

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-537416

(P2013-537416A)

(43) 公表日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 16/00 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 16/00 Z N A	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 P 21/08 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 16/46 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-523624 (P2013-523624)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月11日 (2011. 8. 11)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年4月10日 (2013. 4. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/063857  
 (87) 国際公開番号 W02012/020096  
 (87) 国際公開日 平成24年2月16日 (2012. 2. 16)  
 (31) 優先権主張番号 61/373, 421  
 (32) 優先日 平成22年8月13日 (2010. 8. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506042265  
 メディミュン リミテッド  
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ  
 ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ  
 ランタ パーク, ミルスティン ビルディ  
 ング  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチド及び使用方法

## (57) 【要約】

変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチド及びその使用方法が提供される。いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドは融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドは抗体である。

【選択図】 図1A

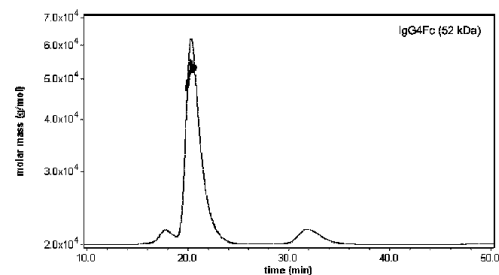


Fig 1A.

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

免疫グロブリン F c 領域を含むポリペプチドであって、該 F c 領域が、F c 領域の二量体形成を阻害する 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、前記ポリペプチド。

**【請求項 2】**

標識特異的結合部分をさらに含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

**【請求項 3】**

前記標的特異的結合部分が、以下：

( i ) 結合して、標的特異的結合部分を形成する免疫グロブリン軽鎖可変領域と免疫グロブリン重鎖可変領域；

( i i ) ドメイン抗体 ( d A b ) ；及び

( i i i ) タンパク質スカフォールド

からなる群から選択される、請求項 2 に記載のポリペプチド。

**【請求項 4】**

前記ポリペプチドが、治療用ポリペプチドに融合した免疫グロブリン F c 領域を含む融合タンパク質である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記ポリペプチドが、モノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

**【請求項 6】**

前記アミノ酸置換が、F c 領域の C H 3 界面内又はその近傍にある、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

**【請求項 7】**

C H 3 界面内又はその近傍にある前記アミノ酸置換が、K a b a t E U 番号付け体系に従う以下のアミノ酸：3 4 7、3 4 9、3 5 0、3 5 1、3 5 2、3 5 4、3 5 6、3 5 7、3 6 0、3 6 2、3 6 4、3 6 6、3 6 8、3 7 0、3 9 0、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4 0 0、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 1 及び 4 3 9 の 1 つ以上での置換である、請求項 6 に記載のポリペプチド。

**【請求項 8】**

1 つ以上のアミノ酸が、以下：

( i ) 陽荷電側鎖を有するアミノ酸；

( i i ) 陰荷電側鎖を有するアミノ酸；

( i i i ) 親水性側鎖を有するアミノ酸；

( i v ) 大きな側鎖を有するアミノ酸

からなる群から選択されるアミノ酸で置換される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

**【請求項 9】**

前記 F c 領域が、I g G 免疫グロブリンに由来する、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

**【請求項 1 0】**

前記 F c 領域が、ヒト I g G 免疫グロブリンに由来する、請求項 9 に記載のポリペプチド。

**【請求項 1 1】**

前記 F c 領域が、マウス I g G 免疫グロブリンに由来する、請求項 1 0 に記載のポリペプチド。

**【請求項 1 2】**

前記 F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 免疫グロブリンに由来する、請求項 9 又は 1 0 に記載のポリペプチド。

**【請求項 1 3】**

前記アミノ酸置換が、K a b a t E U 番号付け体系に従う以下のアミノ酸位置：3 4 9、3 5 1、3 5 4、3 5 6、3 5 7、3 6 4、3 6 6、3 6 8、3 7 0、3 9 2、3 9 4、3 9 9、4 0 5、4 0 7、4 0 9 及び 4 3 9 の 1 つ以上での置換である、請求項 9 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

以下のアミノ酸位置：3 5 1、3 5 6、3 5 7、3 6 4、3 6 6、3 6 8、3 9 4、3 9 9、4 0 5 及び 4 0 7 の 1 つ以上が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

以下のアミノ酸位置：3 4 9、3 5 1、3 9 4、4 0 7 及び 4 3 9 の 1 つ以上が、陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

以下のアミノ酸位置：3 5 7、3 6 4、3 6 6、3 6 8、及び 4 0 9 の 1 つ以上が、大きな側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

以下のアミノ酸位置：3 6 6、4 0 5 及び 4 0 7 の 1 つ以上が、親水性側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8】

アミノ酸位置 4 0 5 が、陽荷電側鎖又は親水性側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

アミノ酸位置 3 5 1 が、陽荷電側鎖又は陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

アミノ酸位置 3 5 7 が、陽荷電側鎖又は大きな側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

アミノ酸位置 3 6 4 が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

アミノ酸位置 3 6 6 が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

アミノ酸位置 3 6 8 が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

アミノ酸位置 3 9 4 が、陽荷電側鎖又は陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 5】

アミノ酸位置 3 9 9 が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 6】

アミノ酸位置 4 0 7 が、陽荷電側鎖又は陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 7】

アミノ酸位置 4 0 9 が、大きな側鎖を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 8】

( i ) 陽荷電側鎖を有する前記アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン及びリシンから選択され；

10

20

30

40

50

( i i ) 陰荷電側鎖を有する前記アミノ酸が、アスパラギン酸及びグルタミン酸から選択され；

( i i i ) 親水性側鎖を有する前記アミノ酸が、グルタミン、アスパラギン、セリン及びトレオニンから選択され；及び

( i v ) 大きな側鎖を有する前記アミノ酸が、トリプトファン、フェニルアラニン及びチロシンから選択される、

請求項 13 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 29】

前記 F c 領域が、以下のアミノ酸置換：L 3 5 1 R、L 3 5 1 D、E 3 5 7 R、E 3 5 7 W、S 3 6 4 R、T 3 6 6 R、L 3 6 8 R、T 3 9 4 R、T 3 9 4 D、D 3 9 9 R、F 4 0 5 R、F 4 0 5 Q、Y 4 0 7 R、Y 4 0 7 D、K 4 0 9 W 及び R 4 0 9 W の 1 つ以上を含む、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 30】

前記 F c 領域が、二量体形成を阻害する少なくとも 2 つのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 31】

前記 F c 領域が、二量体形成を阻害する少なくとも 3 つのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

前記アミノ酸置換が、以下：Y 3 4 9 D、L 3 5 1 D、L 3 5 1 R、S 3 5 4 D、E 3 5 6 R、D 3 5 6 R、S 3 6 4 R、S 3 6 4 W、T 3 6 6 Q、T 3 6 6 R、T 3 6 6 W、L 3 6 8 R、L 3 6 8 W、T 3 9 4 D、T 3 9 4 R、D 3 9 9 R、F 4 0 5 A、F 4 0 5 Q、Y 4 0 7 A、Y 4 0 7 Q、Y 4 0 7 R、K 4 0 9 R、及び K 4 3 9 D からなる群から選択される、請求項 30 又は 31 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 33】

前記 F c 領域が、以下のアミノ酸置換のセット：Y 3 4 9 D / S 3 5 4 D、L 3 5 1 D / T 3 9 4 D、L 3 5 1 D / K 4 0 9 R、L 3 5 1 R / T 3 9 4 R、E 3 5 6 R / D 3 9 9 R、D 3 5 6 R / D 3 9 9 R、S 3 6 4 R / L 3 6 8 R、S 3 6 4 W / L 3 6 8 W、S 3 6 4 W / K 4 0 9 R、T 3 6 6 R / Y 4 0 7 R、T 3 6 6 W / L 3 6 8 W、L 3 6 8 R / K 4 0 9 R、T 3 9 4 D / K 4 0 9 R、D 3 9 9 R / K 4 0 9 R、D 3 9 9 R / K 4 3 9 D、F 4 0 5 A / Y 4 0 7 A、F 4 0 5 Q / Y 4 0 7 Q、及び T 3 6 6 Q / F 4 0 5 Q / Y 4 0 7 Q の 1 つ以上を含む、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 34】

前記ポリペプチドが、欠失したか又は突然変異したヒンジ領域を有する免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 35】

少なくとも 12 個のアミノ酸が、ヒンジ領域から欠失している、請求項 34 に記載のポリペプチド。

【請求項 36】

前記突然変異が、少なくとも 1 つのシステイン残基での欠失又は置換である、請求項 34 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 37】

前記ポリペプチドが、非改変ヒンジ領域を有する免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 38】

前記免疫グロブリン鎖が、完全にヒトである、請求項 5 ~ 37 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 39】

前記免疫グロブリン鎖が、ヒト化されている、請求項 5 ~ 37 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

50

## 【請求項 40】

前記Fc領域が、ヒト免疫グロブリン重鎖に由来する、請求項1～39のいずれか1項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 41】

溶液中に存在する前記ポリペプチドの少なくとも70%が、モノマーである、請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 42】

前記ポリペプチドの少なくとも70%が、*in vivo*条件下でモノマーである、請求項1～41のいずれか1項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 43】

前記モノマーポリペプチドの割合(%)が、SEC-MALLS又はAUCによって決定される、請求項41又は42に記載のポリペプチド。

## 【請求項 44】

請求項1～43のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

## 【請求項 45】

請求項44に記載の核酸分子で形質転換した宿主細胞。

## 【請求項 46】

請求項1～43のいずれか1項に記載のポリペプチドを生産する方法であって、前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項44に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、前記方法。

## 【請求項 47】

請求項1～43のいずれか1項に記載のポリペプチドと、薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物。

## 【請求項 48】

前記組成物中の少なくとも70%のポリペプチドがモノマーである、請求項47に記載の医薬組成物。

## 【請求項 49】

前記モノマーポリペプチドの割合(%)が、SEC-MALLS又はAUCによって決定される、請求項48に記載の医薬組成物。

## 【請求項 50】

医薬剤としての使用を目的とする、請求項48又は49に記載の医薬組成物。

## 【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、2010年8月13日に出願された米国仮特許出願第61/373,421号に対する優先権を請求する。尚、上記文献は、参照としてその全文を本明細書に組み込むものとする。

## 【0002】

## 2. 配列表の参照

本出願は、2011年8月3日に作成され、28,672バイトのサイズを有するテキストファイルMED0585\_PCT\_SL.txtとして本出願と一緒に提出された配列表を参照として組み込むものとする。

## 【0003】

## 3. 発明の分野

本発明は、変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチド及びそれらを使用する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

## 4. 発明の背景

10

20

30

40

50

ネイティブ抗体及び免疫グロブリンは、通常、約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽鎖(L)と2つの同一の重鎖(H)とから構成されている。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されており、また重鎖は互いに連結されているが、ジスルフィド結合の数は、様々な免疫グロブリンイソタイプの重鎖間で変動する。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではV<sub>L</sub>と略記する)と軽鎖定常領域(本明細書ではC<sub>L</sub>と略記する)を含む。各重鎖は、重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)と、重鎖の3つのドメイン、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3からなる重鎖定常領域(C<sub>H</sub>)とを含み、これらは、いわゆるヒンジ領域で互いに隔てられている。ヒンジ領域は、通常、1つ以上のシステイン残基を含み、これらの残基は、抗体分子内の他の重鎖のヒンジ領域のシステイン残基とジスルフィド架橋を形成しうる。抗体は、抗体特異的結合部位を含む可変ドメインと、エフェクター機能に關与する定常領域とを有する。

10

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

#### 5. 発明の概要

本発明は、Fc領域の二量体形成を阻害する1つ以上のアミノ酸置換を有する変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチドに関する。モノマーポリペプチドは、変異型Fc領域に融合した第2ポリペプチド、例えば、治療用タンパク質又は抗体の抗原結合領域をさらに含んでもよい。例示の実施形態において、モノマーポリペプチドは、変異型Fc領域を有する重鎖と軽鎖とを含むモノマー抗体である。

20

#### 【0006】

本発明は、さらに、本発明のモノマーポリペプチドと担体とを含む製剤を提供する。一実施形態では、上記製剤は、薬学的に許容可能な担体を含む治療製剤である。本発明の製剤は、哺乳動物における疾患/病態を治療する、並びに/又は疾患/病態の1つ以上の症状を予防及び/若しくは軽減する上で有用となりうる。製剤は、こうした治療が必要な患者に投与することができ、ここで、製剤は、本発明の1つ以上のモノマーポリペプチドを含んでもよい。別の実施形態では、製剤は、他の治療薬と組み合わせて、モノマーポリペプチドを含んでもよい。

#### 【0007】

本発明はまた、本発明のモノマーポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本発明はさらに、本発明の核酸分子を含む発現ベクターと、本発明の核酸分子で形質転換された宿主細胞も提供する。本発明はさらに、本発明のモノマーポリペプチドを製造する方法であって、前記モノマーポリペプチドの発現に適した条件下で本発明の宿主細胞を培養することを含む、方法も提供する。

30

#### 6. 図面の簡単な説明

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0008】

【図1A】野生型IgG4 Fcドメイン(パネルA)、366位(パネルB)及び407位(パネルC)でのIgG4単一アルギニン突然変異体、並びに366/407二重アルギニン突然変異体(パネルD)について得られたSEC-MALLSプロフィールを示す。野生型構築物は、二量体と一致する分子量を有するが、3つの突然変異体は、有意に低い分子量を有する。時間は、x軸に沿って分で示し、モル質量はy軸に沿ってモル当たりグラムで示す。

40

【図1B】図1Aの続きである。

【図1C】図1Bの続きである。

【図1D】図1Cの続きである。

【図2A】分析した突然変異型IgG4 Fcドメインの選択及び既知野生型二量体(WT)について得られたものとのプロフィールの比較のためのサイズ排除クロマトグラムを示す。パネルAは、野生型二量体(矢印で示す)と類似していると思われるサンプルについて得られた多数の波形を示し、パネルBはモノマー種とさらに共通する特徴を示す突然

50

変異体の収集物を示す。パネルCは、サンプル、すなわち、52 kDaを超える見掛け分子量の突然変異体から、モノマーと一致する分子量（約28 kDa）の突然変異体までについて得られた広範な範囲の保持時間を示す。

【図2B】図2Aの続きである。

【図2C】図2Bの続きである。

【図3A】野生型と、3つのIgGサブクラスのT366/Y407単一及び二重アルギニン突然変異体Fcドメインについての分析SECクロマトグラムを示す。各トレースには名称を付け、カッコ内の数字は、主ピークの中心についての保持時間を分で表す。パネルA及びBは、IgG1及び2 Fcドメインをそれぞれ示し、Y407Rは、いずれのサブクラスについても優勢にモノマーのようであるが、他の突然変異体は、モノマーと二量体の混合集団の兆候を示している。パネルCは、野生型と比較したIgG4突然変異体を示し、すべてのサンプルが、右側に有意に移動して、モノマーサンプルを示す単分散分布を呈している。

10

【図3B】図3Aの続きである。

【図3C】図3Bの続きである。

【図4A】野生型（パネルA）、Y349D（パネルB）及びT394D（パネルC）ヒンジなしIgG4 Fcドメインについての沈降速度分析超遠心分離（SV-AUC）クロマトグラムを示す。野生型構築物の主ピークは、ホモ二量体の予想質量と一致する見掛け分子量を有し、Y349D突然変異体の主ピークの見掛け分子量は、これより低く、モノマー-二量体平衡と一致しており、T394D突然変異体の見掛け分子量は、モノマーと一致している。

20

【図4B】図4Aの続きである。

【図4C】図4Bの続きである。

【図5】16日の期間にわたる野生型IgG4、アグリコシル化一価IgG4及びグリコシル化IgG4の血漿濃度を示す。水平方向の点線は、定量の下限を示している。

【図6A】ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4並びにマウスIgG1、IgG2a及びIgG2bのFcのCH2（パネルA）及びCH3（パネルB）領域のアラインメントを示す。ルーラーの番号付けは、Kabatatに記載されているEUIンデックスに従う（Kabatat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）。図に示したイソタイプ間の違いの他に、ここに示していないが、当該技術分野では周知のアロタイプの違いもある。

30

【図6B】図6Aの続きである。

【発明を実施するための形態】

【0009】

7. 詳細な説明

7. 1 概論

本発明は、変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチド及びそれらを使用する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示の変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチドは、モノマー抗体、モノマー抗体フラグメント又はモノマー融合タンパク質であってよい。本発明の変異型Fc領域を含むモノマーポリペプチドは、本明細書において、本発明のポリペプチドとも称される。

40

【0010】

抗体は、安定な二量体タンパク質である。免疫グロブリン重鎖同士は、ヒンジでは鎖間ジスルフィド結合によって、また、CH3ドメインでは非共有結合的相互作用によって連結されている。これは、ほとんどの条件下でほとんどのIgGサブタイプが安定な二量体抗体を形成するのに十分である。しかし、IgG4抗体は、鎖内及び鎖間ジスルフィド結合を形成して、アーム交換をもたらすことができる（すなわち、重鎖は分離することができる、2つの異なる抗体からの重鎖が対合して、ヘテロ二量体分子を形成することができる

50

）。

#### 【0011】

抗体は、治療用途についての主要な注目分野となっており、多数の抗体薬剤が承認されているか、あるいは、治療薬としての使用について承認を得る過程にある。治療用抗体に望まれる特徴は、治療しようとする具体的病態によって変わりうる。ある用途では、二価の完全長抗体又は二価の抗体フラグメントが最も有利であるが、別の用途では、モノマー抗体フラグメントが有利である。抗体は、抗原特異的結合部位を含む可変ドメインと、エフェクター機能に關与する定常ドメインとを有する。いくつかの適応では、抗原結合だけが求められるが、その場合、例えば、抗体の治療効果は、抗原と、ブロックしないと抗原と結合することができる1つ以上の特定の特異的分子との間の相互作用をブロックすることである。他の適応では、さらに別の効果、例えば、補体活性化を誘導する、Fc受容体に結合する、異化作用から保護する、免疫細胞をリクルートする能力などが求められることがある。こうした用途の場合、抗体分子の他の部分、例えば、定常Fc領域が有利になりうる。

10

#### 【0012】

いくつかの適応では、二量体抗体は、抗体が、Fabフラグメントとして用いられるときアンタゴニストとして作用するにも関わらず、標的抗原に結合すると、望ましくないアゴニスト効果を呈示する可能性がある。場合によっては、この効果は、二価抗体の「架橋結合」に起因すると考えられるが、架橋結合によって標的二量体化が促進され、これによって、次には、特に標的が受容体である場合、活性化が起こりうる。可溶性抗原の場合には、二量体化は、望ましくない免疫複合体を形成しうる。いくつかの適応では、完全長抗体は大きすぎて、要求される標的身体区画を貫通することができないことがあるため、より小さな抗体フラグメント、例えば、モノマー抗体が必要となりうる。場合によっては、抗原との一価結合（例えば、FcRIの場合）がアポトーシスシグナルを誘導しうる。

20

#### 【0013】

候補タンパク質治療薬は、最適な薬物動力学的特性がなかったり、及び/又はエフェクター機能から利益を得ていたりする可能性がある。これらの問題に対処するために、抗体フラグメントのFc領域をタンパク質治療薬に融合してもよい。Fc領域の付加によって、ポリペプチドのエフェクター機能が増強されると共に、ポリペプチドの薬物動力学的特性（例えば、半減期）が改変される可能性がある。さらに、Fc領域への融合により、タンパク質治療薬の二量体の形成されるであろう。Fc領域の二量体化を回避することには、抗体について述べたように、タンパク質融合物の場合と同じ利点がある。

30

#### 【0014】

治療薬としての用途のモノマーポリペプチドの作製を促進する、実質的に又は完全にモノマーである変異型Fcドメインを作製すれば、有利であろう。こうした変異型モノマーFcドメインは、モノマーFc融合タンパク質を製造する目的で、治療用タンパク質に融合させることができる。あるいは、こうした変異型モノマーFcドメインは、一価抗体の作製を可能にし、これによって、前述したように、二量体抗体に関連する望ましくない副作用を回避することができよう。本発明は、これらのユニークかつ有利な特徴を有するモノマー抗体の同定及び特性決定に基づくものである。これらのモノマーポリペプチドについては本明細書で詳しく説明する。

40

#### 【0015】

##### 7.2 用語

本発明について詳しく説明する前に、本発明は、特定の組成物又は製造ステップに限定されないことを理解すべきである。というのも、これらは変わりうるからである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いられているように、単数形「1つ(a、an)」及び「その(the)」は、文面が明らかに他の意味を示すのでない限り、複数の指示物を含むことは留意すべきである。

#### 【0016】

別途記載のない限り、本明細書で用いられるすべての技術及び科学用語は、本発明が関

50



連する分野の当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及び the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、当業者に、本発明で用いられる用語の多くの一般的辞書を提供する。

#### 【0017】

アミノ酸は、本明細書では、一般に知られている3文字略号、又はIUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字略号のいずれかによって表記する。ヌクレオチドも同様に、一般に受け入れられている1文字符号によって表記する。

#### 【0018】

抗体の可変ドメイン、相補性決定領域(CDR)及びフレームワーク領域(FR)におけるアミノ酸の番号付けは、別途記載のない限り、Kabata et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載されているKabata定義に従う。この番号付け体系を用いて、実際の直線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はCDRの縮小、又はこれらへの挿入に応じて、より少ない、又は追加のアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一アミノ酸挿入(Kabataに従い、残基52a)と、重鎖FR残基82の後に挿入残基(例えば、Kabataに従い、残基82a、82b、及び82cなど)を含みうる。残基のKabata番号付けは、所与の抗体について、「基準」Kabata番号付け配列を有する抗体の配列の相同性領域でのアラインメントによって決定することができる。フレームワーク残基の最大アラインメントは、往々にして、Fv領域に用いるために、番号付け体系に「スペーサー」残基の挿入を必要とする。さらに、所与のKabata部位番号でのいくつかの個々の残基の同一性は、種間又は対立遺伝子多様性のために、抗体鎖同士の間で変動しうる。

#### 【0019】

本明細書で用いるように、「Fc領域」という用語は、第1定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を指す。従って、Fc領域は、IgA、IgD及びIgGの最後の2つの定常領域と、IgE及びIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメイン、並びにこれらドメインに対する可変性ヒンジN-末端を指す。IgA及びIgMについては、Fc領域は、J鎖を含みうる。IgGについては、Fc領域は、免疫グロブリンドメインCガンマ2及びCガンマ3(C<sub>2</sub>及びC<sub>3</sub>)、並びにCガンマ1(C<sub>1</sub>)とCガンマ2(C<sub>2</sub>)との間のヒンジを含む。Fc領域の境界は変動しうるが、ヒンジ領域を含むヒトIgG重鎖Fc領域は、一般に残基E216からそのカルボキシル末端までを含むことが定義されている(ここで、番号付けは、Kabataに記載されているEUIンデックスに従う)。本明細書で用いられるように、「ヒンジ領域」とは、IgG1のE216からP230にわたるFc領域の部分を指す(ここで、番号付けは、Kabataに記載されているEUIンデックスに従う)。他のIgGイソタイプのヒンジ領域は、以下の表1に示すのと同じ位置に、重鎖間ジスルフィド結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することによって、IgG1配列とアラインメントすることができる。

#### 【0020】

【表 1】

表 1. ヒト IgG のヒンジ領域のアラインメント

IgG	216	217	218	219	220	221			222	223	224	225	226	227	228		229	230
hIgG1	E	P	K	S	C	D			K	T	H	T	C	P	P		C	P
hIgG2	E	R	K	C	C				V		E		C	P	P		C	P
hIgG3	E	L	K	T	P	L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	[CPEPKSCDT PPPCPR] <sub>x3</sub>	C	P
hIgG4	E	S	K	Y	G						P	P	C	P	S		C	P

10

## 【0021】

本発明で用いるように、「抗体」（また、免疫グロブリンとしても知られる）という用語は、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体など）、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖 F v s ( s c F v )、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、F a b フラグメント、F ( a b ' ) 2 フラグメント、所望の生物活性を呈示する抗体フラグメント（例えば、抗原結合部分）、ジスルフィド結合 F v s ( d s F v )、及び抗イディオタイプ（抗 I d ）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗 I d 抗体など）、細胞内抗体、及びこれらのうちいずれかのエピトープ結合フラグメントを包含する。特に、抗体は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のフラグメント、すなわち少なくとも 1 つの抗原結合部位を含む分子を包含する。免疫グロブリン分子は、どのイソタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A 及び I g Y）、サブイソタイプ（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 4、I g A 1 及び I g A 2）又はアロタイプ（例えば、G m、例えば、G 1 m ( f、z、a 若しくは x )、G 2 m ( n )、G 3 m ( g、b、若しくは c )、A m、E m、及び K m ( 1、2 若しくは 3 ) ) のものであってもよい。抗体は、任意の哺乳動物、例えば、限定するものではないが、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスなど、又はその他の動物、例えば、鳥類（例：ニワトリ）に由来するものでよい。

20

30

## 【0022】

本発明で用いるように、「モノマータンパク質」又は「モノマーポリペプチド」という用語は、完全に、又は実質的にモノマーである、例えば、少なくとも 50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % モノマーである変異型 F c 領域を含むタンパク質又はポリペプチドを指す。

## 【0023】

本明細書で用いられるように、「モノマー抗体」又は「モノクローナル抗体フラグメント」という用語は、完全に、又は実質的にモノマーである、例えば、少なくとも 50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % モノマーである変異型 F c 領域を含む抗体を指す。

40

## 【0024】

## 7.3 モノマーポリペプチド

いくつかの態様では、本発明は、F c 領域の二量体形成を阻害する 1 つ以上のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失又は挿入）を有する変異型 F c 領域を含むポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、変異型 F c 領域を含む本発明のポリペプチドは、実質的にモノマーであり、例えば、本発明のポリペプチドの少なくとも 70 % は、溶液中でモノマーである。例示の実施形態では、変異型 F c 領域を含む本発明のポリペプチドは、実質的にモノマーであり、例えば、本発明のポリペプチドの少なくとも 70 % は、濃度 0.5 mg / ml ~ 10.0 mg / ml の溶液中でモノマーである。別の例示の実施形態では、変異型 F c 領域を含む本発明のポリペプチドは、実質的にモノマーであり、例えば、本発

50

明のポリペプチドの少なくとも70%は、濃度0.5mg/ml~1.0mg/mlの溶液中でモノマーである。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドの少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99又は100%が、溶液中でモノマーである。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドの少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99又は100%が、濃度0.5mg/ml~10.0mg/mlの溶液中でモノマーである。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドの少なくとも70%が、*in vivo*条件下でモノマーである。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドの少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99又は100%が、*in vivo*条件下でモノマーである。モノマーポリペプチドのパーセントは、当業者には公知の任意の好適な手段、例えば、多角度光散乱検出器（SEC-MALLS）及び分析用超遠心機（AUC）と組み合わせたサイズ交換クロマトグラフィーによって決定することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0025】

変異型Fc領域は、任意の好適な二量体親Fc領域に由来するものでよく、例えば、天然に存在するFc領域、多形性Fc領域配列、改変Fc領域（例えば、1つ以上の配列改変の導入を有する）、又はキメラFc領域、任意の種由来のFc領域、及び任意の抗体イソタイプのFc領域を含む。様々な実施形態では、変異型Fc領域は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、サル、ネコ、又はイヌ由来の親Fc領域から誘導したものでよい。例示の実施形態では、変異型Fc領域は、ヒト由来の親Fc領域から誘導したものである。様々な実施形態では、変異型Fc領域は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA又はIgY抗体由来の親Fc領域から誘導したものでよい。例としての変異型Fc領域配列は、IgG免疫グロブリンの親Fc領域、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4免疫グロブリンのFc領域の配列から誘導したものである。具体的実施形態では、変異型Fc領域は、ヒトIgG1の変異型である。別の具体的実施形態では、変異型Fc領域は、ヒトIgG2の変異型である。別の具体的実施形態では、変異型Fc領域は、ヒトIgG3の変異型である。さらに別の具体的実施形態では、変異型Fc領域は、ヒトIgG4の変異型である。実施形態では、変異型Fc領域は、マウスIgGの変異型である。具体的実施形態では、変異型Fc領域は、マウスIgG1の変異型である。別の実施形態では、変異型Fc領域は、マウスIgG2a又はIgG2bの変異型である。

#### 【0026】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、Fcホモ二量体との間の界面を形成する残基に1つ以上のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失又は挿入）を含む。例示の実施形態では、変異型Fc領域は、Fcホモ二量体の他方の鎖内でそれ自身と相互作用するアミノ酸（自己相互作用残基）の1つ以上の改変を含む。例えば、表6に示す自己相互作用残基を参照されたい。様々な実施形態では、変異型Fc領域は、CH3界面内、CH3界面付近に1つ以上のアミノ酸改変を含む。様々な実施形態では、変異型Fc領域は、ヒンジ領域内に1つ以上のアミノ酸改変を含む。

#### 【0027】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、CH3界面を含むが、これは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体由来のCH3界面のアミノ酸配列、又はマウスIgG2a若しくはIgG2b抗体由来のCH3界面のアミノ酸配列の全部又は一部から誘導されたCH3界面を含む。こうしたマウス及びヒト抗体由来のCH3界面の配列を以下の表2に示す。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域のCH3界面は、以下の表2に記載したIgGのいずれか1つの少なくとも16、17、18、19、20又は全21アミノ酸を含む配列から誘導したものである。アロタイプ変異がhIgG1の356位と、hIgG3の397位及び409位に示されている。各免疫グロブリンクラスのアミノ酸をアラインメントし、図6に示すようにKabata E U番号付けに従って番号付けした。この番号付けは、Kabata et al., *In: Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US De

partment of Health and Human Services, 1991に記載されているヒトIgG1 Kabat抗体のEUインデックス番号付けを指す。

【0028】

【表2】

表2. マウス及びヒトCH3 界面配列

IgG	347	349	350	351	354	356	357	364	366	368	370	392	394	395	397	398	399	405	407	409	439
hIgG1	Q	Y	T	L	S	D/E	E	S	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F	Y	K	K
hIgG2	Q	Y	T	L	S	E	E	S	T	L	K	K	T	P	M	L	D	F	Y	K	K
hIgG3	Q	Y	T	L	S	E	E	S	T	L	K	N	T	P	M/V	L	D	F	Y	K/R	K
hIgG4	Q	Y	T	L	S	E	E	S	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F	Y	R	K
mIgG1	Q	Y	T	I	P	E	Q	S	T	M	T	K	T	Q	I	M	D	F	Y	K	K
mIgG2a	Q	Y	V	L	P	E	E	T	T	M	T	K	T	E	V	L	D	F	Y	K	K
mIgG2b	Q	Y	I	L	P	E	Q	S	T	L	V	K	T	A	V	L	D	F	Y	K	K

表2中:h = ヒト、m = マウス;hIgG1Fcは、Acc.No.P01857.1由来;hIgG2Fcは、Acc.No.P01859.2由来;hIgG3Fcは、Acc.No.BAA11364.1由来;hIgG4Fcは、Acc.No.P01861.1由来;mIgG1Fcは、Acc.No.P01868.1由来であり、mIgG2aFcは、Acc.No.P01863.1由来;及びmIgG2bFcは、Acc.No.P01867.3由来である。

【0029】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、Fc領域のCH3界面内又はその近傍に1つ以上のアミノ酸置換を含む。CH3界面内又はその近傍における1つ以上のアミノ酸置換は、例えば、Kabat EU番号付け体系に従う以下のアミノ酸: 347、349、350、351、352、354、356、357、360、362、364、366、368、370、390、392、393、394、395、396、397、398、399、400、405、406、407、408、409、411及び439の1つ以上での置換であってよい。例示の実施形態では、変異型Fc領域は、Kabat EU番号付け体系に従う以下のアミノ酸位置: 349、351、354、356、357、364、366、368、370、392、394、399、405、407、409、及び439の1つ以上でのアミノ酸置換を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、2つのFcポリペプチドの間のホモ二量体形成を低減又は排除する親Fc領域配列に関する1つ以上のアミノ酸置換(例えば、忌避置換(repelling substitutions))を含む。例示の実施形態では、こうした忌避置換は、自己相互作用アミノ酸残基で実施してよい。好適な忌避置換の例として、例えば、荷電側鎖、大きな側鎖又はバルキーな(bulky)側鎖、又は親水性側鎖を有するアミノ酸への置換がある。例えば、親Fc配列に陽荷電側鎖を有していないアミノ酸残基を、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換して、変異型Fc領域を形成することもできる。陽荷電側鎖を有するアミノ酸の例は、アルギニン、ヒスチジン及びリシンから選択することができる。例示の実施形態では、親Fc領域における以下のアミノ酸位置: 351、356、357、364、366、368、394、399、405及び407の1つ以上を、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換することにより、変異型Fc領域を形成する。あるいは、親Fc配列に陰荷電側鎖を有していないアミノ酸残基を、陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換して、変異型Fc領域を形成することもできる。陰荷電側鎖を有するアミノ酸の例は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から選択することができる。例示の実施形態では、親Fc領域における以下のアミノ酸位置: 349、351、39

4、407、及び439の1つ以上を、陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換することにより、変異型Fc領域を形成している。これ以外にも、親Fc配列に親水性側鎖を有していないアミノ酸残基を、親水性側鎖を有するアミノ酸で置換して、変異型Fc領域を形成してもよい。親水性側鎖を有するアミノ酸の例は、グルタミン、アスパラギン、セリン及びトレオニンから選択することができる。例示の実施形態では、親Fc領域における366位、405位及び407位のアミノ酸を、親水性側鎖を有するアミノ酸で置換することにより、変異型Fc領域を形成している。あるいはまた、親Fc配列に大きな側鎖又はバルキーな側鎖を有していないアミノ酸残基を、大きな側鎖又はバルキーな側鎖を有するアミノ酸で置換して、変異型Fc領域を形成してもよい。大きな側鎖を有するアミノ酸の例は、トリプトファン、フェニルアラニン及びチロシンから選択することができる。例示の実施形態では、親Fc領域における以下のアミノ酸位置：357、364、366、368、及び409の1つ以上を、大きな側鎖を有するアミノ酸で置換することにより、変異型Fc領域を形成する。

10

20

30

40

50

#### 【0031】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、親Fc領域に関して以下のアミノ酸置換の1つ以上を含む：(i)405位のアミノ酸が、陽荷電側鎖又は親水性側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(ii)351位のアミノ酸が、陽荷電側鎖又は陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(iii)357位のアミノ酸が、陽荷電側鎖又は大きな側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(iv)364位のアミノ酸が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(v)366位のアミノ酸が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(vi)368位のアミノ酸が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(vii)394位のアミノ酸が、陽荷電側鎖又は陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(viii)399位のアミノ酸が、陽荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(ix)407位のアミノ酸が、陽荷電側鎖又は陰荷電側鎖を有するアミノ酸で置換されている、(x)409位のアミノ酸が、大きな側鎖を有するアミノ酸で置換されている。

#### 【0032】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、親Fc領域に対する以下のアミノ酸置換の1つ以上を含む：L351R、L351D、E357R、E357W、S364R、T366R、L368R、T394R、T394D、D399R、F405R、F405Q、Y407R、Y407D、K409W及びR409W。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上を含む：Y349D、L351D、L351R、S354D、E356R、D356R、S364R、S364W、T366Q、T366R、T366W、L368R、L368W、T394D、T394R、D399R、F405A、F405Q、Y407A、Y407Q、Y407R、K409R、及びK439D。

#### 【0033】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、二量体形成を阻害する少なくとも2つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、二量体形成を阻害する少なくとも3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、二量体形成を阻害する少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、変異型Fc領域は、親Fc領域に対する1~21、1~15、1~10、1~5、1~3、1~2、2~21、2~15、2~10、2~5、2~3、3~21、3~15、3~10、3~5、3~4、5~15、5~10、5~8、5~6、10~21、10~15、10~12、12~15、又は15~20のアミノ酸置換を含み、こうして得られる変異型Fc領域は、親Fc領域配列と比較して二量体形成が低減又は排除されている。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、以下のアミノ酸置換のセットの1つ以上を含む：Y349D/S354D、L351D/T394D、L351D/K409R、L351R/T394R、E356R/D399R、D356R

/ D 3 9 9 R、S 3 6 4 R / L 3 6 8 R、S 3 6 4 W / L 3 6 8 W、S 3 6 4 W / K 4 0 9 R、T 3 6 6 R / Y 4 0 7 R、T 3 6 6 W / L 3 6 8 W、L 3 6 8 R / K 4 0 9 R、T 3 9 4 D / K 4 0 9 R、D 3 9 9 R / K 4 0 9 R、D 3 9 9 R / K 4 3 9 D、F 4 0 5 A / Y 4 0 7 A、F 4 0 5 Q / Y 4 0 7 Q、L 3 5 1 R / S 3 6 4 R / T 3 9 4 R、及び T 3 6 6 Q / F 4 0 5 Q / Y 4 0 7 Q。いくつかの実施形態では、変異型 F c 領域は、アミノ酸置換の任意の組合せを含む。

#### 【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、変異型 F c 領域は、ヒンジ領域を含まないか、又は 1 つ以上の突然変異（アミノ酸置換、欠失、及び / 又は挿入など）を有するヒンジ領域を含む。例えば、ヒンジ領域の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、又はそれ以上のアミノ酸が置換されているか、若しくは欠失していてもよいし、又はヒンジ領域の 1 ~ 15、1 ~ 12、1 ~ 10、1 ~ 5、1 ~ 3、2 ~ 15、2 ~ 12、2 ~ 10、2 ~ 5、5 ~ 12、5 ~ 10、又は 5 ~ 8 アミノ酸が置換されているか、若しくは欠失していてもよい。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域における少なくとも 1 つのシステイン残基が、欠失しているか、又は別のアミノ酸、例えば、アラニン、セリン若しくはグルタミンで置換されている。実施形態の一例では、ヒンジ領域のアミノ酸の全部が欠失している。別の実施形態では、変異型 F c 領域は、非改変ヒンジ領域を含む。

#### 【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する変異型 F c 領域は、二量体化が低減又は排除された変異型 F c 領域に、別の望ましい機能又は特性を付与する追加的改変を含んでもよい。例えば、本明細書に記載する変異型 F c 領域は、他の公知の F c 変異体、例えば、以下の文献に開示されているものと組み合わせてもよい：Ghetie et al., 1997, Nat Biotech. 15: 637 - 40; Duncan et al., 1988, Nature 332: 563 - 564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147: 2657 - 2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29: 53 - 59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57: 1537 - 1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92: 11980 - 11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett 44: 111 - 117; Lund et al., 1995, Faseb J 9: 115 - 119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54: 101 - 104; Lund et al., 1996, J Immunol 157: 4963 - 4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29: 2613 - 2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164: 4178 - 4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164: 1925 - 1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200: 16 - 26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166: 2571 - 2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276: 6591 - 6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57 - 65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30: 487 - 490); 米国特許第 5, 624, 821 号明細書; 同第 5, 885, 573 号明細書; 同第 5, 677, 425 号明細書; 同第 6, 165, 745 号明細書; 同第 6, 277, 375 号明細書; 同第 5, 869, 046 号明細書; 同第 6, 121, 022 号明細書; 同第 5, 624, 821 号明細書; 同第 5, 648, 260 号明細書; 同第 6, 528, 624 号明細書; 同第 6, 194, 551 号明細書; 同第 6, 737, 056 号明細書; 同第 7, 083, 784 号明細書; 同第 7, 122, 637 号明細書; 同第 7, 183, 387 号明細書; 同第 7, 217, 797 号明細書; 同第 7, 276, 585 号明細書; 同第 7, 332, 581 号明細書; 同第 7, 355, 008 号明細書; 同第 7, 335, 7

10

20

30

40

50

42号明細書；同第7, 371, 826号明細書；同第6, 821, 505号明細書；同第6, 180, 377号明細書；同第7, 317, 091号明細書；同第7, 355, 008号明細書；米国特許出願公開第2002/0147311号明細書；同第2004/0002587号明細書；同第2005/0215768号明細書；同第2006/0173170号明細書；同第2006/024298号明細書；同第2006/235208号明細書；同第2007/0135620号明細書；同第2007/0224188号明細書；同第2008/0089892号明細書；並びにPCT公開番号：国際公開第94/29351号パンフレット；及び国際公開第99/58572号パンフレット。

【0036】

Fc受容体(FcR)は、概して、完全長抗体においてFc領域の両方のコピーに結合することから、本明細書に記載する変異型Fc領域は、一般に、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)の機能を保持しないようである。このFcR結合の欠如は、Fc受容体刺激が望ましくない場合には、抗体又はFc融合タンパク質には有用となりうる。しかし、IgA抗体由来の変異型Fc領域は、受容体がFc単鎖(例えば、Fcモノマー)内のC2/C3界面に結合するため、やはりそのFcRに結合する可能性がある。さらに、新生児型Fc受容体(FcRn)は1つのFcモノマーにのみ結合するが、これは、本発明の変異型Fc領域が、FcRn結合を十分に保持しうることを示している。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、1つ以上のFcRに結合せず、従って、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、及び/又は抗体依存性細胞性食作用(ADCP)活性を有していない。別の実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、FcR結合、FcRn結合、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)、又は抗体依存性細胞性食作用(ADCP)の低減又は増大をもたらす追加的修飾を有する。

20

【0038】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、FcRnの変異型Fc領域の結合親和性を増大する追加的修飾を含み、これによって、変異型Fc領域を含むポリペプチドの血清半減期が増加する。例えば、半減期が増加した本発明のモノマーポリペプチドは、FcとFcRn受容体同士の相互作用に関与するものとして識別されるアミノ酸残基を修飾することにより、作製することができる(例えば、米国特許第6, 821, 505号明細書及び同第7, 083, 784号明細書；並びに国際公開第09/058492号パンフレットを参照されたい)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、M252Y、S254T、T256E、P257N、P257L、M428L、N434S、及びN434Yからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸置換をさらに含む。別の実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、以下のアミノ酸置換のセット：M252Y/S254T/T256E、P257L/M434Y、P257N/M434Y、及びM428L/N434Sの1つ以上をさらに含む。具体的実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、アミノ酸置換M252Y/S254T/T256Eをさらに含む。本明細書で用いる「ポリペプチド半減期」という用語は、ポリペプチドの薬物動学的特性を意味し、投与からのポリペプチド分子の平均存続時間の測度である。ポリペプチド半減期は、患者の身体(若しくは他の哺乳動物)又は特定のその区画からのタンパク質の既知量の50%を排除するのに必要な時間として表すことができ、例えば、血清(すなわち循環半減期)、又は他の組織において測定されている。半減期は、1つのポリペプチド又はポリペプチドのクラスによって変動しうる。一般に、ポリペプチドの半減期が増加すると、投与したポリペプチドの、循環における平均滞留時間(MRT)が増加する。半減期の増加は、患者に投与される薬物量の減少、さらには、投与頻度の減少も可能にする。

30

40

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、FcR及び/又はFcRnに対する親和性の増大又は低減を呈示し、これは、親Fc領域と比較して、少な

50

くとも2倍、又は少なくとも3倍、又は少なくとも5倍、又は少なくとも7倍、又は少なくとも10倍、又は少なくとも20倍、又は少なくとも30倍、又は少なくとも40倍、又は少なくとも50倍、又は少なくとも60倍、又は少なくとも70倍、又は少なくとも80倍、又は少なくとも90倍、又は少なくとも100倍、又は少なくとも200倍、又は2倍～10倍、又は5倍～50倍、又は25倍～100倍、又は75倍～200倍、又は100倍～200倍多いか、又は少ない。別の実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域は、親Fc領域と比較して、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、又は少なくとも5%多いか、又は少ない、FcR及び/又はFcRnに対する親和性を呈示する。いくつかの実施形態では、本発明の変異型Fc領域は、FcR及び/又はFcRnに対する親和性が増大している。別の実施形態では、本発明の変異型Fc領域は、FcR及び/又はFcRnに対する親和性が低減している。

10

#### 【0040】

いくつかの実施形態では、本発明の変異型Fc領域の配列は、親Fc領域との実質的なアミノ酸置換配列同一性を有する。例えば、本発明の変異型Fc領域のアミノ酸配列は、親Fc領域のアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する。

#### 【0041】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、タンパク質化学の分野で公知であり、本明細書でさらに詳しく説明するタンパク質の単離/精製方法によって精製することができる。精製モノマーポリペプチドは、好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも95%、また最も好ましくは少なくとも98%の純度を有する。純度の正確な数値とは無関係に、ポリペプチドは、医薬品としての使用目的で十分純粋である。

20

#### 【0042】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する変異型Fc領域を含むポリペプチドは、グリコシル化されていてもよいし、アグリコシルであってもよい。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含むポリペプチドの部分がグリコシル化されているか、又はアグリコシルである。変異型Fc領域は、ネイティブグリコシル化パターン又は改変グリコシル化パターンを含んでもよい。改変グリコシル化パターンは、例えば、Fc領域配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を改変することにより、達成することができる。例えば、1つ以上のグリコシル化部位の排除をもたらす1つ以上のアミノ酸置換を実施することによって、その部位（例えば、IgGのアスパラギン297）でのグリコシル化を排除することができる。変異型Fc領域を含むこうしたアグリコシル化ポリペプチドは、必要なグリコシル化装置が欠失した細菌細胞において生産することができる。

30

#### 【0043】

Fc領域のオリゴ糖にシアル酸を添加することにより、抗炎症活性を増大すると共に、こうした分子の細胞傷害作用を改変することができる（Keneko et al., Science, 2006, 313: 670-673; Scallion et al., Mol. Immunol., 2007 Mar; 44(7): 1524-34）。従って、変異型Fc領域を含むポリペプチドは、特定の治療用途のための適切なシアリル化プロフィールで修飾することができる（米国特許出願公開第2009/0004179号明細書及び国際公開第2007/005786号パンフレット）。一実施形態では、本明細書に記載の変異型Fc領域は、ネイティブFc領域と比較して改変されたシアリル化プロフィールを含む。一実施形態では、本明細書に記載の変異型Fc領域は、ネイティブFc領域と比較して増加したシアリル化プロフィールを含む。別の実施形態では、本明細書に記載の変異型Fc領域は、ネイティブFc領域と比較して減少したシアリル化プロフィールを含む。

40

#### 【0044】

50



### 7.3.1 Fc融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、Fc融合タンパク質、例えば、1つ以上の異種タンパク質部分に結合した、本明細書に記載の変異型Fc領域を含むポリペプチドである。Fc融合タンパク質を形成するために、任意の所望する異種ポリペプチドを変異型Fc領域に融合して、Fc融合タンパク質を形成することができ、このような異種ポリペプチドとして、例えば、治療用タンパク質、Fc領域が欠失した抗体フラグメント及びタンパク質スカフォールドなどが含まれる。例示の実施形態では、ポリペプチドのサイズ、可溶性、発現率、及び/又は血清半減期を増加させる上で望ましい異種ポリペプチドにFc領域を融合させる。いくつかの実施形態では、Fc領域は、異種ポリペプチドの精製及び/又は検出のためのタグとして異種ポリペプチドに融合させる。例示の実施形態では、本発明のFc融合タンパク質は実質的にモノマーであり、例えば、Fc融合タンパク質の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%が、溶液中でモノマーである。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の変異型Fc領域は、1つ以上の異種ポリペプチドに融合させてもよいし、あるいはN及び/又はC末端でこれらポリペプチドと連結させてもよい。変異型Fc領域は、当該技術分野で公知の任意の好適な手段、例えば、化学結合、化学架橋、又は遺伝子融合によって、直接、又は化学又はアミノ酸リンカーを介して、異種ポリペプチドに連結してもよい。好ましくは、変異型Fc領域は、Fcドメイン及び異種ポリペプチド部分が適正にフォールドされ、異種ポリペプチド部分が、生物活性を保持するように、異種ポリペプチド配列に連結する。

#### 【0046】

本発明のFc融合物は、治療効果を得るために一価性が所望される場合に用いることができる。例えば、本発明のFc融合物は、Fc融合物の二価性が受容体の二量体形成を誘導し、それによってシグナル伝達経路に不要なモジュレーションが起こることが懸念される場合に、用いることができる。本発明のFc融合物はまた、治療用Fc融合物が、免疫系媒介による活性、例えば、エフェクター機能、ADCC、食作用及びCDCを誘導することなく、治療作用を発揮することが好ましい場合にも望ましい。

#### 【0047】

本発明のFc融合物は、疾患の診断及び治療に関わる多くのin vitro及びin vivo診断及び治療有用性を有する。本発明によれば、本明細書に記載の一価ポリペプチドは、どんな異種タンパク質部分でも組み込むことができるため、本発明は、特定の異種タンパク質部分を組み込むFc融合タンパク質に関するものではない。本発明のFc融合タンパク質の具体的有用性は、具体的異種タンパク質部分に応じて異なる。異種タンパク質の選択は、異種タンパク質の一価形態を投与する治療価値及び/又は利点に基づいて行ってよい。このような考慮は、当業者の技能で十分可能である。本発明のFc融合タンパク質は、ある分子の活性を部分的又は完全にブロックするためのアンタゴニスト及び/又はインヒビターとして用いることもできる。具体的実施形態では、本発明のFc融合タンパク質は、受容体に結合して、ネイティブリガンドと受容体との結合をブロック又は妨害することにより、対応するシグナル伝達経路を阻害しうるリガンドの受容体結合部分を含む。別の実施形態では、本発明のFc融合タンパク質は、ネイティブリガンドに結合して、リガンドがネイティブ受容体と結合するのを阻止し、これによって、対応するシグナル伝達経路を阻害しうる受容体のリガンド結合ドメインを含む。また別の実施形態では、本発明の一価ポリペプチドは、より長い半減期が所望される、治療効果を有する異種分子を含む。

#### 【0048】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、1つ以上の異種ポリペプチドの精製を促進するためのタグとして用いてもよい。本発明のFc融合タンパク質は、Fcドメインを含むポリペプチドを単離するための当該技術分野で公知の任意の好適な方法、例えば、クロマトグラフ技法（例えば、イオン交換、サイズ排除、疎水性相互作用クロマトグラフィ

ー)、並びにプロテイン A 及び / 又はプロテイン G、及び / 又は抗 Fc 抗体、又はこれらの組合せの使用を用いて、精製することができる。一般に、培地又は細胞溶解物からの Fc タグ付きタンパク質の精製は、樹脂 (例えば、アガロース又はセファロースビーズ) に結合させたプロテイン A 又はプロテイン G を用いることを含む。精製は、例えば、Fc タグ付きタンパク質を含む溶液中でプロテイン A 又はプロテイン G 樹脂をインキュベートした後、遠心分離ステップによって可溶性画分から樹脂を分離することにより、又は Fc タグ付きタンパク質の溶液を、プロテイン A 又はプロテイン G 樹脂を含むカラムに通過させることにより、バッチ形態で実施することができる。プロテイン A 又はプロテイン G からの Fc タグ付きタンパク質の溶離は、任意の好適な方法、例えば、様々な等張性及び / 又は pH のバッファー中で Fc 結合樹脂をインキュベートすることによって実施してよい。Fc タグ付きポリペプチドは、様々な技法、例えば、イオン交換、サイズ排除、疎水性相互作用クロマトグラフィー、又はこれらの組合せなどを用いて、さらに精製してもよい。

#### 【0049】

いくつかの実施形態では、変異型 Fc 領域は、1 つ以上の異種ポリペプチドの検出を容易にするためのタグとして用いてもよい。本発明の Fc 融合タンパク質は、Fc ドメインを含むポリペプチドを識別するために当該技術分野で知られる任意の好適な方法、例えば、プロテイン A、プロテイン G、及び / 又は抗 Fc 抗体のような標識 Fc 結合タンパク質の使用によって、検出することができる。こうした Fc 結合タンパク質は、任意の好適な検出試薬に結合させてもよく、このような試薬として、例えば、発色団、発蛍光団、蛍光部分、りん光色素、タンデム色素、ハプテン、ビオチン、酵素コンジュゲート、及び / 又は放射性同位元素が含まれる (例えば、米国特許出願公開第 2009/0124511 号明細書を参照、尚、その教示内容は、参照として本明細書に組み込むものとする)。1 つ以上の標識 Fc 結合タンパク質と一緒にインキュベートした後、本発明の変異型 Fc 領域でタグ付けしたタンパク質を、当該技術分野で公知の 1 つ以上の免疫検出技法を用いて、識別することができ、このような技法として、例えば、免疫蛍光顕微鏡検査法、フローサイトメトリー、免疫沈降、ウェスタンブロットティング、ELISA、及び / 又はオートラジオグラムがある。いくつかの態様では、本発明の Fc タグ付きタンパク質の精製を容易にするために、上記の標識 Fc 結合タンパク質を用いてもよい。例えば、Fc タグ付きタンパク質を 1 つ以上の蛍光標識抗 Fc 抗体に結合させた後、当該技術分野では公知の様々な蛍光活性化細胞自動分離法を用いて分離することができる。

#### 【0050】

異種タンパク質のカテゴリー例として、限定するものではないが、酵素、増殖因子 (例えば、トランスフォーミング増殖因子、例: TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  2、TGF- $\beta$  3)、治療用タンパク質 (例えば、エリトロポエチン (EPO)、インターフェロン (例えば、IFN- $\alpha$ )、又は腫瘍壊死因子 (例えば、TNF- $\alpha$ ))、サイトカイン、膜貫通受容体の細胞外ドメイン、受容体リガンド、完全 Fc 領域を欠失した抗体フラグメント (例えば、抗体の抗原結合フラグメント)、又は非免疫グロブリン標的結合スカフォールドがある。

#### 【0051】

いくつかの実施形態では、異種タンパク質は、抗体の抗原結合部分である。抗体の抗原結合部分は、ある抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の 1 つ以上のフラグメントを含む。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のフラグメントによって実施することができることが分かっている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合フラグメントの例としては、以下のものがある: (i) Fab フラグメント、すなわち、VL、VH、CL 及び CH1 ドメインからなる一価フラグメント; (ii) F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、すなわち、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された 2 つの Fab フラグメントを含む二価フラグメント; (iii) VH 及び CH1 ドメインからなる Fd フラグメント; (iv) 抗体の単一アームの VL 及び VH ドメインからなる Fv フラグメント; (v) VH ドメインからなるドメイン抗体 (dAb) フラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); (vi) 単離された相補性

10

20

30

40

50

決定領域 (CDR) ; (vii) 合成リンカーによって連結された Fv フラグメントの 2 つのドメイン (VL 及び VH) からなる単鎖 Fv (scFv) であって、上記リンカーにより、両ドメインを単鎖タンパク質として形成することができ、この単鎖において、VL 及び VH 領域が対合することによって一価分子を形成する (例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; 及び Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 を参照); (viii) ワクシボディ (米国特許出願公開第 2004/0253238 号明細書を参照); 及び (ix) 一对のタンデム Fd セグメント (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) からなる二重特異性又は単一特異性直線状抗体であって、これらのセグメントは、一对の抗原結合領域を形成する (Zapata et al., Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995) 及び米国特許第 5,641,870 号明細書を参照)。

#### 【0052】

抗体フラグメントは、当業者には公知の従来の技法を用いて取得することができ、また、これらのフラグメントは、インタクトな抗体と同様に、有用性のためにスクリーニングしてもよい。伝統的には、抗体フラグメントは、当該技術分野で公知の方法を用いて、インタクトな抗体のタンパク質分解消化によって得られてきた。しかし、今日では、抗体フラグメントを組換え宿主細胞により直接生産することができる。Fab、Fv 及び scFv 抗体フラグメントはすべて、大腸菌 (E. coli) において発現させ、これから分泌させることができ、このようにして、多量のフラグメントを容易に生産することが可能になった。一実施形態では、抗体フラグメントは、以下に記載する抗体ファージライブラリーから単離することができる。これ以外に、Fab'-SH フラグメントも大腸菌 (E. coli) から直接回収して、化学的に結合させることにより、F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを形成することができる (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。別の手法によれば、F(ab')<sub>2</sub> フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。また、当該技術分野で公知の方法、例えば、PCT 国際公開第 92/22324 号パンフレット; Mullinax et al., BioTechniques 12 (6): 864-869 (1992); 及び Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) に開示されているものなどを用いて、組換えによって Fab、Fab' 及び F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを生産する技術を使用することもできる。単鎖 Fv 及び抗体を生産するのに用いることができる技術の例としては、米国特許第 4,946,778 号明細書及び同第 5,258,498 号明細書に記載されているものがある。ドメイン抗体の例としては、限定するものではないが、Domantis から入手可能なものがあり、これらは、治療標的に特異的である (例えば、国際公開第 04/058821 号パンフレット; 国際公開第 04/081026 号パンフレット; 国際公開第 04/003019 号パンフレット; 国際公開第 03/002609 号パンフレット; 米国特許第 6,291,158 号明細書; 同第 6,582,915 号明細書; 同第 6,696,245 号明細書; 及び同第 6,593,081 号明細書を参照)。市販されているドメイン抗体のライブラリーを用いて、モノクローナルドメイン抗体を識別定することができる。

#### 【0053】

いくつかの実施形態では、本発明の Fc 融合タンパク質は、非免疫グロブリン標的結合スカフォールドである異種ポリペプチドに結合した変異型 Fc 領域を含む。非免疫グロブリン標的結合スカフォールドは、概して突然変異アミノ酸配列を含有させることにより、標準タンパク質から得られる。非免疫グロブリン標的結合スカフォールドは、例えば、以下のものに由来するものでよい: 抗体サブストラクチャー、ミニボディ、アドネクチン、アンチカリン、アフィボディ、ノッティン、グルボディ、C 型レクチン様ドメインタンパク質、テトラネクチン、クニツドメインタンパク質、チオレドキシン、サイトクローム b562、ジンクフィンガースカフォールド、ブドウ球菌ヌクレアーゼスカフォールド、フィブロネクチン又はフィブロネクチン二量体、テネイシン、N-カドヘリン、E-カド

ヘリン、ICAM、タイチン、GCSF - 受容体、サイトカイン受容体、グリコシダーゼインヒビター、抗体色素タンパク質、ミエリン膜付着分子P0、CD8、CD4、CD2、クラスI MHC、T細胞抗原受容体、CD1、C2及びVCAM-1のI-セットドメイン、ミオシン結合プロテインCの1-セット免疫グロブリンドメイン、ミオシン結合プロテインHの1-セット免疫グロブリンドメイン、テロキンのI-セット免疫グロブリンドメイン、NCAM、ツイッチン(twitchin)、ニューログリアン、成長ホルモン受容体、エリトロポエチン受容体、プロラクチン受容体、インターフェロン受容体、  
- ガラクトシダーゼ/グルコロニダーゼ、  
- グルコロニダーゼ、トランスグルタミナーゼ、T細胞抗原受容体、スーパーオキシドジムスターゼ、組織因子ドメイン、シトクロムF、緑色蛍光タンパク質、GroEL、又はタウマチン。その他の好適なタンパク質スカフォールドは、Wurch et al. (2008) Current Pharmaceutical Biotechnology, 9:502 (本明細書に参照として組み込む)に記載されている。

10

#### 【0054】

Fc融合タンパク質は、任意の好適な立体配置で構築することができる。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域のC末端を異種タンパク質のN末端に連結することができる。あるいは、異種タンパク質のC末端を変異型Fc領域のN末端に連結してもよい。いくつかの実施形態では、異種タンパク質を変異型Fc領域の露出した内部(非末端)残基に連結するか、又は変異型Fc領域を異種タンパク質の露出した内部(非末端)残基に連結することができる。別の実施形態では、任意の組合せの変異型Fc-異種タンパク質立体配置を用いることによって、変異型Fc:異種タンパク質の比が1:1より大きくなる(例えば、1異種タンパク質に対し2変異型Fc分子)ようにすることもできる。

20

#### 【0055】

変異型Fc領域と異種タンパク質は、互いに直接結合してもよいし、リンカー配列を用いて、間接的に結合してもよい。例示の実施形態では、リンカー配列は、それぞれの部分がその適正な二次及び三次構造に適正にフォールドすることを確実にするのに十分な距離だけ変異型Fc領域と異種タンパク質を隔てる。好適なリンカー配列は、以下に挙げる特性の1つ以上を有しうる:(1)可変の延長コンホメーションを採用することができる、(2)変異型Fcポリペプチド又は異種タンパク質の機能性ドメインと相互作用しうる定序二次構造を形成する傾向を呈示しない、及び/又は(3)機能性タンパク質ドメインとの相互作用を促進しうる、最小限の疎水性又は荷電性を有する。可変タンパク質領域における典型的表面アミノ酸としては、Gly、Asn及びSerがある。Gly、Asn及びSerを含むアミノ酸配列の順列は、リンカー配列の上記基準を満たすことが求められる。その他のほぼ中性のアミノ酸、例えば、Thr及びAlaもリンカー配列に用いることができる。具体的実施形態では、長さが約15アミノ酸のリンカー配列を用いて、機能性タンパク質ドメイン同士を好適に隔てることができるが、これより長い、又は短いリンカー配列を用いてもよい。変異型Fc領域と異種タンパク質を隔てるリンカー配列の長さは、長さ5~500アミノ酸でよく、より好ましくは長さ5~100アミノ酸である。好ましくは、リンカー配列は、長さ約5~30アミノ酸である。好ましい実施形態では、リンカー配列は、約5~約20アミノ酸、又は約10~約20アミノ酸である。

30

40

#### 【0056】

いくつかの実施形態では、開裂性リンカーを介して、変異型Fc領域を1つ以上の異種ポリペプチドと融合してもよい。様々な開裂性リンカーが当業者には周知である(例えば、米国特許第4,618,492号明細書;同第4,542,225号明細書;同第4,625,014号明細書;同第5,141,648号明細書;及び同第4,671,958号明細書を参照;尚、これら文献の教示内容は参照として本明細書に組み込むものとする)。これらのリンカー基からの物質の遊離のため作用機構としては、例えば、感光性結合の照射、酸触媒加水分解、及びタンパク質分解酵素による切断などがある。例示の実施形態では、異種ポリペプチドの精製及び/又は検出を容易にするためのタグとして用いられる本発明の変異型Fc領域を異種ポリペプチドから除去した後、開裂性リンカーの化学

50

的又は酵素的切断により精製及び／又は検出を実施する。

【0057】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域と異種ポリペプチドとを含む本発明のFc融合タンパク質は、公知の架橋試薬及びプロトコルを用いて、作製することができる。例えば、変異型Fc領域と異種タンパク質を架橋するのに、当業者には公知で、しかも有用な多数の化学架橋試薬がある。例えば、好適な架橋剤は、ヘテロ二機能性クロスリンカーであり、これを用いて、段階的に分子同士を連結することができる。ヘテロ二機能性クロスリンカーは、タンパク質を結合するためのより特異的結合方法を設計する能力を提供し、これによって、ホモタンパク質ポリマーのような不要な副反応物の発生を抑制する。当該技術分野では、非常に多様なヘテロ二機能性クロスリンカーが知られており、例えば、以下のものがある：スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)；N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)；4-スクシンイミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)-トルン(SMPT)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート]ヘキサノエート(LC-SPDP)。N-ヒドロキシスクシンイミド部分を有する架橋剤は、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド類似体として得ることができ、これは、一般に、より高い水溶性を有する。さらに、結合鎖内にジスルフィド架橋を有する架橋剤は、アルキル誘導体として合成して、*in vivo*でのリンカー切断の量を減らすようにすることもできる。その他の好適な架橋剤として、ホモ二機能性及び光反応性クロスリンカーがある。ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)及びジメチルピメルイミデート・2HCl(DMP)は、有用なホモ二機能性架橋剤の例であり、ビス-[B-(4-アジドサリシルアミド)エチル]ジスルフィド(BASED)及びN-スクシンイミジル-6(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート(SANPAH)は、有用な光反応性クロスリンカーの例である。近年のタンパク質結合技術の概観については、Means et al. (1990) *Bioconjugate Chemistry*, 1: 2-12 (参照として本明細書に組み込む)を参照されたい。

【0058】

いくつかの実施形態では、本発明のFc融合タンパク質は、標準的タンパク質化学技術、例えば、Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) 及び Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman 及び Company, New York (1992) に記載されているものを用いて、製造することができる。本明細書に記載のFc融合タンパク質の製造に好適な自動ペプチド合成装置は市販されている(例えば、Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。

【0059】

変異型Fc領域と異種ポリペプチドの化学的結合のための前述した架橋方法のいずれにおいても、開裂性ドメイン又は開裂性リンカーを用いることができる。切断によって、異種ポリペプチドと変異型Fc領域を分離することが可能になる。例えば、Fc融合タンパク質が細胞を貫通した後、開裂性リンカーの切断によって、変異型Fc領域を異種ポリペプチドから分離することができる。

【0060】

いくつかの実施形態では、本発明のFc融合タンパク質は、1つの連続したポリペプチド鎖として発現される、変異型Fc領域と異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質

として作製することができる。このような融合タンパク質は、本明細書において、組換えにより結合されたものと呼ぶ。こうした融合タンパク質を調製する際には、変異型Fc領域及び異種ポリペプチドをコードする核酸と、任意で、変異型Fc領域と異種ポリペプチドを連結するためのペプチドリンカー配列とを含む融合遺伝子を構築する。融合遺伝子（翻訳産物が所望の融合タンパク質である）を作製するための組換えDNA技術の使用は、当該技術分野では公知である。融合タンパク質を作製するための方法の例が、PCT出願、PCT/米国特許第87/02968号明細書、PCT/米国特許第89/03587号明細書及びPCT/米国特許第90/07335号明細書、並びにTraunacker et al. (1989) Nature 339: 68に記載されており、参照として本明細書に組み込まれる。主として、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の連結は、従来の技術に従い、連結のための平滑末端又はスタッガー末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じた付着末端の充填、不要な連結を防ぐためのアルカリ性ホスファターゼ処理、及び酵素的連結を用いて実施する。あるいは、自動DNA合成装置などの従来の技術により融合遺伝子を合成することもできる。別の方法では、2つの連続した遺伝子断片の間に相補的突出部を発生させるアンカブライマーを用いて、遺伝子断片のPCR増幅を実施することも可能であり、これらを後にアニーリングして、キメラ遺伝子配列を作製することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照）。融合遺伝子によってコードされるFc融合タンパク質は、当該技術分野では公知の様々な発現系を用いて、組換えにより作製してもよい（以下も参照のこと）。

#### 【0061】

##### 7.3.2 モノマー抗体

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、モノマー抗体、例えば変異型Fc領域を含む抗体又は抗体フラグメントであり、ここで抗体又は抗体フラグメントは、実質的にモノマーであり、免疫特異的に標的に結合する。一例示の実施形態では、モノマー抗体は、本明細書に記載の変異型Fc領域を有する重鎖と、軽鎖とを含み、抗体は実質的にモノマーである。モノマー抗体は、任意のタイプの抗体のモノマー形態であってもよく、例えば、モノクローナル抗体、キメラ抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、又は完全なヒト抗体、又は変異型Fc領域を含む上記いずれかのフラグメントのモノマー形態を含む。変異型Fc領域を含むモノマー抗体又はそのフラグメントは、任意の供給源、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ニワトリなどに由来するものであってもよく、任意のイソタイプのものでよい。

#### 【0062】

本明細書に記載の変異型Fc領域を含むモノマー抗体は、任意の好適な手段によって作製することができる。例えば、抗体又は抗体フラグメントのFc領域の配列は、本明細書に記載のFc領域配列変異型を導入するように修飾してもよく、これによって、Fc領域のモノマー形態を増加させる。あるいは、抗体又はフラグメントの親Fc領域の全部又は実質的部分を本明細書に記載の変異型Fc領域の配列で置換してもよい。抗体の親Fc領域を置換して、変異型Fc領域を導入する場合には、置換Fc領域は、同じ種及び/若しくはイソタイプの抗体、又は異なる種及び/若しくはイソタイプの抗体に由来するものでよく、これによってキメラ抗体を形成する。例えば、ヒトIgG4抗体の親Fc領域を変異型ヒトIgG4Fc領域で置換することにより、モノマーヒト抗体を形成することができる。あるいは、マウスIgG抗体の親Fc領域をヒトIgG抗体由来の変異型Fc領域で置換することにより、モノマーキメラ抗体を形成することもできる。こうしたFc修飾は、当該技術分野では公知であり、また以下にさらに詳しく説明する標準組換えDNA技術を用いて実施してよい。

#### 【0063】

治療効果を得るために一価性が望ましい場合、本発明のモノマー抗体を用いてよい。例えば、抗体の二価性によって、標的細胞が誘導されて抗原のモジュレーションを受ける懸

念がある場合に、モノマー抗体を用いることができる。また、治療用抗体が、免疫系媒介の活性、例えば、エフェクター機能、ADCC、食作用及びCDCを伴わずに、治療作用を発揮することが好ましい場合に、本発明のモノマー抗体が望ましい。従って、本発明のモノマー抗体は、疾患の診断及び治療に関わる多くの *in vitro* 及び *in vivo* 診断及び治療有用性を有する。

#### 【0064】

本発明によれば、本明細書に記載のモノマー抗体は、どの抗原にでも結合しうるため、本発明は、特定の抗原に向けられるモノマー抗体に関するものではないことは理解されよう。本発明のモノマー抗体の具体的有用性は、具体的標的抗原に応じて異なる。標的抗原の選択は、標的抗原に特異的な抗体の一価形態を投与する治療価値及び/又は利点に基づいて行ってよい。このような考慮は、当業者の技能で十分に可能である。本発明のモノマー抗体は、*in vitro*、*ex vivo* 及び/又は *in vivo* で特定の抗原の活性を部分的又は完全にブロックするためのアンタゴニスト及び/又はインヒビターとして用いることもできる。具体的実施形態では、本発明のモノマー抗体は、リガンド抗原に特異的であり、リガンド抗原に関わるリガンド-受容体の相互作用をブロック又は妨害することにより抗原活性を阻害することによって、対応するシグナル伝達経路及びその他の分子又は細胞事象を阻害する。別の実施形態では、本発明のモノマー抗体は、リガンドとの接触により活性化されうる受容体抗原に特異的であり、リガンド-受容体の相互作用をブロック又は妨害することにより抗原活性を阻害し、これによって、対応するシグナル伝達経路及びその他の分子又は細胞事象を阻害する。

10

20

#### 【0065】

本明細書に記載のモノマー抗体は、モノマー抗体の意図する用途に応じて、任意の所望する標的と免疫特異的に相互作用することができる。例えば、モノマー抗体は、標的、例えば、細胞表面受容体、癌抗原、サイトカイン、酵素などに結合しうる。モノマー抗体は、既存の抗体、例えば、市販されている形態の抗体、又は新たに単離した抗体に由来するものでよい。市販の抗体の例として、限定するものではないが、Humira（登録商標）、Remicade（登録商標）、Simpsoni（登録商標）、Rituxan（登録商標）、Herceptin（登録商標）などがある。様々なタイプの抗体を作製する方法は、当該技術分野では公知であり、また、以下に詳しく説明する。

#### 【0066】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含むモノマー抗体又は抗体フラグメントは、250ナノモルより小さい $K_D$ で標的に免疫特異的に結合する。いくつかの実施形態では、 $K_D$ は、100ナノモルより小さい、50ナノモルより小さい、25ナノモルより小さい、又は1ナノモルより小さい。いくつかの実施形態では、上記条件下での $K_D$ は、900ピコモルより小さい、800ピコモルより小さい、700ピコモルより小さい、600ピコモルより小さい、500ピコモルより小さい、400ピコモルより小さい、300ピコモルより小さい、200ピコモルより小さい、又は100ピコモルより小さい。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含むモノマー抗体又は抗体フラグメントは、250ナノモルより小さい $IC_{50}$ で、標的を阻害する。いくつかの実施形態では、 $IC_{50}$ は、100ナノモルより小さい、50ナノモルより小さい、25ナノモルより小さい、又は1ナノモルより小さい。いくつかの実施形態では、上記条件下での $IC_{50}$ は、900ピコモルより小さい、800ピコモルより小さい、700ピコモルより小さい、600ピコモルより小さい、500ピコモルより小さい、400ピコモルより小さい、300ピコモルより小さい、200ピコモルより小さい、又は100ピコモルより小さい。いくつかの実施形態では、モノマー抗体の $K_D$ 及び/又は $IC_{50}$ は、当該技術分野で公知の任意の方法、例えば、BIACORE（商標）親和性データ、細胞結合、標準ELISA又は標準フローサイトメトリーアッセイを用いて、測定することができる。

30

40

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、モノマー抗体の結合親和性は、親抗体の結合親和性と実質的に同じである。例えば、本明細書に記載の変異型Fc領域を作製するためにFc領域に1

50

つ以上の配列変異を導入しても、抗体の結合親和性にほぼ又は全く影響をもたらさない。例えば、モノマー抗体を作製するために抗体のFc領域に配列変異を導入すると、標的に対する抗体の結合親和性に、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%より小さい変化が起こる。あるいは、モノマー抗体を作製するために抗体のFc領域に配列変異を導入すると、標的に対する抗体の結合親和性に、10倍、8倍、5倍、4倍、3倍、又は2倍より小さい変化が起こる。いくつかの実施形態では、モノマー抗体は、標的に対する親抗体の結合親和性の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%を維持する。いくつかの実施形態では、標的に対するモノマー抗体の結合親和性は、同じ標的の親抗体の結合親和性の10倍、8倍、5倍、4倍、3倍、又は2倍以内である。

10

#### 【0068】

一実施形態では、本発明のモノマー抗体は、本明細書に記載の変異型Fc領域を含むモノクローナル抗体又はそのフラグメントである。モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の様々な技法を用いて調製することができるが、こうした技法としては、以下のものがある：ハイブリドーマの使用(Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)、組換え及びファージディスプレイ技術、又はこれらの組合せ。本明細書で用いる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の、又は単離された抗体の集団から得られた抗体を指す。例えば、上記の集団を含む個々の抗体は、わずかな量で存在しうる自然に起こりうる突然変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位、又は多重特異的改変抗体の場合には多重抗原部位に対して向けられている。さらに、様々な決定基(エピトープ)に対して向けられる様々な抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の同じ決定基に対して向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体による混入なしに合成することができる点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、いずれか特定の方法による抗体の生産を必要とするものと解釈すべきではない。

20

30

#### 【0069】

ハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体の生産又はスクリーニング方法は、当該技術分野において一般的であり、公知である。例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986); Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); 及び Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)を参照されたい。さらに、抗体ファージライブラリーを用いて、モノクローナル抗体を生産する方法は、当該技術分野において一般的であり、公知である。例えば、McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990); 及び Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) 及び Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)を参照されたい。ファージディスプレイライブラリーを作製するための市販のキット(例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; 及び the Stratagene SURF ZAP (商標) phage display kit, catalog no. 240612)の他に、抗体ディスプレイライブラリーを作製及びスクリーニングするのに使用

40

50



するための方法及び試薬の例は、例えば、米国特許第 6, 248, 516 号明細書；同第 6, 545, 142 号明細書；同第 6, 291, 158 号明細書；同第 6, 291, 159 号明細書；同第 6, 291, 160 号明細書；同第 6, 291, 161 号明細書；同第 6, 680, 192 号明細書；同第 5, 969, 108 号明細書；同第 6, 172, 197 号明細書；同第 6, 806, 079 号明細書；同第 5, 885, 793 号明細書；同第 6, 521, 404 号明細書；同第 6, 544, 731 号明細書；同第 6, 555, 313 号明細書；同第 6, 593, 081 号明細書；同第 6, 582, 915 号明細書；同第 7, 195, 866 号明細書に記載されている。

#### 【0070】

一実施形態では、本発明のモノマー抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、又はそれらのフラグメントであり、これらは、本明細書に記載の変異型 Fc 領域を含む。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合する、非ヒト種抗体（本明細書ではまた、ドナー抗体とも称する）に由来する抗体分子である。ヒト化抗体は、ドナー抗体からの 1 つ以上の相補性決定領域（CDR）と、ヒト免疫グロブリン分子からの 1 つ以上のフレームワーク領域（本明細書では、アクセプター抗体とも呼ぶ）とを有する。往々にして、ヒトフレームワーク領域におけるフレームワーク残基を、ドナー抗体からの対応する残基で置換することにより、抗原結合を改変、好ましくは改善し、及び/又は免疫原性を低減する。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野で公知の方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を識別するための CDR とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、及び特定の位置の特異フレームワーク残基を識別するための配列比較によって、識別する。（例えば、Riechmann et al., Nature 332:323 (1988) を参照のこと）。実際には、また、いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、概してヒト抗体であり、このヒト抗体では、いくつかの超可変領域残基と、恐らくいくつかの FR 残基は、ドナー抗体における類似部位からの残基で置換されている。別の実施形態では、FR 残基は完全にヒト残基である。

#### 【0071】

ヒト化は、Winter 及び共同研究者（Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)；Reichmann et al., 前掲：Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)）の方法に従い、超可変領域配列を、ヒト抗体の対応する配列で置換することによって実施する。具体的には、ヒト化抗体は、当該技術分野で公知の方法によって調製することができ、こうした方法としては以下のものがある：CDR グラフティング手法（例えば、米国特許第 6, 548, 640 号明細書を参照）、ベニアリング（veneering）又は表面再構成（resurfacing）（米国特許第 5, 639, 641 号明細書及び同第 6, 797, 492 号明細書；Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)；Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)）、鎖シャッフリング戦略（例えば、米国特許第 5, 565, 332 号明細書；Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915 を参照）、分子モデル化戦略（米国特許第 5, 639, 641 号明細書）など。これらの一般的手法を標準突然変異及び組換え合成技術と組み合わせ、所望の特性を備えるモノマーヒト化抗体を作製することもできる。

#### 【0072】

定義により、ヒト化抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する配列、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体において対応する配列と同一であるか、又は相同的であり、この鎖の別の部分は、別の種に由来する配列、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体において対応する配列と同一であるか、又は相同的である抗体、並びに、このような抗体のフラグメント（これらが所望の生物活性を呈示する限り）である（例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (

1984))。本明細書において興味深いキメラ抗体としては、非ヒト霊長類(例えば、ヒヒ、アカゲザル又はカニクイザルのような旧世界ザル(Old World Monkey))由来の変域ドメイン抗原結合配列を含む「霊長類化」抗体及びヒト定常領域配列(米国特許第5,693,780号明細書)がある。

#### 【0073】

一実施形態では、本発明のモノマー抗体は、本明細書に記載の変異型Fc領域を含むヒト抗体又はそのフラグメントである。ヒト抗体は、マウス又はラット可変及び/又は定常領域配列を有する抗体に関連する問題のいくつかを回避する。こうしたマウス又はラット由来の配列が存在すると、抗体の急速なクリアランスを起こす可能性、又は患者による抗体に対する免疫応答の発生を招く恐れがある。マウス又はラット由来の抗体の使用を避けるために、げっ歯類、その他の哺乳動物又は動物が、完全なヒト抗体を産生するように、機能性ヒト抗体遺伝子座をげっ歯類、その他の哺乳動物又は動物に導入することによって、完全なヒト抗体を作製することができる。

10

#### 【0074】

ヒト抗体は、当該技術分野で公知の方法を用いて作製することができる。例えば、今日、免疫すると、内因性免疫グロブリン生産の非存在下で、ヒト抗体の全レパトアを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作製することが可能である。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258(1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33(1993); 米国特許第5,545,806号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,591,669号明細書(すべてGenPharm); 米国特許第5,545,807号明細書; 及び国際公開第97/17852号パンフレットを参照。ヒト抗体作製のためのマウスのXENOMOUSE(登録商標)株の使用が記載されている。Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156(1997)及びGreen and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495(1998)を参照されたい。XENOMOUSE(登録商標)株は、Amgen, Inc. (Fremont, Calif.)から入手可能である。マウスのXENOMOUSE(登録商標)株の作製及びこれらのマウスで生産された抗体については、以下の文献でさらに詳しく説明されている: 米国特許第6,673,986号明細書; 同第7,049,426号明細書; 同第6,833,268号明細書; 同第6,162,963号明細書、同第6,150,584号明細書、同第6,114,598号明細書、同第6,075,181号明細書、同第6,657,103号明細書; 同第6,713,610号明細書及び同第5,939,598号明細書; 米国特許出願公開第2004/0010810号明細書; 同第2003/0229905号明細書; 同第2004/0093622号明細書; 同第2005/0054055号明細書; 同第2005/0076395号明細書; 及び同第2006/0040363号明細書。別の手法では、GenPharm International, Inc., を含む他者は、「ミニ遺伝子座」手法を用いている。この手法は、米国特許第5,545,807号明細書; 同第5,545,806号明細書; 同第5,625,825号明細書; 同第5,625,126号明細書; 同第5,633,425号明細書; 同第5,661,016号明細書; 同第5,770,429号明細書; 同第5,789,650号明細書; 同第5,814,318号明細書; 同第5,877,397号明細書; 同第5,874,299号明細書; 同第6,255,458号明細書; 同第5,591,669号明細書; 同第6,023,010号明細書; 同第5,612,205号明細書; 同第5,721,367号明細書; 同第5,789,215号明細書; 同第5,643,763号明細書; 及び同第5,981,175号明細書に記載されている。また、Kirinも、大きな染色体片又は全染色体を微小核融合によって導入したマウスからのヒト抗体の作製を示している。米国特許第6,632,976号明細書を参照されたい。さらに、Medarexのミニ遺伝子座(Hamab)を含むKirinのTcマウスの交雑育種によ

20

30

40

50

って得られたKM(商標)マウスも作製されている。これらのマウスは、KirinマウスのヒトIgHトランスクロモソームと、Genpharmマウスの鎖トランスジーンとを有する(Ishida et al., Cloning Stem Cells, (2002) 4: 91-102)。ヒト抗体はまた、in vitro法によって得ることもできる。好適な例として、限定するものではないが、ファージディスプレイ(MedImmune(旧称CAT), Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion(旧称Proliferon), Affimed)リボソームディスプレイ(MedImmune(旧称CAT))、酵母ディスプレイなどがある。ファージディスプレイ技術(例えば、米国特許第5,969,108号明細書を参照)を用いて、非免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパトアからヒト抗体及び抗体フラグメントをin vitroで生産することができる。ファージディスプレイは、様々なフォーマットで実施することができ、例えば、Johnson, Kevin S.及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571(1993)に概要が記載されている。V-遺伝子セグメントの複数の供給源をファージディスプレイに用いることができる。例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628(1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991); Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734(1993);及び米国特許第5,565,332号明細書及び同第5,573,905号明細書を参照されたい。前述したように、ヒト抗体は、in vitroで活性化したB細胞によって作製してもよい(米国特許第5,567,610号明細書及び同第5,229,275号明細書を参照)。

10

20

30

40

50

#### 【0075】

##### 7.3.3 異種タンパク質及び抗原

一般に、本発明のモノマーポリペプチドが抗原結合部分を含む場合には、本発明のモノマーポリペプチドは目的の抗原に特異的に結合する。一実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、ポリペプチド抗原に特異的に結合する。別の実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、非ポリペプチド抗原に特異的に結合する。また別の実施形態では、本発明の一価ポリペプチドを疾患又は障害に罹患した哺乳動物に投与することによって、その哺乳動物に治療利益をもたらすことができる。

#### 【0076】

変異型Fc変異体部分を含む本発明の一価ポリペプチド(例えば、一価抗体、Fc融合タンパク質)により、ほぼあらゆる分子をターゲティングすることができ、及び/又は一価ポリペプチドに組み込むことができるが、このようなポリペプチドとして、限定するものではないが、以下に挙げるタンパク質、並びに以下に挙げるタンパク質に属するサブユニット、ドメイン、モチーフ及びエピトープがある：レニン；成長ホルモン、例えば、ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク質；-1-抗トリプシン；インスリンA鎖；インスリンB鎖；プロインスリン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；凝固因子、例えば、VII因子、VIIIC因子、IX因子、組織因子(TF)、及びフォンビルブラント因子；抗凝固因子、例えば、プロテインC；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；プラスミノゲンアクチベーター、例えば、ウロキナーゼ若しくはヒト尿又は組織型プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)；ボンベシン；トロニン；造血増殖因子；腫瘍壊死因子 及び ；エンケファリナーゼ；RANTES(血小板やT細胞由来の好酸球走化性物質：regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質(MIP-1-)；血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン；ミューラー管抑制物質；リラキシンA鎖；リラキシンB鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；微生物タンパク質、例えば、ラクタマーゼ；DNase；IgE；細胞傷害性Tリンパ球関連抗原(CTLA)、例えば、CT

LA - 4 ; インヒビン ; アクチビン ; 血管内皮増殖因子 ( VEGF ) ; 肝細胞増殖因子 ( HGF ) ; ホルモン又は増殖因子の受容体、例えば、EGFR、VEGFR、HGF-R ( cMETとしても知られる ) ; インターフェロン、例えば、インターフェロン ( - IFN )、インターフェロン ( - IFN ) 及びインターフェロン ( - IFN ) ; プロテインA又はD : リウマチ因子 ; 神経栄養因子、例えば、骨由来神経栄養因子 ( BDNF )、ニューロトロフィン - 3、- 4、- 5、若しくは - 6 ( NT - 3、NT - 4、NT - 5、若しくはNT - 6 )、又は神経成長因子 ; 血小板由来増殖因子 ( PDGF ) ; 線維芽細胞増殖因子、例えば、FGF及びFGF ; 上皮増殖因子 ( EGF ) ; TGF - 及びTGF - のようなトランスフォーミング増殖因子 ( TGF )、例えば、TGF - 1、TGF - 2、TGF - 3、TGF - 4、又はTGF - 5 など ; インスリン様増殖因子 - I 及び - II ( IGF - I 及びIGF - II ) ; デス ( 1 - 3 ) - IGF - I ( 脳IGF - I )、インスリン様成長因子結合タンパク質 ; CDタンパク質、例えば、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD14、CD18、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD40、CD40L、CD52、CD63、CD64、CD80及びCD147 ; TNF - 関連アポトーシス誘導リガンド ( TRAIL ) 受容体、例えば、細胞死受容体TRAIL - R1及びTRAIL - R5並びにデコイ受容体TRAIL - R3及びTRAIL - R5 ; エリトロポエチン ; 骨誘導因子 ; イムノトキシン ; 骨形成因子 ( BMP ) ; インターフェロン、例えば、インターフェロン - 、 - 、及び - ; コロニー刺激因子 ( CSF )、例えば、M - CSF、GM - CSF、及びG - CSF ; インターロイキン ( IL )、例えば、IL - 1 ~ IL - 13 ; TNF、スーパーオキシドジムスターゼ ; T細胞受容体 ; 表面膜タンパク質 ; 崩壊促進因子 ; ウイルス抗原、例えば、AIDS包膜の一部、例えば、gp120 ; 輸送タンパク質 ; ホーミング受容体 ; アドレシン ; 調節タンパク質 ; 細胞接着分子、例えば、LEA - 1、Mac1、p150.95、VLA - 4、ICAM - 1、ICAM - 3及びVCAM、a4 / p7インテグリン、及び(Xv / p3インテグリン ( その1以上のサブユニットを含む )、インテグリンサブユニット、例えば、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、7、8、9、D、CD11a、CD11b、CD51、CD11c、CD41、IIb、IELb ; インテグリンサブユニット、例えば、CD29、CD18、CD61、CD104、5、6、7及び8 ; インテグリンサブユニット組合せ、例えば、限定するものではないが、V3、V5、及び47 ; アミロイド ( A 又はAベータ ) ; アポトーシス経路のメンバー ; 血液型抗原 ; flk2 / flt3受容体 ; 肥満 ( OB ) 受容体 ; mpl受容体 ; CTLA - 4 ; プロテインC ; Eph受容体、例えば、EphA2、EphA4、EphB2など ; ヒト白血球抗原 ( HLA ) 例え、HLA - DR ; 補体タンパク質、例えば補体受容体CR1、C1Rq及びその他の補体因子、例えば、C3及びC5 ; 糖タンパク質受容体、例えば、GpIb、GPIIb / IIIa及びCD200 ; 並びに以上挙げたいずれかのポリペプチドのフラグメント。

#### 【0077】

癌抗原に特異的に結合する抗原結合部分を含む本発明の一価ポリペプチドも考慮され、限定するものではないが、以下のものを含む : ALK受容体 ( プレイオトロフィン受容体 )、プレイオトロフィン、KS1 / 4全癌抗原 ; 卵巣がん抗原 ( CA125 ) ; 前立腺酸性フォスフェート ; 前立腺特異的抗原 ( PSA ) ; 黒色腫関連抗原p97 ; 黒色腫抗原gp75 ; 高分子量黒色腫抗原 ( HMW - MAA ) ; 前立腺特異的膜抗原 ; 癌胎児性抗原 ( CEA ) ; 多形上皮ムチン抗原 ; ヒト乳脂肪球抗原 ; 結腸直腸腫瘍関連抗原、例えば、CEA、TAG - 72、CO17 - 1A、GIGA19 - 9、CTA - 1及びLEA ; パーキットリンパ腫抗原 - 38.13 ; CD19 ; ヒトBリンパ腫抗原 - CD20 ; CD33 ; 黒色腫特異的抗原、例えば、ガングリオシドGD2、ガングリオシドGD3、ガングリオシドGM2及びガングリオシドGM3 ; 腫瘍特異的移植型細胞表面抗原 ( TSTA ) ; ウイルス誘導腫瘍抗原、例えば、T抗原、DNA腫瘍ウイルス及びRNA腫瘍ウイルスの外膜抗原 ; 癌胎児性抗原 - - フェトプロテイン、例えば、結腸のCEA、5T4癌胎児

性栄養芽層糖タンパク質及び膀胱腫瘍癌胎児性抗原；分化抗原、例えば、ヒト肺癌抗原 L 6 及び L 2 0；線維肉腫の抗原、ヒト白血病 T 細胞抗原 - G p 3 7；ネオ糖タンパク質；スフィンゴ脂質；乳癌抗原、例えば、E G F R（上皮増殖因子受容体）；N Y - B R - 1 6；H E R 2 抗原（p 1 8 5 H E R 2）；多形上皮ムチン（P E M）；悪性ヒトリンパ球抗原 - A P O - 1；分化抗原、例えば、胎児赤血球に存在する I 抗原；成人赤血球に存在する一次内胚葉 I 抗原；着床前胚；胃腺癌に存在する I（M a）；乳房上皮に存在する M 1 8、M 3 9；骨髓性細胞に存在する S S E A - 1；V E P 8；V E P 9；M y 1；V I M - D 5；結腸直腸癌に存在する D 1 5 6 - 2 2；T R A - 1 - 8 5（血液型 H）；精巣及び卵巣癌に存在する S C P - 1；結腸腺癌に存在する C 1 4；肺腺癌に存在する F 3；胃癌に存在する A H 6；Y ハプテン；胚性癌細胞に存在する L e y；T L 5（血液型 A）；A 4 3 1 細胞に存在する E G F 受容体；膵臓癌に存在する E 1 シリーズ（血液型 B）；胚性癌細胞に存在する F C 1 0 . 2；胃腺癌抗原；腺癌に存在する C O - 5 1 4（血液型 L e a）；腺癌に存在する N S - 1 0；C O - 4 3（血液型 L e b）；A 4 3 1 細胞の E G F 受容体に存在する G 4 9；結腸腺癌に存在する M H 2（血液型 A L e b / L e y）；結腸癌に存在する 1 9 . 9；胃癌ムチン；骨髓性細胞に存在する T 5 A 7；黒色腫に存在する R 2 4；胚性癌細胞に存在する 4 . 2、G D 3、D 1 . 1、O F A - 1、G M 2、O F A - 2、G D 2、及び M 1 : 2 2 : 2 5 : 8 並びに 4 ~ 8 期胚に存在する S S E A - 3 及び S S E A - 4；皮膚 T 細胞リンパ腫抗原；M A R T - 1 抗原；S i a l y T n（S T n）抗原；結腸癌抗原 N Y - C O - 4 5；肺癌抗原 N Y - L U - 1 2 変異体 A；腺癌抗原 A R T 1；腫瘍随伴性脳 - 精巣 - 癌抗原（腫瘍と神経細胞の共通抗原 M A 2；傍腫瘍性神経抗原）；神経腫瘍腹側抗原 2（N e u r o - o n c o l o g i c a l v e n t r a l a n t i g e n 2）（N O V A 2）；肝細胞癌抗原遺伝子 5 2 0；腫瘍関連抗原 C O - 0 2 9；腫瘍関連抗原 M A G E - C 1（癌 / 精巣抗原 C T 7）、M A G E - B 1（M A G E - X P 抗原）、M A G E - B 2（D A M 6）、M A G E - 2、M A G E - 4 a、M A G E - 4 b 及び M A G E - X 2；及び癌 - 精巣抗原（N Y - E O S - 1）；並びに上に挙げたポリペプチドのいずれかのフラグメント。

10

20

30

40

50

#### 【0078】

いくつかの具体的実施形態では、変異型 F c 領域を含む本発明の一価ポリペプチド（例えば、一価抗体、F c 融合タンパク質）は、c M E T 若しくは T R A I L - R 2 若しくは V E G F を含むか、又はこれらに結合する。

#### 【0079】

##### 7.4 モノマーポリペプチドコンジュゲート

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、当該技術分野で公知の方法を用いて、ある物質に結合しているか、又は共有結合している。一実施形態では、結合させる物質は、治療薬、検出可能な標識（本明細書では、リポーター分子とも呼ばれる）又は固体支持体である。モノマーポリペプチドとの結合に好適な物質としては、限定するものではないが、以下のものがある：アミノ酸、ペプチド、タンパク質、多糖、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ハプテン、薬物、ホルモン、脂質、脂質集合体、合成ポリマー、ポリマー微粒子、生物細胞、ウイルス、発蛍光団、発色団、色素、毒素、酵素、放射性同位元素、固体マトリクス、半固体マトリクス及びこれらの組合せ。別の物質をモノマーポリペプチドに結合又は共有結合させる方法は、当該技術分野では公知である。

#### 【0080】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドを固体支持体に結合する。モノマーポリペプチドは、スクリーニング及び / 又は精製及び / 又は製造工程の一環として固体支持体に結合させてもよい。あるいは、本発明のモノマーポリペプチドは、診断法又は組成物の一部分として固体支持体に結合させてもよい。本発明での使用に好適な固体支持体は、概して、液相中に実質的に不溶性である。多数の支持体を利用可能であり、当業者には周知である。従って、固体支持体としては、固体及び半固体マトリクス、例えば、エーロゲル及びヒドロゲル、樹脂、ビーズ、バイオチップ（薄膜被覆バイオチップなど）

、マイクロ流体チップ、シリコンチップ、マルチウェルプレート（マイクロタイタープレート又はマイクロプレート）、膜、導電性及び非導電性金属、ガラス（顕微鏡スライドを含む）及び磁気支持体などがある。固体支持体のさらに具体的な例としては、以下のものがある：シリカゲル、ポリマー膜、粒子、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲル、Sepharoseのような多糖、ポリ（アクリレート）、ポリスチレン、ポリ（アクリルアミド）、ポリオール、アガロース、アガー、セルロース、デキストラン、デンプン、FICOLL、ヘパリン、グリコーゲン、アミロペクチン、マンナン、イヌリン、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン（ポリ（エチレングリコール）など）、ナイロン、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、常磁性ビーズ、超常磁性ビーズ、デンプンなど。

10

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、固体支持体は、本発明のモノマーポリペプチドを結合するために、反応性官能基を含んでいてもよく、こうした基として、限定するものではないが、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、チオール、アルデヒド、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミノ、尿素、炭酸塩、カルバミド酸塩、イソシアン酸塩、スルホン、スルホン酸塩、スルホンアミド、スルホキシドなどがある。

#### 【0082】

好適な固相支持体を所望の最終用途及び様々な合成プロトコルについての好適性に基づいて選択することができる。例えば、本発明のモノマーポリペプチドと固体支持体とを結合するのに、アミド結合形成が望ましい場合には、ペプチド合成に一般に用いられる樹脂を用いることができ、こうした樹脂として、例えば、以下のものがある：ポリスチレン（例：Bachem Inc.、Peninsula Laboratoriesなどから得られるPAM-樹脂）、POLYHIPE（商標）樹脂（Aminotech, Canadaから得られる）、ポリアミド樹脂（Peninsula Laboratoriesから得られる）、ポリエチレングリコールでグラフティングしたポリスチレン樹脂（TENTAGEL（商標）、Rapp Polymere, Tubingen, Germany）、ポリジメチル-アクリルアミド樹脂（Milligen/Biosearch, California）、又はPEGABEES（Polymer Laboratoriesから得られる）。

20

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチド及び/又はその関連リガンドを検出する診断及びその他のアッセイの目的で、本発明のモノマーポリペプチドを標識に結合する。モノマーポリペプチドに結合して、本明細書に記載する本方法及び組成物で用いる標識は、280nmより大きい波長で最大の吸光を呈示すると共に、モノマーポリペプチドに共有結合したとき、その分光特性を保持する、有機又は無機の任意の化学部分である。標識としては、限定するものではないが、発色団、発蛍光団、蛍光タンパク質、りん光色素、タンデム色素、粒子、ハプテン、酵素及び放射性同位元素がある。

30

#### 【0084】

いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドを酵素標識に結合させる。酵素は、検出可能なシグナルの増幅が得られ、これによりアッセイ感度が高くなるため、望ましい標識である。いくつかのアッセイでは、化学発光を発生する酵素及びその適切な脂質が好ましい。これらには、限定するものではないが、ルシフェラーゼ及びエクオリンの天然及び組換え形態が含まれる。

40

#### 【0085】

別の実施形態では、モノマーポリペプチドをハプテン、例えば、ビオチンに結合させる。ビオチンは、酵素系において、検出可能なシグナルをさらに増幅するように作用することができ、また、単離の目的で、アフィニティークロマトグラフィーに用いられるタグとして作用することができるため、有用である。検出を目的として、ビオチンに対し親和性を有する酵素コンジュゲート、例えば、アビジン-HRPを用いる。次に、ペルオキシダーゼ基質を添加して、検出可能なシグナルを生成する。

50

## 【0086】

いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドを蛍光タンパク質標識に結合させる。蛍光タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）及びフィコビリントタンパク質及びその誘導体がある。蛍光タンパク質、特にフィコビリントタンパク質は、タンデム色素標識ラベル化剤を作製するのにとくに有用である。

## 【0087】

いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドを放射性同位元素に結合させる。好適な放射性材料としては、限定するものではないが、以下のものがある：ヨウ素（ $^{121}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、イオウ（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{111}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{113}\text{mIn}$ 、 $^{115}\text{mIn}$ ）、テクネチウム（ $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ $^{201}\text{Ti}$ ）、ガリウム（ $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ ）、パラジウム（ $^{103}\text{Pd}$ ）、モリブデン（ $^{99}\text{Mo}$ ）、キセノン（ $^{135}\text{Xe}$ ）、フッ素（ $^{18}\text{F}$ ）、 $^{153}\text{SM}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 及び $^{97}\text{Ru}$ 。

## 【0088】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、ポリペプチドの薬物動力学的特性を高める部分、例えば、非タンパク質性ポリマー又は血清アルブミンと結合してもよい。一実施形態では、モノマーポリペプチドをポリマー、例えば、ポリエチレングリコール（「PEG」）、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンに、米国特許第4,640,835号明細書；同第4,496,689号明細書；同第4,301,144号明細書；同第4,670,417号明細書；同第4,791,192号明細書又は同第4,179,337号明細書に記載の方法で結合する。「PEG」という用語は、PEGのサイズ又はその末端での修飾とは無関係に、広範に用いられて、あらゆるポリエチレングリコール分子を包含し、式： $\text{X}-\text{O}(\text{CHO}_2\text{CHO}_2\text{O})_{n-1}\text{CHO}_2\text{CHO}_2\text{OH}(1)$ （式中、 $n$ は、20～2300であり、 $X$ は、 $\text{H}$ 又は末端修飾、例えば、 $\text{C}_{1-4}$ アルキルである）により表すことができる。一実施形態では、PEGは、一端においてヒドロキシ又はメトキシで終了してもよく、すなわち、 $X$ は $\text{H}$ 又は $\text{CH}_3$ である（「メトキシPEG」）。PEGは、さらに別の化学基：反応に結合するのに必要な化学基；分子の化学合成から生じる化学基；又は分子部分の最適距離のためのスペーサーである化学基を含んでもよい。さらに、PEGは、互いに連結された1つ以上のPEG側鎖からなるものであってもよい。2つ以上のPEG鎖を有するPEGは、マルチアーム又は分枝PEGと呼ばれる。分枝PEGは、例えば、様々なポリオール（例えば、グリセロール、ペンタエリトリオール、及びソルビトールなど）にポリエチレンオキシドを添加することによって調製することができる。例えば、4アーム分子PEGは、ペンタエリトリオールとエチレンオキシドから調製することができる。当業者であれば、どのようにペギル化結合ポリペプチドを治療に用いるのか、所望の投薬量、循環時間、タンパク質分解耐性、免疫原性、及びその他の考慮事項に基づいて、PEGの好適な分子量を選択することができる。タンパク質の特性を高めるためのPEG及びその使用についての論考は、N. V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114 (1993)を参照されたい。

## 【0089】

当該技術分野で公知の技術を用いて、本発明のモノマーポリペプチドにPEGを結合させることができる。例えば、ペプチド又はタンパク質とPEGの結合は、一般に、PEGの活性化後、活性化PEGを標的タンパク質／ペプチド又はリンカーに直接連結させることを含み、リンカーは、後に活性化させて標的タンパク質／ペプチドに連結させる（Abuchowski, A. et al, J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977) 及び J. Biol. Chem., 252, 3582 (1977), Zalipsky, et al., 及び Harris et al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Bio

10

20

30

40

50

medical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap. 21 及び 22 を参照のこと)。

【0090】

7.5 核酸

前述したアミノ酸配列に加えて、本発明はさらに、変異型Fc領域を含む本発明のモノマーポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を提供する。従って、本発明はまた、本明細書に記載するモノマーポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、さらには、細胞（例えば、哺乳動物細胞）におけるその効率的発現のためのポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターも提供する。本発明はまた、こうしたポリヌクレオチド及び発現ベクターを含有する宿主細胞、並びに本明細書に記載のポリヌクレオチドを用いて、モノマーポリペプチドを作製する方法も提供する。上記のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の構造的及び/又は機能的特徴を有するモノマーポリペプチドをコードする。

10

【0091】

本発明はまた、例えば、本明細書で定義するように、ストリンジェントな、又はより低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、本発明のモノマーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。本明細書で用いる「ストリンジェンシー」という用語は、ハイブリダイゼーション実験の実験条件（例えば、温度及び塩濃度）を指し、プローブとフィルター結合核酸との間の相同性の程度を示すものであり；ストリンジェンシーが高いほど、プローブとフィルター結合核酸との間の相同性は高い。

20

【0092】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、限定するものではないが、約45 で6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中のフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションの後、約50~65 で0.2X SSC/0.1%SDS中で1回以上の洗浄；高度にストリンジェントな条件、例えば、約45 で6X SSC中のフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションの後、約65 で0.1X SSC/0.2%SDS中で1回以上の洗浄；又は当業者には公知のその他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件がある（例えば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. 及び John Wiley and Sons, Inc., NY、ページ6.3.1~6.3.6及び2.10.3を参照のこと）。

30

【0093】

当該技術分野では公知の任意の方法によって本発明のポリヌクレオチドを取得し、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。例えば、モノマーポリペプチドの全部又は一部のヌクレオチド配列が既知である場合には、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、化学的に合成したオリゴヌクレオチドから組織化してもよい（例えば、Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)に記載のように）。手短には、これは、ポリペプチドをコードする配列の一部を含む重複オリゴヌクレオチドを合成し、これらオリゴヌクレオチドをアニーリングして、連結した後、連結したオリゴヌクレオチドをPCRにより増幅することを含む。

40

【0094】

モノマーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、好適な供給源由来の核酸から作製することもできる。特定のポリペプチドをコードする核酸を含むクローンは入手できないが、ポリペプチド分子の配列がわかっている場合には、ポリペプチドをコードする核酸を化学的に合成してもよいし、好適な供給源から取得してもよい（例えば、cDNAライブラリー、又は上記配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いたPCR増幅により、若しくは、例えば、cDNAライブラリーから、ポリペプチドをコードするcDNAクローンを識別するための特定の遺伝子配列に特異的なオリゴ

50



ヌクレオチドプローブを用いるクローニングによって、ポリペプチドを発現する任意の組織又は細胞から作製したcDNAライブラリー、又はそれらから単離した核酸、好ましくはポリA+RNA。次に、PCRにより生産した増幅核酸は、当該技術分野では公知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローン化することができる。

#### 【0095】

ポリペプチドのヌクレオチド配列、及び対応するアミノ酸配列を決定したら、当該技術分野では公知のヌクレオチド配列の操作方法、例えば、組換えDNA技法、部位指定突然変異誘発、PCRなど（例えば、以下の文献に記載の技法を参照されたい：Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 及び Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY）を用いて、ヌクレオチド配列を操作することにより、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを作製する、例えば、Fc領域におけるアミノ酸置換、欠失、及び/又は挿入を形成することができる。

10

#### 【0096】

##### 7.6 ベクター、宿主細胞、及びポリペプチド生産

本明細書では、本発明のモノマーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターも提供される。一例示の実施形態では、本明細書に記載のモノマーポリペプチドをコードする核酸を発現ベクターに組み込むことによって、好適な宿主細胞において上記モノマーポリペプチドを発現させることができる。様々な発現ベクターをモノマーポリペプチドの発現に使用してよい。発現ベクターとしては、自己複製の染色体外ベクター又は宿主ゲノムに組み込まれるベクターが挙げられる。発現ベクターは、宿主細胞型と適合するように構築する。従って、本発明で有用となる発現ベクターとしては、限定するものではないが、哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞、酵母、及びin vitro系においてモノマーポリペプチド発現を可能にするものがある。当該技術分野では周知のように、本発明のモノマーポリペプチドを発現するのに有用となりうる様々な発現ベクターが市場又はその他で入手可能である。

20

#### 【0097】

発現ベクターは、概して、モノマーポリペプチドのコード配列を含むが、この配列は、制御若しくは調節配列、選択マーカー、及び/又は別のエレメントに機能的に連結している。本明細書において、「機能的に連結している」とは、モノマーポリペプチドの核酸配列が、別の核酸配列と機能的関係にあるように配置されていることを意味する。一般に、これらの発現ベクターは、モノマーポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されており、概して、タンパク質を発現するのに用いられる宿主細胞に適している。一般に、転写及び翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列、並びにエンハンサー又はアクチベーター配列を含んでもよい。当該技術分野では周知のように、発現ベクターは、一般に、選択遺伝子又はマーカーを含んでおり、これによって、発現ベクターを含有する形質転換宿主細胞の選択が可能になる。選択遺伝子は、当該技術分野で公知であり、用いる宿主細胞によって異なる。

30

40

#### 【0098】

本出願はまた、モノマーポリペプチドをコードする核酸、ベクター又は発現ベクターを含む宿主細胞、及びモノマーポリペプチドの発現のための宿主細胞の使用も提供する。ベクター中のポリヌクレオチドを発現するのに適した宿主細胞としては、原核細胞、酵母、又はより高等な真核細胞がある。この目的に適した原核生物としては、真正細菌、例えば、グラム陰性又はグラム陽性細菌、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) のような腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) がある。真核微生物、例えば、糸状菌又は酵母も好適な宿主細胞であり、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*)、ピキア属 (*Pichia*)、米国特許第7326681

50

号明細書などがある。グリコシル化ポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物、例えば、植物細胞（例：米国特許出願公開第20080066200号明細書）、無脊椎動物細胞、及び脊椎動物細胞に由来する。グリコシル化モノマーポリペプチドの発現のための無脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞、例えば、Sf21/Sf9、イラクサギンウワバBti-Tn5b1-4がある。有用な脊椎動物細胞の例としては、ニワトリ細胞（例：国際公開第2008142124号パンフレット）及び哺乳動物細胞、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、又はげっ歯類、例えば、ウサギ、ラット、ミンク若しくはマウス細胞がある。

#### 【0099】

組換えポリペプチドの発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は当該技術分野では周知であり、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多数の不活化細胞系があり、限定するものではないが、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞 (例：Hep G2)、ヒト上皮腎293細胞、及びいくつかの他の細胞系が含まれる。様々な宿主細胞が、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセッシング及び修飾に固有の、かつ特異的な機構を有している。モノマーポリペプチドの適正な修飾及びプロセッシングを確実にするために、適切な細胞系又は宿主系を選択することができる。このため、遺伝子産物の一次転写物、グリコシル化、及びリン酸化の適正なプロセッシングのための細胞機構を有する真核宿主細胞を用いることができる。こうした哺乳動物細胞として、限定するものではないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20及びT47D、NS0（機能性免疫グロブリン鎖を内因的に産生しないマウス骨髄腫細胞系）、SP20、CRL7030及びHsS78Bst細胞がある。一実施形態では、ヒトリンパ球を不活化させることによって作製したヒト細胞系を用いて、モノマーポリペプチドを組換えにより生産することができる。一実施形態では、ヒト細胞系PER.C6. (CruCell, Netherlands) を用いて、モノマーポリペプチドを組換えにより生産することができる。

#### 【0100】

また、本発明の核酸及び宿主細胞を用いて、モノマーポリペプチドを生産する方法も提供される。モノマーポリペプチドの組換え発現には、一般に、モノマーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築が必要である。次に、従来の方法で発現ベクターを宿主細胞に転移させた後、トランスフェクトした細胞を従来の方法で培養することにより、モノマーポリペプチドを生産する。モノマー抗体を発現させる場合には、全重鎖及び軽鎖配列（変異型Fc領域を含む）を、同じ、又は異なる発現カセットから発現させてもよいし、これらの配列を1つ以上のベクターに含有させてもよい。

#### 【0101】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、モノマーポリペプチドの安定発現を含む細胞系において発現させる。安定発現は、組換えタンパク質の長期の高収率生産のために用いることができる。例えば、モノマーポリペプチド分子を安定して発現する細胞系を作製してもよい。発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位など）及び選択マーカー遺伝子を含む、適切に作製されたベクターで、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAの導入後、濃縮培地において1～2日にわたり細胞を増殖させてから、選択培地に移す。組換えプラスミド内の選択マーカーは、選択に対する耐性を賦与することから、染色体にプラスミドを安定に組み込んだ細胞を増殖させて、フォーカスを形成し、次に、これらのフォーカスをクローン化し、細胞系へと増殖させることができる。高収率の安定な細胞系を生産する方法は、当該技術分野では公知であり、試薬は一般に市販のものが入手可能である。

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、モノマーポリペプチドの一過性発現を含む細胞系において発現させる。一過性トランスフェクションは、細胞に導

10

20

30

40

50

入した核酸が、その細胞のゲノム又は染色体DNAに組み込まれないプロセスである。これは、実際、細胞内で、染色体外エレメント、例えば、エピソームとして維持される。エピソームの核酸の転写プロセスは影響を受けないため、エピソームの核酸によってコードされたタンパク質が生産される。

#### 【0103】

細胞系は、安定な細胞系又は一過性トランスフェクト細胞系のいずれも、当該技術分野では公知の細胞培地及び条件で維持することにより、モノマーポリペプチドの発現及び生産が達成される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞培地は、市販の培地調製物、例えば、DMEM又はHam's F12を基材とする。別の実施形態では、細胞培地は、細胞増殖及び生物学的タンパク質発現の両方の増加を支持するように修飾する。本明細書で用いるように、「細胞培地」、「培養基」、及び「培地組成物」という用語は、多細胞生物又は組織外部の人工的*in vitro*環境における細胞の維持、成長、増殖、又は拡大のための栄養溶液を指す。細胞培地は、具体的な細胞培養の用途に合わせて最適化することができ、このような用途として、例えば、細胞の増殖を促進するように調製された細胞培養物増殖培地、又は組換えタンパク質生産を促進するように調製された細胞培養物生産培地などがある。栄養素、構成材料、及び成分という用語は、本明細書では置換え可能に用いられ、いずれも、細胞培地を組成する成分を指す。

10

#### 【0104】

組換え発現によってモノマーポリペプチド分子を生産したら、ポリペプチドを精製するための当該技術分野では公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例：イオン交換、アフィニティー、及びサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、又はタンパク質の精製のための他の標準的技法によって精製してよい。さらに、本発明のモノマーポリペプチドを異種ポリペプチド配列（例えば、「タグ」）に融合させて、精製を促進することも可能である。こうしたタグの例として、例えば、ポリヒスチジンタグ、HAタグ、c-mycタグ、又はFLAGタグがある。アフィニティー精製法で用いることができるこのようなタグに結合する抗体は市販されている。

20

#### 【0105】

組換え技術を用いる場合には、モノマーポリペプチドを細胞内で、すなわち細胞周辺腔内に生産することもできるし、又は培地に直接分泌させることもできる。モノマーポリペプチドを細胞内で生産する場合には、第1ステップとして、粒子状破片（宿主細胞又は溶解フラグメントのいずれでも）を、例えば、遠心分離又は限外ろ過により除去する。Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)は、大腸菌(*E. coli*)の細胞周辺腔内に分泌されるポリペプチドを単離する方法を記載している。モノマーポリペプチドを培地に分泌させる場合には、一般に、こうした発現系からの上清をまず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon限外ろ過ユニットを用いて濃縮させる。タンパク質分解を阻害するために、PMSFのようなプロテアーゼインヒビターを前述のステップのいずれかで含有させてもよいし、また、外来の混入物の増殖を防止するために、抗生物質を含有させてもよい。

30

#### 【0106】

#### 7.7 医薬製剤

いくつかの態様では、本発明は、本発明のモノマーポリペプチドと薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物中、変異型Fcドメインを含むポリペプチドの少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%がモノマーである。いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドのパーセントは、SEC-MALLSによって決定される。いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドのパーセントは、AUCによって決定される。特定の実施形態では、モノマーポリペプチドのパーセントは、以下に記載する実施例で説明するようなSEC-MALLS及び/又はAUCによって決定される。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、薬剤として用いられる。

40

50

## 【0107】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドは、薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤と一緒に、医薬（治療用）組成物として製剤化することができ、当該技術分野では公知の様々な方法によって投与することができる。当業者には理解されるように、投与の経路及び／又は方式は、所望する結果に応じて異なる。本明細書で用いられるように、モノマーポリペプチドを含む医薬製剤は、本発明の製剤と呼ぶ。「薬学的に許容可能な担体」という用語は、活性成分の生物活性の効果を妨害しない1種以上の無毒性材料を意味する。こうした製剤は、一般的に、塩類、緩衝剤、保存料、適合性担体、及び任意でその他の治療薬を含みうる。このような薬学的に許容可能な製剤は、また、一般的に、ヒトへの投与に好適な適合性固体又は液体充填剤、希釈剤又はカプセル化物質も含みうる。本発明の製剤に用いることができる他に考慮される担体、賦形剤、及び／又は添加剤としては、例えば、芳香剤、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、帯電防止剤、脂質、タンパク質賦形剤、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン、塩形成カウンターイオン、例えば、ナトリウムなどがある。本発明の製剤での使用に好適な上記及びその他の公知の医薬用担体、賦形剤及び／又は添加剤は当該技術分野では公知であり、例えば、“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 21<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005), 及び“Physician's Desk Reference”, 60<sup>th</sup> ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2005)に記載されているものがある。薬学的に許容可能な担体は、当業者には周知のように、また、本明細書でも記載するように、モノマーポリペプチドの投与方式、溶解性及び／又は安定性について好適なものを選択することができる。

10

20

## 【0108】

本発明の製剤は、所望の用量について適切なw/vをもたらず濃度のモノマーポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドは、約1mg/ml～約200mg/ml、約1mg/ml～約100mg/ml、約1mg/ml～約50mg/ml、又は1mg/ml～約25mg/mlの濃度で本発明の製剤中に存在する。いくつかの実施形態では、製剤中のモノマーポリペプチドの濃度は、約0.1～約100重量%まで変動しうる。いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチドの濃度は、0.003～1.0モルの範囲である。

30

## 【0109】

一実施形態では、本発明の製剤は、発熱物質除去製剤であり、内毒素及び／又は関連発熱物質を実質的に含まない。内毒素は、微生物内部に閉じ込められた毒素を含み、この毒素は、微生物が分解されるか、死滅したときにのみ放出される。発熱物質はまた、細菌及びその他の微生物の外膜に由来する熱誘発性の熱安定性物質（糖タンパク質）も含む。これらの物質のいずれも、ヒトに投与すると、熱、高血圧及びショックを引き起こす。潜在的な有害作用があるため、たとえ少量の内毒素であっても、静脈内投与用医薬剤溶液からは除去しなければならない。The Food & Drug Administration（「FDA」）は、静脈内の薬剤適用の場合、1時間に体重1kg当たりの用量につき5内毒素単位（EU）の上限を設定している（The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26（1）: 223（2000））。いくつかの具体的実施形態では、組成物中の内毒素及び発熱物質レベルは、10EU/mgより低い、又は5EU/mgより低い、又は1EU/mgより低い、又は0.1EU/mgより低い、又は0.01EU/mgより低い、又は0.001EU/mgより低い。

40

## 【0110】

in vivo投与に用いる場合には、本発明の製剤は滅菌してなければならない。本発明の製剤は、様々な滅菌方法で滅菌してよく、滅菌方法として、滅菌ろ過、照射などがある。一実施形態では、モノマーポリペプチド製剤は、予め滅菌した0.22ミクロンフィルターでフィルター滅菌する。注射用の滅菌組成物は、“Remington: The

50

Science & Practice of Pharmacy”, 21<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005)に記載の通常の薬務に従って製剤化することができる。

#### 【0111】

本発明の治療用組成物は、特定の投与経路、例えば、経口、鼻、肺、局所（口腔及び舌下など）、直腸、膣及び／又は非経口投与のために製剤化することができる。本明細書で用いる「非経口投与」及び「非経口的に投与される」というフレーズは、腸及び局所投与以外の投与様式を指し、通常、注射によるものであり、こうした投与様式として、限定するものではないが、静脈内、筋内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内注射及び注入がある。局所又は経皮投与に好適な本発明の製剤としては、粉末、噴霧、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤がある。活性化合物を滅菌条件下で、薬学的に許容可能な担体、及び必要に応じて任意の防腐剤、バッファー、又は噴射剤と混合してもよい（米国特許第7,378,110号明細書；同第7,258,873号明細書；同第7,135,180号明細書；米国特許出願公開第2004-0042972号明細書；及び同第2004-0042971号明細書）。

10

#### 【0112】

製剤は、単位投薬形態をしているのが便利であり、薬学の分野で公知の任意の方法で調製することができる。本発明の医薬組成物で活性の成分の実際の投薬レベルは、患者に対して毒性にならずに、具体的な患者、組成物、及び投与様式についての所望する治療応答を達成するのに有効な活性成分の量（例えば、「治療有効量」）が得られるように、変動しうる。選択される投薬レベルは、様々な薬物動力学的要因、例えば、使用する本発明の具体的組成物の活性、投与経路、投与時間、使用する具体的化合物の排出速度、治療期間、使用する具体的組成物と組み合わせて用いられる他の薬物、化合物及び／又は材料、治療する患者の年齢、性別、体重、病態、健康状態、及び病歴、並びに医学分野で周知の類似要因がある。好適な投薬量は、約0.0001～100mg/kg（体重）以上、例えば、0.1、1、10、又は50mg/kg（体重）以上、約1～約10mg/kg（体重）が好ましい。

20

#### 【0113】

##### 7.8 用途例

本明細書に記載のモノマーポリペプチドは、診断及び／又は治療目的に用いることができる。いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチド及びその組成物は、細胞及び組織において標的発現を検出する目的で、又は標的発現細胞及び組織をイメージングする目的でin vivo及び／又はin vitroで用いることができる。例えば、いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドは、生きているヒトの患者における標的発現をイメージングするのに用いることができる、変異型Fc領域を含むモノマー抗体である。

30

#### 【0114】

例として、診断のための使用は、例えば、試験しようとするサンプルを、任意で対照サンプルと一緒に、モノマー抗体と標的同一の複合体の形成を可能にする条件下で、モノマー抗体と接触させることによって達成することができる。次いで、複合体形成を検出する（例えば、ELISAを用いて、又はモノマー抗体と結合した部分を検出するためのイメージングにより）。試験サンプルと一緒に対照サンプルを用いる場合には、両サンプルにおいて複合体を検出し、サンプル同一の複合体の形成に統計的に有意な差があれば、試験サンプル中の標的の存在を示している。

40

#### 【0115】

一実施形態では、本発明は、標的を含有することが疑われるサンプル中の標的の存在を決定する方法を提供し、前記方法は、本発明のモノマー抗体にサンプルを暴露するステップと、モノマー抗体とサンプル中の標的との結合を決定するステップを含み、モノマー抗体とサンプル中の標的との結合は、サンプル中の標的の存在を示すものである。一実施形

50

態では、サンプルは生体サンプルである。

【0116】

いくつかの実施形態では、*in vivo* 診断アッセイを用いて、標的の過剰発現又は増幅を検出するのに、モノマー抗体を用いることができる。一実施形態では、モノマー抗体をサンプルに添加し、モノマー抗体を、検出しようとする標的に結合させて、検出可能な標識（例えば、放射性同位元素又は蛍光標識）でタグ付けし、標識の定位のために患者を外部からスキャンする。

【0117】

これに代わり、又はこれに加えて、FISHアッセイ、例えば、INFORM（商標）（Ventana, Ariz. により販売）又はPATHVISION（商標）（Vysis, Ill.）を、ホルマリン固定したパラフィン包埋組織上で実施して、サンプルにおける標的発現又は過剰発現の程度（もしあれば）を決定する。

10

【0118】

いくつかの実施形態では、本発明のモノマーポリペプチド及びその組成物は、必要とする被検者に、疾患／障害／病態の予防及び／又は治療を目的として投与することができる。本発明は、標的関連の、又は追発した疾患／障害／病態を予防、治療、維持、軽減、若しくは阻害する、並びに／又は哺乳動物における疾患の1つ以上の症状を予防及び／若しくは軽減する方法であって、哺乳動物に治療有効量のモノマーポリペプチドを投与することを含む、上記方法を含む。モノマーポリペプチド組成物は、医師の指示に従い、短期（急性）若しくは長期、又は断続的に投与することができる。

20

【実施例】

【0119】

8. 例証

以下の実施例により本発明の実施を説明する。これらの実施例は、本発明の全範囲を制限又は限定することを意図するものではない。

【0120】

8.1 実施例1：ヒンジ欠失IgG4ベクターの作製

野生型ヒトIgG4定常ドメインの12アミノ酸ヒンジ領域を以下のようにして除去した：IgG4発現ベクターpEU8.2は、初め参考文献[1]に記載される重鎖発現ベクターから得たものであり、哺乳動物細胞において全IgG重鎖を発現するためのヒト重鎖定常領域及び調節エレメントを含む。このベクターは、単純にOriPエレメントを導入することによって改変した。ヒンジ領域上流の5'イントロンと、ヒンジ領域のすぐ下流の3'イントロン配列とにフランキングするオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。次に、参考文献[2]に記載の標準的突然変異誘発技法を用いて、上流のイントロンと12アミノ酸ヒンジ領域を除去した。配列において予想される420bp欠失をDNA配列決定によって確認した。新規のベクターをpEU8.2 ヒンジと称する。

30

【0121】

8.2 実施例2：ヒンジ欠失IgG4分子の作製

8.2.1 実施例2a：抗細胞表面受容体抗体6のpEU8.2 ヒンジへのサブクローニング

40

抗細胞表面受容体抗体（「抗体6」と称する）のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインをベクターpEU8.2 ヒンジ及びpEU4.4ベクターにそれぞれサブクローン化した。V<sub>H</sub>ドメインを、ヒト重鎖4定常ドメイン（但し、12アミノ酸ヒンジ領域は除去した）と、調節エレメントとを含むベクター（pEU8.2 ヒンジ）にクローン化して、哺乳動物細胞に全IgG重鎖を発現させた。同様に、ヒト軽鎖（ ）定常ドメイン及び調節エレメントの発現用のベクター（pEU4.4）にV<sub>L</sub>ドメインをクローン化して、哺乳動物細胞に全IgG軽鎖を発現させた。IgGを得るために、ベクターを発現する重鎖及び軽鎖IgGをEBNA-HEK293哺乳動物細胞にトランスフェクトした。IgGを発現させて、培地に分泌させた。回収物をプールし、ろ過してから精製した後、プロテインAクロマトグラフィーを用いて、IgGを精製した。培養上清をCeramic Protein

50

A (BioSeptra) の適切なサイズのカラムにロードし、50 mM Tris - HCl pH 8.0、250 mM NaCl で洗浄した。0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 3.0) を用いて、結合 IgG をカラムから溶離した後、Tris - HCl (pH 9.0) の添加により中和した。溶離した物質を、Nap10 カラム (Amersham, #17-0854-02) を用いて、PBS にバッファー交換した後、IgG のアミノ酸配列に基づく吸光係数を用いて、IgG の濃度を分光測光法により決定した。SEC - HPLC 及び SDS - PAGE により、精製 IgG を凝集及び分解について分析した。

#### 【0122】

8.2.2 実施例 2b: Multi Angle Laser Light Scattering (SEC - MALLS) と組み合わせたサイズ置換クロマトグラフィーによる抗体 6IgG4 ヒンジ分子の特性決定

Multi Angle Laser Light Scattering (SEC - MALLS) と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィーは、バイオポリマーの正確な分子サイズを決定するための非常に高感度の技術である。このシステムを用いて、抗体 6IgG4 野生型と比較した抗体 6IgG4 ヒンジ分子の分子量を決定した。100 µl サンプルをまず、BioSep - SEC - S4000 カラム (300 × 7.8 mm、Phenomenex 部品番号 00H - 2147 - K0、通し番号 389524 - 11) を用いて分析したが、上記カラムは、Agilent HP1100 HPLC により毎分 1.0 mL の Dulbecco's PBS で平衡した。Diode Array Detector (DAD) からの 220 及び 280 nm シグナルを用いて、ピークを検出した。HP1100 DAD 検出器からの溶出液を Wyatt Technologies DAWN EOS 及び Optilab rEX 検出器 (それぞれ、Multiple Angle Light Scattering 及び Refractive Index 検出器) に通過させた。これら検出器からの出力を ASTRA V (5.1.9.1) ソフトウェアを用いて処理した。0.184 の屈折率増分 (dn/dc) 値を用いた (グリコシル化 IgG が、約 2.5 質量% のグリカンをもつと想定して計算した)。D - PBS 平衡カラムからの検出器 11 (90°) バックグラウンド光散乱値は、< 0.35 ボルトであった。

#### 【0123】

国際公開第 2007/059782 A 1 号パンフレットによれば、IgG4 ヒンジ変異体は、野生型 IgG4 分子のサイズのほぼ半分 (約 75 kDa) であるはずである。しかし、野生型 IgG4 及び IgG4 ヒンジの両者について算出されたサイズは、いずれも、二価分子について予想されるサイズと大体同じであった (表 3)。これは、12 アミノ酸ヒンジ領域のみの欠失が、予想 (約 75 kDa) サイズの一価モノマーを生成するには十分でないことを示している。

#### 【0124】

#### 【表 3】

表 3. 抗体 6IgG4 及び IgGΔ ヒンジの保持時間及び算出分子量

	抗体 6IgG4 変異体	
	IgG4 野生型	IgG4Δ ヒンジ
保持時間 BioSep-SEC S 4000 (分)	9.394	9.465
% モノマーピーク	> 88	> 89
% 多量体	4.5	2.3
MALS 質量 (kDa)	146	149

#### 【0125】

8.3 実施例 3: CH3 定常ドメイン突然変異の生成

一価抗体の生産をさらに安定化するために、さらなる突然変異をC H 3 定常ドメイン領域におけるI g G 4 ヒンジ分子に導入して、I g G 4 分子の2つのアーム間のC H 3 - C H 3 界面を破壊した。

#### 【0126】

##### 8.3.1 実施例3a: C H 3 - C H 3 界面の破壊のためのアミノ酸の選択

I g G 分子のC H 3 ドメインは、2つのF c 鎖の二量体化を促進して、機能性免疫グロブリン分子を形成する表面を含む。二量体化は、2つの会合するC H 3 ドメイン各々の片面内での相互作用によって媒介されるが、一方のC H 3 ドメインの面は、他方のC H 3 ドメインの面のものと同じのアミノ酸残基から構成されており、C H 3 ドメインの一方は、他方に対し、その縦軸に沿って180°回転することによって、二量体化のために適正な配向を達している。界面は、回転対称によるそれらの関係のために、各C H 3 ドメインからの約16アミノ酸から構成されており、界面の中心は、各々のタンパク質鎖において同じ位置に位置するアミノ酸から構成されている。ヒトI g G のF c ドメインの結晶構造[3]の分析によって、向き合うC H 3 ドメインのそれぞれの対応物と相互作用する各アミノ酸との界面の中心にあるものとして、両C H 3 ドメインからの366位のトレオニン及び407位のチロシンを同定することができた。I g G 1 C H 3 ドメインのアミノ酸配列とヒトI g G 4 の配列とのアラインメントにより、I g G 4 の配列に同じアミノ酸が存在することが明らかになったが、実際に、すべてのヒトI g G イソタイプのC H 3 ドメインにおけるそれらの位置に同じアミノ酸が存在する。C H 3 - C H 3 界面におけるアミノ酸のいずれを置換しても、界面の不安定化がおり、二量体の形成を防止することができたが、特にアミノ酸の置換を、天然に存在するアミノ酸より大きい側鎖で実施すると、そうであった。これは、こうした置換により、強力な相互作用に必要な密接な接触が破壊されるためであろう。最大限の破壊は、一方の鎖の1つのアミノ酸と、他方の鎖でそれと接触しているアミノ酸を置換することによって達成されると推定される。導入したアミノ酸がその側鎖に同じ実効電荷を帯びている場合には、これによって、電荷に基づく反発作用が生じ、また、パッキングの改変により相互作用表面の破壊が起こる。改変残基の数を最小限にするために、界面中心の2つのアミノ酸、すなわちt h r 366及びt y r 407を選択し、アルギニン(いずれも、大きな側鎖を有し、実効陽電荷を帯びている)で置換した。

#### 【0127】

##### 8.3.2 実施例3b: 抗体6 I g G 4 ヒンジC H 3 ドメインの突然変異誘発

標準的な部位指定突然変異誘発方法を用いて、p E U 8 . 2 ヒンジの366位のトレオニンをアルギニンに、407位のチロシンをアルギニンに突然変異させた。DNA配列決定を用いて、突然変異誘発を確認した。新規の変異体は、p E U 8 . 2 ヒンジT 3 6 6 R Y 4 0 7 Rと称する。抗体6のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを、p E U 8 . 2 ヒンジT 3 6 6 R Y 4 0 7 R及びp E U 4 . 4 にそれぞれサブクローン化した。ヒト重鎖4定常ドメイン(但し、12アミノ酸ヒンジ領域を除去し、366位のトレオニンと407位のチロシンをアルギニンに突然変異させた)と、調節エレメントを含むベクター(p E U 8 . 2 ヒンジT 3 6 6 R Y 4 0 7 R)に、V<sub>H</sub>ドメインをクローン化して、哺乳動物細胞に全I g G 重鎖を発現させた。同様に、ヒト軽鎖( )定常ドメイン及び調節エレメントの発現用のベクター(p E U 4 . 4)にV<sub>L</sub>ドメインをクローン化して、哺乳動物細胞に全I g G 軽鎖を発現させた。I g G を得るために、ベクターを発現する重鎖及び軽鎖I g G をE B N A - H E K 2 9 3 哺乳動物細胞にトランスフェクトした。I g G を発現させて、培地に分泌させた。回収物をプールし、ろ過してから精製した後、プロテインAクロマトグラフィーを用いて、I g G を精製した。培養上清をC e r a m i c P r o t e i n A ( B i o S e p r a ) の適切なサイズのカラムにロードし、50mM T r i s - H C l p H 8 . 0、250mM N a C l で洗浄した。0.1Mクエン酸ナトリウム(p H 3 . 0)を用いて、結合I g G をカラムから溶離した後、T r i s - H C l ( p H 9 . 0)の添加により中和した。溶離した物質を、N a p 1 0 カラム( A m e r s h a m , # 1 7 - 0 8 5 4 - 0 2 )を用いて、P B S にバッファー交換した後、I g G のアミノ酸配列



に基づく吸光係数を用いて、IgGの濃度を分光測光法により決定した。SEC-HPLCを用いて、またSDS-PAGEにより、精製IgGを凝集及び分解について分析した。

#### 【0128】

8.3.3 実施例3c：多角度レーザー光散乱（SEC-MALLS）と組み合わせたサイズ置換クロマトグラフィーによる抗体6IgG4 ヒンジT366RY407R分子の特性決定

SEC-MALLSを用いて、抗体6IgG4野生型及び抗体6IgG4 ヒンジと比較した抗体6IgG4 ヒンジT366RY407R分子の分子量を決定した。100μlサンプルをまず、BioSep-SEC-S4000カラム（300×7.8mm、Phenomenex 部品番号00H-2147-K0、通し番号389524-11）を用いて分析したが、上記カラムは、Agilent HP1100HPLCにより毎分1.0mLのDulbecco's PBSで平衡した。Diode Array Detector（DAD）からの220及び280nmシグナルを用いて、ピークを検出した。HP1100DAD検出器からの溶出液をWyatt Technologies DAWN EOS及びOptilab rEX検出器（それぞれ、多角度レーザー光散乱及び屈折率検出器）に通過させた。これら検出器からの出力をASTRA V（5.1.9.1.）ソフトウェア（Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, USA）を用いて処理した。0.184の屈折率増分（dn/dc）値を用いた（グリコシル化IgGが約2.5質量%のグリカンを有すると想定して計算した）。D-PBS平衡カラムからの検出器11（90°）バックグラウンド光散乱値は<0.35ボルトであった。

#### 【0129】

抗体6IgG4 ヒンジT366RY407R変異体について算出されたサイズは約68kDaであり、一価分子と一致していたが、野生型IgG4及びIgG4 ヒンジの両者は、いずれも、二価分子について予想されるサイズと同様であった（表4）。

#### 【0130】

#### 【表4】

表4. 抗体6IgG4 変異体の保持時間及び算出分子量

	抗体6IgG4 変異体		
	IgG4 野生型	IgG4Δヒンジ	IgG4Δヒンジ T366RY407R
保持時間 BioSep-SEC S 4000 (分)	9.394	9.465	9.841
% モノマーピーク	> 88	> 89	> 86
% 多量体	4.5	2.3	4.2
MALS 質量(kDa)	146	149	68

#### 【0131】

8.3.4 実施例3d：HeLa細胞からのリガンド誘導サイトカイン放出の阻害

二価抗体6IgG4野生型及び抗体6IgG4 ヒンジと比較した一価抗体6IgG4 ヒンジT366RY407Rの生物活性を決定するために、これらの活性をHeLaヒト細胞アッセイにおいて、リガンド誘導サイトカイン放出の用量依存的阻害を測定することにより、評価した。手短には、10%ウシ胎仔血清及び1%非必須アミノ酸を添加したMEM中に維持するHeLa細胞（European Collection of Cell Cultures, ECACCカタログ番号93021013）を、 $1.5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで96ウェル組織培養アッセイプレートに接種して、細胞を37℃及び

5 % C O <sub>2</sub> の加湿雰囲気中で一晚 ( 1 6 ~ 1 8 時間 ) 培養した。培地中で連続的に希釈した精製 I g G 変異体を、上記の H e L a 細胞に、一晚培養した培地を除去せずに添加し、H e L a 細胞と一緒に 3 7 ° で 3 0 ~ 6 0 分プレインキュベートした。続いて、濃度 E C <sub>50</sub> のリガンド ( アッセイにおいて最大応答の半分を達成するリガンドの濃度として定義される ) を添加した後、3 7 ° 及び 5 % C O <sub>2</sub> の加湿雰囲気中で 4 ~ 5 時間インキュベートした。上清 ( 条件培地 ) を回収し、上清中のサイトカインレベルを、市販の E L I S A キットを用いて決定した。試験した各構築物の I C <sub>50</sub> を表 5 に示す。これらのデータは、一価抗体 A b 6 I g G 4 ヒンジ T 3 6 6 R Y 4 0 7 R 構築物が生物活性を保持していることを示している。

【 0 1 3 2 】

10

【表 5】

表 5. IC50 決定値

	リガンド誘導のサイトカイン放出を測定する HeLa アッセイにおける IC <sub>50</sub> (pM)		
	N=1	N=2	N=3
Ab6 IgG4	53.8	61.1	98.7
Ab6 IgG4Δヒンジ	21.8	62.2	35.4
Ab6 IgG4Δヒンジ T366RY407R	107	238	142
負の対照クローン CEA6 IgG4	影響なし	影響なし	影響なし
負の対照クローン CEA6 IgG4Δヒンジ	影響なし	影響なし	影響なし

20

【 0 1 3 3 】

#### 8 . 4 実施例 4 : C H 3 - C H 3 界面の分子モデル化

C H 3 - C H 3 界面の分析をヒト I g G 1 F c ドメインの高分解能結晶構造 ( P D B アクセションナンバー 1 H 3 U [ 3 ] ) 及び唯一入手可能な I g G 4 F c ドメイン結晶構造 ( P D B アクセションナンバー 1 A D Q [ 4 ] ) で、P y M o l ソフトウェア ( ワールドワイドウェブ p y m o l . o r g [ 5 ] ) を用いて実施した。P D B アクセションナンバーとは、ワールドワイドウェブ p d b . o r g でアクセス可能な P r o t e i n D a t a B a n k に関する。分子間接触に関与する残基は、ファンデルワールス半径 + 0 . 5 Å の和 [ 6 ] より接近した原子団の任意の対を含む残基として定義されている。部位指定突然変異体の崩壊の可能性を、P y M o l 突然変異誘発ウィザードを用いて分析することにより、様々なアミノ酸鎖で置換した際の理論的衝突を確認した。

30

【 0 1 3 4 】

C H 3 - C H 3 界面での分子間相互作用に関与する残基を表 6 に示す。界面での最も顕著な非ファンデルワールス相互作用は、T 3 6 6 と Y 4 0 7 同士の 2 つの水素結合 ( これは、分析した全ての結晶構造に存在する ) 、及び構造に応じて起こりうる 3 つ又は 4 つの塩架橋 ( E 3 5 6 - K 4 3 9 、 D 3 9 9 - R 4 0 9 、 K 3 9 2 - D 3 9 9 、及び R 4 0 9 - D 3 9 9 ) であった。

40

【 0 1 3 5 】

T 3 6 6 及び Y 4 0 7 は、C H 3 界面のコアで重要な残基であり、これら残基の両方がアルギニンへと突然変異することによって、F c ドメインの二量体化が阻止される ( 実施例 3 参照 ) 。別の 2 つの残基 ( L 3 6 8 及び F 4 0 5 ) は、この領域における有意な相互作用に関与するものとして識別されており、これらの位置での合理的突然変異もまた C H 3 ドメインの二量体化を阻止しうることを示している。既述したように、構造分析によって、二量体化界面に 4 つ以下の塩架橋が存在しうることが明らかになり、これらの位置での突然変異は、電荷反発を引き起こすか、又は単純に、F c 二量体形成に影響をもたらすことが推定される静電気相互作用を除去する。4 つのコア界面残基 ( T 3 6 6 、 L 3 6 8

50

、F 4 0 5 及び Y 4 0 7 ) 並びに 5 つの塩架橋残基 ( E 3 5 6 、 D 3 9 9 、 K 3 9 2 、 R 4 0 9 及び K 4 3 9 ) に加えて、5 つの残基 ( E 3 5 1 、 S 3 6 4 、 L 3 6 8 、 K 3 7 0 、 T 3 9 4 ) からなる第 3 のセットが、ホモ二量体の向き合う C H 3 ドメイン上の同一残基、又は崩壊性突然変異の挿入 ( 例えば、互いに反対の同電荷の挿入 ) を可能にする傾向が高いと思われる特定の残基のいずれかと相対するものとして識別された。また、C H 3 - C H 3 界面周辺における残基 ( Y 3 4 9 、 S 3 5 4 、 E 3 5 7 ) からなる第 4 のセットも、二量体形成に影響を与える可能性があるものとして決定された。

【 0 1 3 6 】

【 表 6 】

表 6. IgG1Fc ドメイン (1H3U) の結晶構造における CH3-CH3 界面に位置する残基。界面残基を溶媒接触性の減少によって決定した。接触残基とは、分子間接触に関与する残基である [6]

	界面	接触
	Q347	Q347
	Y349	Y349
	T350	T350
	L351 <sup>‡</sup>	L351
	P352 <sup>‡</sup>	
	S354	S354
	E356	E356
	E357	E357
	K360	
	Q362	
	S364	S364
	T366 <sup>‡</sup>	T366
	L368	L368
	K370	K370
	N390	
	K392	K392
	T393	
	T394 <sup>‡</sup>	T394
	P395 <sup>‡</sup>	P395
	P396	
	V397	V397
	L398	L398
	D399	D399
	S400	
	F405	F405
	L406	
	Y407 <sup>‡</sup>	Y407
	S408	
	K409	K409
	T411	
	K439	
残基の数	30	20

<sup>‡</sup>自己相互作用残基

【 0 1 3 7 】

上記の位置での単一又は複数の部位指定突然変異の影響を分析するために、5 アミノ酸

10

20

30

40

50

からなる1セットを側鎖の各タイプを代表するものとして選択した：陽荷電（アルギニン）；陰荷電（アスパラギン酸）；大きな芳香族（トリプトファン）；小さな中性（アラニン）；及び親水性（グルタミン）。疎水基の挿入は、タンパク質-タンパク質界面を破壊するようではないと推論したことから、脂肪族側鎖は排除した。表7に記載の、合計65のIgG4CH3ドメイン単一、二重及び三重突然変異体を合理的に設計して、構築物を発現させ、ヒンジなしIgG4Fcドメインと同様に分析した。これら突然変異体のうちの21を、野生型ヒンジを含むIgG4Fcドメインと同様に設計、発現及び分析した。また、37のIgG1及び3つのIgG2ヒンジなしFcドメイン突然変異体も調べた。

#### 【0138】

8.5 実施例5：CH3-CH3界面領域におけるアミノ酸の突然変異誘発及びSEC-MALLS及びHPLCによる分析

8.5.1 実施例5a：突然変異誘発、タンパク質発現及び精製

IgG1、2及び4のCH2及びCH3ドメインを既存の抗体構築物からのPCRによって増幅し、pEUベクターにクローン化して、目的とする3つのIgGサブクラスについてヒンジなしFcドメインの発現構築物を作製した。Stratagene Quick Change II Site-Directed Mutagenesisキット（Agilent Technologies, La Jolla, California, USA）を用い、製造者の指示に従って、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発を実施した。

#### 【0139】

組換えFcドメインの一過性発現を、EBNA-1遺伝子でトランスフェクトしたCHO細胞で実施した。100µg/mlのペニシリン及びストレプトマイシンを含有する細胞を、細胞1ml当たり1µgのDNAと一緒に、直線状PEI（ポリエチレンジアミン）を12：1のPEI：DNA比で用いて、 $1 \pm 0.1 \times 10^6$  生存細胞/mlの細胞数でトランスフェクトした。細胞にCHO CD Efficient Feed B（Invitrogen, Paisley, UK）を2日目及び5日目に供給し、7日後に遠心分離により回収した。上清を0.22µMフィルターでろ過してから、Fcドメインを、Vivapure maxiprep Gスピンカラム（Sartorius, Epsom, Surrey, UK）を用いて、プロテインGアフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製した。溶離したサンプルを濃縮し、Nap10カラム（GE Healthcare, Uppsala, Sweden）を用いてPBSにバッファー交換し、タンパク質純度をSDS-PAGEにより分析した。典型的な収率は、初めの培養物1リットル当たり>95%純度のタンパク質約50～100mgであった。

#### 【0140】

8.5.2 実施例5b：多角度レーザー光散乱

光散乱を分別に即して実施した（SEC-MALLS）が、これは、実施例3bに記載したのと同じ方法で実施した。DAWN-HELEOS及びOptilab rEX計器（Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, California, USA）をそれぞれ用いて、光散乱及び示差屈折率を検出した。突然変異体のデータは、取得可能な場合、それらを表7に示す。

#### 【0141】

以前、全抗体として分析された野生型IgG4及びT366R/Y407R二重変異体のFcドメインを光散乱によって分析して、タンパク質の分子量の正確な測定値（±3%）を決定し、このようにしてFcドメインのモノマー又は二量体性を決定する。366位及び407位での単一アルギニン突然変異体も、さらに別の7つの突然変異体と共に分析した。図1は、野生型と比較したT366R/Y407Rサンプルの光散乱データを示す。

#### 【0142】

モノマーFcドメインについてMALDI-TOF質量分析によって決定した分子量は、約25.9kDa（2つの等しく集合した糖型からなる）であったため、二量体は51

10

20

30

40

50

・ 8 k D a の質量を有すると推定された。従って、野生型 I g G 4 F c ドメインの光散乱から得られた 5 2 k D a の分子量は、推定分子量と十分に一致し、野生型が、上記の条件下では排他的に二量体であることを示している。しかし、T 3 6 6 R、Y 4 0 7 R 及び T 3 6 6 R / Y 4 0 7 R 突然変異体は、より低い見掛け分子量 ( 3 2 ~ 3 5 k D a ) を有し、モノマー種について予想されるものに近づくものの、完全には一致しない。

【 0 1 4 3 】

8 . 5 . 3 実施例 5 c : サイズ排除クロマトグラフィー

A g i l e n t 1 1 0 0 シリーズ H P L C で、S u p e r d e x 7 5 1 0 / 3 0 0 G L カラム ( G E H e a l t h c a r e , U p p s a l a , S w e d e n ) を用いたサイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) により精製タンパク質サンプルを分析した。濃度 0 . 8 m g / m l の各サンプル 5 0  $\mu$  l を、オートサンプラーでカラムにインジェクトして、リン酸緩衝食塩水泳動バッファーにおいて流量 0 . 5 m l / 分で泳動を実施した。野生型 F c ドメインのサンプルを各バッチと一緒にロードし、直接比較した。また、すべてのサンプルは 2 回繰り返して泳動させた。

10

【 0 1 4 4 】

光散乱データと一致して、図 2 に示すように、6 5 の I g G 4 突然変異体の H P L C 分析によって、サンプルを、二量体のものと、モノマーのものとおおまかに分離することはできないことが明らかにされた。表 7 は、サイズ排除 H P L C を用いた 6 5 の I g G 4 突然変異体についてのデータを示す。分析から、I g G 4 突然変異体には、二量体と一致する分子量で溶離したのものもあれば、モノマーの分子量で溶離したのものもあったことがわかった。さらに、中間の保持時間で溶離した I g G 4 突然変異体もあった。これらのサンプルには、2 つの種の間の平衡によって、モノマー及び二量体保持時間の間に急速な交換があると考えられる。S E C 保持時間と、クロマトグラムの外観 ( 例えば、明らかに単分散性のサンプル、又はピークの広がり又は二重ピークから種の明瞭な混合物 ) に基づいて 3 つの任意の群にさらに分類した結果、1 9 の二量体 ( 野生型を除く )、1 8 のモノマー - 二量体平衡状態のもの、及び優勢にモノマー種を示す有意に小さい分子量を有する 2 8 の突然変異体を得られた。疑いのないように言えば、単独で組み込まれると二量体を生成する突然変異体は、モノマー又は平衡状態の種をもたらす他の突然変異と組み合わせると、モノマーを生成しうることは当業者にはあきらかであろう。表に「モノマー」という表記が用いられている場合、当業者であれば、これらの種の構造をさらに調べるのに利用可能な別の実験方法を認識されるであろう。

20

30

【 0 1 4 5 】

【表 7】

表 7. 流量 0.5ml/分で Superdex 75 10/300 カラムを用いた分析用サイズ排除により分析したヒンジなし IgG4 突然変異体のまとめ。サンプルは、分子量を推定するのに用いたカラムの校正によって、保持時間の順に記載した。多角度レーザー光散乱(MALLS)から算出した分子量も、データが取得可能であるサンプルについて示す。

ヒンジなし IgG4 Fc 突然変異体	分析	RT (分)	SEC (kDa)	MALLS (kDa)
E356RK392DR409D	二量体	19.6	59.0	
T366W	二量体	19.7	59.5	53
T366D	二量体	20.3	54.0	
K439D	二量体	20.5	52.5	
K370W	二量体	20.5	52.5	
K392AK439A	二量体	20.5	52.5	
K439A	二量体	20.6	51.5	
野生型	二量体	20.6	51.5	52
R409A	二量体	20.6	51.5	
T366DY407D	平衡	20.7	51.0	
D399W	二量体	20.7	51.0	
S364W	二量体	20.7	51.0	
S354D	二量体	20.7	51.0	
K370A	二量体	20.7	51.0	
E356AK392A	二量体	20.7	51.0	
K392D	二量体	20.8	50.0	
E356A	二量体	20.8	50.0	
E356R	二量体	20.8	50.0	

10

20

R409D	二量体	20.9	49.0	
D399A	二量体	21.0	48.0	
S354W	二量体	21.0	48.0	
D399WR409W	平衡	21.0	48.0	
D399AK439A	平衡	21.1	47.5	
T366QY407Q	平衡	21.1	47.5	
F405A	平衡	21.1	47.5	50
E356RR409D	平衡	21.1	47.5	
L351W	平衡	21.1	47.5	
E356AD399AK439A	平衡	21.1	47.5	
K392DK439D	平衡	21.2	46.5	
Y349D	平衡	21.4	44.5	48
L368W	平衡	21.5	44.0	
Y407Q	平衡	21.6	43.5	
T366Q	平衡	21.7	42.0	
E356RK392D	平衡	21.8	41.5	
Y407D	モノマー	22.0	40.0	
E356AD399A	平衡	22.0	40.0	
T394W	平衡	22.0	40.0	
Y407A	平衡	22.1	39.5	
T394R	モノマー	22.1	39.5	
L351WT394W	平衡	22.2	38.5	
T366R	モノマー	22.3	37.5	35
R409W	モノマー	22.3	37.5	
E357W	モノマー	22.4	37.0	
Y407R	モノマー	22.4	37.0	32
D399R	モノマー	22.5	36.5	
T366RY407R	モノマー	22.5	36.5	32
F405AY407A	モノマー	22.6	36.0	
Y349DS354D	モノマー	22.6	36.0	
T366QF405QY407Q	モノマー	22.7	35.0	
T394D	モノマー	22.8	34.0	28
F405Q	モノマー	22.9	33.5	
S364R	モノマー	22.9	33.5	
F405QY407Q	モノマー	22.9	33.5	
L351DT394D	モノマー	23.0	33.0	
L368R	モノマー	23.0	33.0	
L351D	モノマー	23.0	33.0	29
S364RL368R	モノマー	23.1	32.0	
L351R	モノマー	23.1	32.0	30
F405R	モノマー	23.1	32.0	29
L351RT394R	モノマー	23.2	31.5	
S364WL368W	モノマー	23.3	31.0	
E357R	モノマー	23.4	30.0	
D399RK439D	モノマー	23.4	30.0	
E356RD399R	モノマー	23.4	30.0	
T366WL368W	モノマー	23.7	28.0	
L351RS364RT394R	モノマー	25.1	26.0	

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

F c ドメイン相互作用におけるヒンジ領域の役割をさらに詳しく調べるために、17の

モノマーヒンジなし I g G 4 突然変異体及び少数の他の突然変異体を、野生型ヒンジを含む I g G 4 F c ドメインに転換し、精製したタンパク質を H P L C により分析した。すべてのサンプルは、R 4 0 9 W 突然変異体を除いてヒンジなしドメインについて観察されたものと類似の挙動を示した。R 4 0 9 W 突然変異体は、ヒンジなし I g G 4 F c ドメインのような優勢にモノマー種としての挙動と比較して、モノマー及び二量体のほぼ等分の集団を含んでいた。残る 1 6 の「モノマー」突然変異体はすべて、ピーク積分により測定すると、3 0 % を下回る二量体を含んでいた（表 8）。これは、3 7 で 2 週間のインキュベーションの結果、S D S - P A G E 又は H P L C によるはっきりとした変化の兆候を全く示さなかったことから、非還元条件下で静的集団であることがわかった。表 9 に、表示位置でのモノマー F c ( I g G 4 F c のみ ) を形成する突然変異のタイプをまとめた。

10

【 0 1 4 7 】

【表 8】

表 8. HPLC により分析したヒンジ付 IgG4Fc 突然変異体をまとめた表。

突然変異体は、サンプルに存在する二量体の量の順で記載し、この量はピーク積分により計算した。保持時間(RT)を用いて、Superdex 75 10/300 カラムについての校正曲線との比較により分子量を推定する。

ヒンジ付 IgG4 Fc 突然変異体	分析	RT (分)	SEC (kDa)	% 二量体
T366W	二量体	19.5	59.5	100.0
野生型	二量体	20.1	56.5	100.0
S364W	二量体	20.1	56.5	100.0
F405A	二量体	20.2	56.0	100.0
T366Q	平衡	20.2	56.0	58.3
R409W	平衡	20.1	56.5	56.4
D399R	モノマー	22.2	38.5	26.8
L351D	モノマー	22.5	36.5	23.0
L351R	モノマー	22.6	36.0	20.9
L351DT394D	モノマー	22.0	40.0	20.6
F405Q	モノマー	22.5	36.5	18.0
S364WL368W	モノマー	22.9	33.5	16.5
L368R	モノマー	22.5	36.5	12.4
F405R	モノマー	22.6	36.0	6.2
L351RT394R	モノマー	22.7	35.5	5.8
T366R	モノマー	22.0	40.0	5.4
T366RY407R	モノマー	22.5	36.5	5.1
T394D	モノマー	22.3	37.5	5.0
T366WL368W	モノマー	23.7	28.0	3.7
S364R	モノマー	22.4	37.0	3.2
Y407R	モノマー	22.0	40.0	2.3
S364RL368R	モノマー	22.6	36.0	1.5

20

30

40

【 0 1 4 8 】



【表 9】

表 9. モノマーFcドメインの形成をもたらす単一突然変異のタイプ及び位置を示す表。

モノマーFcをもたらす突然変異は、チェック印(✓)で表し、モノマーFcを形成しない突然変異体は、クロス印(x)で表す。

	陽荷電	陰荷電	大	小	親水性
Y349		x			
L351	✓	✓	x		
S354		x	x		
E356	x			x	
E357	✓		✓		
S364	✓		x		
T366	✓	x	x		x
L368	✓		x		
K370			x	x	
K392		x			
T394	✓	✓	x		
D399	✓		x	x	
F405	✓			x	✓
Y407	✓	✓		x	x
R409		x	✓	x	
K439		x		x	

10

20

## 【0149】

## 8.6 実施例 6 : IgG1 及び 2 の HPLC 分析

図 3 のクロマトグラムは、IgG4 のサブクラスと比較した、IgG サブクラス 1 及び 2 の単一及び二重 T366R / Y407R 突然変異体についての分析 SEC データを示す。3 つのサブクラスの突然変異体は、配列アラインメントによるほぼ同じ界面残基を有するにもかかわらず、それぞれ挙動が異なる。IgG1 及び 2 の両方について、Y407R 突然変異体は、性質が最もモノマー的に見えるのに対し、T366R 及び T366R / Y407R 突然変異体は、混合集団の明らかな兆候を示している。これを 29 のヒンジなし IgG1Fc ドメイン突然変異体の作製によってさらに分析した。IgG4 サブタイプとしてモノマーであった 21 の突然変異体を調べると、そのうち 11 の突然変異体のみが IgG1 としてモノマーであった (表 10)。

30

## 【0150】

IgG サブクラス、R355Q、Q419E 及び P445L の間で異なる残基のうち 3 つは、分子間相互作用に関与しておらず、従って、CH3 二量体の安定性に大きな影響をもたらさないはずである。しかし、R409K は、2 つの CH3 ドメイン間の界面にあり、また、K409 は、Fc 二量体の安定性に大きく寄与することが以前明らかにされている [7]。IgG4 様界面 (すなわち、K409R) を生成するための IgG1 突然変異体の部位指定突然変異誘発によって、表 10 から明らかなように、IgG4 について観察された状態に逆転した突然変異体のいくつかが得られた。

40

## 【0151】

本発明は、安定な半抗体の初めての作製及び特性決定を示すものであり、Fc ドメインの有利な特性、例えば、長い半減期は維持しながら、二価抗体による抗原の架橋をもたらす、時に不要なアゴニスト作用に解決策を提供する。これは、増大したサイズ及び / 又は FcRn 再生により半減期を延長するペプチド、タンパク質又はポリマーとの融合なしに、他の非活性化抗体フォーマット又は新規のスcaffolds が有していない独特の特性であり、従って、一価抗体を魅力的な選択肢にする。

## 【0152】

50

【表 10】

表 10. ヒンジなし IgG4Fc、ヒンジ付 IgG4Fc 及びヒンジなし IgG1Fc ドメインについてのモノマー突然変異体のまとめ。HPLC により決定したモノマーは、チェック印(✓)で、二量体又はモノマー - 二量体平衡状態である突然変異体はクロス(x)でそれぞれ示し、また、データの無い突然変異体はそのまま空欄とした。

突然変異体	ヒンジなし IgG4 Fc	ヒンジ付 IgG4 Fc	ヒンジなし IgG1 Fc	ヒンジなし IgG1 Fc K409R
L351D	✓	✓	x	✓
L351R	✓	✓	x	
E357R	✓			
E357W	✓			
S364R	✓	✓	x	✓
T366R	✓	✓	x	x
L368R	✓	✓	✓	✓
T394D	✓	✓	✓	✓
T394R	✓		x	
D399R	✓	✓	x	✓
F405Q	✓	✓	✓	
F405R	✓	✓		
Y407D	✓		x	x
Y407R	✓	✓	✓	
R409W	✓	x	x	
Y349DS354D	✓			
L351DT394D	✓	✓	✓	
L351RT394R	✓	✓	✓	
E356RD399R	✓		✓	
S364RL368R	✓	✓	✓	
S364WL368W	✓	✓	✓	
T366RY407R	✓	✓	x	x
T366WL368W	✓	✓	✓	
D399RK439D	✓		x	
F405AY407A	✓			
F405QY407Q	✓			
L351RS364RT394R	✓		✓	
T366QF405QY407Q	✓			

【0153】

8.7 実施例7: Sedimentation Velocity Analytical UltraCentrifugation (沈降速度分析超遠心分離) (SV - AUC)

Sedimentation Velocity Analytical UltraCentrifugation (SV - AUC) を複数のヒンジなし構築物に実施して、沈降係数及び見掛け溶解分子量を決定した。実験及び分析を M - Scan Ltd. (Workingham, UK) で実施した。SV - AUC は、20 で Beckman Coulter XL - A AUC 計器で実施した。濃度 28 ~ 42  $\mu$ M のサンプルを XL - A AUC 細胞のサンプルセクターにロードし、PBS バッファーを細胞の対照セクタ

ーにロードした。波長( )スキャンを実施して、配列スキャンに用いることができる好適な を取得した(得られたデータが、Beer Lambertの法則が依然として有効である、すなわち吸光度 1.0であるスペクトル領域であるとき)。これに基づき、300nmの を選択した。初期SVスキャンを3,000rpmで開始して、重い凝集体の存在を確認した。界面移動は観察されなかったが、これはサンプル中に大きな沈殿物が存在しないことを意味する。最終ローター速度40,000rpmを、6分間隔での200スキャンと共に選択した。得られたデータを、SEDFITプログラムを用いて評価して、スベドベリ単位(S)で記録される沈降係数(s)値のc(s)プロフィールを取得した。平均部分比体積0.73ml/g(20 で)をSEDFIT分析に用いた。コンピュータプログラムSEDNTERPを用いて、バッファー密度及びPBSのバッファー粘度を計算した。バッファー密度の値1.00534とPBSの粘度(ポアズ)0.01002を算出した。3つのヒンジなしFcサンプルについて得られた沈降係数をまとめたものを表11に示す。このデータの分布グラフを図4に示す。

#### 【0154】

野生型ヒンジなしIgG4Fcドメインの主要種は、3.7Sのs値を示した。c(M)への変換によって、3.7S成分の見掛け溶解分子量は、51.2kDaとなったが、これは、ホモ二量体の予想分子量と一致する。2.4Sのs値と1.2%の相対UV吸収率を有する、より小さい成分は、見掛け溶解分子量が27.4kDaであったが、これは、モノマーの予想分子量と近似で一致する(図4A)。ヒンジなしIgG4Y349DFcドメインの主要種は、3.5Sのs値を示した。c(M)への変換によって、3.5S成分の見掛け溶解分子量は、43.3kDaとなったが、これは、ホモ二量体成分の予想分子量より低い。この結果は、HPLCデータと一致しており、これは、上記の特定の突然変異体が、急速モノマー-二量体平衡にあることを示している(図4B)。ヒンジなしIgG4T394DFcドメインの主要種は、2.4Sのs値を示した。c(M)への変換によって、2.4S成分の見掛け分子量は、26.8kDaとなったが、これは、モノマーFcドメインの予想分子量と一致する。ホモ二量体の存在は、この突然変異体については検出されなかった(図4C)。

#### 【0155】

#### 【表11】

表 11.3 つのヒンジなしIgG4FcドメインについてのSV-AUCにより決定された沈降係数及び主要種の算出分子量のまとめ

サンプル	沈降係数値 (S)	主要種の分子量 (kDa)
野生型 ヒンジなし IgG4 Fc ドメイン	2.4, 3.7, 5.7, 8.9	51.2
ヒンジなし IgG4 Y349D Fc ドメイン	3.5, 5.7, 7.9, 10.9, 16.4	43.3
ヒンジなし IgG4 T394D Fc ドメイン	2.4, 4.9, 6.5, 9.1, 10.9, 15.6	26.8

#### 【0156】

実施例で使用した試薬は市販のものであってもよいし、又は当該技術分野で公知の市販の計器類、方法、又は試薬を用いて調製してもよい。前述の実施例は、本発明の様々な形態、及び本発明の方法の実施を示すものである。これらの実施例は、本発明の多くの異なる実施形態の網羅的な説明の提供を意図するものではない。従って、前述の発明は、理解を明瞭にするために説明及び例として幾分詳細に記載されているが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲を逸脱することなく、多くの変更及び改変をこれらに加えることは容易に理解されよう。

#### 【0157】

#### 8.8 実施例8：マウスにおける薬物動力学的試験

BALB/cマウス(1グループ当たり5匹)に、10mg/kg(体重)IVボラス用量の野生型IgG4、グリコシル化一価IgG4(C226Q/C229Q/T394D突然変異からなる)又はアグリコシル化一価IgG4(C226Q/C229Q/N297Q/T394D突然変異からなる)を投与した。野生型IgG4及びアグリコシル化一価IgG4については、5分、1、2、4、7、10、13及び16日おきに、またグリコシル化一価IgG4については5分、2、4及び7日置きに血漿サンプルを回収した。抗ヒトIgG4Fcポリクローナル抗体を用いた抗体の捕捉と、抗ヒト軽鎖モノクローナル抗体を用いた検出を含むMSD免疫アッセイにより、タンパク質濃縮物をアッセイした(図5)。各グループについて、WinNoLinソフトウェアを用いて、時間0から最終測定可能時間までの濃度時間曲線下面積(AUCINF)、クリアランス、半減期、及び最大濃度(Cmax)の薬物動学的パラメーターを計算したが、その際、非コンパートメント分析又は2コンパートメントモデル化のいずれかを用いた。得られた結果を表12に示す。一価IgG4の半減期は、13日の半減期を有する野生型IgG4と比較すると、約20時間である。血漿半減期は、インタクトなIgG4について観測されたものより短かったが、一価抗体の20時間という血漿半減期は、げっ歯類におけるFab分子の一般的半減期(概して、0.5~3.5時間)に対して有意な改善を示している(例えば、[8]、[9]、[10]、及び[11]参照)。血漿半減期が短いのは、より小さい一価抗体の系球体ろ過の増加及び/又はFcRnの結合活性の減少によると考えられる。

【0158】

【表12】

表12. 野生型IgG4、グリコシル化一価IgG4、及びアグリコシル化一価IgG4についての薬物動学的パラメーターの非コンパートメント及び2コンパートメント分析

非コンパートメント分析				
パラメーター	単位	半アグリコシル化 IgG4	半グリコシル化 IgG4	野生型 IgG4
半減期	日	0.86	0.86	13.89
Cmax	ug/mL	293.26	244.71	262.31
AUCINF	日*ug/mL	131.83	178.93	1896.33
クリアランス	mL/日/kg	75.85	55.89	5.27

2コンパートメントモデル化				
パラメーター	単位	半アグリコシル化 IgG4	半グリコシル化 IgG4	野生型 IgG4
半減期	日 (SD)	0.85 (0.08)	0.87 (0.08)	13.36 (4.12)
クリアランス	mL/日/kg (SD)	119.6 (12.1)	103.9 (11.3)	5.32 (1.1)

【0159】

8.9:実施例9:マウスIgG1CH3-CH3界面領域におけるアミノ酸の突然変異誘発並びにSEC-MALLS及びHPLCによる分析

タンパク質を基材とする治療薬の効果を評価するのに、マウスモデルなどいくつかの動物モデル系が一般に用いられている。これらの試験は、代用分子、例えば、マウス抗体、又はマウスFc領域を組み込んだ融合タンパク質を使用して十分に実施することができる。さらに突然変異誘発スクリーンを実施して、モノマーマウス抗体の作製に有用なFc突然変異を識別した。いくつかの部位指定突然変異を含むヒンジなしマウスIgG1Fcドメインを実施例5のヒト構築物と同様に作製した。突然変異の選択は、主としてヒトモノマーFc操作から得たデータによって決定した。HPLC及びSEC-MALLSを実施して、突然変異型マウスIgG1Fcの特性を決定したが、表13にデータをまとめる。

表 13 に概要を示すように、モノマーヒトFcドメインの形成をもたらす突然変異の大部分は、モノマーマウスFcドメインの形成をもたらさない。しかし、突然変異 F405R は、主にモノマーであるマウスIgG1Fcドメインを生成し、いくつかの突然変異は、モノマー-二量体平衡状態にあるマウスIgG1Fcドメインを生成する。

【0160】

【表13】

表 13. 流量 0.5ml/分での Superdex 75 10/300 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより分析したヒンジなしマウスIgG1Fc 突然変異体のまとめ。アミノ酸は、ヒトCH3ドメインとのアラインメントに従い番号付けした。サンプルは、分子量を推定するのに用いたカラムの校正によって、保持時間の順に記載した。多角度レーザー光散乱から算出した分子量も、データが取得可能であるサンプルについて示す。

IgG1 マウス Fc	分析	RT (分)	SEC(kDa)	MALLS(kDa)
野生型	二量体	19.9	58.5	54
T366R	二量体	20.1	54.0	
Y349D/P354D	二量体	20.5	52.5	
I351D	二量体	20.5	52.5	
S364R	二量体	20.5	52.5	
Q357W	二量体	20.5	52.5	
S364R/K409R	二量体	20.6	51.5	
F405Q	二量体	20.6	51.5	
I351R	二量体	20.6	51.5	
Q357R	二量体	20.6	51.5	
K409R	二量体	20.6	51.5	
T394R	二量体	20.6	51.5	
T394D	二量体	20.6	51.5	
T366W/M368W	二量体	20.8	50.0	
F405Q/K409R	二量体	20.8	50.0	
T394D/K409R	二量体	20.8	50.0	55
D399R/K409R	平衡	21.1	47.5	48
S364W/M368W/K409R	平衡	21.8	41.5	
Y407R/K409R	平衡	21.9	41.0	
S364W/M368W	平衡	22.1	39.5	
Y407R	平衡	22.1	39.5	
D399R	平衡	22.2	38.5	48
F405R	モノマー	22.9	33.5	30
M368R	平衡	22.9 (及び 21.5)	33.5	36
F405R/K409R	モノマー	23.1	32.0	29

【0161】

本明細書に記載するすべての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許又は特許出願が、参照として本明細書に組み込まれると明示的かつ個別に表示されているのと同じ程度まで、本明細書に参照として組み込むものとする。

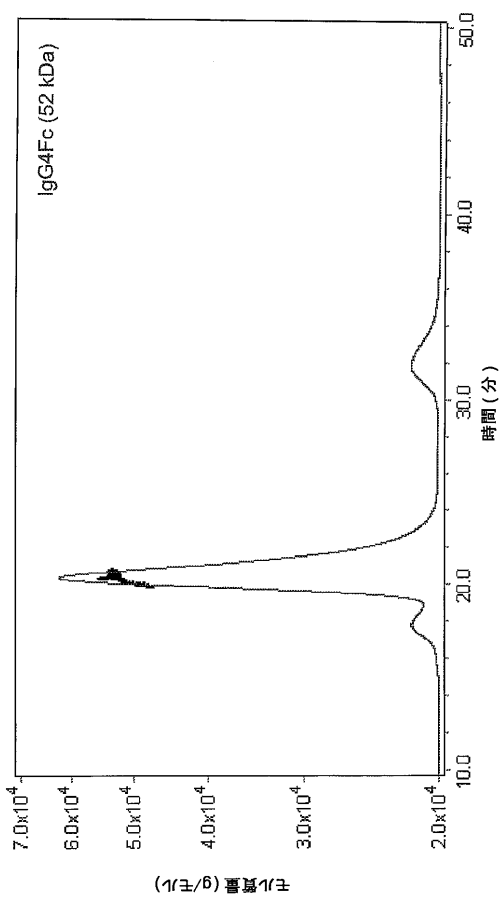
## 【 0 1 6 2 】

## 参考文献

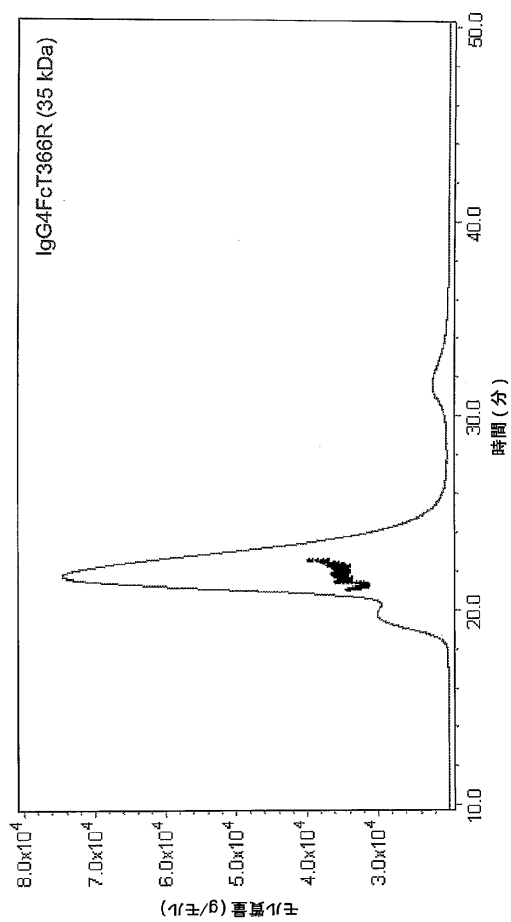
- [1] Persic, L. et al. Gene. 187(1):9-18, 1997
- [2] Clackson, T. and Lowman, H.B. Phage Display - A Practical Approach, 2004. Oxford University Press
- [3] Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R. & Sondermann, P. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. Journal of molecular biology 325, 979-989 (2003) 10
- [4] Corper, A.L. et al. Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. Nature structural biology 4, 374-381 (1997).
- [5] DeLano, W.L. The PyMOL User's Manual. (DeLano Scientific, Palo Alto, Ca, USA; 2002) 20
- [6] Tsai, C.J., Lin, S.L., Wolfson, H.J. & Nussinov, R. A dataset of protein-protein interfaces generated with a sequence-order-independent comparison technique. Journal of molecular biology 260, 604-620 (1996)
- [7] Dall'Acqua, W., Simon, A.L., Mulkerin, M.G. & Carter, P. Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers. Biochemistry 37, 9266-9273 (1998). 30
- [8] Chapman et al. (1999). Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. Nature Biotechnology, 17, 780-783.
- [9]. Nguyen et al. (2006). The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. Protein Engineering, Design and Selection, 19, 291-297. 40
- [10] Pepinsky et al. (2011). Production of a PEGylated Fab' of the anti-LINGO-1 Li33 antibody and assessment of its biochemical and functional properties in vitro and in a rat model of remyelination. Bioconjugate Chemistry, 22, 200-210.
- [11] Valentine et al. (1994). Anti-phencyclidine monoclonal Fab fragments marked 50

ly alter phencyclidine pharmacokinetics in rats. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 269, 1079-1085.

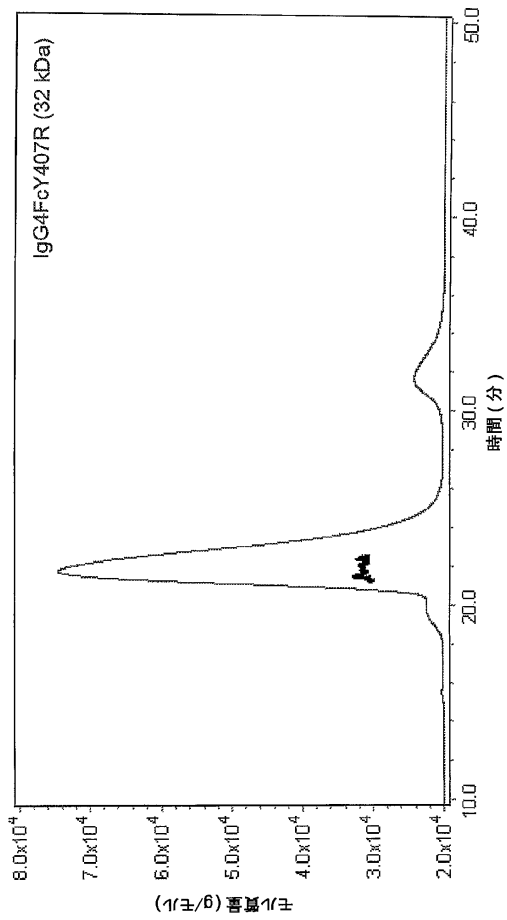
【図 1 A】



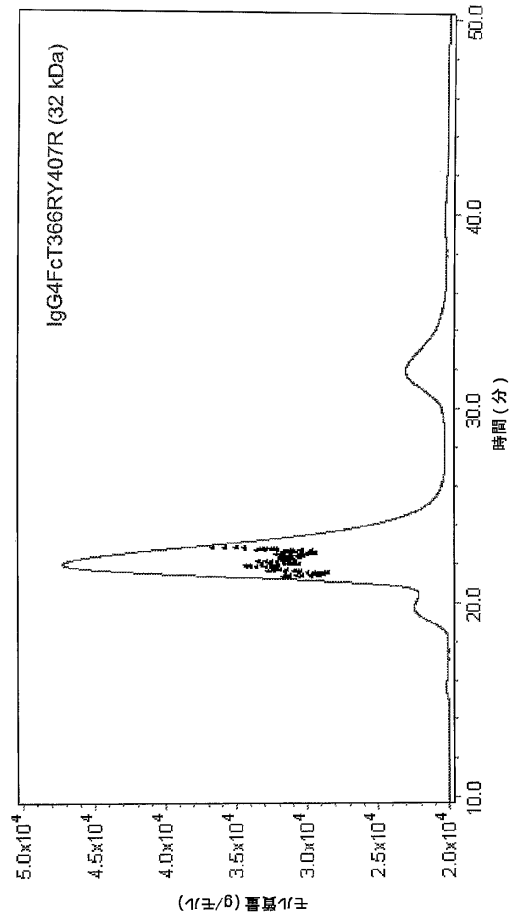
【図 1 B】



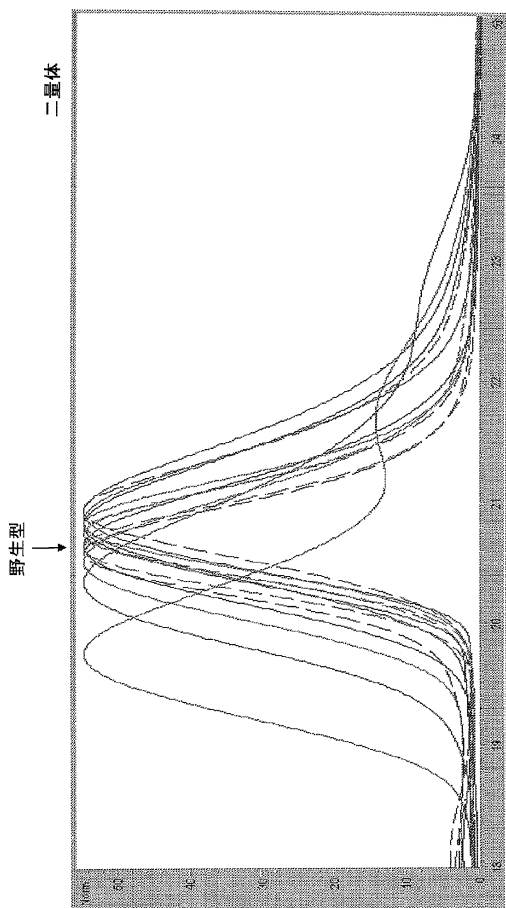
【図 1 C】



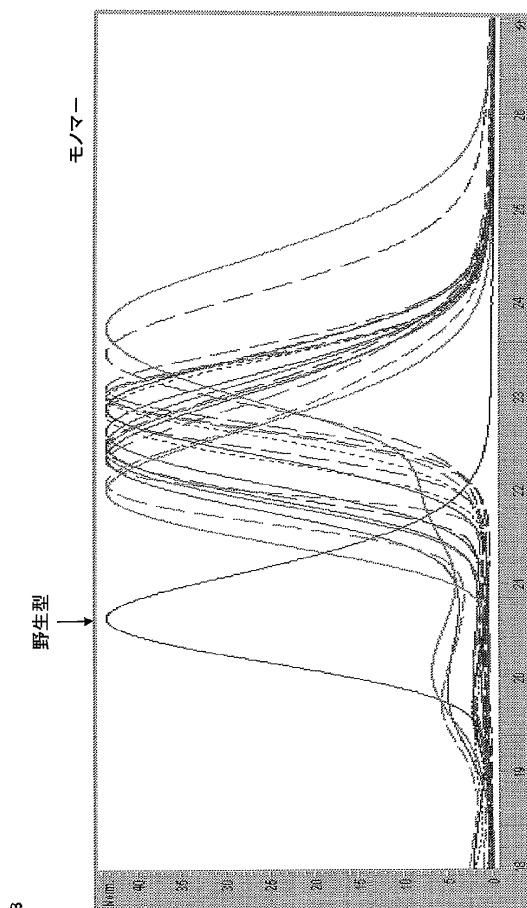
【図 1 D】



【図 2 A】

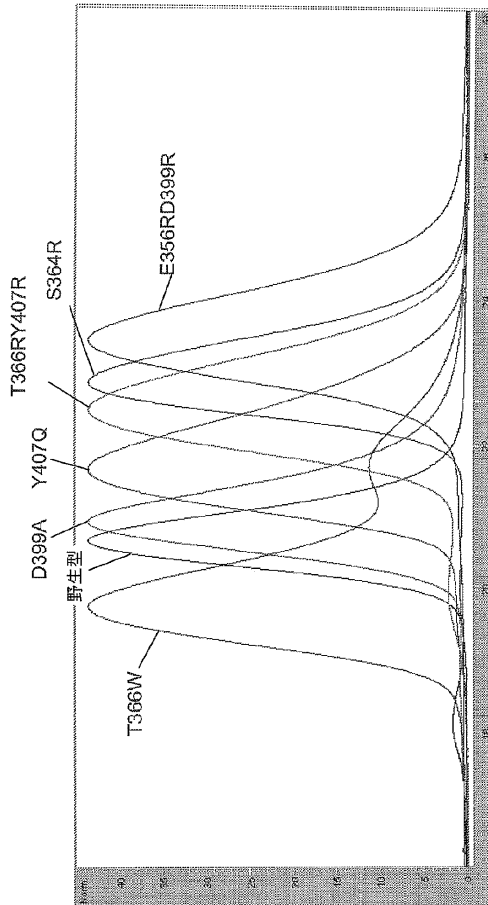


【図 2 B】

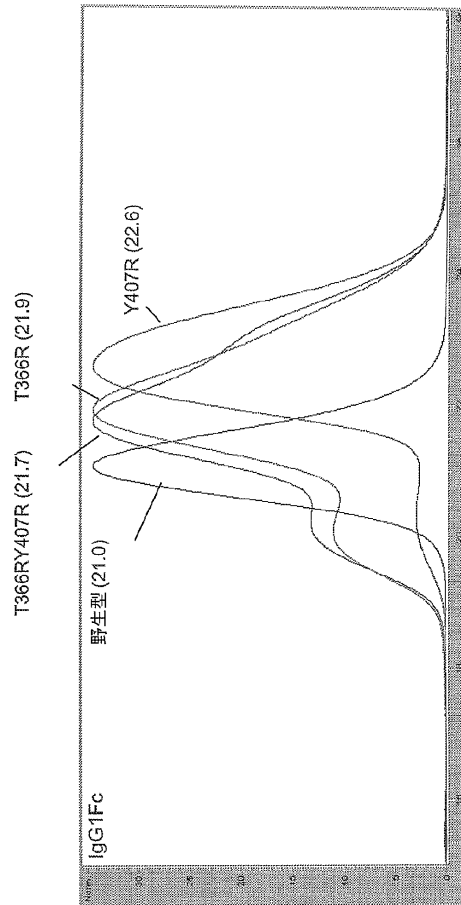




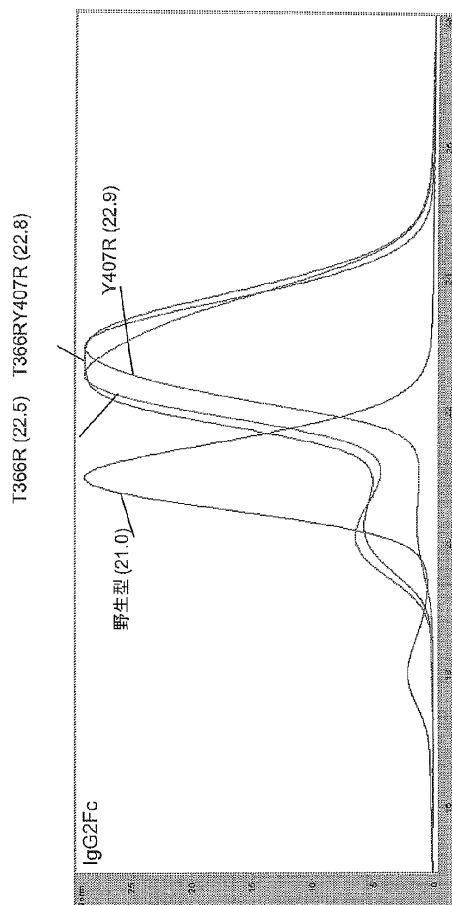
【図 2 C】



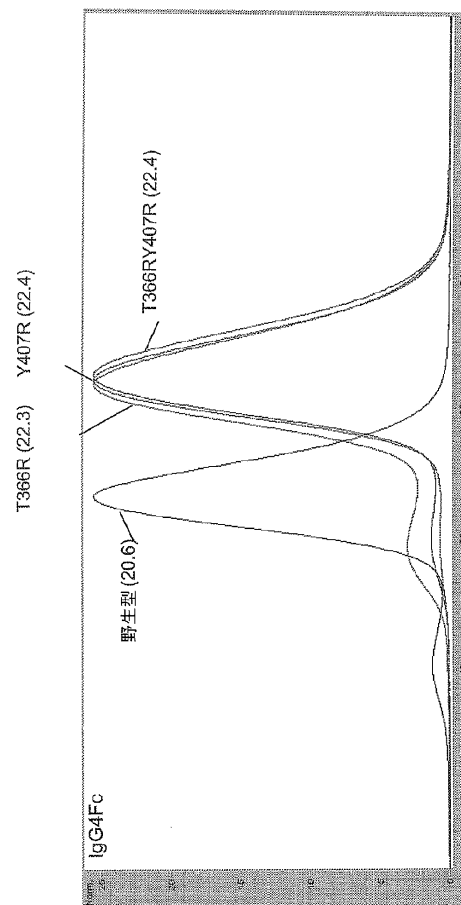
【図 3 A】



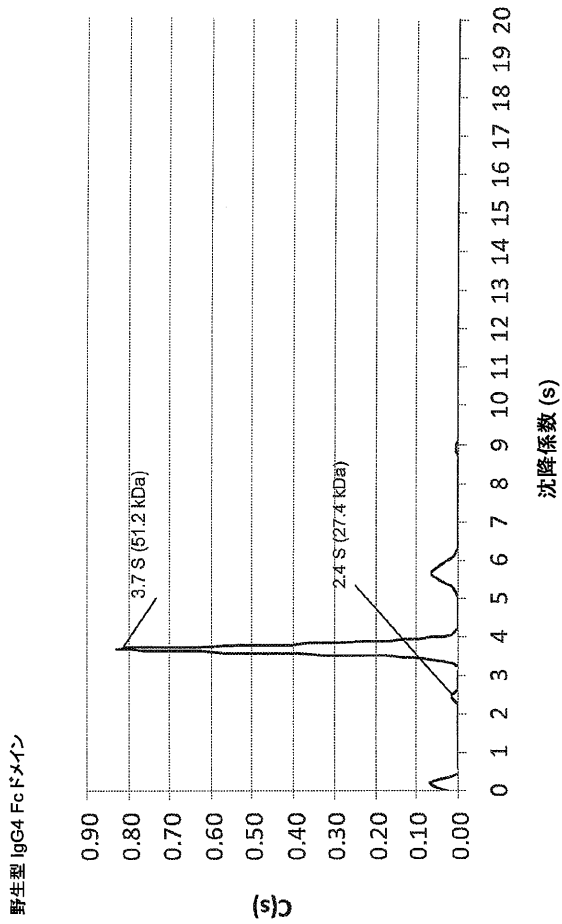
【図 3 B】



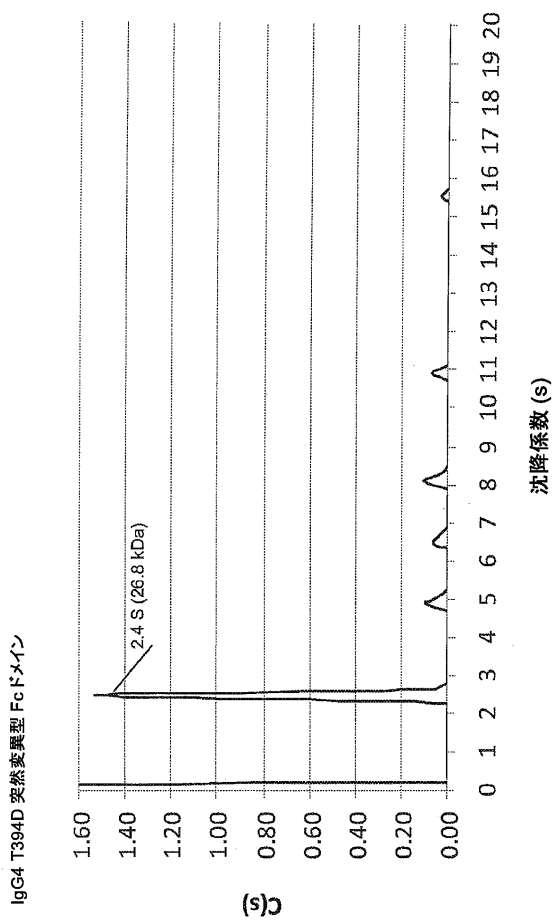
【図 3 C】



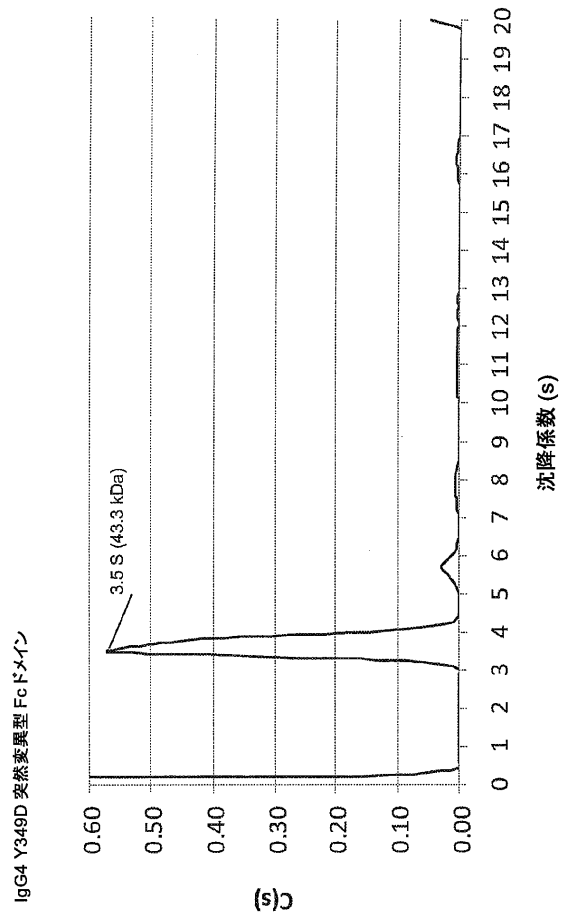
【図 4 A】



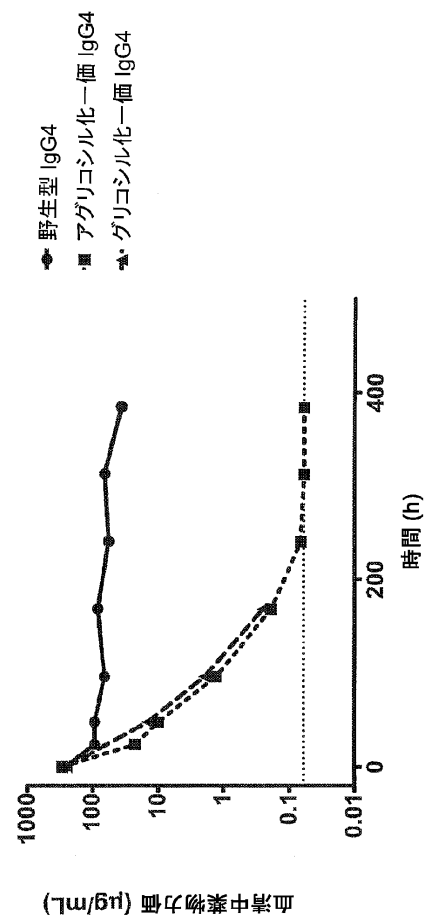
【図 4 C】



【図 4 B】



【図 5】



## 【図 6 A】

	240	250	260	270	280	配列 番号:
ヒト IgG1	GPSVFLFPKPKD	TIMISRTPEV	TCVVVDV	SHEDPEV	KFNWYVDG	VEVHNAKT 9
ヒト IgG2	GPSVFLFPKPKD	TIMISRTPEV	TCVVVDV	SHEDPEV	QFNWYVDG	VEVHNAKT 10
ヒト IgG3	GPSVFLFPKPKD	TIMISRTPEV	TCVVVDV	SHEDPEV	QFNWYVDG	VEVHNAKT 11
ヒト IgG4	GPSVFLFPKPKD	TIMISRTPEV	TCVVVDV	SHEDPEV	QFNWYVDG	VEVHNAKT 12
マウス IgG1	-SSVFI	FPKPKD	VLITITL	TPKVT	CVVVDISK	DDPEVQFSW
マウス IgG2a	GPSVFI	FPKIKD	VLMISL	PIVTC	VVVDVSE	DDPDVQISW
マウス IgG2b	GPSVFI	FPNPKD	VLMISL	TPKVT	CVVVDVSE	DDPDVQISW

	290	300	310	320	330	340	配列 番号:
ヒト IgG1	KPREQYNSTYR	WVSVLTVL	HQDWLNG	KEYKCKV	SNKALP	PAPIEKTI	SKAK 9
ヒト IgG2	KPREQFNSTFR	WVSVLTVV	HQDWLNG	KEYKCKV	SNKGLP	PAPIEKTI	SKTK 10
ヒト IgG3	KPREQYNSTFR	WVSVLTVL	HQDWLNG	KEYKCKV	SNKALP	PAPIEKTI	SKTK 11
ヒト IgG4	KPREQFNSTYR	WVSVLTVL	HQDWLNG	KEYKCKV	SNKGLP	PSSIEKTI	SKAK 12
マウス IgG1	QPREQFNSTFR	SVELPIM	HQDWLNG	KEFKCRV	NSAAPP	PAPIEKTI	SKTK 13
マウス IgG2a	QTHREDYNSTI	LRVWSALP	IQHQDWS	GKEFKCKV	NNKDL	PAPIERTI	SKPK 14
マウス IgG2b	QTHREDYNSTI	LRVWSLIP	IQHQDWS	GKEFKCKV	NNKDL	PSPIERTI	SKTK 15

## 【図 6 B】

	350	360	370	380	390	配列 番号:
IgG1	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT					9
IgG2	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKT					10
IgG3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGGQPENNYNT					11
IgG4	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT					12
マウス IgG1	GRPKAPQVYITLPPPKEQMAKDKVSLTCTMTDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKN					13
マウス IgG2a	GSRAPQVYVILPPPEEMTKKQVTLTCMTDTPMPEDIIYVEWNTNNGKTELNYKN					14
マウス IgG2b	GLVRAPQVYIILPPPAEQLSRKDVSLTCLVGNFGPDISVEWTSNGHTEENYKD					15

	400	410	420	430	440	配列 番号:	
ヒト IgG1	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTV	DKSRWQQ	GNVFC	SVMEALHN	HYTQKSLSPGK 9	
ヒト IgG2	TPPMLDSDGS	FFLYSKLTV	DKSRWQQ	GNVFC	SVMEALHN	HYTQKSLSPGK 10	
ヒト IgG3	TPPMLDSDGS	FFLYSKLTV	DKSRWQQ	GNVFC	SVMEALHN	HYTQKSLSPGK 11	
ヒト IgG4	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTV	DKSRWQEG	NVFC	SVMEALHN	HYTQKSLSLGK 12	
マウス IgG1	TQPTMNTNGS	YFVYSKLV	NQKSNWEAG	NTFTCS	VLHGLHN	HHTEKSLSHSPGK 13	
マウス IgG2a	TEPVLDSDGS	YFMYSKLV	EKKKNWERN	SYS	CSVHGLHN	HHHTKSFRTPGK 14	
マウス IgG2b	TAPVLDSDGS	YFTYSKLV	NMKT	SKWEKTD	SFCNVR	HEGLKNYLKTTIS	RSPGK 15

## 【配列表】

2013537416000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2011/063857**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12, 30, 31, 34-50(all partially)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063857

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/063785 A2 (GENMAB AS [DK]; LABRIJN ARAN FRANK [NL]; LOVERIX STEFAN [BE]; PARREN P) 10 June 2010 (2010-06-10) whole document, especially Examples 3, 5, 13, 15; Figures 1-2 -----	1-12,30, 31,34-50
A	WO 2008/114011 A2 (MEDIMMUNE LTD [GB]; GULER-GANE GULIN [GB]; HOLGATE ROBERT GEORGE EDWAR) 25 September 2008 (2008-09-25) figures 6C, 6D, 6E; examples 1-3, 10-11; tables 12-13 ----- -/--	1-12,30, 31,34-50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2011

Date of mailing of the international search report

03/01/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luyten, Kattie

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063857

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DALL'ACQUA WILLIAM ET AL: "Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers", BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 37, no. 26, 30 June 1998 (1998-06-30) , pages 9266-9273, XP002245748, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/BI980270I cited in the application whole document, especially the Abstract -----</p>	<p>1-12,30, 31,34-50</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/063857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010063785 A2	10-06-2010	CA 2745439 A1 EP 2373687 A2 US 2011293607 A1 WO 2010063785 A2	10-06-2010 12-10-2011 01-12-2011 10-06-2010
WO 2008114011 A2	25-09-2008	EP 2087111 A2 US 2010184959 A1 WO 2008114011 A2	12-08-2009 22-07-2010 25-09-2008

International Application No. PCT/ EP2011/ 063857

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12, 30, 31, 34-50(all partially)

A polypeptide comprising an immunoglobulin Fc region wherein the Fc region comprises one or more amino acid substitutions that inhibit dimer formation of the Fc region, comprising an amino acid substitution at position 347 according to the Kabat EU numbering system, wherein the amino acid is substituted with an amino acid having a positively charged side chain.

---

2-124. claims: 1-50(partially)

a polypeptide comprising an immunoglobulin Fc region wherein the Fc region comprises one or more amino acid substitutions that inhibit dimer formation of the Fc region, comprising an amino acid substitution at position 347, 349, 350, 351, 352, 354, 356, 357, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 405, 406, 407, 408, 409, 411 or 439 (31 possibilities) according to the Kabat EU numbering system, wherein the amino acid is substituted with either (i) an amino acid having a positively charged side chain, (ii) an amino acid having a negatively charged side chain, (iii) an amino acid having a hydrophilic side chain, or (iv) an amino acid having a large side chain; i.e. 31 amino acid positions combined with 4 different groups of side chains, minus the combination of invention 1.

---



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Y	
	A 6 1 K 39/395 N	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

(72)発明者 ウィルキンソン, イアン クレイグ  
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド

(72)発明者 ウェブスター, カール イネス  
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド

(72)発明者 ロウ, デヴィッド クリストファー  
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA06 DA02 DA03 EA04 GA11 HA01 HA06  
4B064 AG27 CA19 CE12 DA01  
4B065 AA90Y AA91X AA93X AB01 AC14 BA01 BD18 CA25 CA44  
4C085 AA14 AA34 BB36 BB42 CC22  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26