(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7050001号
(P7050001)

(45)発行日　令和4年4月7日(2022.4.7)

(24)登録日　令和4年3月30日(2022.3.30)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/13	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/15	
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/19	
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	1/21	

ＦＩ

請求項の数　17　（全39頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-555892(P2018-555892)
(86)(22)出願日　平成29年4月25日(2017.4.25)
(65)公表番号　特表2019-523632(P2019-523632A)
(43)公表日　令和1年8月29日(2019.8.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/029375
(87)国際公開番号　WO2017/189556
(87)国際公開日　平成29年11月2日(2017.11.2)
審査請求日　令和2年4月27日(2020.4.27)
(31)優先権主張番号　62/326,907
(32)優先日　平成28年4月25日(2016.4.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　517396386
シンティミューン，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，ニューヨーク　１００１０，ニューヨーク，パーク アベニュ サウス ２５７，フィフティーンス フロア
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100150810

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヒト化親和性成熟抗ＦＣＲＮ抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

重鎖可変部及び軽鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントであって、前記重鎖可変部の配列が配列番号２６、配列番号２８、または配列番号３２であり、及び前記軽鎖可変部の配列が配列番号２２である、前記抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項２】

重鎖可変部及び軽鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントであって、前記重鎖可変部の配列が配列番号２８であり、前記軽鎖可変部の配列が配列番号２２である、前記抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項３】

前記抗体が、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項１または２に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項４】

前記抗体が、アイソタイプＩｇＧ４を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項５】

前記抗体が前記重鎖においてＳ２４１Ｐ修飾を含み、及び／または前記抗体が前記重鎖においてＣ末端リジンを欠乏する、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項６】

ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）2、または二特異性抗体である、請求項

１～５のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか一項に記載のＦｃＲｎ抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸。
【請求項８】
請求項７に記載の単離された核酸を含む核酸ベクター。
【請求項９】
請求項７に記載の単離された核酸を含む原核宿主細胞または真核宿主細胞。
【請求項１０】
請求項１～６のいずれか一項に記載のＦｃＲｎ抗体または抗原結合フラグメント、及び医薬的に許容される担体を含む組成物。
【請求項１１】
ＦｃＲｎを抗体または抗原結合フラグメントと接触させるによる、ＦｃＲｎとアルブミンとの相互作用の阻害に使用するための、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１２】
対象に抗体または抗原結合フラグメントを投与することによる、対象におけるアルブミンのレベルの低下、あるいは対象に抗体または抗原結合フラグメントを投与することによる、対象におけるアルブミン結合毒素のレベルの低下に使用するための、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１３】
前記アルブミン結合毒素が、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、キニジン、リシン、アミオダロン、またはアセトアミノフェンである、請求項１２に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１４】
前記アルブミン結合毒素が、アセトアミノフェンである、請求項１３に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１５】
冠動脈アテローム性硬化症及び末梢血管疾患、糖尿病性血管合併症、アルツハイマー病、外傷性脳障害、糖尿病、または末期腎不全である、アルブミン毒性に関連する医学的病態の治療に使用するための、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１６】
（ａ）治療の必要がある対象に抗ＦｃＲｎ抗体またはそのフラグメントを投与することによる、アルブミンベースの治療薬を投与する前の内因性アルブミン分解；または
（ｂ）対象に抗ＦｃＲｎ抗体またはそのフラグメントを投与することによる、対象に投与された外因性アルブミンベースの治療薬の分解
の促進に使用するための、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１７】
前記抗ＦｃＲｎ抗体またはそのフラグメントが配列番号２６、配列番号２８、または配列番号３２の重鎖可変部のアミノ酸配列及び配列番号２２の軽鎖可変部配列を含む、請求項１６に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本出願は、２０１６年４月２５日に出願された米国特許出願第６２／３２６，９０７号の優先権を主張し、これはその全体が本出願に組み込まれる。

【０００２】

本発明は、ＦｃＲｎに結合する抗体及びそれらの抗体結合部分ならびにＦｃＲｎとアルブミンとの相互作用を調節または阻害するための、これらの使用に関する。抗体は、アルブミンが結合する特定の化合物または分子の中毒作用を最小化するための治療薬として有用である。

【０００３】

配列表

本出願には、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩフォーマットで提出された配列表が含まれており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０１７年４月２５日に作成された配列表は、１６２２５５．４６２７６＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－Ｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔと題され、サイズが５８，７８７バイトである。

【背景技術】

【０００４】

新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）は、ＩｇＧに対する細胞内輸送膜内在性Ｆｃレセプターである。ＦｃＲｎは元来、新生児の生命において機能するレセプターとして同定された。げっ歯類の腸から、１２ｋＤａ～４０～５０ｋＤａのタンパク質のヘテロ二量体として最初に単離され（Ｒｏｄｅｗａｌｄ＆Ｋｒａｅｈｅｎｂｕｈｌ　１９８４，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ　９９（１　Ｐｔ２）１５９ｓ－１５４ｓ；Ｓｉｍｉｓｔｅｒ＆Ｒｅｅｓ，１９８５，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：７３３－７３８）、１９８９年にクローン化された（Ｓｉｍｉｓｔｅｒ＆Ｍｏｓｔｏｖ，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ　３３７：１８４－１８７）。ＦｃＲｎのクローン化及び続く結晶化により、１２ｋＤａのβ２－ミクログロブリン軽鎖と非共有結合した約５０ｋＤａの主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩ様重鎖を有することが明らかとなった（Ｒａｇｈａｖａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３２：８６５４－８６６０；Ｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３０：１０７７－１０８３）。胎児及び新生児の生命に関連して最初に同定されたが、現在ＦｃＲｎは、成人期を通じて機能し続けることが知られている。ＦｃＲｎは、ｐＨ６．５でマイクロモル～ナノモル親和性で、ｐＨ依存的にＩｇＧのＦｃ領域に結合する初期の酸性エンドソームに主に存在し、生理的ｐＨでのＦｃＲｎのＦｃへの結合は無視できる。大部分の細胞において、ＦｃＲｎの大半はエンドソームに存在し、ＦｃＲｎとそのＩｇＧ　Ｆｃ配位子との相互作用は、その酸性環境内で生じる。造血細胞などの一部の細胞において、細胞内発現に加えて細胞表面でＦｃＲｎの有意なレベルが検出することができる（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６６：３２６６－３２７６）。この場合、細胞外環境が酸性であるとき、腫瘍性または感染性病態の場合のように、これらの細胞型の細胞表面でＦｃＲｎがＩｇＧに結合することが可能である。ＦｃＲｎは、取り込まれたモノマーＩｇＧに結合し、それをリソソームのコンパートメントにおける分解から保護し、中性の細胞外ｐＨで放出させるためにＩｇＧを細胞表面に輸送することによって、血清ＩｇＧ濃度を調節する。ＦｃＲｎにより結合されないＩｇＧはリソソーム経路に入り、分解されるため、この機構を通して、ＦｃＲｎはＩｇＧの長い血清半減期の原因となる。

【０００５】

ＦｃＲｎは、ＦｃＲｎとＦｃＲｎ重鎖の反対側の表面上のＩｇＧまたはアルブミンとの間のイオン相互作用に起因して、ＩｇＧのＦｃドメインに対する結合部位とは異なるアルブミンの結合部位を含む（Ｃｈａｕｄｈｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，２００６，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４５：４９８３－４９９０）。ＩｇＧへの結合と同様、ＦｃＲｎのアルブミンへの結合は、酸性ｐＨ（典型的にはｐＨ６未満、最適にはｐＨ５）で起こるが、中性ｐＨでは起こらず、非常にｐＨ依存性である。アルブミンのＦｃＲｎ結合は、アルブミンを分解から保護し、アルブミンの血清半減期を延長させる。マウスにおけるＦｃＲｎ発現の非存在下で、アルブミンは血液循環から胆汁に失われる（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００６，

Ａｍ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔ Ｌｉｖｅｒ Ｐｈｓｉｏｌ ２９０（２）：Ｇ３５２－６０）。更に、アルブミンは、複数の病気の状態、例えば急性及び慢性毒性曝露（Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ ２０１２）、冠動脈アテローム性硬化症及び末梢血管疾患（Ｓｏｎｇ，Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ２０１２）、糖尿病性血管合併症（Ｋｉｍ，Ｄｉａｂ Ｍｅｔａｂ Ｊ ２０１２；Ｍｕｒｅａ， Ａｍ Ｊ Ｎｅｐｈｒｏｌ ２０１２）、及びアルツハイマー病（Ｂｙｕｎ，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ２０１２）の病原であるというエビデンスが増えてきている。

【発明の概要】

【０００６】

本発明は、ＦｃＲｎに結合する抗体及びそれらの抗原結合部分を提供する。抗体はアルブミンのＦｃドメインへの結合部分にオーバーラップするＦｃＲｎのエピトープに結合し、ＦｃＲｎのアルブミンへの結合を減少または阻害する。

【０００７】

本明細書では、重鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、重鎖可変部はＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３を含み、
ＣＤＲ１の配列は配列番号２であり、
ＣＤＲ２の配列は配列番号４であり、
ＣＤＲ３の配列は配列番号４８である。

【０００８】

一実施形態においては、ＣＤＲ３の配列は配列番号４６である。別の実施形態においては、ＣＤＲ３の配列は配列番号４４である。

【０００９】

他の実施形態においては、ＣＤＲ３の配列は、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４４、配列番号４６、及び配列番号４８からなる群から選択される。一実施形態においては、ＣＤＲ３の配列は、配列番号２７または配列番号３１である。

【００１０】

また、本明細書では、重鎖可変部及び軽鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、重鎖可変部及び軽鎖可変部はそれぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３を含み、
重鎖のＣＤＲ１の配列は配列番号２であり、
重鎖のＣＤＲ２の配列は配列番号４であり、
重鎖のＣＤＲ３の配列は、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、及び配列番号３９からなる群から選択され、
軽鎖のＣＤＲ１の配列は配列番号６であり、
軽鎖のＣＤＲ２の配列は配列番号８であり、
軽鎖のＣＤＲ３の配列は配列番号１０である。

【００１１】

一部の実施形態においては、重鎖のＣＤＲ３の配列は配列番号２７または配列番号３１である。

【００１２】

一部の実施形態においては、本明細書の抗体及び抗原結合フラグメントはキメラ抗体もしくはヒト化抗体または抗原結合フラグメントである。

【００１３】

また、本明細書では、重鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、重鎖可変部の配列は、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、もしくは配列番号４０であるか、または重鎖可変部の配列は、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、もしくは配列番号４０の重鎖可変部のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である。

【００１４】
一部の実施形態においては、抗体またはその抗原結合フラグメントは軽鎖可変部を更に含み、軽鎖可変部の配列は配列番号２２である。一部の実施形態においては、重鎖可変部の配列は配列番号２８または配列番号３２である。一部の実施形態においては、重鎖可変部の配列は配列番号２８である。他の実施形態においては、重鎖可変部の配列は配列番号３２である。
【００１５】
また、本明細書では軽鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、軽鎖可変部の配列は、配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、もしくは配列番号２４であるか、または軽鎖可変部の配列は、配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、もしくは配列番号２４の軽鎖可変部のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である。一部の実施形態においては、軽鎖可変部の配列は配列番号２２である。一部の実施形態においては、軽鎖可変部の配列は配列番号２２であり、抗体または抗原結合フラグメントは重鎖可変部を更に含み、重鎖可変部は配列番号１２のフレームワーク領域を含む。一部の実施形態においては、軽鎖可変部の配列は配列番号２２であり、抗体または抗原結合フラグメントは重鎖可変部を更に含み、重鎖可変部の配列は配列番号２８である。他の実施形態においては、軽鎖可変部の配列は配列番号２２であり、抗体またはそ抗原結合フラグメントは重鎖可変部を更に含み、重鎖可変部の配列は配列番号３２である。
【００１６】
また、本明細書では重鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、重鎖可変部は、配列番号１２、配列番号１４、もしくは配列番号１６の重鎖可変部のアミノ酸配列のフレームワーク領域、または配列番号１２、配列番号１４、もしくは配列番号１６のフレームワーク領域と少なくとも９５％同一であるフレームワーク領域を含む。一部の実施形態においては、重鎖可変部は、配列番号１２の重鎖可変部のアミノ酸配列のフレームワーク領域、または配列番号１２のフレームワーク領域と少なくとも９５％同一であるフレームワーク領域を含む。
【００１７】
また、本明細書では、軽鎖可変部を含むＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、軽鎖可変部は、配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、もしくは配列番号２４の軽鎖可変部のアミノ酸配列のフレームワーク領域、または配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、もしくは配列番号２４のフレームワーク領域と少なくとも９５％同一であるフレームワーク領域を含む。一部の実施形態においては、軽鎖可変部は、配列番号２２の軽鎖可変部のアミノ酸配列のフレームワーク領域、または配列番号２２のフレームワーク領域と少なくとも９５％同一であるフレームワーク領域を含む。
【００１８】
本明細書に記載の抗体の一部の実施形態においては、抗体はアイソタイプＩｇＧ４を有する。一部の実施形態においては、抗体は重鎖においてＳ２４１Ｐ修飾を含む。一部の実施形態においては、抗体は重鎖においてＣ末端リジンを欠乏する。一部の実施形態においては、抗体は重鎖においてＳ２４１Ｐ修飾を含み、重鎖においてＣ末端リジンを欠乏する。
【００１９】
一部の実施形態においては、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントは、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、または二重特異性抗体である。
【００２０】
また、本明細書では、本明細書に記載のＦｃＲｎに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと競合するまたはそれを交差ブロックする抗体が提供される。
【００２１】
また、本明細書では、本明細書に記載のＦｃＲｎ抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸が提供される。また、本明細書では、本明細書に記載のＦｃＲｎ抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸を含む核酸ベクターが提供される。また、本明細書では、本明細書に記載のＦｃＲｎ抗体または抗原結合フラグメント

をコードする単離された核酸を含む原核または真核宿主細胞が提供される。また、本明細書では、本明細書に記載のＦｃＲｎ抗体または抗原結合フラグメント及び医薬的に許容される担体を含む組成物が提供される。

【００２２】

また、本明細書では、ＦｃＲｎとアルブミンとの相互作用を調節する方法であって、ＦｃＲｎを本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントと接触させることを含む、方法が提供される。

【００２３】

また、本明細書では、対象におけるアルブミンのレベルを低下させる方法であって、対象にアルブミンのレベルを低下させるのに有効な量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態においては、対象は哺乳動物である。一部の実施形態においては、哺乳動物はヒトである。

【００２４】

また、本明細書では、対象におけるアルブミン結合毒素のレベルを低下させる方法であって、対象にアルブミン結合毒素のレベルを低下させるのに有効な量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は外因性または内因性であり得る。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、キニジン、リシン、アミオダロン、またはアセトアミノフェンである。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は、アセトアミノフェンであり得る。一部の実施形態においては、治療的有効量の本明細書に記述される抗体またはその抗原結合部分を、他の作用剤、薬剤、またはホルモンと組み合わせて（例えば、同時に、連続的に、または別々に）投与してもよい。一部の実施形態においては、周知の治療は標準治療であり得る。例えば、アルブミン結合毒素がアセトアミノフェンであり得る実施形態においては、方法は、同時に、別々に、または連続的にＮ－アセチルシステインの投与を更に含み得る。

【００２５】

また、本明細書では、対象において、毒素への曝露を予防、治療、阻害、または減少させる方法であって、対象に有効量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は外因性または内因性であり得る。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、キニジン、リシン、アミオダロン、またはアセトアミノフェンである。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素はアセトアミノフェンであり得る。一部の実施形態においては、治療的有効量の本明細書に記述される抗体またはその抗原結合部分を、他の作用剤、薬剤、またはホルモンと組み合わせて（例えば、同時に、連続的に、または別々に）投与してもよい。一部の実施形態においては、周知の治療法は標準治療であり得る。例えば、アルブミン結合毒素がアセトアミノフェンであり得る実施形態においては、方法は、同時に、別々に、または連続的にＮ－アセチルシステインの投与を更に含み得る。

【００２６】

また、本明細書では、アルブミン毒性に関連する医学的病態を予防するまたは治療する方

法であって、対象に有効量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態においては、医学的病態は、冠動脈アテローム性硬化症及び末梢血管疾患である。一部の実施形態においては、医学的病態は、糖尿病性血管合併症である。一部の実施形態においては、医学的病態は、アルツハイマー病である。一部の実施形態においては、医学的病態は、外傷性脳障害である。一部の実施形態においては、医学的病態は、糖尿病である。一部の実施形態においては、医学的病態は、末期腎不全である。一部の実施形態においては、治療的有効量の本明細書に記述される抗体またはその抗原結合部分を、他の作用剤、薬剤、またはホルモンと組み合わせて（例えば、同時に、連続的に、または別々に）投与してもよい。一部の実施形態においては、他の作用剤、薬剤、またはホルモンはそれぞれ医学的病態用の周知の治療法であり得る。一部の実施形態においては、周知の治療法は標準治療であり得る。

【００２７】

また、本明細書では、アルブミンベースの治療薬を用いる治療の必要がある対象に、ＦｃＲｎのアルブミン結合部位に特異的である抗ＦｃＲｎ抗体またはそのフラグメントを投与することを含む、アルブミンベースの治療薬を投与する前に内因性アルブミン分解を促進する方法が提供される。

【００２８】

また、本明細書では、対象に投与されている外因性アルブミンベースの治療薬の分解を促進する方法が提供され、この方法は、ＦｃＲｎのアルブミン結合部位に特異的である、有効量の抗ＦｃＲｎ抗体またはそのフラグメントを対象に投与することを含む。

【００２９】

一部の実施形態においては、方法は対象にアルブミンベースの治療薬を投与するステップを更に含む。一部の実施形態においては、アルブミンベースの治療薬の薬物動態または薬力学が増強される。

【００３０】

本特許または特許出願ファイルには、少なくとも１つのカラーの図面が含まれる。カラー図面（複数可）付きで公開された本特許または特許出願の写しは、要請及び必要な手数料の納付があれば、米国特許商標庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】ヒト化重鎖変異体（V_H1、V_H1及びV_H4）のアミノ酸配列を示す図である。変異体はヒト重鎖可変ドメイン配列に基づき、潜在的な免疫原性を最小限にするために特定の位置に取り込まれたアミノ酸の変化を示すように整列される。ヒト化フレームワーク間で変動するアミノ酸残基には、下線を引く。Ｋａｂａｔ　ＣＤＲは枠で囲む。

【図２】ヒト化軽鎖変異体（Ｖκ１～Ｖκ４）のアミノ酸配列を示す図である。変異体は、ヒト軽鎖可変ドメイン配列に基づき、潜在的な免疫原性を最小限にするために特定の位置に取り込まれたアミノ酸の変化を示すように整列される。ヒト化フレームワーク間で変動するアミノ酸残基には、下線を引く。Ｋａｂａｔ　ＣＤＲは枠で囲む。

【図３】ｐＨ６．０及びｐＨ７．４でのＥＬＩＳＡの比較を示す図である。親ｓｃＦｖを中央に示す。更なる分析のための対象のｓｃＦｖを枠で強調する。

【図４】（ａ）ｐＨ７．４または（ｂ）ｐＨ６．０のいずれかでの、ヒト化親和性成熟抗ＦｃＲｎ抗体の抗ＦｃＲｎ競合ＥＬＩＳＡ試験を示す図である。ＩｇＧはＨＥＫ細胞で一時的に発現した。ｐＨ７．４またはｐＨ６．０のいずれかで、組換えヒトＦｃＲｎへの結合に関し、抗ＦｃＲｎヒト化親和性成熟変異体の希釈系列を、固定された濃度のビオチン化されたマウスの親に対して試験した。結合したビオチン化されたマウスの親はストレプトアビジン－ＨＲＰ及びＴＭＢ基質を用いて検出した。

【図５】ｐＨ６．０での、ヒト化親和性成熟抗ＦｃＲｎ抗体の抗ＦｃＲｎ競合ＥＬＩＳＡ試験を示す図である。ＩｇＧは安定してＮＳ０細胞において発現した。ｐＨ６．０で、組換えヒトＦｃＲｎへの結合に関し、抗ＦｃＲｎヒト化親和性成熟変異体の希釈系列を、固定された濃度のビオチン化されたマウスの親に対して試験した。結合したビオチン化され

たマウスの親をストレプトアビジン－ＨＲＰ及びＴＭＢ基質を用いて検出した。
【図６】ｐＨ７．４での、ヒト化親和性成熟抗ＦｃＲｎ抗体の抗ＦｃＲｎ競合ＥＬＩＳＡ試験を示す図である。ＩｇＧは安定してＮＳ０細胞において発現した。ｐＨ７．４で、組換えヒトＦｃＲｎへの結合に関し、抗ＦｃＲｎヒト化親和性成熟変異体の希釈系列を、固定された濃度のビオチン化されたマウスの親に対して試験した。結合したビオチン化されたマウスの親をストレプトアビジン－ＨＲＰ及びＴＭＢ基質を用いて検出した。
【図７－１】ｐＨ７．４及びｐＨ６．０での、ｍＡｂのヒトＦｃＲｎへの結合を示す図である。固定化されたｍＡｂ（Ａ）ＳＹＮＴ００２ｈ（ヒト化親V_H１／Ｖκ１）、（Ｂ）ＳＹＮＴ００２－３（Ｇ１５＿Ｃ３／Ｖκ３）、（Ｃ）ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／Ｖκ３）、（Ｄ）ＳＹＮＴ００２－１６（Ｇ５０＿Ｃ１０／Ｖκ３）、（Ｅ）ＳＹＮＴ００２－１７（Ｇ５４＿Ｄ１１／Ｖκ３）、及び（Ｆ）ＳＹＮＴ００２－２１（Ｇ４９＿Ｈ９．３／Ｖκ３）上に注入された滴定量のｈＦｃＲｎの結合を示す代表的なセンサーグラム。
【図７－２】ｐＨ７．４及びｐＨ６．０での、ｍＡｂのヒトＦｃＲｎへの結合を示す図である。固定化されたｍＡｂ（Ａ）ＳＹＮＴ００２ｈ（ヒト化親V_H１／Ｖκ１）、（Ｂ）ＳＹＮＴ００２－３（Ｇ１５＿Ｃ３／Ｖκ３）、（Ｃ）ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／Ｖκ３）、（Ｄ）ＳＹＮＴ００２－１６（Ｇ５０＿Ｃ１０／Ｖκ３）、（Ｅ）ＳＹＮＴ００２－１７（Ｇ５４＿Ｄ１１／Ｖκ３）、及び（Ｆ）ＳＹＮＴ００２－２１（Ｇ４９＿Ｈ９．３／Ｖκ３）上に注入された滴定量のｈＦｃＲｎの結合を示す代表的なセンサーグラム。
【図８】Ａは、指示された時点での、２４時間ベースライン（±標準誤差）に基づいて残存するアルブミンの平均％としてプロットされたＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／Ｖκ３）及びＳＹＮＴ００２－１６（Ｇ５０＿Ｃ１０／Ｖκ３）の試験結果を示す図である。Ｂは、用量依存的に、ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／Ｖκ３）が効果的にアルブミン異化反応を増加させたことを示す図である。結果を、指示された時点での、２４時間ベースラインと比較して残存するヒトアルブミンの平均百分率（±ＳＥＭ）のｌｏｇ１０として示す。
【図９】ＰＣＳ、ＮＡＣ（１４０ｍｇ／ｋｇ）、ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／Ｖκ３）（１０ｍｇ／ｋｇ）、またはＡＰＡＰ投与の２時間後にＩｇＧ４アイソタイプ対照（１０ｍｇ／ｋｇ）を受けるＦｃｇｒｔ^{TG}マウスにおけるより低いレベルのＡＰＡＰ投与の６及び８時間後の血清ＡＬＴレベルを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３２】
一態様においては、本明細書では、ＦｃＲｎに結合する抗体及び結合タンパク質が提供される。より詳細には、抗体は、アルブミンの結合部位にオーバーラップするＦｃＲｎのエピトープに結合する。それゆえ、抗体は、アルブミンへのＦｃＲｎの結合、分解からのアルブミンの保護、及びアルブミン結合化合物の半減期延長などのＦｃＲｎ媒介機能を調節する。別の態様においては、ＦｃＲｎ抗体またはその抗原結合部分をコードする配列を含む単離された核酸が提供される。別の態様においては、ＦｃＲｎ抗体またはその抗原結合部分及び薬学的に許容される担体を含む対象への投与に好適な組成物が提供される。
【００３３】
一部の実施形態においては、本明細書に開示の抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合を阻害するが、ヒトＩｇＧのヒトＦｃＲｎへの結合は阻害しない。一部の実施形態においては、本明細書に開示の抗体はアルブミンの血清半減期は減少させるが、ヒトＩｇＧの血清半減期は減少させない。
【００３４】
別の態様においては、ＦｃＲｎとアルブミンとの相互作用を調節する方法が提供される。例えば、アルブミンのＦｃＲｎへの結合を減少させることにより、本明細書に記述される抗体またはそれらの抗原結合部分を使用して、循環するアルブミンの半減期を短縮させ、急性及び慢性毒性曝露を治療または予防することができる。アルブミンは広範囲の化合物

及び分子、例えば、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、及びキニジンに結合することが周知である（例えば、Ｖａｒｓｈｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｌｉｇａｎｄ ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｓｅｒｕｍ ａｌｂｕｍｉｎ：Ｈｏｗ ｃａｎ ｔｈｅ ｃａｒｇｏ ｂｅ ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ．Ｃｈｉｒａｌｉｔｙ．２０１０（２２）：７７－８７参照）。リシンはアルブミンに結合することも周知である（Ｂｌｏｍｅ ａｎｄ Ｓｃｈｅｎｇｒｕｎｄ．，Ｔｏｘｉｃｏｎ．２００８ ５１（７）：１２１４－２４）。また、アセトアミノフェンはヒト血清アルブミンに結合することが見出されている（Ｄａｍｓｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ Ｄｉｓｐｏｓ．２００７ ３５（８）：１４０８－１７）。かかる化合物及び分子の排泄は、種々の薬剤（アルブミン結合薬物及び融合タンパク質）の毒性過剰投与、重金属毒性、細菌性過負荷、細菌性敗血症、及び種々の他の病態を含むが、これらに限定されない様々な病態の治療において有利である。

【００３５】

同様に、本明細書に記載の抗体またはそれらの抗原結合部分を使用して、アルブミン毒性に関連する医学的病態、またはより低いレベルが有益であると示されている医学的病態を治療するため、循環するアルブミンの半減期を短縮させてもよい。例えば、アルブミンは、冠動脈アテローム性硬化症及び末梢血管疾患（Ｓｏｎｇ，Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ２０１２）、糖尿病性血管合併症（Ｋｉｍ，Ｄｉａｂ Ｍｅｔａｂ Ｊ ２０１２；Ｍｕｒｅａ，Ａｍ Ｊ Ｎｅｐｈｒｏｌ ２０１２）、アルツハイマー病（Ｂｙｕｎ，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ２０１２）、及び外傷性脳障害（Ｔｈｅ ＳＡＦＥ Ｓｔｕｄｙ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒｓ，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２００７）に関連している。循環するアルブミンを減少させることは、糖尿病、末期腎不全、及び他の病気、疾病、または疾患の治療においても有用であり得る。

【００３６】

新生児Ｆｃレセプターとしても周知のＦｃＲｎは、アルブミンの内在性膜Ｆｃレセプターである。ＦｃＲｎは、膜結合アルファ鎖（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ００４１０７）及び可溶性β２－ミクログロブリン（β２ｍ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ００４０４８）のヘテロ二量体であり、ＭＨＣクラスＩ分子と構造的に関連している。ＦｃＲｎは、取り込まれたアルブミンに結合し、それをリソソームコンパートメントにおける分解から保護すること、及び中性細胞外ｐＨで放出するためにアルブミンを細胞表面に輸送することによって、アルブミン濃度を調節する。この機構を介して、ＦｃＲｎはアルブミンの長い半減期の原因となる。従って、病原性アルブミン結合毒素の分解を促進するため、ＦｃＲｎ－アルブミン相互作用の特定の遮断が使用できる。

【００３７】

ＦｃＲｎに特異的に結合し、ＦｃＲｎのアルブミンへの結合をブロックするがＦｃＲｎのＩｇＧ－Ｆｃ結合部位に実質的に結合しないマウスの抗体から誘導される抗体が提供される。この抗体は、ｐＨ７．４及びｐＨ６．０でのＦｃＲｎに対する結合親和性の実質的な改善を有し、その結果、生理的及び酸性条件下でのアルブミンのＦｃＲｎへの結合をブロックする。抗体は自己免疫疾患及び炎症性疾患の治療に有用である。抗体は、１つ以上の親和性成熟ＣＤＲを含む。親和性成熟化手順により、６．０～７．４の臨界ｐＨ範囲を超えて高親和性でＦｃＲｎと結合する抗体が提供される。こうして、抗体はエンドソームの酸性環境に一旦内在化されたアルブミンの結合を、効果的にブロックする。

【００３８】

特定の実施形態によれば、改善された抗体はまた、免疫原性の低下のためのヒト化フレームワークを特徴とする。特定の実施形態においては、ＦｃＲｎ特異抗体のＣＤＲはヒト抗体から得られるフレームワークに位置づけられる。他の実施形態においては、ＦｃＲｎ特

異抗体のＣＤＲは２つ以上のヒト抗体の複合体であるフレームワークに位置づけられる。他の実施形態においては、ＦｃＲｎ特異抗体の表面曝露フレームワーク残基はヒト抗体のフレームワーク残基と置き換えられる。好ましい実施形態においては、フレームワークは、広い個体群範囲にわたってＴ細胞エピトープであると予測されるアミノ酸配列の存在を最小化するように選択される。ＣＤＲは、ヒト定常領域（すなわち、キメラ抗体）に連結するマウスフレームワークに位置づけられ得る。

【００３９】

更に本明細書に記載のように、親和性成熟化のため、重鎖可変ドメインＣＤＲ３領域を、ｐＨ６．０～ｐＨ７．４でｓｃＦｖ形態で突然変異させ、選別した。アミノ酸配列の変形形態を、以下：ａ．ａ．９４：Ｋ、Ｒ；ａ．ａ．９５：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９６：Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ，Ｈ、Ｋ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ；ａ．ａ．９７：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ；ａ．ａ．９８：Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ；ａ．ａ．９９：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｙ；ａ．ａ．１００：Ａ、Ｇ、Ｓ、Ｔのようにそれぞれの位置で選択されたアミノ酸を提供する配列ＡＲＧＢＮＳＶＶＳＢＮＣＶＮＣＮＶＣＲＳＣ（配列番号４１）を含むオリゴヌクレオチドを用いて、アミノ酸位置９４～１００（ＣＤＲ３Ｈのａ．ａ．９５～１００及びＦＷ３のａ．ａ．９４）で重鎖ＣＤＲ３Ｈ領域に導入した。アミノ酸配列の変形形態を、以下：ａ．ａ．９４：Ｒ；ａ．ａ．９５：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９６：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９７：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９８：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９９：Ａ、Ｇ、Ｓ、Ｔのようにそれぞれの位置で選択されたアミノ酸を提供する配列ＡＧＧＮＮＳＮＮＳＮＮＳＮＮＳＲＳＣ（配列番号４２）を含むオリゴヌクレオチドを用いて、アミノ酸位置９４～９９（ＣＤＲ３Ｈのａ．ａ．９５～９９及びＦＷ３のａ．ａ．９４）で重鎖ＣＤＲ３Ｈ領域に導入した。

【００４０】

以下の実施例に示すように、これにより、いくつかのＦｃＲｎ結合親和性が実質的に改善したＣＤＲ３Ｈ変異体がもたらされる。ＣＤＲ３Ｈライブラリに導入された可変性と比較して得られた変異体の検査により、アミノ酸が比較的変化しない特定の位置、及び変異が導入されることができ、結合が改善される他の位置が示される。従って、ＦｃＲｎに結合する抗体またはその結合部分が提供され、重鎖は可変であり得る特定のアミノ酸を含むＣＤＲ３Ｈを含む。かかる一実施形態においては、ＣＤＲ３ＨはX_1ＥＳＴＴX_2（X_1はＡ、またはＬであり、X_2はＴ、またはＲである）（配列番号４３）を含む。かかる別の実施形態においては、重鎖ＣＤＲ３ＨはX_1ＥＳＴＴX_2ＶＧＤＹ（X_1はＡ、またはＬであり、X_2はＴ、またはＲである）（配列番号４４）である。かかる別の実施形態においては、重鎖ＣＤＲ３ＨはX_1ＥＳＴＴX_2（X_1はＧ、Ａ、またはＬであり、X_2はＴ、またはＲである）（配列番号４５）を含む。かかる別の実施形態においては、重鎖ＣＤＲ３ＨはX_1ＥＳＴＴX_2ＶＧＤＹ（X_1はＧ、Ａ、またはＬであり、X_2はＴ、またはＲである）（配列番号４６）である。かかる別の実施形態においては、重鎖ＣＤＲ３Ｈは$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$（X_1はＧ、Ａ、Ｆ、またはＬであり、X_2はＥ、Ａ、またはＤであり、X_3はＳ、Ｔ、またはＡであり、X_4はＴ、Ｌ、Ｐ、またはＶであり、X_5はＴ、Ｓ、またはＡであり、X_6はＴまたはＡである）（配列番号４７）を含む。かかる別の実施形態においては、重鎖ＣＤＲ３Ｈは$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ＶＧＤＹ（X_1はＧ、Ａ、Ｆ、またはＬであり、X_2はＥ、Ａ、またはＤであり、X_3はＳ、Ｔ、またはＡであり、X_4はＴ、Ｌ、Ｐ、またはＶであり、X_5はＴ、Ｓ、またはＡであり、X_6はＴまたはＡである）（配列番号４８）である。

【００４１】

特定の実施形態においては、ＣＤＲ３ＨはＧＥＳＴＴＴＶＧＤＹ（配列番号２５）、ＡＥ

ＳＴＴＴＶＧＤＹ（配列番号２７）、ＦＳＳＬＳＴＶＧＤＹ（配列番号２９）、またはＬＥＳＴＴＡＶＧＤＹ（配列番号３１）である。特定の実施形態においては、ＣＤＲ３ＨはＦＤＴＰＡＴＶＧＤＹ（配列番号３３）、ＦＤＴＰＳＴＶＧＤＹ（配列番号３５）、ＦＤＳＬＳＴＶＧＤＹ（配列番号３７）、またはＬＥＡＶＳＡＶＧＤＹ（配列番号３９）である。これらの実施形態の特定のものにおいては、重鎖可変ドメインの位置１０３でのアミノ酸は、トリプトファンである。これらの実施形態の特定のものにおいては、重鎖可変ドメインの位置１０３でのアミノ酸は、アルギニンである。

【００４２】

ＣＤＲ３Ｈが上記に記述される通りである特定の実施形態においては、ＣＤＲ１Ｈは配列番号２により記述され、ＣＤＲ２Ｈは配列番号４により記述される。

【００４３】

いくつかの重鎖及び軽鎖フレームワークを開発した。免疫原性Ｔ細胞エピトープを最小化することに目を付けて、ヒト化フレームワークをヒト可変ドメイン配列から組み立てた。３つのかかるヒト化重鎖フレームワーク及び４つのかかる軽鎖ヒト化フレームワークを例証する：V_H1（配列番号１２）；V_H3（配列番号１４）；V_H4（配列番号１６）；Ｖκ１（配列番号１８）；Ｖκ２（配列番号２０）；Ｖκ３（配列番号２２）；及びＶκ４（配列番号２４）。これらの例証されたヒト化フレームワークに対応するオリゴヌクレオチド配列は、配列番号１１（V_H1）；配列番号１３（V_H3）；配列番号１５（V_H4）；配列番号１７（Ｖκ１）；配列番号１９（Ｖκ２）；配列番号２１（Ｖκ３）；及び配列番号２３（Ｖκ４）により記述される。配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、及び配列番号１８、ＣＤＲ１Ｈ、ＣＤＲ２Ｈ、及びＣＤＲ３Ｈアミノ酸に提供される重鎖可変ドメイン配列は、「Ｘａａ」として代表的である。ＣＤＲ１Ｈ及びＣＤＲ２Ｈのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号２及び配列番号４として記述される。ＣＤＲ１Ｈに対応するオリゴヌクレオチド配列は配列番号１により記述され、ＣＤＲ２Ｈに対応するオリゴヌクレオチド配列は配列番号３により記述される。配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、及び配列番号２４で提供される軽鎖可変ドメイン配列においては、特定のアミノ酸は全ての位置で特定されている。ＣＤＲ１Ｌのアミノ酸配列は配列番号６として記述され、ＣＤＲ２Ｌは配列番号８として記述され、ＣＤＲ３Ｌは配列番号１０として記述される。対応するオリゴヌクレオチド配列は、配列番号５（ＣＤＲ１Ｌ）；配列番号７（ＣＤＲ２Ｌ）；及び配列番号９（ＣＤＲ３Ｌ）により記述される。重鎖及び軽鎖におけるＦＷ及びＣＤＲの位置は、それぞれ図１及び図２から明白である。

【００４４】

表１は、親和性成熟された、ヒト化ＦｃＲｎ結合抗体重鎖及び軽鎖可変ドメインならびにＣＤＲの非限定例を提供する。本明細書に記載のように、可変ドメインは、ｐＨ６．０及びｐＨ７．４で結合を改善するように選択され、親マウス抗体に対して実質的に改善された結合を実証した。

【表１】

表１－配列番号による抗体アミノ酸配列

	CDR1H	CDR2H	CDR3H	V_H
G15_C3 V_H1	2	4	25	26
G47_B10 V_H1	2	4	27	28
G47_H6 V_H1	2	4	29	30
G50_C10 V_H1	2	4	31	32
G54_D11 V_H1	2	4	33	34
G52_G9 V_H1	2	4	35	36
G49_H9.3 V_H1	2	4	37	38
G49_H9.5 V_H1	2	4	39	40

【００４５】
親和性成熟重鎖ＣＤＲ３を、重鎖ＣＤＲ１（例えば、配列番号２を有するＣＤＲ１）及び／または重鎖ＣＤＲ２（例えば、配列番号４を有するＣＤＲ２）と組み合わせてもよい。
【００４６】
以下の実施例に開示のように、本明細書で例証される様々な抗体可変ドメインは、マウス抗体に基づき、親和性成熟ＣＤＲを含み、特定の実施形態はまたヒト化ＦＷを特徴とする。表１に開示の任意の重鎖可変ドメインを、任意の開示される軽鎖と共発現させ、官能性抗ＦｃＲｎ抗体を作製してもよい。また、親和性成熟重鎖可変ドメインを、本明細書に開示のヒト化非親和性成熟軽鎖可変ドメインと対にしてもよく、親和性成熟軽鎖可変ドメインをヒト化非親和性成熟重鎖可変ドメインと対にしてもよい。好ましい実施形態においては、親和性成熟重鎖可変ドメインをヒト化軽鎖可変ドメインと対にしてもよい。また、表１ではV_H1における重鎖ＣＤＲが記述される。重鎖ＣＤＲはまた、例えば本明細書に開示のフレームワークV_H3、及びV_H4と適合性がある（図１参照）。本明細書で用いられる、呼称V_H1、V_H3、V_H4、Ｖκ１、Ｖκ２、Ｖκ３、及びＶκ４は、本明細書に開示の代表的なヒト化フレームワークを指し、ヒト生殖系列遺伝子ファミリの参照ではない。本明細書に開示の重鎖または軽鎖可変ドメインを相補性可変ドメインのライブラリに組み合わせ、改良されたまたは改変された結合特性を有する新規の抗体を同定するため選別しすることができることは明白であろう。
【００４７】
本明細書では、表１に開示されたものに類似するが同一ではない抗体及び抗原結合部分が提供される。抗体は１つ以上のアミノ酸置換、欠損、挿入、及び／または付加を有することができる。特定の実施形態においては、ＦｃＲｎ抗体は、表１に記述される重鎖可変ドメインに少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％同一の重鎖可変ドメインを含む。
【００４８】
実施形態においては、ＦｃＲｎ抗体は、ＣＤＲ配列、すなわち表１に記述されるＣＤＲ１Ｈ、ＣＤＲ２Ｈ、及びＣＤＲ３ＨならびにV_H1、V_H3、もしくはV_H4のフレームワーク（すなわち、ＦＷ１、ＦＷ３、及びＦＷ４）またはV_H1、V_H3、もしくはV_H4のフレームワークに少なくとも８５％、９０％、または９５％同一のフレームワークを含む重鎖可変ドメインを含む。実施形態においては、ＦｃＲｎ抗体は、表１に記述されるＣＤＲ配列及び重鎖重鎖可変ドメインが表１に記述される可変ドメインに少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％同一となるようにフレームワークを含む重鎖可変ドメインを含む。
【００４９】
実施形態においては、ＦｃＲｎ抗体は、ＣＤＲ配列、すなわち表１に記述されるＣＤＲ１Ｈ、ＣＤＲ２Ｈ、及びＣＤＲ３Ｈ及びV_H1、V_H3、もしくはV_H4のフレームワーク（すなわち、ＦＷ１、ＦＷ３、及びＦＷ４）またはV_H1、V_H3、もしくはV_H4のフレームワークに少なくとも８５％、９０％、または９５％同一のフレームワークを含む重鎖可変ドメイン、ならびにＶκ１、Ｖκ２、Ｖκ３、もしくはＶκ４またはＶκ１、Ｖκ２、Ｖκ３、もしくはＶκ４に少なくとも８５％、９０％、または９５％同一の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。
【００５０】
「同一性」は、２つの配列の最適なアラインメントに導入される必要がある、ギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れて、２つのアミノ酸または核酸配列により共有される同一の位置の数または百分率を指す。
【００５１】
アミノ酸配列が別のアミノ酸配列と少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％同一であると記載される場合、アミノ酸配列は保存的置換（全ての置換が保存的置換である場合を含む）により異なってもよい。
【００５２】

アミノ酸置換は、ある場合には、（ａ）置換領域におけるペプチド主鎖の構造、（ｂ）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖の嵩高さの保持に対する作用において大幅に異ならない置換を選択することにより行うことができる。例えば、天然残基を、側鎖特性；（１）疎水性アミノ酸（メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン）、（２）中性親水性アミノ酸（システイン、セリン、及びスレオニン）、（３）酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、（４）塩基性アミノ酸（アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、及びアルギニン）、（５）鎖の配向に影響するアミノ酸（グリシン及びプロリン）、ならびに（６）芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン、及びフェニルアラニン）に基づくグループに分割することができる。これらのグループの範囲内で行われる置換は、保存的置換であると考えられる。置換の例としては、限定されるものではないが、アラニンに対するバリン、アルギニンに対するリジン、アスパラギンに対するグルタミン、アスパラギン酸に対するグルタミン酸、システインに対するセリン、グルタミンに対するアスパラギン、グルタミン酸に対するアスパラギン酸、グリシンに対するプロリン、ヒスチジンに対するアルギニン、イソロイシンに対するロイシン、ロイシンに対するイソロイシン、リジンに対するアルギニン、メチオニンに対するロイシン、フェニルアラニンに対するロイシン、プロリンに対するグリシン、セリンに対するスレオニン、スレオニンに対するセリン、トリプトファンに対するチロシン、チロシンに対するフェニルアラニン、及び／またはバリンに対するロイシンの置換が挙げられる。

【００５３】

配列の類似性を同定するための方法及びコンピュータプログラムは公的に入手可能であり、限定されないが、ＧＣＧプログラムパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２：３８７，１９８４）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３（１９９０）及びＡＬＩＧＮ ｐｒｏｇｒａｍ（ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０）が挙げられる。周知であるＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎのアルゴリズムを使用して類似性を決定してもよい。ＢＬＡＳＴプログラムはＮＣＢＩ及び他の供給元（ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ，Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ ａｌ．，ＮＣＢＩ ＮＬＭ ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．２０８９４；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／でのＢＬＡＳＴ２．０）から公的に入手可能である。配列の比較において、これらの方法は様々な置換、欠損、及び他の修飾を説明する。

【００５４】

本明細書で用いられる用語「相補性決定領域」（ＣＤＲ、すなわち、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）は、その存在が抗原結合に必要である抗体可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは通常、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３として識別される３つのＣＤＲ領域を有する。各相補性決定領域は、Ｋａｂａｔにより定義される（すなわち、軽鎖可変部において残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）及び８９～９７（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメインにおいて３１～３５（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）及び９５～１０２（Ｈ３）について）「相補性決定領域」由来のアミノ酸残基を含み得る。同様に、「フレームワーク」（ＦＷ）は、Ｋａｂａｔナンバリングシステム（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７，１９９１））を考慮に入れて、軽鎖可変部において、アミノ酸１～２３（ＦＷ１）、３５～４９（ＦＷ２）、５７～８８（ＦＷ３）、及び９８～１０７（ＦＷ４）ならびに重鎖可変ドメインにおいて１～３０（ＦＷ１）、３６～４９（ＦＷ２）、６６～９４（ＦＷ３）、及び１０３～１１３（ＦＷ４）を含む。

【００５５】

Ｋａｂａｔの残基指定は、必ずしもアミノ酸残基の直鎖の番号付けと直接対応するとは限らない。実際の直鎖アミノ酸配列は、基本可変ドメイン構造のフレームワークであっても

、相補性決定領域（ＣＤＲ）であっても、構造成分の短縮もしくは挿入に対応する厳密なＫａｂａｔナンバリングよりも少ない、または追加のアミノ酸を含み得る。抗体の配列における相同性の残基の、「標準的な」Ｋａｂａｔ番号付き配列とのアラインメントにより、所定の抗体に関して残基の正しいＫａｂａｔナンバリングを同定することができる。

【００５６】

本明細書で用いられる「抗体可変ドメイン」は、相補性決定領域（ＣＤＲ；すなわち、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）及びフレームワーク領域（ＦＲ）のアミノ酸配列を含む抗体分子の軽鎖及び重鎖の一部を指す。V_Hは重鎖の可変ドメインを指す。V_Lは軽鎖の可変ドメインを指す。

【００５７】

抗体は特定の抗原または物質を認識し結合するタンパク質である。好ましい実施形態においては、本明細書に記述される抗体または抗原結合部分は、少なくとも天然の配位子（すなわち、アルブミン）と同程度強くＦｃＲｎに結合する。抗原の抗体との解離の平衡定数（Ｋｄ）に表される親和性により、抗原決定基と抗体結合部位との結合強度が測定される。抗体の抗原への親和性は、好適な表面プラズモン共鳴測定値の使用により測定され得る。かかる測定は、国際特許出願公開ＷＯ２００５／０１２３５９及び本明細書の他の箇所に記載のＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）アッセイであり得る。親和性を測定する他の方法としては、酵素結合免疫吸着測定法またはラジオイムノアッセイなどの競合アッセイが挙げられる。

【００５８】

アビディティは、抗体とその抗原との結合強度の尺度である。アビディティは、抗原決定基と抗体上の抗原結合部位との親和性及び抗体あたりの結合部位の数（原子価）の両方に関連する。例えば、一価の抗体（例えば、ＦａｂまたはｓｃＦｖ）は、特定のエピトープに１つの結合部位を有する。ＩｇＧ抗体は２つの抗原結合部位を有する。Ｋの典型的な値（解離定数K_dの逆数）は、10^5～10^{11}リットル／モルである。10^4リットル／モルよりも弱い任意のＫは、非特異性である結合を示すと考えられている。

【００５９】

特定の実施形態においては、本明細書に記載の抗体またはそれらの抗原結合部位は、10^5～10^{12}リットル／モル、10^6～10^{12}リットル／モル、10^7～10^{12}リットル／モル、10^8～10^{12}リットル／モル、10^9～10^{12}リットル／モル、10^{10}～10^{12}リットル／モル、または10^{11}～10^{12}リットル／モルのK_dでヒトＦｃＲｎのアルブミン結合部位に結合する。他の実施形態においては、本明細書に記載の抗体またはそれらの抗原結合部位は、10^5～10^{11}リットル／モル、10^6～10^{11}リットル／モル、10^7～10^{11}リットル／モル、10^8～10^{11}リットル／モル、10^9～10^{11}リットル／モル、または10^{10}～10^{11}リットル／モルのK_dでヒトＦｃＲｎのアルブミン結合部位に結合する。他の実施形態においては、本明細書に記載の抗体またはそれらの抗原結合部位は、10^5～10^{10}リットル／モル、10^6～10^{10}リットル／モル、10^7～10^{10}リットル／モル、10^8～10^{10}リットル／モル、または10^9～10^{10}リットル／モルのK_dでヒトＦｃＲｎのアルブミン結合部位に結合する。他の実施形態においては、本明細書に記載の抗体またはそれらの抗原結合部位は、10^5～10^8リットル／モル、10^6～10^8リットル／モル、または10^7～10^8リットル／モルのK_dでヒトＦｃＲｎのアルブミン結合部位に結合する。

【００６０】

ヒトに投与する際に免疫原性を最小化するため、本明細書に記述される抗体またはそれらの抗原結合部位は、好ましくはヒト定常ドメインを含む。従って、抗体は、IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3、IgG_4、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、もしくはＩｇＥを含むが、これらに限定されないアイソタイプまたはサブタイプであり得る。抗体クラスは、エフェクター機能（例えば、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）または抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を増加または減少）を最適化するように選択され得る。特定の実施形態においては、定常領域（すなわち、C_H1、C_H2、C_H3、及び／またはヒンジ領域）は

改変され、例えばＦｃレセプターへの結合が増加または減少する。特定の実施形態においては、定常ドメインは改変され、重鎖－重鎖結合を促進または安定化させる。特定の実施形態においては、抗体はＩｇＧ４抗体であり、重鎖のヒンジ領域は、位置２４１でのセリンのプロリンへの変化により変性され、血清半減期の延長がもたらされる（Ａｎｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：１０５－１０８）。特定の実施形態においては、抗体はＩｇＧ４抗体であり、重鎖の位置４７８でＣ末端リジンが除去される。一部の実施形態においては、ＩｇＧ４抗体はＳ２４１Ｐ修飾の両方を有し、Ｃ末端リジンを欠く。

【００６１】

特定の実施形態においては、ＦｃＲｎ結合抗体フラグメントが提供される。Ｆｖは、６つの超可変ループ（ＣＤＲ）を含む完全な重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む最小のフラグメントである。定常ドメインが不足していると、可変ドメインは非共有結合的に結合している。重鎖及び軽鎖は、V_H及びV_Lドメインが結合して抗原結合部位を形成することを可能にするリンカーを用いて、単一のポリペプチド鎖（「単鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」）に連結され得る。例えば、Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３及びＨｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ，，１９８８，Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８５：５８７９を参照されたい。実施形態においては、リンカーは（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_3$である。全抗体の定常ドメインを欠くため、ｓｃＦｖフラグメントは全抗体よりもかなり小さい。ｓｃＦｖフラグメントはまた、特定の実施形態において所望であり得る他の生物学的分子との通常の重鎖定常ドメイン相互作用を含まない。

【００６２】

本明細書で用いられる「抗体」は、モノマーならびに多量体及び結合フラグメントを指す。多量体を含むインタクトな抗体、または抗体の抗原結合領域を有する抗体フラグメントを使用することができる。抗原結合領域は、限定されないが、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’及びＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを含む。抗体フラグメントの調整方法は、当該技術分野において周知である。例えば、重鎖ヒンジ領域を欠く一価のＦａｂフラグメントを、パパインを用いるタンパク質消化により全免疫グロブリンから調製することができる。重鎖ヒンジ領域を保持する二価のＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、ペプシンを用いるタンパク質消化により調製することができる。

【００６３】

V_H、V_L、及び場合によりC_L、C_H1、または他の定常ドメインを含む抗体のフラグメントも使用することができる。かかるフラグメントもまた、組換え産生され得る。多くの他の有用な抗原結合抗体フラグメントは当該技術分野において公知であり、限定されることなく、二重特異性抗体、三重特異性抗体、単一ドメイン抗体、ならびに他の一価及び多価の形態を含む。

【００６４】

限定されないが、抗体、それらの抗原結合フラグメントの形態であり得る、多価の抗原結合タンパク質、及び抗体の抗原結合部分の全てまたは一部を含むタンパク質が更に提供される。多価の抗原結合タンパク質は、単一特異性、二重特異性、または多特異性であり得る。特異性という用語は、特定の分子が結合できる異なる種の抗原決定基の数を指す。免疫グロブリン分子が一種の抗原決定基にのみ結合する場合、免疫グロブリン分子は単一特異性である。免疫グロブリン分子が異なる種の抗原決定基に結合する場合、免疫グロブリン分子は多特異性である。

【００６５】

一実施形態においては、多価の単鎖抗体は、可変重鎖フラグメント（ｓｃＦｖに類似）に結合された可変軽鎖フラグメントを含み、更に別のペプチドリンカーによって少なくとも１つの他の抗原結合ドメインに結合されている。通常、ペプチドリンカーは約１５のアミノ酸残基からなる。好ましい実施形態においては、V_L及びV_Hドメインの数は同等である。例えば、二価の単鎖抗体は、以下に代表されることができる：$V_L－L_1－V_H－L$

２－ＶＬ－Ｌ３－ＶＨまたはＶＬ－Ｌ１－ＶＨ－Ｌ２－ＶＨ－Ｌ３－ＶＬまたはＶＨ－Ｌ１－ＶＬ－Ｌ２－ＶＨ－Ｌ３－ＶＬまたはＶＨ－Ｌｌ－ＶＬ－Ｌ２－ＶＬ－Ｌ３－ＶＨ。三価以上の多価の単鎖抗体は、追加のペプチドリンカーにより二価の単鎖抗体に結合する１つ以上の抗体フラグメントを有する。三価の単鎖抗体の一例は：ＶＬ－Ｌ１－ＶＨ－Ｌ２－ＶＬ－ＬＩ－ＶＨ－Ｌ２－ＶＬ－ＬＩ－ＶＨである。

【００６６】

２つの単鎖抗体を組み合わせて、二価の二量体としても既知の二重特異性抗体を形成することができる。例えば、欧州特許出願０　４０４　０９７号またはＨｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４を参照されたい。二重特異性抗体は２つの鎖を有する。二重特異性抗体の各鎖は、約５～１０のアミノ酸残基、例えば、（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）、（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）２の短いリンカーによりＶＬドメインに結合するＶＨドメインを含む。かかるリンカーは、同一鎖上のドメイン間の、鎖間のペアリングを防止のするに十分短く、従って、異なる鎖上の相補ドメイン間の鎖間のペアリングを促進し、２つの抗原結合部位を再現する。二重特異性抗体の構造は小型であり、分子の反対側の末端に抗原結合部位を有する。

【００６７】

ＶＬ及びＶＨフレームワーク配列変異体ならびに親和性成熟抗体を、前臨床ｅｘ　ｖｉｖｏアッセイに供し、潜在的な免疫原性を評価することができる。１つのかかるアッセイは、タンパク質治療に対するＴ細胞の応答の定量化によりＴ細胞免疫原性を予測する効果的な技術を提供するＥＰＩＳＣＲＥＥＮ（商標）である。アッセイは、世界人口で発現されるＨＬＡ－ＤＲアロタイプの数及び頻度を最もよく表すために、ＭＨＣクラスＩＩハプロタイプに基づいて慎重に選択された献血者のコホートを使用する。アッセイは、全タンパク質の免疫原性をＴ細胞応答の程度及び頻度の両方で評価することができる方法を提供する（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｒｅｓ．２００４　２４（９）：５６０－７２；Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｔｈｒｏｍｂ　Ｈａｅｍｏｓｔ．２００５　３（５）：９９１－１０００）。

【００６８】

本明細書に開示された抗体のＦｃＲｎへの結合に競合するか、もしくはそれを交差ブロックする抗体、または本明細書に開示の抗体により結合するＦｃＲｎから交差ブロックされる抗体が、本明細書に開示のＦｃＲｎ活性をブロックする方法において使用され得る。ある場合には、これらの競合する、交差ブロックする、または交差ブロックされた抗体は、本明細書に記載の抗体により結合されたエピトープと接する及び／または重なるＦｃＲｎのエピトープに結合する。ある場合には、これらの競合する、交差ブロックする、または交差ブロックされた抗体は、本明細書に記載の抗体により結合されたエピトープと同じであるＦｃＲｎのエピトープに結合する、キメラ抗体、完全ヒト抗体、またはヒト化抗体である。

【００６９】

競合する、交差ブロックする、及び交差ブロックされた抗体は、競合するまたは交差ブロックする抗体のヒトＦｃＲｎへの結合が、本明細書に開示の抗体の結合を阻止するか、もしくはその逆である競合ＥＬＩＳＡまたはＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）アッセイを含む当該技術分野において公知の任意の好適な方法により同定することができる。

【００７０】

特定の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックする抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合をブロックし、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、及び配列番号４０からなる群から選択される重鎖配列ならびに配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、及び配列番号２４からなる群から選択される軽鎖配列を有する抗体の結合と競合するまたはそれを交差ブロックする抗体である。一部の実施形態においては、競合または交差ブロックは８０％超、８５％超、９０％超、または９５％超である。

【００７１】
特定の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックする抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合をブロックし、配列番号２８の重鎖配列及び配列番号２２軽鎖配列を有する抗体の結合と競合するまたはそれを交差ブロックする抗体である。一部の実施形態においては、競合または交差ブロックは８０％超、８５％超、９０％超、または９５％超である。
【００７２】
特定の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックする抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合をブロックし、配列番号３２の重鎖配列及び配列番号２２軽鎖配列を有する抗体の結合と競合するまたはそれを交差ブロックする抗体である。一部の実施形態においては、競合または交差ブロックは８０％超、８５％超、９０％超、または９５％超である。
【００７３】
特定の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックする抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合をブロックする抗体であり、このＦｃＲｎへの結合は、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、及び配列番号４０からなる群から選択される重鎖配列ならびに配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、及び配列番号２４からなる群から選択される軽鎖配列を有する抗体により競合または交差ブロックされる。一部の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックされる抗体は、８０％超、８５％超、９０％超、または９５％超に競合または交差ブロックされる。
【００７４】
特定の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックされる抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合をブロックする抗体であり、このＦｃＲｎへの結合は、配列番号２８の重鎖配列及び配列番号２２の軽鎖配列を有する抗体により、競合または交差ブロックされる。一部の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックされる抗体は、８０％超、８５％超、９０％超、または９５％超に競合または交差ブロックされる。
【００７５】
特定の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックされる抗体は、アルブミンのヒトＦｃＲｎへの結合をブロックする抗体であり、このＦｃＲｎへの結合は、配列番号３２の重鎖配列及び配列番号２２の軽鎖配列を有する抗体により、競合または交差ブロックされる。一部の実施形態においては、競合するまたは交差ブロックされる抗体は、８０％超、８５％超、９０％超、または９５％超に競合または交差ブロックされる。
【００７６】
一部の実施形態においては、競合する、交差ブロックする、または交差ブロックされた抗体は、キメラ抗体、完全ヒト抗体、またはヒト化抗体である。一部の実施形態においては、競合する、交差ブロックする、または交差ブロックされた抗体は、10^{5}～10^{11}リットル／モル、10^{6}～10^{11}リットル／モル、10^{7}～10^{11}リットル／モル、10^{8}～10^{11}リットル／モル、10^{9}～10^{11}リットル／モル、または10^{10}～10^{11}リットル／モルの親和性でヒトＦｃＲｎのアルブミン結合部位に結合する。
【００７７】
本明細書では、抗ＦｃＲｎ抗体をコードする核酸ならびにこれらの官能基フラグメント、ベクター、宿主細胞及び発現系もまた提供される。抗ＦｃＲｎ抗体をコードする核酸及びこれらの官能基フラグメントは、例えば、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、合成的に産生されたＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはそれらのポリヌクレオチドのいずれかを単独でまたは組み合わせて含む組換え産生されたキメラ核酸分子であってもよい。例えば、真核及び／または原核宿主細胞における発現に好適な発現制御配列に作動可能に連結されている、本明細書に記載の抗ＦｃＲｎ抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターが提供される。開発されている酵母及び哺乳動物細胞培養系を含むが、これらに限定されない、細菌群及び真核細胞系などの原核細胞での抗体及びフラグメントの効率的な合成のため

の種々の発現ベクターが開発されている。ベクターは染色体、非染色体及び合成ＤＮＡのセグメントを含むことができる。一部の実施形態においては、核酸は配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号６、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号１７、配列番号１９、配列番号２１、配列番号２３、配列番号４１、または配列番号４２を含み得る。

【００７８】

任意の好適な発現ベクターを使用することができる。例えば、ｃｏｌＥ１、ｐＣＲ１、ｐＢＲ３２２、ｐＭＢ９、ｐＵＣ、ｐＫＳＭ、及びＲＰ４などのＥ．ｃｏｌｉからのプラスミドを含む原核クローン化ベクターが挙げられる。原核ベクターはまた、Ｍ１３及び他の繊維状単鎖ＤＮＡファージなどのファージＤＮＡの誘導体も含む。酵母における有用なベクターの例は２μプラスミドである。哺乳動物細胞における発現に好適なベクターとしては、周知のＳＶ４０の誘導体、アデノウィルス、レトロウィルス由来ＤＮＡ配列及び上記のものなどの官能性哺乳動物ベクターの組合せから誘導されたシャトルベクターならびに官能性プラスミド（例えば、ｐＬｅｎｔｉ６．３／Ｖ５－ＤＥＳＴ（登録商標）、ｐＴ－Ｒｅｘ（商標）－ＤＥＳＴ３１（登録商標）、ｐＧｅｎｅ／Ｖ５－ＨｉｓｐＧｅｎｅ／Ｖ５－Ｈｉｓ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ））が挙げられる。

【００７９】

更なる真核発現ベクターは、当該技術分野において公知である（例えば、Ｐ．Ｊ．Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　ａｎｄ　Ｐ．Ｂｅｒｇ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．，１，３２７－３４１（１９８２）；Ｓｕｂｒａｍａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１：８５４－８６４（１９８１）；Ｋａｕｆｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｓｈａｒｐ，“Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　Ｃｏｔｒａｎｓｆｅｃｔｅｄ　ｗｉｔｈ　ａ　Ｍｏｄｕｌａｒ　Ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｌａｔｅ　Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ　Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ＤＮＡ　Ｇｅｎｅ，”Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５９，６０１－６２１（１９８２）；Ｋａｕｆｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｓｈａｒｐ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１５９，６０１－６６４（１９８２）；Ｓｃａｈｉｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　Ｏｆ　Ｔｈｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｏｆ　Ａ　Ｈｕｍａｎ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　ＤＮＡ　Ｇｅｎｅ　Ｉｎ　Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｈａｍｓｔｅｒ　Ｏｖａｒｙ　Ｃｅｌｌｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８０，４６５４－４６５９（１９８３）；Ｕｒｌａｕｂ　ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７，４２１６－４２２０，（１９８０））。

【００８０】

発現ベクターは、発現されるＤＮＡ配列またはフラグメントに作動可能に結合する少なくとも１つの発現制御配列を含み得る。制御配列は、クローン化されたＤＮＡ配列の発現を制御及び調節するため、ベクター内に挿入される。有用な発現制御配列の例は、ｌａｃ系、ｔｒｐ系、ｔａｃ系、ｔｒｃ系、ラムダファージの主要なオペレータ領域及びプロモータ領域、ｆｄコートタンパク質の制御領域、酵母の解糖プロモータ（例えば３－ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモータ）、酵母酸性ホスファターゼのプロモータ（例えばＰｈｏ５）、酵母α－交配因子のプロモータ、サイトメガロウイルス、ポリオーマ、アデノウィルス、レトロウィルス、及びシミアンウイルス由来のプロモータ（例えば初期及び後期プロモータまたはＳＶ４０）、ならびに原核または真核細胞及びそれらのウイルスまたはそれらの組み合わせの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列である。使用され得る他の発現制御配列は、チャイニーズハムスター延長因子－１α（ＣＨＥＦ１）遺伝子由来のＤＮＡ制御配列を含む（Ｒｕｎｎｉｎｇ　Ｄｅｅｒ＆Ａｌｌｉｓｏｎ，２００４，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．２０：８８０－８８９；米国特許第５，８８８，８０９号）。

【００８１】

以前に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞もまた提供される。本明細書に記述され

る抗体またはそれらの抗原結合部位は、ハイブリドーマ以外に細胞株において発現することができる。本明細書に記載のポリペプチドをコードする配列を含む核酸を、好適な哺乳動物宿主細胞の変換に使用することができる。

【００８２】

特に好ましい細胞株は、高レベルの発現、目的のタンパク質の構成的発現及び宿主タンパク質からの最小の汚染に基づいて選択される。発現のための宿主として入手可能な哺乳動物細胞株は当該技術分野において周知であり、ＮＳ０細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞及び多くの他のものなどであるが、これらに限定されない多くの不死化細胞株を含む。一部の実施形態においては、細胞は、腹水から高濃度のＩｇＧを回収することができるマウスの腹腔内での培養においてトランスフェクトして増殖させることができる骨髄腫細胞、例えばＳＰ２／０である。好適な更なる真核細胞としては、酵母及び他の菌類が挙げられる。有用な原核宿主としては、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ＳＧ－９３６、Ｅ．ｃｏｌｉ ＨＢ１０１、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｘ１７７６、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｘ２２８２、Ｅ．ｃｏｌｉ ＤＨＩ及びＥ．ｃｏｌｉ ＭＲＣｌなどのＥ．ｃｏｌｉ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓなどのＢａｃｉｌｌｕｓ、ならびにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓが挙げられる。

【００８３】

これらの本発明の組換え宿主細胞を、抗体またはその抗原結合部分を産生するために、抗体またはそのフラグメントの発現を可能にする条件下で細胞を培養し、宿主細胞または宿主細胞を取り囲む培地から抗体またはそのフラグメントを精製することによって、使用することができる。従って、一実施形態においては、ＦｃＲｎのアルブミン結合領域に結合できる抗体を産生するための方法が提供され、当該方法は、（ａ）上記の通り、宿主細胞を培養すること、及び（ｂ）当該抗体を宿主細胞または宿主細胞の培養培地から抗体を単離することを含む。

【００８４】

形質転換された宿主を、発酵槽で増殖させ、当該技術分野において公知の技術により培養することができる。抗体の発現が所望のレベルに到達する際、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラムでの精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該技術分野の標準的な手順に従い抗体を精製することができる。本明細書に記載の治療的な方法における使用に関し、抗体を少なくとも９０％、９５％、９８％、または９９％の純度まで精製することが好ましい。

【００８５】

組換え宿主細胞における分泌のために発現された抗体またはフラグメントのターゲティングは、対象の抗体をコードする遺伝子の５’末端においてシグナルまたは分泌リーダーペプチドコード配列を挿入することにより促進することができる（Ｓｈｏｋｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６０（６）：６５４－６４（２００３），Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．１０：１－６（１９９７）及びｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４：４６８３－４６９０（１９８６）参照）。これらの分泌リーダーペプチド要素は、原核または真核の配列のいずれかに由来し得る。従って、適切には、宿主細胞の細胞質ゾルからのポリペプチドの移動及び培地への分泌を導くために、ポリペプチドのＮ末端に結合したアミノ酸である分泌リーダーペプチドが使用される。

【００８６】

抗体またはそれらの抗原結合部分は、更なるアミノ酸残基に融合することができる。かかるアミノ酸残基は、恐らく単離を容易にするために、ペプチドタグであり得る。特定の臓器または組織に対する抗体のホーミングのための他のアミノ酸残基も考えられる。

【００８７】

一部の実施形態においては、抗体またはその抗原結合部分は、抗体またはその抗原結合部分に何らかの所望の性質（例えば、増加した半減期）を提供する１つ以上のエフェクター

分子にコンジュゲートされる。特定の実施形態においては、抗体またはその抗原結合部分は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）にコンジュゲートされる。ＰＥＧは、任意のアミノ酸側鎖または末端アミノ酸官能基（例えば、遊離アミノ、イミノ、チオール、ヒドロキシル、もしくはカルボキシル基）に結合し得る。ＰＥＧを抗体に結合する方法は、当該技術分野において公知であり、使用され得る。例えば、欧州特許出願ＥＰ０９４８５４４号、欧州特許出願ＥＰ１０９００３７号、“Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅｇｌｙｃｏｌ）Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，”１９９２，Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ Ｈａｒｒｉｓ（ｅｄ），Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；“Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅｇｌｙｃｏｌ）Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，”１９９７，Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ Ｈａｒｒｉｓ＆Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ（ｅｄｓ），Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ ＤＣ；“Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｕｐｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，”１９９８，Ｍ．Ａｓｌａｍ＆Ａ．Ｄｅｎｔ，Ｇｒｏｖｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；またはＣｈａｐｍａｎ，Ａ．２００２，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２００２，５４：５３１－５４５を参照されたい。

【００８８】

別の実施形態においては、本明細書に記述される抗体またはその抗原結合部分は、抗体が発現し回収できるように、遺伝子導入動物において抗体をコードする核酸を発現することにより作成される。例えば、抗体は回収及び精製を容易にする組織に特異的な方法で発現することができる。かかる一実施形態においては、抗体は泌乳中の分泌のため、乳腺で発現される。遺伝子導入動物としては、マウス、ヤギ及びウサギが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８９】

本明細書では、酸性ｐＨ及び生理的ｐＨの両方でＦｃＲｎに結合し、ＦｃＲｎに結合するアルブミンと競合するエピトープでも結合する抗体を同定する方法が提供される。方法は、酸性ｐＨ（例えば、ｐＨ５．０～６．６、ｐＨ５．８～６．４、ｐＨ６．０～６．２またはｐＨ６．０）で行われる２以上の選別ステップを含む。２つ以上の酸性選別ステップは、生理的ｐＨ（例えば、ｐＨ６．８～８．２、ｐＨ６．８～７．６、ｐＨ７．２～７．４またはｐＨ７．４）で行われる選別ステップと交互に行われる。

【００９０】

例えば、かかる方法の一実施形態は、

（ａ）ｐＨ５．８～６．４で、候補抗体のコレクションとＦｃＲｎまたはその一部とを接触させ、ＦｃＲｎまたはその一部に結合する抗体を単離するステップと、

（ｂ）ｐＨ６．８～７．６で、ステップ（ａ）の単離した抗体とＦｃＲｎまたはその一部とを接触させ、ＦｃＲｎまたはその一部に結合する抗体を単離するステップと、

（ｃ）ｐＨ５．８～６．４で、ステップ（ｂ）の単離した抗体とＦｃＲｎまたはその一部とを接触させ、ＦｃＲｎまたはその一部に結合する抗体を単離するステップと、

（ｄ）ＦｃＲｎへのアルブミンの結合をブロックする能力について、ステップ（ｃ）の単離した抗体を分析するステップと、を含む。

【００９１】

別の実施形態は、

（ａ）候補ＦｃＲｎ結合抗体のコレクションを提供するステップと、

（ｂ）ｐＨ６．０で、ＦｃＲｎまたはその一部と、少なくとも一部の候補ＦｃＲｎ結合抗体との間に複合体を形成するような条件下で、候補ＦｃＲｎ結合抗体のコレクションをＦｃＲｎまたはその一部と接触させるステップと、

（ｃ）複合体を単離するステップと、

（ｄ）単離した複合体から候補ＦｃＲｎ結合抗体を分離するステップと、

（ｅ）ｐＨ７．４で、ＦｃＲｎまたはその一部と、少なくとも一部の候補ＦｃＲｎ結合抗

体との間に複合体を形成するような条件下で、ステップ（ｄ）からの分離された候補ＦｃＲｎ結合抗体をＦｃＲｎまたはその一部と接触させるステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）において形成した複合体を単離するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）の単離した複合体から候補ＦｃＲｎ結合抗体のコレクションを分離するステップと、
（ｈ）ｐＨ６．０で、ＦｃＲｎまたはその一部と、少なくとも一部の候補ＦｃＲｎ結合抗体との間に複合体を形成するような条件下で、ステップ（ｇ）からの分離された候補ＦｃＲｎ結合抗体をＦｃＲｎまたはその一部と接触させるステップと、
（ｉ）ステップ（ｈ）において形成した複合体を単離するステップと、
（ｊ）ステップ（ｉ）の単離された複合体から候補ＦｃＲｎ結合抗体を分離して、酸性ｐＨ及び生理的ｐＨの両方でＦｃＲｎに結合する抗体を得るステップと、
（ｋ）ＦｃＲｎへのアルブミンの結合をブロックする能力について、候補ＦｃＲｎ結合抗体を分析するステップと、を含む。

【００９２】
一部の実施形態においては、候補ＦｃＲｎ結合抗体のコレクションは、抗体またはそれらの部分のライブラリ（例えば、ファージ上に提示されたｓｃＦｖのライブラリ）であり得る。

【００９３】
一部の実施形態においては、ＦｃＲｎまたはその一部の濃度は、各接触ステップで減少される。例えば、ステップ（ｂ）は２５ｎＭの濃度で行われ、ステップ（ｅ）は２．５ｎＭの濃度で行われ、ステップ（ｈ）は０．２５ｎＭの濃度で行ってもよい。

【００９４】
一部の実施形態においては、ＦｃＲｎまたはその一部は、固体支持体、例えば電磁ビーズに結合し得る。かかる実施形態においては、単離ステップは、例えば、固体支持体がクロマトグラフィーカラムである場合に、固体支持体に結合するＦｃＲｎまたはその一部への単純な抗体の結合であり得る。一部の実施形態においては、ＦｃＲｎまたはその一部は、ＦｃＲｎまたはその一部と抗体との間の複合体の単離を促進する部分に結合し得る。例えば、ＦｃＲｎまたはその一部は、ビオチンに結合し得る。

【００９５】
本明細書に記述される抗体またはそれらの抗原結合部分物理的性質及び機能的性質は、通常の手順により決定することができる。例えば、抗体のＦｃＲｎ－アルブミン相互作用をブロックする能力を、多くの方法により評価することができる。かかる方法としては、抗体によりＦｃＲｎへの結合からブロックされたアルブミンの量を試験するｉｎ　ｖｉｖｏアッセイ、アルブミンとの結合について競合する既知のＦｃＲｎ抗体に対する競合アッセイ、または抗体の投与に起因するアルブミン分泌の量を調べるｉｎ　ｖｉｖｏアッセイが挙げられる。

【００９６】
ＦｃＲｎとアルブミンとの間の結合の破壊を検出する種々の方法のいずれか、例えばＵ．Ｓ．８，２３２，０６７に記載されているものを使用してよく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、蛍光共鳴エネルギー移動（「ＦＲＥＴ」）またはクロマトグラフィー法が使用され得る。ある場合には、タンパク質－タンパク質相互作用は、酵素、例えばβ－ガラクトシダーゼのドメインを再構成することによって検出することができる（Ｒｏｓｓｉ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９４：８４０５－８４１０（１９９７）参照）。一部の実施形態においては、ＦｃＲｎとアルブミンとの相互作用を妨害する抗体もしくは抗原結合フラグメントの試験、またはＦｃＲｎの結合が欠損している変異体アルブミンポリペプチドの試験は、動物モデルで行うことができる。例えば、抗体または抗原結合フラグメントによるＦｃＲｎポリペプチドとアルブミンポリペプチドとの間の破壊を測定する方法は、対象、例えば実験動物（例えば、哺乳動物）に抗体または抗原結合フラグメントを投与して抗体または抗原結合フラグメントを有するＦｃＲｎポリペプチド及びアルブミンポリペプチドを発現すること、ならびに対象

の体液におけるアルブミンポリペプチドのレベルを測定することを含み、ここで、抗体または抗原結合フラグメントの非存在下で動物の体液中に存在し得るアルブミンポリペプチドのレベルと比較して、抗体または抗原結合フラグメントの存在下での対象の体液中のアルブミンポリペプチドのレベルの差は、試験化合物がＦｃＲｎポリペプチドとアルブミンポリペプチドとの間の相互作用を破壊することを示す。一部の実施形態においては、本明細書に開示の１つ以上の方法に従い使用される動物は、遺伝子導入動物であり得る。例えば、本明細書に開示の１つ以上の方法に従い使用される動物は、ＦｃＲｎ、アルブミン、または両方を発現するように遺伝子導入され得る。一部の実施形態においては、動物はヒトＦｃＲｎ、アルブミン、または両方を発現するように遺伝子導入され得る。

【００９７】

本明細書に開示される抗体が結合するヒトＦｃＲｎの特定の領域またはエピトープは、当該技術分野で公知の任意の好適なエピトープマッピング方法によって同定することができる。かかる方法としては、ＦｃＲｎのどのアミノ酸に抗体が結合するかを同定するために、抗体への結合について様々な長さのペプチドをＦｃＲｎから選別することが挙げられる。ペプチドは、ＦｃＲｎのタンパク質消化または化学合成のような周知の方法によって製造することができる。質量分析などの技術も、抗体に結合するペプチドを同定するために使用してもよい。あるいは、ＮＭＲ分光法またはＸ線結晶解析を用いることができる。同定されると、ＦｃＲｎの同じエピトープに結合する更なる抗体を得るために、結合ペプチドを免疫原として使用することができる。

【００９８】

本明細書に記述される抗ＦｃＲｎ抗体またはそれらの抗原結合部分は、予防または治療の目的で哺乳動物において使用される場合、医薬的に許容される担体を更に含む組成物の形態で投与されることが理解される。好適な医薬的に許容される担体としては、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、ヒスチジン、グルタミン酸、クエン酸、マンニトール、トレハロース、スクロース、アルギニン、アセテート、ポリソルベート８０、ポロクサマー１８８などの１つ以上、及びそれらの組み合わせが挙げられる。医薬的に許容される担体としては、少量の補助物質（例えば、抗体の貯蔵寿命または有効性を高める湿潤剤または乳化剤、保存剤または緩衝剤）が更に挙げられる。

【００９９】

一部の実施形態においては、抗体及び医薬的に許容される担体を含む組成物は凍結乾燥される。

【０１００】

抗体及び医薬的に許容される担体を含む組成物は、様々な濃度で、本明細書に記述される抗ＦｃＲｎ抗体またはそれらの抗原結合部分を含み得る。例えば、組成物は１０ｍｇ／ｍｌ～２００ｍｇ／ｍｌ、２５ｍｇ／ｍｌ～１３０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ～１２５ｍｇ／ｍｌ、７５ｍｇ／ｍｌ～１１０ｍｇ／ｍｌ、または８０ｍｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌで抗体を含み得る。また、組成物は約１０ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、６０ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍｌ、８０ｍｇ／ｍｌ、９０ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｇ／ｍｌ、１１０ｍｇ／ｍｌ、１２０ｍｇ／ｍｌ、１３０ｍｇ／ｍｌ、１４０ｍｇ／ｍｌ、または１５０ｍｇ／ｍｌで抗体を含み得る。

【０１０１】

「アルブミン結合毒素」は、アルブミンに結合する化合物、薬剤、または分子を指す。一部の状況下では、対象におけるアルブミン結合毒素の濃度を低下させることが望ましい可能性があるが、この用語は、「毒素」として標識されているかまたは一般に理解されている化合物、薬物または分子に限定されない。また、この用語は外因性毒素と内因性毒素との両方も含み得る。アルブミン結合毒素としては、例えば、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェ

ン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、キニジン、リシン、アミオダロン、及びアセトアミノフェンが挙げられる。

【０１０２】

一実施形態においては、対象におけるアルブミン結合毒素のレベルを低下させる方法であって、対象にアルブミン結合毒素のレベルを低下させるのに有効な量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は外因性または内因性であり得る。実施形態においては、アルブミン結合毒素は、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、キニジン、リシン、アミオダロン、またはアセトアミノフェンである。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素はアセトアミノフェンであり得る。アルブミン結合毒素がアセトアミノフェンであり得る他の実施形態においては、方法は、同時に、別々に、または連続的にＮ－アセチルシステインを投与することを更に含み得る。

【０１０３】

別の実施形態においては、対象において、毒素への曝露を予防、治療、阻害、またはその重篤度を減少させる方法であって、対象に有効量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素は外因性または内因性であり得る。実施形態においては、毒素は、銅、ヘマチン、長鎖脂肪酸、亜鉛、ビリルビン、チロキシン、エイコサノイド、トリプトファン、ビタミンＤ３、胆汁酸、カルシウム、マグネシウム、塩化物、インドメタシン、ブロモフェノールブルー、サリチレート、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジゴキシン、フロセミド、フェニトイン、クロルプロパミド、ベンジルペニシリン、エバンスブルー、ジアゼパム、イブプロフェン、ナプロキセン、クロフィブレート、クロルプロマジン、イミプラミン、キニジン、リシン、アミオダロン、またはアセトアミノフェンである。一部の実施形態においては、アルブミン結合毒素はアセトアミノフェンであり得る。アルブミン結合毒素がアセトアミノフェンであり得る他の実施形態においては、方法は、同時に、別々に、または連続的にＮ－アセチルシステインを投与することを更に含み得る。

【０１０４】

本明細書に記載の方法は、例えば、過量投与（例えば、偶発的もしくは意図的な曝露もしくは摂取から、ヒトもしくは動物の健康にとって安全と考えられるレベルを超えた毒素の量まで）により、または対象における内因的に高レベルアルブミン結合毒素（例えば、ヒトもしくは動物の健康に正常で安全と考えられるよりも高レベルの毒素を産生する対象に由来する）によるアルブミン結合毒素に関連する（例えば、かかる毒素の毒性量を有する）疾患を治療するための方法を含む。

【０１０５】

本明細書では、アルブミン毒性に関連する医学的病態を予防または治療する方法であって、対象に有効量の、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法が提供される。本明細書で用いられる「アルブミン毒性」は、アルブミンが有害または弊害をもたらすと考えられ、例えば死、臓器損傷または神経的損傷をもたらし得る状態を指す。一部の実施形態においては、医学的病態は、冠動脈アテローム性硬化症及び末梢血管疾患である。一部の実施形態においては、医学的病態は、糖尿病性血管合併症である。一部の実施形態においては、医学的病態は、アルツハイマー病である。一部の実施形態においては、医学的病態は、外傷性脳障害である。一部の実施形態においては、医学的病態は、糖尿病である。一部の実施形態においては、医学的病態は、末期腎不全である。

【０１０６】

本明細書に記載の方法においては、本明細書に記述される治療有効量の抗体またはそれらの抗原結合部分を、他の作用剤、薬剤またはホルモンと組み合わせて（例えば、同時に、連続的に、または別々に）投与することができる。一部の実施形態においては、他の作用剤、薬剤、またはホルモンはそれぞれの医学的病態用の周知の治療法であり得る。一部の実施形態においては、周知の治療法は標準治療であり得る。例えば、アルブミン結合毒素がアセトアミノフェンである、対象におけるアルブミン結合毒素のレベルを低下させる方法または対象における毒素への曝露の重篤度を予防、治療、阻害、もしくは軽減する方法の一部の実施形態において、方法はＮ－アセチルシステインを同時に、別々に、または連続的に投与することを更に含み得る。

【０１０７】

一部の実施形態においては、アルブミン低下剤でＦｃＲｎをブロックすることは、内因性アルブミンレベルを低下させるのに有益であり、アルブミンベースの治療剤の薬物動態及び薬力学の増強を可能にする。この場合は、かかる治療剤の投与前にアルブミン結合部位に特異的な抗ＦｃＲｎ抗体を用いた前処理により、内在性アルブミンに由来する競合を低下させ、投与されたアルブミンベースの治療剤の保護を高めることを可能にする。他の実施形態においては、アルブミン結合部位に特異的な抗ＦｃＲｎ抗体を用いた治療は、投与後の血清からアルブミンベースの治療剤を除去するために使用され得る。これは、かかるアルブミンベースの治療薬の処置がもはや望ましくない場合、または治療的に過剰な投与の副作用を減少させる場合に有用であり得る。

【０１０８】

アルブミンは、ＦｃＲｎとのその相互作用に起因して、半減期延長のための、及び薬物の標的化細胞内送達のための候補として研究されてきた。本明細書で用いられる用語「アルブミンベースの治療薬」は、アルブミンに関連する治療薬を指す。アルブミンベースの治療薬は、例えば、共有結合、遺伝的融合、または非共有結合的結合を介してアルブミンと結合し得る（本明細書に参照により全体が組み込まれるＬａｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｉｅｓ（２０１６）４：３参照）。アルブミンとの結合は、投与前に行われてもよく、すなわち、アルブミンベースの治療薬は、外因性アルブミン分子（複数可）と結合する。例えば、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅによって製造され、ＩＩ型糖尿病の治療のためにＥｐｅｒｚａｎ／Ｔａｎｚｅｕｍとして市販されているアルビグルチドは、２つのヒトＧＬＰ－１リピートの組換えヒトアルブミンへの融合によって開発されたＧＬＰ－１レセプターアゴニストである。アルブミンとの結合は、治療薬の投与後に行われてもよく、すなわち、アルブミンベースの治療薬は、内因性アルブミン分子（複数可）と結合する。例えば、Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋによって製造され、Ｉ型糖尿病の治療のためにＬｅｖｅｍｉｒとして市販されているインスリンデテミールは、ミリスチン酸修飾インスリン類似体である。注入時、脂肪酸部分はアルブミンに結合し、経時的に解離し、生物学的利用能及び分布を増強する。アルブミンベースの治療薬の他の例には、Ｌａｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌに記載のリラグルチド、オゾラリズマブ、ＭＴＸ－ＨＳＡ、アドロキソルビシン、ＣＪＣ－１１３４、アルブフェロン、アブラキサン、ＡＢＩ－００８、ＡＢＩ－００９、ＡＢＩ－０１０、９９ｍＴｃ－Ａｌｂｕｒｅｓ、９９ｍＴｃ－Ｎａｎｏｃｏｌｌなどが挙げられる。

【０１０９】

本明細書に記載の方法においては、治療的有効量の、本明細書に記述される抗体またはその抗原結合部分を必要とする哺乳動物に投与する。本明細書で用いられる用語「投与する」は、求められる結果を達成し得る任意の方法によって、本明細書に記述される抗体またはそれらの抗原結合部分を哺乳動物に送達することを意味する。それらは、例えば、皮下、静脈内または筋肉内に投与され得る。本明細書に記述される抗体またはそれらの抗原結合部分は、ヒトへの投与に特に有用であるが、他の哺乳動物に投与することもできる。本明細書で用いられる用語「哺乳動物」は、ヒト、実験動物、飼育動物及び家畜を含むことが意図されるが、これらに限定されない。「治療有効量」は、哺乳動物に投与された場合に、所望の治療効果を生じるのに有効である、本明細書に記述される抗体またはその抗原

結合部分の量を意味する。これは例えば、疾病に応じて、抗体については、０．１、１．０、３．０、６．０、または１０．０ｍｇ／Ｋｇを要求し得る。１５０，０００ｇ／モルの分子量を有するＩｇＧ（２つの結合部位）については、これらの用量は、５Ｌの血液量について約１８ｎＭ、１８０ｎＭ、５４０ｎＭ、１．０８μＭ及び１．８μＭの結合部位に対応する。

【０１１０】

特定の実施形態においては、抗体またはその抗原結合部分は、静脈内注入、すなわち抗体またはその抗原結合部分の哺乳動物の静脈への特定の時間の導入によって哺乳動物に投与される。特定の実施形態においては、時間は約５分、約１０分、約３０分、約１時間、約２時間、約４時間、または約８時間である。

【０１１１】

特定の実施形態においては、抗体またはその抗原結合部分は、皮下送達によって投与され、すなわち、哺乳動物の皮膚の下で、一般的に皮膚を挟んで下にある組織から持ち上げて、それによって形成された皮膚の下の空間に抗体または抗原結合部分を注射することによって投与される。

【０１１２】

特定の実施形態においては、化合物または組成物の用量を、毎日、隔日、数日ごと、３日ごと、週１回、週２回、週３回、または２週に1回、対象に投与する。他の実施形態においては、化合物または組成物の２、３または４用量を、毎日、数日ごと、３日ごと、週１回または２週に１回、対象に投与する。一部の実施形態においては、化合物または組成物の用量（複数可）を、２日間、３日間、５日間、７日間、１４日間、または２１日間投与する。一部の実施形態においては、化合物または組成物の用量を、１か月間、１．５か月間、２か月間、２．５か月間、３か月間、４か月間、５か月間、６か月間、またはそれ以上投与する。一部の実施形態においては、化合物または組成物は、毒素に曝露する前に、それと同時に、またはその後に投与してもよい。

【０１１３】

投与の方法としては、限定されないが、非経口、皮内、硝子体内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、経口、舌下、鼻腔内、脳内、膣内、経皮、経粘膜、経直腸、吸入による、または局所的、特に耳、鼻、目、もしくは皮膚への局所的投与の方法が挙げられる。投与様式は施術者の裁量に委ねられる。多くの場合、投与は血流への化合物の放出をもたらす。

【０１１４】

特定の実施形態においては、化合物を局所的に投与することが望ましい場合がある。これは、限定目的ではないが、例えば局所注入、局所適用によって、注射によって、カテーテルによって、またはインプラントによって達成され得、インプラントは、多孔性、非多孔性またはシアラスティック膜などの膜を含むゼラチン質材料、または繊維のものである。かかる場合において、投与は、化合物を血流中に実質的に放出させることなく、局所組織を選択的に標的とし得る。

【０１１５】

また、例えば、吸入器もしくは噴霧器の使用、及びエアロゾル化剤を用いた配合物の使用、またはフルオロカーボンもしくは合成肺サーファクタントの灌流を介いて肺投与を使用することができる。特定の実施形態においては、化合物は、伝統的な結合剤及びトリグリセリドなどのビヒクルを用いて坐剤として処方される。

【０１１６】

別の実施形態においては、化合物は小胞、特にリポソーム中で送達される（Ｌａｎｇｅｒ，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３；Ｔｒｅａｔ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ，Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｆｉｄｌｅｒ（ｅｄｓ．），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３５３－３６５（１９８９）；Ｌｏｐｅｚ Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ，同上，ｐｐ．３１７－

３２７参照；一般的に同上参照）
【０１１７】
別の実施形態においては、化合物は制御放出系において送達される（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，上記参照，ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８（１９８４）参照）。制御放出系の例は、Ｌａｎｇｅｒ，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３のレビューで論じられ、使用され得る。一実施形態においては、ポンプが使用され得る（Ｌａｎｇｅｒ，上記参照；Ｓｅｆｔｏｎ，１９８７，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１；Ｂｕｃｈｗａｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７；Ｓａｕｄｅｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４参照）。別の実施形態においては、ポリマー材料を使用できる（Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，Ｌａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｗｉｓｅ（ｅｄｓ．），ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ（１９７４）；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ，Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ，Ｓｍｏｌｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｌ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４）；Ｒａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｐｅｐｐａｓ，１９８３，Ｊ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１；また、Ｌｅｖｙ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１９０；Ｄｕｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１；Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５参照）。
【０１１８】
毒性及び治療効果は、例えば、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって測定し、ＬＤ５０（集団の５０％において致死的な用量）及びＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な用量）を決定することができる。ＬＤ５０／ＥＤ５０の間の比として表される用量比は、治療指数として知られている。高い治療指数を示す抗体または抗原結合フラグメントが好ましい。
【０１１９】
ヒトにおける使用のための投薬量範囲の処方は、細胞培養アッセイ及び／または動物研究からのデータから得られ、好ましくは毒性がほとんどまたは全くないＥＤ５０を含む血中濃度の範囲内にある。投与量は、使用される投与形態及び利用される投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。当業者は、治療される患者のタイプ、疾病または疾患の重篤度、以前の治療、患者の一般的な健康状態及び／または年齢、及び存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、患者を効果的に治療するために必要な投薬量及びタイミングに特定の因子が影響を及ぼすことを理解するであろう。また、治療有効量の抗体または抗原結合フラグメントを有する患者の治療は、単一の治療を含むことができ、または一連の治療を含むことができる。
【０１２０】
上記の投与スケジュールは、例示のためにのみ提供されており、限定的であるとみなされるべきではない。当業者は、全ての用量が本発明の範囲内にあることを容易に理解するであろう。
【０１２１】
本明細書に開示された発明の原理の変形が当業者によってなされ得ること、及びそのような変更が本発明の範囲内に含まれることが意図されることが理解され、期待されるべきである。
【０１２２】
本出願を通して、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物は、本発明が属する技術水準をより完全に説明するために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。以下の実施例は本発明を更に説明するが、決して本発明の範囲を限定するものと理解されるべきではない。

【実施例】
【０１２３】
実施例１
可変ドメインのヒト化
ヒトへの投与に好適な重鎖及び軽鎖可変領域を、ＦｃＲｎに結合し、ＦｃＲｎ及びアルブミンの結合をブロックする能力について選択されたマウスモノクローナル抗体に基づいて設計した。マウス抗体は実質的にＦｃＲｎとＩｇＧ　Ｆｃとの結合をブロックしない。既存の抗体構造に基づくモノクローナル抗体のモデルを用いて、ヒト抗体の可変領域フレームワークをヒトＶ領域のセグメントから設計した。潜在的な免疫原性を最小化するため、ヒトＴ細胞エピトープを除去するように設計された特定のフレームワーク位置で選択されたアミノ酸を有するいくつかの変異体を設計した。
【０１２４】
重鎖及び軽鎖Ｖ領域遺伝子は、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）を用いて全長遺伝子に組み立てられた重複オリゴヌクレオチドから構築され、続いて増幅及びクローン化に好適な制限部位の付加が行われた。
【０１２５】
Ｓ２４１Ｐ突然変異を含むヒトＩｇＧ４定常領域を有する３つの重鎖変異体を構築した。変異体はV_H1、V_H3、及びV_H4と命名された。重鎖変異体の可変ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１２、１４及び１６によって表される。重鎖変異体の可変ドメインのオリゴヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号１１、１３及び１５によって表される。図１は３つの変異体のアラインメントを示す。４つの軽鎖変異体を構築し、ヒトκ鎖として発現させた。変異体はＶκ１、Ｖκ２、Ｖκ３、及びＶκ４と命名された。軽鎖変異体の可変ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１８、２０、２２及び２４によって表される。軽鎖変異体の可変ドメインのオリゴヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号１７、１９、２１及び２３によって表される。図２は４つの変異体のアラインメントを示す。
【０１２６】
抗体は、上流のサイトメガロウイルスの即時／初期プロモータ／エンハンサー、免疫グロブリンシグナル配列、及び免疫グロブリン定常領域を有する哺乳動物発現ベクターにＶ領域遺伝子をクローン化することによって全ＩｇＧとして発現させた。ベクターをＨＥＫ　ＥＢＮＡ細胞にトランスフェクトし、発現を定量し、プロテインＡカラムで抗体を精製した。
【０１２７】
ＨＥＫ　ＥＢＮＡ細胞への一過性トランスフェクションによって、３つの重鎖及び４つの軽鎖変異体の１２種類の重鎖－軽鎖の組合せを全て発現させた。抗体をプロテインＡセファロースカラムで精製し、定量した。上記の通り、ＦｃＲｎは主に、低ｐＨでエンドサイトーシスされたアルブミンを捕捉する初期の酸性エンドソームに主に存在する。ＦｃＲｎのアルブミンへの結合をブロックするために、ＦｃＲｎ抗体が、生理的ｐＨ（例えば、ｐＨ７．４）で細胞間環境に曝露されたＦｃＲｎに結合することも望ましい。従って、ＦｃＲｎへの精製された抗体の結合を、競合ＥＬＩＳＡアッセイ（ｐＨ６．０及びｐＨ７．４）で評価した。
【０１２８】
ＥＬＩＳＡのために、Ｎｕｎｃ　Ｉｍｍｕｎｏ　ＭａｘｉＳｏｒｐ　９６ウェル平底マイクロタイタープレートを、アルブミン結合領域とは異なるＩｇＧ結合エピトープに特異的なＦｃＲｎ抗体でｐＨ７．４で一晩プレコートした。翌日、ＰＢＳ　ｐＨ７．４で希釈した組換えヒトＦｃＲｎ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｃ．カタログ番号ＣＴ００９－Ｈ０８Ｈ）１μｇ／ｍｌをウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベートした。３０μｇ／ｍｌ～０．００１８μｇ／ｍｌの試験抗体または対照ＩｇＧ４抗体の４倍希釈系列を、一定濃度のビオチン化親マウス抗体と予め混合し、プレートに加え、３７℃で１時間インキュベートした。ストレプトアビジンＨＲＰ及びＴＭＢ基質を用いて、ビオチン化m

Ａｂの結合を検出した。吸光度を４５０ｎｍで読み取り、結合曲線をプロットした。１２の組み合わせの結合をｐＨ７．４及びｐＨ６．０の両方で試験し、表２に示すように、親抗体との比較によって定量した。

【表２】

表２－相対親和性

変異体	平均力価（μｇ／ｍｌ）	平均相対ＩＣ$_{50}$（キメラ親ＩｇＧ$_4$に対して）	
		ｐＨ　７．４	ｐＨ　６
キメラ親	１０．３０	１	１
$V_H1/V_\kappa1$	２７．９２	０．５１	０．６４
$V_H1/V_\kappa2$	２５．６１	０．２９	０．４５
$V_H1/V_\kappa3$	２７．９３	０．３７	０．５６
$V_H1/V_\kappa4$	２８．００	０．４５	０．７５
$V_H3/V_\kappa1$	３３．０５	１．３９	１．０９
$V_H3/V_\kappa2$	２４．２７	１．２４	０．９０
$V_H3/V_\kappa3$	２４．７６	０．５０	０．５２
$V_H3/V_\kappa4$	２１．５６	０．５８	０．６１
$V_H4/V_\kappa1$	３７．１８	１．０６	１．０６
$V_H4/V_\kappa2$	３８．７１	１．０６	１．０６
$V_H4/V_\kappa3$	３３．９５	１．２４	０．８６
$V_H4/V_\kappa4$	３４．９５	１．３７	０．９９

【０１２９】

実施例２

親和性成熟化

酸性及び生理的ｐＨでの結合親和性を改善するため、ｐＨ６．０及びｐＨ７．４で、重鎖及び軽鎖可変ドメインＣＤＲ３領域を突然変異させ、ｓｃＦｖ形態で選別した。ｓｃＦｖを調製するため、オーバーラップＰＣＲを用いてV_H及びＶκをコードする遺伝子を１５アミノ酸（Ｇ４Ｓ）３リンカーで構築した。ｓｃＦｖ配列を遺伝子３融合タンパク質としてファージミドベクターにクローン化し、ベクターをＥ．ｃｏｌｉ（ＴＧ１）に形質転換した。親和性成熟プロセスは、V_H１及びＶκ１変異体を用いて行った。選別のため、V_H１中の重鎖ＣＤＲ３のライブラリをヒト化親Ｖκ１軽鎖と組み合わせ、Ｖκ１中の軽鎖ＣＤＲ３のライブラリをヒト化親V_H１重鎖と組み合わせた。

【０１３０】

アミノ酸配列の変形形態を、以下：ａ．ａ．９４：Ｋ、Ｒ；ａ．ａ．９５：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９６：Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ，Ｈ、Ｋ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ；ａ．ａ．９７：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ；ａ．ａ．９８：Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ；ａ．ａ．９９：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｙ；ａ．ａ．１００：Ａ、Ｇ、Ｓ、Ｔのようにそれぞれの位置で選択されたアミノ酸を提供する配列ＡＲＧＢＮＳＶＶＳＢＮＣＶＮＣＮＶＣＲＳＣ（配列番号４１）を含むオリゴヌクレオチドを用いて、アミノ酸位置９４～１００（ＣＤＲ３Ｈのａ．ａ．９５～１００及びＦＷ３のａ．ａ．９４）で重鎖ＣＤＲ３Ｈ領域に導入した。アミノ酸配列の変形形態を、以下：ａ．ａ．９４：Ｒ；ａ．ａ．９５：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９６：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９７：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９８：Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ；ａ．ａ．９９：Ａ、Ｇ

、Ｓ、Ｔのようにそれぞれの位置で選択されたアミノ酸を提供する配列ＡＧＧＮＮＳＮＮＳＮＮＳＮＮＳＲＳＣ（配列番号４２）を含むオリゴヌクレオチドを用いて、アミノ酸位置９４～９９（ＣＤＲ３Ｈのａ．ａ．９５～９９及びＦＷ３のａ．ａ．９４）で重鎖ＣＤＲ３Ｈ領域に導入した。

【０１３１】

各ＣＤＲについて、約３～６×１０^{6}個のＤＮＡ配列（すなわち、各ＤＮＡ配列の約１０～２０コピーが示された）を含む約５～１０×１０^{7}のファージのライブラリを、可溶性抗原への結合について選別した。具体的には、ファージライブラリーを可溶性ビオチン化ＦｃＲｎと混合し、続いてストレプトアビジン被覆ビーズ上のＦｃＲｎ－抗体ファージ複合体の捕捉を行った。酸性エンドソームにおいて、及び生理的ｐＨでＦｃＲｎに結合する抗体を得るために、交互のｐＨで連続的なラウンドのライブラリ選別を行った。また、各連続選別ラウンドのストリンジェンシーを増加させるために、ＦｃＲｎ抗原の濃度を減少させた。最初の選択ラウンドは、ｐＨ６．０で２５ｎＭのＦｃＲｎ濃度で行った。２ラウンド目は、ｐＨ７．４で２．５ｎＭで行った。３ラウンド目は、ｐＨ６．０で０．２５ｎＭで行った。３ラウンド目の間、ｐＨ６．０で０．２５ｎＭで「オフレート」選択を行った。４ラウンド目は、ｐＨ７．４で０．１ｎＭで行った。

【０１３２】

ｓｃＦｖ抗体は、細菌ペリプラズム抽出物から調製し、ｐＨ６．０及びｐＨ７．４の競合ＥＬＩＳＡによって試験した。４１００超のｐＨ６．０で解析したペリプラズム調製物のうち、ｐＨ７．４での更なる分析のため、９９を選択した。競合ＥＬＩＳＡにおいて、ｓｃＦｖ抗体フラグメントを、固定化ＦｃＲｎへの結合について、ＦｃＲｎ－アルブミン相互作用をブロックすることが以前に示されたビオチン化親マウス抗体と競合させた。ヒト化変異体を試験するために使用したＥＬＩＳＡと同様に、９６ウェル平底マイクロタイタープレートに、アルブミン結合領域とは異なるＩｇＧ結合エピトープに特異的な１μｇ／ｍｌのＦｃＲｎ抗体をプレコートした。結合はｐＨ７．４及びｐＨ６．０で同定した。図３は、親ｓｃＦｖ（すなわち、V_H１／Ｖκ１からなる）に関するｐＨ６．０及びｐＨ７．４での競合ＥＬＩＳＡの比較を示す。

【０１３３】

V_H１フレームワークにおいて、親和性成熟重鎖ＣＤＲ３を含むｓｃＦｖについて結合の実質的な改善を測定した。従って、これらの重鎖は、改善された軽鎖と組み合わせて試験するため進めた。改良された変異体は、Ｖκ３フレームワークにおいて親和性成熟軽鎖ＣＤＲ３を含むｓｃＦｖについて同定されなかった。

【０１３４】

実施例３

ＩｇＧ抗体の開発

２１の親和性成熟重鎖（Ｇ０３＿Ｂ２、Ｇ１５＿Ｃ１０、Ｇ１５＿Ｃ３、Ｇ１５＿Ｂ７、Ｇ０２＿Ｆ４、Ｇ２４＿Ｃ１１、Ｇ１９＿Ｆ８、Ｇ４７＿Ｂ１０、Ｇ４７＿Ｈ１１、Ｇ４７＿Ｈ６、Ｇ４８＿Ｇ１０、Ｇ４８＿Ｅ３、Ｇ４９＿Ｆ１１、Ｇ５０＿Ｂ１０、Ｇ５０＿Ｇ５、Ｇ５０＿Ｃ１０、Ｇ５４＿Ｄ１１、Ｇ５２＿Ｇ９、Ｇ５１＿Ｈ６、Ｇ４９＿Ｈ９．３、またはＧ４９＿Ｈ９．５）を選択し、ヒト化軽鎖（Ｖκ３）と発現させた。２１種の組み合わせを、ＨＥＫ細胞の一過性トランスフェクションによるＳ２４１Ｐ突然変異を含む二価ＩｇＧ４抗体として発現させ、続いてＩｇＧ４抗体を精製した。

【０１３５】

実施例４

ＥＬＩＳＡによって同定されるＩｇＧ４抗体の抗原結合特性

ＩｇＧ４抗体を、ｐＨ６．０及びｐＨ７．４の競合ＥＬＩＳＡにおいて抗原結合について試験した。Ｎｕｎｃ　Ｉｍｍｕｎｏ　ＭａｘｉＳｏｒｐ　９６ウェル平底マイクロタイタープレート（Ｆｉｓｈｅｒ，カタログ番号ＤＩＳ－９７１－０３０Ｊ）に、アルブミン結合領域とは異なるＩｇＧ結合エピトープに特異的な１μｇ／ｍｌのＦｃＲｎ抗体で、ｐＨ７．４で一晩プレコートした。翌日、ｐＨ７．４のＰＢＳで希釈した組換えヒトＦｃＲｎ（

Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｃ．カタログ番号ＣＴ００９－Ｈ０８Ｈ）１μｇ／ｍｌをウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベートした。プレートをｐＨ７．４のＰＢＳＴで３回洗浄した後、プレートをｐＨ７．４のＰＢＳＭで１時間ブロックした。この点以降、選択されたアッセイｐＨ（ｐＨ６．０または７．４）で全ての洗浄及びインキュベーションステップを実施した。ＰＢＳＴで３回洗浄した後、２５μｇ／ｍｌ～０．００６μｇ／ｍｌの最終濃度の試験抗体の４倍希釈系列を、一定濃度のビオチン化親マウス抗体（最終濃度０．４μｇ／ｍｌ）と予め混合し、ＦｃＲｎでコーティングしたプレートに加え、３７℃で１時間インキュベートした。３回のＰＢＳＴ洗浄後、ビオチン化ｍＡｂの結合をストレプトアビジン－ＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ，カタログ番号Ｓ５５１２）及びＴＭＢ基質（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，カタログ番号００－２０２３）で検出した。反応を３ＭのＨＣｌで停止させ、Ｄｙｎｅｘ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＭＲＸ ＴＣ ＩＩプレートリーダーで吸光度を４５０ｎｍで読み取り、結合曲線をプロットした。４つの抗体（Ｇ０２＿Ｆ４V_H１＿Vκ３、Ｇ２４＿Ｃ１１V_H１＿Vκ３、Ｇ１９＿Ｆ８V_H１＿Vκ３、Ｇ４７＿Ｂ１０V_H１＿Vκ３）のデータの例を、ｐＨ７．４でのものを図４（ａ）に、ｐＨ６．０でのものを図４（ｂ）に示す。得られた全結果を表３に要約する。表３は、ｐＨ７．４及びｐＨ６．０で行った実験の平均相対ＩＣ５０値及び実験の数（ｎ）を示す。組み合わせのＩＣ５０値を、同じプレートで試験したヒト化親抗体に対して正規化した。

【表３】

表３－相対親和性

変異体	平均相対IC_{50}（ヒト化親に対する）	
	ｐＨ ７．４	ｐＨ ６
V_H1／V_κ1	1	1
Ｇ０３＿Ｂ２／V_κ３	４．３	９．１
Ｇ１５＿Ｃ１０／V_κ３	０．６	０．７
Ｇ１５＿Ｃ３／V_κ３	０．８	０．９
Ｇ１５＿Ｂ７／V_κ３	２．０	８．２
Ｇ０２＿Ｆ４／V_κ３	０．８	０．６
Ｇ２４＿Ｃ１１／V_κ３	２．６	１．５
Ｇ１９＿Ｆ８／V_κ３	０．９	０．７
Ｇ４７＿Ｂ１０／V_κ３	０．６	０．６
Ｇ４７＿Ｈ１１／V_κ３	１．５	１．０
Ｇ４７＿Ｈ６／V_κ３	０．７	０．８
Ｇ４８＿Ｇ１０／V_κ３	２．４	１．０
Ｇ４８＿Ｅ３／V_κ３	３．６	２．３
Ｇ４９＿Ｆ１１／V_κ３	１．５	１．０
Ｇ５０＿Ｂ１０／V_κ３	１．１	１．０
Ｇ５０＿Ｇ５／V_κ３	１．２	０．９
Ｇ５０＿Ｃ１０／V_κ３	０．７	０．９
Ｇ５４＿Ｄ１１／V_κ３	０．８	０．６
Ｇ５２＿Ｇ９／V_κ３	０．８	０．８
Ｇ５１＿Ｈ６／V_κ３	２．９	２．３
Ｇ４９＿Ｈ９．３／V_κ３	０．７	０．８
Ｇ４９＿Ｈ９．５／V_κ３	１．０	０．８

【０１３６】

ｐＨ６．０またはｐＨ７．４のいずれかでヒト化親と同等またはそれよりも良好な活性を有する１４の組み合わせを同定し、ＮＳ０マウス骨髄腫細胞への安定なトランスフェクションのために進めた。

【０１３７】
実施例５
抗体の安定な発現及び精製
ヒト化親（すなわち、V_H１／V_K１からなる）と同等またはそれよりも良好な活性を有する１４のＩｇＧ組み合わせ（Ｇ１５＿Ｃ１０／V_K３、Ｇ１５＿Ｃ３／V_K３、Ｇ０２＿Ｆ４／V_K３、Ｇ１９＿Ｆ８／V_K３、Ｇ４７＿Ｂ１０／V_K３、Ｇ４７＿Ｈ６／V_K３、Ｇ４９＿Ｆ１１／V_K３、Ｇ５０＿Ｂ１０／V_K３、Ｇ５０＿Ｇ５／V_K３、Ｇ５０＿Ｃ１０／V_K３、Ｇ５４＿Ｄ１１／V_K３、Ｇ５２＿Ｇ９／ V_K３、Ｇ４９＿Ｈ９．３／V_K３、またはＧ４９＿Ｈ９．５／V_K３）をコードするｐＡｎｔベクターＤＮＡを、電気穿孔によって安定にＮＳ０マウス骨髄腫細胞へトランスフェクションした。加えて、好適なヒト化抗体、V_H１／V_K３を含んだ。安定なトランスフェクションは、２００ｎＭのメトトレキセートを用いて最初に選択したが、これは増殖の間に５００ｎＭに増加した。各コンストラクトについてのメトトレキセート耐性コロニーを、ＩｇＧ４　ＥＬＩＳＡを用いてＩｇＧ発現レベルについて試験し、最良の発現系を選択し、液体窒素下で増殖させ、凍結させた。成功したトランスフェクション及び安定したクローン選択は、１４種のヒト化変異体全てに加えてV_H１／V_K３で達成された。
【０１３８】
抗体をプロテインＡセファロースカラム上の細胞培養上清から精製し、緩衝液をｐＨ７．２のＰＢＳに交換し、予想されるアミノ酸配列に基づく吸光係数を用いてＯＤ２８０ｎｍで定量した。
【０１３９】
ヒト化親和性成熟抗体のＦｃＲｎへの結合を、上記の競合ＥＬＩＳＡによってｐＨ７．４及びｐＨ６．０の両方で試験し、キメラ親と比較した。ＮＳ０産生ヒト化親和性成熟ＩｇＧを、一時的に発現するＨＥＫ細胞から精製したＧ５０＿Ｃ１０／V_K３以外の全てのアッセイに使用した。ｐＨ６．０でのデータの例を図５に示し、ｐＨ７．４でのデータの例を図６に示す。データを以下の表４に要約する。
【表４】

表４－相対親和性

変異体	平均相対Ic_{50}（ヒト化親に対する）	
	ｐＨ　７．４	ｐＨ　６
V_H１／V_K３	１	１
Ｇ１５＿Ｃ１０／V_K３	０．９８	０．７８
Ｇ１５＿Ｃ３／V_K３	０．８０	０．６８
Ｇ０２＿Ｆ４／V_K３	１．１０	０．９５
Ｇ１９＿Ｆ８／V_K３	１．１９	０．７６
Ｇ４７＿Ｂ１０／V_K３	０．７４	０．５８
Ｇ４７＿Ｈ６／V_K３	０．８９	０．８４
Ｇ４９＿Ｆ１１／V_K３	１．３５	０．９８
Ｇ５０＿Ｂ１０／V_K３	１．２９	１．２３
Ｇ５０＿Ｇ５／V_K３	１．６３	０．８４
Ｇ５０＿Ｃ１０／V_K３	０．５４	０．８９
Ｇ５４＿Ｄ１１／V_K３	１．９３	０．６２
Ｇ５２＿Ｇ９／V_K３	０．９２	０．５６
Ｇ４９＿Ｈ９．３／V_K３	０．７３	０．５８
Ｇ４９＿Ｈ９．５／V_K３	０．８７	０．８０

【０１４０】

８つの変異体（Ｇ１５＿Ｃ３／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ４７＿Ｈ６／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ５０＿Ｃ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ５４＿Ｄ１１／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ５２＿Ｇ９／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ４９＿Ｈ９．３／$Ｖ_{Ｋ}$３、及びＧ４９＿Ｈ９．５／$Ｖ_{Ｋ}$３）を、ｐＨ６．０及びｐＨ７．４の両方で改善し、好ましいヒト化変異体と比較した。１つの抗体はｐＨ６．０では改善されたが、ｐＨ７．４では改善されなかった。これらの８つの抗体を、Ｂｉａｃｏｒｅ分析のために進めた。

【０１４１】

実施例６

表面プラズモン共鳴を使用したｍＡｂ結合キネティクスの決定

選択された変異体の結合キネティクスを、Ｔ２００　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔを用いてＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）によってマウスの親及びヒト化親（$Ｖ_{Ｈ}$１／Ｖκ１）と比較した。抗体を、標準的なアミンカップリング化学を用いてシリーズＳ　ＣＭ５センサーチップ表面上に固定化し、表面上に分析物（ＦｃＲｎ）を流した。２倍の希釈範囲を、５０～０．０１ｎＭのＦｃＲｎから選択した。ＦｃＲｎ分析物の結合相を４５０秒間モニターし、解離を２５０または２５００秒間、４０μｌ／分で最初に測定した。$Ｆ_{Ｃ}$１は参照チャネルであり、非特異的結合を補正するために他のフローセルから差し引かれた。$Ｋ_{Ｄ}$における倍数差は、ヒト化親の$Ｋ_{Ｄ}$を同じチップ上の試験抗体の$Ｋ_{Ｄ}$で除して計算した。キネティクス値は１：１結合モデルに基づく（表５）。

【０１４２】

親和性成熟ヒト化抗体Ｇ１５＿Ｃ３／$Ｖ_{Ｋ}$３、Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３、及びＧ５０＿Ｃ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３は、ヒト化親と比較して親和性において有意な改善（平均約７．１～約５０倍の範囲）を示した。Ｇ５０＿Ｃ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３はについて観察された遅いオフレートは、Ｂｉａｃｏｒｅ機器の検出限界に近づいていた。Ｇ５０＿Ｃ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３の解離定数をより正確に決定するために、３つの最良の変異体を再度アッセイして、解離時間を４５００秒に増加させた直接順位比較を提供した。

【表５】

表５－抗ヒトＦｃＲｎ　ｍＡｂの結合キネティクス

ｍＡｂ	F_c	K_a（１／Ｍｓ）	K_d（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）	χ^2	K_Dの倍数差
マウスの親	２	４．７５Ｅ＋０５	１．２９Ｅ－０３	２．７	０．０２	０．９
V_H１／Vκ１	３	４．７７Ｅ＋０５	１．１６Ｅ－０３	２．４３	０．０８	１．０
Ｇ４７＿Ｂ１０／$V_κ$３	４	４．１５Ｅ＋０５	１．３４Ｅ－０４	０．３３	０．０７	７．４
V_H１／Vκ１	２	５．３７Ｅ＋０５	１．１０Ｅ－０３	２．０５	０．０２	１．０
Ｇ１５＿Ｃ３／$V_κ$３	３	６．６８Ｅ＋０５	１．９６Ｅ－０４	０．２９	０．０６	７．１
Ｇ５０＿Ｃ１０／$V_κ$３（ＨＥＫ）	４	３．９９Ｅ＋０５	１．００Ｅ－０５	０．０２５	０．０７	８２
V_H１／Vκ１	２	５．１７Ｅ＋０５	１．０２Ｅ－０３	１．９７	０．０８	１．０
Ｇ５２＿Ｇ９／$V_κ$３	３	４．５５Ｅ＋０５	９．０４Ｅ－０４	１．９９	０．０６	１．０
Ｇ４９＿Ｈ９．３／$V_κ$３	４	５．４７Ｅ＋０５	６．０８Ｅ－０４	１．１１	０．０９	１．８
V_H１／Vκ１	２	４．４７Ｅ＋０５	１．１７Ｅ－０３	２．６１	０．０８	１．０
Ｇ４７＿Ｈ６／$V_κ$３	３	３．８９Ｅ＋０５	８．１４Ｅ－０４	２．０９	０．０５	１．２
Ｇ４９＿Ｈ９．５／$V_κ$３	４	１．５Ｅ＋０５	１．８１Ｅ－０４	１．２１	０．０７	２．２
V_H１／Vκ１	２	４．７２Ｅ＋０５	１．１０Ｅ－０３	２．３４	０．０４	１．０
Ｇ５４＿Ｄ１１／$V_κ$３	３	５．６７Ｅ＋０５	２．１０Ｅ－０３	３．７１	０．０３	０．６
Ｇ５０＿Ｃ１０／$V_κ$３	４	２．９８Ｅ＋０５	２．３４Ｅ－０５	０．０７８	０．０９	３０
Ｇ１５＿Ｃ３／$V_κ$３	２	３．２０Ｅ＋０５	１．２５Ｅ－０４	０．３９	０．０６	－
Ｇ４７＿Ｂ１０／$V_κ$３	３	３．７４Ｅ＋０５	９．１２Ｅ－０４	０．２４	０．１	－
Ｇ５０＿Ｃ１０／$V_κ$３	４	２．８３Ｅ＋０５	１．５４Ｅ－０５	０．０５４	０．１２	－

【０１４３】

更なる試験において、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）は、メーカーによって記載されたアミンカップリング化学を用いてｍＡｂ（約５００～７００共鳴単位）とカップリングされたＣＭ５センサーチップを有するＢｉａｃｏｒｅ　３０００機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて行われた。カップリングは、２μｇ／ｍｌの各タンパク質を１０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ４．５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にアミンカップリングキット（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて注入することにより行った。ランニング緩衝液及び希釈緩衝液として、ＨＢＳ－Ｐ緩衝液ｐＨ７．４（０．０１ＭのＨＥＰＥＳ、０．１５ＭのＮａＣｌ、０．００５％界面活性剤Ｐ２０）またはリン酸緩衝液ｐＨ６．０（６７ｍＭのリン酸緩衝液、０．１５ＭのＮａＣｌ、０．００５％Ｔｗｅｅｎ２０）を使用した

。結合キネティクスは、ｐＨ７．４またはｐＨ６．０の固定化Ａｂ上に、滴定された量の単量体Ｈｉｓタグ付きｈＦｃＲｎ（４００．０～１２．５ｎＭ）を注入することによって決定した。全てのＳＰＲ実験は、２５℃、流速４０μｌ／分で行った。結合データを零点調整し、参照細胞値を差し引いた。結合キネティクスを決定するために、ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア（バージョン４．１）によって提供されるラングミュア１：１配位子結合モデルを使用した。適合の近さは、統計値χ^2によって記述される。

【０１４４】

図７は、（Ａ）ＳＹＮＴ００２ｈ（ヒト化親$V_H1/V_\kappa1$）、（Ｂ）ＳＹＮＴ００２－３（Ｇ１５＿Ｃ３／$V_\kappa3$）、（Ｃ）ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／$V_\kappa3$）、（Ｄ）ＳＹＮＴ００２－１６（Ｇ５０＿Ｃ１０／$V_\kappa3$）、（Ｅ）ＳＹＮＴ００２－１７（Ｇ５４＿Ｄ１１／$V_\kappa3$）、及び（Ｆ）ＳＹＮＴ００２－２１（Ｇ４９＿Ｈ９．３／$V_\kappa3$）について表面プラズモン共鳴により決定された結合会合及び解離のプロットを示す。キネティクス速度定数は、以下の表６に示される。キネティクス速度定数は、単純な一次（１：１）ラングミュア二分子相互作用モデルを用いて得られた。キネティクス値は、重複の平均を表す。χ^2（カイ二乗）値は、使用された結合モデルへの適合を表す。

【表６】

表６－抗ヒトＦｃＲｎ　ｍＡｂの結合キネティクス

ｍＡｂ	K_a（１／Ｍｓ）	K_d（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）	χ^2
ｐＨ　７．４				
$V_H1/V_\kappa1$	１．７±０．１Ｅ＋０５	５．１±０．１Ｅ－０３	３０．０	５．０
Ｇ１５＿Ｃ３／$V_\kappa3$	０．９±０．２Ｅ＋０５	０．７±０．０Ｅ－０３	７．８	４．０
Ｇ４７＿Ｂ１０／$V_\kappa3$	１．５±０．１Ｅ＋０５	０．６±０．０Ｅ－０３	４．０	０．９
Ｇ５０＿Ｃ１０／$V_\kappa3$	１．２±０．１Ｅ＋０５	０．００００８±０．０Ｅ－０３	０．００００６６	０．６
Ｇ５４＿Ｄ１１／$V_\kappa3$	２．２±０．１Ｅ＋０５	７．５±０．０Ｅ－０３	３４．０	５．０
Ｇ４９＿Ｈ９．３／$V_\kappa3$	１．８±０．１Ｅ＋０５	１．８±０．１Ｅ－０３	１０．０	３．９
ｐＨ　６．０				
$V_H1/V_\kappa1$	４．５±０．５Ｅ＋０５	１．３±０．１Ｅ－０３	２．８	１１．７
Ｇ１５＿Ｃ３／$V_\kappa3$	２．７±０．１Ｅ＋０５	０．２±０．０Ｅ－０３	０．７	２７．０
Ｇ４７＿Ｂ１０／$V_\kappa3$	３．５±０．２Ｅ＋０５	０．２±０．１Ｅ－０３	０．６	５．５
Ｇ５０＿Ｃ１０／$V_\kappa3$	１．１±１．０Ｅ＋０５	０．０４７±０．２Ｅ－０３	０．４	２．１
Ｇ５４＿Ｄ１１／$V_\kappa3$	５．９±０．３Ｅ＋０５	０．８±０．１Ｅ－０３	１．６	３６．０
Ｇ４９＿Ｈ９．３／$V_\kappa3$	５．３±０．３Ｅ＋０５	０．９±０．０Ｅ－０３	１．７	２０．０

【０１４５】

結果は、全ての抗体が、両方のｐＨ条件で異なる動態でヒトＦｃＲｎに結合することを示

す。親和性成熟変異体は、ｐＨ６．０でのみ改善されたＧ５４＿Ｄ１１／$Ｖ_{Ｋ}$３を除いて、ヒト化親と比較して両方のｐＨ条件で改善された親和性でヒトＦｃＲｎに結合した。

【０１４６】

実施例７

アルブミンクリアランス試験

トランスジェニックマウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏ試験を実施して、アルブミンクリアランスに対する抗ＦｃＲｎ抗体の効果を調べた。０日目に、全てのマウスに、５００ｍｇ／ｋｇのヒトアルブミンを静脈内注射することによって予め負荷した。１日目に、各群のマウス（ｎ＝６）にＰＢＳまたは２０ｍｇ／ｋｇのＧ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３（ＳＹＮＴ００２－８）もしくはＧ５０＿Ｃ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３（ＳＹＮＴ００２－１６）のいずれかを投与した。静脈内注射後、２４時間、３２時間、４８時間、５６時間、７２時間、９６時間、１２０時間及び１４４時間後に各マウスから血液サンプルを採取し、血漿に処理した。アルブミンの血漿濃度をＥＬＩＳＡによって定量した。

【０１４７】

図８Ａは、示された時点における２４時間ベースライン（±標準誤差）に基づいて残存する平均アルブミン％としてプロットされたＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３）及びＳＹＮＴ００２－１６（Ｇ５０＿Ｃ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３）の試験結果を示す。

【０１４８】

図８Ｂは、ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３）がアルブミン異化作用を用量依存的に効果的に増加させることを実証する第２の実験の結果を示す。ＰＢＳ、ＩｇＧ４アイソタイプ対照（２０ｍｇ／ｋｇ）、及び３つの異なる濃度のＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３）（５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ及び２０ｍｇ／ｋｇ）を投与し、結果を２４時間のベースラインと比較して指示された時点で残存するヒトアルブミンの平均パーセンテージ（±ＳＥＭ）の$ｌｏｇ_{１０}$として示す。曲線は、９０％信頼区間を有する非線形回帰分析を示す。これらの曲線±ＳＤの傾きは、一元配置ＡＮＯＶＡ（ｎ＝５～１１；＊Ｐ＝０．０３１；＊＊Ｐ＝０．００６９；＊＊＊Ｐ＝０．０００３；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）によって分析した。

【０１４９】

実施例８

アセトアミノフェン（ＡＰＡＰ）保護試験

トランスジェニックマウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏ試験を行って、アセトアミノフェン（ＡＰＡＰ）肝毒性に対する抗ＦｃＲｎ抗体の保護効果を調べた。そのようにするために、ＦｃｇｒｔＴＧマウスに亜致死量のＡＰＡＰ（４００ｍｇ／ｋｇ）を投与した。ＰＢＳ、標準的な臨床解毒剤Ｎ－アセチルシステイン（ＮＡＣ）（１４０ｍｇ／ｋｇ）、ＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３）（１０ｍｇ／ｋｇ）、またはＩｇＧ４アイソタイプ対照（１０ｍｇ／ｋｇ）を、ＡＰＡＰ投与の２時間後に投与した。血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）レベルを、ＡＰＡＰ投与の６時間後及び８時間後に測定した。

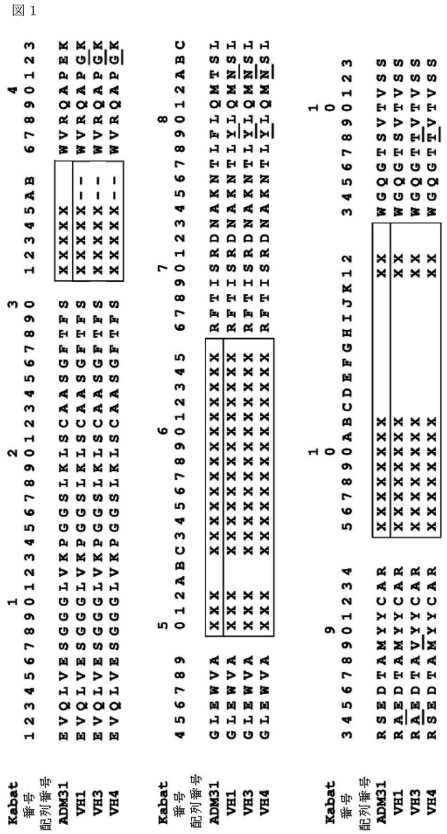
【０１５０】

図９は、１０ｍｇ／ｋｇの用量でのＳＹＮＴ００２－８（Ｇ４７＿Ｂ１０／$Ｖ_{Ｋ}$３）が、対照治療（ｎ＝３～５；＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．００３８；＊＊＊Ｐ＜０．００１）と比較して、ＦｃｇｒｔＴＧマウスに亜致死ＡＰＡＰ投与の２時間後に投与されたＮＡＣによって提供されるものと同等の保護を提供したことを示す。従って、治療的状況において、ＳＹＮＴ００２－８により、現在の標準的な解毒剤であるＮＡＣと同様の範囲への毒素ＡＰＡＰ曝露が保護される。

【図面】

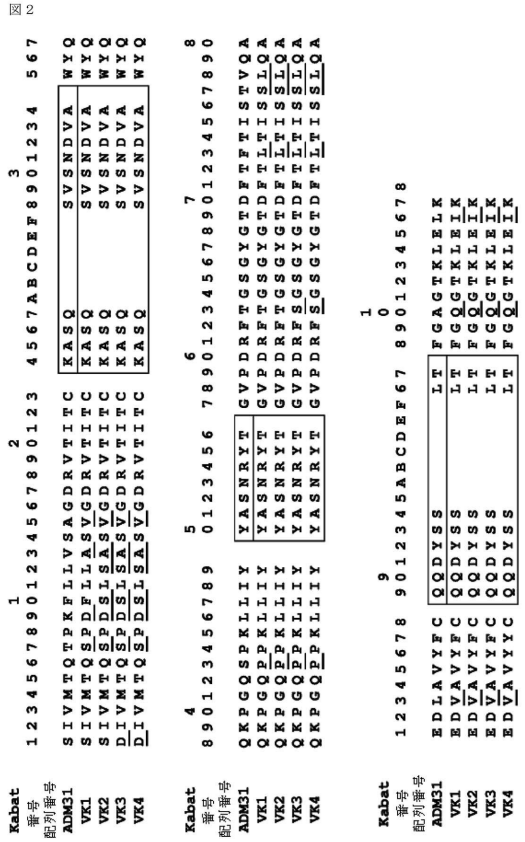
【図１】

図１



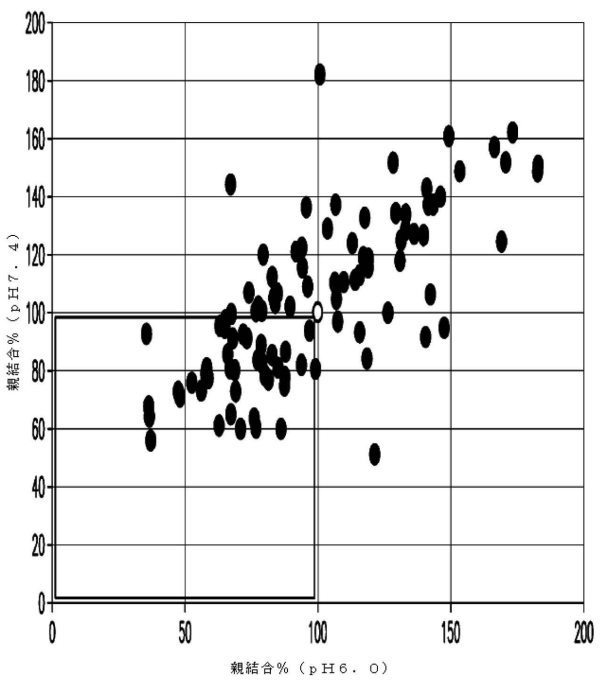
【図２】

図２



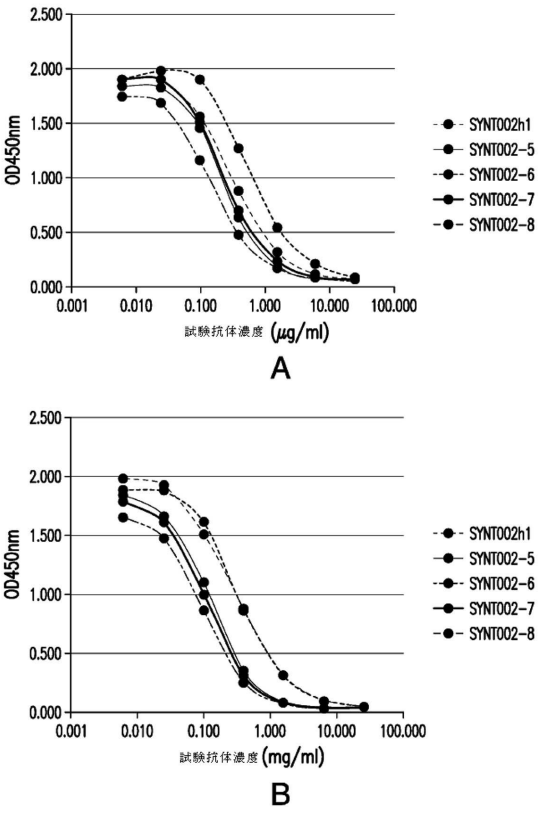
【図３】

図３



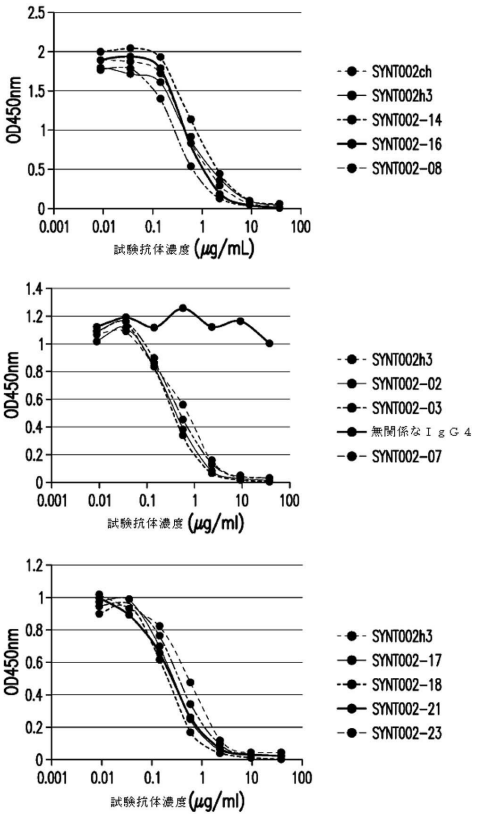
【図４】

図４



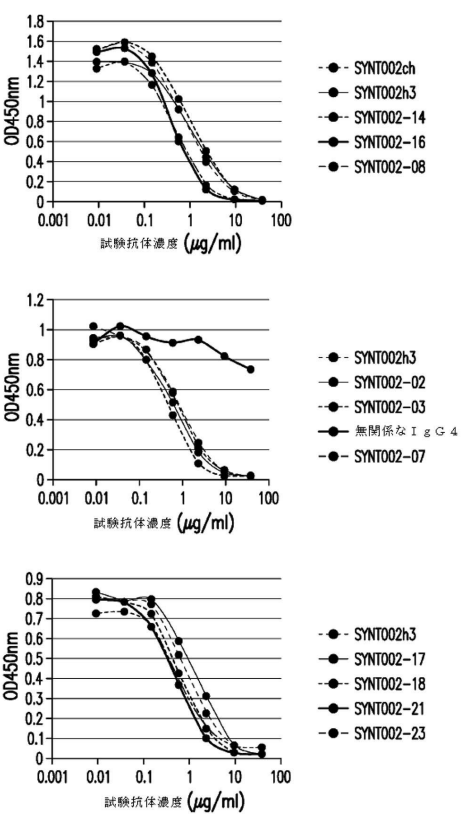
【図５】

図５



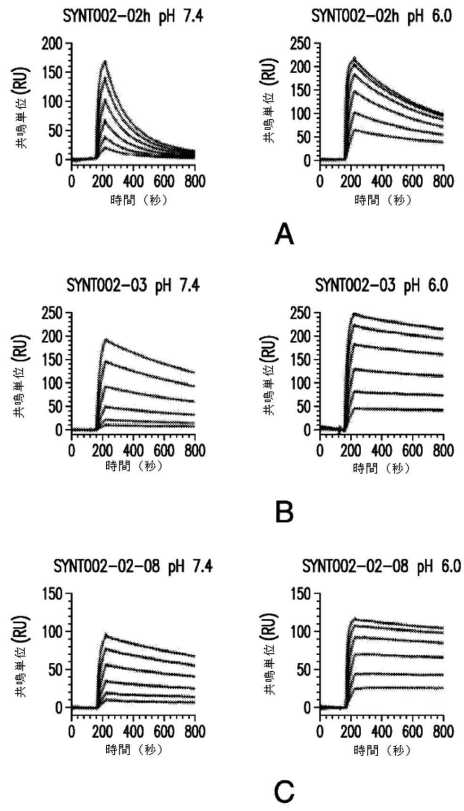
【図６】

図６



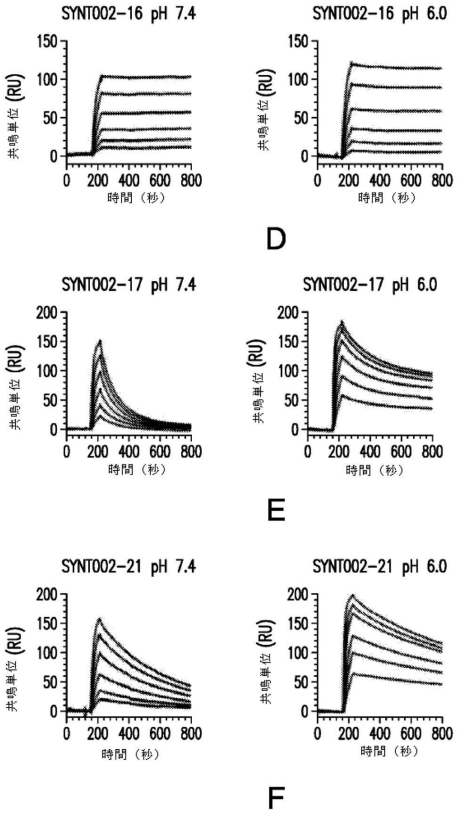
【図７－１】

図７－１



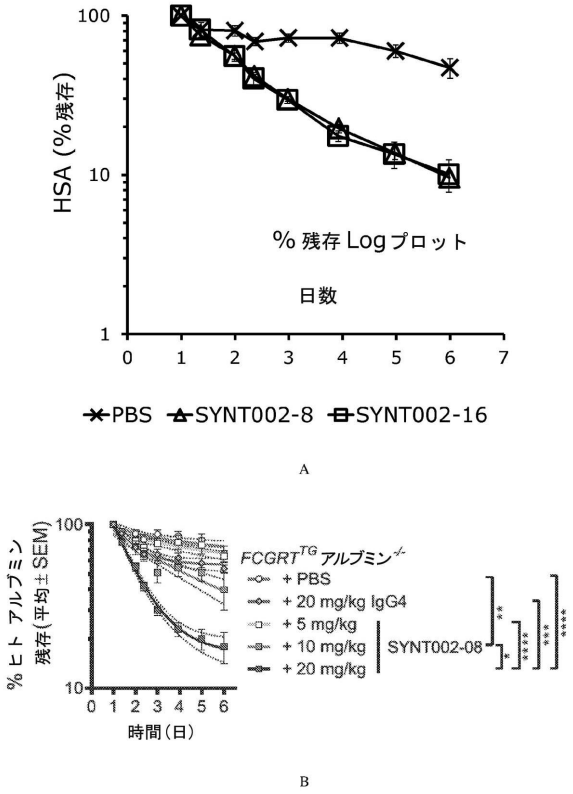
【図７－２】

図７－２



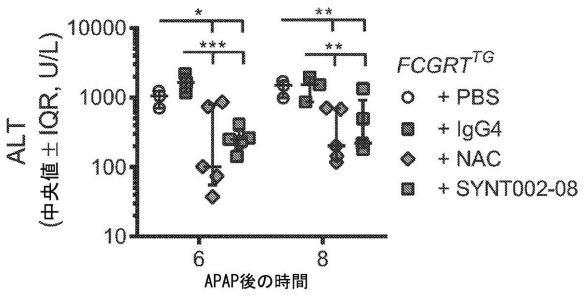
【図８】

図８



【図９】

図９



【配列表】

0007050001000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	N
A61P 9/10 (2006.01)		A61P	9/10	101
A61P 9/00 (2006.01)		A61P	9/00	
A61P 25/28 (2006.01)		A61P	25/28	
A61P 25/00 (2006.01)		A61P	25/00	
A61P 3/10 (2006.01)		A61P	3/10	
A61P 13/12 (2006.01)		A61P	13/12	
A61P 39/02 (2006.01)		A61P	39/02	

弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 ローレンス ジェイ．ブランバーグ
アメリカ合衆国，ニューヨーク １００２４，ニューヨーク，ウエスト エンド アベニュ ４２４，２１ジェイ
(72)発明者 リチャード エス．ブランバーグ
アメリカ合衆国，マサチューセッツ ０２４５１，ウォルサム，フォックス ロード １９５，ユニット １０１
(72)発明者 スーザン ダーナ ジョーンズ
アメリカ合衆国，マサチューセッツ ０２２１０，ボストン，アトランティック アベニュ ５００，ユニット １５ピー
(72)発明者 デリー ルーペニアン
アメリカ合衆国，メイン ０４６７２，サルズベリー コーブ，ローカスト レーン １５
(72)発明者 ロバート ジョージ エドワード ホールゲイト
イギリス国，ロイストン エスジー８ ７ディーディー，ハートフォードシャー，スタンフォード アベニュ ２２
(72)発明者 ティモシー デイビッド ジョーンズ
イギリス国，ケンブリッジ シービー２２ ３エージェイ，ケンブリッジシャー，バブラハム，ブリック ロウ ２７
(72)発明者 アーロン ロバート ハーン
イギリス国，イーリー シービー６ ３ダブリュティー，ケンブリッジシャー，ブルック グローブ ４９
審査官 太田 雄三

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１２／０１０７８４５（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１５／１６７２９３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／０７１３３０（WO，Ａ１）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
Ｃ０７Ｋ １６／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）