLC、陰イオン交換または陽イオン交換、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、アフィニティークロマトグラフィー、またはこれらの組み合わせを行うことが含まれ得る。いくつかの実施形態においては、複数の方法に、IgG Fc領域に結合するブドウ球菌プロテインAを使用するアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。他の精製方法は当業者に周知である。

20

【0036】

いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体は、活性化FcRポリペプチドに特異的に結合することができる。活性化FcRポリペプチドは、1つ以上の免疫細胞を活性化するFcRポリペプチドをいう。活性化ポリペプチドには、FcRI、IIa、IIa、IIb、およびIIcが含まれる。FcRIIbは阻害性FcRポリペプチドである。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体は、もはや、グリコシル化された野生型Fcドメインに匹敵するレベルでは阻害性FcRポリペプチドには結合しない。特異的な実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体は、FcRIポリペプチドに特異的に結合する。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体はFcRIIbポリペプチドに結合する能力が低下しており、この場合、その親和性は、ポリペプチドまたは抗体のグリコシル化された野生型バージョンよりも少なくとも50倍小さい。特定の実施形態においては、グリコシル化されていない抗体は治療用抗体のグリコシル化されていないバージョンであり、これは、疾患または状態の治療あるいは処置に使用される抗体をいう。上記で議論されたものを含む本明細書中で議論される抗体またはポリペプチドのいずれかが、免疫応答を誘導するための方法の実施において使用され得る。治療用抗体の一例はトラスツマブである。

30

40

【0037】

いくつかの実施形態においては、複数の方法に、E. coli細胞である細菌細胞が含まれる。さらなる実施形態においては、Fcドメインは、IgG、IgA、またはIgE Fcドメインである。さらなる実施形態においては、グラム陰性細菌細胞の集団に、複数のグリコシル化されていないFcドメインをコードする複数の核酸が含まれる。いくつかの場合には、複数の核酸はさらに、複数のグリコシル化されていないFcドメインに融合させられた膜分泌シグナルをコードする。膜分泌シグナルはPelBまたはDsbAであり得る。さらに、グリコシル化されていないFcドメインには、ヒンジ、CH2、およびCH3領域が含まれ得る。特定の実施形態においては、グリコシル化されていないポリ

50

ペプチドに、真核生物のFcRドメインが含まれる。いくつかの実施形態においては、表1のポリペプチドのうちの1つに特異的に結合するFcドメインを持つポリペプチドが存在する。特定の実施形態においては、Fcドメインは、ヒトFcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、FcRI、またはC1qに結合する。他の実施形態においては、これは、Fcドメインのグリコシル化された野生型バージョンと比較して、FcRIIbに対して低い結合親和性を有する。特異的な方法が、引用により本明細書中に組み入れられるWO2008/137475に開示されている。

【0038】

他の実施形態には、以下の工程を含む、Fcドメインを有しているグリコシル化されていないポリペプチドの1つ以上の特異的FcRポリペプチドに対するFcの結合を最適化するための方法が含まれる：a) グラム陰性細菌細胞の集団を得る工程であって、この集団の細胞が、それらのペリプラズムの中でFcドメインを含むグリコシル化されていないポリペプチドを発現する工程（ここでは、上記集団は、様々な変異したFcドメインを発現する複数の異なるポリペプチドを発現する）；b) 上記細菌細胞を第1のFcRポリペプチドと、FcRポリペプチドとグリコシル化されていないFcドメインとの間での接触を可能にする条件下で接触させる工程（ここでは、FcRポリペプチドは、FcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、またはFcRIである）；およびc) グリコシル化されていないFcドメインの第1のFcRポリペプチドに対する結合に基づいて少なくとも1つの細菌細胞を選択する工程。上記の実施形態の議論のいずれかをこれらの方法の実施のために適用することができる。

【0039】

本発明の方法および/または組成物の状況において議論される実施形態は、本明細書中に記載される任意の他の方法または組成物に関して利用され得る。したがって、1つの方法または組成物に関する実施形態は、本発明の他の方法および組成物にも同様に適用することができる。

【0040】

本明細書中で使用される場合は、用語「コードする」または「コーディング」は、核酸に関して、当業者が本発明を容易に理解できるようにするために使用される。しかし、これらの用語は、それぞれ「含む」または「含んでいる」と互換的に使用され得る。

【0041】

明細書において本明細書中で使用される場合は、「a」または「an」は、1つ以上を意味する場合がある。特許請求の範囲（単数または複数）において本明細書中で使用される場合は、語句「含んでいる」と組み合わせて使用されていれば、語句「a」または「an」は、1つまたは2つ以上を意味し得る。

【0042】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、代替えのものだけを言うように明白に示されているか、または代替えのものが相互に排他的でない限りは、「および/または」を意味するように使用されるが、上記開示は、代替えのものだけ、および「および/または」をいう定義をサポートする。本明細書中で使用される場合は、「別」は、少なくとも第2のものまたはそれ以上を意味し得る。

【0043】

本明細書全体を通じて、用語「約」は、値が、デバイスの固有の偏差、値を決定するために利用される方法、または実験対象間に存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0044】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な記述から明らかとなるであろう。しかし、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、本発明の趣旨および範囲内での様々な変更と改変が、この詳細な説明から当業者に明

10

20

30

40

50

らかとなるであろうとの理由から、説明のために提供されるにすぎないことが理解されるものとする。

【 0 0 4 5 】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに明らかにするためを含められる。本発明は、本明細書中に提示される特異的な実施形態についての詳細な記載と組み合わせて、これらの図面の1つ以上を参照することによってさらに理解され得る。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

ヒトFcRIIaポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインを含むポリペプチドであって、ここで、該Fcドメインは、298位および299位のアミノ酸でのアミノ酸置換、ならびに以下の位置または複数の位置：382位；382位および263位；382位、390位および428位；392位、382位、397位および428位；315位、382位および428位または268位、294位、361位、382位および428位での少なくとも1つのさらなる置換を含む、ポリペプチド。

10

(項目2)

上記298位のアミノ酸の置換がグリシン(S298G)であり、上記299位のアミノ酸の置換がアラニン(T299A)である、項目1に記載のポリペプチド。

(項目3)

上記さらなる置換が、382位のアミノ酸の置換である、項目1に記載のポリペプチド。

20

(項目4)

上記382位のアミノ酸の置換がバリン(E382V)である、項目3に記載のポリペプチド。

(項目5)

上記さらなる置換が382位および263位のアミノ酸の置換である、項目1に記載のポリペプチド。

(項目6)

上記382位のアミノ酸の置換がバリン(E382V)であり、上記263位のアミノ酸の置換がグルタミン酸(V263E)である、項目5に記載のポリペプチド。

30

(項目7)

上記さらなる置換が382位、390位および428位のアミノ酸の置換である、項目1に記載のポリペプチド。

(項目8)

上記382位のアミノ酸の置換がバリン(E382V)であり、上記390位のアミノ酸の置換がアスパラギン酸(N390D)であり、上記428位のアミノ酸の置換がロイシン(M428L)である、項目7に記載のポリペプチド。

(項目9)

上記さらなる置換が392位、382位、397位および428位のアミノ酸の置換である、項目1に記載のポリペプチド。

40

(項目10)

上記382位のアミノ酸の置換がバリン(E382V)であり、上記392位のアミノ酸の置換がグルタミン酸(K392E)であり、上記397位のアミノ酸の置換がメチオニン(V392M)であり、上記428位のアミノ酸の置換がロイシン(M428L)である、項目9に記載のポリペプチド。

(項目11)

上記さらなる置換が315位、382位および428位のアミノ酸の置換である、項目1に記載のポリペプチド。

(項目12)

50

上記 3 1 5 位のアミノ酸の置換がアスパラギン酸 (N 3 1 5 D) であり、上記 3 8 2 位のアミノ酸の置換がバリン (E 3 8 2 V) であり、上記 4 2 8 位のアミノ酸の置換がロイシン (M 4 2 8 L) である、項目 1 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 3)

上記さらなる置換が 2 6 8 位、2 9 4 位、3 6 1 位、3 8 2 位および 4 2 8 位のアミノ酸の置換である、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 4)

上記 2 6 8 位のアミノ酸の置換がプロリン (H 2 6 8 P) であり、上記 2 9 4 位の置換がリジン (E 2 9 4 K) であり、上記 3 6 1 位のアミノ酸の置換がセリン (N 3 6 1 S) であり、上記 3 8 2 位のアミノ酸の置換がバリン (E 3 8 2 V) であり、上記 4 2 8 位の

10

(項目 1 5)

非 F c R 結合ドメインをさらに含む、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 6)

上記非 F c R 結合ドメインが抗体の抗原結合部位である、項目 1 5 に記載のポリペプチド。

(項目 1 7)

上記非 F c 結合領域が抗体の抗原結合部位ではない、項目 1 6 に記載のポリペプチド。

(項目 1 8)

上記非 F c 結合領域が細胞表面タンパク質に結合する、項目 1 7 に記載のポリペプチド

20

。

(項目 1 9)

上記細胞表面タンパク質が受容体である、項目 1 8 に記載のポリペプチド。

(項目 2 0)

上記受容体がチロシンキナーゼである、項目 1 9 に記載のポリペプチド。

(項目 2 1)

上記非 F c 結合領域が複数のチロシンキナーゼ受容体に結合する、項目 2 0 に記載のポリペプチド。

(項目 2 2)

項目 1 ~ 2 1 に記載のポリペプチドのいずれかをコードする核酸。

30

(項目 2 3)

上記核酸が D N A セグメントである、項目 2 2 に記載の核酸。

(項目 2 4)

上記核酸が発現ベクターである、項目 2 2 に記載の核酸。

(項目 2 5)

項目 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、宿主細胞。

(項目 2 6)

上記細胞が上記核酸を発現する、項目 2 5 に記載の宿主細胞。

(項目 2 7)

項目 2 5 または 2 6 に記載の宿主細胞のインビトロ集団であって、ここで、該集団は、異なる F c ドメインを発現する複数の宿主細胞を含む、インビトロ集団。

40

(項目 2 8)

任意の 2 つの異なる F c ドメインのアミノ酸配列が同一性において 2 0 % 未満異なる、項目 2 7 に記載の宿主細胞集団。

(項目 2 9)

グリコシル化されていないポリペプチドを調製するための方法であって、

a) 項目 2 6 に記載の宿主細胞を得る工程 ;

b) グリコシル化されていない抗体の発現を促進する条件下で、培養物中で該宿主細胞をインキュベーションする工程 ; および

c) 該宿主細胞から、発現された抗体を精製する工程

50

を包含する、方法。

(項目30)

上記宿主細胞が原核生物細胞である、項目29に記載の方法。

(項目31)

標的化された細胞表面ポリペプチドを発現する標的細胞に対して樹状細胞(DC)媒介性の細胞の殺傷を誘導する方法であって、

a) 該標的細胞を、項目1~21のいずれか1項に記載のポリペプチドと接触させる工程；および

b) 該標的細胞を、該標的細胞の殺傷を促進する条件下で樹状細胞に曝す工程

を包含する、方法。

(項目32)

疾患の処置において使用するための、項目1~21のいずれか1項に記載のポリペプチド。

(項目33)

上記疾患が標的細胞に対して樹状細胞(DC)媒介性の細胞の殺傷を誘導することによって処置される疾患である、項目1に記載のポリペプチド。

(項目34)

上記疾患が過剰増殖性障害、例えば、癌治療、関節炎、免疫疾患および炎症性疾患である、項目33に記載のポリペプチド。

(項目35)

疾患、例えば、癌治療、関節炎、免疫疾患および炎症性疾患を処置するための医薬の調製における、項目1~21のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1。精製されたFc断片、野生型FcおよびFc2aタンパク質を示すSDS-PAGEゲル。レーンM：分子量標準；レーン1：野生型Fc；レーン2；Fc2a(S298G/T299A)。

【図2】図2。FcRIIaに対する、グリコシル化されていないFc2a(Fc断片)およびグリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc2a(全長IgG)の親和性を示すELISAアッセイ。

【図3】図3。FcRI、FcRIIaおよびFcRIIbへの結合における、グリコシル化されていないトラスツズマブFcバリエーションの特異性。[注意：各群における1番目のバーはRIであり、2番目はRIIaであり、3番目はRIIbである]。

【図4】図4。FcRIIa(PDB:1FCG)とFcRIIb(2FCB)との間の高い相同性を示しているこれら2つのタンパク質のX線結晶構造のアラインメント。

【図5】図5。トラスツズマブ-Fc5-2aのFc領域を無作為化するErrorPronePCRライブラリーの構築手順。

【図6】図6。FcRIIbよりもFcRIIaに対して高い結合親和性を示す単離されたグリコシル化されていないトラスツズマブFcバリエーションの配列。スフェロプラストを、検出のために、20nMのFcRIIa-GST-Alexa488および100nMのFcRIIb-GSTとともにインキュベーションした。FACS平均値を括弧内に示す。

【図7】図7。野生型のグリコシル化されていないトラスツズマブおよびグリコシル化されていないトラスツズマブFc5-2aと比較して、グリコシル化されていないトラスツズマブFc1001バリエーションの蛍光シグナルを示しているヒストグラム。スフェロプラストを、FACS分析のために、20nMのFcRIIa-GST-Alexa488および100nMのFcRIIb-GSTとともにインキュベーションした。M：平均蛍光強度。

【図8】図8。グリコシル化されたIgG(PDB Code:1FC1)の3D構造上に示されている、単離されたグリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc1001の

10

20

30

40

50

変異点。

【図9】図9。HEK293細胞において産生された、精製されたグリコシル化されていないFc2a、グリコシル化されていないFc1001、グリコシル化されていないFc1003、グリコシル化されていないFc1002およびグリコシル化されていないFc1004を示すSDS-PAGEゲル。レーンM：分子量標準；レーン1：Fc1001；レーン2：Fc1002；レーン3：Fc1004；レーン4：Fc2a；レーン1a：Fc1003。

【図10】図10。FcRIIaおよびFcRIIbに対する、Fcバリエーションのグリコシル化されていないトラスツズマブ形式抗体(AglycoT)のSPRセンサーグラム(sensorgram)。(A)FcRIIa-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc2a、(B)FcRIIb-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc2a、(C)FcRIIa-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc1001、(D)FcRIIb-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc1001、(E)FcRIIa-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc1003、(F)FcRIIb-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc1003、(G)FcRIIa-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc1004、および(H)FcRIIb-GSTへの結合についてのAglycoT-Fc1004の(A~H)SPRセンサーグラム。

【図11】図11。HEK293F細胞から単離され、精製されたFcRIIb-strepを示すSDS-PAGE。レーンM：分子量標準；レーン1：変性なしのFcRIIb-strep；レーン2：100で5分間変性されたFcRIIb-strep。

【図12】図12。二量体FcγRIIb-GST融合物よりも、四量体のFcγRIIb-Strep融合物がヒトIgGに対して高親和性であることを示すELISAアッセイ。

【発明を実施するための形態】

【0047】

代表的実施形態の説明

本発明者らは、これまでに、Fc受容体ポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインを提供することにおける、現在の免疫治療技術に伴ういくつかの重要な問題を克服してきた。操作された特性を持つさらなるFcドメインが開発されている。さらなる実施形態と利点が以下に記載されるが、Fcライブラリーについての情報とスクリーニング方法が提供される。

【0048】

I. ペリプラズム発現

いくつかの実施形態においては、抗体Fcドメインを含むポリペプチドを、グラム陰性細菌のペリプラズム空間内で発現させることができる。さらに、いくつかの態様においては、抗体Fcドメインを、内膜のペリプラズム表面に固定することができる。例えば、Fcドメインは、膜貫通ポリペプチドもしくは膜結合型ポリペプチドに直接融合させることができ、また、膜貫通ポリペプチドもしくは膜結合型ポリペプチドと相互作用する(例えば、タンパク質-タンパク質相互作用を介して)場合もある。そのような技術は、「固定化ペリプラズム発現」または「APEX」と呼ぶことができる。

【0049】

ペリプラズム区画は、グラム陰性細胞の内膜と外膜との間に含まれる(例えば、Oliver, 1996を参照のこと)。ペリプラズム区画は、細胞内区画(sub-cellular compartment)であるので、細胞の増殖および分裂に伴って大きさ、形状、および内容物が変動する。ペプチドグリカンの枠組み内では、ヘテロポリマーはペリプラズムタンパク質およびわずかな水の高密度環境であり、この区画にゲル様の粘稠度をもたらす(Hobotら、1984; van Wielink and Duine、1990)。ペプチドグリカンは、外膜への近さに依存して様々な程度に重合され、至

10

20

30

40

50

近距離では、細胞の形状および浸透圧溶解に対する耐性を与えるムレイン細胞嚢を形成する。

【0050】

外膜 (Nikaido、1996を参照のこと) は、リン脂質、ポーリントタンパク質、および、培地内へ伸長するリポ多糖 (LPS) から構成される。外膜の完全性の分子基盤は、2価の陽イオン (Mg^{2+} および Ca^{2+}) を結合し、互いを静電的に連結して表面上に高次の規則正しい準結晶配向した「瓦屋根」を形成するLPSの能力により備わっている (Labischinskiら、1985)。この膜は、ポーリンを介して、約650Da以下の分子の通過を可能にする非常に厳密な透過性障壁を形成する (Burmanら、1972; Decad and Nikaido、1976)。大量の水で満たされたポーリンチャネルは、単糖および二糖、イオン、ならびにアミノ酸のペリプラズム区画への自由な通過の許容を主に担う (Nikaido and Nakae、1979; Nikaido and Vaara、1985)。分子のペリプラズムへの接近の、そのような厳密な生理的調節により、より大きなリガンド (すなわち、650Daの排除限界より大きいもの) をスクリーニング方法において利用できることは、一見して不可解に見えるかもしれない。しかし、本発明者らは、2000Daよりも大きいリガンドがペリプラズム膜を破壊することなくペリプラズム内に拡散し得ることを示した。このような拡散は、細菌細胞の1つ以上の処理によって支援することができ、これにより、本明細書において以下に記載されるように、外膜をより透過性にすることができる。

【0051】

ペリプラズム空間内でポリペプチド、および特に、抗体を発現させるための方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第7,094,571号、ならびに米国特許公開番号第20030180937号および同第20030219870号 (それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる) を参照のこと。いくつかの場合には、本発明のグラム陰性細菌細胞は、E.coli細胞として定義され得る。さらに、いくつかの態様においては、グラム陰性細菌細胞は、遺伝子操作された細菌細胞 (例えば、E.coliのJude-1株) として定義され得る。

【0052】

II. 外膜の透過処理

いくつかの実施形態においては、複数の方法に、当該分野で周知である細菌の外膜を破壊する、透過処理する、または除去する工程が含まれる。例えば、米国特許第7,094,571号を参照のこと。例えば、細菌細胞をFcRポリペプチドと接触させる前に、細菌細胞の外膜を、高浸透圧条件、物理的ストレス、リゾチーム、EDTA、消化酵素、外膜を破壊する化学物質で、または細菌をファージに感染させることにより、あるいは上記方法の組み合わせにより処理することができる。このように、いくつかの場合には、外膜を、リゾチームとEDTAでの処理により破壊することができる。さらに、特定の実施形態においては、細菌の外膜を完全に取り除くことができる。

【0053】

1つの実施形態においては、1つ以上の標識されたりガンドに対する外膜の透過性を増大させる方法が利用される。これにより、通常なら外膜を通過できない標識されたりガンドのスクリーニングアクセスを利用することが可能になる。しかし、特定のクラスの分子 (例えば、650Daの排除限界よりも大きい疎水性抗生物質) は、膜ポーリンとは無関係にそれ自体が細菌の外膜を通過して拡散することができる (Farmerら、1999)。このプロセスは、そのように行くと膜を実際に透過処理することができる (Jouenne and Junter、1990)。このような機構は、ポリミキシンBノナペプチドを用いてインピボで細胞質膜タンパク質のペリプラズムループを選択的に標識するために採用されている (Wadaら、1999)。また、特定の長鎖リン酸ポリマー (100Pi) も、外膜の正常な分子ふるい活性をまとめて回避するとみられる (Rao and Torriani、1988)。

【0054】

生存性を喪失することなく、または発現されたタンパク質が細胞から放出されることなく、リガンドのペリプラズム内への透過をもたらし条件が同定されているが、本発明は外膜を維持せずに行うことが可能である。本明細書中で示されるように、Fcドメインをペリプラズム空間の中で発現させ、ペリプラズム空間の中の候補の結合性ポリペプチドに対して固定することにより、結合した標識リガンドを検出するために（細胞からの結合性タンパク質（binding protein）の漏出を妨げる障壁としての）外膜を維持する必要がなくなる。結果として、細胞質膜の外（ペリプラズム）面に固定された結合性タンパク質を発現する細胞は、ある程度透過処理された膜を有する細胞またはほぼ完全に外膜が除去された細胞のいずれかにおいて、単に蛍光標識リガンドの溶液とともにインキュベーションすることにより、蛍光標識することができる。

10

【0055】

異なる細菌宿主株の外膜の透過性は、大きく異なり得る。Omp Fの過剰発現が原因である透過性の増大が、ヒストン様タンパク質が存在しないことにより起こり、これにより、Omp Fの翻訳に関する負の調節性mRNAの量の減少が生じることが以前に示されている（Painbeniら、1997）。また、DNA複製および染色体分離も、レプリソームと内膜との密接した接触に依存することが公知であり、内膜自体は複数の箇所を外膜と接触している。ライブラリースクリーニングの用途に好ましい宿主は、プラスミドコピー数を減少させる変異をさらに有するE. coli ABLE C株である。

【0056】

高浸透圧ショックのような処理により標識を有意に改善することができる。カルシウムイオン（Bukauら、1985）、およびさらにはTris緩衝液（Irvinら、1981）を含む多くの作用物質が、外膜の透過性を変化させることは公知である。さらに、ファージ感染が標識化プロセスを刺激する。繊維状ファージの内膜タンパク質pIIIおよび大きな多量体外膜タンパク質pIVの両方によって膜透過性は変わり得（Boekeら、1982）、pIV中の変異が、通常は排除されるマルトデキストリンへの接近を改善することが知られている（Marcianoら、1999）。株、塩、およびファージの賢明な組み合わせを含む本発明の技法を使用して、高度な透過性が達成され得る（Daughertyら、1999）。次に、フローサイトメトリーまたは他の関連する技術を使用して、蛍光標識リガンドに結合している固定されたポリペプチドまたはペリプラズムと関係があるポリペプチドを含む細胞を、標識リガンドに対する親和性を持たない結合性タンパク質を発現する細胞から容易に単離することができる。しかし、いくつかの場合には、細胞の生存性を維持するために、より破壊的ではない技法を使用することが望ましいと考えられる。EDTA処理およびリゾチーム処理もまた、これに関して有用であり得る。

20

30

【0057】

III. 抗体結合性ポリペプチド

特定の態様においては、Fc受容体のような抗体結合性ポリペプチドに対して特異的親和性を持つ抗体Fcドメインを同定するための方法が存在する。いくつかの実施形態においては、Fcドメインは、1つ以上の特異的Fc受容体に結合するように操作される。さらに、またはあるいは、Fcドメインは、それが1つ以上の特異的Fc受容体に特異的に結合しないように操作される場合もある。

40

【0058】

特定の実施形態においては、天然のまたは野生型タンパク質と比較して修飾されたタンパク質様分子を含む組成物が存在する。

【0059】

いくつかの実施形態においては、タンパク質様化合物は、アミノ酸残基が欠失している。他の実施形態においては、タンパク質様化合物のアミノ酸残基は置換されており、なおさらなる実施形態においては、タンパク質様化合物中のアミノ酸残基の欠失と置換の両方が作製されている。さらに、タンパク質様化合物には、アミノ酸分子を含有する2つ以上のポリペプチド物質が含まれ得る。本明細書中で使用される場合は、「タンパク質様分子

50

「タンパク質様組成物」、「タンパク質様化合物」、「タンパク質様鎖」、または「タンパク質様物質」は、一般的には、1つの遺伝子から翻訳された約200を超えるアミノ酸もしくは全長の内因性の配列のタンパク質；100以上のアミノ酸のポリペプチド；および/または3～100アミノ酸のペプチドをいうが、これらに限定されない。上記全ての「タンパク質様」の用語は、本明細書中では互換的に使用され得る。しかし、特定のタイプのタンパク質様化合物（例えば、ポリペプチド）に限定される実施形態が存在し得ることが具体的に想定される。さらに、これらの用語は、融合タンパク質またはタンパク質結合体にも同様に適用され得る。タンパク質には、2つ以上のポリペプチドが含まれる場合がある。例えば、IgG抗体は、2つの重鎖ポリペプチドと2つの軽鎖ポリペプチドを有し、これらは、ジスルフィド結合を通じて互いに連結される。

10

【0060】

本明細書中で使用される場合は、「異なるFcドメイン」は、わずか1つのアミノ酸が別のFcとは異なるドメインと定義され得る。異なる抗体Fcドメインまたは複数の抗体をコードする核酸のライブラリーを作製するための方法は当該分野で周知であり、本明細書中で例示される。例えば、いくつかの場合には、Fcドメインを、本明細書中で例示されるerror prone PCRにより増幅させることができる。さらに、特定の場合には、複数の抗体Fcドメインに、無作為化された（1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上の）アミノ酸の1つのストレッチが含まれ得る。特定の場合には、特異的な変異が、Fcドメインの中に操作され得る。例えば、いくつかの態様においては、抗体Fcドメインにおいて通常グリコシル化される残基を変異させることができる。さらに、特定の態様においては、通常グリコシル化される残基（または隣接する残基）を、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸の挿入のための部位として使用することができる。アミノ酸の挿入は、IgG1 Fc（配列番号2）の384位のアミノ酸に対応している残基に、またはそれに隣接するように作製することができる。なおさらなる場合には、本発明のグラム陰性細菌の集団は、少なくとも約 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、またはそれ以上の異なる抗体Fcドメインを含むと定義され得る。いくつかの特異的な場合には、グラム陰性細菌細胞の集団は、以下の工程を含む方法により産生され得る：（a）複数の異なる抗体Fcドメインをコードする複数の核酸配列を調製する工程；および（b）グラム陰性細菌の集団を上記核酸で形質転換する工程（ここでは、上記グラム陰性細菌には、ペリプラズムの中で発現された複数の抗体Fcドメインが含まれる）。

20

30

【0061】

様々な抗体結合ドメイン（例えば、FcRポリペプチド）が当該分野で公知であり、本発明の方法および組成物において使用され得る。例えば、いくつかの態様においては、FcRは、特定のタイプまたはサブタイプのIg（例えば、IgA、IgM、IgE、またはIgG（例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgG4））に対して特異性を有し得る。したがって、いくつかの実施形態においては、抗体結合ドメインは、IgG結合ドメインとして定義され得る。FcRポリペプチドには、真核生物の、原核生物の、または合成のFcRドメインが含まれ得る。例えば、抗体Fc結合ドメインは、哺乳動物の、細菌の、または合成の結合ドメインと定義され得る。本発明において使用されるいくつかのFc結合ドメインとしては、表1のポリペプチドのうちの1つに由来する結合ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Fc結合ポリペプチドは、FCGR2A、FCGR2B、FCGR2C、FCGR3A、FCGR3B、FCGR1A、Fcgr1、FCGR2、FCGR2、Fcgr2、Fcgr2、FCGR3、FCGR3、Fcgr3、FCGR3、Fcgr3、FCGRT、mrp4、spa、またはspg遺伝子によりコードされ得る。好ましくは、本発明にしたがって使用されるFcRポリペプチドは、ヒトFcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、FcRI、またはC1q由来のFc結合領域であり得る。

40

50

【 0 0 6 2 】

本発明のなおさらなる実施形態においては、F c ポリペプチドがグラム陰性細菌の内膜に固定され得る。グラム陰性細菌の内膜へのポリペプチドの固定のための方法および組成物は、これまでに記載されている（米国特許第 7, 0 9 4, 5 7 1 号および米国特許公開番号 2 0 0 5 0 2 6 0 7 3 6）。したがって、いくつかの態様においては、F c ドメインは、細菌の内膜と会合するかまたは細菌の内膜の中に組み込まれるポリペプチドに融合させることができる。そのような融合タンパク質には、F c ドメインとのN末端またはC末端融合が含まれ得、いくつかの場合には、膜固定性ポリペプチドとF c ドメインとの間にさらに別のリンカーアミノ酸が含まれ得る。特定の特異的な場合には、膜固定性ポリペプチドは、E . c o l i N l p A 遺伝子によりコードされる最初の 6 個のアミノ酸、E . c o l i 内膜タンパク質由来の 1 つ以上の膜貫通ヘリックス、線維性ファージの遺伝子 I I I タンパク質またはその断片、あるいは内膜リポタンパク質またはその断片であり得る。したがって、一例として、膜固定性ポリペプチドは、以下のような内膜リポタンパク質またはその断片であり得る：A r a H、M g l C、M a l F、M a l G、M a l C、M a l D、R b s C、R b s C、A r t M、A r t Q、G l n P、P r o W、H i s M、H i s Q、L i v H、L i v M、L i v A、L i v E、D p p B、D p p C、O p p B、A m i C、A m i D、B t u C、T h u D、F e c C、F e c D、F e c R、F e p D、N i k B、N i k C、C y s T、C y s W、U g p A、U g p E、P s t A、P s t C、P o t B、P o t C、P o t H、P o d、M o d B、N o s Y、P h n M、L a c Y、S e c Y、T o l C、D s b、B、D s b D、T o u B、T a t C、C h e Y、T r a B、E x b D、E x b B、またはA a s。

【 0 0 6 3 】

当業者は、F c R とのそれらの相互作用（結合）に基づいて細胞を選択するための方法が当該分野で周知であることを理解するであろう。例えば、F c R が、カラムまたはビーズ（例えば、磁気ビーズ）上に固定化され得、F c R に対する細菌細胞の結合が、ビーズ（例えば、磁気による分離）またはカラムを繰り返し洗浄することにより分離される。さらに、いくつかの態様においては、標的リガンドが、例えば、発蛍光団、放射性同位体、または酵素で標識され得る。したがって、いくつかの場合には、細菌細胞は、結合したF c R 上の標識を検出することにより選択され得る。例えば、発蛍光団が、蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用して細胞を選択するために使用され得る。さらに、いくつかの態様においては、細菌細胞は、2 つ以上のF c R ポリペプチドの結合、またはその結合が存在しないことに基づいて選択され得る。例えば、2 つのF c R ポリペプチドに結合する抗体を提示する細菌が選択され得る。ここでは、各F c R は、細菌を逐次的に選択するため使用される。反対に、特定の態様においては、1 つのF c R（例えば、第 1 の標識を含むF c R）に結合するが、第 2 のF c R（例えば、第 2 の標識を含むF c R）には結合しない抗体F c ドメインを提示する細菌が選択され得る。上記方法は、例えば、特異的F c R に結合するが、第 2 の特異的F c R には結合しない抗体F c ドメインを同定するために使用することができる。

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態においては、少なくとも 1 つのF c ポリペプチドタンパク質様分子の大きさとして、以下を挙げることができるが、これらに限定されない：約または少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、もしくはそれより多いアミノ酸分子残基、あるいはその中から導くことができる任意の範囲。化合物には、配列番号 1（ヒト I g G F c ポリペプチド）または配列番号 4 ~ 9 に由来する、上記数の連続するアミノ酸が含まれ得、これらは、配列番号 2 または配列番号 4 ~ 9 のいずれかに対し

て同一性または相同性（％）を有しているとしてさらに条件をつけることができる（以下で議論される）。配列番号 2 に関する実施形態が、本明細書中に記載される任意の他のアミノ酸配列に関しても利用され得ること、および適切である場合にはその逆も想定される。

【0065】

本明細書中で使用される場合は、「アミノ分子」は、任意のアミノ酸、当業者に公知である任意のアミノ酸誘導体またはアミノ酸模倣物をいう。特定の実施形態においては、タンパク質様分子の残基は連続しており、アミノ分子の残基の配列の間に割り込んでいる非アミノ分子は存在しない。他の実施形態においては、上記配列に、1 つ以上の非アミノ分子部分が含まれ得る。特定の実施形態においては、タンパク質様分子の残基の配列の間に、1 つ以上の非アミノ分子部分が割り込んでいる場合がある。

10

【0066】

A. 修飾されたタンパク質およびポリペプチド

複数の実施形態は、修飾されたタンパク質およびポリペプチド、特に、修飾されていないバージョンに匹敵する少なくとも 1 つの機能的活性を示す修飾されたタンパク質またはポリペプチドに関係するが、上記修飾されたタンパク質またはポリペプチドは、なおも、修飾されていないバージョンを上回るさらなる利点（例えば、ADCC を誘発すること、生産がより容易であり、より安価であること、誘発する副作用が少ないこと、および／またはより優れたもしくはより長い効力または生体利用性を有していること）を持つ。したがって、本出願が「修飾されたタンパク質」または「修飾されたポリペプチド」の機能あるいは活性について言及する場合には、当業者は、これに、例えば、1）未修飾のタンパク質もしくはポリペプチドと少なくとも 1 つの同じ活性を行うか、または少なくとも 1 つの同じ特異性を有するが、異なるレベルの別の活性または特異性を有し得る；そして、2）未修飾のタンパク質またはポリペプチドを上回るさらなる利点を持つタンパク質あるいはポリペプチドが含まれることを理解するであろう。活性の決定は、（特に、タンパク質の活性に関する）当業者が良く知っているアッセイを使用して達成され得、これには、比較目的のための、例えば、修飾されたもしくは未修飾のタンパク質またはポリペプチドのいずれかの未改変のならびに／あるいは組み換え体バージョンの使用が含まれ得る。「修飾されたタンパク質」と関係がある複数の実施形態は、「修飾されたポリペプチド」に関して実行することができる場合があり、そしてその逆もあり得ることが具体的に想定される。本明細書中で議論される修飾されたタンパク質およびポリペプチドに加えて、複数の実施形態には、WO 2008 / 137475（引用により本明細書中に具体的に組み入れられる）に記載されているドメイン、ポリペプチド、およびタンパク質が含まれ得る。

20

30

【0067】

修飾されたタンパク質は、アミノ酸の欠失および／または置換を持つ場合がある。したがって、欠失を持つタンパク質、置換を持つタンパク質、および欠失と置換を持つタンパク質は、修飾されたタンパク質である。いくつかの実施形態においては、これらの修飾されたタンパク質にはさらに、例えば、融合タンパク質またはリンカーを持つタンパク質のように、アミノ酸の挿入または付加が含まれる場合がある。「修飾された欠失タンパク質」は、未改変のタンパク質の 1 つ以上の残基を欠くが、未改変のタンパク質の特異性および／または活性を持つ。「修飾された欠失タンパク質」はまた、低下した免疫原性または抗原性を有し得る。修飾された欠失タンパク質の一例は、少なくとも 1 つの抗原性領域（すなわち、特定の生物（例えば、修飾されたタンパク質が投与され得る生物のタイプ）において抗原性であると決定されたタンパク質の 1 つの領域）に由来するアミノ酸残基が欠失しているタンパク質である。

40

【0068】

置換（substitutional）バリエーションまたは置き換え（replacement）バリエーションは、典型的にはタンパク質内の 1 つ以上の部位での、1 つのアミノ酸の別のアミノ酸への交換を含み、ポリペプチドの 1 つ以上の特性（特に、そのエフェクター機能および／または生体利用性）を調節するように設計され得る。置換は保存的である

50

、すなわち1つのアミノ酸が類似する形状および電荷を持つもので置き換えられている場合も、またそうではない場合もある。保存的置換は当該分野で周知であり、これには例えば、以下の変化が含まれる：アラニンからセリンへ；アルギニンからリジンへ；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへ；アスパラギン酸からグルタミン酸へ；システインからセリンへ；グルタミンからアスパラギンへ；グルタミン酸からアスパラギン酸へ；グリシンからプロリンへ；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへ；イソロイシンからロイシンまたはバリンへ；ロイシンからバリンまたはイソロイシンへ；リジンからアルギニンへ；メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへ；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニンへ；セリンからスレオニンへ；スレオニンからセリンへ；トリプトファンからチロシンへ；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへ；およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへ。

10

【0069】

欠失または置換に加えて、修飾されたタンパク質は残基の挿入を持つ場合があり、これには典型的には、ポリペプチドの中の少なくとも1つの残基の付加が含まれる。これには、標的化ペプチドもしくはポリペプチド、または単に1つの残基の挿入が含まれ得る。融合タンパク質と呼ばれる末端付加は以下で議論される。

【0070】

用語「生物学的に機能的に等価」は、当該分野で十分に理解されており、本明細書中でさらに詳細に定義される。したがって、天然のポリペプチドのアミノ酸に対して同一または機能的に等価であるアミノ酸の約70%～約80%、または約81%～約90%、さら

20

【0071】

アミノ酸配列および核酸配列に、さらなる残基（例えば、さらなるN末端アミノ酸もしくはC末端アミノ酸、または5'配列もしくは3'配列）が含まれる場合があり、それでもなお、本質的には、その配列が、タンパク質発現が関係する生物学的タンパク質活性の維持を含む上記に示された基準を満たす限りは、本明細書中で開示される配列のうちの1つの中に示されるものであることも、理解されるであろう。末端配列の付加は、特に、例えば、コード領域の5'部分もしくは3'部分のいずれかに隣接している様々な非コード

30

【0072】

以下は、等価であるか、またはなおさらには改良された第2世代の分子を作製するための、タンパク質のアミノ酸の変化に基づく議論である。例えば、特定のアミノ酸を、構造（例えば、基質分子に対する結合部位）との相互作用による結合能力の感知できるほどの喪失を伴って、または伴わずに、タンパク質構造中の他のアミノ酸で置換することができる。そのタンパク質の生物学的機能的活性を定義するものが、タンパク質の相互作用能力および性質であるので、特定のアミノ酸置換をタンパク質配列中、およびその根底にあるDNAコード配列中に作製することができ、それでもなお、類似する特性を持つタンパク質が生じる。したがって、以下で議論されるように、それらの生物学的有用性または活性の感知できるほどの喪失を伴わない様々な変化を、遺伝子のDNA配列中に作製することができるが、本発明者らにより想定される。タンパク質様分子は、以下の「相同性の基準」のうちの1つが満たされる場合には、第2のタンパク質様分子に対して「相同性」を有するか、または「相同である」と考えられる：1) タンパク質様分子の少なくとも30%が第2のタンパク質様分子と同じ位置に配列同一性を有する；2) 第2のタンパク質様分子と同じ位置に、ある程度の配列同一性が存在し、同一ではない残基では、本明細書中に記載される場合には、それらのうちの少なくとも30%が第2のタンパク質様分子と保存的に異なる；または、3) タンパク質様分子の少なくとも30%が第2のタンパク質様分子と配列同一性を有するが、同一である残基の間に同一ではない残基のギャップが存

40

50

在する可能性がある。本明細書中で使用される場合は、用語「相同」は、分子全体ではなくタンパク質様分子の1つの領域にも同様に適用することができる。用語「相同性」または「相同」が数により定性化される場合（例えば、「50%の相同性」または「50%相同」）、1）、2）、および3）に関する相同性の基準が、「少なくとも30%」から「少なくとも50%」までで調節される。したがって、2つのタンパク質様分子またはタンパク質様分子の複数の部分の間に、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上の相同性が存在し得ることが想定される。

【0073】

あるいは、修飾されたポリペプチドは、未修飾のポリペプチドに対して、または配列番号1もしくは配列番号4～9のいずれかを含む本明細書中に開示される任意のポリペプチド配列に対して、特定の割合（%）の同一性を有するとして特性決定することができる。同一性の割合（%）は、2つのタンパク質様分子またはタンパク質様分子の複数の部分の間で、多くとも、または少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（あるいはそれらから導くことができる任意の範囲）であり得る。上記で議論される同一性の割合（%）が、ポリペプチドの未修飾の領域と比較したポリペプチドの特定の領域に関係し得ることが想定される。例えば、ポリペプチドには、修飾されたFcドメインまたは変異体Fcドメインが含まれ得る。これらは、同じ種に由来する未修飾のFcドメインまたは変異体Fcドメインに対する、修飾されたFcドメインまたは変異体Fcドメインのアミノ酸配列の同一性に基いて特性決定することができる。例えば、未修飾のFcドメインに対して90%の同一性を有していると特性決定された修飾されたヒトFcドメインまたは変異体ヒトFcドメインは、そのドメイン中のアミノ酸の90%が未修飾のヒトFcドメイン（配列番号1）中のアミノ酸と同一であることを意味する。

【0074】

そのような変化を作製することにおいて、アミノ酸の疎水性親水性指数が考慮される場合がある。タンパク質に対して相互作用性の生物学的機能を付与する疎水性親水性アミノ酸指数の重要性は当該分野で一般的に理解されている（Kyte & Doolittle, 1982）。アミノ酸の相対的な疎水性親水性特性が得られるタンパク質の二次構造に寄与し、これは次いで、そのタンパク質の他の分子（例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を決定すると認められている。

【0075】

類似するアミノ酸の置換が親水性に基いて有効となり得ることもまた当該分野で理解されている。引用により本明細書中に組み入れられる米国特許第4,554,101号には、その隣接するアミノ酸の親水性により支配されるタンパク質の最大の局所平均親水性（local average hydrophilicity）がタンパク質の生物学的特性と関係していることが記載されている。米国特許第4,554,101号に詳細に記載されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）。

【0076】

アミノ酸を類似する親水性値を有している別のアミノ酸で置換することができ、なおも生物学的に等価であり免疫学的に等価なタンパク質が生じることが理解される。このような変化においては、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内にあるアミノ酸の置換が特に好ましく、±0.5以内であるアミノ酸の置換がなおさらに特に好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

上記で概説されたように、アミノ酸置換は、一般的には、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性（例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、大きさなど）に基づく。様々な上記特徴を考慮する例示的な置換は当業者に周知であり、これには、アルギニンおよびリジン；グルタミンおよびアスパラギン；セリンおよびスレオニン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；ならびに、バリン、ロイシンおよびイソロイシンが含まれる。

【 0 0 7 8 】

それに対してFcドメインが結合する様々なFc受容体が当該分野で周知であり、受容体のいくつかの例が表1において以下に列挙される。

【 0 0 7 9 】

10

【表1 - 1】

表 1: 選択されたFcRポリペプチド

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fcγ RII-a (CD32)	FCGR2A	低親和性免疫 グロブリンγFc 領域受容体II-a 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	317	(Stuart <i>et al.</i> , 1987)
Fcγ RII-a	FCGR2A	低親和性免疫 グロブリンγFc 領域受容体II-a 前駆体	<i>Pan troglodytes</i> (チンパンジー)	316	
Fcγ RII-b	FCGR2B	低親和性免疫 グロブリンγFc 領域受容体II-b 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	310	(Stuart <i>et al.</i> , 1989)
Fcγ RII-c	FCGR2C	低親和性免疫 グロブリンγFc 領域受容体II-c 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	323	(Stuart <i>et al.</i> , 1989)
Fcγ RIIIa	FCGR3A	低親和性免疫 グロブリンγFc 領域受容体III-A 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	254	(Ravetch and Perussia, 1989)
Fcγ RIIIb	FCGR3B	低親和性免疫 グロブリンγFc 領域受容体III-B 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	233	(Ravetch and Perussia, 1989)

20

30

40

【 0 0 8 0 】

【表 1 - 2】

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc γ RI (CD64)	FCGR1A	高親和性免疫 グロブリン γ Fc 受容体 I 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	374	(Allen and Seed, 1988)
Fc γ RI	Fcgr1	高親和性免疫 グロブリン γ Fc 受容体 I 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	404	(Sears <i>et al.</i> , 1990)
Fc γ RII	FCGR2	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Bos taurus</i> (ウシ)	296	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)
Fc γ RII	FCGR2	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Cavia porcellus</i> (モルモット)	341	(Tominaga <i>et al.</i> , 1990)
Fc γ RII	Fcgr2	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	330	(Ravetch <i>et al.</i> , 1986)
Fc γ RII	Fcgr2	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	285	(Bocek and Pecht, 1993)
Fc γ RIII	FCGR3	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Bos taurus</i> (ウシ)	250	(Collins <i>et al.</i> , 1997)
Fc γ RIII	FCGR3	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Macaca fascicularis</i> (カニクイザル) (マカクザル)	254	
Fc γ RIII	Fcgr3	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	261	(Ravetch <i>et al.</i> , 1986)

【表 1 - 3】

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc γ RIII	FCGR3	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Sus scrofa</i> (ブタ)	257	(Halloran <i>et al.</i> , 1994)
Fc γ RIII	Fcgr3	低親和性免疫 グロブリン γ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	267	(Zeger <i>et al.</i> , 1990)
FcRn	FCGRT	IgG受容体トランス ポーター FcRn ラージサブユニット p51 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	365	
FcRn	FCGRT	IgG受容体トランス ポーター FcRn ラージサブユニット p51 前駆体	<i>Macaca fascicularis</i> (カニクイザル) (マカクザル)	365	
FcRn	Fcgrt	IgG受容体トランス ポーター FcRn ラージサブユニット p51 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	365	(Ahouse <i>et al.</i> , 1993)
FcRn	Fcgrt	IgG受容体トランス ポーター FcRn ラージサブユニット p51 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	366	(Simister and Mostov, 1989)
MRP タンパク質	mrp4	フィブリノーゲン結合 性タンパク質前駆体 およびIg結合性 タンパク質前駆体	<i>Streptococcus pyogenes</i>	388	(Stenberg <i>et al.</i> , 1992)
プロテイン B		cAMP 因子	<i>Streptococcus agalactiae</i>	226	(Ruhlmann <i>et al.</i> , 1988)
プロテイン A	spa	免疫グロブリンG 結合性プロテインA 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8325株)	516	(Uhlen <i>et al.</i> , 1984)
プロテイン A	spa	免疫グロブリンG 結合性プロテインA 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i>	508	(Shuttleworth <i>et al.</i> , 1987)

【表 1 - 4】

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
プロテイン A	spa	免疫グロブリンG 結合性プロテインA 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50 株 / ATCC 700699)	450	(Kuroda <i>et al.</i> , 2001)
プロテイン A	spa	免疫グロブリンG 結合性プロテインA 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (N315 株)	450	(Kuroda <i>et al.</i> , 2001)
プロテイン G	spg	免疫グロブリンG 結合性プロテインG 前駆体	<i>Streptococcus</i> G群連鎖球菌	448	(Fahnestock <i>et al.</i> , 1986)
プロテイン G	spg	免疫グロブリンG 結合性プロテインG 前駆体	<i>Streptococcus</i> G群連鎖球菌	593	(Olsson <i>et al.</i> , 1987)
プロテイン H		免疫グロブリンG 結合性プロテインH 前駆体	<i>Streptococcus pyogenes</i> 血清型 M1	376	(Gomi <i>et al.</i> , 1990)
プロテイン sbi	sbi	免疫グロブリンG 結合性プロテイン sbi 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8325-4 株)	436	(Zhang <i>et al.</i> , 1998)
アレルゲン Asp fl 1		アレルゲン Asp fl 1 はヒトにおいてアレ ルギー反応を引き 起こす。IgEとIgG に結合する。	<i>Aspergillus flavus</i>	32	
アレルゲン Asp fl 2		アレルゲン Asp fl 2 はヒトにおいてアレ ルギー反応を引き 起こす。IgEとIgG に結合する。	<i>Aspergillus flavus</i>	20	
アレルゲン Asp fl 3		アレルゲン Asp fl 3 はヒトにおいてアレ ルギー反応を引き 起こす。IgEとIgG に結合する。	<i>Aspergillus flavus</i>	32	
Fc ε RI		肥満細胞、好酸球、 および好塩基球上 に提示されるIgE 受容体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		

【表 1 - 5】

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc α RI (CD86)		マクロファージ上に 提示されるIgA (IgA1, IgA2) 受容体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		
Clq	C1QA NP_057075.1 , C1QB NP_000482.3 , C1QC NP_758957.1	Clqは、6つの A鎖、6つのB鎖、 および6つのC鎖 からなる抗体Fc に結合する多量 体複合体である。	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		

10

【0084】

上記で議論されたように、ポリペプチドには、FcRポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインが含まれる場合がある。いくつかの態様においては、上記グリコシル化されていないFcドメインは、生理学的条件下でFcRポリペプチドに対して特異的親和性を有しているとしてさらに定義され得る。例えば、Fcドメインは、生理学的条件下で約 10^{-6} M ~ 約 10^{-9} Mの間の平衡解離定数を有し得る。いくつかの態様においてはさらに、グリコシル化されていないFcドメインは、野生型配列（例えば、ヒトの野生型配列）と比較して1つ以上のアミノ酸置換または挿入を含むと定義することができる。

20

【0085】

そのようなポリペプチドを調製する手段としては、引用により本明細書中に組み入れられるWO2008/137475において議論されているものが挙げられる。あるいは、例えば、既知のFcバックグラウンドの中に選択されたアミノ酸置換または挿入を導入することにより、遺伝子操作技術によって直接そのようなポリペプチドを調製することもできる。この場合、上記挿入または置換により、上記で議論されるように、グリコシル化されていないFc領域に対する改善されたFcR結合能力がもたらされる。

30

【0086】

いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインに、FcR（例えば、ヒトFcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、FcRI、またはClq）に対する特異的結合親和性が含まれる。したがって、いくつかの態様においては、本発明のグリコシル化されていないFcドメインは、FcRIaに対して特異的親和性を持つFcドメインと定義される。さらに、そのようなFcドメインは、生理学的条件下で約 10^{-6} M ~ 約 10^{-9} MのFcRIa結合に関する平衡解離定数を有していると定義され得る。

40

【0087】

B. 異種領域を持つ修飾された抗体およびタンパク質様化合物

複数の実施形態が、2つ以上の自然界に存在しているかまたは天然のポリペプチドあるいはタンパク質に由来するアミノ酸配列を含むことができるFcポリペプチドタンパク質様化合物に関係する。上記で議論された実施形態は、このセクションにも適用されると想定され、その逆も想定される。例えば、修飾された抗体は、抗原結合ドメインを持つ修飾されたFcドメインを含む抗体である。さらに、抗体は、2つの異なる抗原結合領域（例えば、2つの重鎖のそれぞれの上にある異なる領域）を有し得る。あるいは、またはさらに、いくつかの実施形態においては、複数の異種ペプチドおよび/またはポリペプチド（「異種」は、それらが同じポリペプチドには由来しないことを意味している）を含むポリ

50

ペプチドが存在する。タンパク質様化合物または分子は、例えば、抗体由来ではないタンパク質結合領域を持つ修飾されたFcドメインを含み得る。いくつかの実施形態においては、細胞表面受容体に結合するタンパク質結合領域を持つ修飾されたFcドメインを含むポリペプチドが存在する。複数の機能的ドメインを含むこれらのタンパク質様分子は、互いに化学的に結合体化した2つ以上のドメインである場合があり、また、これは、同じ核酸分子によりコードされる2つ以上のポリペプチドの融合タンパク質である場合もある。タンパク質またはポリペプチドが、2つ以上の異種ポリペプチド全体あるいはそれらの一部を含み得ると想定される。

【0088】

したがって、マルチポリペプチドタンパク質様化合物は、第1のポリペプチド全体またはその一部と、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、第4のポリペプチド、第5のポリペプチド、第6のポリペプチド、第7のポリペプチド、第8のポリペプチド、第9のポリペプチド、第10のポリペプチド、またはさらなるポリペプチドの全体またはその一部から構成され得る。

【0089】

抗体の抗原結合ドメインまたは領域とグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドあるいはタンパク質（抗体を含む）は、以下の標的のリストに属しているタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフ、および/またはエピトープを含むがこれらに限定されない任意の抗原あるいはエピトープに対して使用することができる：17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレッシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、-1-抗トリプシン、-V/-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、Bリンパ球刺激因子(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl1、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3オステオゲニン、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、BMP-6 Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPr、BMPr-IA(ALK-3)、BMPr-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPr-II(BRK-3)、BMPs、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原(CEA)、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPi、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/ZIP、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD

10

20

30

40

50

27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、Clostridium botulinum毒素、Clostridium perfringens毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩壊促進因子、des(1-3)-IGF-I (脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクトリン、ET-1、第IIa因子、第VII因子、第VIIIC因子、第IX因子、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルキン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-1、GFR-2、GFR-3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIa (GPIIb/IIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-capまたはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV) gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、HepB gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量の黒色腫関連抗原 (HMW-MM)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心筋ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン (INF)-、INF-、INF-、インヒピン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様成長因子1、インテグリン 2、インテグリン 3、インテグリン 4、インテグリン 4/1、インテグリン 4/7、インテグリン 5 (V)、インテグリン 5/1、インテグリン 5/3、インテグリン 6、インテグリン 1、インテグリン 2、インターフェロン、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カ

10

20

30

40

50

リクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン
 15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、K
 C、KDR、ケラチノサイト成長因子(KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LA
 P(TGF-1)、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LBP、LDGF、
 LECT2、Lefty、Lewis-Y抗原、Lewis-Y関連抗原、LFA-1、
 LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リボタンパク質、LIX、LKN、Lptn
 、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性物質、黄
 体形成ホルモン、リンホトキシン 受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP
 2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer
 、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC(HLA-D 10
 R)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-、MK、MMAC1、MMP、MMP-
 1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP
 -15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9
 、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン(Muc1)、MUC18、ミュー管抑
 制因子(Muellerian-inhibiting substance)、Mug、
 MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-カドヘリン、NCA90、NCAM、NC
 AM、ネブリリシン、ニュートロフィン-3、ニュートロフィン-4、またはニュートロ
 フィン-6、ニュールツリン、神経成長因子(NGF)、NGFR、NGF-、nNO
 S、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OP
 N、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモ 20
 ン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、P
 DGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI
 2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ(PLAP)、PIG
 F、PLP、PP14、プロインスリン、プロリラキシン、プロテインC、PS、PSA
 、PSCA、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN
 、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラ
 キシンB鎖、レニン、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)F、RSV Fgp、Ret、リ
 ウマチ因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、
 SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SL
 AM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、ST 30
 EAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72(腫瘍関連糖タンパク質
 -72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体(例えば、T細胞受容体 /)、Td
 T、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、精巢性PLAP様
 アルカリホスファターゼ(testicular PLAP-like alkaline
 phosphatase)、TfR、TGF、TGF-、TGF-、TGF-
 (Pan特異的)、TGF-RI(ALK-5)、TGF-RII、TGF-
 RIIb、TGF-RIII、TGF-1、TGF-2、TGF-3、TG
 F-4、TGF-5、トロニン、胸線Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、T
 IMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpos、TMPRSS2、TNF、TNF
 -、TNF-、TNF-2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNF 40
 RSF10A(TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B(TRA
 IL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRS
 F10C(TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D(T
 R
 AIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A(RANK ODF R
 、TRANCE R)、TNFRSF11B(OPG OCIF、TR1)、TNFRS
 F12(TWEAK R FN14)、TNFRSF13B(TACI)、TNFRSF
 13C(BAFF R)、TNFRSF14(HVEM ATAR、HveA、LIGH
 T R、TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF17(50

BCMA)、TNFRSF18(GITR AITR)、TNFRSF19(TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A(TNFR I CD120a、p55-60)、TNFRSF1B(TNFR I I CD120 b、p75-80)、TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3(LTbR TNFR I I I、TNFC R)、TNFRSF4(OX40 ACT35、TXGP 1 R)、TNFRSF5(CD40 p50)、TNFRSF6(Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B(DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7(CD27)、TNFRSF8(CD30)、TNFRSF9(4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25(DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11(TRAN CE/RANKリガンドODF、OPGリガンド)、TNFSF12(TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITRリガンドAITRリガンド、TL6)、TNFSF1A(TNF-aコネクチン、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B(TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC、p33)、TNFSF4(OX40リガンドgp34、TXGP1)、TNFSF5(CD40リガンドCD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6(FasリガンドApo-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7(CD27リガンドCD70)、TNFSF8(CD30リガンドCD153)、TNFSF9(4-1BBリガンドCD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAN CE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、Lewis Y関連炭水化物を発現する腫瘍関連抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-カドヘリン、VE-カドヘリン-2、VEFGF-1(flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(fit-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、ならびに、ホルモンおよび成長因子の受容体。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドまたはタンパク質は、1つ以上の細胞表面腫瘍抗原に特異的な抗原結合ドメインを有する。複数の方法および組成物が、ADCCのために腫瘍細胞を標的化するために利用され得る。

【0090】

FcドメインはFcRに結合することができる。しかし、Fcドメインを含むポリペプチド上の抗原結合ドメインを介してのみならず、いくつかの他のタンパク質結合ドメインを介しても、ADCCに対して指向させることができると想定される。結果として、複数の実施形態は、Fcドメインと異種非抗原結合ドメインとに関係する。特定の実施形態においては、非抗原結合ドメインは細胞表面に結合する。したがって、これらの作用物質には、特異的標的細胞に結合することができる作用物質/タンパク質に対する化学的結合、またはそれらとの融合のいずれかが必要である。複数の実施形態には、表2に列挙されるタンパク質のいずれかの全体またはその一部に対して、グリコシル化されていないFcドメイン全体またはその一部を連結させることがさらに含まれる。複数の実施形態に、表2および本明細書中の記載の中で提供される例が含まれるが、これらに限定されるわけではないことが想定される。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 1 】

【 表 2 】

表 2

タンパク質の分類	下位分類	種	亜種
1) 抗体	ポリクローナル		
	モノクローナル	組み換え体ではない	
		組み換え体	
			キメラ
			単鎖
			ダイアボディー
			多量体
2) 細胞表面受容体の リガンド			IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19
	サイトカイン／成長因子		
		受容体チロシンキナーゼ のサイトカイン／成長因 子	
			GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EGF, VEGF, FGF, PDGF, HGF, GDNF, Trk, AXL, LTK, TIE, ROR, DDR, KLG, RYK, MuSK リガンド
3) 細胞表面分子の 非Ab結合タンパク質			
	細胞表面タンパク質の バインダー		
		分化抗原クラスター (CD) 分子	

【 0 0 9 2 】

受容体のリガンドは、その表面上にリガンドの受容体を発現する細胞を標的化するために利用され得る。リガンドとしてはまた、例えば、CD95リガンド、TRAIL、TNF（例えば、TNF- またはTNF- ）、成長因子（VEGFおよびサイトカイン（例えば、インターフェロンまたはインターロイキン、およびそれらのバリエーション）のような上記で議論されたものを含む）が挙げられる。

【 0 0 9 3 】

VEGF受容体1（Flt-1）の第2の細胞外ドメインをVEGF受容体2の第3のドメイン（KDR/FIK-1）とIgGFc領域とともに含むVEGF Trap融合タンパク質のような、複数のドメインを持つ実施形態もまた想定される。

【 0 0 9 4 】

10

20

30

40

50

a. 融合タンパク質および複合タンパク質

挿入バリエーションの特別な種は融合タンパク質である。この分子は、一般的には、第2のポリペプチド全体またはその一部に対してN末端またはC末端で連結された天然の分子全体またはその実質的な部分を有する。

【0095】

複数の実施形態はまた、修飾されたタンパク質またはポリペプチドが形成するように、少なくとも1つの作用物質に連結させられる、複合ポリペプチド（例えば、翻訳されたタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド）にも関係する。診断剤または治療剤としての分子の有効性を高めるためには、少なくとも1つの所望される分子または部分に連結させる、または共有結合させる、または複合体化させることが一般的である。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であり得るが、これらに限定されるわけではない。エフェクター分子は、所望される活性（例えば、細胞傷害性活性）を有している分子を含む。抗体に結合させられているエフェクター分子の限定ではない例としては、毒素、抗腫瘍薬、治療用酵素、放射線標識核種、抗ウイルス薬、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出することができる任意の部分と定義される。抗体に結合体化させられているレポーター分子の限定ではない例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色された粒子またはリガンド（例えば、ビオチン）が挙げられる。

【0096】

十分な選択性、特異性、または親和性の任意の抗体を、抗体結合体の基礎として利用することができる。そのような特性は、当業者に公知の従来の免疫学的スクリーニング方法論を使用して評価することができる。標準的な抗原結合部位に加えて、抗体分子中の生物学的活性分子への結合のための部位として、病原体、B細胞スーパー抗原、T細胞共受容体CD4、およびHIV-1エンベロープに結合することができる可変ドメイン中に存在する部位が挙げられる（Sassoら、1989；Shorkiら、1991；Silvermannら、1995；Clearyら、1994；Lenerterら、1990；Berberianら、1993；Kreierら、1991）。加えて、可変ドメインは抗体の自己結合にも関与しており（Kangら、1988）、これには抗抗体により認識されるエピトープ（イディオトープ）が含まれる（Kohlerら、1989）。

【0097】

抗体結合体の特定の例は、抗体が検出可能な標識に連結させられた結合体である。「検出可能な標識」は、それらの特異的機能的特性、および/または化学的特性に起因して検出することができる化合物ならびに/あるいはエレメントであり、その使用により、それらを検出しようとする抗体に結合することができる、および/またはさらには、所望される場合には定量化することができる。別のそのような例は、細胞傷害剤または抗細胞性剤（anti-cellular agent）に連結させられた、「免疫毒素」と呼ぶことができる、抗体を含む結合体の形成である。

【0098】

アミノ酸（例えば、選択的に切断可能なリンカー、合成のリンカー、または他のアミノ酸配列）を、タンパク質様部分を分けるために使用することができる。

【0099】

IV. 抗体Fcライブラリー

多様な抗体Fcドメインおよび/またはそのようなドメインを含む抗体の作製のための実施形態と組み合わせる利用することができる技術の例は、米国特許第5,824,520号に記載されている免疫グロブリン重鎖ライブラリーの発現のための技術と類似する技術を利用することができる。これまでに利用されたFcライブラリーは、引用により具体的に本明細書中に組み入れられるWO2008/137475の中で議論されている。

【0100】

V. 抗体Fcドメインのスクリーニング

特定のFcRに結合することができる分子を同定するための方法を含む実施形態が存在する。これらは、本明細書中、ならびにその全体が引用により本明細書中に具体的に組み入れられる、PCT出願WO2008/137475に記載されている。スクリーニングされた結合ポリペプチドには、多様な候補のFcドメインの大きなライブラリーが含まれる場合があり、また代わりに、それらが標的リガンドに結合する可能性をさらに高くすると考えられる目的とする構造的性質を用いて選択された特定のクラスのFcドメイン（例えば、操作された点変異またはアミノ酸の挿入）が含まれる場合もある。1つの実施形態においては、候補の結合タンパク質は完全な抗体、またはFcドメインを含むその断片または一部である。

10

【0101】

標的リガンドに結合することができる候補のFcドメインを同定するためには、以下の工程を行うことができる：異なる抗体Fcドメインを発現するグラム陰性細菌細胞の集団を提供する工程；細菌またはファージと、抗体に接触することができる少なくとも1つの第1の標識または固定化された標的リガンド（FcRポリペプチド）を混合する工程、および標的リガンドに結合することができる分子を発現する少なくとも1つの第1の細菌を同定する工程。

【0102】

上記方法のいくつかの態様においては、抗体Fcドメインと標識されたFcRポリペプチドとの間での結合は、細菌細胞の拡散を妨げるであろう。この方法で、標識されたりリガンドの分子を、透過化された外膜を含む細菌のペリプラズムの中に保持することができる。あるいは、Fcドメインは内膜と会合することが示されているので、ペリプラズムを除去し、それにより、Fcドメインが結合した候補分子の保持を生じることができる。その後、標識を、FcRポリペプチドに結合できる結合ポリペプチドを発現する細胞、およびこの方法では、単離されたFcドメインポリペプチドをコードする遺伝子を単離するために使用することができる。次いで、標的リガンドに結合することができる分子が、インビボまたはエキソビボでの発現方法を使用して大量に産生され得、その後、任意の所望される用途（例えば、診断用途または治療用途）に使用され得る。さらに、同定された単離された抗体Fcドメインが、抗原結合ドメインを含む抗体断片または全長抗体を構築するために使用され得ることが理解されるであろう。

20

30

【0103】

さらなる実施形態においては、本発明の細菌の産生のための方法には、少なくとも2回の選択（工程c）が含まれ得る。ここでは、第1回目の選択において得られた細菌細胞のサブ集団について、FcRに対する候補の抗体Fcドメインの結合に基づく少なくとも第2回目の選択が行われる。さらに、いくつかの態様においては、第1回目の選択において得られた細菌細胞のサブ集団を、（細胞の総数を増加させるために）第2回目の選択の前に許容条件下で増殖させることができる。したがって、いくつかの態様においては、複数の方法に、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、またはそれ以上の回数の選択が含まれ得る。さらに、いくつかの態様においては、それぞれの回の選択により得られた細菌細胞のサブ集団が、続く回の選択の前に許容条件下で増殖させられるであろう。1回以上のそのような選択後に単離された細胞は、変異誘発のさらなる回に供され得る。いくつかの場合には、選択は、抗体に結合していないFcRポリペプチドを除去した後に行われるであろう。さらに、いくつかの場合には、選択のストリンジェンシーは、抗体を提示する細菌を含む溶液のpH、塩濃度、または温度を調節することにより変えることができる。したがって、いくつかの態様においては、本発明の細菌細胞を、約25

40

のような生理学的温度より低い温度（sub-physiological temperature）で増殖させることが好ましい場合がある。

【0104】

なおさらなる態様においては、本発明の細菌細胞を産生する方法はさらに、少なくとも第1のFcRに結合するFcドメインをコードする核酸配列を産生する方法として定義す

50

ることができる。したがって、本明細書中の方法により産生された細菌細胞は、F c R ポリペプチドに対して特異的親和性を有しているF c ドメインをコードする核酸配列をクローニングするために使用することができる。細胞からそのような核酸を単離し、増幅させるための方法（例えば、PCRによる）は当該分野で周知であり、以下にさらに記載される。したがって、上記方法により産生された核酸配列は、本発明の一部として含まれる。さらに、そのような配列は、F c R に対して特異的親和性を有しているF c ドメインを産生させるために、細胞中で発現させることができる。したがって、いくつかの態様においては、本発明は、F c R に対して特異的親和性を有しているF c ドメインを産生するための方法を提供する。さらに、本発明には、本発明の方法により産生された抗体F c ドメインが含まれる。しかし、そのようなスクリーニングにより産生された抗体F c ドメインを、特定の標的リガンドに対して親和性を有している抗体可変領域と組み合わせることができること、これらの抗体もまた本発明の一部として含まれることが理解されるであろう。

10

【0105】

A．F c ドメインのコード配列のクローニング

抗体F c または他の結合タンパク質の結合親和性は、例えば、Munson & Pollard (1980) のスキャッチャード解析により決定することができる。あるいは、結合親和性は、表面プラズモン共鳴、またはタンパク質：タンパク質相互作用について速度論および平衡定数を決定するための任意の他の周知の方法により決定することができる。所望される特異性、親和性、および/または活性の分子を産生する細菌細胞が同定された後、対応するコード配列をクローニングすることができる。この方法では、上記分子をコードするDNAを、従来の手順を使用して（例えば、抗体または結合タンパク質をコードする遺伝子に特異的に結合することができる遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）単離し、配列決定することができる。

20

【0106】

一旦単離されると、抗体F c ドメインDNAを発現ベクターの中に配置することができ、これをその後、細菌のような宿主細胞にトランスフェクトすることができる。上記DNAはまた、例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変ドメインの配列の付加により、あるいは、免疫グロブリンではないポリペプチドのコード配列全体またはその一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより、修飾することができる。そのような方法で、所望される結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」結合タンパク質が調製される。例えば、同定された抗体F c ドメインは、治療用ポリペプチドまたは毒素に融合させられる場合があり、また、特定のF c Rを発現する標的細胞に対して（インビトロまたはインビボで）使用される場合もある。

30

【0107】

キメラまたはハイブリッドF c ドメインはまた、合成タンパク質化学反応（架橋剤を含む化学反応を含む）において公知の方法を使用してインビトロで調製することもできる。例えば、標的化された毒素を、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成させることにより構築することができる。この目的に適している試薬の例としては、イミノチオラートおよびメチル - 4 - メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

40

【0108】

核酸を、生存細胞から、また非生存細胞からもクローニングできることは当業者に理解されるであろう。非生存細胞の場合には、例えば、（例えば、PCRを使用する）クローニングされたDNAの増幅を使用することが所望され得る。これはまた、細胞のさらなる増殖を伴って生存細胞を使用して行われる場合があり、また、細胞のさらなる増殖を伴わずに生存細胞を使用して行われる場合のいずれもがある。

【0109】

B．標識されたりリガンド

1つの実施形態においては、標識されたF c Rポリペプチドに対して親和性を有するF c ドメインが単離される。本発明のグラム陰性細菌のペリプラズム膜の透過化および/ま

50

たは除去により、あらゆる大きさである可能性がある標識されたりガンドをスクリーニングすることができる。ペリプラズム膜の除去を行わない場合には、リガンドが細菌のペリプラズム膜を通過して効率よく拡散できるようにするために、標識されたりガンドが50,000Da未満の大きさであることが通常は好ましいであろう。

【0110】

上記で示されたように、1つ以上の検出可能な作用物質（単数または複数）で標識されたFcRポリペプチドを提供することが通常は望ましいであろう。これは、結合体が形成するように、例えば、少なくとも1つの検出可能な作用物質に対してリガンドを連結させることにより行うことができる。例えば、少なくとも1つの検出可能な分子または部分に連結させる、共有結合させる、または複合体化させることが一般的である。「標識」または「検出可能な標識」は、その使用により、それが結合したリガンドを検出し、および/またはさらには所望される場合には定量化することが可能となる、特異的な機能的特性および/または化学的特性により検出することができる化合物ならびに/あるいはエレメントである。使用することができる標識の例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色された粒子、またはビオチンのようなリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

本発明の1つの実施形態においては、視覚的に検出可能なマーカーが使用される。その結果、その標識についての細胞の自動スクリーニングを行うことができる。具体的には、蛍光標識が、これらが所望される結合タンパク質または抗体を発現する細胞の単離にフローサイトメトリーを使用することを可能にする点で、有用である。適切な機器を用いて視覚により検出することができる作用物質の例は、所望されるリガンドに対するそれらの結合についての方法と同様に、当該分野で公知である（例えば、米国特許第5,021,236号；同第4,938,948号；および同第4,472,509号（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと）。そのような作用物質としては、常磁性イオン；放射性同位体；発蛍光団；NMRにより検出可能な物質、およびX線画像化法のための物質を挙げることができる。

【0112】

別のタイプのFcR結合体は、リガンドが、色素形成性基質と接触すると着色された生成物を生じるであろう第2の結合分子に対しておよび/または酵素に対して（酵素タグ）連結される場合である。そのような酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋ワサビ）水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。そのような例においては、選択された細胞が依然生存可能であることが所望されるであろう。好ましい第2の結合リガンドは、ビオチンおよび/またはアビジン、ならびにストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されている。

【0113】

アジド基を含む分子もまた、弱い強度の紫外線により発生する反応性ナイトレン中間体を通じてタンパク質に対して共有結合を形成させるために使用することができる（Potter & Haley, 1983）。具体的には、プリンヌクレオチドの2-アジドアナログおよび8-アジドアナログが、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的フォトプローブ（photoprobe）として使用されている（Owens & Haley, 1987；Athertonら、1985）。2-アジドヌクレオチドおよび8-アジドヌクレオチドはまた、精製されたタンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするために使用されており（Khatoonら、1989；Kingら、1989；およびDholakiaら、1989）、そして、リガンド結合剤として使用することができる。

【0114】

標識化は、当業者に周知である任意の技術によって行うことができる。例えば、FcRポリペプチドは、リガンドを、所望される標識および化学酸化剤（例えば、次亜塩素酸ナトリウム）または酵素的酸化剤（例えば、ラクトペルオキシダーゼ）と接触させることによって標識することができる。同様に、リガンド交換プロセスが使用され得る。あるいは、直接標識化技術は、例えば、標識、還元剤（例えば、 SnCl_2 ）、緩衝溶液（例えば、ナトリウム - カリウムフタレート溶液）、およびリガンドをインキュベーションすることによって使用され得る。リガンド上の中間官能基（Intermediary functional group）もまた、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）の存在下でリガンドに標識を結合させるために使用することができる。

10

【0115】

リガンドのその結合体部分への結合または結合体化のための他の方法もまた、当該分野で公知である。いくつかの結合方法は、リガンドに結合させられた有機キレート剤（例えば、無水ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）；エチレントリアミン四酢酸；N - クロロ - p - トルエンスルホンアミド；および / またはテトラクロロ - 3 - 6 - ジフェニルグリコウリル（tetrachloro - 3 - 6 - diphenyl glycouril - 3）の使用を含む（米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）。FcRポリペプチドはまた、カップリング剤（例えば、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩）の存在下で、酵素と反応させることができる。フルオレセインマーカールとの結合体は、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応により調製することができる。米国特許第4,938,948号において、乳癌の画像化はモノクローナル抗体を使用して達成され、そして、検出可能な画像化部分は、リンカー（例えば、メチル - p - ヒドロキシベンズイミデートまたはN - スクシンイミジル - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート）を使用して抗体に結合させられる。なおさらなる態様においては、FcRポリペプチドを、レポータータンパク質（例えば、上記のような酵素）または蛍光タンパク質に融合させることができる。

20

【0116】

適切な蛍光リガンドを用いて、ペリプラズムで発現されるタンパク質を特異的に標識化する能力はまた、ライブラリースクリーニング以外の用途を有する。蛍光リガンドでの特異的標識化およびフローサイトメトリーは、タンパク質の製造の際のFcドメインの産生をモニタリングするために使用することができる。

30

【0117】

一旦、Fcドメインが単離されると、結合体を形成させるために、分子を少なくとも1つの作用物質に連結して、この分子の有用性を高めることが所望され得る。例えば、診断剤または治療剤としてのFcドメインあるいは抗体分子の有効性を高めるためには、少なくとも1つの所望される分子または部分に連結させる、または共有結合させる、または複合体化させることが一般的である。このような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクター分子またはレポーター分子であり得るが、これらに限定されない。エフェクター分子には、所望される活性（例えば、細胞傷害活性）を有している分子が含まれる。抗体へ結合させられるエフェクター分子の限定ではない例として、以下が挙げられる：毒素、抗腫瘍薬、治療用酵素、放射性標識ヌクレオチド、抗ウイルス薬、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出することができる任意の部分として定義される。そのような分子を標識化するための技術は当業者に公知であり、そして、本明細書中で上記に記載されている。

40

【0118】

次いで、本発明に従って調製された標識化された結合タンパク質（例えば、Fcドメイン）はまた、例えば、生物学的成分（例えば、タンパク質（単数または複数）、ポリペ

50

チド（単数または複数）、またはペプチド（単数または複数）の結合、精製、除去、定量、および／または、別の一般的な検出のための免疫検出方法において利用され得る。いくつかを挙げると、いくつかの免疫検出法として、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光免疫アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウェスタンブロット法が挙げられる。様々な有用な免疫検出法の工程は、以下のような科学技術文献に記載されている：例えば、Doolittle and Ben-Zeev, 1999; Gulbis and Galand P, 1993; および De Jager Rら、1993（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）。このような技術として、結合アッセイ（例えば、当該分野で公知である、様々なタイプの酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および／または放射免疫アッセイ（RIA））が、挙げられる。

10

【0119】

Fcドメイン分子（抗体を含む）はまた、例えば、免疫組織化学（IHC）によって、研究のために調製された新鮮凍結された、および／またはホルマリン固定され、パラフィンに包埋された組織ブロックと組み合わせて利用され得る。これらの粒子検体から組織ブロックを調製する方法は、種々の予後因子に関するこれまでのIHC研究においてうまく使用されており、そして／または当業者に周知である（Abbondanzoら、1990）。

【0120】

VI. フローサイトメトリーを用いる自動スクリーニング

20

本発明の1つの実施形態においては、蛍光活性化細胞選別（FACS）スクリーニング、または他の自動フローサイトメトリー技術を、Fcドメインに結合した標識されたりガンドを含む細菌細胞の効率的な単離のために使用することができる。フローサイトメトリーを実施するための機器は当業者に公知であり、そして市販されている。そのような機器の例として、以下が挙げられる：FACS Star Plus、FACSscanおよびFACS sort 機器（Becton Dickinson（Foster City, Calif.）から）、Epics C（Coulter Epics Division（Hialeah, Fla.）から）ならびにMOFLO（商標）（Cytomation（Colorado Springs, Co）から）。

【0121】

30

一般的に、フローサイトメトリー技術には、液体試料中の細胞または他の粒子の分離が含まれる。典型的には、フローサイトメトリーの目的は、分離された粒子を、それらの1つ以上の特性（例えば、標識されたりガンドまたは他の分子の存在）について分析することである。フローサイトメトリーの基本的な工程は、装置を通る流体試料の誘導を含み、その結果、液体の流れが感知領域を通り抜ける。粒子は、センサーによって1度に1つずつ通過しなければならない、そして、大きさ、屈折、光散乱、不透明度、粗度、形状、蛍光などに基づいて分類される。

【0122】

細胞の迅速な定量分析が生物医学的研究および医療において有用であることを証明する。装置は、1秒あたり数千個の細胞の速度で、細胞特性の定量的多パラメーター分析をすることができる。これらの機器は、細胞型間を区別する能力を提供する。多くの場合、データは、測定された変数の1次元度数分布（ヒストグラム）または2次元度数分布（輪郭プロット、散布図）で表示される。多パラメーターデータファイルの分配には、対話型（interactive）の1次元図表プログラムまたは2次元図表プログラムの連続的使用が含まれる。

40

【0123】

迅速な細胞検出のための多パラメーターフローサイトメトリーデータの定量分析は、以下の2つの段階からなる：細胞のクラスの特性決定と試料の処理。一般に、細胞のクラスの特性決定のプロセスは、細胞の特徴を、目的の細胞と目的ではない細胞とに分配する。その後、試料の処理において、各細胞が、それらが入る領域に従って、2つのカテゴリー

50

のうちの一方に分類される。細胞のクラス分析は、非常に重要である。なぜなら、高い検出性能は、細胞の適切な特性が取得される場合にしか期待できないからである。

【0124】

フローサイトメトリーによつては、細胞分析が実施されるだけでなく、細胞の分別も行われる。米国特許第3,826,364号には、粒子（例えば、機能的に異なる細胞のタイプ）を物理的に分離する装置が開示されている。この機械では、レーザーは、適切なレンズまたはレンズシステムによつて粒子の流れに集められた照明を提供し、その結果、その中に、粒子からの高度に局限化させられた散乱が存在する。加えて、高強度の照明光源は、流れの中での蛍光粒子の励起のために、粒子の流れに向けられる。この流れの中の特定の粒子を選択的に帯電させ、次いで、これら粒子を指定されるレセプタクルへ偏向させることによつて分離することができる。この分離の古典的な形態は蛍光タグ化抗体を介するものであり、この蛍光タグ化抗体は、分離のために、1つ以上の細胞のタイプに印を付けるために使用される。

10

【0125】

フローサイトメトリーの他の方法として、以下に記載されている方法を挙げることができるが、これらに限定されるわけではない：米国特許第4,284,412号、同第4,989,977号、同第4,498,766号、同第5,478,722号、同第4,857,451号、同第4,774,189号、同第4,767,206号、同第4,714,682号、同第5,160,974号および同第4,661,913号（これらの開示のそれぞれが、引用により本明細書中に組み入れられる）。

20

【0126】

本発明についてのフローサイトメトリーの重要な局面は、複数回のスクリーニングを逐次的に行うことができることである。細胞は、最初の回の選別により単離することができ、すぐにフローサイトメーターに再度導入され、スクリーンのストリンジェンシーを改善するために再びスクリーニングされ得る。当業者に公知である別の利点は、非生存細胞をフローサイトメトリーを使用して回収できることである。フローサイトメトリーは本質的には粒子選別技術であるので、増殖または繁殖する細胞の能力は必要ない。そのような非生存細胞からの核酸の回収のための技術は当該分野で周知であり、これには例えば、PCRを含む鋳型依存性増幅技術の使用が含まれ得る。

30

【0127】

VII. フローサイトメトリーを用いる自動スクリーニング

核酸に基づく発現システムは、組み換え体タンパク質の発現のための本発明の特定の実施形態において用途が見出され得る。例えば、本発明の1つの実施形態には、抗体Fcドメイン、または好ましくは、複数の異なるFcドメインのコード配列でのグラム陰性細菌の形質転換が含まれる。

【0128】

VIII. 核酸に基づく発現システム

核酸に基づく発現システムは、組換えタンパク質の発現のための本発明の特定の実施形態において用途が見出され得る。例えば、本発明の1つの実施形態は、抗体Fcドメイン、または好ましくは、複数の異なるFcドメインのコード配列でのグラム陰性細菌の形質転換が含まれる。

40

【0129】

A. 核酸送達の方法

本発明の特定の態様は、標的細胞（例えば、グラム陰性細菌）への核酸の送達を含み得る。例えば、細菌宿主細胞は、FcRに結合する可能性がある候補Fcドメインをコードする核酸で形質転換され得る。本発明の特定の実施形態においては、発現を細菌のペリプラズムに標的化することが所望され得る。真核生物宿主細胞の形質転換は同様に、標的リガンドに結合できるとして同定される様々な候補分子の発現において用途が見出され得る。

【0130】

50

細胞の形質転換のための核酸送達に関する適切な方法は、核酸（例えば、DNA）を、そのような細胞に、またはさらにはその細胞小器官にさえも導入できる、実質的に任意の方法を含むと考えられる。このような方法としては以下のようなDNAの直接送達が挙げられるが、これらに限定されない：注入（米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、同第5,656,610号、同第5,589,466号、および同第5,580,859号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）（マイクロインジェクション（HarlanおよびWeintraub、1985；米国特許第5,789,215号、引用により本明細書中に組み入れられる）を含む）；エレクトロポレーション（米国特許第5,384,253号、引用により本明細書中に組み入れられる）；リン酸カルシウム沈澱（GrahamおよびVan Der Eb、1973；ChenおよびOkayama、1987；Rippeら、1990）；DEAE-デキストランと、それに続くポリエチレングリコールの使用（Gopal、1985）；直接の音波負荷（direct sonic loading）（Fechheimerら、1987）；リボソーム媒介性トランスフェクション（NicolaouおよびSene、1982；Fraleleyら、1979；Nicolaouら、1987；Wongら、1980；Kanedaら、1989；Katoら、1991）；マイクロプロジェクトイルボンバードメント（PCT出願番号WO94/09699号および同WO95/06128号；米国特許第5,610,042号、同第5,322,783号、同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号、および同第5,538,880号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）；あるいは、炭化ケイ素繊維を用いた攪拌（Kaepplerら、1990；米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）；乾燥/阻害媒介性のDNAの取り込み（desiccation/inhibition-mediated DNA uptake）（Potrykusら、1985）。これらのような技術の適用により、細胞を安定に、または一時的に形質転換することができる。

【0131】

B. ベクター

ベクターは、例えば、標的FcRに結合する能力についてスクリーニングすることが望まれる候補Fcドメインをコードする核酸配列でのグラム陰性細菌の形質転換において、本発明での用途が見出され得る。本発明の1つの実施形態において、標的ポリペプチドをコードする核酸配列の不均質な「ライブラリー」全体が細菌集団に導入され得、それにより、全ライブラリーのスクリーニングが可能となる。用語「ベクター」は、核酸配列を複製することができる細胞への導入のために核酸配列を挿入することができるキャリア核酸分子をいうために使用される。核酸配列は「外来性」または「異種」であり得、この「外来性」または「異種」は、ベクターがその中に導入される細胞にとって外来のものであること、または、この配列がその細胞中の配列に対して相同であるが、通常その配列が見られない宿主細胞核酸内の位置にあるということを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、およびウイルス（例えば、バクテリオファージ）が挙げられる。当業者は、標準的な組換え技術によりベクターを構築することができる。この技術は、Maniatisら、1988およびAusubelら、1994（これらはいずれも、引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されている。

【0132】

用語「発現ベクター」は、転写される能力がある遺伝子産物の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むベクターをいう。いくつかの場合には、その後、RNA分子が、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。発現ベクターには様々な「制御配列」を含めることができる。「制御配列」は、特定の宿主生物体において作動可能であるように連結されたコード配列の転写と、おそらくは翻訳に不可欠な核酸配列をいう。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターには、さらに他

の機能も供与する核酸配列を含めることができ、これらを以下に記載する。

【0133】

1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、転写の開始および転写の速度が制御される核酸配列の領域である、制御配列である。プロモーターは、調節タンパク質および調節分子（例えば、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子）がそれに結合し得る遺伝子エレメントを含み得る。句「作動可能であるように配置された」、「作動可能であるように連結された」、「制御下」、および「転写制御下」は、配列の転写開始および／または発現を制御するために、プロモーターが、核酸配列に関連して正しい機能的な位置および／または方向にあることをいう。プロモーターは、「エンハンサー」と組み合わせ使用することができ、またそうでない場合もあり、この「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に關与するシス作用性調節配列をいう。

10

【0134】

プロモーターは、コードセグメントおよび／またはエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することにより得ることができるように、遺伝子または配列に生来付随しているものであり得る。このようなプロモーターは、「内因性」として呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置し、核酸配列に生来付随しているものであり得る。あるいは、特定の利点は、組換え体プロモーターまたは異種プロモーター（その自然環境における核酸配列に通常は付随しないプロモーターをいう）の制御下にコード核酸セグメントを配置することにより得られるであろう。組換え体エンハンサーまたは異種エンハンサーはまた、その自然環境において核酸配列に通常は付随しないエンハンサーをいう。このようなプロモーターまたはエンハンサーとしては、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他の原核生物細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「自然界には存在」しないプロモーターまたはエンハンサー（すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および／または発現を変化させる変異を含む）を挙げることができる。合成によりプロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を作製することに加えて、配列は、組換えクローニングおよび／または核酸増幅技術を使用して作製され得、この技術としては、本明細書に開示される組成物と組み合わせたPCR（商標）が挙げられる（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照のこと）。

20

30

【0135】

当然のことながら、発現のために選択される細胞のタイプにおいてDNAセグメントの発現を効率的に指示するプロモーターおよび／またはエンハンサーを利用することが重要である。本発明とともに使用することができるそのようなプロモーターの1つの例は、E.coliアラビノースプロモーターまたはT7プロモーターである。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞のタイプの組み合わせの使用に精通している。例えば、引用により本明細書中に組み入れられるSambrookら（1989）を参照のこと。利用されるプロモーターは、構成的、組織特異的、誘導性、ならびに／あるいは、組換え体であるタンパク質および／またはペプチドの大量生産において有利であるような、導入されたDNAセグメントの高いレベルの発現を指示するための適切な条件下で有用であり得る。プロモーターは、異種である場合も、また内因性である場合もある。

40

【0136】

2. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

特異的な開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳に必要である場合がある。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接する配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルを、提供することが必要な場合がある。当業者は、容易にこの配列を決定することができ、そして必要なシグナルを提供することができる。挿入物全体の翻訳を確実にするためには、開始コドンが、所望されるコード配列のリーディングフレ

50

ームと「インフレーション」でなければならないことは周知である。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然のものであっても、また、合成のものであってもいずれであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることにより増強され得る。

【0137】

3. マルチクローニング部位

ベクターには、マルチクローニング部位 (MCS) を含めることができる。これは、複数の制限酵素部位を含む核酸領域であり、これらのうちの任意のものを、ベクターを消化するための標準的な組換え技術と組み合わせて使用することができる (引用により本明細書中に組み入れられる、Carbone *et al.*、1999、Levenson *et al.*、1998、および Cocea、1997を参照のこと)。「制限酵素消化」は、核酸分子中の特定の位置でのみ機能する酵素での核酸分子の触媒的切断をいう。これらの制限酵素の多くは市販されている。このような酵素の使用は当業者に理解されている。多くの場合、ベクターは、外因性の配列をベクターに連結できるようにするために、MCS内で切断する制限酵素を使用して直鎖化または断片化される。「ライゲーション」は、2つの核酸断片の間にホスホジエステル結合を形成するプロセスをいう。これらの断片は互いに連続している場合があり、また連続していない場合もある。制限酵素およびライゲーション反応を含む技術は組換え技術の当業者に周知である。

【0138】

4. 終止シグナル

本発明にしたがって調製されたベクターまたは構築物には、一般的に、少なくとも1つの終止シグナルが含まれるであろう。「終止シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写の特異的終止に関与するDNA配列から構成される。したがって、特定の実施形態において、RNA転写産物の産生を終わらせる終止シグナルが想定される。ターミネーターは、所望されるメッセージレベルを得るためにインピボで不可欠であり得る。

【0139】

本発明での使用が想定されるターミネーターとしては、本明細書中に記載されるか、または当業者に公知の転写の任意の公知のターミネーターが挙げられる。これには、例えば、rhp依存性ターミネーターまたはrho非依存性ターミネーターが含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態においては、終止シグナルは、配列の短縮が原因であるような、転写可能な配列または翻訳可能な配列の欠損であり得る。

【0140】

5. 複製起点

宿主細胞中でベクターを増殖させるために、複製が開始される特定の核酸配列である1つ以上の複製起点部位 (しばしば「ori」と呼ばれる) を含めることができる。

【0141】

6. 選択マーカーおよびスクリーニングマーカー

本発明の特定の実施形態において、本発明の核酸構築物を含む細胞は、発現ベクター中にマーカーを含めることによってインピトロまたはインピボで同定することができる。このようなマーカーは、発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にする同定可能な変化を細胞に付与する。一般的には、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。ポジティブな選択マーカーは、そのマーカーの存在がその選択を可能にする選択マーカーであり、一方、ネガティブな選択マーカーは、その存在がその選択を妨げる選択マーカーである。ポジティブな選択マーカーの例は薬物耐性マーカーである。

【0142】

通常、薬物選択マーカーを含めることは、形質転換体のクローニングおよび同定を補助し、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が有用な選択マーカーである。実施の条件に基づく形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加

えて、その根拠が比色分析であるGFPのようなスクリーニングマーカーを含む他のタイプのマーカーもまた想定される。あるいは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)のようなスクリーニング可能な酵素が利用され得る。当業者はまた、おそらくは、FACS分析と組み合わせて免疫学的マーカーを利用する方法を理解するであろう。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現させることが可能である限りは、使用されるマーカーは重要ではないと考えられる。選択マーカーおよびスクリーニングマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0143】

C. 宿主細胞

異種の核酸配列を発現する状況においては、「宿主細胞」は原核生物細胞をいい、そしてこれには、ベクターを複製することができる、および/またはベクターによってコードされる異種遺伝子を発現することができる、任意の形質転換可能な生物が含まれる。宿主細胞は、ベクターのためのレシピエントとして使用することができ、そして使用されてきた。宿主細胞は、「トランスフェクト」されるかまたは「形質転換」され得る。これは、外因性の核酸が、宿主細胞内に形質導入されるかまたは導入されるプロセスをいう。形質転換された細胞には、初代被験細胞とその子孫が含まれる。

【0144】

本発明の特定の実施形態においては、宿主細胞は、グラム陰性細菌細胞である。これらの細菌は、これらが内膜と外膜との間にペリプラズム空間を、特に、ペリプラズムと細胞質との間の上記内膜を(これは、細胞質膜としても知られている)持つ点で、本発明での使用について適している。このように、そのようなペリプラズム空間を持つ任意の他の細胞を、本発明に従って使用することができる。本発明を用いた用途が見出され得るグラム陰性細菌の例としては、*E. coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Vibrio cholera*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella flexneri*、*Haemophilus influenza*、*Bordetella pertussis*、*Erwinia amylovora*、*Rhizobium sp.*を挙げることができるが、これらに限定されない。グラム陰性細菌細胞は、なおさらに、選択されたりガンドに結合することができる候補の結合ポリペプチドを含む融合ポリペプチドのコード配列で形質転換された細菌細胞として定義され得る。ポリペプチドは、ペリプラズム空間に面している細胞質膜の外表面に固定され、そしてこれには抗体のコード配列または別の配列が含まれ得る。ポリペプチドの発現のための1つの手段は、このような指示を生じ得るポリペプチドにリーダー配列を結合させることによる。

【0145】

複数の原核生物細胞株および原核生物細胞培養物が、宿主細胞としての使用に利用可能であり、そして、これらはAmerican Type Culture Collection(ATCC)を介して入手することができる。ATCCは、生きた培養物および遺伝物質のための保管所としての役割を果たす機関である(www.atcc.org)。適切な宿主は、ベクター骨格および所望される結果に基づいて当業者によって決定され得る。プラスミドまたはコスミドは、例えば、多くのベクターの複製のために原核生物宿主細胞中に導入することができる。ベクターの複製および/または発現のための宿主細胞として使用される細菌細胞としては、DH5、JM109、およびKC8、ならびに複数の市販されている細菌宿主(例えば、SURE(登録商標)Competent CellsおよびSOLOPACK(商標)Gold Cells(STRATAGENE(登録商標)、La Jolla))が挙げられる。あるいは、E. Coli LE392のような細菌細胞をバクテリオファージのための宿主細胞として使用することができる。

【0146】

様々な細胞のタイプおよび生物由来の多くの宿主細胞が入手可能であり、そして当業者に公知である。同様に、ウイルスベクターは、原核生物宿主細胞、特にベクターの複製または発現について許容性のものと組み合わせて使用され得る。いくつかのベクターは、ベ

10

20

30

40

50

クターが原核生物細胞および真核生物細胞の両方において複製および／または発現できるようにする制御配列を利用することができる。当業者は、さらに、上記に記載された宿主細胞の全てがこれらを維持し、そしてベクターの複製を可能にするための、インキュベーションするための条件を理解する。ベクターの大量生産、ならびにベクターによってコードされる核酸およびこれらの同族のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの産生を可能にする技術ならびに条件もまた理解され、そして公知である。

【0147】

D．発現システム

上記で議論した組成物の少なくとも一部または全てを含む複数の発現システムが存在する。そのようなシステムは、例えば、特定のリガンドに結合できるとして本発明に従って同定されたポリペプチド産物の産生のために使用することができる。原核生物をベースとするシステムは、核酸配列、またはそれらの同族のポリペプチド、タンパク質およびペプチドを産生するために、本発明を用いる用途に利用することができる。複数のこのようなシステムは、商業的に広範に利用することができる。発現システムの他の例として、強力な原核生物のプロモーター（例えば、T7、Tac、Trc、BAD、pL、テトラサイクリン、またはlacプロモーター）を含むベクター、pET発現システム、およびE．coli発現システムが挙げられる。

【0148】

E．候補の結合タンパク質および抗体

特定の実施形態においては、抗体Fcドメインは、宿主細菌細胞の細胞質膜上、またはペリプラズム空間膜中で発現される。そのようなFcドメインの不均質な集団の発現によって、標的リガンド（FcR）に対して高い親和性を有しているポリペプチドが同定され得る。その後、同定されたFcドメインは、本明細書中に記載されるように、様々な診断的適用または治療的適用に使用され得る。

【0149】

本明細書中で使用される場合は、用語「Fcドメイン」は、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE Fcのような任意の免疫グロブリンFc領域を広くいうように意図される。種々な抗体をベースとする構築物および断片を調製し、使用するための技術は、当該分野で周知である。抗体を調製および特性決定するための方法もまた、当該分野で周知である（例えば、引用により本明細書中に組み入れられる、Antibodies：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと）。

【0150】

一旦、標的リガンドに対して親和性を有している抗体が同定されると、Fcドメインを、必要に応じて、濾過、遠心分離、および様々なクロマトグラフィー方法（例えば、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー）を使用して精製することができる。あるいは、より一般的にはFcドメイン、またはポリペプチドおよびペプチドを、自動ペプチド合成機を使用して合成することができる。

【実施例】

【0151】

IX．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術が、本発明者によって発見された技術が本発明の実施において良好に機能することを示し、従って、本実施例において開示された技術が、その実施のための好ましい態様を構成するとみなされ得ることが当業者によって理解されるものとする。しかし、本開示を考慮して、当業者は、開示される特定の実施形態の中で多くの変更を行うことができ、そしてなお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様もしくは類似する結果が得られることを理解するものとする。

【0152】

実施例1：ホモ二量体の野生型Fc断片およびFc2a断片の可溶性発現および精製

本研究において使用される全てのプライマーおよびプラスミドを表1および表2に記載する。CH2領域のC' Eループ内に2つの変異(S298G/T299A)を含むFc2aは、FcRIIFファミリーに結合するために操作されたグリコシル化されていないFcドメインである(Sazinskyら、2008)。グリコシル化されていないFc2aが、FcRIIaおよびFcRIIbに対して、グリコシル化された野生型IgGと同様の結合親和性を示すことが報告された(Sazinskyら、2008)。正しくアセンブリされたホモ二量体Fc断片(野生型FcおよびFc2a)の可溶性発現および分泌のために、2つのプラスミド(pDsbA-Fc-FLAGおよびpDsbA-Fc2a-FLAG)を構築した。SalIおよびFatI制限エンドヌクレアーゼ(NcoIと適合性)でpTrc99A(Amersham Pharmacia)を消化した後、合成53bp DsbAシグナルペプチド遺伝子と連結することによって、pDsbAを作製した。親Fc遺伝子を、プライマーSTJ#144およびSTJ#145を使用してPCR増幅し、SalIおよびHindIII制限酵素部位を使用して上記pDsbAプラスミドに連結することにより、pDsbA-Fc-FLAGを得た。pDsbA-Fc2a-FLAGを作製するために、CH2領域内に2つの変異(S298G/T299A)を含むFc2a遺伝子を、2つのプライマー(STJ#422およびSTJ#147)および鋳型(pDsbA-Fc-FLAG)を使用してPCR増幅し、次いで、SacII/HindIII制限酵素で処理されたpDsbA-Fc-FLAGに連結した。【0153】

E.coliにおいて野生型のグリコシル化されていないFc断片およびグリコシル化されていないFc2aタンパク質を発現させるために、pDsbA-Fc-FLAGまたはpDsbA-Fc2a-FLAGを持つJude-1細胞(F'[Tn10(Tet^r)proAB⁺lacI^q(lacZ)M15]mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC)80dlacZ M15 lacX74 deoR recA1 araD139(ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG)(Kawarasakiら、2003)を2Lのフラスコにおいて500mlの使用容量で培養した。グリコシル化されていないFcまたはFc2aの8時間にわたる発現および7,000rpmでの30分間の遠心分離の後、培養上清を0.22μmボルトトップフィルター(Corning, Corning NY)で濾過して細胞残屑を除去し、その後、1mlのImmobilized Protein Aアガロース(Pierce, Rockford, IL)を詰めたポリプロピレンカラムに充填した。400mlの上清を充填した後、各Protein Aアガロースカラムを75mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)および50mlの40mMクエン酸ナトリウム(pH5.0)で洗浄した。次いで、結合した抗体を0.1Mグリシン(pH2.5)で溶離し、その溶液を、1M Tris(pH8.0)溶液を添加することによってすぐに中和した。精製された野生型のグリコシル化されていないFcおよびFc2aドメインの大部分は、SDS-PAGEゲル分析によって測定したとき、二量体にアセンブリしていた(図1)。

【0154】

実施例2：グリコシル化されていない全長トラスツズマブおよびグリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc2aの産生および精製

pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc2aを構築するために、鋳型としてpDsbA-Fc2a-FLAGとともに、プライマーSTJ#290およびSTJ#291を使用して、Fc2a遺伝子を増幅した。増幅したPCR断片を、SalI/EcoRVで消化したpSTJ4-Herceptin IgG1(Jungら、2010)に連結して、pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc2aを作製した。全長IgG野生型トラスツズマブおよび変異体トラスツズマブ-Fc2aの発現のための各プラスミドを、重鎖と軽鎖の両方にN末端PelBリーダーペプチド融合物を持つ2シストロン性オペロン中のlacプロモーターによって制御されるように設計する。

【0155】

全長IgG発現プラスミドで形質転換した*E. coli* BL21(DE3)(EMD Chemicals, Gibbstown, NJ)をLB複合培地中で増殖させ、その後、R/2培地(Jeong & Lee, 2003)中で一晚、継代培養した。その継代培養を、R/2限定培地中での順応のために2回繰り返した。pSTJ4-Herceptin-IgG1またはpSTJ4-Herceptin-IgG1-Fc2aを持つ*E. coli* BL21(DE3)を、120mlのR/2培地を含む500mlのバツフル底フラスコの中で、250rpmで振盪させながら30で8時間培養し、その後、それを使用して、1.2LのR/2培地を含む3.3Lの卓上発酵装置(BioFlo310)(New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ)に接種した。流加発酵を、pHスタットグルコース供給ストラテジー(pH-sta 10
t at glucose feeding strategy)を使用して30で行った。溶存酸素(DO)濃度を、連続的にモニターし、攪拌速度を100rpmから1000rpmまで、空気流量を1から3SLPM(1分あたりの標準的な液体(Standard liquid per minute))まで、そして純粋な酸素の流量を0から1.5SLPMまで制御する自動カスケード制御を使用して40%の空気飽和度で制御した。最初のpHを6.8に設定し、pHが6.9を超えたときは、6.75未満のpHの20%(v/v)水酸化アンモニウムの補充および80%(v/v)栄養溶液(feeding solutions)(700g/Lのグルコースおよび9.77g/LのMgSO₄・7H₂O; 誘導前または500g/Lのグルコース、10g/LのMgSO₄・7H₂Oおよび100g/Lの酵母エキス; 誘導後)の添加によって、自動的に調整した。20
OD600がおよそ100に達したら、培養温度を25に設定し、冷却の30分後、イソプロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシド(IPTG)を1mMの濃度まで添加することによってタンパク質合成を誘導した。誘導の7時間後、培養液をおよそ130~140のOD600で回収した。

【0156】

細胞ペレットを、30分間の11,000×gでの遠心分離により回収し、100mM Tris、10mM EDTA(pH7.4)、4mgのリゾチーム(1gの乾燥細胞重量あたり)および1mM PMSFを含む1.2Lの緩衝液に再懸濁した。250rpmで振盪させながら30で16時間インキュベーションすることにより、ペリプラズムタンパク質を放出させた。14,000×gで30分間遠心分離して細胞残屑を除去し、30
ポリエチレンイミン(MP Biomedical, Solon, OH)を0.2%(w/v)の最終濃度まで滴下して添加した後、その溶液を14,000×gで30分間遠心分離し、0.2μmのフィルターで濾過して核酸-カチオン性ポリエチレンイミンポリマー複合体を除去した。回収した濾液を、4で16時間インキュベーションすることによって20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中に予め平衡化させた固定化したプロテインAアガロース樹脂に通した。その樹脂を200mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)、200mlの40mMクエン酸ナトリウム(pH5.0)で洗浄し、15mlの0.1Mグリシン(pH3.0)で溶離した後、すぐに1M Tris(pH8.0)溶液中で中和することによって、野生型のグリコシル化されていないトラスツズマブまたはトラスツズマブ-Fc2aを同様に精製した。そのプロテインAカラムで40
精製されたサンプルを、10kDaのMWカットオフメンブレンでの限外濾過により濃縮し、Superdex200ゲル濾過クロマトグラフィーカラムに充填し、完全にアセンブリされた抗体をPBS(pH7.4)中に回収した。

【0157】

実施例3: Fc2aおよびグリコシル化されていない全長トラスツズマブ-Fc2aについてのELISA分析

ホモ二量体のグリコシル化されていないFc2a(Fc断片)またはグリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc2a(全長IgG)について、Fc RIIa-GSTに対する結合親和性をELISAによって分析した。0.05M Na₂CO₃緩衝液(pH9.6)中に希釈された、50μlの4μg/mlのグリコシル化されていないトラス 50

ツズマブ、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc2aまたは臨床グレードのグリコシル化されたIgGトラスツズマブを、4 で16時間インキュベーションすることによって96ウェルポリスチレンELISAプレート(Corning, Corning, NY)上にコーティングした。そのプレートを、室温において2時間、1×PBS(pH7.4)、0.5%BSAでブロッキングし、0.05%Tween20を含むPBS(PBST)で4回洗浄し、段階希釈したFcRIIa-GST(Berntzenら、2005)とともに室温で1時間インキュベーションし、そしてPBSでさらに4回洗浄した後、1:5,000希釈した抗GST抗体HRP結合体(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)をそのプレートに添加した。さらに4回洗浄した後、そのプレートを、Ultra-TMB基質(Pierce, Rockford, IL)を使用して現像した。予想したとおり、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc2a(全長IgG)は、FcRIIaに対して、以前の研究(Sazinskyら、2008)において報告されたグリコシル化された全長トラスツズマブIgGと同様の高い結合親和性を示した。全長IgGの形式とは際立って対照的に、グリコシル化されていないFc2a(Fc断片のみ)は、FcRIIa-GSTに対して有意な結合親和性を示さなかったことから、Fc領域に対するFcRIIa受容体の結合についてのFabアームの構造的および機能的な役割が示唆される(図2)。

【0158】

実施例4: FcRI、FcRIおよびFcRIIbの3つ全てに対して高い結合親和性を示すグリコシル化されていないFcバリエーションの単離

グリコシル化されていないトラスツズマブ(trastuzumab) - Fc5(E382V/M428I; Fc5の配列は配列番号2に提供されていることに注意)は、FcRIに対して特異的な高い結合親和性を示した(Jungら、2010)。一方、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc2a(S298G/T299A)は、活性化FcRIIaと阻害性FcRIIbの両方に対して高い結合親和性を示した(Sazinskyら、2008)。グリコシル化されていない抗体によるFcRIとFcRIIの両方の可能な活性化を調べるために、pSTJ4-Herceptin IgG1 - Fc5 - 2a(E382V/M428I/S298G/T299A)を構築した(Fc5 - 2aの配列は配列番号3に提供されている)。Fc5 - 2a遺伝子の断片を、STJ#490およびSTJ#220を使用して増幅し、SacII/EcoRI制限酵素で処理されたpSTJ4-Herceptin IgG1に連結するために同じ制限酵素で消化した。構築した発現プラスミドをBL21(DE3)に形質転換した後、グリコシル化されていない(aglycosylated)全長トラスツズマブ - Fc5 - 2a抗体を、pHスタット流加発酵によって産生させた。そのトラスツズマブ抗体を、リゾチーム/EDTAを含む緩衝液中でインキュベーションした後、実施例2に記載したような2回の逐次的なクロマトグラフィー工程、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって、E.coliのペリプラズムタンパク質から精製した。トラスツズマブ - Fc5およびトラスツズマブ - Fc2aとは対照的に、トラスツズマブ - Fc5 - 2aは、FcRIならびにFcRIIaおよびFcRIIbに対して高い親和性を示した(図3)。

【0159】

実施例5: Fc5 - 2aを操作するためのerror prone PCRライブラリーの構築

高い配列同一性(96%)および類似のFc結合エピトープを共有するにもかかわらず(図4)、2つの受容体(FcRIIaおよびFcRIIa)は、逆の機能を示す(Rankinら、2006)。FcRIIbよりも活性化FcRIIaに対して高い選択的結合親和性のために、ハイスループットライブラリースクリーニングを行った。標準的な手法(Fromantら、1995)を用いてerror prone PCRライブラリーを作製した。簡潔には、鋳型としてトラスツズマブ - Fc5 - 2a、ならびに2つのプライマーSTJ#485およびSTJ#67を使用してCH2 - CH3領域を無

作為化した。次いで、VH - CH1断片を、プライマーSTJ # 474およびSTJ # 486を使用して鋳型 (pSTJ4 - Herceptin IgG) からPCR増幅した。2つの断片、ヒンジ - CH2 - CH3領域およびVH - CH1領域を、プライマーSTJ # 474およびSTJ # 67を使用する遺伝子アセンブリPCRによってアセンブリして、図5に示されるようなトラストズマブ重鎖 (VH - CH1 - ヒンジ - CH2 - CH3) ライブラリーを作製した。増幅した重鎖ライブラリー遺伝子を、SfiIで消化したpPelBFLAGに連結した。効率的なFc受容体結合を可能にするために、得られたプラスミドを軽鎖プラスミド (pBADPelB - VL - Ck - NlpA - VL - Ck - His) を持つE. coli Jude - 1に形質転換した (その軽鎖プラスミドは、NlpAシグナル配列を用いてIgG軽鎖 (VL - Ck) を内膜のペリプラズム側に共有結合し、同時に、PelBリーダーペプチドを持つ可溶性IgG軽鎖を発現し、それにより、共有結合した四量体の全長IgGが作製された)。最終的なライブラリーの大きさは、無作為に選択された20個のライブラリークローンの配列決定の結果に基づく、遺伝子1つあたり0.5%のエラー率を有している 4.8×10^9 の個々の形質転換体だった。

【0160】

実施例6：FcRIIbよりもFcRIIaに対する選択的結合についてのハイスループットFCASスクリーニング

重鎖Fcライブラリープラスミド (pPelB - VH - CH1 - ヒンジ - CH2 - CH3) と軽鎖プラスミド (pBADPelB - VL - Ck - NlpA - VL - Ck - His) の両方で同時形質転換したE. coli Jude - 1細胞を、2% (w/v) グルコースおよび適切な抗生物質 (50 μ g/mlのクロラムフェニコールおよび50 μ g/mlのカナマイシン) が補充されたTerrific Broth (Becton Dickinson Diagnostic Systems DifcoTM, Sparks, MD) 中において250rpmで振盪させながら37℃で一晩培養した。一晩培養した細胞を、110mlの新しいTerrific Broth中で1:100希釈した。37℃で2時間インキュベーションし、20分間にわたって250rpmで振盪させながら25℃で冷却した後、タンパク質の発現を1mMのイソプロピル - 1 - チオ - D - ガラクトピラノシド (IPTG) で誘導した。20時間にわたるタンパク質の発現の後、36mlの培養液を遠心分離により回収し、6mlの冷却した10mM Tris - HCl (pH 8.0) 中で2回洗浄し、6mlの冷却したSTE溶液 (0.5Mスクロース、10mM Tris - HCl、10mM EDTA, pH 8.0) 中に再懸濁した。その細胞懸濁液を37℃で30分間混合し、12,000 \times gでの1分間の遠心分離によってペレット化し、6mlの冷却したSolution A (0.5Mスクロース、20mM MgCl₂、10mM MOPS, pH 6.8) 中で洗浄した。洗浄した細胞を、1mg/mlのニワトリの卵のリゾチームを含む6mlのSolution Aの中で、37℃で15分間インキュベーションし、12,000 \times gで1分間遠心分離し、6mlの冷却したPBS中に再懸濁することにより、ライブラリースクリーニングの準備が整ったスフェロプラストの溶液を作製した。蛍光活性化細胞選別 (FACS) 用の蛍光リガンドを作製するために、グリコシル化された組換えFcRIIa - GST (Bernitzénら、2005) の細胞外ドメインを、Alexa488標識キット (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用してAlexa488で標識した。競合的スクリーニングを用いて、FcRIIbよりもFcRIIaに対して高い結合親和性を有するクローンを単離した (ここでは、スフェロプラストを、過剰量の非蛍光FcRIIb - GST中で蛍光FcRIIa - GST - Alexa488とともにインキュベーションした) (選別の1回目は、FcRIIa - GST - Alexa488の濃度: 非蛍光FcRIIb - GSTの濃度 = 30nM: 100nM、2回目は10nM: 100nM、3回目は10nM: 100nM、4回目は5nM: 100nM、および5回目は5nM: 200nM)。スクリーニングの1回目は、 4×10^8 個よりも多いスフェロプラストを、励起のための488nmアルゴンレーザーを搭載したMoFloフローサイトメーター (Dako Cytomation, Fort Collins, CO) において選別した。各

10

20

30

40

50

回において、最も高い蛍光を示している集団の上位3%を単離し、最初の選別の直後に再選別した。スフェロプラスト中の重鎖遺伝子(VH-CH1-CH2-CH3)を、回収したスフェロプラストから2つの特異的プライマーSTJ#474およびSTJ#67を使用するPCRによって増幅し、SfiI制限酵素で消化したpPelBFLAG-Fcに連結し、エレクトロコンピテント(electrocompetent)E.coli Jude-1細胞に形質転換した。得られた形質転換体を、クロラムフェニコール含有LB寒天プレート上で増殖させ、この実施例中の前に詳細に記載したように次の回の選別用のスフェロプラストとして再調製した。5回目の選別の後、6個の個々のクローンを単離した(図6)。野生型またはグリコシル化されていないFc5-2aトラスツズマブと比較して、単離されたグリコシル化されていないトラスツズマブFcバリエーションは、100nMのFcRIIb-GSTと競合するとき、FACSによって、20nMの蛍光FcRIIa-GST-Alexa488に対して有意に高い結合を示した(図7)。Fc5-2aに加えて、FACS分析において最も高い蛍光を示すFc1001グリコシル化されていないトラスツズマブは、4つの変異(H268P、E294K、N361SおよびM428L)を含んだ(図8)。

【0161】

実施例7: HEK293F細胞からの変異体IgGの発現および精製

Fc1001、Fc1002、Fc1003、Fc1004(それぞれ配列番号4~7)およびFc2aのFc配列を、PCRによってpPelBFLAG-Fc(STJ#290およびSTJ#498)から増幅し、SalIおよびXbaI制限酵素で消化した。これらの挿入物を、E.coli MC1061から調製した哺乳動物発現ベクターpMAZ-IgH-Herceptinに連結した。pMAZ-IgH-Herceptinは、ヒトIgG1定常ドメインおよびトラスツズマブ(trastuzumab)由来のVHドメインを含む。HEK293F細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含む30mlの培養物を、20μgの重鎖含有プラスミド(pMAZ-IgH-Herceptin)および20μgの軽鎖含有プラスミド(pMAZ-IgL-Herceptin)で6日間にわたって一時的にトランスフェクトし、その時点において、その細胞を、2,000rpmでの10分間の遠心分離によって除去した。上清を、0.45μmのフィルターで濾過し、1mlのImmobilized Protein Aアガロース(Pierce, Rockford, IL)を詰めたポリプロピレンカラムに通した。そのフロースルーを回収し、そのカラムにさらに2回通した後、40mlのpH7.4の10mMリン酸緩衝食塩水を通した。結合した抗体を、1.7mlのpH2.7の100mMグリシンHClで溶離し、その後、150μlのpH8.0の1.0M Trisで中和した。10kDaのカットオフを有する15mlのAmicon Ultraスピンカラム(Millipore, Ireland)を使用して、10mM PBS pH7.4への緩衝液交換を行った。精製された抗体は、SDS-PAGEゲルで泳動したとき、ほぼ完全なアセンブリを示した(図9)。

【0162】

実施例8: FcRIIaおよびFcRIIbに対する変異体IgGの定量的結合親和性

可溶性ヒトFcRIIa^{R131}-GSTまたはFcRIIb-GST(Berntzenら、2005)に対するグリコシル化されていないトラスツズマブ(AglycoT)-Fc2a、Fc1001、Fc1003およびFc1004の結合を、Biacore3000バイオセンサー(Biacore, Piscataway, NJ)を使用する表面プラズモン共鳴により分析した。完全にアセンブリされたAglycoT-Fc2a、Fc1001、Fc1003およびFc1004抗体を、アミンカップリングキットを製造者が推奨するとおり使用してCM-5センサーチップ上に個々に固定化した。HBS-EP緩衝液(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3.4mM EDTAおよび0.005% P20界面活性剤)中で結合実験を行った。可溶性二量体FcRIIa-GSTまたはFcRIIb-GST溶液を、解離時間300秒で

10

20

30

40

50

、30 μ l / 分の流量で60秒間注入した。リガンドの再生を、50 mM グリシン、pH 4.0、50 mM グリシン、pH 9.5 および 3 M NaCl を3連で注入すること（各々2分間）により行った。AglycoT-Fc2a、Fc1001、Fc1003 および Fc1004 と可溶性二量体 FcRIIa-GST との親和性は、それぞれ 120、100、80、60、30 nM、140、120、100、80、40 nM、100、80、60、40、20 nM および 120、100、80、60、30 nM の濃度で可溶性 FcRIIa-GST を2連で、固定化された AglycoT-Fc2a、Fc1001、Fc1003 および Fc1004 の上に30 μ l / 分の流量で60秒間注入することによって得た。AglycoT-Fc2a、Fc1001、Fc1003 および Fc1004 と可溶性二量体 FcRIIb-GST との親和性は、それぞれ 400、300、200、100、50 nM、300、200、100、80、40 nM、120、100、80、60、30 nM および 300、200、100、80、40 nM の濃度で可溶性 FcRIIb-GST を2連で、固定化された AglycoT-Fc2a、Fc1001、Fc1003 および Fc1004 の上に30 μ l / 分の流量で60秒間注入することによって得た。ウシ血清アルブミンを結合させた表面の上にサンプルを流すことによって応答を取得し、ならびに緩衝液を用いたトレースを結合曲線から引き算した。平衡解離定数 (K_D) を、BIAevaluation 3.0 ソフトウェアにより提供される二価分析物フィッティングモデル (bivalent analyte fitting model) に対して上記応答をフィットさせることにより決定した。このモデルのフィッティングによって返される結合親和性は、これらの実験では二量体構築物を使用しているにもかかわらず、単量体受容体相互作用の代表値である。

【0163】

SPR 分析から、Fc2a および Fc1004 が、それぞれ 1000 nM および 240 nM という K_D 値で FcRIIa に対して高い親和性を示すことが明らかになった (k_{on} , Fc2a = $3.00 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 k_{off} , Fc2a = $3.00 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$; k_{on} , Fc1004 = $1.46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 k_{off} , Fc1004 = $3.51 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$) (表4、図10)。このデータは、Fc2a から Fc1000 シリーズへの FcRIIa に対する親和性の改善が、解離速度 (off-rate) に起因する一方で、FcRIIb に対する K_D の変化は、結合速度 (on-rate) と解離速度の両方に起因することを示唆している。また、選択された Fc 変異体 (Fc2a、Fc1001、Fc1003 および Fc1004) の AglycoT 形式の解離定数を比較することにより、阻害性 Fc ガンマ受容体 I Ib よりも活性化 Fc ガンマ受容体 I Ia に対する結合の改善のために最適化された Fc ドメインを特定した (表4)。その結果として、AglycoT-Fc1004 は、AglycoT-Fc2a と比較して $18.5 / 3.9 = 4.7$ 倍、FcRIIb よりも FcRIIa に対して相対的な親和性の増強を示した。ELISA では、どの変異体についても FcRIIa への結合は観察されなかった。

【0164】

実施例9: FcRIIb よりも FcRIIa に対して高い結合親和性を示すグリコシル化されていない Fc バリエント IgG をスクリーニングするための最適化されたシステムの開発

FcRIIb よりも FcRIIa に対する変異体の結合をさらに改善するために、高次の多量体化を通じて IgG に対する FcRIIb の見かけの親和性を高めることによって FACS 選別中のより高い淘汰圧が達成され得る。このために、高いアビディティを有する四量体 FcRIIb 複合体が、その C 末端をストレプトアビジンのモノマーと融合することによって発現された。FcRIIb を、pSTJ1-FcRIIb-His (WK # 27 および WK # 28) から増幅し、pBAD30-Km-DsbA-FcRIIa-Streptavidin-His (WK # 29 および WK # 30) から増幅された C 末端のストレプトアビジンモノマーと遺伝子アセンブリした。完成した断片を、pMaz-IgH-Herceptin に連結するために BssHII および Xb

a Iで消化した。HEK293F細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA) における一時的なトランスフェクションのために、40 μ gのプラスミドを調製した。6日間の発現の後、その細胞を2000 rpmでの10分間の遠心分離によってペレット化した。上清を0.45 μ mのフィルターで濾過し、10 mMという最終濃度までイミダゾールを添加した。その溶液を、20 mMイミダゾール (pH 8) を含むPBSで事前に平衡化させた1 mlのニッケルNTA樹脂 (Qiagen, Germany) を含むポリプロピレンカラムに3回通した。次いで、そのカラムを、20 mMイミダゾールを含む40 mlのPBSで洗浄し、結合した受容体を、pH 8.0の250 mMイミダゾールを含む2 mlのPBSで溶離した。10 kDaのカットオフを有する15 mlのAmicon Ultraスピナカラム (Millipore, Ireland) を使用して、10 mM PBS pH 7.4への緩衝液交換を行った。SDS-PAGEゲルによる分析は、100°Cで5分間変性すると単量体型に変換される上記四量体の形成を示した (図11)。

ヒトIgGに対する四量体Fc RIIb複合体の親和性を、ELISAで二量体Fc RIIb-GSTと比較した。0.05 M Na_2CO_3 緩衝液 (pH 9.5) 中の50 μ lの4 μ g/mlの臨床グレードのグリコシル化されたIgGトラスツズマブを使用して、4で16時間インキュベーションすることによって96ウェルポリスチレンELISAプレート (Corning, Corning, NY) をコーティングした。そのプレートを、室温において2時間、1%脱脂粉乳が補充された1 x PBS (pH 7.4) でブロッキングし、0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄した後、そのプレートを、段階希釈したFc RIIb-GST (Berntzenら、2005) またはFc RIIb-Strepとともに室温で1時間インキュベーションした。そのプレートを1 x PBSTで6回洗浄し、1:5, 000希釈した抗ECS抗体HRP結合体 (Bethyl Laboratories, TX, USA) を添加した。再度6回洗浄した後、そのプレートを、Ultra-TMB基質 (Pierce, Rockford, IL) を使用して現像した。ELISAの現像後、四量体複合体は、二量体構築物よりも有意に高い親和性を示したことから、FACSスクリーニングに適しているはずである (図12)。

【0165】

実施例10: Fc RIIbよりもFc RIIaに対して高い親和性を示すグリコシル化されていないトラスツズマブFcバリエーションのための選択されたFc領域の配列

Fc RIIbよりもFc RIIaに対して高い親和性を示すグリコシル化されていないトラスツズマブFcバリエーションは、Fcドメインの野生型配列 (タンパク質配列 # 1) と比較していくつかの置換変異を有する。単離された変異体に対するFc領域配列 (タンパク質配列 # 2、3、4、5、6、7および8) を表3にまとめる。

【0166】

【表 3 - 1】

表1. 本研究において使用したプライマー

プライマー の名称	プライマーのヌクレオチド配列 (5' → 3')	
STJ#67	AATTCGGCCCCCGAGGCCCTTTACCCGGGGACAGGGAGAGGCTCTTC TGCGTG (配列番号 :10)	
STJ#144	TTTAGGGGTCGACGACAAACTCACACATGCCCACCGTG (配列番号 :11)	
STJ#145	TTTAAGGGAAGCTTCTATTAGGCGCGCCCTTTGTCATCG (配列番号 :12)	10
STJ#147	GGCAAATTCTGTTTTATCAGACCGCTTCTG (配列番号 :13)	
STJ#220	CAATTTTGTCAGCCGCTGAGCAGAAG (配列番号 :14)	
STJ#290	TTTAGGGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTC ACACATGCCCACCG (配列番号 :15)	
STJ#291	GGCCACCGGATATCTTATTATTACCCGGGGACAGGGAGAGG (配列番号 :16)	
STJ#422	CTAGGGAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACGGCGCGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTC (配列番号 :17)	
STJ#474	CGCAGCGAGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTTCAATTAGTGGAATC TG (配列番号 :18)	20
STJ#485	CGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG (配列番号 :19)	
STJ#486	CACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTGTG (配列番号 :20)	
STJ#498	TTTAGGGTCT AGA TCATTACCCGGGGACAGGGAGAGG (配列番号 :21)	
WK#27	CTCTCCACAGGCGCGCACTCCACACCTGCAGCTCCCCCAAAGG (配列番号 :22)	
WK#28	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAAGTCAGATCCGGGAGCTTGGACAGTGAT GGTCACAG (配列番号 :23)	
WK#29	GGATCTGACTACAAGGATGACGACGATAAGGACCCGTCTAAAGATAG CAAGGCACAAG (配列番号 :24)	30
WK#30	ATCAGCGAGCTTCTAGATCATTAGTGGTGATGATGGTGGTGAGAG (配列番号 :25)	

【 0 1 6 7 】

【表 3 - 2】

表 2. 本研究において使用したプラスミド

プラスミド	関連する特徴	参考文献または供給源	
pPe1BFLAG	Cm ^r , lacプロモーター, tetA遺伝子, skp遺伝子, C末端FLAGタグ	(Jungら、2010)	
pPe1BFLAG-Fc	pPe1BFLAG中のIgG1-Fc遺伝子	(Jungら、2010)	
pPe1BFLAG-Fc5	pPe1BFLAG中のIgG1-Fc5遺伝子	(Jungら、2010)	
pPe1BFLAG-Fc2a	pPe1BFLAG中のIgG1-Fc2a遺伝子	本研究	10
pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360中のM18.1ヒト化IgG1遺伝子	(Mazor ら、2007)	
pSTJ4-Herceptin IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1遺伝子	(Jungら、2010)	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc5	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc5遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc2a遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc5-2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc5-2a遺伝子	本研究	
pPe1B-Herceptin(H)-FLAG	pPe1BFLAG中のIgG1重鎖遺伝子	本研究	20
pPe1B-Herceptin(H)-Fc5-FLAG	pPe1BFLAG中のIgG1-Fc5重鎖遺伝子	本研究	
pPe1B-Herceptin(H)-Fc2a-FLAG	pPe1BFLAG中のIgG1-Fc2a重鎖遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1遺伝子	(Jungら、2010)	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc5	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc5遺伝子	(Jungら、2010)	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブ(Trastuzumba) IgG1-Fc2a遺伝子	本研究	30
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc5-2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc5-2a遺伝子	本研究	
pDsbA	pTrc99A中のDsbAシグナル配列遺伝子	(Jungら、2010)	
pDsbA-Fc-FLAG	pTrc99A中の、DsbA融合IgG1-Fc遺伝子, C末端FLAGタグ	(Jungら、2010)	
pDsbA-Fc5-FLAG	pTrc99A中の、DsbA融合IgG1-Fc5遺伝子, C末端FLAGタグ	本研究	
pDsbA-Fc2a-FLAG	pTrc99A中の、DsbA融合IgG1-Fc2a遺伝子, C末端FLAGタグ	本研究	40
pBAD30	Apr, BADプロモーター	(Guzman ら、1995)	
pBAD30-KmR	Km ^r , BADプロモーター	(Jungら、2007)	

【 0 1 6 8 】

【表 3 - 3】

pBAD-Pe1B-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-His	pBAD30-KmR中の、Pe1B融合トラスツズマブ VL-CkドメインおよびNlpA融合トラスツズマブVL-Ck-His	本研究
pSTJ1-FcγRIIb-His	C末端Hisタグを持つhFcγRIIb遺伝子	本研究
pBAD30-Km-DsbA-FcγRIIIa-Streptavidin-His	C末端ストレプトアビジンモノマーHis融合物を持つhFcγRIIIa遺伝子	本研究
pMaz-IgH-Herceptin	pMaz-IgH中のトラスツズマブIgG1重鎖	(Benhar および Mazor, 2008;U. S. Publ.n. 20080292646)

10

【 0 1 6 9 】

【表 3 - 4】

表 3 : FcγRIIbよりもFcγRIIaに対して高い親和性を付与するFc領域変異

Fc変異体	変異
Fc1001	H268P, S298G, T299A, E294K, N361S, E382V, M428L (配列番号4)
Fc1002	S298G, T299A, N315D, E382V, M428L (配列番号5)
Fc1003	S298G, T299A, K392E, E382V, V397M, M428L (配列番号6)
Fc1004	S298G, T299A, E382V, N390D, M428L (配列番号6)
Fc1005	S298G, T299A, E382V (配列番号8)
Fc1006	V263E, S298G, T299A, E382V (配列番号9)

20

【 0 1 7 0 】

【表 4】

表 4：FcγRIIa および FcγRIIb に対するグリコシル化されていない Fc パリアントの、SPR 由来の解離定数。動力学的な結合速度および解離速度を、上記二価モデルを使用して SPR によって測定した。

リガンド ^a	分析物	k_{on} (M ⁻¹ sec ⁻¹) _b	k_{off} (sec ⁻¹) _b	K_D (nM) _b	K_{D2b}/K_{D2a} _c	Chi ²
AglycoT-Fc2a	FcγRIIa-GST	3.00×10^4	3.00×10^{-2}	1000	3.9	1.91
	FcγRIIb-GST	8.78×10^3	3.42×10^{-2}	3895		0.94
AglycoT-Fc1001	FcγRIIa-GST	3.46×10^4	3.52×10^{-3}	102	9.6	0.79
	FcγRIIb-GST	1.99×10^4	1.94×10^{-2}	975		0.99
AglycoT-Fc1003	FcγRIIa-GST	2.03×10^4	7.9×10^{-3}	389	3.56	1.35
	FcγRIIb-GST	6.26×10^3	8.66×10^{-3}	1383		1.2
AglycoT-Fc1004	FcγRIIa-GST	1.46×10^4	3.51×10^{-3}	240	18.5	1.67
	FcγRIIb-GST	2.52×10^3	1.12×10^{-2}	4444		1.82

^a CM5 チップ上に固定化されたリガンド：AglycoT-Fc2a、グリコシル化されていない Fc2a トラストズマブ；AglycoT-Fc1001、グリコシル化されていない Fc1001 トラストズマブ；AglycoT-Fc1003、グリコシル化されていない Fc1003 トラストズマブ；AglycoT-Fc1004、グリコシル化されていない Fc1004 トラストズマブ

^b これらの定数は二価分析物フィッティングに起因して単量体の値に相当することに注意。

^c FcγRIIb-GST に対する K_D 値と FcγRIIa-GST に対する K_D 値との比

【0171】

本明細書中に開示され特許請求された方法の全ては、本開示を考慮して、過度の実験を伴わずに行うことができ、実行することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される方法および本明細書に記載される方法、および工程に、または本明細書中に記載される方法の工程の順序に変更を適用することができることは、当業者に明らかである。さらに詳細には、化学的かつ生理学的の両方に関連する特定の作用物質を、本明細書中に記載される作用物質の代用とされる場合があり、それでも、同じまたは類似する結果が得られることは、明らかである。当業者に明らかであるこのような類似の代用品および改変はすべて、添付の特許請求の範囲により定義されるような、本発明の趣旨、範囲、および概念内にあるとみなされる。

【0172】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書中に示した手順または他の詳細を補足する例示的な手順または他の詳細を提供する程度まで、引用により本明細書中に組み入れられる。

【0173】

【化 1】

U.S. Patent 3,817,837
U.S. Patent 3,826,364
U.S. Patent 3,850,752
U.S. Patent 3,939,350
U.S. Patent 3,996,345
U.S. Patent 4,275,149
U.S. Patent 4,277,437
U.S. Patent 4,284,412
U.S. Patent 4,366,241
U.S. Patent 4,472,509
U.S. Patent 4,498,766
U.S. Patent 4,661,913
U.S. Patent 4,683,195
U.S. Patent 4,683,202
U.S. Patent 4,714,682
U.S. Patent 4,767,206
U.S. Patent 4,774,189
U.S. Patent 4,800,159
U.S. Patent 4,857,451
U.S. Patent 4,883,750
U.S. Patent 4,938,948
U.S. Patent 4,988,618
U.S. Patent 4,989,977
U.S. Patent 5,021,236
U.S. Patent 5,160,974
U.S. Patent 5,302,523
U.S. Patent 5,322,783
U.S. Patent 5,384,253

10

20

30

40

【 0 1 7 4 】

【化 2】

U.S. Patent 5,464,765

U.S. Patent 5,478,722

U.S. Patent 5,538,877

U.S. Patent 5,538,880

U.S. Patent 5,550,318

U.S. Patent 5,563,055

U.S. Patent 5,567,326

U.S. Patent 5,580,859

U.S. Patent 5,589,466

U.S. Patent 5,610,042

U.S. Patent 5,656,610

U.S. Patent 5,702,932

U.S. Patent 5,736,524

U.S. Patent 5,779,907

U.S. Patent 5,780,448

U.S. Patent 5,789,215

U.S. Patent 5,824,520

U.S. Patent 5,843,650

U.S. Patent 5,846,709

U.S. Patent 5,846,783

U.S. Patent 5,849,497

U.S. Patent 5,849,546

U.S. Patent 5,849,547

U.S. Patent 5,858,652

U.S. Patent 5,866,366

U.S. Patent 5,882,864

U.S. Patent 5,912,148

U.S. Patent 5,916,776

U.S. Patent 5,916,779

U.S. Patent 5,922,574

U.S. Patent 5,928,905

U.S. Patent 5,928,906

U.S. Patent 5,932,451

U.S. Patent 5,935,825

【 0 1 7 5 】

10

20

30

40

50

【化 3】

- U.S. Patent 5,939,291
- U.S. Patent 5,942,391
- U.S. Patent 5,945,100
- U.S. Patent 5,981,274
- U.S. Patent 5,994,624
- U.S. Patent 7,094,571 10
- U.S. Patent 7,094,571
- U.S. Patent Publ. 20030180937
- U.S. Patent Publ. 20030219870
- U.S. Patent Publ. 20050260736
- U.S. Patent Publ. 20060173170
- U.S. Patent Publ. 20080292646
- Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990. 20
- Ahouse *et al.*, *J. Immunol.*, 151:6076-6088, 1993.
- Allen and Seed, *Nucleic Acids Res.*, 16:11824, 1988.
- Andersen *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 36:3044-3051, 2006.
- Andersen *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 36:3044-3051, 2006.
- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- Atherton *et al.*, *Biol. Reprod.*, 32(1):155-171, 1985.
- Ausubel *et al.*, *In: Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994. 30
- Baneyx and Mujacic, *Nat. Biotechnol.*, 22:1399-1408, 2004.
- Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berntzen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 298:93-104, 2005.
- Better *et al.*, *Science*, 240: 1041-10433, 1988.
- Bocek and Pecht, *FEBS Lett.*, 331, 86-90, 1993.
- Bocke *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 186, 1982. 40
- Boss *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:3791-3806, 1984.
- Bowden and Georgiou, *J. Biol. Chem.*, 265:16760-16766, 1990.
- Bukau *et al.*, *J. Bacteriol.*, 163:61, 1985.
- Burman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 112:1364, 1972.
- Cabilly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3273-3277, 1984.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.*, 177:75-82. 1999

【化 4】

- Chames *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:7969-7974, 2000.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Cocca, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Collins *et al.*, *Immunogenetics*, 45:440-443, 1997.
- Daugherty *et al.*, *Protein Eng.*, 12:613-621, 1999.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993. 10
- de Kruif and Logtenberg, *J. Biol. Chem.*, 271:7630-7634, 1996.
- Decad and Nikaido, *J. Bacteriol.*, 128:325, 1976.
- Dcsai *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2417-2425, 1998.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(34):20638-20642, 1989.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol Biol*, 109:215-237, 1999.
- Eigenbrot *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 229:969-995, 1993.
- Elbein *et al.*, *Glycobiology*, 13:17R-27, 2003. 20
- European Appln. 320 308
- European Appln. 329 822
- Fahnestock *et al.*, *J. Bacteriol.*, 167:870-880, 1986.
- Farmer *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 176:11, 1999.
- Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10444-10448, 1993.
- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 30
1990.
- Fromant *et al.*, *Analytical Biochem.*, 224:347-353, 1995.
- Fromant *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 224:347-353, 1995.
- Garinot-Schneider *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 260:731-742, 1996.
- GB Appln. 2 202 328
- Georgiou and Segatori, *Current Opin. Biotech.*, 16:538-545, 2005.
- Ghetie and Ward, *Annu. Rev. Immunol.*, 18:739-766, 2000. 40
- Ghetie and Ward, *Annu. Rev. Immunol.*, 18:739-766, 2000.
- Gomi *et al.*, *J. Immunol.*, 144:4046-4052, 1990.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Griffiths and Duncan, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:102-108, 1998.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12):1271-1285, 1993.

【化 5】

- Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:4121-30, 1995.
- Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:4121-4130, 1995.
- Halloran *et al.*, *J. Immunol.*, 153:2631-2641, 1994.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Harvey *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 308:43-52, 2006.
- Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9193-9198, 2004. 10
- Hayhurst *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 276:185-196, 2003.
- Hayhurst *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 276:185-196, 2003.
- Hayhurst *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 276:185-196, 2003.
- Hobot *et al.*, *J. Bacteriol.*, 160:143, 1984.
- Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388, 1992.
- Hoogenboom *et al.*, *Immunotechnology.*, 4:1-20, 1998.
- Hoover and Lubkowski, *Nucl. Acids Res.*, 30:c43, 2002.
- Hoover and Lubkowski, *Nucleic Acids Res.*, 30:c43, 2002. 20
- Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Irvin *et al.*, *J. Bacteriol.*, 145:1397, 1981.
- Jefferis, *Biotechnol. Prog.*, 21:11-16, 2005.
- Jeong and Lee, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1295-1298, 2003.
- Jouenne and Junter, *FEMS Microbiol. Lett.*, 56:313, 1990.
- Jung *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 98:39-47, 2007
- Jung *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 31:240-246, 2003. 30
- Jung *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 604-609, 2010.
- Kabat *et al.*, In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. of Health and Hum. Serv., Bethesda, 1991.
- Kaepler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawarasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31:c126, 2003. 40
- Khatoon *et al.*, *Ann. Neurol*, 26(2):210-215, 1989.
- Kim *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:2429-2434, 1994.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(17):10210-10218, 1989.
- Kipriyanov and Little, *Mol. Biotechnol.*, 12:173-201, 1999.
- Kjaer *et al.*, *FEBS Lett.*, 431:448-452, 1998.
- Knight *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1271-1281, 1995.

【 0 1 7 8 】

【化 6】

- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kouzarides and Ziff, *Nature*, 336:646-6451, 1988.
- Kuroda *et al.*, *Lancet.*, 357:1225-1240, 2001.
- Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.
- Labischinski *et al.*, *J. Bacteriol.*, 162:9, 1985.
- Landschulz *et al.*, *Science*, 240:1759-1764, 1988.
- Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4005-4010, 2006. 10
- Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4005-4010, 2006.
- Lci *et al.*, *J. Bacteriol.*, 169:4379-4383, 1987.
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Li *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 337:743-759, 2004.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Marciano *et al.*, *Science*, 284:1516, 1999. 20
- Masaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 13:1623-1635, 1985.
- Mazor *et al.*, *Nat. Biotech.*, 25(5):563-565, 2007.
- Mazor *et al.*, *Nat. Biotech.*, 25:563-5, 2007.
- Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220, 1980.
- Nagaoka and Akaike, *Protein Engineering*, 16: 243-245, 2003.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987. 30
- Nikaido and Nakae, *Adv. Microb. Physiol.*, 20:163, 1979.
- Nikaido and Vaara, *Microbiol. Rev.*, 49:1, 1985.
- Nikaido, *J. Bacteriology*, 178(20):5853-5859, 1996.
- O'Brien *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 24 :43-50, 2002.
- Ober *et al.*, *J. Immunol.*, 172:2021-2029, 2004b.
- Ober *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:11076-11081, 2004a.
- Olsson *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 168:319-324, 1987.
- Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837, 1989. 40
- Osborn *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 247:3973-3986, 1972.
- Owens and Halcy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142(3):964-971, 1987.
- Painbeni *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6712, 1997.
- Pavlou and Belsey, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59:389-396, 2005.
- PCT Appln. PCT/US87/00880

【 0 1 7 9 】

【化 7】

PCT Appln. PCT/US89/01025

PCT Appln. WO 88/10315

PCT Appln. WO 89/06700

PCT Appln. WO 90/07641

PCT Appln. WO 93/06213

PCT Appln. WO 94/09699

PCT Appln. WO 95/06128

10

Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.

Potter and Halcy, *Methods Enzymol*, 91:613-633, 1983.

Purvis *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3761-3769, 2005.

Raghavan and Bjorkman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:181-220, 1996.

Rao and Torriani, *J. Bacteriol.*, 170, 5216, 1988.

Rankin *et al.*, *Blood* 108: 2384-2391, 2006.

Ravetch and Perussia *et al.*, *J. Exp. Med.*, 170:481-497, 1989.

20

Ravetch *et al.*, *Science*, 234:718-725, 1986.

Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Rodewald, *J. Cell Biol.*, 71:666-669, 1976.

Ruhlmann *et al.*, *FEBS Lett.*, 235:262-266, 1988.

Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sazinsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:20167-20172, 2008.

30

Schierle *et al.*, *J. Bacteriol.*, 185:5706-5713, 2003.

Sears *et al.*, *J. Immunol.*, 144:371-378, 1990.

Sergina and Moasser, *Trends in Molec. Med.*, 13:527-534, 2007.

Sergina, and Moasser, *Trends in Molec. Med.*, 13:527-534, 2007.

Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604, 2001.

Shuttleworth *et al.*, *Gene*, 58(2-3):283-295, 1987.

Simister and Mostov, *Nature*, 337(6203):184-187, 1989.

40

Sondermann *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 309:737-749, 2001.

Stenberg *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 6:1185-1194, 1992.

Stengelin *et al.*, *Embo J.*, 7:1053-1059, 1988.

Stuart *et al.*, *Embo J.*, 8:3657-3666, 1989.

Stuart *et al.*, *J. Exp. Med.*, 166:1668-1684, 1987.

Tominaga *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168:683-689, 1990.

【 0 1 8 0 】

50

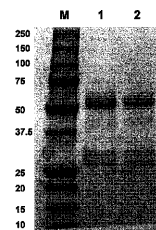
【化 8】

- Uhlen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259:1695-702, 1984.
 Van Wielink and Duine, *Trends Biochem Sci.*, 15:136, 1990.
 Wada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:17353-17357, 1999.
 Walker *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 20(7):1691-1696, 1992.
 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
 Wright and Morrison, *Trends Biotech.*, 15:26-32, 1997.
 Zeger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3425-3429, 1990.
 Zhang *et al.*, *Immunogenetics*, 39:423-437, 1994.
 Zhang *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 4):985-991, 1998.

10

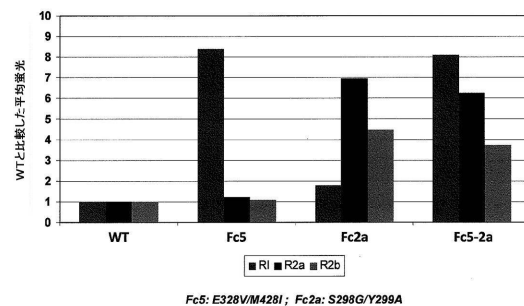
【図 1】

Figure 1.



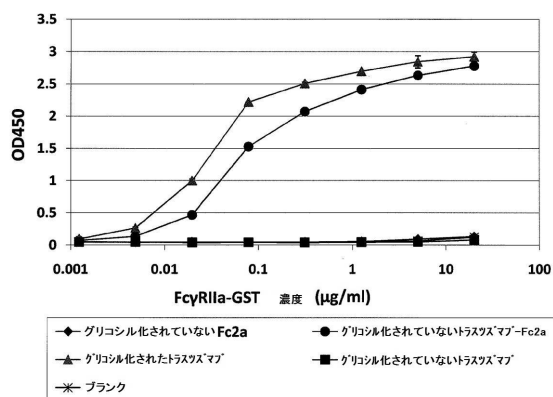
【図 3】

Figure 3.



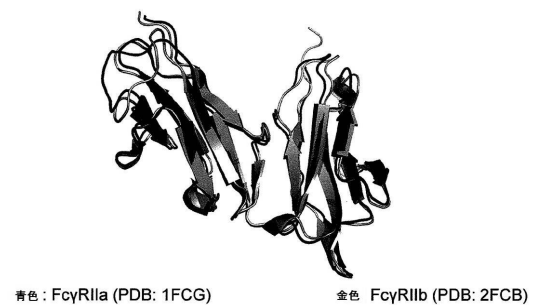
【図 2】

Figure 2.



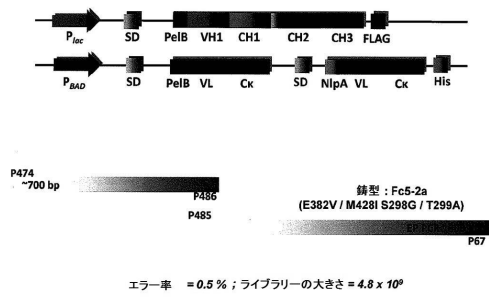
【図 4】

Figure 4.



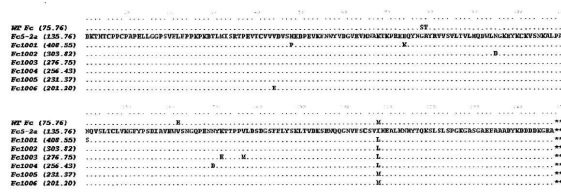
【図 5】

Figure 5.

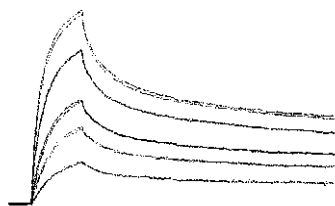


【図 6】

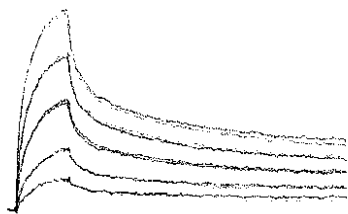
Figure 6.



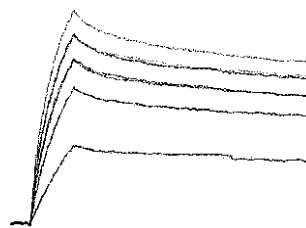
【図10A】

A

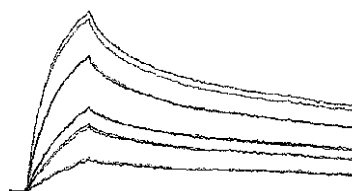
【図10B】

B

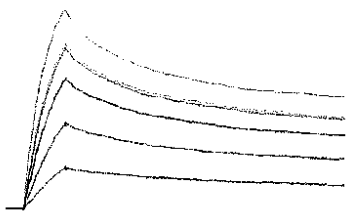
【図10C】

C

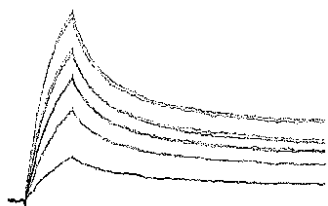
【図10D】

D

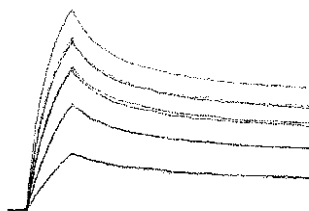
【図10E】

E

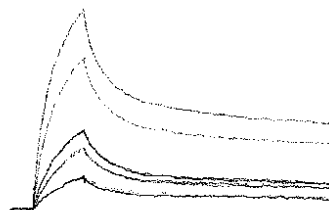
【図10F】

F

【図10G】

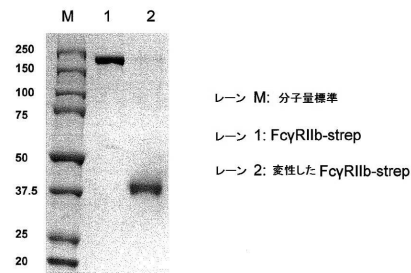
G

【図10H】

H

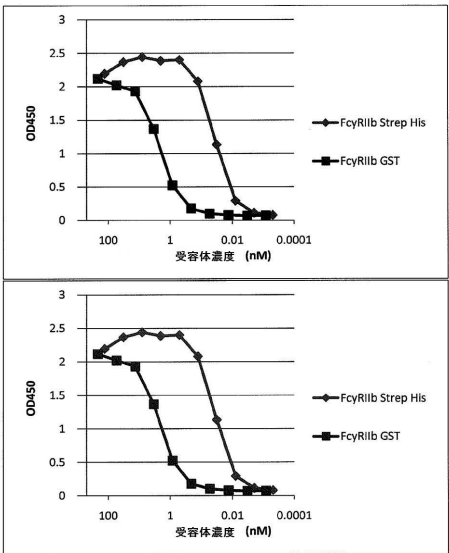
【 図 1 1 】

Figure 11.



【 図 1 2 】

Figure 12.



【 配列表 】

0006228014000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
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	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 ジョルジオ, ジョージ
 アメリカ合衆国 テキサス 78712, オースティン, 1 ユニバーシティー ステーション シー0400, デパートメント オブ バイオメディカル エンジニアリング, イーエヌエス 617エー, ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン 気付
- (72)発明者 チョン, サン テク
 アメリカ合衆国 テキサス 78759, オースティン, ジョリービル ロード 10926, アpartment 1001
- (72)発明者 ケルトン, ウィリアム
 ニュージーランド ハミルトン 3285, アーサー ロード 119, アールディー5
- (72)発明者 カン, テ ヒュン
 アメリカ合衆国 テキサス 78703, オースティン, レイク オースティン ブールバード 3450, アpartment ディー

合議体

審判長 田村 明照
 審判官 高堀 栄二
 審判官 山本 匡子

- (56)参考文献 国際公開第2009/079242(WO, A2)
 特表2007-525443(JP, A)
 国際公開第2011/008517(WO, A2)
 国際公開第2008/114011(WO, A2)
 国際公開第2008/137475(WO, A2)
 国際公開第2008/150494(WO, A1)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008年, Vol. 105, No. 51,
 p. 20167-20172

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90
 C07K16/28
 CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
 PubMed
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq