

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6449229号
(P6449229)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K	16/00	(2006.01)	C O 7 K	16/00	Z N A
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K	16/28	
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K	16/46	
C O 7 K	16/34	(2006.01)	C O 7 K	16/34	
C O 7 K	16/24	(2006.01)	C O 7 K	16/24	

請求項の数 22 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-503152 (P2016-503152)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
 (65) 公表番号 特表2016-514691 (P2016-514691A)
 (43) 公表日 平成28年5月23日 (2016.5.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/029585
 (87) 国際公開番号 W02014/144960
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)
 審査請求日 平成29年3月10日 (2017.3.10)
 (31) 優先権主張番号 61/791,624
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509189086
 アッヴィ・バイオセラピューティクス・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94063、レッドウッド シティ、シーポート ブールバード 1500
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ハーディング、フィオナ・エイ
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・94041、マウンテン・ビュー、カルデロン・アベニュー・543

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FC変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 の C H 2 ドメインと比較して、

(a) 以下の (i) ~ (v) から選択される置換、

(i) V 2 7 3 E、
 (ii) V 2 7 3 F、
 (iii) V 2 7 3 M、
 (iv) V 2 7 3 S または
 (v) V 2 7 3 Y、

または

(b) 以下の (i) ~ (v) から選択される置換の組合せ、

(i) V 2 6 3 L および V 2 7 3 E、
 (ii) V 2 6 3 L および V 2 7 3 F、
 (iii) V 2 6 3 L および V 2 7 3 M、
 (iv) V 2 6 3 L および V 2 7 3 S、または
 (v) V 2 6 3 L および V 2 7 3 Y、

を有する C H 2 ドメインを含む抗体。

【請求項 2】

配列番号 2 の C H 2 ドメインと比較して、V 2 6 3 L 置換を有する C H 2 ドメインを含む抗体であって、C D 4 0 に特異的に結合する抗体。

【請求項 3】

配列番号 2 の C H 2 ドメインと比較して、V 2 6 3 L 置換を有する C H 2 ドメインを含む抗体であって、C D 2 8、P D - 1、C T L A - 4、C D 8 0、C D 8 6、T I M 3、O X 4 0、4 - 1 B B、G I T R、C D 2 7、B 7 - H 4 および D C - S I G N から選択される副刺激分子に特異的に結合する抗体。

【請求項 4】

C H 2 ドメインが T 2 5 0 Q および M 4 2 8 L を含む F c ドメインの一部である、請求項 1 - 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

C D 4 0、C D 2 5、C D 3、H L A 分子、副刺激分子、サイトカイン、ケモカイン、接着分子、活性化マーカーまたは免疫調節性タンパク質に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 6】

エフェクター部分または検出可能な標識に連結されている請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の抗体を含むコンジュゲート化合物。

【請求項 7】

請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の抗体および医薬として許容される担体または請求項 6 に記載のコンジュゲート化合物を含む医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

20

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを含む原核生物の宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 9 に記載のベクターを含む真核生物の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 8 に記載の核酸を発現するように操作された真核生物の宿主細胞。

【請求項 13】

哺乳動物の宿主細胞である、請求項 12 に記載の真核生物の宿主細胞。

30

【請求項 14】

抗体の生成方法であって、(a) 請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を発現するように操作された真核生物の宿主細胞を培養すること、および (b) 抗体を回収することを含む方法。

【請求項 15】

免疫障害またはがんを治療する必要がある患者の治療に使用するための、請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 6 に記載のコンジュゲート化合物または請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

抗体が抗 C D 4 0 抗体であり、

40

がんが、慢性リンパ球性白血病、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、T 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ワルデンストレームマクログロブリン血症、カボジ肉腫から選択されてもよい血液がん、または卵巣がん、乳がん、肺がん、黒色腫、膵がんおよび腎臓がんから選択されてもよい固形腫瘍がんである、請求項 15 に記載の抗体、コンジュゲート化合物または医薬組成物。

【請求項 17】

副刺激分子が、C D 2 8、P D - 1、C T L A - 4、C D 8 0、C D 8 6、T I M 3、O X 4 0、4 - 1 B B、G I T R、C D 2 7、B 7 - H 4 および D C - S I G N から選択される、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 18】

50

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 - 5 および 17 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 19】

抗体が二重特異的抗体である、請求項 1 - 5、17 および 18 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 20】

抗体がヒト化されている、請求項 18 または 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

抗体が CD40 に特異的に結合する、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

配列番号 2 の CH2 ドメインと比較して、V273E 置換を有する、請求項 21 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 § 119(e) 条の下、2013 年 3 月 15 日に出願され、参照により全体が組み込まれる、仮出願第 61/791,624 号の権益を主張する。

【0002】

2. 配列表

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出された、およびここに参照により全体が組み込まれる配列表を含む。2014 年 3 月 13 日に作製された前記 ASCII コピーは、381493-884WO(125234) __SL.txt と名付けられ、サイズは 31,705 バイトである。

【背景技術】

【0003】

3. 背景

抗体の結晶性断片(「Fc」)領域は、抗体の 2 つの重鎖の第 2 および第 3 の定常ドメインに由来する 2 つの同一のタンパク質断片で構成される。Fc 領域は、Fc 受容体(「FcR」)として知られる免疫細胞上の受容体に結合して、活性化シグナルおよび阻害シグナルをもたらす。例えば、FcRIIA(CD16 または CD16a としても知られる)は、ナチュラルキラー細胞およびマクロファージで見出され、Fc 領域に低い親和性を有する。FcRIIA 受容体への Fc リガンドの結合は、抗体依存細胞媒介細胞傷害性(ADCC)の誘導およびマクロファージによるサイトカイン放出の誘導をもたらすことができる。対照的に、FcRIIB 受容体(CD32b としても知られる)は、マクロファージ、好中球、B 細胞および好酸球で見出され、FcRIIB 受容体への Fc リガンドの結合は細胞活性を阻害する。

【0004】

異なる FcR による影響を受ける下流シグナル伝達の差は、構造差に基づく。FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32)、FcRIIA(CD16a)および FcRIIIB(CD16b)を含む Fc ガンマ受容体(「FcR」)ファミリーの中で、Fc 受容体は免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)として知られるモチーフを通して活性化シグナルを生成する。FcRIIA、FcRI および FcRIIA の全ては、それらの ITAM を通して、または ITAM 含有サブユニットとの相互作用によって活性化シグナルを生成する。あるいは、Fc 受容体は、阻害シグナルを生成する免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を含有することができる。FcRIIB1 および FcRIIB2、あるいは FcRIIB のスプライシングされた形(「FcRIIB」と総称される)は ITIM 配列を有し、したがって阻害 Fc 受容体として機能する(Blankら、2009、Immunol Rev. 232(1): 59-71 頁を参照)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

抗体のFc領域を変化させることによって、抗体治療効力を増加させ、抗体半減期を増加させ、望ましくない副作用を低減するために、改良を加えることができる。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Blankら、2009、Immunol Rev. 232 (1) : 59 - 71 頁

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

10

【 0 0 0 7 】

4 . 要旨

FcRIIIAは、免疫細胞、特にADCCを媒介する細胞を活性化するシグナルを生成するので、FcRIIIAへのFc結合を減少させることは免疫細胞活性化の減少およびADCCレベルの低減になると考えられている。さらに、FcRIIBは免疫細胞を阻害するシグナルを生成するので、FcRIIBへのFc結合を増加させることに加えてFcRIIIAへのFc結合を減少させることの二重の作用は、単一の受容体の結合をモジュレートすることと比較して免疫細胞活性化のより大きな阻害をもたらす。本発明者らは、Fc分子のCH2ドメインで両方のFc受容体への結合に影響する単一のアミノ酸置換または点突然変異を同定した。例えば、下でさらに詳細に議論されるように、単一の位置（例えば、V263）のアミノ酸置換はFcRIIBへの結合を有意に増加させることができ、およびFcRIIIAへの結合を減少させることができる。抗体および他のFcをベースとした治療分子へのそのようなアミノ酸置換の組み込みは、単一の受容体への結合をモジュレートする置換と比較して、免疫細胞活性化のより大きな阻害を有する変異体ポリペプチドをもたらすことができる。変異体ポリペプチドは、免疫活性化の誘導が望ましくない適応症の処置のために、例えば免疫障害の処置で特に適している。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

したがって、一態様では、本開示は、対応する野生型CH2（配列番号2）またはFc領域（配列番号1）の結合と比較してFcRIIBへの結合を増加させおよび/またはFcRIIIAへの結合を低減するアミノ酸置換を含む、改変（または変異体）CH2ドメインまたは全Fcドメインを含むポリペプチド（「変異体ポリペプチド」または「変異体Fcポリペプチド」と総称する）を提供する。開示のポリペプチドは単量体または多量体（例えば、二量体または四量体）であってもよく、各単量体単位は1つ以上のCH2またはFcドメインを含む。開示のポリペプチドは、一般的に、開示の変異体CH2またはFcドメインを含む抗体またはFc融合タンパク質である。本開示の変異体CH2または変異体Fcドメインは、263位、266位、273位および305位に1つ以上の置換を一般的に含み、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUインデックスのそれである。これらのアミノ酸位置は、図2でアスタリスク（*）、ダガー（†）、ダブルダガー（‡）および番号符号（#）によってそれぞれ示される。

30

40

【 0 0 0 9 】

したがって、一態様では、本開示は、配列番号2のCH2ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する変異体CH2ドメインを含むポリペプチドを提供する。配列番号2のCH2ドメインと比較して、開示したポリペプチドは、（a）FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV263置換；（b）FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV266置換；および（c）FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV273置換から選択される1つ以上の置換を含むことができる。

50

【0010】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のCH2ドメインと比較して、V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305KおよびV305Wから選択される1つ以上の置換を含む。具体的な実施形態では、CH2ドメインの1つ以上の置換は、V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273Yから選択される。

【0011】

別の態様では、本開示は、配列番号2のCH2ドメインと比較して、(a)FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV263置換；(b)FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV266置換；および(c)FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV273置換から選択される1つ以上の置換を含む、最高6つ、最高5つ、最高4つ、最高3つ、最高2つの置換を有する、または単一のアミノ酸置換を有する変異体CH2ドメインを含むポリペプチドを提供する。

10

【0012】

開示のポリペプチドは、配列番号2のCH2ドメインと比較して、V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305KおよびV305Wから選択される1つ以上の置換を含む、最高6つ、最高5つ、最高4つ、最高3つ、最高2つの置換を有する、または単一のアミノ酸置換を有する変異体CH2ドメインを含むこともできる。具体的な実施形態では、CH2ドメインの1つ以上の置換は、V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273Yから選択される。

20

【0013】

本明細書に詳述されるように、CH2ドメインは抗体のFcドメインの成分である。したがって、一態様では、Fcドメインを含むポリペプチドが提供され、前記Fcドメインは開示のCH2ドメインを含む。一部の実施形態では、Fcドメインは、配列番号1のFcドメインのCH2ドメインと比較して、最高20個、最高15個、最高12個、最高10個、最高9個、最高8個、最高7個、最高6個、最高5個または最高4個のアミノ酸置換を有する。全体として、ポリペプチドのFcドメインは、配列番号1のFcドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有することができる。

30

【0014】

当業者は、開示されるFcドメインが本明細書に記載される1つ以上のCH2置換のいずれかを含むことができることを理解する。したがって、V263置換(例えば、V263L)、V266置換(例えば、V266L)、V273置換(例えば、V273E、V273F、V273L、V273M、V273SまたはV273Y)またはV305置換(例えば、V305KまたはV305W)を含むそれらを含むポリペプチドが提供される。

【0015】

様々な実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のCH2ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有し、配列番号2のCH2ドメインと比較して、FcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV263置換；およびFcRIIBへの親和性を増加させ、FcRIIIAへの親和性を減少させるV273置換から選択される1つ以上の置換を有する変異体CH2ドメインを含む。

40

【0016】

様々な実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のCH2ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少な

50

くとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% の配列同一性を有し、配列番号 2 の CH2 ドメインと比較して、置換 V263L；および/または V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y から選択される V273 置換を有する、変異体 CH2 ドメインを含む。

【0017】

様々な実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 2 の CH2 ドメインと比較して、FcRIIB への親和性を増加させ、FcRIIA への親和性を減少させる V263 置換；FcRIIB への親和性を増加させ、FcRIIA への親和性を減少させる V266 置換；FcRIIB への親和性を増加させ、FcRIIA への親和性を減少させる V273 置換から選択される 1 つ以上の置換を含む、最高 6 つ、最高 5 つ、最高 4 つ、最高 3 つ、最高 2 つの置換を有する、または単一のアミノ酸置換を有する変異体 CH2 ドメインを含む。

10

【0018】

様々な実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 2 の CH2 ドメインと比較して、置換 V263L；および/または V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y から選択される V273 置換から選択される 1 つ以上の置換を含む、最高 6 つ、最高 5 つ、最高 4 つ、最高 3 つ、最高 2 つの置換を有する、または単一のアミノ酸置換を有する変異体 CH2 ドメインを含む。

20

【0019】

セクション 3.5 に記載の通り、Fc ドメインは Fc エフェクター機能を媒介することが知られている。したがって、本開示は、Fc エフェクター機能を改変する 1 つ以上の追加の置換または置換の組合せをさらに含むポリペプチドを提供する。一般的に、改変することができる Fc エフェクター機能には、(a) FcRN への結合の低減もしくは増加；(b) FcRI への結合の低減もしくは増加；(c) FcRIIA もしくは FcRIIB への結合の低減もしくは増加；(d) FcRIIA への結合の低減もしくは増加；または (e) 上述のものの 2 つ、3 つ、4 つもしくは全ての組合せが含まれる。

【0020】

Fc エフェクター機能を改変することが公知である例示的な置換は Fc 置換 M428L であり、M428L は Fc 置換 T250Q と一緒に起こることができる。さらに、開示の Fc ドメインは、配列番号 1 の Fc ドメインと比較して、表 1 から選択される 1 つ以上の追加の置換を含むことができる。

30

【0021】

一態様では、本開示は、セクション 3.1 でさらに詳述される、抗体であるポリペプチドを提供する。これらの抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であってもよい。一般的な実施形態では、抗体は、CD40、CD25、CD3、HLA 分子、副刺激分子、サイトカイン（例えば、TNF- α または IL-2）、ケモカイン、細胞接着因子（例えば、4 インテグリン）、活性化マーカーまたは免疫調節性タンパク質に特異的に結合する。副刺激分子は、CD28、PD-1、CTLA-4、CD80、CD86、TIM3、OX40、4-1BB、GITR、CD27、B7-H4 または DC-SIGN であってもよい。一部の実施形態では、免疫調節性タンパク質は、細胞表面分子である。他の実施形態では、免疫調節性タンパク質は、可溶性分子である。

40

【0022】

一般的な実施形態では、抗体は CD25 に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体は CD40 に特異的に結合する。

【0023】

開示のポリペプチドは、CH2 ドメインが少なくとも 1 つの融合パートナーに作動可能に連結される Fc ドメインの一部である Fc 融合タンパク質も含む。Fc 融合タンパク質は、セクション 3.3 で詳述される。そのような Fc タンパク質では、前記少なくとも 1 つの融合パートナーは、TNF 受容体 II の細胞外ドメイン（「ECD」）；リンパ球機

50

能関連抗原 3 (L F A - 3) の第 1 の E C D ; ヒト細胞傷害性 T リンパ球関連分子 - 4 (C T L A - 4) の E C D ; I L - 1 R アクセサリータンパク質リガンド結合領域の C 末端 ; I L - 1 R I E C D の N 末端 ; ペプチドトロンボポエチン (T P O) 模倣体 ; 2 つのアミノ酸置換 L 1 0 4 E および A 2 9 Y を有する C T L A - 4 の E C D ; ならびに V E G F 受容体 1 の E C D および / または V E G F 受容体 2 の E C D であってもよい。

【 0 0 2 4 】

別の態様では、本開示は、本開示がエフェクター部分または検出可能な標識に連結したポリペプチドを含むコンジュゲート化合物を提供する。コンジュゲート化合物は、セクション 3 . 6 でさらに議論される。一部の実施形態では、コンジュゲート化合物は、検出可能な標識、例えば放射性化合物、蛍光化合物、酵素、基質、エピトープタグまたは毒素に連結させたポリペプチドを含む。一部の実施形態では、コンジュゲート化合物は、細胞傷害剤などの、エフェクター部分に連結させたポリペプチドを含む。当業者は、オーリスタチン、DNA 副溝結合剤、DNA 副溝アルキル化剤、エンジン、デュオカルマイシン、マイタンシノイドまたはピンカアルカロイドを含む、開示のポリペプチドに連結させることができる様々な細胞傷害剤を理解する。他の例示的な細胞傷害剤は、抗チューブリン、A F P、M M A F または M M A E である。

【 0 0 2 5 】

本開示は、開示のポリペプチドおよび医薬として許容される担体または開示のコンジュゲート化合物を含む医薬組成物をさらに提供する。医薬組成物および処置方法は、セクション 3 . 7 で詳述される。

【 0 0 2 6 】

開示のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は本明細書で提供され、核酸を含むベクターも同様である。さらに、開示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換される原核生物および真核生物の宿主細胞が本明細書で提供され、このヌクレオチド配列を発現するように操作される真核生物 (例えば哺乳動物) の宿主細胞も同様である。宿主細胞を培養することおよびポリペプチドを回収することによってポリペプチドを生成する方法も提供され、下のセクション 3 . 4 でさらに議論される。

【 0 0 2 7 】

当業者は、開示のポリペプチドが、それを必要とする患者に開示の適当なポリペプチド、医薬組成物またはコンジュゲート化合物を投与することが適する、免疫障害またはがんなどの様々な疾患または障害の処置で有益であることを理解する。

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態では、ポリペプチドはがんの処置のために有益な抗 C D 4 0 抗体である。特定の実施形態では、がんは、慢性リンパ球性白血病、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、T 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ワルデンストレームマクログロブリン血症またはカボジ肉腫から場合によって選択される血液がんである。特定の実施形態では、がんは、卵巣がん、乳がん、肺がん、黒色腫、膵がんおよび腎臓がんから場合によって選択される固形腫瘍である。抗 C D 4 0 抗体の例示的な V L および V H 配列は、配列番号 3 および配列番号 4 としてそれぞれ提供される。具体的な実施形態では、抗 C D 4 0 抗体は、多重特異的抗体である。

【 0 0 2 9 】

他の実施形態では、ポリペプチドは、関節リウマチまたは多発性硬化症である免疫障害の処置のために有益な抗 C D 2 0 抗体である。抗 C D 2 0 抗体の例示的な V L および V H 配列は、配列番号 5 および配列番号 6 としてそれぞれ提供される。

【 0 0 3 0 】

さらに他の実施形態では、ポリペプチドは、多発性硬化症、喘息、乾癬、ブドウ膜炎、眼性炎症もしくは臓器移植拒絶反応である免疫障害の処置、またはヒト T 細胞白血病ウイルス 1 関連 T 細胞白血病であるがんの処置のために有益である、抗 C D 2 5 抗体である。抗 C D 2 5 抗体の例示的な V L 配列には、配列番号 7 および配列番号 9 が含まれる。抗 C

10

20

30

40

50

D 2 5 抗体の例示的な V L 配列には、配列番号 8 および配列番号 1 0 が含まれる。

【 0 0 3 1 】

さらに他の実施形態では、ポリペプチドは、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎またはプラーク乾癬である免疫障害の処置のために有益である、抗 T N F 抗体である。抗 T N F 抗体の例示的な V L 配列には、配列番号 1 1 および配列番号 1 3 が含まれる。抗 T N F 抗体の例示的な V L 配列には、配列番号 1 2 および配列番号 1 4 が含まれる。

【 0 0 3 2 】

さらなる実施形態では、ポリペプチドは、関節リウマチまたはキャッスルマン病である免疫障害の処置のために有益である、抗 I L - 6 受容体抗体である。抗 I L - 6 受容体抗体の例示的な V L および V H 配列は、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 としてそれぞれ提供される。ポリペプチドは、多発性硬化症である免疫障害の処置のために有益である、抗

10

4 インテグリン抗体であってもよい。一部の実施形態では、ポリペプチドは、C r y o p y r i n 関連周期熱症候群（「C A P S」）である免疫障害の処置のために有益である、抗 I L - 1 抗体である。抗 I L - 6 受容体抗体の例示的な V L および V H 配列は、配列番号 1 7 および配列番号 1 8 としてそれぞれ提供される。ポリペプチドは抗 B A F F 抗体であってもよく、全身性エリテマトーデスまたはアレルギーである免疫障害の処置のために役立つこともできる。抗 B A F F 抗体の例示的な V L および V H 配列は、配列番号 1 9 および配列番号 2 0 としてそれぞれ提供される。

【 0 0 3 3 】

20

上の概要は、本明細書に開示される様々な発明のあらゆる実施形態またはあらゆる実行例を記載することを意図しないことを理解すべきである。発明を実施するための形態および実施例のセクションは、例証的实施形態をさらに例示する。本明細書に記載される様々な実施形態は、各具体的な組合せが明示的に開示されているかのように、組合せで開示されることを意図する。実施例は代表させることだけを目的とし、排他的であるまたは本明細書に開示される様々な発明の範囲を限定するものであると解釈されるべきでない。

【 0 0 3 4 】

本明細書に開示される様々な発明およびその付随する利点の多くのより完全な理解は、後に続く詳細な説明によって提供される。

【 0 0 3 5 】

30

ここに明細書全体および添付の請求項で用いるように、以下の用語および表現は以下の意味を有するものとする。

【 0 0 3 6 】

不定冠詞「a」および「an」ならびに定冠詞「the」は、それらが使用される文脈が明らかに別途示さない限り、単数形および複数形の両方を含むものとする。

【 0 0 3 7 】

「少なくとも1つ」および「1つ以上」は互換的に使用され、その冠詞が掲載要素の1つまたは複数を含むことができることを意味する。

【 0 0 3 8 】

特に明記しない限り、明細書および請求項で使用される、成分、反応条件などの量、比および数値的特性を表す全ての数字は、用語「約」によって全ての場合に修飾することができることが企図されることを理解すべきである。

40

5 . 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 9 】

【図 1】天然の I g G の概略図である。ジスルフィド結合は、C H 1 と C L ドメインの間および2つの C H 2 ドメインの間の太線によって表される。V は可変ドメインであり、C は定常ドメインであり、L は軽鎖を表し、H は重鎖を表す。

【図 2 A】ヒト I g G 1（配列番号 1）からの野生型 F c ドメインの配列を示す図である。F c ドメインの中で、C H 2 ドメイン（その配列は

50

【 0 0 4 0 】

【 化 1 】

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK; 配列番号2

である)は二重下線を引かれ、C H 3 ドメイン(その配列は

【 0 0 4 1 】

【 化 2 】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; 配列番号21

10

である)は太字である。残基 2 6 3、2 6 6、2 7 3 および 3 0 5 は、アスタリスク(*)、ダガー(†)、ダブルダガー(‡) および番号符号(#)によってそれぞれ示される。

【 図 2 B 】 C H 1、ヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインでのアミノ酸配列およびアミノ酸の番号付けを示す図である。図 2 B の C H 1、ヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインの完全長配列は、配列番号 3 8 と呼ばれる。

【 図 3 】 F c 受容体への開示のポリペプチドの結合を測定するために使用される複合体の概略図を示す図である。

【 図 4 】 (A) F c R I I B 1 および (B) F c R I I I A への野生型 h u 1 D 1 0 の結合についての F A C S 滴定曲線および E C ₅₀ 測定を示す図である。

20

【 図 5 】 代表的な F A C S 分類結果を示す図である。

【 図 6 】 F c R I I B 結合が有意に増加し、F c R I I I A 結合が有意に減少した個々のクローンの濃縮比を提示するグラフである。

【 図 7 】 F c R I I B 結合の有意な増加および F c R I I I A 結合の有意な減少を有すると同定された位置および置換を示す図である。各突然変異体の濃縮比が、表にされる。

【 図 8 】 F c R I I B への開示のポリペプチドの結合の単点 F A C S データを示す図である。

【 図 9 】 F c R I I I A への開示のポリペプチドの結合の単点 F A C S データを示す図である。

30

【 図 1 0 A 】 開示のポリペプチドが F c R I I B への野生型抗体より高い最大結合を実証したことを示す確認データを示す図である。図 1 0 A は、F c R I I B に対する W T および変異体 F c 領域の結合曲線を示す。

【 図 1 0 B 】 開示のポリペプチドが F c R I I B への野生型抗体より高い最大結合を実証したことを示す確認データを示す図である。図 1 0 B は、各変異体の結合の E C ₅₀ および野生型結合に対する倍率を示す。

【 図 1 1 A 】 開示のポリペプチドが F c R I I I A への野生型抗体より高い最大結合を実証したことを示す確認データを示す図である。図 1 1 A は、F c R I I I A に対する W T および変異体 F c 領域の結合曲線を示す。

40

【 図 1 1 B 】 開示のポリペプチドが F c R I I I A への野生型抗体より高い最大結合を実証したことを示す確認データを示す図である。図 1 1 B は、各変異体の結合の E C ₅₀ および野生型結合に対する倍率を示す。

【 図 1 2 】 非放射性 A D C C アッセイを用いた開示のポリペプチドの試験からの F A C S データを示す図である。

【 図 1 3 A 】 E C ₅₀ を判定するために I g G 濃度に対してグラフで示した細胞傷害性パーセントを示すデータを示す図である。

【 図 1 3 B 】 野生型より低いが多少の A D C C 活性を有する F c R I I B 上方突然変異体を示す図である。

【 図 1 3 C 】 A D C C 活性のほとんどないポリペプチドを示す図である。

50

【図 1 3 D】非 A D C C h u 1 D 1 0 ポリペプチドと F c R I I I A への結合の減少をもたらす既知の置換 (S 2 6 7 E、L 3 2 8 F、二重突然変異体「S E L F」) との比較を示す図である。

【図 1 4 A】クロム遊離試験を用いた開示のポリペプチドのための A D C C の誘導の結果を示す図である。

【図 1 4 B】図 1 4 A のシンボルキーを示す図である。

【図 1 5 A】単球由来の未熟樹状細胞を用いた開示のポリペプチドのための樹状細胞活性化の結果を示す図である。図 1 5 A は、A D C C を誘導する変異体による樹状細胞活性化を示す。

【図 1 5 B】単球由来の未熟樹状細胞を用いた開示のポリペプチドのための樹状細胞活性化の結果を示す図である。図 1 5 B は、A D C C を誘導しない変異体による樹状細胞活性化を示す。

【図 1 5 C】単球由来の未熟樹状細胞を用いた開示のポリペプチドのための樹状細胞活性化の結果を示す図である。図 1 5 C は、I L - 1 2 誘導の E C 5 0 を示す。

【図 1 6】最も低い A D C C 活性の F c 変異体を示す図であり、太字は保持された / 改善された F c R I I B 結合である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

6. 詳細な説明

6. 1. F c 変異体ポリペプチド

免疫グロブリンの F c ドメインは、非抗原結合機能に関与し、エフェクター分子の結合によって媒介されるいくつかのエフェクター機能を有する。図 1 で例示されるように、F c ドメインは 2 つの主ドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインで構成され、C H 2 ドメインの N 末端側に小さいヒンジ領域を有する。本開示は、本明細書において変異体ポリペプチド、F c 変異体または単に変異体もしくはポリペプチドと総称される、改変 C H 2 ドメインを含むポリペプチド (および改変 C H 2 ドメインを含む改変 F c ドメイン) を提供する。変異体ポリペプチドは、一般的に、抗体または抗体断片 (本明細書において抗体変異体と総称される) または F c 融合タンパク質である。

【0043】

本明細書で用いるように、抗体アミノ酸残基の番号付けは、特に明記しない限り K a b a t の E U 命名法に従って行われる。

【0044】

本明細書で用いるように、用語「F c ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を指す。免疫グロブリン重鎖の F c ドメインの一般に認められた境界は異なることもあるが、ヒト I g G 重鎖の F c ドメインは、通常 C y s 2 2 6 位のアミノ酸残基からまたは P r o 2 3 0 からそのカルボキシル末端に及ぶと規定される。一部の実施形態では、変異体は F c ドメインの一部だけを含み、カルボキシル末端を含むことができまたは含むことができない。免疫グロブリンの F c ドメインは、2 つの定常ドメイン、C H 2 および C H 3 を一般に含む。開示の F c 変異体ポリペプチドは、一般的に少なくとも C H 2 ドメインを含み、しばしば C H 3 ドメインも含む。

【0045】

本明細書で用いるように、「C H 2 ドメイン」(「C 2」ドメインとも呼ばれる) は、F c ドメイン (例えば、ヒト I g G F c ドメイン) のアミノ酸 2 3 1 あたりからアミノ酸 3 4 0 あたりまで延びるひと続きの残基を一般に含む。C H 2 ドメインは、別のドメインと緊密に対合しない点で特異である。むしろ、2 つの N 連結分枝状炭水化物鎖が、そのままの天然の I g G 分子の 2 つの C H 2 ドメインの間に挿入される。

【0046】

本明細書で用いるように、「C H 3 ドメイン」(「C 3」ドメインとも呼ばれる) は、F c ドメインの C H 2 ドメイン C 末端側のひと続きの残基 (例えば、ヒト I g G F c 領域のアミノ酸残基 3 4 1 あたりからアミノ酸残基 4 4 7 あたりまで) を一般に含む。

【0047】

用語「Fc受容体」および「FcR」は、Fcドメイン（例えば抗体または抗体断片のFcドメイン）に結合する受容体を記載するために用いられる。本発明の一部の実施形態では、Fc受容体の一部が特に企図される。好ましい実施形態では、FcRは天然配列ヒトFcRである。他の好ましい実施形態では、FcRは、IgG抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、例としてはFcRI、FcRIIおよびFcRIIIサブクラスの受容体があり、これらの受容体の対立遺伝子変異体あるいはスプライシングされた形が含まれる。FcRII受容体には、その細胞質ドメインが主に異なる類似したアミノ酸配列を有する、FcRIIA（「活性化受容体」）およびFcRIIB（「阻害性受容体」）が含まれる。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含む。阻害性受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン阻害モチーフ（ITIM）を含む。将来同定されるものを含む他のFcRは、本明細書の用語「FcR」に包含される。本用語には、新生児受容体、FcRnも含まれる。

10

【0048】

開示のポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン定常領域、好ましくはIgGCドメインの全部または一部に実質的に相同的であるアミノ酸配列を有するFc変異体ドメインを含む。

【0049】

ヒトC領域の多数の配列が公表されている；例えば、Clark、1997、Chem. Immunol. 65: 88-110頁を参照する。ヒト免疫グロブリン重鎖の他の配列は、Lasergeneソフトウェア（DNASTAR Limited、London UK）を使用して、ヒトIg-1鎖C領域については受託番号A93433、B90563、A90564、B91668、A91723およびA02146の下で、ヒトIg-2鎖C領域についてはA93906、A92809、A90752、A93132、A02148の下で、ヒトIg-4鎖C領域についてはA90933、A90249、A02150の下で、ヒトIg-3鎖C領域についてはA23511の下で、SwissProtおよびPIRデータベースから得ることができる。例示的なFcドメインは、配列番号1のアミノ酸配列を有する。

20

【0050】

様々な実施形態では、Fc変異体ドメインのアミノ酸配列は、参照の前述のFcドメインのいずれかと少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を共有する。好ましい実施形態では、参照のFcドメインは、配列番号1を含む。

30

【0051】

配列比較は、「比較ウィンドウ」にわたって配列を比較して、配列類似性の局所領域を同定し、比較することによって一般的に実施される。「比較ウィンドウ」は、参照配列と比較される一般的に12個の連続した残基の概念上のセグメントを指す。比較ウィンドウは、それぞれの配列の最適な整列のための参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して約20%以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。比較ウィンドウを整列させるための配列の最適な整列は、アルゴリズム（IntelligenticsによるGeneworksプログラム；Wisconsin Genetic Software Packageリリース7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、Wis.、USA中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、参照により本明細書に組み込まれる）のコンピュータによる実行、または検査および選択される様々な方法のいずれかによって生成される最良のアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたって最高百分率の相同性をもたらす。）によって実行することができる。BLASTファミリーのプログラム、例えば参照により本明細書に組み込まれるAltschulら、1997、Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-402頁によって

40

50

開示されるものを参照することもできる。

【0052】

本開示は、改変Fcドメインを含むポリペプチドを提供し、そこにおいて、第1のFc受容体、例えばFcRIIBへのポリペプチドの結合は野生型Fcドメインのそれと比較して増加し、第2のFc受容体、例えばFcRIIIAへのポリペプチドの結合は野生型Fcドメインを有する抗体のそれと比較して減少する。ポリペプチドは、抗体またはFc融合タンパク質であってもよい。

【0053】

Fc変異体ポリペプチドは、野生型Fcドメインを有するポリペプチドのそれと比較して、FcRIIBへの結合の増加およびFcRIIIAへの結合の減少の両方をもたらす単一の置換を含むことができる。

10

【0054】

Fc変異体ポリペプチドは、配列番号2のCH2ドメインと比較して、V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305KおよびV305Wから選択される少なくとも1つの置換を有する、変異体定常領域重鎖ドメイン2(「CH2」)を含むことができる。変異体CH2ドメインは、配列番号2のCH2ドメインと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を好ましくは有する。様々な実施形態では、CH2ドメインは、V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273Yから選択される少なくとも1つの置換を含む。

20

【0055】

一部の実施形態では、変異体CH2ドメインは、配列番号2のCH2ドメインと比較して、合計で最高20個、最高15個、最高12個、最高10個、最高9個、最高8個、最高7個、最高6個、最高5個または最高4個のアミノ酸置換を有する。一部の実施形態では、CH2ドメインは、配列番号2のCH2ドメインと比較して、6以下、5以下、4以下、3以下または2以下の数のアミノ酸置換を有することができる。

【0056】

Fc変異体ポリペプチドは、配列番号2のCH2ドメインと比較して、V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305KおよびV305Wから選択される少なくとも1つの置換を有するCH2ドメインを含む変異体Fc領域を含むことができる。変異体Fc領域は、配列番号1のFc領域と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を好ましくは有する。様々な実施形態では、CH2ドメインは、V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273Yから選択される少なくとも1つの置換を含む。

30

【0057】

一部の実施形態では、変異体Fc領域ドメインは、配列番号1のFcドメインと比較して、合計で最高20個、最高15個、最高12個、最高10個、最高9個、最高8個、最高7個、最高6個、最高5個または最高4個のアミノ酸置換を有する。一部の実施形態では、変異体Fc領域は、配列番号1のFc領域と比較して、6以下、5以下、4以下、3以下または2以下の数のアミノ酸置換を有することができる。

40

【0058】

開示の変異体ポリペプチドは、抗体またはFc融合タンパク質であってもよい。例えば、しかし限定することなく、Fc融合タンパク質は、例えばサイトカインタンパク質、毒素タンパク質または他の生体活性タンパク質との融合タンパク質として組換えで発現される抗体であってもよい。他の実施形態では、Fc融合タンパク質は、融合パートナーとの融合タンパク質として組換えで発現される、本明細書に開示される変異体Fcドメインな

50

どの、抗体のFcドメインを含有する。他の実施形態では、Fc融合タンパク質は、融合パートナーとの融合タンパク質として組換えで発現される、本明細書に開示される変異体CH2ドメインなどの、Fc領域のCH2またはCH3ドメインを含有する。開示の変異体抗体は、抗体-薬物コンジュゲートであってもよい。例えば、しかし限定されずに、変異体抗体は、モル分子毒素または生体活性小分子化合物にコンジュゲートされてもよい。例示的な抗体および融合タンパク質は、セクションに記載される。

【0059】

開示の変異体Fcドメインは、(FcRIIBへの親和性の増加およびFcRIIAへの親和性の低減をもたらす1つ以上の置換に加えて)エフェクター機能に影響を与える1つ以上の置換を含むことができる。

10

【0060】

一実施形態では、変異体Fcドメインは、FcRへの結合の低減をもたらす1つ以上の置換を含有し、Fcドメインのアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438または439の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含み、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabatatのようにEUIンデックスのそれである。

【0061】

20

例えば、変異体Fcドメインは、FcRIへの結合の低減をもたらす1つ以上の置換を含有することができ、Fcドメインのアミノ酸位置238、265、269、270、327または329の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabatatのようにEUIンデックスのそれである。

【0062】

変異体Fcドメインは、FcRIIへの結合の低減をもたらす1つ以上の置換を含有することができ、Fcドメインのアミノ酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438または439の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabatatのようにEUIンデックスのそれである。

30

【0063】

対象の変異体Fcドメインは、FcRIIIへの結合の低減をもたらす1つ以上の置換を含有することができ、Fcドメインのアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435または437の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabatatのようにEUIンデックスのそれである。

【0064】

40

別の実施形態では、変更されたFcR結合親和性を有する変異体Fcドメインは、FcRへの結合の向上をもたらす1つ以上の置換を含有し、Fcドメインのアミノ酸位置255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、298、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、333、334、337、340、360、378、398または430の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含み、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabatatのようにEUIンデックスのそれである。

【0065】

例えば、変異体Fcドメインは、FcRIIIへの結合の増加をもたらす1つ以上の置換を含有することができ、FcRIIへの結合の減少をもたらす1つ以上の置換を場

50

合によってさらに含有することができる。例示的なそのような変異体は、Fcドメインの位置（複数可）298および/または333でアミノ酸改変（複数可）を含み、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUIンデックスのそれである。

【0066】

変異体Fcドメインは、FcRIIへの結合の増加をもたらす1つ以上の置換を含有することができ、Fcドメインのアミノ酸位置255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、337、340、378、398または430の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUIンデックスのそれである。FcRIIへの結合の増加を有するそのような変異体Fcドメインは、FcRIIIへの結合の減少をもたらす1つ以上の置換を場合によってさらに含有することができ、例えば、Fcドメインのアミノ酸位置268、272、298、301、322または340の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUIンデックスのそれである。

【0067】

さらに別の態様では、Fc変異体ポリペプチドは、例えば、FcRn相互作用に關与する特定の領域で免疫グロブリン定常領域セグメントを突然変異させることによって、胎児Fc受容体FcRnへのそれらの結合親和性を増加または低減させるように改変することができる（例えば、WO2005/123780を参照）。したがって、本開示は、変更された新生児Fc受容体（FcRn）結合親和性を有する変異体Fcドメインを含むポリペプチドをさらに提供し、このポリペプチドは、Fcドメインのアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439または447の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含み、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUIンデックスのそれである。FcRnへの結合の低減を有するそのような変異体Fcドメインは、Fcドメインのアミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439または447の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUIンデックスのそれである。あるいは上記の変異体Fcドメインは、FcRnへの結合の増加をもたらす1つ以上の置換を含有することができ、Fcドメインのアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434の任意の1つ以上でアミノ酸改変を含むことができ、そこにおいて、Fcドメインの残基の番号付けは、KabataのようにEUIンデックスのそれである。さらに他の実施形態では、変異体Fcドメインは、FcRnへの親和性を増強する少なくとも1つ以上の改変、例えば1つ以上のアミノ酸残基251 - 256、285 - 290、308 - 314、385 - 389および428 - 436の改変（例えば、M428L）、または位置250および428の改変（例えば、T250Q/M428L）を有する、例えば、Hintonら、2004、J Biol Chem 279（8）：6213 - 6頁；PCT公開番号WO97/34631；およびWO02/060919を参照、これらは全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、IgGクラスの抗体は、重鎖定常領域のアミノ酸残基250、314および428の少なくとも1つが単独で、またはその任意の組合せで、例えば位置250および428、または位置250および314、または位置314および428、または位置250、314および428で置換されるように突然変異させられ、位置250および428が具体的な組合せである。位置250については、置換するアミノ酸残基は、トレ

10

20

30

40

50

オニン以外の任意のアミノ酸残基、例えば、限定されずに、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、バリン、トリプトファンまたはチロシンであってもよい。位置 314 については、置換するアミノ酸残基は、ロイシン以外の任意のアミノ酸残基、例えば、限定されずに、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンまたはチロシンであってもよい。位置 428 については、置換するアミノ酸残基は、メチオニン以外の任意のアミノ酸残基、例えば、限定されずに、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンまたはチロシンであってもよい。そのような突然変異は FcRn への抗体の結合を増加させ、そのことは抗体を分解から保護し、その半減期を増加させる。

10

【0068】

Fcエフェクター機能の改変につながる他の例示的な置換は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている米国特許第 7,632,497 号に開示されているものである。具体的な実施形態では、追加の置換は、下の表 1 のものから選択される。表 1 は、示された置換についての示された FcRn への結合に及ぼす効果（上方、下方または不変「nc」）を示す（Shields ら、2001、J Biol Chem 276(9): 6591 - 604 頁）。

20

【0069】

【表 1】

表1					
置換	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
E233P	下方	下方	下方	下方	下方
L234V	下方	下方	下方	下方	下方
L235A	下方	下方	下方	下方	下方
P238A	下方	下方	下方	下方	下方
S239A	nc	nc	nc	nc	下方
I253A	下方	nc	nc	nc	nc
S254A	下方	nc	nc	nc	nc
R255A	nc	nc	上方	上方	nc
T256A	nc	nc	上方	上方	上方
E258A	nc	nc	上方	上方	nc
D265A	下方	下方	下方	下方	下方
D265N	－	－	下方	下方	下方
D265E	－	－	下方	下方	下方
S267A	nc	nc	上方	上方	nc
S267G	－	－	nc	nc	下方
S267T	－	－	下方	下方	下方
H268A	nc	nc	上方	上方	下方
E269A	nc	nc	nc	nc	下方
D270A	nc	nc	下方	下方	下方
D270N	－	－	下方	下方	下方
D270E	－	－	下方	下方	nc
E272A	nc	nc	上方	上方	nc
N276A	nc	nc	上方	上方	nc
D280A	nc	nc	上方	上方	nc
H285A	nc	nc	上方	上方	nc
N286A	nc	nc	上方	上方	nc
K288A	下方	nc	nc	nc	nc
K290A	nc	nc	上方	上方	上方
R292A	nc	nc	下方	下方	nc
E293A	nc	nc	nc	nc	下方
E293D	－	－	下方	下方	下方
Q295A	nc	nc	下方	下方	下方
Y296F	nc	nc	nc	nc	下方
N297A	下方	下方	下方	下方	下方
S298A	nc	nc	下方	下方	上方
S298T	－	－	下方	下方	nc
S298N	－	－	下方	下方	下方
R301A	nc	nc	上方	上方	下方
R301M	－	－	上方	上方	下方
V303A	nc	nc	nc	nc	下方

10

20

30

40

V305A	上方	nc	nc	nc	nc
T307A	nc	nc	上方	上方	nc
L309A	nc	nc	上方	上方	nc
Q311A	上方	nc	nc	nc	nc
D312A	上方	nc	nc	nc	nc
N315A	nc	nc	上方	上方	nc
K317A	上方	nc	nc	nc	nc
K322A	nc	nc	上方	上方	下方
K326A	nc	nc	上方	上方	nc
A327Q	下方	下方	下方	下方	下方
A327S	nc	nc	下方	下方	下方
A327G	nc	nc	nc	nc	下方
P329A	下方	下方	下方	下方	下方
P331A	nc	nc	上方	上方	nc
P331S	－	－	nc	下方	下方
E333A	nc	nc	nc	nc	上方
E333Q	－	－	下方	下方	nc
E333N	－	－	下方	下方	下方
E333D	－	－	－	－	上方
K334A	nc	nc	nc	nc	上方
K334R	－	－	nc	上方	下方
K334Q	－	－	nc	nc	上方
K334E	－	－	下方	nc	上方
K334V	－	－	上方	nc	上方
S337A	nc	nc	上方	上方	nc
K338A	nc	nc	nc	nc	下方
K338M	－	－	nc	nc	下方
A339T	nc	nc	nc	nc	上方
K360A	上方	nc	nc	nc	nc
Q362A	上方	nc	nc	nc	nc
D376A	nc	nc	nc	nc	下方
A378Q	nc	nc	上方	上方	nc
E380A	上方	nc	nc	nc	nc
E382A	上方	nc	nc	nc	nc
K414A	nc	nc	下方	下方	nc
S415A	下方	nc	nc	nc	nc
S424A	上方	nc	nc	nc	nc
E430A	nc	nc	上方	上方	nc
H433A	下方	nc	nc	nc	nc
N434A	上方	nc	nc	nc	nc
H435A	下方	nc	nc	nc	nc
Y436A	下方	nc	nc	nc	nc

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

ある特定の実施形態では、開示の変異体 F c 領域は、例えば WO 2 0 0 9 / 0 0 6 5 2 0 に記載されているようにそれらのヒンジ領域（C H 2 ドメインの N 末端側の配列番号 1 の部分）に、特に WO 2 0 0 9 / 0 0 6 5 2 0 の請求項 7 に示されているアミノ酸位置に、エフェクター機能に影響を与える 1 つ以上の置換を有することができる。具体的な実施形態では、ヒンジ領域は、WO 2 0 0 9 / 0 0 6 5 2 0 の請求項 8 に示されているように a から f f と命名された置換の組合せの少なくとも 1 つを含むことができる。WO 2 0 0

50

9 / 0 0 6 5 2 0 は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

【 0 0 7 1 】

6 . 2 . 変異体抗体

開示のポリペプチドは、「変異体抗体」と呼ばれる本明細書に記載されている変異体 F c 配列を含む抗体であってもよい。

【 0 0 7 2 】

ある特定の実施形態では、開示の変異体抗体は、モノクローナル抗体である。本明細書で用いられている用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を通して生成される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物、原核生物またはファージのクローンを含む単一のクローンから導かれる抗体を指し、それが生成される方法

10

方法を指すものではない。本開示に関連して有益なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマの使用、組換えおよびファージディスプレイ技術またはその組合せを含む、当技術分野で公知である各種の技術を使用して調製することができる。開示の F c 変異体には、キメラの、霊長類化された、ヒト化されたまたはヒト抗体が含まれる。

【 0 0 7 3 】

開示の変異体抗体は、キメラ抗体であってもよい。本明細書で用いられている用語「キメラ」抗体は、ヒト以外の免疫グロブリン、例えばラットまたはマウスの抗体から導かれる可変配列、およびヒト免疫グロブリン鋳型から一般的に選択されるヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体を指す。キメラ抗体の生成方法は、当技術分野で公知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、Morrisson、1985、Science 229 (4719) : 1202 - 7 頁 ; O i ら、1986、BioTechniques 4 : 214 - 221 頁 ; Gillies ら、1985、J Immunol Methods 125 : 191 - 202 頁 ; 米国特許第 5 , 807 , 715 号 ; 第 4 , 816 , 567 号 ; および第 4 , 816 , 397 号を参照。

20

【 0 0 7 4 】

開示の変異体抗体は、ヒト化されてもよい。ヒト以外の（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形は、ヒト以外の免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、その免疫グロブリン鎖または断片（例えば、抗体の F v、F a b、F a b'、F (a b')₂ または他の標的結合性サブドメイン）である。一般に、ヒト化抗体は少なくとも 1 つの、および一般的に 2 つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そこにおいて、C D R 領域の全てまたは実質的に全てはヒト以外の免疫グロブリンのそれらに対応し、F R 領域の全てまたは実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のそれらである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域 (F c)、一般的にヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそのの少なくとも一部を含むこともできる。抗体ヒト化の方法は、当技術分野で公知である。例えば、その全ては参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、Reichmann ら、1988、Nature 332 : 323 - 7 頁 ; 米国特許第 5 , 530 , 101 号 ; 第 5 , 585 , 089 号 ; 第 5 , 693 , 761 号 ; 第 5 , 693 , 762 号 ; および第 6 , 180 , 370 号、Queen ら ; E P 239400 ; P C T 公開 W O 91 / 09967 ; 米国特許第 5 , 225 , 539 号 ; E P 592106 ; E P 519596 ; Padlan、1991、Mol Immunol、28 : 489 - 498 頁 ; Studnicka ら、1994、Prot. Eng. 7 : 805 - 814 頁 ; Roguska ら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. 91 : 969 - 973 頁 ; および米国特許第 5 , 565 , 332 号を参照。

30

40

【 0 0 7 5 】

開示の変異体抗体は、ヒト抗体であってもよい。完全「ヒト」F c 変異体が、ヒト患者の治療処置にとって望ましい場合がある。本明細書で用いられているように、「ヒト抗体」にはヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離されたまたは 1 つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックであり、内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体が含まれる。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いるファージディス

50

プレイ方法を含む、当技術分野で公知である様々な方法によって作製することができる。その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、米国特許第4,444,887号および第4,716,111号；ならびにPCT公開WO98/46645；WO98/50433；WO98/24893；WO98/16654；WO96/34096；WO96/33735；そして、WO91/10741を参照。ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現することはできないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて生成することもできる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、PCT公開WO98/24893；WO92/01047；WO96/34096；WO96/33735；米国特許第5,413,923号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,569,825号；第5,661,016号；第5,545,806号；第5,814,318号；第5,885,793号；第5,916,771号；および第5,939,598号を参照。さらに、Medarex (Princeton, NJ)、Astellas Pharma (Deerfield, IL)、Amgen (Thousand Oaks, CA) およびRegeneron (Tarrytown, NY) などの会社は、上の記載されているそれに類似の技術を使用して、選択された抗原に向けられるヒト抗体を提供することに従事している可能性がある。選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択」と呼ばれる技術を用いて生成することができる。このアプローチでは、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導するために、マウス抗体などの選択されたヒト以外のモノクローナル抗体が用いられる (Jespersenら、1988、Biotechnology 12:899-903頁)。

【0076】

開示の変異体抗体は、霊長類化されてもよい。用語「霊長類化された抗体」は、サル可変領域およびヒト定常領域を含む抗体を指す。霊長類化された抗体の生成方法は、当技術分野で公知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,658,570号；第5,681,722号；および第5,693,780号を参照。

【0077】

開示の変異体抗体は、二重特異的抗体であってもよい。二重特異的抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に結合特異性を有する、モノクローナルの、しばしばヒトのまたはヒト化された抗体である。二重特異的抗体の抗原標的の非限定例には、細胞表面タンパク質、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、ウイルス由来タンパク質、ウイルスコードエンベロープタンパク質、細菌由来タンパク質または細菌表面タンパク質などが含まれる。

【0078】

開示の変異体抗体は、二重可変ドメイン(「DVD」)免疫グロブリン(「DVD-Ig」)であってもよい(参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、Gu & Ghayur、2012、Methods in Enzymology 502:25-41頁を参照)。DVD-Igは、リンカーを通して2つのモノクローナル抗体の標的結合性可変ドメインを合わせて、四価の二重標的化単一薬剤を作製する。本開示のDVDの軽鎖に用いるのに適するリンカーには、参照により本明細書に組み込まれている、Gu & Ghayur、2012、Methods in Enzymology 502:25-41頁の30頁の表2.1で特定されているそれら：短鎖リンカーADAAP(配列番号22)(マウス)およびTVAAP(配列番号23)(ヒト)；長鎖リンカーADAAPTVSIFP(配列番号24)(マウス)およびTVAAPSVFIFPP(配列番号25)(ヒト)；短鎖リンカーQPKAAP(配列番号26)(ヒト)；長鎖リンカーQPKAAPSVTLFPP(配列番号27)(ヒト)；GS-短リンカーGSGGG(配列番号28)、GS-中間リンカーGSGGGGSG(配列番号29)およびGS-長リンカーGSGGGGSGGGGS(配列番号30)(全てのGSリンカーはマウスおよびヒトである。)が含まれる。本開示のDVDの重鎖に用いるのに適す

10

20

30

40

50

るリンカーには、参照により本明細書に組み込まれている、Gu & Ghayur、2012、Methods in Enzymology 502:25-41頁の30頁の表2.1で特定されているそれら：短リンカーAKTTAP（配列番号31）（マウス）およびASTKGP（配列番号32）（ヒト）；長リンカーAKTTAPSVYPLAP（配列番号33）（マウス）およびASTKGPSVFPLAP（配列番号34）（ヒト）；GS-短リンカーGGGGS（配列番号35）、GS-中間リンカーGGGSGGGGS（配列番号36）およびGS-長リンカーGGGSGGGSGGGSGGGG（配列番号37）（全てのGSリンカーはマウスおよびヒトである。）が含まれる。好ましくはヒトリンカーは、ヒトのまたはヒト化されたDVD-Igのために使用されている。

【0079】

10

本開示では、DVD-Igは、2つの異なる標的の方向に向けられる。標的は、EGFR、HER2、ErbB3、または2011年2月24日に公表されたTariqら、米国特許出願公開第2011/0044980号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。）に記載されている任意の他の標的から選択することができる。

【0080】

DVD免疫グロブリンの標的結合性ドメインは一般的に縦に並んで配置され、1つの可変ドメインが別の上に積み重ねられて、内側および外側のFvドメインを形成する。

【0081】

開示の変異体抗体は、誘導体化された抗体を含む。例えば、しかし限定せずに、誘導体化される抗体は、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結（抗体コンジュゲートの議論についてはセクション6.5を参照）などによって一般的に改変される。公知の技術、例えば限定されずに特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などによって、多数の化学的改変のいずれかを実行することができる。さらに、誘導体は、例えばAmbryx技術を用いて、1つ以上の非天然アミノ酸を含有することができる（例えば、Wolfson、2006、Chem. Biol. 13(10):1011-2頁を参照）。

20

【0082】

6.2.1. Fc変異体抗体の標的

それらに限定されないが、サイトカインなどの可溶性因子および膜貫通受容体を含む膜結合因子の両方を含む、標的抗原の以下のリストに属するタンパク質、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、事実上いかなる抗原も開示の抗体の標的にすることができる：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、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-抗トリプシン、アルファ-V/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、Bリンパ球刺激物質（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bc1、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)、BMP、b-NGF、BOK

30

40

50

、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、がん胎児抗原(CEA)、癌腫関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPP I、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4 10、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINCクロストリジウム・ボツリナム(*Clostridium botulinum*)毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンス(*Clostridium perfringens*)毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF 20、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、デス(1-3)-IGF-I(脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnアーゼ、Dpp、DPP IV/CD26、Dtk、ECAD 30、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-セレクチン、ET-1、10a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-1 40、CDMP-1)、GDF-6(BMP-13、CDMP-2)、GDF-7(BMP-12、CDMP-3)、GDF-8(ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15(MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質10b/IIIIa(GP10b/IIIIa)、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エンベローブ糖タンパク質、HCMV) gHエンベローブ糖タンパク質、HCMV UL、造血増殖因子(HGF)、Hep B gp120、ヘパラーゼ、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、 50

HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原(HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB 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)-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビ
 10
 ン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、インテグリンアルファ5(アルファV)、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP(TGF-1)、潜在性TGF-1、潜在性TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT
 20
 2、Lefty、ルイス-Y抗原、ルイス-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、肺界面活性剤、黄体形成ホルモン、リンフォトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、メタロプロテアーゼ、MGDF受容体、MGMT、MHC(HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン(Muc1)、MUC18、ミューラー管抑制因子(Muellerian-inhibiting substance)、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-カドヘリン、NCA90、NCAM、NCAM、ネプリリシン、ニューロトロフィン-3、-4または-6、ニューロツリン、ニューロン成長因子(NGF)、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤アルカリ性ホスファターゼ(PLAP)、PIGF、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)
 30
 40
 、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、レニン、RS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、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72(腫瘍関連糖タンパク質-72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体(例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、精巣PLAP様アルカリ性ホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータPan特異的、TGF-ベータRI
 50

(ALK-5)、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpe、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A(TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B(TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)

、TNFRSF10C(TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A(RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B(OPG OCIF、TR1)

10

、TNFRSF12(TWEAK R FN14)、TNFRSF13B(TACI)、TNFRSF13C(BAFF R)、TNFRSF14(HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF17(BCMA)、TNFRSF18(GITR AITR)、TNFRSF19(TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A(TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B(TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3

20

(LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4(OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5(CD40 p50)、TNFRSF6(Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B(DcR3M68、TR6)、

TNFRSF7(CD27)、TNFRSF8(CD30)、TNFRSF9(4-1 BB CD137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DcT

RAIL R2TNFRH2)、TNFRST23(DcTRAIL R1TNFRH1)、TNFRSF25(DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11

(TRANCE/RANKリガンドODF、OPGリガンド)、TNFSF12(TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15(T

30

L1A/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(4-1 BBリガ

ンドCD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原

40

発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-カドヘリン、VE-カドヘリン-2、VEFGR-1(flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VN

Rインテグリン、フォンウィルブラント因子、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

。

50

【 0 0 8 3 】

本明細書に記載されている変異体Fcドメインを含む開示の抗体は、公知の「親」抗体のCDR配列または可変ドメイン配列を含むことができる。一部の実施形態では、親抗体および開示の抗体は、本明細書に開示されているFcドメインへの改変を除いて類似したまたは同一の配列を共有することができる。

【 0 0 8 4 】

例えば、親抗体は、リツキシマブ(Rituxan(登録商標)、IDEC/Genentech/Roche)(例えば米国特許第5,736,137号を参照)、非ホジキンリンパ腫を処置するために承認されたキメラ抗CD20抗体;HuMax-CD20、Genmabによって現在開発中の抗CD20、米国特許第5,500,362号に記載されている抗CD20抗体、AME-133(Applied Molecular Evolution)、hA20(Immunomedics, Inc.)、HumalYM(Intracel)およびPRO70769(PCT/US2003/040426、表題「Immunoglobulin Variants and Uses Thereof」)にかなり類似していてもよい。EGFR(ErbB-1)、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)を含む上皮成長因子受容体のファミリーのメンバーを標的にするいくつかの抗体は、本発明のFcポリペプチドから恩恵を受けることができる。例えば、本発明のFcポリペプチドは、トラスツズマブ(Herceptin(登録商標)、Genentech)(例えば米国特許第5,677,171号を参照)、乳がんを処置するために承認されたヒト化抗Her2/neu抗体;ペルツズマブ(rhuMab-2C4、Omnitarg(商標))、現在Genentechによって開発中;米国特許第4,753,894号に記載されている抗Her2抗体;セツキシマブ(Erbbitux(登録商標)、Imclone)(米国特許第4,943,533号;PCT WO96/40210)、様々ながんのために臨床試験中のキメラ抗EGFR抗体;ABX-EGF(米国特許第6,235,883号)、現在Abgenix-Immunex-Amgenによって開発中;HuMax-EGFR(米国特許シリアルナンバー10/172,317)、現在Genmabによって開発中;425、EMD55900、EMD62000およびEMD72000(Merck KGaA)(米国特許第5,558,864号;Murthyら1987、Arch Biochem Biophys.252(2):549-60頁;Rodeckら、1987、J Cell Biochem.35(4):315-20頁;Kettl eboroughら、1991、Protein Eng.4(7):773-83頁);ICR62(Institute of Cancer Research)(PCT WO95/20045;Modjtahediら、1993、J Cell Biophys.1993、22(1-3):129-46頁;Modjtahediら、1993、Br J Cancer.1993、67(2):247-53頁;Modjtahediら、1996、Br J Cancer.73(2):228-35頁;Modjtahediら、2003、Int J Cancer.105(2):273-80頁);TheraCIM hR3(YM Biosciences、Canada and Centro de Immunologia Molecular、Cuba(米国特許第5,891,996号;米国特許第6,506,883号;Mateoら、1997、Immunotechnology.3(1):71-81頁);mAb-806(Ludwig Institute for Cancer Research、Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluthら2003、Proc Natl Acad Sci USA.100(2):639-44頁);KSB-102(KS Biomedix);MR1-1(IVAX、National Cancer Institute)(PCT WO0162931A2);およびSC100(Scancell)(PCT WO01/88138)にかなり類似している抗体での使用が可能である。別の好ましい実施形態では、本発明のFcポリペプチドは、アレムツズマブ(Campath(登録商標)、Millenium)、B細胞慢性リンパ球性

10

20

30

40

50

白血病の処置のために現在承認されているヒト化モノクローナル抗体で利用できる。本発明のFcポリペプチドは、他の臨床製品および候補、例えばそれらに限定されずに、ムロナブ-CD3 (Orthoclone OKT3 (登録商標))、Ortho Biotech/Johnson & Johnsonによって開発された抗CD3抗体、イブリツモマブチウキセタン (Zevalin (登録商標))、IDEC/Schering AGによって開発された抗CD20抗体、ゲムツズマブオゾガミシン (Mylotarg (登録商標))、Celltech/Wyethによって開発された抗CD33 (p67タンパク質)抗体、Centocor/Lillyによって開発されたアブシキシマブ (ReoPro (登録商標))、Novartisによって開発されたバシリキシマブ (Simulect (登録商標))、MedImmuneによって開発されたパリビズマブ (Synagis (登録商標))、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、Centocorによって開発された抗TNFアルファ抗体、アダリムマブ (Humira (登録商標))、Abbottによって開発された抗TNFアルファ抗体、Humicade (商標)、Celltechによって開発された抗TNFアルファ抗体、ABX-CBL、Abgenixによって開発中の抗CD147抗体、ABX-IL8、Abgenixによって開発中の抗IL8抗体、ABX-MA1、Abgenixによって開発中の抗MUC18抗体、ベムツモマブ (R1549、90Y-muHMF G1)、Antisomaによって開発中の抗MUC1、Therex (R1550)、Antisomaによって開発中の抗MUC1抗体、Antisomaによって開発中のAngioMab (AS1405)、Antisomaによって開発中のHuBC-1、Antisomaによって開発中のチオプラチン (AS1407)、Antegren (登録商標) (ナタリズマブ)、Biogenによって開発中の抗アルファ-4-ベータ-1 (VLA-4) およびアルファ-4-ベータ-7抗体、VLA-1 mAb、Biogenによって開発中の抗VLA-1インテグリン抗体、LTBR mAb、Biogenによって開発中の抗リンフォトキシンベータ受容体 (LTBR) 抗体、CAT-152、Cambridge Antibody Technologyによって開発中の抗TGF-2抗体、J695、Cambridge Antibody TechnologyおよびAbbottによって開発中の抗IL-12抗体、CAT-192、Cambridge Antibody TechnologyおよびGenzymeによって開発中の抗TGF-1抗体、CAT-213、Cambridge Antibody Technologyによって開発中の抗エオタキシン1抗体、LymphoStat-B (商標)、Cambridge Antibody TechnologyおよびHuman Genome Sciences Inc.によって開発中の抗Bly s抗体、TRAIL-R1 mAb、Cambridge Antibody TechnologyおよびHuman Genome Sciences, Inc.によって開発中の抗TRAIL-R1抗体、Avastin (商標) (ベバシズマブ、rhumaB-VEGF)、Genentechによって開発中の抗VEGF抗体、Genentechによって開発中の抗HER受容体ファミリー抗体、抗組織因子 (ATF)、Genentechによって開発中の抗組織因子抗体、Xolair (商標) (オマリズマブ)、Genentechによって開発中の抗IgE抗体、Raptiva (商標) (エファリズマブ)、GenentechおよびXomaによって開発中の抗CD11a抗体、GenentechおよびMillenium Pharmaceuticalsによって開発中のMLN-02抗体 (旧称LDP-02)、HuMax CD4、Genmabによって開発中の抗CD4抗体、HuMax-IL15、GenmabおよびAmgenによって開発中の抗IL15抗体、GenmabおよびMedarexによって開発中のHuMax-Inflam、HuMax-がん、GenmabおよびMedarexおよびOxford GeoSciencesによって開発中の抗ヘパラーゼI抗体、GenmabおよびAmgenによって開発中のHuMax-リンパ腫、Genmabによって開発中のHuMax-TAC、IDEC-131、IDEC Pharmaceuticalsによって開発中の抗CD40L抗体、IDEC-151 (クレノリキシマブ)、IDEC Pharmaceutic

10

20

30

40

50

als によって開発中の抗CD4抗体、IDEC - 114、IDEC Pharmaceuticals によって開発中の抗CD80抗体、IDEC - 152、IDEC Pharmaceuticals によって開発中の抗CD23、IDEC Pharmaceuticals によって開発中の抗マクロファージ遊走阻止因子(MIF)抗体、BEC2、Imclone によって開発中の抗イディオタイプ抗体、IMC - 1C11、Imclone によって開発中の抗KDR抗体、DC101、Imclone によって開発中の抗flk-1抗体、Imclone によって開発中の抗VEカドヘリン抗体、CEA-Cide(商標)(ラベツズマブ)、Immunomedics によって開発中の抗がん胎児性抗原(CEA)抗体、LymphoCide(商標)(エブラツズマブ)、Immunomedics によって開発中の抗CD22抗体、Immunomedics によって開発中のAFP-Cide、Immunomedics によって開発中のMyelomaCide、Immunomedics によって開発中のLkoCide、Immunomedics によって開発中のProstaCide、MDX - 010、Medarex によって開発中の抗CTLA4抗体、MDX - 060、Medarex によって開発中の抗CD30抗体、Medarex によって開発中のMDX - 070、Medarex によって開発中のMDX - 018、Osidem(商標)(IDM - 1)、Medarex および Immuno-Designed Molecules によって開発中の抗Her2抗体、HuMax(商標) - CD4、Medarex および Genmab によって開発中の抗CD4抗体、HuMax - IL15、Medarex および Genmab によって開発中の抗IL15抗体、CNTO 148、Medarex および Centocor/J&J によって開発中の抗TNF抗体、CNTO 1275、Centocor/J&J によって開発中の抗サイトカイン抗体、MOR101およびMOR102、MorphoSys によって開発中の抗細胞間接着分子1(ICAM-1)(CD54)抗体、MOR201、MorphoSys によって開発中の抗線維芽細胞成長因子受容体3(FGFR-3)抗体、Nuvion(登録商標)(ビシリズマブ)、Protein Design Labs によって開発中の抗CD3抗体、HuZAF(商標)、Protein Design Labs によって開発中の抗ガンマインターフェロン抗体、Protein Design Labs によって開発中の抗51インテグリン、Protein Design Labs によって開発中の抗IL-12、ING-1、Xoma によって開発中の抗Ep-CAM抗体、ならびにMLN01、Xoma によって開発中の抗ベータ2インテグリン抗体、にかなり類似している様々な抗体またはFc融合体で使用でき、この段落の上で引用した参照の全ては、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0085】

一実施形態では、本発明の変異体は、自己免疫性、炎症性または移植適応症の処置のために使用される。そのような疾患に関連する標的抗原および臨床製品および候補には、限定されずに抗47インテグリン抗体、例えばLDP-02、抗ベータ2インテグリン抗体、例えばLDP-01、抗補体(C5)抗体、例えば5G1.1、抗CD2抗体、例えばBTI-322、MEDI-507、抗CD3抗体、例えばOKT3、SMART抗CD3、抗CD4抗体、例えばIDEC-151、MDX-CD4、OKT4A、抗CD11a抗体、抗CD14抗体、例えばIC14、抗CD18抗体、抗CD23抗体、例えばIDEC152、抗CD25抗体、例えばZenapax、抗CD40L抗体、例えば5c8、Antova、IDEC-131、抗CD64抗体、例えばMDX-33、抗CD80抗体、例えばIDEC-114、抗CD147抗体、例えばABX-CBL、抗E-セレクトリン抗体、例えばCDP850、抗gpIIb/IIIa抗体、例えばReoPro/Abcixima、抗ICAM-3抗体、例えばICM3、抗ICE抗体、例えばVX-740、抗FcR1抗体、例えばMDX-33、抗IgE抗体、例えばrhuma-b-E25、抗IL-4抗体、例えばSB-240683、抗IL-5抗体、例えばSB-240563、SCH55700、抗IL-8抗体、例えばABX-IL8、抗インターフェロンガンマ抗体、抗TNF(TNF、TNFa、TNFa、TNF-アルファ)抗体、例えばCDP571、CDP870、D2E7、インフリキシマブ、MAK-195

F、および抗VLA-4抗体、例えばAntegrenが含まれる。

【0086】

開示の変異体Fc領域を組み込むように操作することができる例示的な抗体を、下の表2に示す：

【0087】

【表2】

表2			
抗体標的と名前	鎖	配列識別子	配列
抗-CD40 (S2C6)	VL	配列番号3	DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQSLVHSN GNTFLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSQVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTH VPWTFGGGTKLEIQ
	VH	配列番号4	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSTGY YIHMVKQSKGHSLEWIGRVIPIVNGGTSYNQKF KGKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC AREGIYWWGHGTTTLTVSS
抗-CD20 (リツキシマブ)	VL	配列番号5	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIH WFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPRFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG GGTKLEIK
	VH	配列番号6	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTS YNMHVVKQTPGRGLEWIGAIYPNGGDTSYNQ KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
抗-CD25 (ダクリズマブ)	VL	配列番号7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSISYMH WYQQKPGKAPKLLIYTTSNLASGVPARFSGSG SGTEFTLTISLQPDDEFATYYCHQRSTYPLTFG QGTKVEVK
	VH	配列番号8	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSY RMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQK FKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDATVYY CARGGGVFDYWGQGTTLTVSS
抗-CD25 (バシリキシマブ)	VL	配列番号9	QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSISYMQ WYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSG SGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGG TKLEIK
	VH	配列番号10	EVQLQQSGTVLARPASVKMSCKASGYSFTRY WMHWIKRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQK FEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYY CSRDYGYDFWQGTTLTVSS
抗-TNF α (アダリムマブ)	VL	配列番号11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYL AWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTF GGTKVEIK
	VH	配列番号12	EVQLVESGGGLVQPRSLRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKVSYLSTASSLDYWGQGTTLTVSS
抗-TNF α (インフリキシマブ)	VL	配列番号13	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCTASQSVSNDV VWYQQKPGQSPKMLMYSAFNRYTGVPDRFTG RGYGTDFTFITISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPR TFGGGTKLEIKR
	VH	配列番号14	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYG MNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADD FKEHFAFSLETASTVFLQINNLKNEATATYFC ARERGDAMDYWGQGTSTVTVSS
抗-IL-6R (トシリズマブ)	VL	配列番号15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDFTFITISSLPEDIATYYCQQGNTLPYTFGQ

10

20

30

40

抗体標的と名前	鎖	配列識別子	配列
			GTKVEIK
	VH	配列番号16	QVQLQESGPGLVRPSTLSLTCTVSGYSITSDH AWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKS RVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYCARS LARTTAMDYWGQGS�VTVSS
抗-IL-1 (カナキヌマブ)	VL	配列番号17	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLH WYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGS GTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGP GTK
	VH	配列番号18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVY GMNWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYAD SVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNGLRAEDTAVY YCARDLRTGPFQDYWGQGLVT
抗-BAFF (ベリムマブ)	VL	配列番号19	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYA SWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSS GNRPSGIPNRFSGSSSGNASLTITGAQAEDEAD YYCSSRDSSGNHWVFVGGGTELTVLG
	VH	配列番号20	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCASGTFENN NAINWVRQAPGGLEWMGGIIPMFGTAKYSE NFQGRVAITADESTGTASMESSLRSDDTAVY YCARSRDLLFPFHALLSPWGRGTMVTVSS

【 0 0 8 8 】

このセクションで記載されている抗体のいくつかは、それらの生体特性を改善するために突然変異分析にかけた。望ましい特性を有するそのような突然変異体抗体は、開示の変異体 C H 2 ドメインおよび F c 領域を組み込むように改変することができる。例えば U S 2 0 1 0 / 0 2 6 6 6 1 3 A 1 は、抗 T N F 抗体 アダリムマブの変異体 V_L および V_H 配列を開示している。開示の変異体 C H 2 ドメインおよび F c 領域は、参照により本明細書にその全体が組み込まれている U S 2 0 1 0 / 0 2 6 6 6 1 3 A 1 に開示されている変異体抗 T N F 抗体のいずれかに組み込むことができる。一部の実施形態では、変異体抗 T N F 抗体は、U S 2 0 1 0 / 0 2 6 6 6 1 3 の表 5 の置換、すなわち V_L 鎖中の A 2 5 W、Q 2 7 R、Q 2 7 T、I 2 9 V、R 3 0 Q および L 3 3 E の 1 つ以上を含む。他の実施形態では、変異体抗 T N F 抗体は、U S 2 0 1 0 / 0 2 6 6 6 1 3 の表 1 0 からの置換の組合せ、すなわち V_L 鎖中の I 2 9 T / A 3 4 G、N 3 1 T / A 3 4 G、R 3 0 Q / A 3 4 S、R 3 0 Q、Q 2 7 G / A 3 4 G、Q 2 7 H / A 3 4 S、Q 2 7 R / A 3 4 S、G 2 8 S / A 3 4 S、N 3 1 T / A 3 4 S または N 3 1 S / A 3 4 S を含み、最も好ましくは G 2 8 S / A 3 4 S を含む。上の表 2 において、A 2 5 から A 3 4 までのひと続きのアミノ酸は、太字で、下線を引いたフォントである。

【 0 0 8 9 】

一部の実施形態では、感染性疾患に対する抗体が使用される。真核生物の細胞に対する抗体には、酵母細胞、例えば限定されずに、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセンラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、クルイベロミセス・フラジリス (*Kluyveromyces fragilis*) および *K. ラクチス* (*K. lactis*)、ピチア・ギレリモンジ (*Pichia guillierimondii*) および *P. パストリス* (*P. pastoris*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、プラスモディウム・ファルシパリウム (*Plasmodium falciparum*) およびヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) を標的にする抗体が含まれる。

【 0 0 9 0 】

カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*)、カンジダ・アルビカン
ス (*Candida albicans*)、*C. クルセイ* (*C. krusei*)、*C. ル*

シタニエ (*C. lusitaniae*) および *C. maltosa* を含むカンジダ属の株、ならびにアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、ヒストプラズマ属 (*Histoplasma*)、コクシジオイデス属 (*Coccidioides*)、プラストミセス属 (*Blastomyces*) およびペニシリウム属 (*Penicillium*) の種に関連した標的抗原を含む、追加の真菌細胞に対する抗体も有益である。

【0091】

原生動物に関連した標的抗原に対する抗体には、限定されずに、トリパノソーマ属 (*Trypanosoma*)、リーシュマニア・ドノバニ (*Leishmania donovani*) を含むリーシュマニア属種；プラスモディウム属種 (*Plasmodium* spp.)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、クリプトスポリジウム・パルブム (*Cryptosporidium parvum*)、ジアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*)、エントアメーバ・ヒストリティカ (*Entamoeba histolytica*) およびシクロスポラ・カイエタネンシス (*Cyclospora cayetanensis*) に関連した抗体が含まれる。

【0092】

原核生物の抗原に対する抗体、例えば、病原性および非病原性の原核生物などの適する細菌、例えば限定されずに、バシラス属 (*Bacillus*)、例えばバシラス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*)；ビブリオ属 (*Vibrio*)、例えば *V. cholerae*；エシェリヒア属 (*Escherichia*)、例えば腸内毒素原性 *E. coli*、シゲラ属 (*Shigella*)、例えば *S. dysenteriae*；サルモネラ属 (*Salmonella*)、例えば *S. typhi*；マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*) 例えば *M. tuberculosis*、*M. leprae*；クロストリジウム属 (*Clostridium*)、例えば *C. botulinum*、*C. tetani*、*C. difficile*、*C. perfringens*；コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、例えば *C. diphtheriae*；ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、*S. pyogenes*、*S. pneumoniae*；スタフィロコッカス属、例えば *S. aureus*；ヘモフィルス属 (*Haemophilus*)、例えば *H. influenzae*；ナイセリア属 (*Neisseria*)、例えば *N. meningitidis*、*N. gonorrhoeae*；エルシニア属 (*Yersinia*)、例えば *Y. lamblia*、*Y. pestis*、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、例えば *P. aeruginosa*、*P. putida*；クラミジア属 (*Chlamydia*)、例えば *C. trachomatis*；ボルデテラ属 (*Bordetella*)、例えば *B. pertussis*；トレポネーマ属 (*Treponema*)、例えば *T. palladium*；*B. anthracis*、*Y. pestis*、ブルセラ属種 (*Bruceella* spp.)、*F. tularensis*、*B. mallei*、*B. pseudomallei*、*B. mallei*、*B. pseudomallei*、*C. botulinum*、サルモネラ属種、SEBV、コレラ毒素 B、*E. coli* O157:H7、リステリア属種 (*Listeria*)、トリコスポロン・ベイグリー (*Trichosporon beigelii*)、ロドトルラ属種 (*Rhodotorula* species)、ハンゼヌラ・アノマラ (*Hansenula anomala*)、エンテロバクター属種 (*Enterobacter* sp.)、クレブシエラ属種 (*Klebsiella* sp.)、リステリア属種、マイコプラズマ属種 (*Myc*

10

20

30

40

50

oplasmasp.)などに対する抗体も有益である。

【0093】

一部の態様では、抗体はウイルス感染症に向けられる；これらのウイルスには、オルソミクソウイルス（例えばインフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（例えばRSウイルス、おたふくかぜウイルス、はしかウイルス）、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、トガウイルス（例えば風疹ウイルス）、パルボウイルス、ポックスウイルス（例えば痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス）、エンテロウイルス（例えばポリオウイルス、コクサッキーウイルス）、肝炎ウイルス（A型、B型およびC型を含む）、ヘルペスウイルス（例えば単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス）、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、ハンタウイルス、アレナウイルス、ラブドウイルス（例えば狂犬病ウイルス）、レトロウイルス（HIV、HTLV-Iおよび-IIを含む）、パポバウイルス（例えば乳頭腫ウイルス）、ポリオマウイルスおよびピコルナウイルスなどが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0094】

6.3.Fc融合タンパク質

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、Fc融合タンパク質である。Fcをベースとした融合タンパク質は、別のペプチドに直接連結されている免疫グロブリンFcドメインで一般的に構成される。Czajkowskyら、2012、EMBO Mol Med 4:1015-1028頁によって説明されているように、融合パートナーは対象の任意の他のタンパク性分子、例えば細胞表面受容体との相互作用によりタンパク質を活性化するリガンド、難しい病原体に対するペプチド抗原（Ag）またはタンパク質マイクロアレイで組み立てられた結合パートナーを同定するための「餌」タンパク質であってもよい。最も頻繁には、Fcドメインは治療潜在能力を有するポリペプチドに融合されて、いくつかの追加の有益な生物学および薬理学的特性を融合に与える。Fcドメインの存在は、タンパク質の血漿半減期を著しく増加させることができ、それはサルベージ新生児Fc受容体とのその相互作用（FcRn；Roopenian&Akilesh、2007、Nat Rev Immunol 7:715-725頁）、ならびにより大きな分子のより遅い腎クリアランス（Kontermann、2011、Curr Opin Biotechnol 22:868-876頁）のためにその治療活性を長引かせる。付着しているFcドメインは、これらの分子が免疫細胞の上で見出されるFc受容体（FcR）と相互作用することも可能にする（Nimmerjahn&Ravetch、2008、Nat Rev Immunol 8:34-47頁）。

20

30

【0095】

したがって、Fc融合体は、抗体のFc領域、したがってその好都合のエフェクター機能および薬物動態を、受容体の標的結合領域、リガンドまたは一部の他のタンパク質もしくはタンパク質ドメインと組み合わせる。後者の役割は標的認識を媒介することであり、したがってそれは抗体可変領域に機能的に類似している。Fc融合体の抗体との構造的および機能的重複のために、本開示での抗体に関する議論は特記しない限りFc融合体に拡張する。

40

【0096】

例示的な実施形態では、Fc融合パートナーは、TNF受容体IIの細胞外ドメイン（「ECD」）；リンパ球機能関連抗原3（LFA-3）の第1のECD；ヒト細胞傷害性Tリンパ球関連分子-4（CTLA-4）のECD；IL-1RI ECDのN末端に融合しているIL-1RAクセサリータンパク質リガンド結合領域のC末端；ペプチドトロンボポエチン（TPO）模倣体；2つのアミノ酸置換L104EおよびA29Yを有するCTLA-4のECD；またはVEGF受容体1および2のECDである。

【0097】

本明細書に記載されている変異体Fcドメインを含む開示のFc融合タンパク質は、公知の「親」Fc融合体、例えば表3に記載されている承認された生物製剤に基づいてもよ

50

い。

【 0 0 9 8 】

【 表 3 】

表3			
国際非商標(商品)名	説明	作用機作	最初の米国承認の年と適応症
エタナーセプト (Enbrel (登録商標))	ヒトIgG1 Fcに融合された腫瘍壊死因子(TNF)受容体I Iの75kDa可溶性細胞外ドメイン(ECD)	TNFの膜結合性および可溶性の形に結合し、それによって炎症性サイトカインの濃度を低減する	1998 関節リウマチ
アレファセプト (Amevive (登録商標))	ヒトIgG1 Fcに融合されたリンパ球機能関連抗原3(LFA-3)の第1のECD	CD2に結合する;APCの上のLFAとT細胞の上のCD2の間の相互作用をブロックし、それによってT細胞活性化を阻害する	2003 プラーク乾癬
アバタセプト (Orencia(登録商標))	ヒトIgG1 Fcに融合されたヒト細胞傷害性Tリンパ球関連分子-4(CTLA-4)のECD	APCの上のCD80またはCD86とT細胞の上のCD28の間の相互作用をブロックし、それによってT細胞活性化を阻害する	2005 関節リウマチ
リロナセプト (Arcalyst(登録商標))	ヒトIgG1 Fcに融合された、IL-1RI ECDのN末端に融合されているIL-1RAアクセサリタンパク質リガンド結合領域のC末端を各々含む2つの鎖	IL-1に結合し、それによって内因性細胞表面受容体との相互作用を阻止する	2008 プラーク乾癬
ロミプロスチム (Nplate(登録商標))	無グリコシル化ヒトIgG1 FcのC末端に融合されたペプチドトロンボポエチン(TPO)模倣体;E. コリーで生成される	TP0受容体に結合してアゴナイズする;グリコシル化の欠如のためにFc機能性は最小化される	2008 血小板減少症
ベラタセプト (Nulojix(登録商標))	ヒトIgG1 Fcに融合されたCTLA-4のECD;CTLA-4領域の2つのアミノ酸置換(L104E、A29Y)によってアバタセプトと異なる	APCの上のCD80またはCD86とT細胞の上のCD28の間の相互作用をブロックし、それによってT細胞活性化を阻害する	2011 成体腎臓移植レシピエントでの器官拒絶反応の予防
アフリベルセプト (Eylea(商標))	ヒトIgG1 Fcに融合されたVEGF受容体1および2のECD	VEGF-Aの全ての形ならびに胎盤成長因子に結合し、それによって血管形成を阻害する	2011 湿性の年齢関連の黄斑変性症

【 0 0 9 9 】

一部の実施形態では、開示の親Fc融合体およびFc融合体は、本明細書に開示されているFcドメインへの改変を除いて類似したまたは同一の配列を共有することができる。

【 0 1 0 0 】

Fc融合タンパク質は、完全なFc領域の代わりに変異体CH2ドメインだけを含むこともできる。変異体CH2ドメインを含む融合タンパク質は、例えば二量体化ドメインとしておよび/または融合ポリペプチドをFc I I Bに誘導するために使用することができる。一実施形態では、融合パートナーは、「直列型の」Fcポリペプチドを形成する、IgE Fcドメインなどの別のFcドメインである。IgG-IgE融合ポリペプチドは、Fc RおよびFc R I I Bに結合し、肥満細胞脱顆粒を停止することが示された。C e r m e r s k i ら、2012、Immunol . L e t t . 143:34-43頁を参照。

【 0 1 0 1 】

6.4. 核酸および発現系

本開示は、開示のFc変異体ポリペプチドをコードする核酸分子および宿主細胞を包含

10

20

30

40

50

する。

【0102】

抗体である開示の変異体抗体は、宿主細胞での免疫グロブリンの軽鎖および重鎖遺伝子の組換え発現によって調製することができる。例えば、組換えで抗体を発現させるために、軽鎖および重鎖が宿主細胞で発現され、場合によって、抗体を回収することができる、宿主細胞が培養される培地に分泌されるように、抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするDNA断片を運ぶ1つ以上の組換え発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクトする。抗体重鎖および軽鎖遺伝子を得、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込み、ベクターを宿主細胞に導入するために、標準の組換えDNA方法、例えばMolecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版(Sambrook、FritschおよびManiatis(編)、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989)、Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel、F.M.ら、編、Greene Publishing Associates、1989)、および米国特許第4,816,397号に記載されている方法が使用される。

10

【0103】

一実施形態では、Fc変異体ポリペプチドは、それらのFcドメインでの変化を除いてそれらの野生型同等物に類似している。そのようなFc変異体ポリペプチドをコードする核酸を生成するために、野生型抗体のFcドメインまたはFcドメインの一部(「野生型Fcドメイン」と呼ぶ)をコードするDNA断片を合成して、日常の突然変異誘発技術を使用して本明細書に記載されているポリペプチドを生成する突然変異誘発のための鑄型として使用することができ;あるいは、ポリペプチドをコードするDNA断片を直接に合成することができる。

20

【0104】

野生型FcドメインをコードするDNA断片が得られると、例えば定常領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子に変換するために、標準の組換えDNA技術によってこれらのDNA断片をさらに操作することができる。これらの操作では、CHをコードするDNA断片は、別のタンパク質、例えば抗体可変領域またはフレキシブルリンカーをコードする別のDNA断片に作動可能に連結される。この文脈で使用されるように、用語「作動可能に連結される」は、その2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように、2つのDNA断片が連結されることを意味するものとする。

30

【0105】

開示のFc変異体ポリペプチドを発現させるために、その遺伝子が転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、上記のように得られる部分的なまたは完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAが発現ベクターに挿入される。この文脈において、用語「作動可能に連結される」は、ベクターの中の転写および翻訳制御配列がポリペプチド遺伝子の転写および翻訳を調節するそれらの意図された機能を果たすように、ポリペプチド遺伝子がベクター中にライゲーションされることを意味するものとする。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用する発現宿主細胞に適合するように選択される。変異体抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は別々のベクターに挿入されてもよく、またはより一般的には、両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。

40

【0106】

ポリペプチド遺伝子は、標準の方法によって発現ベクターに挿入される(例えば、ポリペプチド遺伝子断片およびベクターの上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合は平滑末端ライゲーション)。変異体Fcドメイン配列の挿入の前に、発現ベクターは既に抗体可変領域配列をもっているもよい。さらに、または代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドであってもよく、または異種シグナルペプ

50

チド（すなわち、免疫グロブリン以外のタンパク質からのシグナルペプチド）であってもよい。

【0107】

抗体鎖遺伝子に加えて、開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞で抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を運ぶ。用語「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むものとする。そのような調節配列は、例えば、Goeddel、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990)に記載されている。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換する宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子によって決めることができることは、当業者に理解される。哺乳動物宿主細胞での発現のために適する調節配列には、哺乳動物細胞で高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルスエレメント、例えばサイトメガロウイルス (CMV) (例えばCMVプロモーター/エンハンサー)、シミアンウイルス40 (SV40) (例えばSV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス主後期プロモーター (AdMLP)) およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。ウイルス調節エレメントおよびその配列のさらなる説明については、例えば、Stinskiによる米国特許第5,168,062号、Bellらによる米国特許第4,510,245号およびSchaffnerらによる米国特許第4,968,615号を参照。

【0108】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞でのベクターの複製を調節する配列（例えば複製開始点）などの追加の配列、および選択マーカー遺伝子を運ぶことができる。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、全てAxelらによる米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017号を参照）。例えば、一般的に、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ピューロマイシン、ブラストサイジン、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬物への耐性を付与する。適する選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (DHFR⁻宿主細胞でメトトレキセート選択/増幅と使用するために) およびネオ遺伝子 (G418選択のために) が含まれる。軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター（複数可）は、標準の技術によって宿主細胞にトランスフェクトされる。用語「トランスフェクション」の様々な形は、原核生物または真核生物の宿主細胞への外因性DNAの導入のために一般的に使用される様々な技術、例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントラnsフェクションなどを包含するものとする。

【0109】

原核生物または真核生物のいずれかの宿主細胞で開示のポリペプチドを発現させることが可能である。ある特定の実施形態では、ポリペプチドの発現は、適切に折り畳まれている、免疫活性のあるポリペプチドの最適な分泌のために、真核生物細胞、例えば哺乳動物の宿主細胞で実行される。開示の組換えポリペプチドを発現させるための例示的な哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞) (DHFR選択マーカー、例えばKauffmanおよびSharp, 1982, Mol. Biol. 159: 601-621頁に記載されているものと使用された、UrlaubおよびChasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220頁に記載されているDHFR⁻ CHO細胞を含む)、NS0骨髓腫細胞、COS細胞、293細胞およびSP2/0細胞が含まれる。ポリペプチド遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入されるとき、宿主細胞でのポリペプチドの発現を可能にするまたは宿主細胞が増殖する培地へのポリペプチドの分泌を可能にするのに十分な時間、宿主細胞を培養することによってポリペプチドは生成される。ポリペプチドは、標準のタ

ンパク質精製方法を使用して培地から回収することができる。宿主細胞は、無傷のポリペプチドの一部、例えばF a b断片またはs c F v分子を生成するために使用することもできる。上記の手順の変形が本開示の範囲内であると理解される。

【0110】

組換えDNA技術は、抗原への結合のために必要でない軽鎖および重鎖の一方または両方をコードするDNAの一部または全部を取り除くために使用することもできる。そのようなトランケーションされたDNA分子から発現される分子も、開示のポリペプチドに含まれる。

【0111】

一部の実施形態では、開示のポリペプチドは、二官能基抗体であってもよい。1つの重鎖および1つの軽鎖が1つの抗原に特異的であり、他の重鎖および軽鎖が第2の抗原に特異的であるそのような抗体は、標準の化学架橋法によって開示の抗体を第2の抗体へ架橋させることによって生成することができる。二官能基の抗体は、二官能基抗体をコードするように操作された核酸を発現させることによって作製することもできる。

10

【0112】

ある特定の実施形態では、二重特異抗体、すなわち同じ結合部位を使って1つの抗原および第2の無関係な抗原に結合する抗体は、軽鎖および/または重鎖のCDRのアミノ酸残基を突然変異させることによって生成することができる。例示的な第2の抗原には、炎症誘発性サイトカイン（例えばリンフォトキシン、インターフェロン - またはインターロイキン - 1）が含まれる。二重特異的ポリペプチドは、例えば、抗原結合部位の末梢のアミノ酸残基を突然変異させることによって生成することができる（例えば、Bostromら、2009、Science 323:1610-1614頁を参照する）。二重官能性のポリペプチドは、二重特異的ポリペプチドをコードするように操作された核酸を発現させることによって作製することができる。

20

【0113】

開示のポリペプチドは、化学的合成（例えば、Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、1984、The Pierce Chemical Co.、Rockford、Illに記載されている方法による）によって生成することもできる。ポリペプチドは、無細胞プラットホームを使用して生成することもできる（例えば、Chura、Biochemia 2号、2001（Roche Molecular Biologicals）を参照）。

30

【0114】

Fc融合タンパク質の組換え発現のための方法は、Flanaganら、Methods in Molecular Biology、第378巻：Monoclonal Antibodies: Methods and Protocolsに記載されている。

【0115】

開示のポリペプチドが組換え発現によって生成されると、それは免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野で公知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、プロテインAまたはプロテインG選択の後の抗原については特に親和性、およびサイズ処理カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差別的溶解性、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準技術によって精製することができる。さらに、本開示のポリペプチドまたはその断片は、精製を促進するために、本明細書に記載されているさもなければ当技術分野で公知である異種ポリペプチド配列に融合させることができる。

40

【0116】

単離されると、ポリペプチドは所望により、例えば高速液体クロマトグラフィー（例えば、Fisher、Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology（WorkおよびBurdon編、Elsevier、1980））、またはSuperdex（商標）75カラム

50

(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)でのゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに精製されてもよい。

【0117】

6.5. Fc変異体ポリペプチドの生体活性

FcRIIIAおよび/またはFcRIIBへの結合に影響を与えるFc領域中のアミノ酸置換の組込みのために、開示のポリペプチドは、改変された生体活性、例えば改変されたエフェクター機能ならびに/またはFcRIIIAおよび/もしくはFcRIIBへの結合を提示する。

【0118】

一実施形態では、エフェクター機能はADCCである。したがって、本開示は、非変異体Fcポリペプチド、すなわち、FcRIIBへの結合を増加させおよび/またはFcRIIIAへの結合を減少させる置換(複数可)、例えば置換V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305KおよびV305Wの1つ以上を除いて同一であるポリペプチドと比較して、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%またはそれ以上も低減されるADCCを示すことで特徴付けられる変異体Fcポリペプチドを提供する。

【0119】

ある特定の実施形態では、ADCCの低減は、例えば3以上、6以上、10以上または50以上の数の健康なドナーからのPBMCエフェクター細胞を使用するときに、例えば25:1、40:1、50:1または60:1のエフェクター対標的細胞比を使用して、1μg/mLまたは2μg/mL以上(例えば、3μg/mL、4μg/mLまたは5μg/mL)のポリペプチド濃度でのインビトロアッセイで測定される。実施例9に記載されているようにADCC活性はフローサイトメトリーによって測定することができ、または実施例10に記載されているように⁵¹Cr放出を測定することによって測定することができる。ADCCアッセイで利用される標的細胞は変異体ポリペプチドの結合特異性に依存し、当業者ならば容易に決定することができる。例えば、実施例9に記載されているように、Raji細胞は、抗体Hu1D10(およびそのFc変異体)のADCC活性の検査のための適する標的細胞であり、実施例10に記載されているように、リンパ腫RL細胞は、抗CD40抗体(およびそのFc変異体)のADCC活性の検査のための適する標的細胞である。

【0120】

別の実施形態では、エフェクター機能は架橋Fcポリペプチドによる標的細胞の免疫活性化である。例えば1つのアッセイでは、標的細胞は樹状細胞であり、架橋Fcポリペプチドは抗CD40抗体である。一般的に、FcRIIBへのFc領域の結合は、受容体のITAMモチーフを通してFcRIIB陽性細胞に負のシグナルを提供する。しかし、樹状細胞の表面でのFcRIIBへの抗CD40抗体のFc領域の結合はCD40の架橋を向上させ、樹状細胞によるIL-12生成の増加をもたらす。したがって、FcRIIBへの親和性を増加させることは、より高いIL-12分泌をもたらす。したがって、開示は、CD40抗体に接いだときに、そのFc領域が樹状細胞でIL-12分泌を増加させる変異体Fcポリペプチドを提供する。様々な実施形態では、Fc領域は、非変異体抗CD40抗体、すなわち、FcRIIBへの結合を増加させ、場合によってさらにFcRIIIAへの結合を減少させる置換(複数可)、例えば置換V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305KおよびV305Wの1つ以上を除いて同一である抗CD40抗体と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、またはそれ以上も樹状細胞を活性化することができる。

【0121】

ある特定の実施形態では、樹状細胞の免疫活性化は、IL-12p70分泌アッセイで

測定される。簡潔には、単球由来の未熟な樹状細胞（「m o D C」）は、開示のポリペプチドで刺激することができ、I F N でプライミングすることができ、生成されたI L - 1 2 p 7 0の生じた量は例えばE L I S Aによって検査することができる。例示的な実施形態では、I L - 1 2 p 7 0分泌アッセイは、下記の実施例 1 1に記載されているように実施される。

【 0 1 2 2 】

さらに他の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは、F c R I I Bへの結合の増加および/またはF c R I I Aへの結合の低減を提示する。例示的な結合アッセイは、実施例 7 および 8 に記載されている。ある特定の実施形態では、F c R I I Bへの変異体ポリペプチドの結合は、非変異体F cポリペプチド、例えば、V 2 6 3 L、V 2 6 6 L、V 2 7 3 C、V 2 7 3 E、V 2 7 3 F、V 2 7 3 L、V 2 7 3 M、V 2 7 3 S、V 2 7 3 Y、V 3 0 5 KおよびV 3 0 5 Wの置換の1つ以上を除いて同一であるポリペプチドのF c R I I Bへの結合より少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%または少なくとも約50%大きい。さらなる実施形態では、F c R I I Aへの変異体ポリペプチドの結合は、非変異体F cポリペプチド、例えば、V 2 6 3 L、V 2 6 6 L、V 2 7 3 C、V 2 7 3 E、V 2 7 3 F、V 2 7 3 L、V 2 7 3 M、V 2 7 3 S、V 2 7 3 Y、V 3 0 5 KおよびV 3 0 5 Wの置換の1つ以上を除いて同一であるポリペプチドのF c R I I Aへの結合より少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%または少なくとも約50%小さい。

【 0 1 2 3 】

6 . 6 . ポリペプチドコンジュゲート

開示のポリペプチドには、例えば、共有結合が抗原への結合に干渉しないような、ポリペプチドへの任意の種類の分子の共有結合によって改変されるポリペプチドコンジュゲートが含まれる。

【 0 1 2 4 】

ある特定の態様では、開示のポリペプチドは、エフェクター部分または標識にコンジュゲートされてもよい。本明細書で用いられる用語「エフェクター部分」には、例えば、抗腫瘍薬、薬物、毒素、生物活性タンパク質、例えば酵素、抗体もしくは抗体断片、合成されたもしくは天然に存在するポリマー、核酸（例えば、DNAおよびRNA）、放射性核種、特に放射性ヨウ化物、放射性同位体、キレート化金属、ナノ粒子およびレポーター基、例えば蛍光性化合物またはNMRもしくはESR分光法によって検出することができる化合物が含まれる。

【 0 1 2 5 】

1つの例では、所与の生体応答を改変するために、ポリペプチドはエフェクター部分、例えば細胞傷害剤、放射性核種または薬物部分にコンジュゲートされてもよい。エフェクター部分は、タンパク質またはポリペプチド、例えば、限定せずに、毒素（アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素またはジフテリア毒素など）、シグナル伝達分子（ γ -インターフェロン、 δ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子または組織プラスミノゲン活性化因子など）、血栓剤もしくは抗血管新生剤（例えば、アンギオスタチンまたはエンドスタチン）または生体応答調整剤、例えばサイトカインもしくは成長因子（例えば、インターロイキン - 1（IL - 1）、インターロイキン - 2（IL - 2）、インターロイキン - 6（IL - 6）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM - CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G - CSF）または神経成長因子（NGF））であってもよい。

【 0 1 2 6 】

別の例では、エフェクター部分は、細胞毒素または細胞傷害剤であってもよい。細胞毒素および細胞傷害剤の例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシン

ジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1 - デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、およびその類似体または相同体が含まれる。

【0127】

エフェクター部分には、限定されずに、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロルエタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC5およびシス - ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（旧ダウノマイシン）およびドキソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン（AMC）、カリケアマイシンまたはデュオカルマイシン）、および有糸分裂阻害剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）も含まれる。

【0128】

他のエフェクター部分には、放射性核種、例えば限定されずに、 ^{111}In および ^{90}Y 、 Lu^{177} 、ビスマス 213 、カリホルニウム 252 、イリジウム 192 およびタングステン 188 / レニウム 188 、ならびに薬物、例えば限定されずに、アルキルホスホコリン、トポイソメラーゼI阻害剤、タキソイドおよびスラミンが含まれてもよい。

【0129】

そのようなエフェクター部分をポリペプチドにコンジュゲートする技術は当技術分野で周知である（例えば、Hellstromら、Controlled Drug Delivery、第2版、623 - 53頁（Robinsonら編、1987））；Thorpeら、1982、Immunol. Rev. 62：119 - 58頁およびDubowchikら、1999、Pharmacology and Therapeutics 83：67 - 123頁）。

【0130】

1つの例では、ポリペプチドは、共有結合（例えば、ペプチド結合）により、ポリペプチドのN末端もしくはC末端を通して、または内部的に別のタンパク質のアミノ酸配列（またはその一部、例えばタンパク質の少なくとも10、20または50アミノ酸部分）に融合される。ポリペプチドは、他のタンパク質にポリペプチドのFcドメインのN末端で連結することができる。そのような融合体を作製するために、例えばWO86/01533およびEP0392745に記載されているように、組換えDNA方法を使用することができる。別の例では、エフェクター分子はインビボ半減期を増加させることができ、および/または上皮障壁を横断する免疫系へのポリペプチドの送達を増強することができる。このタイプの適するエフェクター分子の例には、ポリマー、アルブミン、アルブミン結合性タンパク質またはアルブミン結合性化合物、例えばWO2005/117984に記載されているものが含まれる。

【0131】

ある特定の態様では、ポリペプチドは小分子毒素にコンジュゲートされる。ある特定の例示的な実施形態では、開示のポリペプチドは、ドラスタチンまたはドラスタチンペプチド類似体もしくは誘導体、例えばオーリスタチンにコンジュゲートされる（米国特許第5,635,483号および第5,780,588号）。ドラスタチンまたはオーリスタチン薬物部分は、そのN（アミノ）末端、C（カルボキシル）末端を通して、または内部的にポリペプチドに付着させることができる（WO02/088172）。ここに参照によりその全体が組み込まれている米国特許第7,498,298に開示されているように（例えば、リンカーおよびリンカーにコンジュゲートされるMMAEおよびMMAFなどのモノメチルバリン化合物の調製方法を開示している）、例示的なオーリスタチン実施形態には、N末端に連結されたモノメチルオーリスタチン薬物部分DEおよびDFが含まれる。

【0132】

他の例示的实施形態では、小分子毒素には、限定されずに、カリケアマイシン、マイタンシン（米国特許第5,208,020号）、トリコテセン（trichothene）およびCC1065が含まれる。本開示の一実施形態では、ポリペプチドは、1つ以上のマイタンシン分子（例えばポリペプチド1分子につき約1から約10の数のマイタンシン分子）にコンジュゲートされる。マイタンシンは、例えば、May-SH3に還元してポリペプチドと反応させて（Chaririら、1992、Cancer Research 52:127-131頁）、マイタンシノイド-ポリペプチドまたはマイタンシノイド-Fc融合コンジュゲートを生成することができる、May-SS-Meに変換することができる。同じく用いることができるカリケアマイシンの構造類似体には、限定されずに、 1^1 、 3^1 、 3^1 N-アセチル- 1^1 、PSAGおよび 1^1 が含まれてもよい（Hinmanら、1993、Cancer Research 53:3336-3342頁；Lodeら、1998、Cancer Research 58:2925-2928頁；米国特許第5,714,586号；米国特許第5,712,374号；米国特許第5,264,586号；米国特許第5,773,001号）。

10

【0133】

開示のポリペプチドは、標的送達のためにリボソームにコンジュゲートされてもよい（例えば、Parkら、1997、Adv. Pharmacol. 40:399-435頁；Marty & Schwendener、2004、Methods in Molecular Medicine 109:389-401頁を参照）。

20

【0134】

1つの例では、本開示のポリペプチドは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分に付着させることができる。1つの特定の例では、ポリペプチドは抗体断片であり、PEG部分は抗体断片に位置する任意の利用可能なアミノ酸側鎖または末端のアミノ酸官能基、例えば任意の遊離のアミノ、イミノ、チオール、ヒドロキシルまたはカルボキシル基を通して付着させることができる。そのようなアミノ酸は抗体断片に天然に存在してもよくまたは組換えDNA方法を用いて断片に導入することができる。例えば、米国特許第5,219,996号を参照。2つ以上のPEG分子を付着させるために、多部位を使用することができる。PEG部分は、抗体断片に位置する少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を通して共有結合することができる。チオール基が付着点として使用される場合、適切に活性化されたエフェクター部分（例えば、マレイミドおよびシステイン誘導体などのチオール選択的誘導体）を使用することができる。

30

【0135】

本明細書で用いるとき、語「標識」は、開示のポリペプチドと直接または間接にコンジュゲートさせることができる検出可能な化合物または組成物を指す。標識はそれ自体検出可能であってもよく（例えば放射性同位体標識または蛍光標識）または、酵素標識の場合は検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒することができる。有益な蛍光性部分には、限定されずに、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル塩化物、フィコエリトリンなどが含まれる。有益な酵素標識には、限定されずに、アルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどが含まれる。

40

【0136】

6.7. 医薬組成物および治療方法

それらの低いADCC活性のために、開示のポリペプチドは、細胞殺滅が望ましくない、自己免疫性疾患を含む免疫疾患および障害の状況で特に有益である。そのような疾患および障害の例には、アジソン病、耳の自己免疫性疾患、ブドウ膜炎などの眼の自己免疫性疾患、自己免疫性肝炎、クローン病、糖尿病（I型）、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブズ病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常天疱瘡、乾癬、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、乾癬、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、潰瘍性大腸炎および/また

50

は血管炎が含まれる。しかし、開示のポリペプチドは、特にポリペプチドが標的分子を通してシグナル伝達することが可能であるときおよび／またはエフェクター部分にコンジュゲートされる場合は、細胞殺滅が望ましい適応症、例えば腫瘍適応症の処置で使用することもできる。Fc変異体ポリペプチドを使用する処置のために適する具体的な適応症（複数可）は、Fc変異体ポリペプチドの非Fc部分の配列および／または特性に依存し、当業者が容易に判定することができる。例示的な実施形態を、下に示す。

【0137】

一実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗CD40抗体であり、CD40発現がん、例えば慢性リンパ球性白血病、パーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ワルデンストレームマクログロブリン血症、カボジ肉腫、卵巣がん、乳がん、肺がん、黒色腫、膵がんまたは腎臓がんを処置するために使用される。抗CD40抗体は、多重特異的抗体であってもよい。

10

【0138】

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗CD20抗体であり、関節リウマチまたは多発性硬化症を処置するために使用される。

【0139】

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗CD25抗体であり、多発性硬化症、乾癬、喘息、ブドウ膜炎、眼性炎症またはヒトT細胞白血病ウイルス-1関連のT細胞白血病を処置するために、または臓器移植拒絶反応を予防するために使用される。

【0140】

20

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗TNF抗体であり、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎またはプラーク乾癬を処置するために使用される。

【0141】

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗IL-6受容体抗体であり、関節リウマチまたはキャッスルマン病を処置するために使用される。

【0142】

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗4-インテグリン抗体であり、多発性硬化症を処置するために使用される。

【0143】

30

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗IL-1抗体であり、Cryopyrin関連周期熱症候群（「CAPS」）を処置するために使用される。

【0144】

別の実施形態では、開示の変異体ポリペプチドは抗BAFF抗体であり、全身性エリテマトーデスまたはアレルギーを処置するために使用される。

【0145】

本開示は、それを必要とする患者で上述の疾患のいずれかを処置する方法であって、開示の適当なポリペプチドを治療的有效用量で患者に投与することを含む方法を提供する。

【0146】

本明細書で用いるように、ポリペプチドの「治療的有效」量は、単一の用量としてまたは治療レジメンクールにわたって、例えば、1週、2週、3週、1カ月、3カ月、6カ月、1年もしくはそれより長いクールにわたって投与することができる。

40

【0147】

投与される開示のポリペプチドの投薬量は、特定の抗原特異性、自己免疫性または炎症性疾患の種類、対象、および疾患の性質および重症度、対象の身体状態、治療レジメン（例えば、組合せ治療薬が使用されるかどうか）、ならびに選択される投与経路によって異なり；適当な投薬量は、当分野の技術者が容易に判定することができる。

【0148】

ヒトおよび動物での自己免疫性または炎症性の疾患の処置および／または予防のために、任意の適する投与経路、例えば注射および当技術分野で公知である抗体ベースの臨床製

50

品のための他の投与経路を使用して、患者（例えば、ヒト対象）にポリペプチドを含む医薬組成物を治療的または予防的に有効な投薬量（例えば、自己免疫性または炎症性の疾患の阻止および／または自己免疫性または炎症性の疾患症状の軽減をもたらす投薬量）で投与することができる。

【0149】

開示のポリペプチドの個々の投薬の最適な量および間隔は、処置されている状態の性質および程度、投与の形、経路および部位、ならびに処置されている特定の対象の年齢および状態によって決定されること、ならびに使用する適当な投薬量を最終的に医師が決定することは、当業者によって認識される。この投薬は、適宜何回でも繰り返すことができる。副作用が生じる場合は、通常の医療慣行に従って、投薬の量および／または頻度を変更または低減することができる。

10

【0150】

本開示に従って、疾患の処置は、任意の臨床ステージまたは徴候の任意の形の疾患を有すると既に診断されている患者の処置；疾患の症状もしくは徴候の開始もしくは進展もしくは悪化もしくは増悪の遅延；ならびに／または疾患の予防および／もしくはその重症度の低減を包含する。

【0151】

開示のポリペプチドが投与される「対象」または「患者」は、好ましくは非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）または霊長類（例えば、サルまたはヒト）などの哺乳動物である。ある特定の実施形態では、対象または患者はヒトである。ある特定の態様では、ヒトは小児患者である。他の態様では、ヒトは成人患者である。

20

【0152】

開示のポリペプチドを含む組成物が本明細書で提供される。組成物は、医薬として許容される担体を通例含む、無菌の医薬組成物の一部として一般的に供給される。この組成物は、任意の適する形であってよい（患者にそれを投与する所望の方法による）。

【0153】

医薬組成物は、1用量につき開示のポリペプチドの所定量を含有する単位用量形で便利に提供することができる。そのような単位は、例えば、限定されずに、5 mg から 5 g、例えば 10 mg から 1 g、または 20 から 50 mg、40 mg から 100 mg、または 50 mg から 300 mg を含有することができる。開示で用いられる医薬として許容される担体は、例えば処置される状態または投与経路によって多種多様の形をとることができる。

30

【0154】

開示のポリペプチドの治療製剤は、所望の純度を有するポリペプチドを、当技術分野で一般的に用いられる場合による医薬として許容される担体、賦形剤または安定剤（その全ては本明細書において「担体」と呼ばれる）、すなわち、緩衝剤、安定化剤、保存剤、等張剤、非イオン性界面活性剤、抗酸化剤および他の雑多な添加剤と混合することによって、保存のために凍結乾燥製剤または水性溶液として調製することができる。Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版（Osol 編、1980）を参照。そのような添加剤は、用いられる投薬量および濃度においてレシピエントに無毒でなければならない。

40

【0155】

緩衝剤は、生理的条件に近似した範囲に pH を維持するのを助ける。それらは、約 2 mM から約 50 mM の範囲内の濃度で存在してもよい。本開示の使用に適する緩衝剤には、有機および無機の酸およびその塩、例えばクエン酸緩衝液（例えば、クエン酸ナトリウム - クエン酸二ナトリウム混合液、クエン酸 - クエン酸三ナトリウム混合液、クエン酸 - クエン酸ナトリウム混合液など）、コハク酸緩衝液（例えば、コハク酸 - コハク酸ナトリウム混合液、コハク酸 - 水酸化ナトリウム混合液、コハク酸 - コハク酸二ナトリウム混合液など）、酒石酸緩衝液（例えば、酒石酸 - 酒石酸ナトリウム混合液、酒石酸 - 酒石酸カリウム混合液、酒石酸 - 水酸化ナトリウム混合液など）、フマル酸緩衝液（例えば、

50

フマル酸 - フマル酸ナトリウム混合液、フマル酸 - フマル酸二ナトリウム混合液、フマル酸ナトリウム - フマル酸二ナトリウム混合液など)、グルコン酸緩衝液(例えば、グルコン酸 - グリコン酸ナトリウム混合液、グルコン酸 - 水酸化ナトリウム混合液、グルコン酸 - グリコン酸カリウム混合液など)、シュウ酸緩衝液(例えば、シュウ酸 - シュウ酸ナトリウム混合液、シュウ酸 - 水酸化ナトリウム混合液、シュウ酸 - シュウ酸カリウム混合液など)、乳酸緩衝液(例えば、乳酸 - 乳酸ナトリウム混合液、乳酸 - 水酸化ナトリウム混合液、乳酸 - 乳酸カリウム混合液など)および酢酸緩衝液(例えば、酢酸 - 酢酸ナトリウム混合液、酢酸 - 水酸化ナトリウム混合液など)が含まれる。さらに、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液およびトリメチルアミン塩、例えばトリスを使用することができる。

【0156】

微生物の増殖を遅らせるために保存剤を加えてもよく、0.2% - 1% (w/v) の範囲内の量で加えることができる。本開示の使用に適する保存剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンズアルコニウムハライド(例えば、塩化物、臭化物およびヨウ化物)、塩化ヘキサメトニウム、ならびにアルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノールおよび3 - ペンタノールが含まれる。本開示の液体組成物の等張性を確保するために、時には「安定剤」として知られる等張剤を加えることができ、多価の糖アルコール、例えば三価またはより高級である糖アルコール、例えばグリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトールが含まれる。安定剤は、増量剤から治療薬剤を可溶化するまたは変性もしくは容器壁への接着を阻止するのを助ける添加剤まで機能が様々であってよい広いカテゴリーの賦形剤を指す。一般的な安定剤は、多価の糖アルコール(上で列挙される); アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L - ロイシン、2 - フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニンなど、有機糖または糖アルコール、例えば乳糖、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクトクトール、グリセロールなど、例えばイノシトールなどのシクリトール; ポリエチレングリコール; アミノ酸ポリマー; 含硫黄還元剤、例えば尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α - モノチオグリセロールおよびチオ硫酸ナトリウム; 低分子量ポリペプチド(例えば、10残基以下のペプチド); ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質; 親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン、単糖、例えばキシロース、マンノース、フルクトース、グルコース; 乳糖、マルトース、スクロースなどの二糖およびラフィノースなどの三糖; ならびにデキストランなどの多糖であってよい。安定剤は、1重量部の活性タンパク質につき0.1から10,000重量部までの範囲で存在してもよい。

【0157】

治療薬剤の可溶化を助けるために、ならびに攪拌によって誘導される凝集から治療的タンパク質を保護するために、非イオン性界面活性剤または洗浄剤(「湿潤剤」としても知られる)を加えてもよく、そのことはタンパク質の変性を引き起こすことなくストレス下の剪断表面に製剤を曝露させることも可能にする。適する非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート(20、80など)、ポロキサマー(184、188など)、プルロニックポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(TWEEN(登録商標) - 20、TWEEN(登録商標) - 80など)が含まれる。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/mLから約1.0mg/mL、例えば約0.07mg/mLから約0.2mg/mLの範囲で存在してもよい。

【0158】

追加の雑多の賦形剤には、増量剤(例えば、デンプン)、キレート化剤(例えば、EDTA)、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE)および助溶剤が含まれる。開示のポリペプチドのために適するさらなる製剤は米国特許出願第2004/

10

20

30

40

50

0033228A1号に開示されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

【実施例】

【0159】

7. 実施例

【実施例1】 CH2のポイントごとの(P×P)ライブラリーの構築

Hu1D10、HLA-DRのベータ鎖に特異的なモノクローナル抗体(Shira、2002、Leuk Lymphoma、43(6):1303-12頁)を、モデル系として使用した。Hu1D10の合成VLおよびVHドメインは、民間の遺伝子合成供給業者(DNA 2.0 Inc.、Menlo Park、CA)によって構築され、ベクターpYA206にクローニングしてpYA206-Hu1D10プラスミドを作製した。ベクターpYA206は、哺乳動物細胞の表面での抗体の発現およびディスプレイのために設計された、EBウイルス由来のエピソームベクターである。

10

【0160】

定常領域重鎖ドメイン2(CH2)の84アミノ酸位置を、NNKランダム化アプローチを使用する突然変異誘発の標的にした。以下の理由により、NNKコード体系を使用した(ここでは、N=A、C、GまたはTおよびK=GまたはT)。1)全20個の天然に存在するアミノ酸をコードするために32個のコドンだけが必要とされる、2)単一の終止コドン(TAG)だけが32個の中に含まれる、3)完全な64コドン遺伝子コードに存在する最大6倍の縮重ではなしに、最大縮重(単一のアミノ酸をコードする異なるコドンの数)が3である。

20

【0161】

各々異なるCH2位置にNNK縮重を有する、ヒトFcアイソタイプ(Fc)をコードする84個の異なるDNA断片が、合成遺伝子の民間供給業者(DNA 2.0、Menlo Park、CA)によって合成された。合成Fc遺伝子をSalIおよびNotI制限酵素で消化し、プラスミドpYA206-hu1D10にサブクローニングした。そのサブライブラリー中の可能なコドンの総数より少なくとも10倍多くのE.コリー形質転換体が得られるように、ライゲーションをE.コリーTop10細胞(Invitrogen、CA)に形質転換させた。生じたCH2ライブラリーは、84個の異なる位置で合計1680個の異なるコドンで構成された。

30

【0162】

【実施例2】 Fc RIIIB結合性判定

未変更の対照FcへのFc RIIIBの結合を評価するために、蛍光活性化セルソーター(FACS)滴定を実施した。Fc RIIIBとFcの間の低親和性相互作用のため、フローサイトメトリーのために8:4:1の複合体を使用した(図3):5マイクログラムのFc RIIIB(R&D Systems、1875-CD)を、12.5μgのビオチン化抗ポリヒスチジン(R&D Systems、BAM050)とプレインキュベートし、次に3.5μgのストレプトアビジン-APC(Southern Biotech、カタログ番号7100-11L)に加えた。この複合体を次に4倍に連続希釈し、ヤギ抗ヒトカッパ-PE(Southern Biotech、2060-09)と合わせた。Fc R-複合体結合のEC₅₀を判定するために、100μlの複合体を各濃度で2×10⁵個の細胞に加え、1時間インキュベートした。FACS緩衝液で3回の洗浄の後、細胞をFACSCalibur(BD Biosciences)でフローサイトメトリーにより分析した。二重正の象限での細胞のパーセントを判定し、Fc RIIIB濃度に対してプロットした。EC₅₀は、3.6μg/mLと判定された(図4A)。

40

【0163】

【実施例3】 Fc RIIIA結合性判定

FcへのFc RIIIAの結合を評価するために、FACS滴定を実施した。Fc RIIIAとFcの間の低親和性相互作用のため、フローサイトメトリーのために2

50

: 1 : 1 の複合体を使用した (図 3) 。 $9 \mu\text{g}$ の Fc RI I I A (R \& D Systems 、カタログ番号 4325 - FC) を、 $15 \mu\text{g}$ のビオチン化抗ポリヒスチジン (R \& D Systems 、BAM050) とブレインキュベートし、次に $15 \mu\text{g}$ のストレプトアビジン - APC (Southern Biotech 、カタログ番号 7100 - 11 L) に加えた。この複合体を次に 4 倍に連続希釈し、ヤギ抗ヒトカップ - PE (Southern Biotech 、2060 - 09) と合わせた。Fc R - 複合体結合の EC_{50} を判定するために、 $100 \mu\text{l}$ の複合体を各濃度で 2×10^5 個の細胞に加え、1 時間インキュベートした。FACS 緩衝液で 3 回の洗浄の後、細胞を FACS Calibur (BD Biosciences) でフローサイトメトリーにより分析した。二重正の象限での細胞のパーセントを判定し、Fc RI I I A 濃度に対してプロットした。 EC_{50} は、 $0.17 \mu\text{g} / \text{mL}$ と判定された (図 2 B) 。

10

【 0 1 6 4 】

【 実施例 4 】 CH2 ライブラリーの蛍光活性化細胞分取 (FACS)

CH2 ライブラリーは、 $0.5 \mu\text{g}$ のライブラリープラスミド、 $100 \mu\text{g}$ の pACYC184 担体プラスミドおよび $250 \mu\text{l}$ リポフェクタミンで $293\text{c}18$ 細胞にトランスフェクトさせ、2 日後に $0.8 \mu\text{g} / \text{mL}$ ピューロマイシンを使用して選択し、さらなる 18 日間培養してから FACS 選別を実施した。

【 0 1 6 5 】

細胞は、1 : 200 の PE 標識抗ヒトカップ - PE 抗体 (Southern Biotech) と、滴定によって判定される 50 % 最大結合以下の Fc RI I I A - または Fc RI I B - 複合体 (図 3) とで同時染色した。Fc R への差別的結合に基づいて、最小限 1×10^5 個の細胞を 3 つの集団、高 (H) 、中間 (M) および低 (L) から選別した。代表的な FACS 選別結果を、図 5 に示す。所望の特性を有する変異体は、Fc RI I B 結合の H - ゲートで濃縮され、Fc RI I I A 結合の L - ゲートで濃縮された。

20

【 0 1 6 6 】

【 実施例 5 】 「発現され」、「選別された」集団の大規模並行配列決定

実施例 4 に記載されている選別された H、M および L 細胞集団からプラスミドを回収し、大規模並行配列決定に適する短いアンプリコンを調製するために PCR 増幅を実施した。製造業者 ($454 \text{ Life Sciences, Branford, CT}$) の指示通りにゲノムシーケンサー FLX を用いて、次にアンプリコンを配列決定した。FACS 選別された細胞の各集団について、およそ 800 , 000 個の個々の配列を判定した。

30

【 0 1 6 7 】

配列を検査し、「発現され」、「選別された」集団で各点突然変異が見出された回数を表にした。各アミノ酸コドン最初に同定して、表にした。複数のコドンを有するアミノ酸については、各アミノ酸の異なるコドンの発生を一緒に加えて、各亜集団でのそのアミノ酸変異体の行動の全体的概要を作製した。Fc RI I I A または Fc y RI I B への結合を評価するための CH2 ライブラリーの 3 方向選別のために、濃縮比 (ER) スコアを各コドン変異体に割り当てた。ER は、その全体頻度と比較してどの程度高いまたは低い頻度で変異体が H 集団で見出されるかを表す。同様に、M および L 集団の各々での各変異体について濃縮比を計算することができる。より高い親和性の変異体は、H 集団で濃縮され ($\text{ER} > 1$) 、L 集団で減損する ($\text{ER} < 1$) ことが予想される。反対に、より低い親和性の突然変異体は、H 集団で減損し ($\text{ER} < 1$) 、L 集団で濃縮される ($\text{ER} > 1$) ことが予想される。H 集団の濃縮比を単に観察することによって、より高い、より低いおよび中間の親和性の変異体を同定することが可能である。

40

【 0 1 6 8 】

【 実施例 6 】 所望の特性を有する点突然変異体の同定

CH2 での 84 個の位置の包括的突然変異誘発は、有意に増加した Fc RI I B 結合および減少した Fc RI I I A 結合 (WT より低い) を有する変異体を同定した、図 6 の右下の四半部。この例では、野生型平均より上の 2 つの標準偏差は有意に増加したと

50

られ、野生型平均より低いものは減少したととられた。

【0169】

有意に増加したFcRIIB結合および減少したFcRIIAへの結合を有すると同定された位置および置換を、図7に示す。変異体ヒトIgGは、可溶性IgG1としてまたは293c18細胞の表面で発現されて、Hu1D10結合ドメインで発現された。

【0170】

【実施例7】 単一ポイント(ワンポイント)FACSを用いた向上した結合の確認

FcRIIBへの向上した結合を確認するために、293c18細胞の上で発現された親IgGと変異体を比較した、ワンポイントFACS分析を実施した。IgG変異体を発現する293c18および対照を、EC50濃度のFcRIIB複合体で染色した。N297A改変を含有するFc変異体を発現する293c18は、陰性対照として使用した。S267E、L328Fおよび二重突然変異体「SELF」は、陽性対照として含まれた。試料はFACSCalibur装置でフローサイトメトリーによって分析し、各変異体の結果はFcR結合はy軸に、IgG発現はx軸に、野生型に対してプロットした(図8)。

10

【0171】

FcRIIAへの減少した結合を確認するために、293c18細胞の上で発現された親IgGと変異体を比較した、ワンポイントFACS分析を実施した。IgG変異体を発現する293c18および対照を、EC50濃度のFcRIIA複合体で染色した。N297A、S267E、L328Fおよび二重突然変異体「SELF」を発現する293c18は、対照として使用した。試料はFACSCalibur装置を使用してフローサイトメトリーによって分析し、各変異体の結果はFcR結合はy軸に、IgG発現はx軸に、WTに対してプロットした(図9)。最も有意な下方シフトを有する変異体は、V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273Yであることが見出された。

20

【0172】

【実施例8】 FcR発現細胞への変異体の結合

Hu1D10 IgG変異体抗体は可溶性で発現され、精製されて、FcRIIBを発現するCHO細胞への結合を評価するために次に使用された。IgG変異体は、20μg/mLまたは133nMから開始して3倍に連続希釈され、次に1試験につき細胞数 2×10^5 に加えられた。変異体IgG結合を検出するために、抗ヒトカッパ抗体を使用した。試料はFACSCaliburで分析し、蛍光をIgG濃度に対してプロットした。図10は、全ての変異体がFcRIIBに対して野生型抗体より高い最大結合を有することを確認する。

30

【0173】

Hu1D10 IgG変異体を精製し、FcRIIA CHOトランスフェクタントへの結合を評価するために使用した。IgG変異体は、20μg/mLまたは133nMから開始して3倍に連続希釈され、次に1試験につき細胞数 2×10^5 に加えられた。変異体IgG結合を検出するのに、抗ヒトカッパ抗体の二次染色を使用した。試料はFACSCaliburで分析し、図11で蛍光をIgG濃度に対してプロットした。全ての変異体は、野生型Fc含有抗体と同等以下でFcRIIAに結合した。

40

【0174】

【実施例9】 FACSに基づく抗体依存細胞媒介細胞傷害性

非放射性抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイを最適化し、Hu1D10 IgG変異体を試験するために使用した。Raji細胞および新たに引き抜かれた全血から精製されたPBMCをそれぞれ標的およびエフェクター細胞として1:40の比で使用した。

【0175】

Raji細胞を洗浄し、PBS中に細胞数 10^6 /mLで再懸濁させ、次に30分の間CSFE(Cell Technology, Inc.、パート4002)の1:200

50

0 希釈溶液とインキュベートした。CFSEで負荷したRaji細胞を次に洗浄し、RPMI + 10%熱不活性化FBSからなる増殖培地に $4 \times 10^5 / \text{mL}$ に再懸濁させた。V底プレートの各ウェルに、 $50 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を加えた。 $18 \mu\text{g} / \text{mL}$ から開始して3倍連続希釈のIgG変異体の $50 \mu\text{L}$ を各ウェルに加えた。

【0176】

665RCFで30分の間Ficoll-Paque (GE、17-1440-02)で遠心分離された、新たに引き抜かれたヘパリン添加血からPBMCを精製した。PBMC層を収集し、PBS + 10%FBSで3回洗浄し、1回目の洗浄は1350RCFで15分間、2回目の洗浄は225RCFで10分間、3回目の洗浄は225RCFで10分間であった。最終洗浄の後、細胞を増殖培地に再懸濁させ、Vi-Cell Rxを使用して数えた。細胞を遠心分離し、増殖培地において細胞数 $8 \times 10^6 / \text{mL}$ に再懸濁させた。 $100 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を標的/IgG懸濁液の各ウェルに加え、 37°C で4時間インキュベートした。細胞懸濁液を7AAD (BD Biosciences、カタログ番号559925)の1:5希釈溶液で染色し、30分間インキュベートした。標的細胞の自然死を判定するために、CFSEを負荷したRaji細胞を培地だけ($0 \text{ mg} / \text{mL}$ IgG、PBMCなし)とインキュベートし、次に7AADで染色した。試料は、FACSCaliburで分析した。

【0177】

各試料についてCFSE (FL1)をx軸に、7AAD (FL3)をy軸に、FACSデータをグラフに示した。四半部を引き抜き、標的細胞 (CFSE+)をPBMC (CFSE-)と区別し、ならびに7AAD陽性細胞を7AAD陰性細胞と区別した (図12)。右上四半部の細胞数は「死」と規定し、右下四半部のそれは「生」と規定した。細胞傷害性パーセントを計算し、自然死を引き算した。 EC_{50} を判定するために、IgG濃度に対して細胞傷害性パーセントをグラフに示した (図13A)。

【0178】

Hu1D10変異体を、ADCC活性に基づいて分類した。図13Bは、野生型より低いが多少のADCC活性を有するFcRIIB上方突然変異体を示す。図13Cは、ADCC活性のほとんどない変異体を示す。図13Dは、非ADCC hu1D10変異体と、文献によりFcRIIAへの結合の減少をもたらす置換 (S267E、L328F、二重突然変異体「SELF」)とを比較する。図14Dは、V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273YがL328Fと同等の応答ならびにS267EおよびSELFより低いADCC応答を導き出したことを示す。

【0179】

[実施例10] 抗CD40 mAbのFc結合変異体の抗体依存細胞媒介細胞傷害性Fc 改変を有する抗CD40モノクローナル抗体を使用して、抗体依存細胞媒介細胞傷害性 (ADCC) アッセイを標準プロトコルに従って設計した (Lawら、2005、Cancer Res. 65: 8331-8頁)。標的細胞として、リンパ腫RL細胞を 51 クロムで1時間標識した。エフェクター細胞としてPBMCを使用し、50:1の比で標的と混合した。抗CD40を連続希釈し、標的/エフェクター細胞混合物に加えた。 37°C 、5% CO_2 で4時間のインキュベーションの後に、 $100 \mu\text{L}$ の培養上清を収集し、放出された放射能をガンマ計数器によって監視した。抗体のない培養物は培地処理陰性対照として記録し、最大 51 クロム放出は標識標的細胞のTriton X100処理によって達成された。細胞傷害性の最終パーセントは、以下の式を用いて計算した： $((\text{試料} - (\text{標的} + \text{培地})) / ((\text{標的} + \text{Triton}) - (\text{標的} + \text{培地}))) * 100$ 。Fc 変異体V263L、V273E、V273F、V273M、V273SおよびV273Yは、ADCC活性を誘導しなかった。(図14)。

【0180】

[実施例11] Fc 置換を有する抗CD40 mAbの機能的活性FcRIIBへの差別的結合が樹状細胞の免疫活性化に影響を及ぼすかどうかについて試験するために、抗CD40モノクローナル抗体をFc の置換で構築し、IL-12

10

20

30

40

50

p 7 0 分泌アッセイで試験した。

【 0 1 8 1 】

等量の P B S で希釈した健康ヒトドナーからの全血を、フリット未満 (1 5 m L) の F i c o l l - P a q u e P l u s を含有する L e u c o s e p (G r e i n e r B i o O n e) 管に加えた。次にブレーキなしで 1 5 分間、血液を 1 , 0 0 0 g で遠心分離した。P B M C を収集し、P B S で一度洗浄し、室温で 5 分間、1 , 3 0 0 r p m で遠心分離し、R P M I 1 6 4 0 で一度洗浄した。細胞は、S N 1 2 C 培地 (R P M I 1 6 4 0 + 1 0 % 熱不活性化 F B S) に再懸濁させた。

【 0 1 8 2 】

単球由来の未熟な樹状細胞 (m o D C) の生成 : S t e m C e l l からの濃縮キットで単球を P B M C から単離し、3 7 、5 % C O 2 で 6 日間、1 0 n g / m l の G M - C S F および 2 0 n g / m l の I L - 4 を付加した S t e m S e p 無血清培地で培養した。D C 分化の維持を助けるために、3 日目に培養物に新鮮な G M - C S F および I L - 4 を加えた。6 日間の培養の後、未熟 D C の表現型 : L i n - 、C D 8 0 / C D 8 6 + 、H L A - D R + 、C D 1 1 C + を検証するために、単球由来の未熟 D C を F A C S 分析にかけた。

10

【 0 1 8 3 】

m o D C からの I L - 1 2 p 7 0 を刺激することにおける抗 C D 4 0 のアゴニスト活性の監視 : 未熟な m o D C を抗 C D 4 0 で刺激し、G M - C S F および I L - 4 を付加した S t e m S e p 無血清培地において 4 8 時間、I F N で初回刺激した。培養上清を採取し、市販の E L I S A キットによって I L - 1 2 p 7 0 生成について分析した。図 1 5 は、A D C C 誘導 (図 1 5 A) および非 A D C C 誘導 (図 1 5 B) 変異体の I L - 1 2 p 7 0 生成を示す。I L - 1 2 p 7 0 分泌によって測定したとき、非 A D C C 変異体のうち、V 2 7 3 F および V 2 7 3 Y は最も増強された樹状細胞活性化を示した (図 1 5 C) 。

20

【 0 1 8 4 】

本出願で引用される全ての刊行物、特許、特許出願および他の文書は、各個々の刊行物、特許、特許出願または他の文書が全ての目的のために参照により組み込まれていることが個々に示されているかのように、全ての目的のためにここに参照によりその全体が組み込まれる。

【 0 1 8 5 】

様々な具体的な実施形態が例示され、記載されたが、本発明 (複数可) の精神および範囲から逸脱することなく様々な変更を加えることができることが理解される。

30

【図 1】

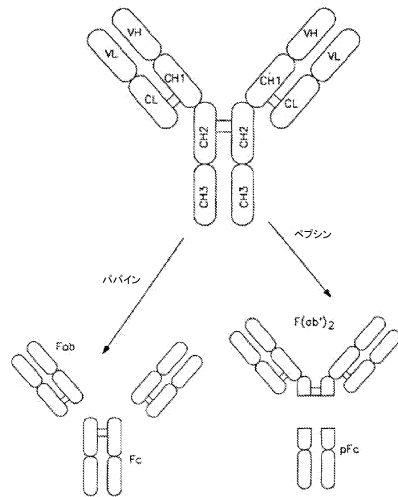


FIGURE 1

【図 2 A】

*

DKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

† ‡ #

VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

QDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GK

FIGURE 2A

【図 2 B】

CH1

118 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
138 GTAALGCLVKDYFPEPTVVS
158 WNSGALTSGVHTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
198 YICNVNHKPSNTKVDKKV

ヒンジ

216 EPKSCDKTHTCPPCP

CH2

231 APELLGGPSVFLFPPKPKDT
251 LMISRTPEVTCVVVDVSHED
271 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
291 PREEQYNSTYRVVSVLTVLH
311 QDWLNKEYKCKVSNKALPA
331 PIEKTISKAK

CH3

341 GQPREPQVYTLPPSREEMTK
361 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
381 WESNGQPENNYKTTPPVLD
401 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
421 NVFSCSVMEALHNHYTQKS
441 LSLSPGK

FIGURE 2B

【図 3】

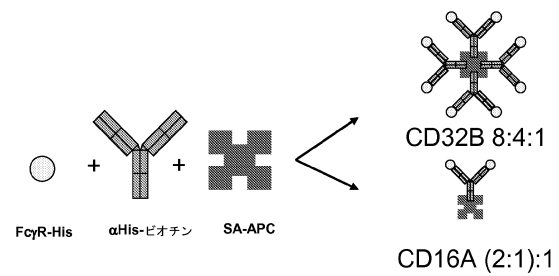


FIGURE 3

【図 4】

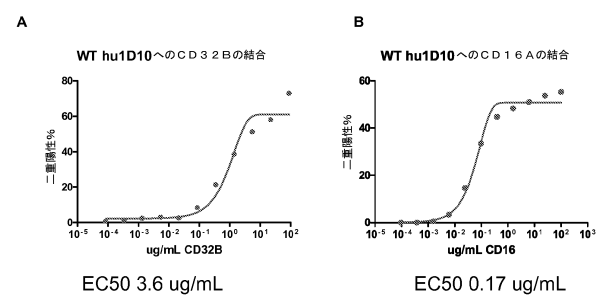


FIGURE 4

【図 5】

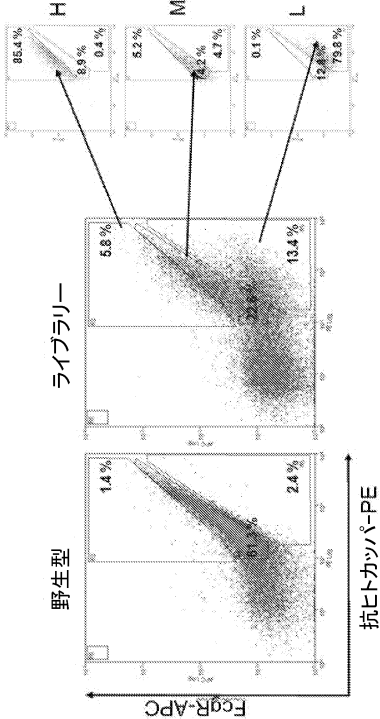


FIGURE 5

【図 6】

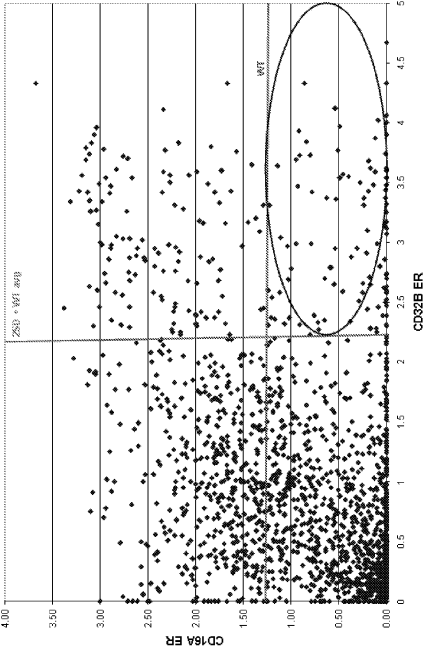


FIGURE 6

【図 7】

	WT-AA	EU	AA	CD32b ER	CD16 ER
	V	263	L	2.25	0.10
	V	266	L	3.93	0.92
	V	273	C	2.70	0.65
	V	273	E	3.54	0.49
	V	273	F	4.00	0.00
	V	273	L	3.57	0.28
	V	273	M	3.74	0.01
	V	273	S	3.42	0.75
	V	273	Y	3.97	0.49
	V	305	K	2.14	1.25
	V	305	W	2.03	1.32
		WT			
対照	N	297	A		
対照	S	267	E		
対照	L	328	F		
対照		SELF			

FIGURE 7

【図 8】

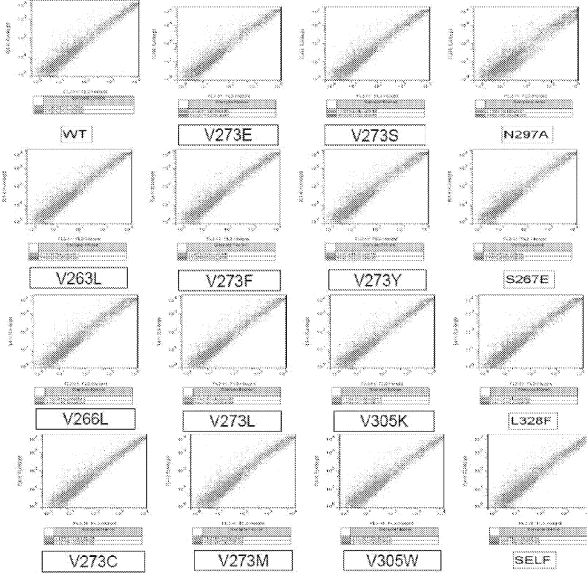


FIGURE 8

【図 9】

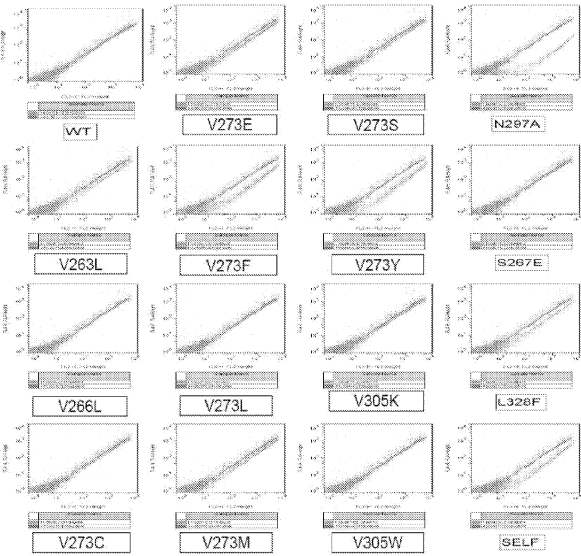


FIGURE 9

【図 10 A】

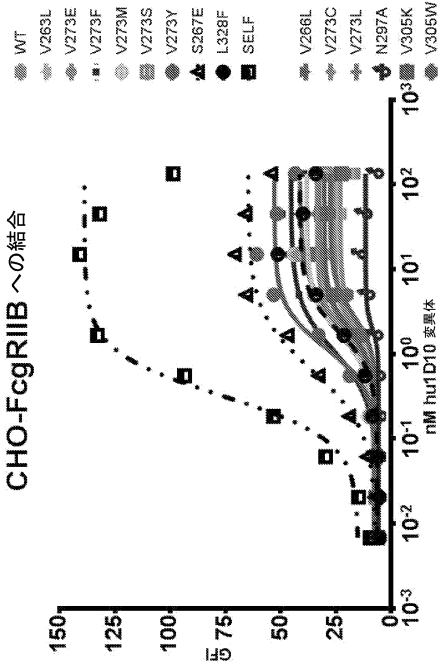


FIGURE 10A

【図 10 B】

変異体	EC50 (nM)	WTに対する倍率
WT	1.83	1.00
V263L	1.80	1.02
V266L	2.22	0.82
V273C	2.03	0.90
V273E	1.66	1.10
V273F	1.08	1.70
V273L	1.66	1.11
V273M	1.63	1.12
V273S	1.72	1.06
V273Y	1.18	1.55
V305K	1.93	0.95
V305W	2.86	0.64
対照 N297A	2.00	0.91
対照 S267E	0.64	2.85
対照 L328F	1.85	0.99
対照 SELF	0.32	5.70

FIGURE 10B

【図 11 A】

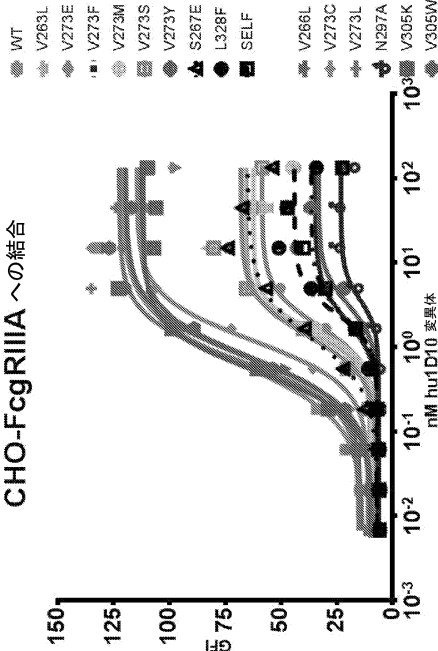


FIGURE 11A

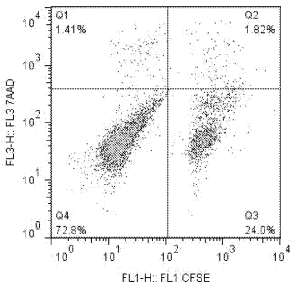
【図 1 1 B】

	変異体	EC50 (nM)	WTに対する倍率
	WT	0.61	1.00
	V263L	1.52	0.40
	V266L	0.76	0.80
	V273C	1.19	0.51
	V273E	1.78	0.34
	V273F	2.01	0.30
	V273L	0.69	0.88
	V273M	1.59	0.38
	V273S	1.33	0.45
	V273Y	3.19	0.19
	V305K	0.51	1.18
	V305W	0.74	0.82
対照	N297A	3.67	0.17
対照	S267E	1.24	0.49
対照	L328F	2.51	0.24
対照	SELF	2.31	0.26

FIGURE 11B

【図 1 2】

A: 0.0 ug/mL WT hu1D10 = 7% 細胞傷害性



B: 1.0 ug/mL WT hu1D10 = 46% 細胞傷害性

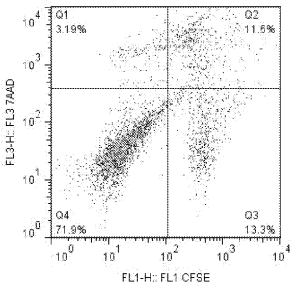
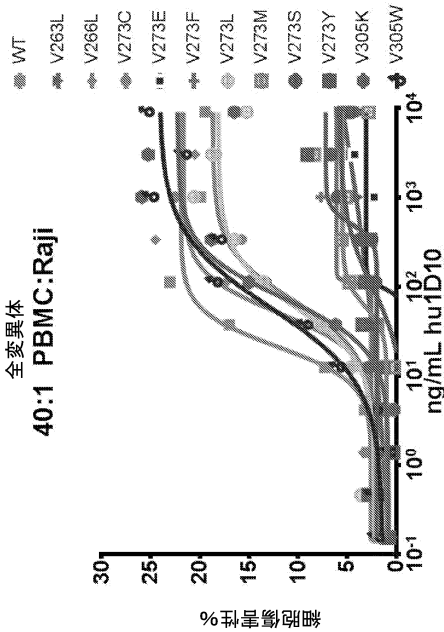


FIGURE 12

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

ADCC
40:1 PBMC:Raji

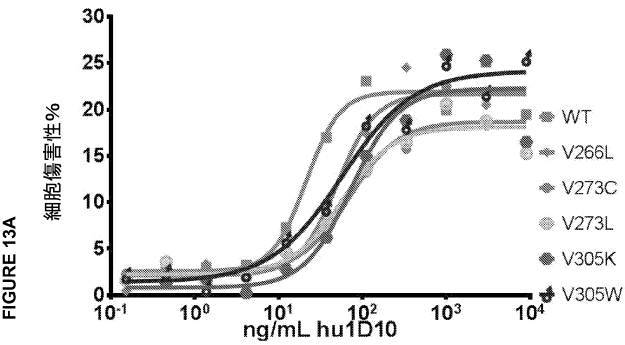


FIGURE 13B

【図 13 C】

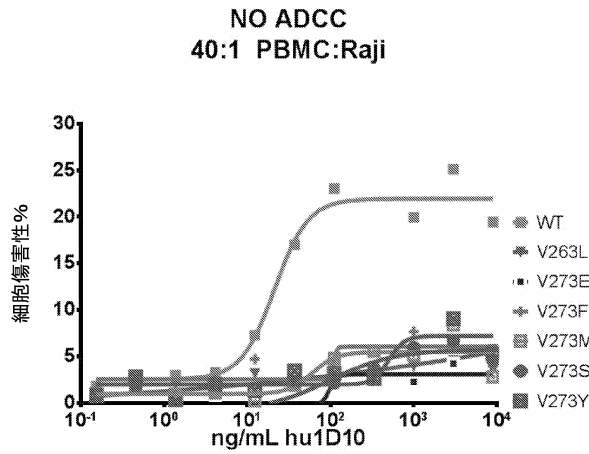


FIGURE 13C

【図 13 D】

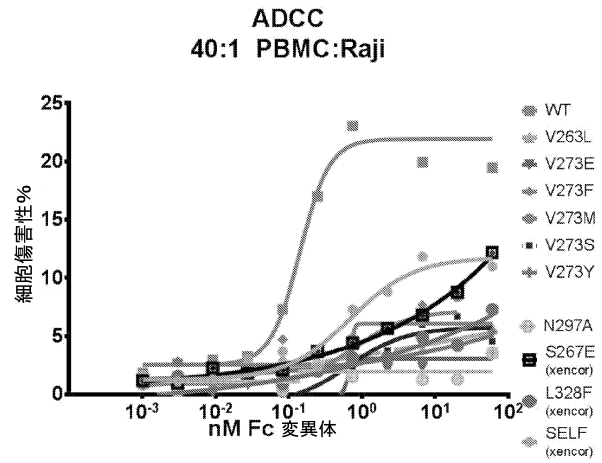


FIGURE 13D

【図 14 A】

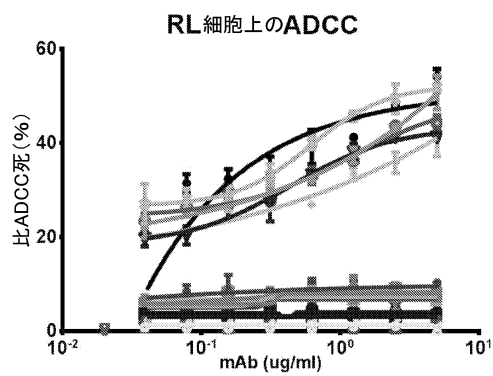


FIGURE 14A

【図 15 A】

ABR4021 G1 Fc 突然変異体 (ADCC)
によって誘導されたIL-12 p70 生成

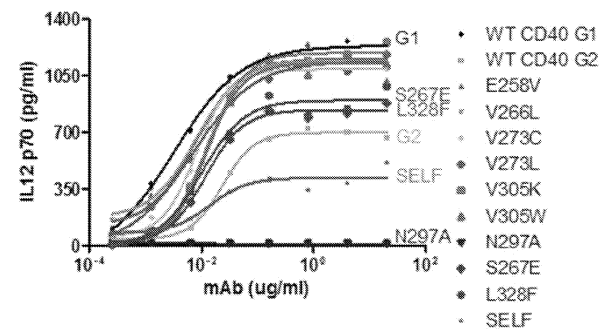


FIGURE 15A

【図 14 B】

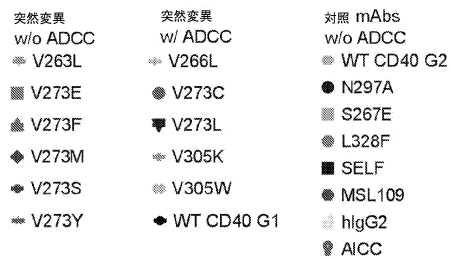


FIGURE 14B

【図 1 5 B】

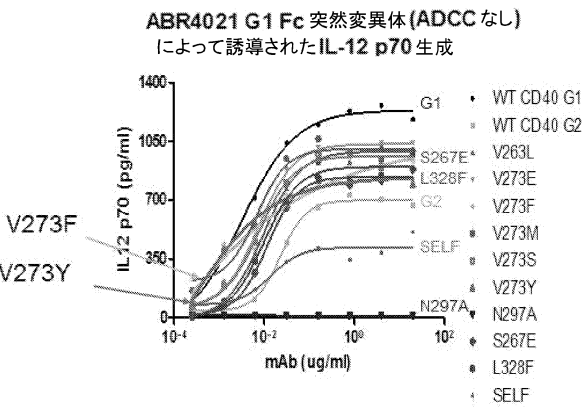


FIGURE 15B

【図 1 5 C】

	EC50, ng/mL
WT CD40 G1	3.25
V263L	9.54
V273E	7.85
V273F	
V273M	6.95
V273S	7.74
V273Y	0.19
N297A	
S267E	11.80
L328F	10.05
SELF	13.97

FIGURE 15C

【図 1 6】

	WT-AA	EU	AA
	V	263	L
	V	266	L
	V	273	C
	V	273	E
	V	273	F
	V	273	L
	V	273	M
	V	273	S
	V	273	Y
	V	305	K
	V	305	W
		WT	
対照	N	297	A
対照	S	267	E
対照	L	328	F
対照		SELF	

FIGURE 16

【配列表】

0006449229000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 16/44 (2006.01)		C 0 7 K 16/44	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13	
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	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	M
A 6 1 K 47/68 (2017.01)		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/06	
		A 6 1 P 29/00	1 0 1
		A 6 1 P 19/02	
		A 6 1 P 1/04	

- (72)発明者 ヒントン, ポール・アール
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 0 8 5、サニーベイル、ダンスミュー・テラス・3 2 1、
ユニット・4
- (72)発明者 シオン, ムオンリ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 5 8 7、ユニオン・シティ、ケーブ・ビュー・ドライブ・
3 1 3 8 9
- (72)発明者 ラゾー, オリビア・ジェニファー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 5 6 0、ニューアーク、マリボー・ドライブ・6 3 6 4
- (72)発明者 イエ, シーミン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 3 0 6、パロ・アルト、ローマ・ベルデ・アベニュー・3
7 1

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 3 / 1 0 9 2 7 9 (WO, A 1)
特表2 0 0 6 - 5 1 2 4 0 7 (JP, A)
J. Biol. Chem., (2001), 276, [9], p.6591-6604

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

UniProt / GeneSeq
PubMed