

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6514103号
(P6514103)

(45) 発行日 令和1年5月15日 (2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日 (2019.4.19)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/00 (2006.01)
C O 7 K 16/46 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)
A 6 1 P 31/12 (2006.01)

C O 7 K 16/00
 C O 7 K 16/46 Z N A
 A 6 1 K 39/395 A
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/12

請求項の数 37 (全 140 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-519244 (P2015-519244)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月5日 (2013.7.5)
 (65) 公表番号 特表2015-524387 (P2015-524387A)
 (43) 公表日 平成27年8月24日 (2015.8.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/064330
 (87) 国際公開番号 WO2014/006217
 (87) 国際公開日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
 審査請求日 平成28年7月4日 (2016.7.4)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2012/063339
 (32) 優先日 平成24年7月6日 (2012.7.6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 PA201300019
 (32) 優先日 平成25年1月10日 (2013.1.10)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 514002569
 ゲンマブ ビー. ブイ.
 オランダ王国 ユトレヒト イャレラーン
 6 O
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 三重変異を有する二量体タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、各ポリペプチドがヒト免疫グロブリンG重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および第2のポリペプチドにおいて、

E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、GおよびYであるか；または代替的にそれぞれK、GおよびYであるか；または代替的にそれぞれR、SおよびYであるか；または代替的にそれぞれR、GおよびWであり、
 ここで、前記アミノ酸は、Kabatで示されるEUナンバリングに従って番号付けされている、前記二量体タンパク質。

【請求項 2】

免疫グロブリン重鎖のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択される、請求項1に記載の二量体タンパク質。

【請求項 3】

前記ポリペプチドの少なくとも一方が、標的と特異的に結合する結合領域を含む、請求項1または2に記載の二量体タンパク質。

【請求項 4】

抗体である、請求項1～3のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項 5】

前記第1および第2のポリペプチドのそれぞれが、第1および第2の抗原結合領域を形成す

る、軽鎖可変領域および定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖配列と会合している免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、請求項4に記載の二量体タンパク質。

【請求項 6】

前記第1および第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置におけるアミノ酸残基がDもしくはEであり、かつ/またはQ386に対応する位置におけるアミノ酸がKである、請求項1～5のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項 7】

前記第1および第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置におけるアミノ酸残基がK、RまたはHであり、かつ、該ポリペプチドが、

(a) Pである、位置448におけるアミノ酸残基；または

(b) K、RもしくはHである、位置448におけるアミノ酸残基、および、Pである、位置449におけるアミノ酸残基

を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項 8】

ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、G236、G237、S239、P238、T250、M252、I253、S254、R255、T256、D265、S267、H268、D270、E272、N286、K288、N297、V303、V305、T307、V308、L309、H310、Q311、D312、K317、K322、S324、P329、P331、I332、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、G385、Q386、P387、E388、N389、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、それぞれ、Lではない；Lではない；Gではない；Gではない；Sではない；Pではない；Tではない；Mではない；Iではない；Sではない；Rではない；Tではない；Dではない；Sではない；Hではない；Dではない；Eではない；Nではない；Kではない；Nではない；Vではない；Vではない；Tではない；Vではない；Lではない；Hではない；Qではない；Dではない；Kではない；Kではない；Sではない；Pではない；Pではない；Iではない；Kではない；Dではない；Kではない；Qではない；Dではない；Aではない；Eではない；Eではない；Gではない；Qではない；Pではない；Eではない；Nではない；Sではない；Dではない；Sではない；Sではない；Mではない；Hではない；Nではない；Hではない；Yではない；およびKではない、請求項1～7のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項 9】

薬物、毒素、放射性標識、放射線不透性物質、常磁性物質、蛍光性物質、リン光性物質、超音波用増強剤またはポリエチレングリコール（PEG）を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項 10】

ホモ二量体またはヘテロ二量体である、請求項1～9のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項 11】

前記第1および第2のポリペプチドがそれぞれ、ヒト免疫グロブリンG重鎖のCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含み、かつ

該第1のポリペプチドにおいて、K409、T366、L368、K370、D399、F405およびY407から選択される位置におけるアミノ酸が、それぞれK、T、L、K、D、FおよびYではなく、かつ

該第2のポリペプチドにおいて、F405、T366、L368、K370、D399、Y407およびK409から選択される位置におけるアミノ酸が、それぞれF、T、L、K、D、YおよびKではない、請求項10に記載の二量体タンパク質。

【請求項 12】

該第1のポリペプチドにおいて、K409の位置におけるアミノ酸がRであり、該第2のポリペプチドにおいて、F405の位置におけるアミノ酸がLである、請求項11に記載の二量体タンパク質。

【請求項 13】

pHが6.8のリン酸緩衝液中で、オリゴマー形態、6.0未満のpHで、単量体形態にある、請

10

20

30

40

50

求項1～12のいずれか一項に記載の二量体タンパク質。

【請求項14】

それぞれが請求項1～13のいずれか一項に記載の二量体タンパク質である非共有結合的に会合した6つの二量体タンパク質を含む、六量体。

【請求項15】

非共有結合的に会合した6つの分子を含む六量体であって、該分子のうち少なくとも1つが請求項1～13のいずれか一項に記載の二量体タンパク質であり、かつ、該分子のうち少なくとも1つが少なくともCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含むFcドメインを含む抗体であり、該抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、前記六量体。

【請求項16】

請求項1～13のいずれか一項に記載の二量体タンパク質および/または請求項14～15のいずれか一項に記載の六量体、ならびに薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項17】

請求項1～13のいずれか一項に記載の第1の二量体タンパク質、請求項1～13のいずれか一項に記載の第2の二量体タンパク質、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項18】

以下の(a)または(b)に記載の第1および第2の二量体タンパク質を含む、組成物：

(a) 第1および第2のポリペプチドを含む第1の二量体タンパク質であって、各ポリペプチドがヒト免疫グロブリンG重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、K439およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、G、EおよびYである、第1の二量体タンパク質、および、

第1および第2のポリペプチドを含む第2の二量体タンパク質であって、各ポリペプチドがヒト免疫グロブリンG重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、G、およびKである、第2の二量体タンパク質；

(b) 第1および第2のポリペプチドを含む第1の二量体タンパク質であって、各ポリペプチドがヒト免疫グロブリンG重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、K439およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、G、EおよびYである、第1の二量体タンパク質、および、

第1および第2のポリペプチドを含む第2の二量体タンパク質であって、各ポリペプチドがヒト免疫グロブリンG重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、Y436、およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、G、I、およびKである、第2の二量体タンパク質；

ここで、前記アミノ酸は、Kabatで示されるEUナンバリングに従って番号付けされている、組成物。

【請求項19】

前記第1および第2の二量体タンパク質の両方が第1および第2のポリペプチドを含み、該第1および第2の二量体タンパク質の該第1および第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸がEではなく、かつ、S440、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、YまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、請求項17に記載の組成物。

【請求項20】

前記第1および第2の二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドの両方において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸がそれぞれR、GおよびYである、請求項17に記載の組成物。

【請求項21】

前記第1の二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置にあるアミノ酸がDもしくはEであり、かつ

10

20

30

40

50

前記第2の二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置にあるアミノ酸がK、RもしくはHであり；448に対応する位置にあるアミノ酸がP、K、RもしくはHであり；かつ／または、449に対応する位置にあるアミノ酸がPである、請求項17～20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記第1および第2の二量体タンパク質の少なくとも一方が抗体である、請求項17～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記第1および第2の抗体が、異なる抗原と結合するか、または同じ抗原の異なるエピトープと結合する、請求項22に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記薬学的に許容される担体が水性緩衝液であり、該水性緩衝液のpHが、少なくとも6.5、6.5～9.0、7.0～8.0、または7.4である、請求項17～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

リン酸緩衝系を含み、該水性緩衝液のpHが、pH 6.5未満、4.0～6.4、または5.0～6.0である、請求項23に記載の組成物。

【請求項 2 6】

酢酸緩衝系、ヒスチジン緩衝系、グリシン緩衝系、クエン酸緩衝系、ニコチン酸緩衝系、乳酸緩衝系、および／またはコハク酸緩衝系を含む、請求項25に記載の組成物。

【請求項 2 7】

それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域およびCH3領域を含む第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質の溶液中でのオリゴマー形成、および／または、補体依存性細胞傷害作用（CDC）であるエフェクター機能を増大させる方法であって、該第1および第2のポリペプチドに、ヒトIgG1重鎖における以下のアミノ酸置換：E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換が、それぞれ345R、430Gおよび440Yであるか、または代替的にそれぞれ345K、430Gおよび440Yであるか；または代替的にそれぞれ345R、430Sおよび440Yであるか；または代替的にそれぞれ345R、430Gおよび440Wである；

を導入する段階を含む、前記方法。

【請求項 2 8】

重鎖配列のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記二量体タンパク質が抗体である、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 3 0】

請求項27～29のいずれか一項に記載の方法によって調製される、変異型二量体タンパク質。

【請求項 3 1】

画像化、診断法または治療法において同時、別々または逐次的に用いるための、請求項1～13のいずれか一項に記載の第1の二量体タンパク質および請求項1～13のいずれか一項に記載の第2の二量体タンパク質を含む、キット。

【請求項 3 2】

細菌感染症、ウイルス感染症もしくは寄生虫感染症、自己免疫疾患、癌、炎症などの疾患の治療において用いるため、および／または細菌感染症によって引き起こされる敗血症性ショックのリスクを低下させるのに用いるための、請求項1～26、30、および31のいずれか一項に記載の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット。

【請求項 3 3】

前記二量体タンパク質が、リポ多糖（LPS）、リポオリゴ糖（LOS）、デルタ内毒素、ボツリヌス毒素、ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）外毒素、細菌スーパー抗

10

20

30

40

50

原、耐熱性エンテロトキシン、細胞溶解素、チャネル形成毒素、酵素活性毒素、またはマイコトキシンと特異的に結合する結合領域を含む、請求項1～26、30、31および32のいずれか一項に記載の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット。

【請求項34】

ヒトまたは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部の画像化において用いるための、請求項1～26、30、31および33のいずれか一項に記載の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット。

【請求項35】

請求項1～26、30、31および33のいずれか一項に記載の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキットを投与する段階を含む、非ヒト哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するための方法。

10

【請求項36】

細菌感染症、ウイルス感染症もしくは寄生虫感染症を治療するため、ヒトもしくは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するため、またはヒトもしくは他の哺乳動物の身体からの標的分子のクリアランスをモジュレートするための医薬の製造における、請求項1～26、30、31および33のいずれか一項に記載の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキットの使用。

【請求項37】

ヒトにおいて癌、自己免疫疾患、臓器移植拒絶反応、および液性系におけるC1q枯渇を治療するための医薬の製造における、請求項1～26、30、31および33のいずれか一項に記載の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物、キットの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、親二量体タンパク質と比較して少なくとも3つの変異を含む二量体タンパク質（例えば抗体）に関する。より詳細には、本発明は、溶液中でオリゴマー構造（例えば六量体構造）を形成できる、そのような二量体タンパク質に関する。本発明はまた、そのような二量体タンパク質およびそのような二量体タンパク質を含む組成物の使用にも関する。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

抗体のFc領域によって媒介されるエフェクター機能は、病原体の死滅ならびに抗原のクリアランスおよび分解といった、外来性実体の破壊を可能にする。抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用（ADCC）および抗体依存性細胞媒介性食作用（ADCP）は、Fc受容体（FcR）を保有する細胞にFc領域が結合することによって惹起され、一方、補体依存性細胞傷害作用（CDC）は、補体活性化の古典的経路を惹起するC1qにFc領域が結合することによって惹起される。

【0003】

40

各IgG抗体はC1qに対する結合部位を2つ含有し、それは各重鎖定常（Fc）領域に1つずつある。しかし、溶液の状態にあるIgGの単分子は、C1qに対する単量体IgGの親和性が極めて弱いため（ K_d ほぼ $10^{-4}M$ ）、補体を活性化しない（Sledge et al., 1973 J. Biol. Chem. 248,2818-13（非特許文献1）；Hughes-Jones et al., 1979 Mol. Immunol. 16,697-701（非特許文献2））。抗原が誘因となるIgGの会合は、多価C1q分子のはるかに強固な結合（ K_d ほぼ $10^{-8}M$ ）および補体活性化を導くことができる（Burton et al., 1990 Mol. Immunol. 22, 161-206（非特許文献3））。対照的に、IgMは自然下では共有結合した五量体または六量体の状態で存在し、発現または固定化された細胞抗原と結合すると、IgM五量体および六量体はCDCを効率的に誘発できる。抗原結合は、C1q結合部位を露出するようにIgMにおけるコンフォメーション変化を誘導するための必要条件である（Feinstein et al

50

., 1986, Immunology Today, 169-174 (非特許文献4))。

【 0 0 0 4 】

また、IgGは、Fc領域のCH2 / CH3ドメインの相互作用を通じて、六量体環構造の形成による補体活性化も達成し得ることが示唆されている (Burton et al., 1990 Trends in Biochem. Sci. 15, 64-69 (非特許文献5))。そのような六量体IgG構造の存在を裏づける証拠は、二次元結晶 (Reidler et al., 1986 I Handbook of Experimental Immunology 4th edit. (Weir, D. M. ed.), pp17.1-17.5. Blackwell, Edinburgh (非特許文献6) ; Pinteric et al., 1971 Immunochem. 8, 1041-5 (非特許文献7)) および三次元結晶において、ならびに溶液の状態にあるIgG1、IgG2aおよびIgG4およびヒトFcに関して見いだされている (Kuznetsov et al., 2000 J Struct. Biol. 131, 108-115 (非特許文献8))。また、六量体環形成は、HIV-1 gp120を対象とするb12ヒトIgG1 抗体の結晶構造 (PDB中の1HZH) でも観察された (Saphire et al., Science 2001 Aug 10;293(5532),1155-9 (非特許文献9))。b12六量体環では、6個の到達可能なC1q結合部位が6個の抗体のそれぞれから1つずつ六量体表面に提示され、残りの6つの結合部位は下方を向いていた。

【 0 0 0 5 】

C1qは、抗体結合領域を含有する6個の球状頭部が6本のコラーゲン柄につなぎ止められた一束のチューリップに似た形をしている [Perkins et al., 1985 Biochem J. 228, 13-26 (非特許文献10) ; Poon et al., 1983 J Mol Biol. 168, 563-77 (非特許文献11) ; Reid et al., 1983 Biochem Soc Trans 11, 1-12 (非特許文献12) ; Weiss et al., 1986 J. Mol. Biol. 189, 573-81 (非特許文献13)]。C1qは、1HZH結晶構造のb12六量体集合体に上から嵌合し、その結果、6個の球状頭部のそれぞれが6つのC1q結合部位の1つと接触することが見いだされている (Parren, FASEB Summer Research Conference, Snowmass, Co., 5-10 July 2010 (非特許文献14) ; "Crystal Structure of an intact human IgG: implications for HIV-1 neutralization and effector Function", Thesis by Erica Ollmann Saphire, for the Scripps Research Institute, La Jolla, California. November 2000 (非特許文献15))。結晶構造内で対称関係にある複数のb12抗体の間で観察されるFc境界面における選択されたアミノ酸の変異は、C1qの結合力を低下させることが観察されており、このことは分子間Fc : Fc相互作用に対するこれらのアミノ酸の寄与を示している。

【 0 0 0 6 】

Mekhaieel DNA et al, Nature Scientific Reports, 1:124, 19 October 2011 (非特許文献16) は、改変されたエフェクター機能を有するポリマー性ヒトFc融合タンパク質を開示している。

【 0 0 0 7 】

WO0042072号 (特許文献1) は、改変されたエフェクター機能を有するポリペプチド変異体を開示している。

【 0 0 0 8 】

US20080089892号 (特許文献2) は、Fc領域変異体を開示している。

【 0 0 0 9 】

WO2006105062号 (特許文献3) は、改変された抗体Fc領域およびそれらの使用を開示している。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 WO0042072号

【 特許文献 2 】 US20080089892号

【 特許文献 3 】 WO2006105062号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 非特許文献 1 】 Sledge et al., 1973 J. Biol. Chem. 248,2818-13

10

20

30

40

50

- 【非特許文献2】Hughes-Jones et al., 1979 Mol. Immunol. 16,697-701
- 【非特許文献3】Burton et al., 1990 Mol. Immunol. 22, 161-206
- 【非特許文献4】Feinstein et al., 1986, Immunology Today, 169-174
- 【非特許文献5】Burton et al., 1990 Trends in Biochem. Sci. 15, 64-69
- 【非特許文献6】Reidler et al., 1986 I Handbook of Experimental Immunology 4th edit. (Weir, D. M. ed.), pp17.1-17.5. Blackwell, Edinburgh
- 【非特許文献7】Pinteric et al., 1971 Immunochem. 8, 1041-5
- 【非特許文献8】Kuznetsov et al., 2000 J Struct. Biol. 131, 108-115
- 【非特許文献9】Saphire et al., Science 2001 Aug 10;293(5532),1155-9
- 【非特許文献10】Perkins et al., 1985 Biochem J. 228, 13-26 10
- 【非特許文献11】Poon et al., 1983 J Mol Biol. 168, 563-77
- 【非特許文献12】Reid et al., 1983 Biochem Soc Trans 11, 1-12
- 【非特許文献13】Weiss et al., 1986 J. Mol. Biol. 189, 573-81
- 【非特許文献14】Parren, FASEB Summer Research Conference, Snowmass, Co., 5-10 July 2010
- 【非特許文献15】"Crystal Structure of an intact human IgG: implications for HIV-1 neutralization and effector Function", Thesis by Erica Ollmann Saphire, for the Scripps Research Institute, La Jolla, California. November 2000
- 【非特許文献16】Mekhaieel DNA et al, Nature Scientific Reports, 1:124, 19 October 2011 20

【発明の概要】

【0012】

本発明は、ある特定のアミノ酸残基を含む二量体タンパク質に関し、ここで、前記二量体タンパク質6つで、溶液中で非共有結合性六量体形態を形成できる。

【0013】

発明の概要

一局面において、本発明は、第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、各ポリペプチドが免疫グロブリン重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、

ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸がEではなく、 30
かつ

S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、二量体タンパク質に関する。

【0014】

別の局面において、本発明は、非共有結合的に会合した少なくとも2つの本発明の二量体タンパク質を含む、オリゴマーに関する。

【0015】

別の局面において、本発明は、非共有結合的に会合した6つの本発明の二量体を含む、六量体に関する。 40

【0016】

別の局面において、本発明は、本発明の二量体タンパク質、1つまたは複数の抗体、および薬学的に許容される担体を含む、組成物に関する。

【0017】

別の局面において、本発明は、本発明の第1の二量体タンパク質、本発明の第2の二量体タンパク質、および任意で薬学的に許容される担体を含む、組成物に関する。

【0018】

別の局面において、本発明は、それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域およびCH3領域を含む第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質の溶液中でのオ 50

リゴマー形成および/またはエフェクター機能を増大させる方法であって、前記第1および/または第2のポリペプチドに、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430に対応する位置、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置におけるアミノ酸置換を導入する段階を含む、方法に関する。
【0019】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって調製される変異型二量体タンパク質に関する。

【0020】

別の局面において、本発明は、画像化、診断法または治療法において、同時、別々または逐次的に用いるための、本発明の第1の二量体タンパク質および本発明の第2の二量体タンパク質を含むキット・オブ・パーツに関する。

10

【0021】

別の局面において、本発明は、本発明の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツを投与する段階を含む、ヒトまたは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するための方法に関する。

【0022】

別の局面において、本発明は、本発明の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツを投与する段階を含む、細菌感染症、ウイルス感染症もしくは寄生虫感染症を治療するための、ヒトもしくは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するための、またはヒトもしくは他の哺乳動物の身体からの標的分子のクリアランスをモジュレートするための方法に関する。

20

【0023】

別の局面において、本発明は、本発明の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物、キット・オブ・パーツを投与する段階を含む、癌、自己免疫疾患、臓器移植拒絶反応、および液性系におけるC1q枯渇などの疾患を予防または治療するための方法に関する。

[本発明1001]

第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、各ポリペプチドが免疫グロブリン重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および/または第2のポリペプチドにおいて、

ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸がEではなく、
かつ

30

S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、

前記二量体タンパク質。

[本発明1002]

一方または両方のポリペプチドに関して、E345に対応する位置にあるアミノ酸が、R、K、Q、N、Y、A、C、D、F、G、H、I、L、M、P、S、T、VおよびWからなる群より選択され、例えばR、K、Q、NおよびYからなる群より選択される、本発明1001の二量体タンパク質。

40

[本発明1003]

一方または両方のポリペプチドに関して、E430に対応する位置にあるアミノ酸が、G、S、T、F、H、A、C、D、I、K、L、M、N、P、Q、R、V、WおよびYからなる群より選択され、例えばG、S、T、FおよびHからなる群より選択される、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1004]

一方または両方のポリペプチドに関して、S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、YまたはWであり；Yではなく；DでもEでもなく；Tではなく；Eではなく；Nではなく；Qではなく；Iではなく；およびSではなく、特にS440に対応する

50

位置におけるアミノ酸がYまたはWである、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1005]

一方または両方のポリペプチドにおいて、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、

(a) I、N、Q、S、T、R、A、E、F、H、K、L、MまたはV、例えばI、N、Q、またはS；

(b) R、G、T、I、L、M、K、H、S、V、Y、Q、N、W、F、A、またはC；

(c) R；

(d) V、L、M、D、Q、K、R、N、H、S、T、W、またはY、例えばV、L、またはM；

(e) W、H、K、Q、R、D、E、S、T、またはY、例えばW、H、K、Q、またはR；

(f) N、S、T、A、E、G、H、K、Q、R、W、またはY、例えばN、S、またはT；

(g) V、L、N、Q、E、S、またはT、例えばV、L、N、またはQ；

(h) L、G、IまたはV

である、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1006]

一方または両方のポリペプチドにおいて、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、GおよびYであるか；または代替的にそれぞれK、GおよびYであるか；または代替的にそれぞれR、SおよびYであるか；または代替的にそれぞれR、GおよびWであるか；または代替的にそれぞれR、GおよびKであるか；または代替的に、E345、E430およびY436に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、GおよびIである、前記本発明

[本発明1007]

前記第1および/または第2のポリペプチドが、該第1および第2のポリペプチド間の共有結合を可能にする領域をさらに含む、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1008]

前記第1および/または第2のポリペプチドが、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域をさらに含む、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1009]

前記第1および第2のポリペプチドが、ヒンジ領域のジスルフィド結合を介して相互接続されている、本発明1007または1008のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1010]

免疫グロブリン重鎖のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgEおよびIgMからなる群より選択される、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1011]

免疫グロブリン重鎖が、霊長動物またはネズミ科動物由来、例えばヒト由来である、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1012]

前記ポリペプチドの少なくとも一方が、標的と特異的に結合する結合領域を含む、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1013]

各ポリペプチドが、標的、任意で同じ標的と特異的に結合する結合領域を含む、本発明1012の二量体タンパク質。

[本発明1014]

前記標的が、細胞、細菌またはビリオン上に存在する分子である、本発明1013の二量体タンパク質。

[本発明1015]

前記ポリペプチドの少なくとも一方が免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1016]

抗体である、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1017]

前記第1および第2のポリペプチドのそれぞれが、同じ抗原と結合してもよい第1および第2の抗原結合領域を形成する免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含む、本発明1016の二量体タンパク質。

[本発明1018]

前記第1および第2のポリペプチドのそれぞれが、同じ抗原と結合してもよい第1および第2の抗原結合領域を形成する、軽鎖可変領域および定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖配列と会合している免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、本発明1016の二量体タンパク質。

[本発明1019]

一方または両方のポリペプチドが、全長重鎖定常領域、例えば全長ヒトIgG1重鎖定常領域を含む、本発明1016～1018のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1020]

前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、K439に対応する位置におけるアミノ酸がKではない、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1021]

K439に対応する位置におけるアミノ酸がEまたはD、例えばEである、本発明1020の二量体タンパク質。

[本発明1022]

一方または両方のポリペプチド、例えば各ポリペプチドにおいて、E345、E430、K439およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、G、EおよびYである、本発明1021の二量体タンパク質。

[本発明1023]

前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、S440に対応する位置におけるアミノ酸がKまたはRである、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1024]

一方または両方のポリペプチド、例えば各ポリペプチドにおいて、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれR、GおよびKである、本発明1023の二量体タンパク質。

[本発明1025]

前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置における少なくとも1つのアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、Yではなく；DでもEでもなく；Tではなく；Eではなく；Nではなく；Qではなく；Iではなく；および、Sではなく、かつ、S440に対応する位置におけるアミノ酸がSでもYでもWでもなく、任意でS440に対応する位置におけるアミノ酸がKまたはRである、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1026]

一方または両方のポリペプチド、例えば各ポリペプチドにおいて、E345、E430、Y436およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がR、G、IおよびKである、本発明1025の二量体タンパク質。

[本発明1027]

前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置におけるアミノ酸残基がDまたはEである、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1028]

前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置におけるアミノ酸残基がK、RまたはHであり、かつ、該ポリペプチドが、

(a) Pである、位置448におけるアミノ酸残基；または

(b) K、RもしくはHである、位置448におけるアミノ酸残基、および、Pである、位置449におけるアミノ酸残基

を含む、本発明1001～1025のいずれかの二量体タンパク質。

10

20

30

40

50

[本発明1029]

前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、Q386に対応する位置におけるアミノ酸がKである、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1030]

ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、G236、G237、S239、P238、T250、M252、I253、S254、R255、T256、D265、S267、H268、D270、E272、N286、K288、N297、V303、V305、T307、V308、L309、H310、Q311、D312、K317、K322、S324、P329、P331、I332、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、G385、Q386、P387、E388、N389、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、それぞれ、Lではない；Lではない；Gではない；Gではない；Sではない；Pではない；Tではない；Mではない；Iではない；Sではない；Rではない；Tではない；Dではない；Sではない；Hではない；Dではない；Eではない；Nではない；Kではない；Nではない；Vではない；Vではない；Tではない；Vではない；Lではない；Hではない；Qではない；Dではない；Kではない；Kではない；Sではない；Pではない；Pではない；Iではない；Kではない；Dではない；Kではない；Qではない；Dではない；Aではない；Eではない；Eではない；Gではない；Qではない；Pではない；Eではない；Nではない；Sではない；Dではない；Sではない；Sではない；Mではない；Hではない；Nではない；Hではない；Yではない；およびKではない、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

10

[本発明1031]

前記ポリペプチドの少なくとも一方とリンカーを介して結合体化されていてもよい、薬物、毒素、放射性標識、放射線不透過性物質、常磁性物質、蛍光性物質、リン光性物質、超音波用増強剤またはポリエチレングリコール（PEG）を含む、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

20

[本発明1032]

ホモ二量体である、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1033]

ヘテロ二量体である、本発明1001～1031のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1034]

前記第1および第2のポリペプチドがそれぞれ、免疫グロブリン重鎖のCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含み、かつ

30

該第1のポリペプチドにおいて、K409、T366、L368、K370、D399、F405およびY407から選択される位置におけるアミノ酸が、それぞれK、T、L、K、D、FおよびYではなく、かつ

該第2のポリペプチドにおいて、F405、T366、L368、K370、D399、Y407およびK409から選択される位置におけるアミノ酸が、それぞれF、T、L、K、D、YおよびKではない、本発明1033の二量体タンパク質。

[本発明1035]

前記第1のポリペプチドにおいて位置K409におけるアミノ酸がRであり、かつ

前記第2のポリペプチドにおいて位置F405におけるアミノ酸がLである、本発明1034の二量体タンパク質。

40

[本発明1036]

pHが約6.8のリン酸緩衝液中で、主としてオリゴマー形態、例えば六量体形態にある、前記本発明のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1037]

6.0未満、例えば約5.0のpHで、主として単量体形態にある、本発明1001～1035のいずれかの二量体タンパク質。

[本発明1038]

それぞれが前記本発明のいずれかの二量体タンパク質である非共有結合的に会合した少なくとも2つの二量体タンパク質を含む、オリゴマー。

[本発明1039]

それぞれが本発明1001～1037のいずれかの二量体タンパク質である非共有結合的に会合

50

した6つの二量体タンパク質を含む、六量体。

[本発明1040]

前記六量体の二量体タンパク質の少なくとも1つ、例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは6つが抗体である、本発明1039の六量体。

[本発明1041]

非共有結合的に会合した6つの分子を含む六量体であって、該分子のうち少なくとも1つが本発明1001～1037のいずれかの二量体タンパク質であり、かつ、該分子のうち少なくとも1つが少なくともCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含むFcドメインを含む抗体である、前記六量体。

[本発明1042]

前記抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、本発明1041の六量体。

[本発明1043]

本発明1001～1037のいずれかの二量体タンパク質および/または本発明1038のオリゴマーおよび/または本発明1039～1042のいずれかの六量体、ならびに薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[本発明1044]

本発明1001～1037のいずれかの二量体タンパク質、1つまたは複数の抗体、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[本発明1045]

本発明1001～1037のいずれかの第1の二量体タンパク質、本発明1001～1037のいずれかの第2の二量体タンパク質、および任意で薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[本発明1046]

本発明1001～1037のいずれかのさらなる二量体タンパク質を少なくとも1つ含む、例えば3つもしくは6つ、または例えば4つ、5つ、7つ、8つ、9つもしくはそれより多くの二量体タンパク質を含む、本発明1045の組成物。

[本発明1047]

前記第1および第2の二量体タンパク質の両方が第1および第2のポリペプチドを含み、該第1および第2の二量体タンパク質の該第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸がEではなく、かつ、S440、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、本発明1045および1046のいずれかの組成物。

[本発明1048]

前記第1および第2の二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドの一方または両方において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸がそれぞれR、GおよびYである、本発明1045～1047のいずれかの組成物。

[本発明1049]

前記第1の二量体タンパク質が第1および第2のポリペプチドを含み、該第1および/または第2のポリペプチドにおいて、K439に対応する位置にあるアミノ酸がEまたはDであり、かつ

前記第2の二量体タンパク質が第1および第2のポリペプチドを含み、該第1および/または第2のポリペプチドにおいて、S440に対応する位置にあるアミノ酸がKまたはR、任意でKである、

本発明1045～1048のいずれかの組成物。

[本発明1050]

前記第1の二量体タンパク質が第1および第2のポリペプチドを含み、該第1および/または第2のポリペプチドにおいて、K439に対応する位置にあるアミノ酸がEまたはDであり、かつ

10

20

30

40

50

前記第2の二量体タンパク質が第1および第2のポリペプチドを含み、該第1および／または第2のポリペプチドにおいて、S440に対応する位置にあるアミノ酸がKまたはR、任意でKであり、かつ、Y436、D／E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置における少なくとも1つのアミノ酸がそれぞれ、Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、本発明1045～1049のいずれかの組成物。

[本発明1051]

前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸がそれぞれR、G、EおよびYであり、かつ

10

前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸がそれぞれR、G、KおよびKであるか；または代替的に、E345、E430、Y436およびS440に対応する位置にあるアミノ酸がそれぞれR、G、IおよびKである、

本発明1049の組成物。

[本発明1052]

前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置にあるアミノ酸がDまたはEであり、かつ

前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置にあるアミノ酸がK、RまたはHであり、かつ、448に対応する位置にあるアミノ酸がPである、

20

本発明1045～1048のいずれかの組成物。

[本発明1053]

前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置にあるアミノ酸がDまたはEであり、かつ

前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、K447に対応する位置にあるアミノ酸がK、RまたはHであり；448に対応する位置にあるアミノ酸がK、RまたはHであり；かつ、449に対応する位置にあるアミノ酸がPである、

本発明1045～1048のいずれかの組成物。

[本発明1054]

30

前記第1および第2の二量体タンパク質の少なくとも一方が抗体である、本発明1045～1053のいずれかの組成物。

[本発明1055]

前記第1および第2の二量体タンパク質の両方が抗体である、本発明1054の組成物。

[本発明1056]

前記第1および第2の抗体が、同じ抗原の同じエピトープと結合する、本発明1055の組成物。

[本発明1057]

前記第1および第2の抗体が、同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列を含む、本発明1056の組成物。

40

[本発明1058]

前記第1および第2の抗体が、異なる抗原と結合するか、または同じ抗原の異なるエピトープと結合する、本発明1054～1055のいずれかの組成物。

[本発明1059]

前記薬学的に許容される担体が水性緩衝液である、本発明1045～1058のいずれかの組成物。

[本発明1060]

前記水性緩衝液のpHが、少なくとも約6.5、例えば6.5～約9.0、例えば約7.0～約8.0、例えば約7.4である、本発明1059の組成物。

[本発明1061]

50

リン酸緩衝系を含む、本発明1060の組成物。

[本発明1062]

前記水性緩衝液のpHが、pH 6.5未満、例えば約4.0～6.4、例えば約5.0～約6.0である、本発明1059の組成物。

[本発明1063]

酢酸緩衝系、ヒスチジン緩衝系、グリシン緩衝系、クエン酸緩衝系、ニコチン酸緩衝系、乳酸緩衝系、および/またはコハク酸緩衝系を含む、本発明1062の組成物。

[本発明1064]

それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域およびCH3領域を含む第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質の溶液中でのオリゴマー形成および/またはエフ
ェクター機能を増大させる方法であって、該第1および/または第2のポリペプチドに、ヒ
トIgG1重鎖における少なくともE345、E430に対応する位置、ならびにS440、Y436、D/E35
6、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置におけるア
ミノ酸置換を導入する段階を含む、前記方法。

10

[本発明1065]

前記エフェクター機能が補体依存性細胞傷害作用（CDC）である、本発明1064の方法。

[本発明1066]

前記アミノ酸置換が、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430およびS440に対応する位置にある、本発明1064および1065のいずれかの方法。

[本発明1067]

E345に対応する位置におけるアミノ酸置換が、345R、345Q、345N、345K、345Y、345A、345C、345D、345F、345G、345H、345I、345L、345M、345P、345S、345T、345Vおよび345Wからなる群より、例えば345R、345Q、345N、345Kおよび345Yからなる群より選択される、本発明1064～1066のいずれかの方法。

20

[本発明1068]

E430に対応する位置におけるアミノ酸置換が、430G、430T、430S、430F、430H、430A、430C、430D、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430Q、430R、430V、430Wおよび430Yからなる群より、例えば430G、430T、430S、430Fおよび430Hからなる群より選択される、本発明1064～1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

S440に対応する位置におけるアミノ酸置換が440Yまたは440Wである、本発明1064～1068のいずれかの方法。

30

[本発明1070]

E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換が、それぞれ345R、430Gおよび440Yであるか、または代替的にそれぞれ345K、430Gおよび440Yであるか；または代替的にそれぞれ345R、430Sおよび440Yであるか；または代替的にそれぞれ345R、430Gおよび440Wであるか；または代替的にそれぞれ345R、430Gおよび440Kであるか；または代替的に、E345、E430およびY436に対応する位置におけるアミノ酸置換がそれぞれ345R、430Gおよび436Iである、本発明1064～1069のいずれかの方法。

[本発明1071]

重鎖配列のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgMおよびIgEからなる群より選択される、本発明1064～1070のいずれかの方法。

40

[本発明1072]

重鎖が、霊長動物またはネズミ科動物由来、例えばヒト由来である、本発明1064～1071のいずれかの方法。

[本発明1073]

各ポリペプチドが、同じ抗原と結合してもよい第1および第2の抗原結合領域を形成する、軽鎖可変領域および定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖配列と会合している免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、本発明1064～1072のいずれかの方法。

[本発明1074]

50

前記二量体タンパク質の各ポリペプチドが、全長重鎖定常領域、例えば全長ヒトIgG1重鎖定常領域を含む、本発明1073の方法。

[本発明1075]

前記二量体タンパク質が抗体である、本発明1064～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

本発明1064～1075のいずれかの方法によって調製される、変異型二量体タンパク質。

[本発明1077]

画像化、診断法または治療法において同時、別々または逐次的に用いるための、本発明1001～1037のいずれかの第1の二量体タンパク質および本発明1001～1037のいずれかの第2の二量体タンパク質を含む、キット・オブ・パーツ。

10

[本発明1078]

細菌感染症、ウイルス感染症もしくは寄生虫感染症、自己免疫疾患、癌、炎症などの疾患の治療において用いるため、および/または細菌感染症によって引き起こされる敗血症性ショックのリスクを低下させるのに用いるための、本発明1001～1063、1076、1077および1079のいずれかの二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツ。

[本発明1079]

前記二量体タンパク質が、リポ多糖(LPS)、リポオリゴ糖(LOS)、デルタ内毒素、ボツリヌス毒素、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)外毒素、細菌スーパー抗原、耐熱性エンテロトキシン、細胞溶解素、チャネル形成毒素、酵素活性毒素、またはマイコトキシンと特異的に結合する結合領域を含む、本発明1001～1063、1076、1077および1079のいずれかの二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツ。

20

[本発明1080]

ヒトまたは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部の画像化において用いるための、本発明1001～1063、1076、1077および1079のいずれかの二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツ。

[本発明1081]

本発明1001～1063、1076、1077および1079のいずれかの二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツを投与する段階を含む、ヒトまたは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するための方法。

30

[本発明1082]

本発明1001～1063、1076、1077および1079のいずれかの二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツを投与する段階を含む、細菌感染症、ウイルス感染症もしくは寄生虫感染症を治療するため、ヒトもしくは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するため、またはヒトもしくは他の哺乳動物の身体からの標的分子のクリアランスをモジュレートするための方法。

[本発明1083]

本発明1001～1063、1076、1077および1079のいずれかの二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物、キット・オブ・パーツを投与する段階を含む、癌、自己免疫疾患、臓器移植拒絶反応、および液性系におけるC1q枯渇などの疾患を予防または治療するための方法。

40

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】(A)六量体IgG分子形成の略図。

【図2】Clustal 2.1ソフトウェアを用い、Kabatに規定されたEUインデックスによって番号を付した、IgG1重鎖における残基P247～K447に対応するヒトIgG1、IgG1f、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgEおよびIgM Fcセグメントの配列アラインメント。示されているIgG1の配列(SEQ ID NO:6)は、ヒトIgG1重鎖定常領域(SEQ ID NO:1; UniProtアクセス番号P01857)の残基130～330を表しており、示されているIgG1m(f)の配列

50

(SEQ ID NO: 7) は、アロタイプ変異体IgG1m (f) (SEQ ID NO: 5) の残基130~330を表しており；示されているIgG2の配列 (SEQ ID NO: 8) は、IgG2重鎖定常領域 (SEQ ID NO: 2; UniProtアクセッション番号P01859) の残基126~326を表しており；示されているIgG3の配列 (SEQ ID NO: 9) は、IgG3重鎖定常領域 (SEQ ID NO: 3; UniProtアクセッション番号P01860) の残基177~377を表しており；示されているIgG4の配列 (SEQ ID NO: 10) は、IgG4重鎖定常領域 (SEQ ID NO: 4; UniProtアクセッション番号P01861) の残基127~327を表しており；示されているIgEの配列 (SEQ ID NO: 11) は、IgE定常領域 (UniProtアクセッション番号P01854) の残基225~428を表しており；示されているIgA1の配列 (SEQ ID NO: 12) は、IgA1定常領域 (UniProtアクセッション番号P01876) の残基133~353を表しており；示されているIgA2の配列 (SEQ ID NO: 13) は、IgA2定常領域 (SEQ ID NO: 8; UniProtアクセッション番号P01877) の残基120~340を表しており；示されているIgMの配列 (SEQ ID NO: 14) は、IgM定常領域 (UniProtアクセッション番号P01871) の残基230~452を表しており；示されているIgDの配列 (SEQ ID NO: 15) は、IgD定常領域 (UniProtアクセッション番号P01880) の残基176~384を表している。

10

【図3】図3AおよびB: IgG1 (SEQ ID NO: 3)、IgG4 (SEQ ID NO: 5) および (部分的) IgG3 (SEQ ID NO: 6) 骨格における抗EGFr抗体2F8の配列アライメント。KabatおよびEUインデックスによるアミノ酸番号付けを示している (いずれも、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載)。

【図4】野生型の非改変Fc分子およびFc'分子間の相互作用を図示している、オリゴマー (例えば、六量体) 配置における隣接分子 (それぞれFcおよびFc') のFc間のK439 / S440相互作用の詳細図。

20

【図5】CD38陽性細胞に対する、CD38抗体HuMAb 005の変異体によって媒介されるCDC。(A) 一連の濃度の005変異体による、Daudi細胞に対するCDC活性。(B) 一連の濃度のHuMAb 005変異体による、Raji細胞に対するCDC活性。(C) 20%または50% NHSのいずれかを伴うHuMAb 005のE345R変異体の、Wien133細胞に対するCDC活性。(D) 20%または50% NHSのいずれかを伴うHuMAb 005および7D8のE345R変異体の、Raji細胞に対するCDC活性。一過性トランスフェクションを行ったものから単離した非精製抗体試料を試験した。陰性対照として、擬似トランスフェクト細胞の上清を用いた。

【図6】Fc結合ペプチドを用いた競合実験における、CD38抗体HuMAb 005の野生型およびE345R変異体によるCDC。一連の濃度のFc結合性DCAWHLGELVWCTペプチド (SEQ ID NO: 7) とともにインキュベートした、抗体でオプソニン化したDaudi細胞に対するCDC後の細胞溶解を測定した。一過性トランスフェクションを行ったものから単離した非精製抗体試料を用いた。陰性対照として、擬似トランスフェクトした細胞の上清を用いた。

30

【図7】CD20抗体7D8変異体 (A)、CD38抗体005変異体 (B)、CD38抗体005変異体およびCD20抗体7D8変異体の混合物 (C) および (D) による、CD20およびCD38陽性のWien133細胞に対するCDC。

【図8】図8AおよびB: Raji-luc #2D1細胞を用いた皮下異種移植モデルにおける、IgG1-005-E345Rのインビボ活性の評価。

【図9】CD38陽性でEGFR陰性のWien133細胞に対する、E345R変異を有するCD38 / EGFR二重特異性抗体によるCDC。

40

【図10】図10AおよびB: E345R変異を有するおよび有しないCD20 / CD38二重特異性抗体による、CD20陽性でCD38陰性のWien133細胞またはRaji細胞に対するCDC。

【図11】E345R変異を有するEGFR抗体2F8による、EGFR陽性A431細胞に対するCDC。

【図12】図12AおよびB: E345R変異型抗体によって媒介されるCDC。

【図13】リソソームマーカーLAMP1 (APC) を用いたTF抗体 (FITC) の共局在分析。

【図14】図14A~D: 種々のB細胞株に対する検討で、E345Rの導入は、野生型リツキシマブと比較してCDC媒介性致死の増強をもたらした。

【図14E】CD20発現レベルが同等な種々のB細胞株において、E345Rの導入は、野生型リツキシマブと比較して、補体調節タンパク質CD46 (A)、CD55 (B) またはCD59 (C) の発

50

現レベルとは無関係に、最大CDC媒介性致死の増強をもたらした。

【図 1 5】CDCの動態。E345R抗体は、野生型抗体と比較して、CDCによる、より迅速かつより実質的な標的細胞溶解をもたらす。

【図 1 6】CDCの動態。二重特異性CD38 × CD20抗体へのE345R変異の導入は、より迅速かつより実質的なCDC媒介性標的細胞溶解をもたらす。

【図 1 7】CDCの動態。EGFR陰性Raji細胞と一価結合する二重特異性抗体EGFR × CD38へのE345R変異の導入は、E345R変異のない二重特異性抗体EGFR × CD38よりも迅速かつより実質的なCDC媒介性標的細胞溶解をもたらす。

【図 1 8】図18A～F：野生型抗体と（A～C）E345RおよびQ386K、または（D～F）E345R、E430GおよびQ386Kを含有する変異型抗体との組み合わせによる、Wien133細胞に対するCDC 10
。IgG1-b12変異体はWien133細胞と結合しないことから、陰性対照抗体として用いた。

【図 1 9】E345R変異を含有するIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4アイソタイプ抗体のCDC活性。

【図 2 0】野生型CD38抗体005へのFc-Fc安定化性E345R変異の導入は、エクスピボCDCアッセイにおいて初代CLL細胞の致死の増強をもたらす（平均 ± 平均の標準誤差）。

【図 2 1】抗体変異体IgG1-005-E345R / E430G / S440YのPAGE分析。左のパネル：SDS-PAGE、非還元条件。中央のパネル：SDS-PAGE、還元条件。右のパネル：非変性PAGE。注記：レーン1：IgG1-b12対照抗体。レーン2：IgG1-005-E345R / E430G。レーン3：IgG1-005-E345R / E430G / S440Y。

【図 2 2】野生型IgG1-005抗体のHP-SEC分析。単量体（すなわち、単一の抗体）の割合が 20
99%を上回ると推定された。

【図 2 3】抗体変異体IgG1-005-E345R / E430G / S440YのHP-SEC分析。オリゴマーの割合がおおよそ79%であると推定された。

【図 2 4】野生型IgG1-005抗体（破線）とIgG1-005-E345R / E430G / S440Y（実線）のHP-SECプロファイルの重ね合わせ図。

【図 2 5】IgG1-005、IgG1-005-E345R / E430G / S440YおよびIgG1-005-E345Rを用いたC1q結合ELISA。一連の濃度の表記の抗体でウェルをコーティングし、固定濃度のC1qとともにインキュベートした。

【図 2 6】一連の濃度のIgG1-005-WT、IgG1-005-E345R / E430G / S440YおよびIgG1-005-E345Rによる、CD38陽性Ramos細胞に対するCDC活性。 30

【図 2 7】CD38陽性Raji細胞ならびに一連の濃度のIgG1-005-WT、IgG1-005-E345R / E430G / S440YおよびIgG1-005-E345Rを用いたADCCレポーターアッセイ。

【図 2 8】総ヒトIgG ELISAによって判定した、SCIDマウスにおける経時的な血漿中ヒトIgG濃度。：野生型IgG1-005；：IgG1-005-E345R / E430G / S440Y。

【図 2 9】抗CD38 ELISAによって判定した、SCIDマウスにおける投与されたヒトIgGのクリアランス速度。：野生型IgG1-005；：IgG1-005-E345R / E430G / S440Y。

【図 3 0】0.1M Na₂SO₄ / 0.1Mリン酸ナトリウム、pH 6.8中でのIgG1-005のHP-SECプロファイル。

【図 3 1】0.1M Na₂SO₄ / 0.1Mリン酸ナトリウム、pH 6.8中でのIgG1-005-E345R / E430G / S440YのHP-SECプロファイル。 40

【図 3 2】0.15M NaCl / 0.1Mクエン酸、pH 6.8（破線）中およびpH 5.0（実線）中でのIgG1-005のHP-SECプロファイルの重ね合わせ図。

【図 3 3】0.15M NaCl / 0.1Mクエン酸、pH 6.8（破線）中およびpH 5.0（実線）中でのIgG1-005-E345R / E430G / S440YのHP-SECプロファイル。

【図 3 4】三重変異型抗体IgG1-005-RGY、IgG-7D8-RGY、IgG1-ritux-RGY、IgG1-2F8-RGYおよびIgG1-M1-RGYのHP-SEC分析。

【図 3 5】E345R / E430G / S440Y三重変異型CD20抗体は、7D8由来抗体（A）およびリツキシマブ由来抗体（B）を用いたエクスピボアッセイにおいて初代CD20陽性CLL細胞の死滅の増強を示す。

【図 3 6】IgG1-005-RGY（A）、IgG2-005-RGY（B）、IgG3-005-RGY（C）およびIgG4-005- 50

RGY (D) のHP-SEC分析。パーセンテージは、多量体の合計を、総ピーク面積に占める割合として示している。

【図37】一連の濃度の、種々のIgGアイソタイプ骨格の005抗体変異体による、CD38陽性Daudi細胞(A)およびWien 133細胞(B)に対するCDC活性。

【図38】IgG1-005-KGY(A)、IgG1-005-RSY(B)、IgG1-005-RGW(C)およびIgG1-005-RGI(D)のHP-SEC分析。

【図39】一連の濃度のIgG1-005-RGY、IgG1-005-KGY、IgG1-005-RSY、IgG1-005-RGWおよびIgG1-005-RGIによる、CD38陽性Wien 133細胞(A)およびRamos細胞(B)に対するCDC活性。

【図40】IGG1-005-RGE、IgG1-005-RGKおよびIgG1-005-RGE + IgG1-005-RGKの混合物のHP-SEC分析(AUは「任意単位」を示す)。

【図41】IgG1-005-RGE、IgG1-005-RGIKおよびIgG1-005-RGE + IgG1-005-RGIKの混合物のHP-SEC分析(AUは「任意単位」を示す)。

【図42】IgG1-005-RGE + IgG1-005-RGKの混合物およびIgG1-005-RGE + IgG1-005-RGIKの混合物のHP-SEC軌跡の重ね合わせ図(AUは「任意単位」を示す)。

【図43】三重変異型Fc断片(Fc-RGY)のHP-SEC分析。

【図44】Fc-RGY-647と全長IgG1-RGY抗体との混合物とともにインキュベートした、A431細胞(A)およびDaudi細胞(B)のFACS分析。

【図45】図45AおよびB: 種々のpHレベルでのIgG1-005-RGYのHP-SEC分析。パーセンテージは、総ピーク面積に占める割合として、オリゴマーの合計を示している。

【図46】三重変異RGYの導入によって、IgG抗体の種々のアイソタイプ変異体においてプログラム細胞死が誘導される。

【図47】IgG1-005-RGY(実線)および六量体IgM-005(破線)のHP-SEC分析。

【図48】一連の濃度のIgG1-005、IgG1-005-RGY、IgM-005による、CD38陽性Daudi細胞(A)およびWien133細胞(B)に対するCDC活性。

【図49】IgG1-2F8-RGYを用いた、固形腫瘍細胞株A431細胞(A)およびDifi細胞(B)に対するインビトロCDCアッセイ。

【図50】溶液中での補体活性化に関する尺度としての、抗体によって正常ヒト血清中に生成されたC4d。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

定義

「免疫グロブリン」という用語は、1対の軽(L)低分子量鎖および1対の重(H)鎖という2対のポリペプチド鎖からなり、その4つすべてがジスルフィド結合によって相互接続されている可能性のある、構造的に類縁性のある糖タンパク質のクラスを指す。免疫グロブリンの構造は詳細に特徴づけられている。例えば、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照。手短に述べると、各重鎖は典型的には、重鎖可変領域(本明細書ではVHと略記)および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は典型的には、CH1、CH2およびCH3という3つのドメインで構成される。重鎖は、いわゆる「ヒンジ領域」におけるジスルフィド結合を介して相互接続されている。各軽鎖は典型的には、軽鎖可変領域(本明細書ではVLと略記)および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は典型的には、CLという1つのドメインで構成される。VH領域およびVL領域を、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存された領域の間に散在する、相補性決定領域(CDR)とも称される超可変性の領域(または超可変領域、これらは構造的に画定されたループの配列および/または形態の点で超可変性であり得る)にさらに細分することもできる。各VHおよびVLは典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置された3つのCDRおよび4つのFRで構成される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987))も参照。別の記述があるか、または文脈と食い違う場合を除き、定常領域配列のアミノ酸は、本明細書にお

いて、EUインデックスまたはナンバリング (Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)に記載)に従って番号付けされている。

【0026】

「ヒンジ領域」という用語は、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指すことを意図している。このため、例えば、ヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、Kabatに記載されたEUナンバリングシステムによるアミノ酸216~230に対応する。

【0027】

「CH2領域」または「CH2ドメイン」という用語は、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン重鎖のCH2領域を指すことを意図している。このため、例えば、ヒトIgG1抗体のCH2領域は、EUナンバリングシステムによるアミノ酸231~340に対応する。しかし、CH2領域が、本明細書に記載したような他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【0028】

「CH3領域」または「CH3ドメイン」という用語は、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン重鎖のCH3領域を指すことを意図している。このため、例えば、ヒトIgG1抗体のCH3領域は、EUナンバリングシステムによるアミノ酸341~447に対応する。しかし、CH3領域が、本明細書に記載したような他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【0029】

「Fc領域」、「Fc断片」または「Fcドメイン」は、本明細書において互換的に用いることができ、N末端からC末端の向きに少なくともヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む抗体領域のことを指す。IgG1抗体のFc領域は、例えば、パパインによるIgG1抗体の消化によって生成できる。

【0030】

「Fab断片」という用語は、本発明の文脈において、重鎖および軽鎖の可変領域ならびに軽鎖の定常領域および免疫グロブリンのCH1領域を含む、免疫グロブリン分子の断片のことを指す。「CH1領域」は、例えば、EUナンバリングシステムによるアミノ酸118~215に対応するヒトIgG1抗体の領域のことを指す。したがって、Fab断片は免疫グロブリンの結合領域を含む。

【0031】

「抗体」(Ab)という用語は、本発明の文脈において、典型的な生理的条件下で、意味のある期間、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間もしくはそれより長い、約48時間もしくはそれより長い、約3日、4日、5日、6日、7日もしくはそれより長い日数など、または任意の他の妥当な機能的に定められた期間(例えば、抗原に対する抗体結合に伴う生理的応答を誘導、促進、増強および/もしくは調節するのに十分な時間、ならびに/または抗体がエフェクター活性を動因するのに十分な時間)の半減期で抗原と特異的に結合する能力を有する、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそれらのいずれかの派生物を指す。本発明の抗体は、免疫グロブリンのFcドメインと抗原結合領域とを含む。抗体は一般に、2つのCH2-CH3領域と1つの連結領域(例えばヒンジ領域)とを含み、例えば少なくとも1つのFcドメインを含む。したがって、本発明の抗体は1つのFc領域と1つの抗原結合領域を含み得る。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域または「Fc」領域は、免疫系のさまざまな細胞(例えばエフェクター細胞)および補体系の成分(例えば補体活性化の古典的経路における第一成分であるC1q)を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介し得る。また、抗体が、二重特異性抗体または類似の分子などの多重特異性抗体であってもよい。「二重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる、典型的には重なり合わないエピトープに対する特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは、同一の標的にあってもよく、または異なる標的にあってもよい。エピトープが異なる標的にある場合、そのような標的は同一の細胞に

10

20

30

40

50

あってもよく、または異なる細胞もしくは細胞種にあってもよい。上述の通り、別の記述があるか、または文脈と明らかに食い違う場合を除き、本明細書における抗体という用語は、Fc領域の少なくとも一部分を含み、かつ抗原と特異的に結合する能力を保持している抗体の断片を含む。そのような断片は、公知の任意の手法、例えば酵素的切断、ペプチド合成および組換え発現の手法などによって得ることができる。抗体の抗原結合機能が全長抗体の断片によって果たされ得ることは示されている。「Ab」または「抗体」という用語の範囲に含まれる結合性断片の例には、一価抗体（GenmabによるWO 007059782号に記載）；2つの重鎖のみからなり、例えばラクダ科動物などにおいて天然に存在する重鎖抗体（例えば、Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446）；ThioMab（Roche、WO2011069104号）；非対称性の二重特異性抗体様分子である鎖交換組換えドメイン（strand-exchange engineered domain）（SEEDまたはSeed-body）（Merck、WO2007110205号）；Triomab（Fresenius、Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219））；Fc Adp（Regeneron、WO2010151792号）；Azymetric Scaffold（Zymeworks / Merck、WO2012/058768号）；mAb-Fv（Xencor、WO2011/028952号）；二重可変ドメイン免疫グロブリン（Abbott、DVD-Ig、米国特許第7,612,181号）；二重ドメイン双頭抗体（Unilever；Sanofi Aventis、WO20100226923号）；ジ-ダイアボディ（Di-diabody）（ImClone / Eli Lilly）；ノブ・イントウ・ホール（Knobs-into-holes）抗体フォーマット（Genentech、WO9850431号）；デュオボディ（DuoBody）（Genmab、WO 2011/131746号）；静電ステアリング（Electrostatic steering）抗体フォーマット（Amgen、EP1870459号およびWO 2009089004号；Chugai、US201000155133号；Oncomed、WO 2010129304A2号）；二重特異性IgG1およびIgG2（Rinat neurosciences Corporation、WO11143545号）；CrossMab（Roche、WO2011117329号）；LUZ-Y（Genentech）；Biclonic（Merus）；二重標的指向性ドメイン抗体（GSK / Domantis）；2つの標的を認識するツー・イン・ワン（Two-in-one）抗体（Genentech、NovImmune）；架橋Mab（Cross-linked Mab）（Karmanos Cancer Center）；CovX-body（CovX / Pfizer）；IgG様二重特異性（ImClone / Eli Lilly、Shen, X, et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74）；ならびにDIG-bodyおよびPIG-body（Pharmabcine）；ならびに二重親和性再標的指向性（retargeting）分子（Fc-DARTまたはIg-DART、MacroGenicsによる、WO / 2008 / 157379号、WO / 2010 / 080538号）；Zybody（Zyngenia）；共通の軽鎖（Crucell / Merus、US7262028号）または共通の重鎖（NovImmuneによる Body）を用いるアプローチ、さらには、ZymoGenetics / BMSによるBsAbのように、ポリペプチド配列をFcドメインを含有する抗体断片と融合させたものを含む、scFv融合物のような融合タンパク質）；Biogen IdecによるHERCULES（US007951918号）；Emergent BioSolutions / TrubionによるSCORPION、Ts2Ab（MedImmune / AZ（Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92）；NovartisによるscFv融合物、Changzhou Adam Biotech IncによるscFv融合物（CN 102250246号）；RocheによるTvAb（WO 2012025525号、WO 2012025530号）；f-StarによるmAb²（WO2008/003116号）および二重scFv融合物が非限定的に含まれる。また、抗体という用語が、別に指定する場合を除き、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ヒトモノクローナル抗体など）、抗体混合物（組換えポリクローナル体）、例えばSymphogenおよびMerusによって開発された技術によって作製されたもの（Oligoclones）、ならびに抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体なども含むことが理解されるべきである。作製される抗体は、可能性として任意のアイソタイプを有し得る。

【0032】

「全長抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、そのアイソタイプの野生型抗体に通常認められるものに対応する重鎖および軽鎖の定常ドメインおよび可変ドメインのすべてを含む抗体（例えば、親抗体または変異型抗体）を指す。

【0033】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことを意図している。本発明のヒト抗体が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってはコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発、またはインビボでの体

10

20

30

40

50

細胞変異によって導入される変異、挿入または欠失)を含んでもよい。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に接ぎ合わされた抗体は含まないものとする。

【0034】

「モノクローナル抗体」、「モノクローナルAb」、「モノクローナル抗体組成物」、「mAb」などの用語は、本明細書で用いる場合、単分子組成のAb分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を呈する。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する、単一の結合特異性を呈するAbを指す。ヒトmAbは、機能的ヒト抗体を産生するように再編成されたヒト重鎖導入遺伝子レパートリーおよび軽鎖導入遺伝子レパートリーを含むゲノムを有するトランスジェニック性またはトランスクロモソーム非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られたB細胞を、不死化細胞と融合させたものを含むハイブリドーマによって作製できる。

【0035】

本明細書で用いる場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンのクラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA1、IgGA2、IgEもしくはIgM、またはそれらの任意のアロタイプ、例えばIgG1m(za)およびIgG1m(f)など)を指す。さらに、各重鎖アイソタイプは、カッパ()またはラムダ()軽鎖のいずれかと組み合わせることができる。

【0036】

「一価抗体」という用語は、本発明の文脈において、抗体分子が該抗体の1つの結合ドメインで抗原と結合できるのみであること、例えば、単一の抗原-抗体相互作用を有し、それ故に抗原架橋を行えないことを意味する。

【0037】

本明細書で用いる場合、「結合領域」とは、細胞、細菌、ビリオンなどに付随する標的と結合し得るタンパク質、タンパク質リガンド、受容体、抗原結合領域、またはリガンド結合領域などのポリペプチド配列であり得る。結合領域は、例えば、受容体、受容体リガンド、または免疫グロブリンもしくは抗体の抗原結合領域の一部を含み得る。

【0038】

本明細書で用いる場合、「標的」という用語は、本発明の文脈において、CH2、CH3、および任意でヒンジ領域、ならびに結合領域を含むポリペプチドの結合領域が結合する分子と理解されよう。抗体の結合の文脈で用いられる場合、産生された抗体が対象とする任意の抗原を含む。「抗原」および「標的」という用語は、抗体との関係について互換的に用いることができ、かつ本発明の任意の局面または態様に関して同じ意味および目的を持つ。

【0039】

本明細書で用いる場合、所定の抗原に対する抗体の結合の文脈における「結合」という用語は、典型的には、例えば、抗原をリガンドとして、抗体を分析物として用いてBIAcore 3000計器で表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって決定した場合に、 K_D が約 10^{-6} Mもしくはそれ未満、例えば、 10^{-7} Mもしくはそれ未満、例えば約 10^{-8} Mもしくはそれ未満、例えば約 10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 10^{-10} Mもしくはそれ未満、または約 10^{-11} Mもしくはそれ未満などに対応する親和性での結合であり、所定の抗原または近縁関係にある抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)に対する結合のその親和性よりも、少なくとも10分の1の低さ、例えば少なくとも100分の1の低さ、例えば少なくとも1,000分の1の低さ、例えば少なくとも10,000分の1の低さ、例えば少なくとも100,000分の1の低さなどの K_D に対応する親和性で、所定の抗原と結合する。親和性がより低くなる量は抗体の K_D に依存し、そのため、抗体の K_D が極めて低い(すなわち、抗体の特異性が高い)場合には、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも低くなる程度は、少なくとも10,000分の1となることがある。「 K_D 」(M)という用語は、本明細書で用いる場合

10

20

30

40

50

、特定の抗体-抗原相互作用に関する解離平衡定数を指す。

【 0 0 4 0 】

本発明の「変異体」とは、二量体タンパク質などの分子、または「親分子」（例えば「親抗体」などの「親二量体タンパク質」）と比較して1つまたは複数の変異を含む分子を指す。抗体変異体について、例示的な親抗体フォーマットには、野生型抗体、全長抗体もしくはFcを含有する抗体断片、二重特異性抗体、ヒト抗体、またはそれらの任意の組み合わせが非限定的に含まれる。例示的な変異には、親アミノ酸配列におけるアミノ酸のアミノ酸欠失、挿入および置換が含まれる。アミノ酸置換は、天然型アミノ酸を、別の天然アミノ酸または非天然アミノ酸誘導体に交換することがある。アミノ酸置換は保存的なこともあれば、非保存的なこともある。本発明の文脈において、保存的置換は、以下の3つの表の1つまたは複数に表されたアミノ酸のクラス内部での置換によって定義し得る：

10

保存的置換に関するアミノ酸残基のクラス

酸性残基	Asp (D) および Glu (E)
塩基性残基	Lys (K), Arg (R), および His (H)
親水性非荷電残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N), および Gln (Q)
脂肪族非荷電残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), および Ile (I)
非極性非荷電残基	Cys (C), Met (M), および Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y), および Trp (W)

20

別の保存的アミノ酸残基置換のクラス

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

30

アミノ酸残基の別の物理的および機能的な分類

アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V, および M
シクロアルケニル付随残基	F, H, W, および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, および Y
負荷電残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, および T
正荷電残基	H, K, および R
小型残基	A, C, D, G, N, P, S, T, および V
極めて小型の残基	A, G, および S
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, および T
柔軟性のある残基	Q, T, K, S, G, P, D, E, および R

10

【 0 0 4 1 】

本発明の文脈において、変異体における置換は以下のように示される：

元のアミノ酸 位置 置換されたアミノ酸；

周知のアミノ酸命名法を参照して、三文字コードまたは一文字コードは、コードXaaおよびXを含めて、アミノ酸残基を示すために用いられる。したがって、「E345R」または「Glu345Arg」という表記は、変異体が、親抗体での位置345におけるアミノ酸に対応する変異型アミノ酸の位置に、この2つを以下に示すようにアライメントした場合に、グルタミン酸のアルギニンによる置換を含むことを意味する。

20

【 0 0 4 2 】

そのような位置が抗体に存在しない場合、変異体はアミノ酸の挿入を含み、例えば：位置 置換されたアミノ酸；例えば、「448E」のような表記を用いる。

【 0 0 4 3 】

そのような表記は、一連の相同なポリペプチドまたは抗体における改変に関して特に該当する。

【 0 0 4 4 】

同様に、置換アミノ酸残基の実体が重要ではない場合には：

元のアミノ酸 位置；または「E345」。

30

【 0 0 4 5 】

元のアミノ酸および/または置換されたアミノ酸が、複数の、ただしすべてではないアミノ酸を含む修飾については、位置345におけるグルタミン酸のアルギニン、リジンまたはトリプトファンへの置換について：

「Glu345Arg,Lys,Trp」または「E345R,K,W」または「E345R/K/W」または「E345をR、KまたはWに」を、本発明の文脈において互換的に用いることができる。

【 0 0 4 6 】

その上、「置換」という用語は、他の19種の天然アミノ酸のいずれか1つへの置換、または非天然アミノ酸などの他のアミノ酸への置換も包含する。例えば、位置345におけるアミノ酸Eの置換には、以下の置換のそれぞれが含まれる：345A、345C、345D、345G、345H、345F、345I、345K、345L、345M、345N、345Q、345R、345S、345T、345V、345W、345P、および345Y。ところで、これは345Xとの表記と等価であり、ここでXは元のアミノ酸以外の任意のアミノ酸を表している。また、これらの置換を、E345A、E345C、その他、またはE345A、C、その他、またはE345A/C/その他と表すこともできる。同じことが、本明細書で言及する各位置およびあらゆる位置についても同様に成り立ち、そのような置換の任意のものが本明細書に具体的に含まれる。

40

【 0 0 4 7 】

「アミノ酸」および「アミノ酸残基」という用語は、互換的に用いることができる。

50

【0048】

「D/E356」への言及は、本文脈において、ヒトIgG1の配列におけるアロタイプ変異体のことを指す。ヒトIgG1のIgG1m(za)アロタイプにおいて、位置356におけるアミノ酸はDであり、一方、ヒトIgG1のIgG1m(f)アロタイプにおいて、位置356におけるアミノ酸はEである。

【0049】

別の記述があるか、または文脈と食い違う場合を除き、アミノ酸位置番号への言及は、ヒトIgG1重鎖におけるアミノ酸位置番号のことを指す。

【0050】

別の配列におけるアミノ酸またはセグメント「に対応する」、1つの配列におけるアミノ酸またはセグメントとは、(i) ALIGN、ClustalWまたは類似のものなどの標準的な配列アラインメントプログラムを、典型的にはデフォルトの設定で用いて、他のアミノ酸またはセグメントとアラインメントされる、かつ(ii) SEQ ID NO:1に対して少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する、もののことである。例えば、図2および3に示された配列アラインメントを用いて、IgG1 Fc配列における特定のアミノ酸に対応する、示された免疫グロブリンFc配列における任意のアミノ酸を特定できる。

【0051】

本発明の目的のために、別の参照アミノ酸配列における特定の位置に対応する、あるアミノ酸配列における位置にあるアミノ酸、ならびに2つのアミノ酸配列間またはヌクレオチド配列間の同一性の度合いを、2つの配列のアラインメントによって決定できる。本明細書においては、別の記述があるか、または文脈と食い違う場合を除き、参照アミノ酸配列はヒトIgG1重鎖のアミノ酸配列である。Needleman-Wunschアラインメント(すなわち、グローバルアラインメント)であるプログラム「Align」を、ポリペプチド配列、ならびにヌクレオチド配列のアラインメントのために用いることができる。ポリペプチドのアラインメントのためにはデフォルトのスコアリング行列BLOSUM50またはBLOSUM62を用いることができ、ヌクレオチドのアラインメントのためにはデフォルトの同一性行列を用いることができ、ギャップの第1の残基のペナルティは、ポリペプチドについては-12とし、ヌクレオチドについては-16とする。ギャップのさらなる残基に対するペナルティは、ポリペプチドについては-2とし、ヌクレオチドについては-4とする。「Align」は、FASTAパッケージ・バージョンv20u6(W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448、およびW. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63-98を参照)の一部である。FASTAタンパク質アラインメントは、Smith-Watermanアルゴリズムをギャップサイズに関して限定せずに用いる("Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197を参照)。免疫グロブリン重鎖のFc領域間の代表的なアラインメントを図2および3に示している。

【0052】

「ベクター」という用語は、本明細書で用いる場合、ベクター中に連結された核酸セグメントの転写を誘導し得る核酸分子を指す。ベクターの1つの型は、環状二本鎖DNAループの形態にある「プラスミド」である。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、この場合には核酸セグメントをウイルスゲノム中に連結できる。ある種のベクターは、それらが導入された宿主細胞内で自律複製を行うことができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター)。他のベクター(非エピソーム性哺乳動物ベクターなど)は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能的に連結している遺伝子の発現を導くことができる。そのようなベクターは、本明細書において「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA手法において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態にあることが多い。

本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に用い得るが、それはプラスミドがベクターの最も一般的に用いられる形態であるためである。しかし、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター（複製能欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなど）のような他の形態の発現ベクターも含むことを意図している。

【0053】

「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、本明細書で用いる場合、発現ベクターが導入された細胞を指すことを意図している。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も指すことを意図していることが理解されるべきである。変異または環境的影響のいずれかに起因してある種の修飾が後続世代で起こり得るため、そのような子孫は実際には親細胞と同一ではない可能性があるものの、それでもなお、本明細書で用いる「宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。組換え宿主細胞には、例えば、トランスフェクトーマ、CHO細胞、HEK-293細胞、PER.C6、NS0細胞およびリンパ球細胞、ならびに原核細胞、例えば大腸菌（*E. coli*）など、ならびに植物細胞および真菌といった他の真核生物宿主が含まれる。

【0054】

「トランスフェクトーマ」という用語は、本明細書で用いる場合、Abまたは標的抗原を発現する組換え真核宿主細胞、例えば、CHO細胞、PER.C6、NS0細胞、HEK-293細胞、植物細胞、または酵母細胞を含む真菌などを含む。

【0055】

本明細書で用いる場合、「エフェクター細胞」という用語は、免疫応答の認識段階および活性化段階ではなく、免疫応答のエフェクター段階に関与する免疫細胞を指す。例示的な免疫細胞には、骨髄系またはリンパ系起源の細胞、例えばリンパ球（B細胞、および細胞溶解性T細胞（CTL）を含むT細胞など）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、多形核細胞、例えば好中球、顆粒球、マスト細胞および好塩基球などが含まれる。ある種のエフェクター細胞は、Fc受容体（FcR）または補体受容体を発現し、特異的な免疫機能を遂行する。いくつかの態様において、例えばナチュラルキラー細胞などのエフェクター細胞は、ADCCを誘導できる。例えば、FcRを発現する単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞およびクッパー細胞は、標的細胞を特異的に死滅させること、および抗原を免疫系の他の成分に対して提示すること、または抗原を提示する細胞と結合することに関与する。いくつかの態様において、ADCCは、標的細胞表面への活性化C3断片の沈着をもたらす、抗体が誘因となる古典的補体活性化をさらに増強できる。C3切断産物は、骨髄系細胞上に発現される、CR3などの補体受容体（CR）に対するリガンドである。エフェクター細胞上のCRによる補体断片の認識は、Fc受容体を介したADCCの増強を促進し得る。いくつかの態様において、抗体を誘因とする古典的補体活性化は、標的細胞上のC3断片をもたらす。これらのC3切断産物は、直接的な補体依存性細胞傷害作用（CDC）を促進し得る。いくつかの態様において、エフェクター細胞は、標的抗原、標的粒子または標的細胞を貪食し得る。エフェクター細胞上での特定のFcRまたは補体受容体の発現は、サイトカインなどの体液性因子によって調節され得る。例えば、FcRIの発現は、インターフェロン（IFN）および/またはG-CSFによってアップレギュレートされることが見いだされている。この発現増強は、標的に対するFcRI保有細胞の細胞傷害活性を増強する。エフェクター細胞は、標的抗原を貪食すること、または標的細胞を貪食もしくは溶解できる。いくつかの態様において、抗体を誘因とする古典的補体活性化は、標的細胞上のC3断片をもたらす。これらのC3切断産物は、エフェクター細胞による直接的な食作用を促進するか、または抗体媒介性食作用を増強することによって間接的に促進する。

【0056】

本明細書で用いる場合、「エフェクター機能」という用語は、抗体などの二量体タンパク質と、任意で細胞上、細胞膜上、ビリオン上または別の粒子上にあるその標的（例えば抗原）との結合の結果として生じる機能のことを指す。エフェクター機能の例には、（i）C1q結合、（ii）補体活性化、（iii）補体依存性細胞傷害作用（CDC）、（iv）オリゴ

10

20

30

40

50

マー形成、(v)オリゴマー安定性、(vi)抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、(vii)FcRn結合、(viii)Fc 受容体結合、(ix)抗体依存性細胞食作用(ADCP)、(x)補体依存性細胞傷害作用(CDCC)、(xi)補体増強性細胞傷害作用、(xii)抗体によって媒介されるオプソニン化抗体の補体受容体に対する結合、(xiii)細胞内移行、(xiv)ダウンモジュレーション、(xv)アポトーシスの誘導、(xvi)オプソニン作用、(xvii)増殖のモジュレーション、例えば増殖の低下、阻害または刺激など、および(xii)(i)~(xvi)の任意のものの組み合わせが含まれる。

【0057】

本明細書で用いる場合、「親和性」という用語は、抗体の個々の抗原結合部位と抗原との一価結合のように単一部位における、ある分子(例えば抗体)と別の分子(例えば標的または抗原)との結合の強度である。

10

【0058】

本明細書で用いる場合、「結合力」という用語は、2つの構造物の間、例えば、ある標的と同時に相互作用する抗体の複数の抗原結合部位の間、または抗体とC1qとの間などでの、複数の結合部位についての複合強度を指す。複数の結合相互作用が存在する場合、2つの構造物は結合部位がすべて解離した際にのみ解離すると考えられ、それ故、解離速度は個々の結合部位に関してよりも低く、その結果、個々の結合部位の結合の強度(親和性)と比較して、より大きな有効な総結合強度(結合力)をもたらすと考えられる。

【0059】

本明細書で用いる場合、「オリゴマー」という用語は、少なくとも原理的には無限の数の単位からなるポリマーとは対照的に、複数の、しかし限られた数の単位の、特定の種類の分子(例えば、本発明の抗体分子または他の二量体タンパク質分子など)からなる構造のことを指す。したがって、本発明のオリゴマーは、本発明の任意の局面または態様の限られた数の二量体タンパク質からなる。例示的なオリゴマーには、ダイマー(二量体)、トリマー(三量体)、テトラマー(四量体)、ペンタマー(五量体)、ヘキサマー(六量体)、およびドデカマー(十二量体)がある。オリゴマーにおける単量体単位を表すためにギリシャ語の接頭語がしばしば用いられ、例えばテトラマー(四量体)は4単位で構成され、ヘキサマー(六量体)は6単位で構成される。同様に、「オリゴマー形成」という用語は、本明細書で用いる場合、分子を有限な重合度に変換させる工程を指すことを意図している。本明細書においては、本発明の抗体および/または他の二量体タンパク質が、実施例31に記載したように特定のpH条件下で、溶液中でのFcドメインの非共有結合性会合を介して、または、標的結合領域を含む二量体タンパク質の場合は、例えば細胞表面での標的との結合後に、オリゴマー(例えば六量体)を形成し得ることが観察されている。溶液中でのオリゴマー形成は、例えば、実施例20に記載したようにして評価できる。特定の態様において、溶液中でのオリゴマー形成は、吸光度検出器が接続された、50kDa~1000kDaの範囲にある分子を分離し得る孔径を有する適切なサイズ排除クロマトグラフィー樹脂を用いてHP-SEC(高圧サイズ排除クロマトグラフィー)分画を行う段階; 1.25 µg/mLのタンパク質を含有する50 µL試料を、pH 6.8に緩衝化された0.1M Na₂SO₄/0.1Mリン酸ナトリウム中にて1mL/分で分離する段階; 適したソフトウエアを用いて結果を処理する段階; および、ピーク毎に総ピーク面積に占めるパーセンテージとして表す段階、によって判定できる。抗原との結合後の抗体のオリゴマー形成は、評価できる(例えば、実施例3、6および21に記載したような補体依存性細胞傷害作用を用いて)。特定の態様において、CDCは、懸濁細胞を、丸底96ウェルプレート中にて1×10⁶個/mLの濃度で、総容積100 µL中で、最終濃度0.0003~30.0 µg/mLの範囲の抗体とともに、振盪機上に室温で15分間ブレインキュベートする段階; 正常ヒト血清を最終濃度20%、30%または50%で添加する段階; 37 °Cで45分間インキュベートする段階; プレートを氷上に置く段階; 10 µLヨウ化プロピジウムを添加する段階; および細胞溶解をFACS分析によって判定する段階、によって判定できる。

20

30

40

【0060】

「C1q結合」という用語は、本明細書で用いる場合、その抗原と結合した抗体に対するC

50

1qの結合という文脈での、C1qの結合を指すことを意図している。その抗原と結合した抗体とは、本明細書に記載した文脈においてインビボおよびインビトロの両方で生じるものと解釈されるものとする。C1q結合は、例えば、人工的表面（例えば、実施例21に記載するように、ELISA用のプレートにおけるプラスチック）上の固定化された抗体を用いることによって評価できる。特定の態様において、C1q結合は、96ウェルELISAプレートを、0.007~25.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲の濃度の抗体により、PBS中にて4 で一晩かけてコーティングする段階；プレートを洗浄する段階；0.5 \times PBS / 0.025% Tween 20 / 0.1%ゼラチンでブロックする段階；プレートを、3%ブールヒト血清、ウサギ抗ヒトC1q、ブタ抗ウサギIgG-HRPとともに37 で1時間ずつ、間に洗浄を行いながら逐次的にインキュベートする段階；1mg/mL 2,2'-アジノ-ビス3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸により、約30分間かけてプレートを発色させる段階；100 μL の2%シュウ酸を添加する段階；および、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する段階、によって判定できる。抗体オリゴマーに対するC1qの結合は、本明細書において、高い結合力で結合をもたらし多価相互作用と解釈されるものとする。

【0061】

本明細書で用いる場合、「補体活性化」という用語は、その抗原と結合した抗体に対する補体成分C1qの結合が引き金となって起こる、古典的補体経路の活性化を指す。C1qは、古典的補体カスケードの初期イベントにおける第1のタンパク質であり、補体成分C3をC3bとC3aに切断するC3コンベルターゼと呼ばれる酵素活性の形成を結果的にもたらし一連の切断反応に関与する。C3bは膜上のC5と共有結合してC5bを形成し、次にはそれが、終末補体成分C5b、C6、C7、C8およびC9が集合して膜傷害性複合体（MAC）となる補体活性化の後期イベントの引き金となる。補体カスケードは孔の生成を結果的にもたらし、そのことがCDCとしても知られる細胞溶解の原因となる。補体活性化は、CDC動態（実施例14、15および16に記載するように）、CDCアッセイ（実施例3および21に記載するように）を用いることによって、またはBeurskens et al April 1, 2012vol. 188 no. 7 3532-3541に記載された、C3bおよびC4bの細胞沈着方法によって評価できる。

【0062】

「補体依存性細胞傷害作用」（「CDC」）という用語は、本明細書で用いる場合、抗体が細胞またはビリオン上のその標的と結合するとき、MAC集合体によって生み出される膜内の孔の結果として細胞またはビリオンの溶解をもたらし、抗体媒介性補体活性化のプロセスを指すことを意図している。CDCは、上記のように、例えば実施例3および21に記載するような、正常ヒト血清を補体供給源として用いるCDCアッセイなどのインビトロアッセイによって評価できる。

【0063】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用」（「ADCC」）という用語は、本明細書で用いる場合、結合した抗体の定常領域を認識するFc受容体を発現する細胞による、抗体で覆われた標的細胞またはビリオンの死滅の機序を指すことを意図している。ADCCは、例えば、実施例21に記載するADCCアッセイなどの方法を用いて決定できる。特定の態様において、ADCCは、細胞を0.5~250 ng/mLの濃度範囲の抗体とインキュベートし；ADCC生物発光レポーターアッセイキットを用いてADCC活性を定量することによって、決定され得る。

【0064】

「抗体依存性細胞食作用」（「ADCP」）という用語は、本明細書で用いる場合、食細胞による細胞内移行による、抗体で覆われた標的細胞またはビリオンの排除の機序を指すことを意図している。細胞内移行した、抗体で覆われた標的細胞またはビリオンは、ファゴソームと呼ばれる小胞内に収容され、それが続いて1つまたは複数のリソソームと融合して、ファゴリソソームを形成する。ADCPは、van Bij et al.によってJournal of Hepatology Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685に記載されたように、または、例えば、PMNによる黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）の食作用について実施例24に記載するように、エフェクター細胞としてのマクロファージおよびビデオ顕微鏡法を用いるインビトロ細胞傷害作用アッセイを用いることによって評価し得る。

【0065】

「補体依存性細胞傷害作用」(「CDCC」)という用語は、本明細書で用いる場合、抗体媒介性補体活性化の結果として標的細胞またはビリオンと共有結合した補体第3成分(C3)切断産物を認識する補体受容体を発現する細胞による、標的細胞またはビリオンの死滅の機序を指すことを意図している。CDCCは、ADCCに関して記載したものと類似の様式であるが、補体C5欠損正常ヒト血清の存在下で評価できる。

【0066】

「ダウンモジュレーション」という用語は、本明細書で用いる場合、例えば、受容体に対する抗体の結合によって、細胞表面上の抗原または受容体などの分子の数を減少させる過程を指すことを意図している。

10

【0067】

「細胞内移行」という用語は、本明細書で用いる場合、本発明の二量体タンパク質(例えば、抗体またはFc含有ポリペプチド)が、細胞表面および/または周囲の媒質から、例えばエンドサイトーシスを介して、標的を発現する細胞への細胞内移行を受ける任意の機序を指すことを意図している。抗体の細胞内移行は、細胞内移行を受けた抗体の量を測定する直接的アッセイ(例えば、実施例12に記載するリソソーム共局在アッセイなど)を用いて評価できる。

【0068】

「プログラム細胞死」または「PCD」という用語は、本明細書で用いる場合、細胞内シグナル伝達によって媒介される、あらゆる形態での細胞の死滅のことを指す。アポトーシス、オートファジーおよび壊死/壊死症という、3種の形態のPCDが見いだされている。特定の態様において、3種の形態のプログラム細胞死の任意のものを、 1.0×10^5 個の細胞を96ウェルU字底プレート中にて、 $0.0025 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の範囲の濃度の抗体の存在下で24時間培養する段階; 適したアネキシン結合アッセイキットを製造元の指示に従って用いて、死細胞をアネキシンV-FITCで染色する段階; および、FACS分析によってアネキシンV-FITC陽性細胞の量を決定する段階、によって判定できる。

20

【0069】

「アポトーシス」という用語は、本明細書で用いる場合、発生および恒常性、ならびに癌などの種々の疾患の病態におけるその重要性が理由で、最もよく特徴が明らかにされている種類のプログラム細胞死のことを指す。アポトーシス細胞は、種々の外因性または内因性シグナル(例えば、腫瘍壊死因子(TNF)受容体の活性化、DNA損傷、ミトコンドリア経路)に応答して、制御された様式で死滅する。生化学的イベントにより、特徴的な細胞変化(形態)および死滅が導かれる。アポトーシス性細胞死の顕著な特徴には、小胞形成、原形質膜の細胞外面でのホスファチジルセリンの曝露、カスパーゼの活性化、ミトコンドリア膜電位の乱れ、細胞縮小、クロマチン凝縮、DNA断片化およびDNA凝縮が含まれる。ある種の受容体に対する抗体の結合は、アポトーシスを誘導することがある。

30

【0070】

「オートファジー」という用語は、本明細書で用いる場合、ミスフォールドしたタンパク質および損傷したオルガネラといった細胞内分子または構造の選択的分解のことを指し、これは重要な恒常性機能の1つである。オートファジーは、ユビキチン-プロテアソーム系(UPS)と協調して働いて、凝集/ミスフォールドしたタンパク質をユビキチン化し、オートファジーによって分解されるようにそれらを標識した上で分解する。ユビキチン化されたカーゴはファゴフォアに運ばれ、それがそのカーゴを取り囲んで、二重膜小胞であるオートファゴソームを形成する。リソソームがオートファゴソームと融合し、カーゴがオートリソソームの内部で分解される。

40

【0071】

「壊死」または「壊死症」という用語は、本明細書で用いる場合、核の断片化および凝縮を伴わない、細胞膨張、ならびに原形質膜および細胞内オルガネラの破壊を特徴とする制御不能な細胞死のことを指す。壊死性細胞死は、プログラム細胞死および偶発的細胞死の両方を含む、異種混交的な現象であると考えられる。

50

【 0 0 7 2 】

「増殖」という用語は、本明細書で用いる場合、細胞成長および細胞分裂の結果としての細胞数の増加のことを指す。

【 0 0 7 3 】

「抗体-薬物結合体」という用語は、本明細書で用いる場合、少なくとも1つの型の悪性細胞に対する特異性を有する本発明の二量体タンパク質（例えば、抗体またはFc含有ポリペプチド）と、薬物と、薬物を例えば抗体に連結させるリンカーとを指す。リンカーは悪性細胞の存在下において切断可能または切断不可能であり；抗体-薬物結合体によって悪性細胞が死滅する。

【 0 0 7 4 】

「抗体-薬物結合体の取り込み」という用語は、本明細書で用いる場合、抗体-薬物結合体が細胞上の標的と結合し、その後に細胞膜による取り込み／抱き込みを受けて、その結果、細胞内に引き込まれる過程を指す。抗体-薬物結合体の取り込みは、WO 2011/157741号に記載されたような「インビトロ致死アッセイにおける抗TF ADCによる抗体媒介性細胞内移行および細胞致死」として評価できる。

【 0 0 7 5 】

「FcRn」という用語は、本明細書で用いる場合、Fc受容体である新生児Fc受容体を指すことを意図している。これは、齧歯動物において、母体の乳から、新生齧歯動物の腸管の上皮を通して新生仔の血流内にIgGを輸送することのできる独特な受容体として最初に発見された。さらなる研究により、ヒトにおける類似の受容体が明らかになった。しかし、ヒトでは、胎盤において、成長中の胎児への母体のIgGの輸送を助長する一助になることが見いだされ、さらにIgGの代謝回転をモニターする役割も果たすことが示されている。FcRnは6.0～6.5の酸性pHではIgGと結合するが、中性またはさらに高いpHでは結合しない。そのため、FcRnは、幾分酸性pHにある腸管腔（腸管の内側）に由来するIgGと結合することができ、pHが中性ないし塩基性（pH 7.0～7.5）である基底外側（身体の内側）への有効な一方向輸送を確実に行うことができる。この受容体はまた、内皮細胞におけるエンドサイトーシスの経路にそれが存在することを通じて、成人でのIgG再利用にも役割を果たす。酸性エンドソーム内のFcRn受容体は、飲作用により細胞内移行したIgGと結合し、それを細胞表面までリサイクルさせ、それを血液の塩基性pHで放出させ、それによって、それがリソソーム分解を受けるのを防ぐ。この機序は、血液中でのIgGの半減期が他のアイソタイプと比較して長いことの説明になる可能性がある。

【 0 0 7 6 】

「プロテインA」という用語は、本明細書で用いる場合、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）という細菌の細胞壁で最初に見いだされた56kDaのMSCRAMM表面タンパク質を指すことを意図している。これはspa遺伝子によってコードされ、その調節はDNAトポロジー、細胞浸透圧、およびArIS-ArIRと呼ばれる二成分系によって制御される。免疫グロブリンと結合するその能力が理由で、これは生化学的研究において用途が見いだされている。これは、フォールディングして3ヘリックスバンドルとなる5つの相同なIg結合ドメインで構成される。各ドメインは、哺乳動物種の多くに由来するタンパク質、最も注目されることにIgGと結合できる。これはほとんどの免疫グロブリンの重鎖Fc領域（FcRn受容体の保存的な結合部位と重なり合う）と結合し、さらにヒトVH3ファミリーのFab領域とも相互作用する。血清中でのこれらの相互作用を通じて、IgG分子は、単にそれらのFab領域のみを介してではなく、それらのFc領域を介しても細菌と結合し、それにより、細菌はオプソニン作用、補体活性化および食作用を破綻させる。

【 0 0 7 7 】

「プロテインG」という用語は、本明細書で用いる場合、特異性が異なる点を除いてプロテインAに非常に類似している、C群およびG群の連鎖球菌で発現される免疫グロブリン結合タンパク質を指すことを意図している。これは、Fc領域に対するその結合を通じて抗体を精製するのに応用されている65kDa（G148プロテインG）および58kDa（C40プロテインG）細胞表面タンパク質である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

二量体タンパク質

本発明は、一局面において、第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、各ポリペプチドが免疫グロブリン重鎖の少なくともC_H2領域およびC_H3領域を含み、該第1および/または第2のポリペプチドにおいて、

ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸がEではなく、かつ

S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、二量体タンパク質に関する。位置S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254のそれぞれは、ヒトIgG1重鎖における位置に対応する。

10

【 0 0 7 9 】

一態様において、前記第1および第2のポリペプチドのそれぞれにおいて、

ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸はEではなく、かつ

S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない。位置S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254のそれぞれは、ヒトIgG1重鎖における位置に対応する。

20

【 0 0 8 0 】

本発明の二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドは、共有結合性または非共有結合性相互作用を形成することによって二量体化する。そのような相互作用は、ポリペプチドのどの領域に認められてもよい。共有結合性相互作用の例には、任意のC_xx_Cペプチド相互作用があり、ここで「x」は任意のアミノ酸を表し、「C」はシステイン残基を表す。別の例は、TCR 鎖定常ドメインおよびTCR 鎖定常ドメインである。非共有結合性相互作用に関する例には、Moll et al, Prot. Science, 2001, 10:649-655に記載されたようなロイシンジッパーがあり得る。一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドは、該第1および第2のポリペプチド間の共有結合を可能にする領域をさらに含み得る。

30

【 0 0 8 1 】

一態様において、第1および/または第2のポリペプチドは、ヒンジ領域をさらに含む。

【 0 0 8 2 】

本発明のある目的には、ヒンジ領域の一部、例えば226~230に対応するアミノ酸位置で十分である。したがって、一態様において、第1および/または第2のポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖における位置226~230に対応する位置にあるアミノ酸をさらに含み得る。

【 0 0 8 3 】

一態様において、前記第1および第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸はEではなく、かつS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、YまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない。

40

【 0 0 8 4 】

一態様において、前記第1および第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸はEではなく、かつS440、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；Eではない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない。

50

【 0 0 8 5 】

したがって、一態様において、本発明は、第1および第2のポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、各ポリペプチドが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含み、

ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸がEではなく、かつ

S440、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、YまたはWである；Yではない；Eではない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、二量体タンパク質に関する。

10

【 0 0 8 6 】

一態様において、第1および第2のポリペプチドは、ヒンジ領域のジスルフィド結合を介して相互接続されている。

【 0 0 8 7 】

別の記述があるか、または文脈と食い違う場合を除き、言及したアミノ酸位置は、本発明の任意の局面または態様におけるヒトIgG1重鎖におけるアミノ酸位置のことを指す。

【 0 0 8 8 】

その上、別の記述があるか、または文脈と食い違う場合を除き、アミノ酸の番号付けは、上記のように、Kabatに記載されたEUナンバリングシステムによる。

【 0 0 8 9 】

20

二量体タンパク質は、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置、ならびにヒトIgG1重鎖におけるS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254に対応する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置に変異を導入することによって、親二量体タンパク質から調製することができ、そのため変異型二量体タンパク質とみなすことができ、ここでS440に対応する位置に導入されるアミノ酸はY、K、RまたはWである。他のアミノ酸位置に、任意のアミノ酸、例えば、任意の天然のアミノ酸を導入することもできる。

【 0 0 9 0 】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E345に対応する位置にあるアミノ酸は、例えば、R、Q、N、K、Y、A、C、D、F、G、H、I、L、M、P、S、T、VおよびWからなる群より、例えばR、Q、N、KおよびYからなる群より別個に選択される。

30

【 0 0 9 1 】

さらなる態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E345に対応する位置にあるアミノ酸は、例えば、R、Q、KおよびYからなる群より別個に選択される。

【 0 0 9 2 】

さらなる態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E345に対応する位置にあるアミノ酸はRである。

40

【 0 0 9 3 】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E430に対応する位置にあるアミノ酸は、G、T、S、F、H、A、C、D、I、K、L、M、N、P、Q、R、V、WおよびYからなる群より、例えばG、T、S、FおよびHからなる群より別個に選択される。

【 0 0 9 4 】

さらなる態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E430に対応する位置にあるアミノ酸は、例えば、G、T、SおよびFからなる群より別個に選択される。

【 0 0 9 5 】

50

さらなる態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E430に対応する位置にあるアミノ酸はGである。

【0096】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、S440に対応する位置におけるアミノ酸は、例えば、YまたはWからなる群より別個に選択される。

【0097】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、S440に対応する位置におけるアミノ酸はWである。

10

【0098】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、S440に対応する位置におけるアミノ酸はYである。

【0099】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）において、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、

20

(a) I、N、Q、S、T、R、A、E、F、H、K、L、MまたはV、例えばI、N、QまたはS；

(b) R、G、T、I、L、M、K、H、S、V、Y、Q、N、W、F、AまたはC；

(c) R；

(d) V、L、M、D、Q、K、R、N、H、S、T、WまたはY、例えばV、LまたはM；

(e) W、H、K、Q、R、D、E、S、TまたはY、例えばW、H、K、QまたはR；

(f) N、S、T、A、E、G、H、K、Q、R、WまたはY、例えばN、SまたはT；

(g) V、L、N、Q、E、SまたはT、例えばV、L、NまたはQ；

(h) L、G、IまたはV；

である。

【0100】

30

ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置に対応する位置にあるアミノ酸は、一態様において、第1および第2のポリペプチドにおいて同じであってもよく；またはそれらが異なってもよい。前記位置にあるアミノ酸は、例えば、二量体タンパク質がヘテロ二量体タンパク質、例えば本明細書に記載の二重特異性抗体である場合に異なってもよい。

【0101】

二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、以下の非限定的な例のうちの1つであってよい。

40

E345R/E430G/S440Y, E345R/E430G/S440W,
 E345K/E430G/S440Y, E345K/E430G/S440W, E345Q/E430G/S440Y, E345Q/E430G/S440W,
 E345N/E430G/S440Y, E345N/E430G/S440W, E345Y/E430G/S440Y, E345Y/E430G/S440W,
 E345R/E430T/S440Y, E345R/E430T/S440W, E345K/E430T/S440Y, E345K/E430T/S440W,
 E345Q/E430T/S440Y, E345Q/E430T/S440W, E345N/E430T/S440Y, E345N/E430T/S440W,
 E345Y/E430T/S440Y, E345Y/E430T/S440W, E345R/E430S/S440Y, E345R/E430S/S440W,
 E345K/E430S/S440Y, E345K/E430S/S440W, E345Q/E430S/S440Y, E345Q/E430S/S440W,
 E345N/E430S/S440Y, E345N/E430S/S440W, E345Y/E430S/S440Y, E345Y/E430S/S440W,
 E345R/E430F/S440Y, E345R/E430F/S440W, E345K/E430F/S440Y, E345K/E430F/S440W,
 E345Q/E430F/S440Y, E345Q/E430F/S440W, E345N/E430F/S440Y, E345N/E430F/S440W,
 E345Y/E430F/S440Y, E345Y/E430F/S440W, E345R/E430G/S440K, E345R/E430G/S440R,
 E345K/E430G/S440K, E345K/E430G/S440R, E345Q/E430G/S440K, E345Q/E430G/S440R,
 E345N/E430G/S440K, E345N/E430G/S440R, E345Y/E430G/S440K, E345Y/E430G/S440R,
 E345R/E430T/S440K, E345R/E430T/S440R, E345K/E430T/S440K, E345K/E430T/S440R,
 E345Q/E430T/S440K, E345Q/E430T/S440R, E345N/E430T/S440K, E345N/E430T/S440R,
 E345Y/E430T/S440K, E345Y/E430T/S440R, E345R/E430S/S440K, E345R/E430S/S440R,
 E345K/E430S/S440K, E345K/E430S/S440R, E345Q/E430S/S440K, E345Q/E430S/S440R,
 E345N/E430S/S440K, E345N/E430S/S440R, E345Y/E430S/S440K, E345Y/E430S/S440R,
 E345R/E430F/S440K, E345R/E430F/S440R, E345K/E430F/S440K, E345K/E430F/S440R,
 E345Q/E430F/S440K, E345Q/E430F/S440R, E345N/E430F/S440K, E345N/E430F/S440R,
 E345Y/E430F/S440K, および E345Y/E430F/S440R

10

20

【 0 1 0 2 】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）に関して、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれR、GおよびYである。

30

【 0 1 0 3 】

代替的な態様において、二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドに関して、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれK、GおよびYである。

【 0 1 0 4 】

代替的な態様において、二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドに関して、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれR、SおよびYである。

【 0 1 0 5 】

代替的な態様において、二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドに関して、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれR、GおよびWである。

40

【 0 1 0 6 】

代替的な態様において、二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドに関して、E345、E430およびY436に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれR、GおよびIである。

【 0 1 0 7 】

代替的な態様において、二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドに関して、E345、E430、Y436およびS440に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれR、G、IおよびKである。

50

【0108】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドに関して、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれR、GおよびKである。

【0109】

本明細書に記載しているように、本発明はとりわけ、ヒトIgG1重鎖のCH2/CH3領域に天然に存在するものとは異なるアミノ酸を3つの位置に含む二量体タンパク質に関する。

【0110】

一態様において、二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を介して相互に接続されている。

【0111】

一態様において、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgEおよびIgMからなる群より選択される。第1および第2のポリペプチドのアイソタイプは異なってもよいが、特定の態様において、それらは同じである。一態様において、第1および第2のポリペプチドのアイソタイプは異なり、例えば、前記第1のポリペプチドのアイソタイプがIgG1免疫グロブリン重鎖であって、前記第2のポリペプチドのアイソタイプはIgG4免疫グロブリン重鎖であってもよい。この例は限定的であると解釈されるべきではなく、このため、アイソタイプの他の組み合わせも本発明に含まれると判断される。

【0112】

ヒトIgG1重鎖におけるアミノ酸位置に対応すると本明細書に記載された、任意のアミノ酸位置、またはアミノ酸位置における変異を、図2中のアラインメントによって定められるようなIgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgE、IgDおよびIgMにおけるその等価な位置において同定すること、またはそれを導入して、本発明の二量体タンパク質を得ることができる。

【0113】

特定の態様において、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる群より選択され、例えばIgG1である。

【0114】

別の態様において、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプは、IgA1およびIgA2からなる群より選択される。

【0115】

別の態様において、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプは、IgE、IgDおよびIgMからなる群より選択される。

【0116】

一態様において、免疫グロブリン重鎖は哺乳動物由来である。

【0117】

一態様において、免疫グロブリン重鎖は霊長動物またはネズミ科動物由来、例えばヒト由来である。

【0118】

一態様において、二量体タンパク質のポリペプチドの少なくとも一方は、標的と特異的に結合する結合領域を含む。

【0119】

さらなる態様において、第1および第2のポリペプチドは両方とも、標的と特異的に結合する結合領域、例えば抗原結合領域などを含む。第1および第2のポリペプチドの結合領域、例えば抗原結合領域などは、同じ標的と結合しても、任意で同じ標的の異なるエピトープと結合してもよく、またはそれらが異なる標的と結合してもよい。

【0120】

第1および/または第2のポリペプチドの結合領域は、抗原結合領域であってもよい。

【0121】

前記結合領域は任意の標的と結合してもよく、ここで標的は、例えば、細胞、細菌、寄

10

20

30

40

50

生虫またはビリオン上に存在する分子であってよい。

【0122】

特定の態様において、標的は抗原であってもよい。

【0123】

さらなる態様において、前記抗原は、ヒト腫瘍細胞などの細胞の表面で発現されていてもよい。

【0124】

一態様において、前記抗原は細胞膜に結合している。

【0125】

別の態様において、前記抗原はビリオンに関連するものであり、任意で、抗原はビリオンのタンパク質外被または脂質エンベロープの中に含まれる。

10

【0126】

さらなる態様において、結合領域が結合する標的は、細菌細胞またはビリオンの表面上で発現される抗原であってもよい。

【0127】

別の態様において、細菌細胞は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*S. Epidermidis*)、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumonia*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、大腸菌 (*E. coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella*)、赤痢菌 (*Shigella*)、エルシニア属菌 (*Yersinia*)、ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、および結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) からなる群より選択される。

20

【0128】

標的または抗原の例には、以下のものが非限定的に含まれる：5T4；ADAM-10；ADAM-12；ADAM17；AFP； / T細胞受容体 (TCR)；AXL；ANGPT2炭疽菌抗原；抗薬物抗体 (ADA) BSG；CAIX；CAXII；CA 72-4；癌関連抗原CTAA16.88；CCL11；CCL2；CCR4；CCR5；CCR6；CD2；CD3E；CD4；CD5；CD6；CD15；CD18；CD19；CD20；CD22；CD24；CD25；CD29；CD30；CD32B；CD33；CD37；CD38；CD40；CD40LG；CD44；CD47；CD52；CD55^{SC1}；CD56；CD66E；CD72；CD74；CD79a；CD79b；CD80；CD86；CD98；CD137；CD147；CD138；CD168；CD200；CD248；CD254；CD257；CDH3；CEA；CEACAM5；CEACAM6；CEACAM8；クローディン4；CS-1；CSF2RA；CSPG-4；CTLA4；CRF-1；Cripto；DLL4；細胞死受容体4；細胞死受容体5；ED-B；EFNA2；EGFR；エンドセリンB受容体；ENPP3；EPCAM；ERBB2；ERBB3；FAP；FAS (APO-1、CD95としても知られる)；Fc RI；FCER2；FGFR3；フィブリンII鎖；FLT1；FOLH1；FOLR1；FRP-1；G-28糖脂質；GD1a；GD-2；GM-1；GD3ガングリオシド；GM3；GDF2；GLP1R；グリピカン-3；GNPMB；GRP78；インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenza*)；HBV (B型肝炎ウイルス)；HCMV (ヒトサイトメガロウイルス)；熱ショックタンパク質90相同体 [カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)]；単純ヘルペスウイルスgD糖タンパク質；HGF；HIV-1；HIV-1 IIIB gp120 V3ループ；HLA-DRB (HLA-DR)；ヒト抗ヒト抗体 (HAHA)；ヒト抗マウス抗体 (HAMA)；ヒト呼吸器合胞体ウイルス、糖タンパク質F；ICAM1；IFNA1；IFNA1；IFNB1二重特異性；IgE、IgE Fc；IGF1R；IGHE接続領域；IL12B；IL13；IL15；IL17A；IL1A；IL1B；IL2RA；IL4；IL5；IL5RA；IL6；IL6R；IL9；インターロイキン-2受容体サブユニット；ITGA2；ITGA2B2 ITGB3；ITGA4 ITGB7；ITGA5；ITGAL；ITGAV ITGB3；ITGB2；KDR；L1CAM；Lewis-x；Lewis-y；リポ多糖 (lipopolysaccharide) LPSのドメインであるリピドA；LTA；リピドA；マンナン (カンジダ・アルビカンス)；MET；微生物プロテアーゼ、例えば黄色ブドウ球菌 gluV8および化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) IdeS；MMP14；MMP15；MST1R；MSTN；MUC1；MUC4；MUC16；MUC5AC；ミエリン；NCA-90顆粒球細胞抗原；ネクチン4；髄膜炎菌、NGF；非POUドメイン含有八量体結合性タンパク質 (NONO)；NRP；NY-ESO-1；O-グリカン；OX40L；PLAC-1；PLGF；PDGFRA；PD1；PDL1；PSCA；ホスファチジルセリン；PTK-7；緑膿菌血清型 IAT5 011；RSV (ヒト呼吸器合胞体ウイルス、糖タンパク質F)；ROR1；RTN4；SELL；SELP；STEAP1；志賀毒素様毒素 IIBサブユニット [大腸菌]；SLAMF7；SLC44A4；SOST；表皮ブドウ球菌リボテイコ酸；肺炎連

30

40

50

鎖球菌；TAF-15；T細胞受容体 _ ；組織因子（TF）；TGFB1；TGFB2；TMEFF2；TNC；TNF；TNFRSF10A；TNFRSF10B；TNFRSF12A；TNFSF13；TNFSF14；TNFSF2；TNFSF7；TRAILR2；TRO2；TYRP1；VAP-1；ピメンチン；erbB1（EGFR）；erbB2（HER2）；erbB3；erbB4；MUC-1；CXCR5；c-Met；HERV-エンベロープタンパク質；ペリオスチン；Bigh3；SPARC；BCR；およびMRP3。

【0129】

さらなる態様において、抗原はCD20、EGFrおよびCD38から選択でき、任意で、本発明の二量体タンパク質は、本発明によって定められたようなアミノ酸位置を含む、本明細書に記載されたような7D8、2F8、003および005から選択され得る。したがって、7D8、2F8、003および005を、本発明の親二量体タンパク質として用いることができる。

10

【0130】

一態様において、二量体タンパク質のポリペプチドの少なくとも一方は、免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

【0131】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は抗体である。

【0132】

二量体タンパク質が抗体であるさらなる態様において、第1および第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）は、同じ抗原と結合してもよい第1および第2の抗原結合領域を形成する、免疫グロブリン重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。

【0133】

20

二量体タンパク質が抗体である別の態様において、第1および第2のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）は、軽鎖可変領域および定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖配列と会合している免疫グロブリン重鎖可変領域を含み、同じ抗原と結合してもよい第1および第2の抗原結合領域を形成する。そのような態様において、免疫グロブリン重鎖可変領域および定常領域を含む前記第1および第2のポリペプチドは、軽鎖可変領域および定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖配列と、前記重鎖および前記軽鎖の定常ドメイン間の鎖間ジスルフィド結合によって会合し、それにより、任意で同じ抗原と結合する第1および第2の抗原結合領域を形成することが理解される。

【0134】

二量体タンパク質が抗体であるさらなる態様において、一方または両方のポリペプチドは、全長重鎖定常領域（例えば全長ヒトIgG1重鎖定常領域）を含む。

30

【0135】

第1および/または第2のポリペプチドのCH2領域およびCH3領域は、本発明によって定められたアミノ酸位置を除き、SEQ ID NO：1のそれぞれアミノ酸114～223および224～330；SEQ ID NO：2のそれぞれアミノ酸111～219および220～326；SEQ ID NO：3のそれぞれアミノ酸161～270および271～377；SEQ ID NO：4のそれぞれアミノ酸111～220および221～327；またはSEQ ID NO：5のそれぞれアミノ酸114～223および224～330を含み得る。

【0136】

前記第1および/または第2のポリペプチドは、ヒンジ領域をさらに含むことができ、該ヒンジ領域は、SEQ ID NO：1のアミノ酸99～113；SEQ ID NO：2のアミノ酸99～110；SEQ ID NO：3のアミノ酸99～160；SEQ ID NO：4のアミノ酸99～110；またはSEQ ID NO：5のアミノ酸99～113を含む。

40

【0137】

第1および/または第2のポリペプチドは、本発明によって定められたアミノ酸位置を除き、SEQ ID NO：1、2、3、4および5のいずれかによる配列を含み得る。

【0138】

本発明の二量体タンパク質は、特定の態様において、上記のような抗体である。その上、当該二量体タンパク質（例えば抗体）を、親二量体タンパク質（例えば親抗体）に、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少な

50

くとも1つの位置におけるアミノ酸において変異を導入することによって調製することもできる。このため、抗体の例は、「本発明の抗体」または「本発明の変異型抗体」、および「親抗体」と称できる。

【0139】

適切な抗体の例には、非限定的に以下が含まれる：一価抗体；2つの重鎖のみからなり、ラクダ科動物などにおいて天然に存在する重鎖抗体（例えば、Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446）；ThioMab (Roche、WO2011069104号）；非対称性の二重特異性抗体様分子である鎖交換組換えドメイン（SEEDまたはSeed-body）（Merck、WO2007110205号）；Triomab (Fresenius、Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)）；Fc Adp (Regeneron、WO2010151792号）；Azymetric Scaffold (Zymeworks / Merck、WO2012/058768号）；m Ab-Fv (Xencor、WO2011/028952号）；二重可変ドメイン免疫グロブリン (Abbott、DVD-Ig、米国特許第7,612,181号）；二重ドメイン双頭抗体 (Unilever；Sanofi Aventis、WO20100226923号）；ジ-ダイアボディ (ImClone / Eli Lilly)；ノブ・イントゥ・ホール抗体フォーマット (Genentech、WO9850431号）；デュオボディ (Genmab、WO 2011/131746号)；静電ステアリング抗体フォーマット (Amgen、EP1870459号およびWO 2009089004号；Chugai、US201000155133号；Oncomed、WO 2010129304A2号)；二重特異性IgG1およびIgG2 (Rinat neurosciences Corporation、WO11143545号)；CrossMAb (Roche、WO2011117329号)；LUZ-Y (Genentech)；Biclonic (Merus)；二重標的指向性ドメイン抗体 (GSK / Domantis)；2つの標的を認識するツー・イン・ワン抗体 (Genentech、NovImmune)；架橋MAb (Karmanos Cancer Center)；CovX-body (CovX / Pfizer)；IgG様二重特異性 (ImClone / Eli Lilly、Shen, X, et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74)；ならびにDIG-bodyおよびPIG-body (Pharmabcine)；ならびに二重親和性再標的指向性分子 (Fc-DARTまたはIg-DART、MacroGenicsによる、WO/2008/157379号、WO/2010/080538号)；Zybody (Zyngenia)；共通の軽鎖 (Crucell / Merus、US7262028号)または共通の重鎖 (NovImmuneによる body)を用いるアプローチ、さらには、ZymoGenetics / BMSによるBsAbのように、ポリペプチド配列をFcドメインを含有する抗体断片と融合させたものを含む、scFv融合物のような融合タンパク質)；Biogen IdecによるHERCULES (US007951918号)；Emergent BioSolutions / TrubionによるSCORPION、Ts2Ab (MedImmune / AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92)；NovartisによるscFv融合物、Changzhou Adam Biotech IncによるscFv融合物 (CN 102250246号)；RocheによるTvAb (WO 2012025525号、WO 2012025530号)；f-StarによるmAb² (WO2008/003116号)；二重scFv融合物、ミニ抗体、および二重標的指向性 (DT) -Ig抗体。また、抗体という用語が、別に指定する場合を除き、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (ヒトモノクローナル抗体など)；抗体混合物 (組換えポリクローナル体)；例えばSymphogenおよびMerusによって開発された技術 (Oligoclones) によって作製されたもの、ならびに抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体なども含むことが理解されるべきである。作製される抗体は、可能性として任意のアイソタイプを有し得る。

【0140】

親抗体または本発明の抗体は、野生型抗体または非天然型抗体フォーマット (本明細書に記載するような任意のもの、例えば、ヘテロ二量体タンパク質) から調製されてもよく、これらは本発明による関連する改変を導入するための出発物質として用いられる。本発明の抗体は、Kohler et al., Nature 256, 495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されてもよく、または組換えDNA法によって作製されてもよい。また、モノクローナル抗体を、例えば、Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991) に記載された手法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。モノクローナル抗体は任意の適した供給源から得ることができる。したがって、例えば、モノクローナル抗体を、関心対象の抗原による免疫処置を受けたマウスから得られたマウス脾臓B細胞から調製されたハイブリドーマから、例えば、表面上に抗原を発現する細胞の形、または関心対象の抗原をコードする核酸の形で得ることができる。また、モノクローナル抗体を、免疫処置を受けた

ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、ウサギ、ラット、イヌ、霊長動物など）の抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得ることもできる。

【0141】

抗体は、例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体であってもよい。別の態様において、抗体はヒト抗体である。ヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウス、例えば、HuMabマウスを用いて作製できる。HuMabマウスは、再編成されていないヒト重鎖（ μ および）および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座位を、内因性 μ および鎖座位を不活性化する標的化変異とともに含む（Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994)）。そのため、このマウスはマウスIgMまたはの発現の低下を示し、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子が免疫処置にตอบสนองしてクラススイッチおよび体細胞変異を受け、高親和性ヒトIgG、モノクローナル抗体を生じる（Lonberg, N. et al. (1994)、前記；Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995)ならびにHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)に総説）。HuMabマウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 628 7 6295 (1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993)、Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)に詳細に記載されている。また、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,789,650、US 5,877,397、US 5,661,016、US 5,814,318、US 5,874,299、US 5,770,429、US 5,545,807、WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/2645、WO 92/03918WO 01/09187も参照されたい。これらのトランスジェニックマウスからの脾細胞を用いて、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを周知の手法に従って作製できる。

【0142】

さらに、本発明のヒト抗体、または他の種由来の本発明の抗体を、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、哺乳動物ディスプレイ、酵母ディスプレイおよび当技術分野において公知の他の手法を非限定的に含むディスプレイ型の技術によって同定して、その結果得られた分子を、当技術分野において周知である手法のような、さらなる成熟、例えば親和性成熟などに供することもできる。

【0143】

抗体は、天然型の、例えばヒトFcドメインを有する抗体には限定されず、それが本発明のもの以外の他の変異、例えば、グリコシル化、C1q結合、Fc受容体結合に影響を及ぼす変異、または抗体が二重特異性抗体であることを可能にする変異などを有する抗体であってもよい。「天然型の抗体」という用語は、遺伝的に導入されたいかなる変異も含まない、あらゆる抗体を意味する。天然に存在する修飾を含む抗体、例えば種々のアロタイプは、それ故、本発明の趣旨においては「天然型の抗体」と解釈されるべきである。そのような抗体は、本発明の変異を導入するためのテンプレートまたは出発物質（例えば、親抗体）として役立てることができ、それにより、本発明の抗体を得ることができる。本発明のもの以外の他の変異を含む抗体の一例は、IgG4様の対応するCH3領域を含む2つの抗体の半分子交換を促進するために還元条件を利用し、それにより、凝集物の随伴形成を伴うことなく二重特異性抗体を形成させる、WO 2011/131746号（Genmab）に記載されたような二重特異性抗体である。抗体の他の例には、ヘテロ二量体二重特異性物：Triomab（Fresenius）；二重特異性IgG1およびIgG2（Rinat Neurosciences Corporation）；Fc Adp（Regeneron）；ノブ・イントゥ・ホール（Genentech）；静電ステアリング（Amgen、Chugai、Oncomed）；SEEDbody（Merck）；Azymetric scaffold（Zymeworks）；mAb-Fv（Xencor）；およびLUZ-Y（Genentech）などの二重特異性抗体が非限定的に含まれる。他の例示的な抗体フォーマットには、野生型抗体、全長抗体もしくはFcを含有する抗体断片、ヒト抗体、またはそれらの任意の組み合わせが非限定的に含まれる。

【 0 1 4 4 】

本発明に用いるためのモノクローナル抗体は、例えば、Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されてもよく、または組換えDNA法によって作製されてもよい。また、モノクローナル抗体を、例えば、Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)に記載された手法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。モノクローナル抗体は任意の適した供給源から得ることができる。したがって、例えば、モノクローナル抗体を、関心対象の抗原による免疫処置を受けたマウスから得られたマウス脾臓B細胞から調製されたハイブリドーマから、例えば、表面上に抗原を発現する細胞の形、または関心対象の抗原をコードする核酸の形で得ることができる。また、モノクローナル抗体を、免疫処置を受けたヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えばラット、イヌ、霊長動物など）の抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得ることができる。

10

【 0 1 4 5 】

一態様において、抗体はヒト抗体である。任意の抗原を対象とするヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを用いて作製できる。そのようなトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスには、それぞれ、本明細書においてHuMAb（登録商標）マウスおよびKMマウスと称されるマウスが含まれ、それらは本明細書において「トランスジェニックマウス」と総称される。

【 0 1 4 6 】

HuMAb（登録商標）マウスは、再編成されていないヒト重鎖（ μ および κ ）および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座位を、内因性 μ および κ 鎖座位を不活性化する標的化変異とともに含む（Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)）。そのため、このマウスはマウスIgMまたは κ 鎖の発現の低下を示し、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は免疫処置にตอบสนองしてクラススイッチおよび体細胞変異を受け、高親和性ヒトIgG、モノクローナル抗体を生じる（Lonberg, N. et al. (1994)、前記；Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)およびHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci. 764 536-546 (1995)に総説）。HuMAb（登録商標）マウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)、Tuailion et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に詳細に記載されている。また、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,789,650、US 5,877,397、US 5,661,016、US 5,814,318、US 5,874,299、US 5,770,429、US 5,545,807、WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/22645、WO 92/03918およびWO 01/09187も参照されたい。

20

30

【 0 1 4 7 】

HCo7、HCo12、HCo17およびHCo20マウスは、それらの内因性軽鎖（ κ ）遺伝子におけるJKD破壊（Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)に記載されたように）、それらの内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊（WO 01/14424号の実施例1に記載されたように）、およびKCo5ヒト軽鎖導入遺伝子（Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されたように）を有する。さらに、HCo7マウスはHCo7ヒト重鎖導入遺伝子を有し（US 5,770,429号に記載されたように）、HCo12マウスはHCo12ヒト重鎖導入遺伝子を有し（WO 01/14424号の実施例2に記載されたように）、HCo17マウスはHCo17ヒト重鎖導入遺伝子を有し（WO 01/09187号の実施例2に記載されたように）、HCo20マウスはHCo20ヒト重鎖導入遺伝子を有する。その結果生じたマウスは、内因性マウス重鎖および軽鎖座位がホモ接合性に破壊されたバックグラウンドにおいて、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子を発現する。

40

【 0 1 4 8 】

50

KMマウス系統では、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載されたように内因性マウス 軽鎖遺伝子がホモ接合性に破壊されており、WO 01/09187号の実施例1に記載されたように内因性マウス重鎖遺伝子がホモ接合性に破壊されている。このマウス系統は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載されたように、ヒト 軽鎖導入遺伝子KCo5を有する。このマウス系統はまた、WO 02/43478号に記載されたように、染色体14断片hCF (SC20) で構成されるヒト重鎖トランスクロモソームも有する。HCo12-Balb / Cマウスは、WO/2009/097006号に記載されたように、HCo12をKCo5 [J / K] (Balb) と交雑させることによって作製できる。これらのトランスジェニックマウスからの脾細胞を用いて、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを周知の手法に従って作製できる。

10

【 0 1 4 9 】

さらに、本発明の任意の抗原結合領域を、当技術分野において周知の手法を用いる、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイおよび他の手法を非限定的に含むディスプレイ型の技術によって同定されたヒト抗体または他の種由来の抗体から得ることもでき、その結果得られた分子を、当技術分野において周知である手法のような、さらなる成熟、例えば親和性成熟などに供することもできる (例えば、Hogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (ファージディスプレイ)、Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (ファージディスプレイ)、Hanes and Pluctha u, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (リボソームディスプレイ)、Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (ファージディスプレイ)、Scott TIBS 17, 241-245 (1992), C wirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)、およびUS 5,733,743号を参照)。ディスプレイ技術を用いてヒト性ではない抗体を作製する場合には、そのような抗体をヒト化することもできる。

20

【 0 1 5 0 】

本発明の二量体タンパク質 (例えば抗体) は、本明細書に記載の変異を除いてSEQ ID NO : 1 (UniProtアクセス番号P01857) の配列を含むヒトIgG1重鎖を含んでもよく、例えば、ヒトIgG1重鎖定常領域の下線を付した残基136 ~ 330 (例えば130 ~ 330) に対応する該当セグメントI253 ~ K447 (例えばP247 ~ K447) を含むヒトIgG1重鎖を含んでもよい。

30

SEQ ID NO : 1 :

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
51 htfpavllqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep
101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsrdel tknqvsltc
251 lvkgfyfpsi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
301 qggnvfscsv mhealhnhyt qkslsispqk

40

【 0 1 5 1 】

前述のIgG1のアロタイプはIgG1m (za) である。SEQ ID NO : 1におけるCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインは、本発明に関して、それぞれアミノ酸1 ~ 98、99 ~ 113、114 ~ 223および224 ~ 330である。CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、Kabatに記載されたEUナンバリングシステムによって番号を付した場合に、それぞれアミノ酸118 ~ 215、216 ~ 230、231 ~ 340および340 ~ 447として番号が付される。

【 0 1 5 2 】

本発明の二量体タンパク質 (例えば抗体) は、本明細書に記載の変異を除いてSEQ ID NO : 2の配列を含むヒトIgG2重鎖も含むことができる。IgG1重鎖のアミノ酸残基I253 ~ K447

50

(例えばP247～K447)は、以下のIgG2重鎖定常領域(アクセッション番号P01859; SEQ ID NO: 2)の下線を付した残基132～326(例えば126～326)に対応する。

1 astkgpsvfp lapcsrse staalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdkhps ntkvdkter
 101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp
 151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vvsvltvvhq dwlngkeykc
 201 kvsnkglpap iektisktkg qprepvytl ppsreemtkn qvsltlclvk
 251 fypsdiavew esngqpenny kttppmlsd gsflysklt vdksrwqqgn
 301 vfscsvmhea lnhhytqksl slspgk

10

【0153】

SEQ ID NO: 2におけるCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、本発明に関して、それぞれアミノ酸1～98、99～110、111～219および220～326である。

【0154】

本発明の二量体タンパク質(例えば抗体)は、本明細書に記載の変異を除いてSEQ ID NO: 3の配列を含むヒトIgG3重鎖も含むことができる。IgG1重鎖のアミノ酸残基1253～K447(例えばP247～K447)は、以下で下線を付している、IgG3重鎖定常領域(UniProtアクセッション番号P01860、SEQ ID NO: 3)の残基183～377(例えば177～377)に対応する。

1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
 101 ktplgdtht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
 151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
 201 pevqfkwvyd gvevhnaktk preeqynstf rvsvltvlh qdwlngkeyk
 251 ckvsnkalpa piektisktk gqprepvytl lppsreemtk nqvsltlclvk
 301 gfypsdiave wessgqpenn ynttppmlsd dgsfflyskl tvdksrwqqg
 351 nifscsvmhe alhnrtqks lslspgk

20

【0155】

SEQ ID NO: 3におけるCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、本発明に関して、それぞれアミノ酸1～98、99～160、161～270および271～377である。

【0156】

本発明の二量体タンパク質(例えば抗体)は、本明細書に記載の変異を除いてSEQ ID NO: 4の配列を含むヒトIgG4重鎖も含むことができる。IgG1重鎖のアミノ酸残基1253～K447(例えばP247～K447)は、以下のIgG4重鎖定常領域(アクセッション番号P01859、SEQ ID NO: 4)の下線を付した残基133～327(例えば127～327)に対応する。

1 astkgpsvfp lapcsrse staalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdkhps ntkvdkrves
 101 kygppcpscp apeflggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed
 151 pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty rvsvltvlh qdwlngkeyk
 201 ckvsnkglps siektiskak gqprepvytl lppsreemtk nqvsltlclvk
 251 gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysr tvdksrwqeg
 301 nvfscsvmhe alhnhytqks lslslgk

40

【0157】

SEQ ID NO: 4におけるCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、本発明に関して、それぞれアミノ酸1～98、99～110、111～220および221～327である。

【0158】

50

本発明の二量体タンパク質（例えば抗体）は、本明細書に記載の変異を除いてSEQ ID NO: 5の配列を含むヒトIgG1m(f)アロタイプ重鎖も含むことができる。IgG1m(f)アロタイプ重鎖のアミノ酸残基1253～K447は、以下のSEQ ID NO: 5の下線を付した残基136～330に対応する。

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep
101 kscdkthtcp pcpapellgg psvfllppkpk kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreegyn styrvvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree mtknqvsltc
251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
301 gggnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

10

【 0 1 5 9 】

SEQ ID NO: 5におけるCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、本発明に関して、それぞれアミノ酸1～98、99～113、114～223および224～330である。

【 0 1 6 0 】

本発明の二量体タンパク質が、ヒトIgG1免疫グロブリンの別のアロタイプ、例えばIgG1m(a)、IgG1m(z)およびIgG1m(x)などであってもよい。そのようなアロタイプは、Kababに記載されたEUナンバリングシステムによる位置214、356、358および431に対応する1つまたは複数の位置に異なるアミノ酸を含むものと記載されている。

20

【 0 1 6 1 】

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG1m(f)、IgA1、IgA2、IgE、IgDおよびIgM定常領域の各々のセグメントのアラインメントを図2に示している。これに応じて、ヒトIgG1重鎖におけるアミノ酸位置に対応すると本明細書に記載されたアミノ酸位置における任意のアミノ酸位置または変異を、任意のアミノ酸位置、またはアミノ酸位置における変異を、図2中のアラインメントによって定められるようなIgG2、IgG3、IgG4、IgG1m(f)、IgA1、IgA2、IgE、IgDおよびIgMにおけるその等価な位置に同定すること、またはそれを導入して、本発明の二量体タンパク質を得ることができる。

【 0 1 6 2 】

30

本発明の二量体タンパク質の任意の局面または態様において、二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 1の残基130～330、SEQ ID NO: 2の残基126～326、SEQ ID NO: 3の残基177～377、SEQ ID NO: 4の残基127～327、またはSEQ ID NO: 5の残基130～330の配列を含み得る。

【 0 1 6 3 】

一態様において、二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、SEQ ID No.: 1～5から選択される配列、例えばSEQ ID No.: 1、SEQ ID No.: 2、SEQ ID No.: 3、SEQ ID No.: 4、またはSEQ ID No.: 5を含む。

【 0 1 6 4 】

一態様において、抗体はヒト全長抗体、例えばヒト全長IgG1抗体である。

40

【 0 1 6 5 】

一態様において、抗体はヒトIgG1抗体、例えば、IgG1m(za)またはIgG1m(f)アロタイプであり、任意で、第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両ポリペプチド）は、本明細書に記載の変異を除いてSEQ ID NO: 1または5を含む。一態様において、抗体は、そのアイソタイプの範囲内にある公知のアロタイプのいずれであってもよいヒト抗体である。

【 0 1 6 6 】

一態様において、抗体はヒトIgG2抗体であり、任意で、第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両ポリペプチド）はSEQ ID NO: 2を含む。

【 0 1 6 7 】

50

一態様において、抗体はヒトIgG3抗体であり、任意で、第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両ポリペプチド）はSEQ ID NO：3を含む。

【0168】

一態様において、抗体はヒトIgG4抗体であり、任意で、第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両ポリペプチド）はSEQ ID NO：4を含む。

【0169】

本発明の任意の二量体タンパク質の特定の態様において、二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両ポリペプチド）は、本発明によって定められたアミノ酸位置を除き、SEQ ID No：1、2、3、4および5のアミノ酸P247～K447（例えばI253～K447）に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも約99%という同一性の度合いを有するアミノ酸配列を含む。

10

【0170】

したがって、二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両ポリペプチド）は、本発明の、および本明細書において定められた任意のアミノ酸残基を除き、SEQ ID No：1、SEQ ID No：2、SEQ ID No：3、SEQ ID No：4またはSEQ ID No：5による配列を含み得る。

【0171】

本発明の発明者らは、ヒトIgG1重鎖のE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸E、EおよびSがそれぞれアミノ酸R、GおよびYに置換された6つの抗体が、溶液中で非共有結合性六量体構造を形成し得ることを見いだした。

20

【0172】

それ故に、一態様において、本発明の二量体タンパク質は、pHが約6.8のリン酸緩衝液中で、主としてオリゴマー形態、例えば六量体形態にある。

【0173】

それ故に、一態様において、本発明の二量体タンパク質は、実施例20または23に記載された条件下、例えば、12.6mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、pH 7.4の溶液中、または0.1M Na₂SO₄、0.1Mリン酸ナトリウム、pH 6.8の溶液中、または0.15M NaCl、0.1Mクエン酸緩衝液、pH 6.8の溶液中で、非共有結合性六量体構造を形成できる。本発明の文脈において、「非共有結合性六量体構造を形成できる」という用語は、実施例20に記載したようにして判定した場合に、二量体タンパク質（例えば抗体）の30%超、例えば40%超、または50%超、または60%超、または70%超、または80%超、または85%超、または90%超、または95%超が、非共有結合性六量体構造にあることを意味する。さらなる態様において、本発明の二量体タンパク質は、0.15M NaCl、0.1Mクエン酸緩衝液、pH 5.0の溶液中で非共有結合性構造を形成できない。「非共有結合性六量体構造を形成できない」という用語は、本発明の文脈において、実施例20に記載したようにして判定した場合に、二量体タンパク質（例えば抗体）の10%未満、例えば8%未満、または7%未満、または6%未満、または5%未満、または4%未満、または3%未満、または2%未満、または1%未満、または0.5%未満しか非共有結合性六量体構造にないことを意味する。すなわち、一態様において、六量体構造は、吸光度検出器が接続された、50kDa～1000kDaの範囲にある分子を分離し得る孔径を有する適したサイズ排除クロマトグラフィー樹脂を用いてHP-SEC（高圧サイズ排除クロマトグラフィー）分画を行う段階；1.25 μg/mLのタンパク質を含有する50 μL試料を、pH 6.8に緩衝化された0.1M Na₂SO₄/0.1Mリン酸ナトリウム中にて1mL/分で分離する段階；適したソフトウェアを用いて結果を処理する段階；および、ピーク毎に総ピーク面積に占めるパーセンテージとして表す段階、によって判定できる。

30

40

【0174】

本発明の二量体タンパク質がオリゴマー構造（例えば六量体構造）を形成し得ることから、この二量体タンパク質は、細胞上に存在する標的だけでなく、可溶性標的をも標的とするのに適している。このため、本発明の二量体タンパク質は、例えば、可溶性因子、例

50

例えば細菌毒素、または他の望まれない因子、例えば補体成分、例えばC1qなどを血流から除去するために用いることができる。

【0175】

赤血球の表現型判定、例えばRh血液型 (Rhesus D status) の判定は、輸血の場合に重要であり、新生児の溶血性疾患のリスクを判定するためにも重要である。赤血球の表現型判定のためには、現在、モノクローナルヒトIgG抗体が、臨床検査、例えばクームス試験に用いられている。しかし、これらのアッセイに用いられるIgGの多くは凝集不足を引き起こすオリゴマー構造、例えば六量体構造を、表現型判定アッセイにおける試薬として用いることができる。本発明の二量体タンパク質の安定なオリゴマー構造、例えば六量体構造を赤血球表現型判定のために用いることには、オリゴマー構造がそれ自体で細胞の架橋を誘発し得るため二次抗体を必要としないこと、アッセイの感度が向上し得ること、および異なる結合領域を有する2種またはそれを上回る二量体タンパク質を、複数の赤血球抗原の表現型判定を同時に行うために用い得ることといった、いくつかの利点がある。したがって、一態様において、本発明の二量体タンパク質は、赤血球の表現型判定のために用いることができる。一態様においては、異なる結合領域を有する2種以上、例えば3種、4種、5種または6種の本発明の二量体タンパク質を、複数の赤血球抗原の表現型判定のために用いることができる。

10

【0176】

さらなる態様において、本発明の二量体タンパク質は、親二量体タンパク質と比較して、エフェクター機能が增大している。本発明の二量体タンパク質は、親二量体タンパク質の変異体とみなすことができ、ここで変異体は、親二量体タンパク質と比較して、位置345、430におけるアミノ酸変異、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸変異を含む。親二量体タンパク質とは、この文脈において、前記第1および/または第2のポリペプチドのアミノ酸が、位置E345、E430にあるヒトIgG1重鎖のアミノ酸、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸に対応する二量体タンパク質のことであり、ここでS440、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択されるアミノ酸位置は、その位置にあるヒトIgG1重鎖のアミノ酸に対応する。上記のように、親二量体タンパク質は任意のアイソタイプであってよい。

20

30

【0177】

抗体に関して、典型的には、抗体の活性は、最大効果の50%を得るために必要な抗体の濃度であるEC50値によって表すことができる。これは、本発明の二量体タンパク質についても同様にあてはまる。

【0178】

最大効果とは、飽和量の抗体を用いた場合に得られる抗体のことであり、ここで飽和とは、当該抗体に対する抗原がすべて当該抗体に結合している抗体量を指すことを意図している。これは、本発明の二量体タンパク質についても同様にあてはまる。

【0179】

「エフェクター機能を増大させる」または「エフェクター機能を向上させる」という用語は、本発明の文脈において、本発明の二量体タンパク質のEC50値が、親二量体タンパク質と比較して低下することを指す。EC50値の低下は、例えば、少なくとももしくは約2分の1、例えば少なくとももしくは約3分の1、または少なくとももしくは約5分の1、または少なくとももしくは約10分の1であってもよい。または、「エフェクター機能を増大させる」または「エフェクター機能を向上させる」は、親二量体タンパク質が全細胞の100%未満を溶解させる条件下で、溶解される細胞の最大量 (細胞の総量を100%に設定した場合) の、例えば、全細胞の10%から100%までの、例えば約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、および約100%の増加がみられることも意味する。

40

【0180】

50

二量体タンパク質は、Daudi（実施例3）およびWien（実施例6）に関して記載したように、IgG1-005またはIgG1-7D8重鎖の可変ドメインを二量体タンパク質の中にクローニングして、その活性をCDCアッセイにおいて試験することによって、エフェクター機能の増大または向上に関して試験できる。一態様において、CDC活性は、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、濃度 1×10^6 細胞/mLの懸濁細胞を、最終濃度0.0003~30.0 μ g/mLの範囲の抗体とともに振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートする段階、正常ヒト血清を最終濃度20%、30%または50%の濃度で添加する段階、37℃で45分間インキュベートする段階、プレートを氷上に置く段階、10 μ Lヨウ化プロピジウムを添加する段階、および細胞溶解をFACS分析によって判定する段階、によって判定できる。

【0181】

IgG1-7D8 HC可変ドメインおよびDaudi細胞を用いる場合、増大は、試験条件下でのIgG1-7D8のEC50よりも2分の1を下回る低いEC50、例えば約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、または10分の1を下回る低さの、最大半値溶解が観察される濃度であるEC50値によって定義され则认为られる。IgG1-005 HC可変ドメインおよびDaudi細胞を用いる場合、増大は、試験条件下でのIgG1-005のEC50の2分の1を下回る低いEC50、例えば約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、または10分の1を下回る低さの、最大半値溶解が観察される濃度であるEC50値によって定義され则认为られる。IgG1-7D8 HC可変ドメインおよびWien133細胞を用いる場合、増大は、試験条件下でのIgG1-7D8のEC50よりも2分の1を下回る低いEC50、例えば約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、または10分の1を下回る低さの、最大半値溶解が観察される濃度であるEC50値によって定義され则认为られる。IgG1-005 HC可変ドメインおよびWien133細胞を用いる場合、増大は、全細胞の10%から100%までの範囲にわたる最大溶解の増大、例えば約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、および約100%の増大によって定義され则认为られる。また、CDC活性の増大を、試験条件下でのIgG1-005のEC50よりも2分の1を下回る低いEC50、例えば約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1または10分の1を下回る低さの、Wien133細胞の溶解が検出可能である条件下で最大半値溶解が観察される濃度であるEC50値によって定義することも可能と认为られる。

【0182】

本発明の発明者らは、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸がそれぞれE、EおよびSではない抗体が、前記位置にあるアミノ酸がそれぞれE、EおよびSである同じ抗体と比較して、C1qとの結合に関するEC50値およびCDCに関するEC50値がいずれも低い（実施例21参照）ことを見いだした。

【0183】

さらなる態様において、本発明の二量体タンパク質のエフェクター機能（例えばCDC）は、標的がピリオンまたは細胞膜上に存在する場合に二量体タンパク質が細胞またはピリオン上のその標的と結合するとき、親二量体タンパク質と比較して増大され得る。

【0184】

他のアミノ酸位置

本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、指示された位置に他の特定のアミノ酸をさらに含んでもよい。本明細書に記載するように、本発明の二量体タンパク質（例えば抗体）は、本発明によって指定されたようなアミノ酸位置に変異を導入することによって調製できる。そのようなさらに他のアミノ酸位置または変異の例には、特定のアミノ酸が二量体タンパク質の1つまたは複数のエフェクター機能に影響を及ぼすアミノ酸位置が含まれる。そのようなアミノ酸の例には、CDC、C1q結合、Fc 受容体結合もしくはFcRn結合を増強すること、および/またはFc 受容体媒介性エフェクター機能を向上させることができるアミノ酸残基が含まれる。

【0185】

エフェクター機能の例には、二量体タンパク質（例えば抗体）が、例えば、細胞上、細胞膜上、ピリオン上、または別の粒子上にあるその抗原と結合した場合の、(i) C1q結合、(ii) 補体活性化、(iii) CDC、(iv) オリゴマー形成、(v) オリゴマー安定性、(v

10

20

30

40

50

i) 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用 (ADCC)、(vii) FcRn結合、(viii) Fc 受容体結合、(ix) 抗体依存性細胞食作用 (ADCP)、(x) 補体依存性細胞傷害作用 (CDCC)、(xi) 補体増強性細胞傷害作用、(xii) 抗体によって媒介されるオプソニン化抗体の補体受容体に対する結合、(xiii) 細胞内移行、(xiv) ダウンモジュレーション、(xv) アポトーシスの誘導、(xvi) オプソニン作用、(xvii) 増殖のモジュレーション、例えば増殖の低下、阻害および刺激、ならびに (xvii) (i) ~ (xvi) の任意のものの組み合わせが含まれる。

【0186】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、CDCを増強することが知られているアミノ酸残基、またはアミノ酸残基の修飾、例えば、キメラ性IgG分子を作製するためのIgGアイソタイプ間でのセグメントの交換 (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72); ヒンジ領域における1つまたは複数のアミノ酸置換 (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138)、ならびに / または残基D270、K322、P329およびP331あたりを中心とするCH2ドメイン内のC1q結合部位の内部もしくは近傍における1つもしくは複数のアミノ酸置換 (Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575; Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564; WO 99 / 51642号; Moore et al., 2010 mAbs 2(2), 181-189) をさらに含む。例えば、一態様において、本発明の二量体タンパク質は、アミノ酸置換S267E、H268F、S324T、S239D、G236AおよびI332Eの任意の組み合わせをさらに含み、CDCまたはADCCを介したエフェクター機能の増強をもたらす (Moore et al., 2010 mAbs 2(2), 181-189およびWO 2011 / 091078 A2号)。また、Fc受容体に対する結合 (WO 2006 / 105062号、WO 00 / 42072号、米国特許第6,737,056号および米国特許第7,083,784号に記載) または抗体の物理的特性 (WO 2007 / 005612 A1号に記載) に影響を及ぼす他のFc変異を、本発明の変異体に用いることもできる。

【0187】

それ故に、一態様において、S267、H268、S324、S239、G236およびI332に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、それぞれE、F、T、D、AおよびEであってよい。

【0188】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、Fc 受容体結合および / またはFc 受容体媒介性エフェクター機能を増強する改変をさらに含む。そのような改変には、(i) C H2結合型グリコシル化におけるフコースの量を減少させること (糖鎖工学) (Umana P, et al., Nat Biotechnol 1999; 17: 176-80; Niwa R, et al., Clin Cancer Res 2004; 10: 6248-55.)、および(ii) 抗体のヒンジ領域またはCH2領域におけるアミノ酸の部位指定変異誘発 (タンパク質工学) (Lazar GA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 4005-10) が含まれる。

【0189】

別の態様において、そのようなさらなる変異は、二量体タンパク質のエフェクター機能を阻害するかまたは低下させる変異であってよい。免疫系の関与が必要とされず、望まれない副作用を引き起こす恐れさえある臨床用途では、C1qおよび / またはFc 受容体相互作用をなくすために、続いて、二量体タンパク質の第1および / または第2のポリペプチドをCH2ドメインでさらに変異させてもよい。

【0190】

C1qおよびFc 受容体との相互作用に主要な役割を果たす、Fcドメイン内のいくつかのアミノ酸残基が同定されている。位置234および235は、ヒトCD64 (Canfield & Morrison, 1991; Chappel et al., 1991; Hezareh et al., 2001)、CD32A (Hezareh et al., 2001; Armour et al., 2003)、CD16 (Hezareh et al., 2001) およびC1q (Xu et al., 2000; Hezareh et al., 2001) に対するヒトFc結合に対して強い調節効果を有することが示されている。CH2の位置331は、ヒトCD64 (Canfield & Morrison, 1991, J Exp Med.; 173:1483-91) およびC1q (Tao et al., 1993; Idusogie et al., 2000) に対するヒトIgG結合の主要決定基であることが示されており、三重変異L234F / L235E / P331Sは、ヒトCD64、CD32A、CD16およびC1qに対する結合の著しい減少を引き起こす。

【0191】

この知見に基づいて、いくつかの変異体により、治療用抗体の開発を目的としてFc 受容体およびC1qとの相互作用に関して不活性であるFcドメインが作製されたことが記載されている。

【0192】

IgG1については、L234AおよびL235AおよびP331Sを変異させることが記載されており (H ezareh M, et al., J Virol 2001, 75:12161-12168, Xu D et al. Cell Immunol 2000, 200:16-26, Shields RL, et al. J Biol Chem 2001, 276:6591-6604)、L234AとL235Aとの組み合わせが臨床に用いられている (Herold KC, et al., Diabetes 2005, 54:1763-1769)。それ故に、一態様において、L234、L235およびP331に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、それぞれA、AおよびSであってよい。

10

【0193】

また、これらの同じ位置をL234FおよびL235Eに変異させることも、Fc 受容体およびC1qとの相互作用がなくなったFcドメインを生じさせることが記載されている (Oganessian A et al. Cryst. (2008). D64, 700-704, Canfield & Morrison, 1991 J Exp Med.;173:1483-91., Duncan, 1988 Nature 332: 738-40)。それ故に、一態様において、L234およびL235に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれFおよびEであってよい。

【0194】

位置D265Aの変異は、すべてのFc 受容体に対する結合を減少させ、ADCCを妨げることが示されている (Shields RL et al. J Biol Chem 2001, 276:6591-6604)。それ故に、一態様において、D265に対応する位置におけるアミノ酸はAであってよい。

20

【0195】

C1qに対する結合は、位置D270、K322、P329およびP331を変異させることによってなくすことができると考えられる (Idusogie et al., J Immunol 2000, 164:4178-4184)。これらの位置を、D270AまたはK322AまたはP329AまたはP331Aのいずれかに変異させることにより、CDC活性を欠損した抗体が作製された。それ故に、一態様において、D270、K322、P329およびP331に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、それぞれA、A、AおよびAであってよい。

【0196】

FcドメインとFc 受容体およびC1qとの相互作用を最小限に抑えるための代替的なアプローチは、抗体のグリコシル化部位の除去による。位置N297を例えばQ、AおよびEに変異させることにより、IgG-Fc 受容体相互作用にとって極めて重要なグリコシル化部位が除去される (Tao and Morrison, J Immunol. 1989 Oct 15;143(8):2595-601, Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23:403-411)。それ故に、一態様において、N297に対応する位置におけるアミノ酸は、Q、AまたはEであってよい。

30

【0197】

または、ヒトIgG2およびIgG4サブクラスはもともと、C1qおよびFc 受容体との相互作用が弱い。しかし、Fc 受容体との残存性相互作用が記載されている (Parren et al., J Clin Invest 1992, 90:1537-1546)。これらの残存性相互作用をなくさせる変異が、いずれのアイソタイプについても記載されており、これらはFcR結合に伴う望まれない副作用の軽減をもたらす。IgG2についてはL234AおよびG237Aが記載されており (Cole MS et al. J Immunol 1997, 159:3613-3621、IgG4についてはL235Eが記載されている (Reddy MP et al., J Immunol 2000, 164:1925-1933)。それ故に、一態様において、ヒトIgG2重鎖におけるL234およびG237に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれAおよびAであってよい。一態様において、ヒトIgG4重鎖におけるL235に対応する位置におけるアミノ酸は、Eであってよい。

40

【0198】

IgG2抗体のFc 受容体およびC1qとの相互作用をさらに最小限に抑えるための他のアプローチは、WO 2011/066501 A1号 (PCT/US2010/058188号) およびLightle, S., et al.; Protein Science (19):753-62 (2010)に記載されている。

50

【0199】

または、抗体のヒンジ領域が、Fc 受容体および補体との相互作用に関して重要なこともある。ヒンジ領域における変異が、抗体のエフェクター機能に影響することが記載されている (Brekke et al., J Immunol 2006, 177:1129-1138, Dall'Acqua WF, et al. J Immunol 2006, 177:1129-1138。ヒンジ領域を変異させるかまたは欠失させるかのいずれかによって、抗体のFcエフェクター機能が影響を受けると考えられる。

【0200】

それ故に、一態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、二量体タンパク質の1つまたは複数のエフェクター機能を阻害するかまたは低下させる、上述の変異のいずれかをさらに含み得る。

10

【0201】

上記の変異のセットを組み合わせること、例えば、IgG1 Fcドメインにおける変異L234F、L235E、D265A；またはL234F、L235E、N297QおよびD265Aを組み合わせること、または上記の情報によって作製される他の変異により、さらに不活性なFcドメインがもたらされる可能性がある。それ故に、一態様において、L234、L235、D265；またはL234、L235、N297およびD265に対応する位置の少なくとも1つまたは組み合わせにおけるアミノ酸は、それぞれF、E、A、F、E、QおよびAであってよい。

【0202】

一態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチド、例えば、両方のポリペプチドは、二量体タンパク質の1つまたは複数のエフェクター機能を阻害するかまたは低下させる上述の変異の任意の組み合わせをさらに含み得る。

20

【0203】

典型的には、エフェクター機能に対する抗体の効果は、最大溶解の半分の値を得るために必要な抗体の濃度であるEC50値によって測定できる。このことは、本発明の二量体タンパク質についても同様にあてはまる。

【0204】

最大溶解とは、飽和量の抗体を用いた場合に得られる溶解のことであり、ここで飽和とは、抗体に対する抗原がすべて、抗体による結合を受けている抗体の量のことを指すことを意図している。このことは、本発明の二量体タンパク質についても同様にあてはまる。

【0205】

したがって、一態様において、二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235およびD265に対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸置換をさらに含むことができ、それらはそれぞれF、EおよびAである。

30

【0206】

「エフェクター機能を低下させる」という用語は、本発明の文脈において、親二量体タンパク質と比較して二量体タンパク質のEC50値の増大がみられることを指し、ここで親二量体タンパク質は上記のような意味を有する。EC50値の増大は、例えば、少なくとももしくは約2倍、例えば少なくとももしくは約3倍、または少なくとももしくは約5倍、または少なくとももしくは約10倍であってよい。または、「エフェクター機能を低下させる」は、親二量体タンパク質が全細胞の100%未満を溶解させる条件下で、溶解される細胞の最大量の例えば全細胞の10%から100%までの減少、例えば約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、および約100%の減少がみられることも意味する。

40

【0207】

二量体タンパク質は、IgG1-005またはIgG1-7D8重鎖の可変ドメインを二量体タンパク質の中にクローニングして、その活性をCDCアッセイにおいて試験することによって、エフェクター機能の低下に関して試験できる (例えば、Daudi (実施例3) およびWien (実施例6) に関して記載したように)。IgG1-7D8 HC可変ドメインおよびDaudi細胞を用いる場合、低下は、試験条件下でのIgG1-7D8のEC50よりも2倍超高いEC50 (最大半値溶解が観察される濃度)、例えば約2倍、約3倍、約5倍、約10倍、または10倍超高いEC50値によって定

50

義されると考えられる。IgG1-005 HC可変ドメインおよびDaudi細胞を用いる場合、低下は、試験条件下でのIgG1-005のEC50よりも2倍超高いEC50（最大半値溶解が観察される濃度）、例えば約2倍、約3倍、約5倍、約10倍、または10倍超高いEC50値によって定義され则认为とされる。IgG1-7D8 HC可変ドメインおよびWien133細胞を用いる場合、低下は、試験条件下でのIgG1-7D8のEC50よりも2倍超高いEC50（最大半値溶解が観察される濃度）、例えば約2倍、約3倍、約5倍、約10倍、または10倍超高いEC50値によって定義され则认为とされる。IgG1-005 HC可変ドメインおよびWien133細胞を用いる場合、低下は、最大溶解の全細胞の10%から100%までの範囲にわたる低下、例えば約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、および約100%の低下によって定義され则认为とされる。また、CDC活性の低下を、試験条件下でのIgG1-005のEC50よりも2倍超

10

【0208】

FcRnは、主要組織適合性複合体クラスI関連受容体の1つであり、母体から幼体への免疫グロブリン（Ig）Gの受動的送達、およびIgGを細胞内分解から保護することによる血清IgGレベルの調節に役割を果たす（Ghetie V et al., Annu Rev Immunol. 18, 739-66 (2000)）。FcRnはIgGおよび他のFc結合体化タンパク質の血清中での存続延長の原因となるため、FcRn-Fc相互作用をモジュレートすることにより、これらの作用物質の循環血中での半減期をさまざまな目的で計画的に制御することが可能になると考えられる。

20

【0209】

一態様において、二量体タンパク質は、例えばFcRnに対する結合に影響を及ぼすことによって薬物動態プロファイルに影響を及ぼす、他のアミノ酸残基、またはさらにアミノ酸置換などを含み得る。

【0210】

一態様において、本発明の二量体タンパク質の六量体形態の血漿中クリアランスは、例えば、投与量を減らして高用量によって引き起こされる有害反応を最小限に抑えるため、注射の頻度を減らすため、特定の組織部位へのトランスサイトーシスを最大限にするため、経胎盤送達の効率を高めるため、または生産費用を減らすために、低減されている。

【0211】

30

さらなる態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチド（例えば、両方のポリペプチド）は、例えばpH 6.0での、例えばFcRnに対する結合を向上させることを介して、例えば薬物動態プロファイルを向上させるために、CH2領域および/またはCH3領域においてさらに改変されている。これらの改変には、Fc領域のアミノ酸位置P238、T250、M252、I253、S254、R255、T256、D265、E272、N286、K288、V303、V305、T307、L309、H310、Q311、D312、K317、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、Q386、E388、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447のうち任意の1つまたは複数での変異が非限定的に含まれ、ここでFc領域における残基の番号付けは、KabatにおけるようなEUインデックスのものである（Shields, R. L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001), Dall'Acqua, W.F., et al, J Immunol. 9, 5171-80 (2002), Hinton, P., et al, J Biol Chem. 8, 6213-6 (2004), Dall'Acqua, W.F., et al, J Biol Chem. 33, 23514-24 (2006), Petkova, S. B., et al, Int Immunol. 12, 1759-69 (2006), Datta-Mannan, A., et al, J Biol Chem. 3, 1709-17 (2007), Yeung, Y.A., J Immunol. 12, 7663-71 (2009), Kabat, E.A. in US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, 5th edition 662, 680, 689 (1991)）。それ故に、一態様において、二量体タンパク質の第1および/または第2の（例えば両方の）ポリペプチドにおいて、P238、T250、M252、I253、S254、R255、T256、D265、E272、N286、K288、V303、V305、T307、L309、H310、Q311、D312、K317、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、Q386、E388、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447からなる群より選択される位置に対応する少なく

40

50

とも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Pではない、Tではない、Mではない、Iではない、Sではない、Rではない、Tではない、Dではない、Eではない、Nではない、Kではない、Vではない、Vではない、Tではない、Lではない、Hではない、Qではない、Dではない、Kではない、Kではない、Dではない、Kではない、Qではない、Dではない、Aではない、Eではない、Eではない、Qではない、Eではない、Sではない、Dではない、Sではない、Sではない、Mではない、Hではない、Nではない、Hではない、Yではない、Kではない、またはKではない。

【 0 2 1 2 】

さらに別の態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチド、例えば、両方のポリペプチドは、特定の変異N434A (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001))、T307A / E380A / N434A (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001))、T250Q / M428L (Hinton, P., et al, J Biol Chem. 8, 6213-6 (2004)) またはM252Y / S254T / T256E (Dall'Acqua, W.F., et al, J Immunol. 9, 5171-80 (2002)) によるFcRnに対する結合の向上を介して薬物動態プロファイルが向上するようにさらに改変されており、ここでFc領域における残基の番号付けは、KabatにおけるようなEUインデックスのものである (Kabat, E.A. in US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, 5th edition 662, 680, 689 (1991))。それ故に、一態様において、N434に対応する位置におけるアミノ酸はAであってよい。別の態様において、T307、E380およびN434に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれA、AおよびAであってよい。別の態様において、位置T250およびM428に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれQおよびLであってよい。別の態様において、M252、S254およびT256に対応する位置におけるアミノ酸はそれぞれY、TおよびEであってよい。したがって、一態様において、前記二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、N434およびS440に対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を含むことができ、それらはそれぞれ、Eではない；Eではない；Aである；およびYまたはWである。

【 0 2 1 3 】

一態様において、二量体タンパク質は、FcRn結合を向上させる、P238、T256、T307、Q311、D312、E380、E382、およびN434のうち1つまたは複数のアラニン残基への置換 (Shields RL, et al. J. Biol. Chem. 2001;276:6591)；または、FcRnに対する親和性を増大させる、IgG1におけるM252Y / S254T / T256E、M252W、M252Y、M252Y / T256Q、M252F / T256D、V308T / L309P / Q311S、G385D / Q386P / N389S、G385R / Q386T / P387R / N389P、H433K / N434F / Y436H、N434F / Y436H、H433R / N434Y / Y436H、M252Y / S254T / T256E-H433K / N434F / Y436HもしくはM252Y / S254T / T256E-G385R / Q386T / P387R / N389Pから選択されるアミノ酸置換もしくは組み合わせ (Dall'Acqua et al., 前記) を含み得る。それ故に、一態様において、P238、T256、T307、Q311、D312、E380、E382およびN434からなる群より選択されるものに対応する位置における1つまたは複数のアミノ酸は、二量体タンパク質の各ポリペプチドに関して、各位置についてそれぞれ、Aであってよい。別の態様において、アミノ酸は、M252、S254およびT256に対応する位置においてそれぞれY、TおよびEであってよく；またはM252に対応する位置においてWであってよく；またはM252に対応する位置においてYであってよく；またはM252およびT256に対応する位置においてそれぞれYおよびQであってよく；またはM252およびT256に対応する位置においてそれぞれFおよびDであってよく；またはV308、L309およびQ311に対応する位置においてそれぞれT、PおよびSであってよく；またはG385、Q386およびN389に対応する位置においてそれぞれD、PおよびSであってよく；またはG385、Q386、P387およびN389に対応する位置においてそれぞれR、T、RおよびPであってよく；またはH433、N434およびY436に対応する位置においてそれぞれK、FおよびHであってよく；またはN434およびY436に対応する位置においてそれぞれFおよびHであってよく；またはH433、N434およびY436に対応する位置においてそれぞれR、YおよびHであってよく；またはM252、S254、T256、H433、N434およびY436に対応する位置においてそれぞれY、T、E、K、FおよびHであってよく；またはM252、S254、T256、G385、Q3

86、P387およびN389に対応する位置においてそれぞれY、T、E、R、T、RおよびPであってよい。

【0214】

一態様において、本発明の二量体タンパク質の六量体形態の半減期は、例えば、画像化および／もしくは放射線免疫療法のために用いられる二量体タンパク質の迅速なクリアランスを確実にするため、または病原性標的分子のクリアランスを促すために短縮される。

【0215】

さらなる態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および／または第2のポリペプチド、例えば、両方のポリペプチドは、例えば、FcRnに対する結合を低下させるかまたはなくすことを介して薬物動態プロファイルをモジュレートするために、例えば、CH2領域および／またはCH3領域においてさらに改変されている。これらの改変には、Fc領域のアミノ酸位置P238、T250、M252、I253、S254、R255、T256、D265、E272、N286、K288、V303、V305、T307、L309、H310、Q311、D312、K317、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、Q386、E388、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447の任意の1つまたは複数での変異が非限定的に含まれ、ここでFc領域における残基の番号付けは、KabatにおけるようなEUインデックスのものである (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001), Dall'Acqua, W.F., et al, J Immunol. 9, 5171-80 (2002), Hinton, P., et al, J Biol Chem. 8, 6213-6 (2004), Dall'Acqua, W.F., et al, J Biol Chem. 33, 23514-24 (2006), Petkova, S.B., et al, Int Immunol. 12, 1759-69 (2006), Datta-Mannan, A., et al, J Biol Chem. 3, 1709-17 (2007), Yeung, Y.A., J Immunol. 12, 7663-71 (2009), Kabat, E.A. in US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, 5th edition 662, 680, 689 (1991))。それ故に、一態様において、P238、T250、M252、I253、S254、R255、T256、D265、E272、N286、K288、V303、V305、T307、L309、H310、Q311、D312、K317、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、Q386、E388、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447からなる群より選択される位置に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Pではない；Tではない；Mではない；Iではない；Sではない；Rではない；Tではない；Dではない；Eではない；Nではない；Kではない；Vではない；Vではない；Tではない；Lではない；Hではない；Qではない；Dではない；Kではない；Kではない；Dではない；Kではない；Qではない；Dではない；Aではない；Eではない；Eではない；Qではない；Eではない；Sではない；Dではない；Sではない；Sではない；Mではない；Hではない；Nではない；Hではない；Yではない；Kではない、またはKではない。

【0216】

さらに別の態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および／または第2のポリペプチド、例えば、両方のポリペプチドは、特定の変異I253A、H310A、H433A、H435A、Y436A、変異I253A / H310A / H435Aによって、FcRnに対する結合を低下させるかまたはなくすことを介して、薬物動態プロファイルを向上させるためにさらに改変されており (Kim, J. K. et al. Eur. J. Immunol. 29, 2819-2825 (1999), Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001))、ここでFc領域における残基の番号付けは、KabatにおけるようなEUインデックスのものである (Kabat, E.A. in US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, 5th edition 662, 680, 689 (1991))。それ故に、一態様において、I253、H310、H433、H435およびY436からなる群より選択される位置に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Aであってよい。別の態様において、I253、H310AおよびH435Aに対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれがAであってよい。

【0217】

他のアミノ酸位置 (特定のアミノ酸が適切であり得る位置、例えば、親二量体タンパク質がアミノ酸を変えるように変異される位置) の別の例は、二量体タンパク質 (例えば抗体) 間のFc領域における相互作用に影響を及ぼすアミノ酸であってよい。そのような変異

は、治療用二量体タンパク質（例えば治療用抗体）と、該治療用二量体タンパク質（例えば治療用抗体）が投与される患者の体内に天然に存在する抗体との相互作用を最小限に抑えるために用いることができる。

【0218】

そのようなアミノ酸残基または変異は以前にPCT/EP12/063339号に記載されており、これには、2つのアミノ酸残基または変異の組み合わせであって、個々ではエフェクター機能を低下させるが、（例えば、それぞれが前記アミノ酸残基または変異のうち1つを含む2つの二量体タンパク質を組み合わせることによって）併せて用いた場合には、そのエフェクター機能が、前記アミノ酸残基が変異していない親二量体タンパク質と同程度になり、それ故にヒトIgG1重鎖のものに対応するような、前記組み合わせが含まれる。それぞれがそのような変異の対を含むそのような2つの二量体タンパク質を併せて用いる場合、前記2つの二量体タンパク質間の相互作用に関する特異性は、そのような変異の対のうち1つの変異しか含まない2つの二量体タンパク質間の相互作用と比較して高くなる可能性がある。同様に、それぞれがそのような変異の対を1つ含む2つの二量体タンパク質間の相互作用も、そのような対の変異のうち1つしか含まない二量体タンパク質と対の変異をいずれも含まない二量体タンパク質との間の相互作用よりも強い可能性がある。

【0219】

それ故に、一態様において、本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、この局面による変異またはアミノ酸残基をさらに含み得る。

【0220】

したがって、いかなる理論にも拘束されることは望まないが、そのような2つの変異を治療用二量体タンパク質に含めることにより、患者におけるC1q結合の誘導は、アミノ酸のそのような組み合わせまたは対を含む治療用二量体タンパク質（例えば抗体）を含有するオリゴマー複合体に限定されることが考えられることが予測される。これにより、治療用二量体タンパク質とそのような変異を含まない患者自身の抗体との相互作用によって引き起こされる副作用の低減が可能になる可能性がある。

【0221】

特定の態様において、二量体タンパク質を、別の二量体タンパク質と組み合わせて用いてもよく、ここで二量体タンパク質のそれぞれは、アミノ酸のそのような「対」のうち、アミノ酸の一方を含む。したがって、一態様において、本発明は、第1および/または第2のポリペプチドにおけるそのような「対」のアミノ酸のうち一方を含む二量体タンパク質に関する。そのような「対」の一方のアミノ酸を含む、そのような二量体タンパク質、例えば、第1の二量体タンパク質は、第1および/または第2のポリペプチドにおいてそのような「対」のもう一方のアミノ酸を含む第2の二量体タンパク質と併せて用いることができる。そのようなアミノ酸の例には、表1のものが含まれる。したがって、さらなる態様において、K439、S440、K447、448および449に対応する位置におけるアミノ酸は、本発明の二量体タンパク質の各ポリペプチドについて、表1に記載されたようなものであってよい。

【0222】

（表1）

アミノ酸位置 (IgG1)	例示的な置換	好ましい置換
K439	439DER	439E
S440	440DEKR	440K
K447	447DE	447E
K447/448	447KRH/448P	447/448P
K447	447DE	447E
K447/448/449	447KRH/448KRH/449P	447/448K/449P

【 0 2 2 3 】

そのようなアミノ酸を含む二量体タンパク質の具体的な組み合わせは、本明細書に記載されたようなものであってよい。

【 0 2 2 4 】

したがって、本発明のさらなる局面において、K439に対応する位置におけるアミノ酸は、二量体タンパク質の一方または両方（例えばそれぞれ）のポリペプチドについて、Kではない。

【 0 2 2 5 】

さらなる態様において、K439に対応する位置におけるアミノ酸はEまたはDである。

【 0 2 2 6 】

さらなる態様において、K439に対応する位置におけるアミノ酸はEである。

【 0 2 2 7 】

さらなる態様において、K439に対応する位置におけるアミノ酸はDである。

【 0 2 2 8 】

一態様において、二量体タンパク質の第1または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれR、K、Q、NまたはY；G、S、T、FまたはH；EまたはD；およびYまたはWである。

【 0 2 2 9 】

一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれR；G；E；およびYである。

【 0 2 3 0 】

一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるS440に対応する位置におけるアミノ酸はKまたはRである。

【 0 2 3 1 】

一態様において、S440に対応する位置におけるアミノ酸はKである。

【 0 2 3 2 】

一態様において、S440に対応する位置におけるアミノ酸はRである。

【 0 2 3 3 】

一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれR；G；およびKである。

【 0 2 3 4 】

本発明のさらなる態様において、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置における少なくとも1つのアミノ酸は、二量体タンパク質の一方または両方（例えばそれぞれ）のポリペプチドについて、各位置についてそれぞれ、Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではなく、かつ、S440に対応する位置におけるアミノ酸はKまたはRである。

【 0 2 3 5 】

さらなる態様において、Y436に対応する位置におけるアミノ酸はIであり、S440に対応するアミノ酸はKである。

【 0 2 3 6 】

一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、E345、E430、Y436およびヒトIgG1重鎖におけるS440に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれR；G；I；およびKである。

【 0 2 3 7 】

一態様においては、K439D/E/R置換およびS440D/E/K/R置換の対が用いられる。したがって、一態様においては、第1のポリペプチドがK439D/E/Rを含み、第2のポリペプチドがS440D/E/K/Rを含むか、またはその反対であり、第1および/または第2のポリペ

10

20

30

40

50

プチドにおいて、位置E345およびE430に対応するアミノ酸はEではない。さらなる態様においては、S440D/E/K/Rを含むポリペプチドにおいて、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置に対応するアミノ酸の1つは、各位置についてそれぞれ、Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない。したがって、本発明の別の局面において、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置における少なくとも1つのアミノ酸は、二量体タンパク質の一方または両方（例えばそれぞれ）のポリペプチドについて、各位置についてそれぞれ、Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではなく、かつ、S440に対応する位置におけるアミノ酸はSでもYでもWでもない。

10

【0238】

別の態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸残基は、二量体タンパク質の一方または両方（例えばそれぞれ）のポリペプチドについて、DまたはEである。

【0239】

さらなる態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸はDである。

【0240】

さらなる態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸はEである。

【0241】

別の態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸残基は、二量体タンパク質のポリペプチドの一方または両方（例えばそれぞれ）について、K、RまたはHであり、かつ、当該ポリペプチドは、

20

(a) Pである、位置448におけるアミノ酸残基；または

(b) K、RまたはHである、位置448におけるアミノ酸残基、および、Pである、位置449におけるアミノ酸残基、を含む。

【0242】

さらなる態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸はKである。

【0243】

さらなる態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸はRである。

【0244】

さらなる態様において、K447に対応する位置におけるアミノ酸はHである。

30

【0245】

さらなる態様において、448に対応する位置におけるアミノ酸はKである。

【0246】

さらなる態様において、448に対応する位置におけるアミノ酸はRである。

【0247】

さらなる態様において、448に対応する位置におけるアミノ酸はHである。

【0248】

さらなる態様において、Q386に対応する位置におけるアミノ酸は、二量体タンパク質における一方または両方（例えばそれぞれ）のポリペプチドについて、Kである。

40

【0249】

実施例3～5に記載されているように、K439EおよびS440K変異の一方のみを含む抗体変異体では、C1qに対する K_D が劇的に増大しており、このことは補体活性化および/またはCDC能力の低下を反映している。驚いたことに、両方の変異を含むHuMAb 7D8または005の抗体変異体では、C1q結合またはCDCの回復または増大がみられることが見いだされた。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、その基礎にある機序はおそらく、図4に図示されているように、各々の変異が互いに立体的に代償することによって説明し得ると考えられる。

【0250】

さらなる態様において、L234、L235、G236、G237、S239、P238、T250、M252、I253、S2

50

54、R255、T256、D265、S267、H268、D270、E272、N286、K288、N297、V303、V305、T307、V308、L309、H310、Q311、D312、K317、K322、S324、P329、P331、I332、K340、D356、K360、Q362、D376、A378、E380、E382、G385、Q386、P387、E388、N389、S400、D413、S415、S424、M428、H433、N434、H435、Y436、K439またはK447に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、二量体タンパク質の一方または両方（例えばそれぞれ）のポリペプチドについて、それぞれ、Lではない；Lではない；Gではない；Gではない；Sではない；Pではない；Tではない；Mではない；Iではない；Sではない；Rではない；Tではない；Dではない；Sではない；Hではない；Dではない；Eではない；Nではない；Kではない；Nではない；Vではない；Vではない；Tではない；Vではない；Lではない；Hではない；Qではない；Dではない；Kではない；Kではない；Sではない；Pではない；Pではない；Iではない；Kではない；Dではない；Kではない；Qではない；Dではない；Aではない；Eではない；Eではない；Gではない；Qではない；Pではない；Eではない；Nではない；Sではない；Dではない；Sではない；Sではない；Mではない；Hではない；Nではない；Hではない；Yではない；Kではない、およびKではない。

10

【0251】

一態様において、本発明の二量体タンパク質はホモ二量体である。したがって、一態様において、二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドは両方とも、本発明の任意の局面または態様の同じまたは同一のアミノ酸置換を含む。

【0252】

ヘテロ二量体の形式

20

別の態様において、本発明の二量体タンパク質はヘテロ二量体である。

【0253】

さらなる態様において、ポリペプチドの少なくとも一方は、標的と特異的に結合する結合領域を含む。さらなる態様において、ヘテロ二量体タンパク質の各ポリペプチドは、標的（任意で同じ標的）と特異的に結合する結合領域を含む。

【0254】

標的は、本明細書に記載した標的のいずれであってもよい。

【0255】

さらなる態様において、ヘテロ二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドの結合領域は、同じ標的上の異なるエピトープと結合してよい。別の態様において、ヘテロ二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドの結合領域は、異なる標的と結合してよい。

30

【0256】

別の態様において、ヘテロ二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドの結合領域は、異なる細胞上の異なる標的と結合してよい。

【0257】

特定の態様において、ヘテロ二量体タンパク質は二重特異性抗体であってよい。

【0258】

さらなる態様において、前記ヘテロ二量体抗体の第1および第2のポリペプチドの結合領域は、同じ標的上の異なるエピトープと結合してよい。別の態様において、前記ヘテロ二量体抗体の第1および第2のポリペプチドの結合領域は、異なる標的と結合してよい。

40

【0259】

別の態様において、ヘテロ二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドの結合領域は、異なる細胞上の異なる標的と結合してよい。

【0260】

二量体タンパク質がヘテロ二量体タンパク質である場合、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430に対応する位置にあるアミノ酸、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置にあるアミノ酸は、一態様において、第1および第2のポリペプチドで異なってよいが、別の態様において、それらは同じであってもよい。

【0261】

50

前記アミノ酸は、例えば、ヘテロ二量体タンパク質が、WO2011/131746号に記載されたようにして生産される場合には、異なってよい。

【0262】

本発明の二重特異性抗体は特定の形式には限定されず、それは本明細書に記載された形式のいずれであってもよい。

【0263】

本発明に用い得る例示的な二重特異性抗体分子には、(i)異なる抗原結合領域を含む2つのアームを有する単一の抗体、(ii)例えば追加のペプチドリンカーによって縦列に連結された2つのscFvを介して、2つの異なるエпитープに対する特異性を有する単鎖抗体；(iii)短いペプチド結合を通じて各軽鎖および重鎖がタンデムになった2つの可変ドメインを含む二重可変ドメイン抗体(DVD-Ig)(Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig(商標))Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))；(iv)化学的に結合した二重特異性(Fab')₂断片；(v)2つの単鎖ダイアボディの融合の結果、標的抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体が生じるTandab；(vi)scFvとダイアボディの組み合わせの結果、多価分子が生じるflexibody；(vii)プロテインキナーゼAの中の「二量体化・ドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドック・アンド・ロック(dock and lock)」分子、これはFabに適用されると、2つの同一なFab断片が1つの異なるFab断片と連結したものである三価の二重特異性結合タンパク質を生じ得る；(viii)例えば、2つのscFvがヒトFabアームの両端と融合したものを含む、いわゆるScorpion分子；ならびに(ix)ダイアボディ、が含まれる。

【0264】

一態様において、本発明の二重特異性抗体は、ダイアボディ、クロスボディ(cross-body)、または本発明に記載されたもののような制御下でのFabアーム交換(例えば、WO 11/131746号に記載されたように)を介して入手し得る二重特異性抗体である。

【0265】

さまざまなクラスの二重特異性抗体の例には、以下のものが非限定的に含まれる。

- ・ヘテロ二量体化を強制的に行わせる相補的CH3ドメインを有するIgG様分子
- ・分子の両側がそれぞれ、少なくとも2種類の異なる抗体のFab断片またはFab断片の一部を含む、組換えIgG様二重標的指向性分子；
- ・全長IgG抗体が追加のFab断片またはFab断片の一部と融合されたIgG融合分子；
- ・単鎖Fv分子または安定化されたダイアボディが、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはそれらの一部と融合された、Fc融合分子；
- ・複数の異なるFab断片が融合して1つになり、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはそれらの一部と融合された、Fab融合分子；
- ・複数の異なる単鎖Fv分子または異なるダイアボディまたは異なる重鎖抗体(例えば、ドメイン抗体、ナノボディ)が互いに、または重鎖定常ドメイン、Fc領域もしくはそれらの一部と融合された別のタンパク質もしくは担体分子と融合された、ScFvおよびダイアボディを基にした抗体および重鎖抗体(例えば、ドメイン抗体、ナノボディ)。

【0266】

相補的CH3ドメイン分子を有するIgG様分子の例には、トリオマブ(Triomab)/クアドローマ(Quadroma)(Trion Pharma/Fresenius Biotech)、ノブ・イントゥー・ホールズ(Knobs-into-Holes)(Genentech)、CrossMAb(Roche)およびエレクトロスタティカルリー・マッチド(electrostatically-matched)(Amgen, Chugai, Ocomed)、LUZ-Y(Genentech)、ストランド交換操作ドメインボディ(Strand Exchange Engineered Domain body)(SEEDbody)(EMD Serono)、Biclonics(Merus)、Fc Adp(Regeneron)、二重特異性IgG1およびIgG2(Pfizer/Rinat)、Azymetric scaffold(Zymeworks)、mAb-Fv(Xencor)、二価二重特異性抗体(Roche)ならびにDuoBody(Genmab A/S)が非限定的に含まれる。

【0267】

組換えIgG様二重標的指向性分子の例には、Dual Targeting (DT) -Ig (GSK / Domantis)、ツー・イン・ワン (Two-in-one) 抗体 (Genentech)、架橋Mab (Cross-linked Mab) (Karmanos Cancer Center)、mAb² (F-Star) およびCovX-body (CovX / Pfizer) が非限定的に含まれる。

【0268】

IgG融合分子の例には、Dual Variable Domain (DVD) -Ig (Abbott)、IgG-like Bispecific (ImClone / Eli Lilly)、Ts2Ab (MedImmune / AZ) およびBsAb (Zymogenetics)、HE RCULES (BiogenIdec) ならびにTvAb (Roche) が非限定的に含まれる。

【0269】

Fc融合分子の例には、ScFv / Fc Fusion (Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions / Trubion、Zymogenetics / BMS)、Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) およびDual(ScFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine-China) が非限定的に含まれる。

【0270】

Fab融合二重特異性抗体の例には、F(ab)₂ (Medarex / AMGEN)、Dual-ActionまたはBis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics)、Bivalent Bispecific (Biotech) およびFab-Fv (UCB-Celltech) が非限定的に含まれる。

【0271】

ScFvに基づく抗体、ダイアボディに基づく抗体およびドメイン抗体の例には、Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet、Tandem Diabody (Tandab) (Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics)、Single-chain Diabody (Academic)、TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics)、Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) およびCOMBODY (Epigen Biotech)、dual targeting nanobody (Ablin x)、二重標的指向性の重鎖のみのドメイン抗体 (dual targeting heavy chain only domain antibody) が非限定的に含まれる。

【0272】

特定の態様において、二重特異性抗体は、WO 2011 / 131746号に記載された形式を有する。

【0273】

したがって、一態様において、本発明は、本発明のヘテロ二量体タンパク質であって、第1のポリペプチドにおいて、K409、T366、L368、K370、D399、F405およびY407から選択される位置におけるアミノ酸がそれぞれK、T、L、K、D、FおよびYではなく、かつ

第2のポリペプチドにおいて、F405、T366、L368、K370、D399、Y407およびK409から選択される位置におけるアミノ酸がそれぞれF、T、L、K、D、YおよびKではない、ヘテロ二量体タンパク質に関する。

【0274】

ヘテロ二量体タンパク質の特定の態様において、第1のポリペプチドでは位置K409におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドでは位置F405におけるアミノ酸がLである。

【0275】

したがって、一態様において、前記第1および第2のポリペプチドの配列は、非対称性のアミノ酸残基または変異、すなわち、第1および第2のポリペプチドにおいて異なる位置にあるアミノ酸残基または変異、例えば、ポリペプチドの一方では位置405にある特定のアミノ酸または変異、およびもう一方のポリペプチドでは位置409にある特定のアミノ酸または変異などを含む。これに関して、これらのアミノ酸残基または変異はもう一方の側のポリペプチドにも同様に存在してよいので、第1および第2のポリペプチドについての言及は限定的であると解釈されるべきではない。すなわち、例えば、前記第1のポリペプチドでは位置F405におけるアミノ酸がLであり、前記第2のポリペプチドでは位置K409におけるアミノ酸がRであるか；またはその反対であり、前記第1のポリペプチドでは位置K409におけるアミノ酸がRであり、前記第2のポリペプチドでは位置F405におけるアミノ酸がLである。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 6 】

一態様において、第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えばArg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置に、T、L、K、D、F、およびYではないアミノ酸を有する。1つのそのような態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置405にPhe以外のアミノ酸（例えば、Lys、Leu、Met、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCys）を有する。このさらなる態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸（例えば、Lys、Leu、Met、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCys）を有する。

10

【 0 2 7 7 】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を含み、前記第2のポリペプチドは、位置405にPhe以外のアミノ酸（例えば、Lys、Leu、Met、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCys）を含み、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1のポリペプチドは、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を含み、前記第2のポリペプチドは、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸（例えば、Lys、Leu、Met、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCys）を含み、位置409にLysを含む。

20

【 0 2 7 8 】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を含み、前記第2のポリペプチドは、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1のポリペプチドは、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸（例えば、Lys、Leu、Met、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCys）を含み、位置409にLysを含む。別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

30

【 0 2 7 9 】

さらなる態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を含み、前記第2のポリペプチドは、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。さらなる態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

40

【 0 2 8 0 】

さらに別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【 0 2 8 1 】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のア

50

ミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を含み、前記第2のポリペプチドは、位置409にLysを含み、かつ：a）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0282】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置409にLysを含み、かつ：a）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0283】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置409にLysを含み、かつ：a）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0284】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のポリペプチドは、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【0285】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸（例えば、His、Asn、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Trp、Leu、MetまたはCys）を有する。別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する。

【0286】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する。

【0287】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸（例えば、His、Asn、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Trp、Leu、MetまたはCys）を、位置409にLysを有する。

【0288】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0289】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0290】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置407にTyrを、位置409にArgを有し

10

20

30

40

50

、前記第2のポリペプチドは、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸（例えば、His、Asn、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Trp、Leu、MetまたはCys）を、位置409にLysを有する。

【0291】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0292】

別の態様において、前記第1のポリペプチドは、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のポリペプチドは、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0293】

一態様において、第1のポリペプチドは、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCys）を有し、第2のポリペプチドは、

(i) 位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Lys、Tyr、TrpもしくはCys）、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAsp、Cys、Pro、GluまたはGln以外のアミノ酸（例えば、Arg、His、Ser、Thr、Asn、Gly、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、LeuもしくはMet）、または

(iv) 位置366にLys、Arg、Ser、ThrまたはTrp以外のアミノ酸（例えば、Leu、Met、His、Asp、Glu、Asn、Glu、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、TyrまたはCys）

を有する。

【0294】

一態様において、第1のポリペプチドは、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のポリペプチドは、

(i) 位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetまたはTyr

を有する。

【0295】

一態様において、第1のポリペプチドは、位置409にArgを有し、第2のポリペプチドは、

(i) 位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln

を有する。

【0296】

上記にて特定されたアミノ酸置換に加えて、前記第1および第2のポリペプチドが、野生型Fc配列に比してのアミノ酸置換、欠失または挿入をさらに含んでもよい。

【0297】

本発明のそのような二重特異性抗体は、実施例8に記載したようにして作製できる。その上、作製されたヘテロ二量体タンパク質によるCDC死滅に対する効果を、実施例9で用いたようなアッセイを用いることによって試験することもできる。すなわち、特定の態様において、CDC死滅は、懸濁細胞を、丸底96ウェルプレート中に 1×10^6 個/mLの濃度で、総容積100 μ L中で、最終濃度0.0003 ~ 30.0 μ g/mLの範囲の抗体とともに、振盪機上にて

10

20

30

40

50

室温で15分間ブレインキュベートする段階、正常ヒト血清を最終濃度20%、30%または50%で添加する段階、37℃で45分間インキュベートする段階、プレートを氷上に置く段階、10 µLヨウ化プロピジウムを添加する段階；および細胞溶解をFACS分析によって判定する段階、によって判定できる。

【0298】

ヘテロ二量体タンパク質の特定の態様において、第1のポリペプチドではK409に対応する位置におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドではF405に対応する位置におけるアミノ酸がLであり、ここでヒトIgG1重鎖においてE345およびE430に対応する位置における前記第1および第2のポリペプチドのそれぞれのアミノ酸はEではなく、かつ、S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、YまたはWである、Yではない、Eではない、Tではない、Eではない、Nではない、Qではない、Iではない、およびSではない。

10

【0299】

ヘテロ二量体タンパク質のさらなる特定の態様において、第1のポリペプチドではK409に対応する位置におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドではF405に対応する位置におけるアミノ酸がLであるか、またはその反対であり；ここでE345、E430およびS440に対応する位置にある第1および第2のポリペプチドのアミノ酸は、それぞれR、GおよびYである。

【0300】

20

ヘテロ二量体タンパク質のさらなる特定の態様において、第1のポリペプチドではK409に対応する位置におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドではF405に対応する位置におけるアミノ酸がLであるか、またはその反対であり；ここでE345、E430およびS440に対応する位置にある第1および/または第2のポリペプチドのアミノ酸は、それぞれK、GおよびYである。

【0301】

ヘテロ二量体タンパク質のさらなる特定の態様において、第1のポリペプチドではK409に対応する位置におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドではF405に対応する位置におけるアミノ酸がLであるか、またはその反対であり；ここでE345、E430およびS440に対応する位置にある第1および/または第2のポリペプチドのアミノ酸は、それぞれR、SおよびYである。

30

【0302】

ヘテロ二量体タンパク質のさらなる特定の態様において、第1のポリペプチドではK409に対応する位置におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドではF405に対応する位置におけるアミノ酸がLであるか、またはその反対であり；ここでE345、E430およびS440に対応する位置にある第1および/または第2のポリペプチドのアミノ酸は、それぞれR、GおよびWである。

【0303】

ヘテロ二量体タンパク質のさらなる特定の態様において、第1のポリペプチドではK409に対応する位置におけるアミノ酸がRであり、第2のポリペプチドではF405に対応する位置におけるアミノ酸がLであるか、またはその反対であり；ここでE345、E430およびY436に対応する位置にある第1および/または第2のポリペプチドのアミノ酸は、それぞれR、GおよびIである。

40

【0304】

さらなる態様において、ヘテロ二量体タンパク質における他の任意のアミノ酸が、「他のアミノ酸位置」の項にさらに記載したようであってもよい。

【0305】

実施例11は、二重特異性CD20xEGFR抗体へのE345R変異の導入により、CDC活性が増強されることを示している。すなわち、一態様において、CDC活性は、懸濁細胞を、丸底96ウェルプレート中にて 1×10^6 個/mLの濃度で、総容積100 µL中で、最終濃度0.0003 ~ 30.0 µ

50

g/mLの範囲の抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートする段階、正常ヒト血清を最終濃度20%、30%または50%で添加する段階、37℃で45分間インキュベートする段階、プレートを氷上に置く段階、10 µLヨウ化プロピジウムを添加する段階、および細胞溶解をFACS分析によって判定する段階、によって判定できる。

【0306】

実施例9、15および16も、異なる二重特異性抗体のいくつかを記載している。

【0307】

二重特異性抗体は、例えば、CD20抗体の抗原結合領域およびCD38抗体の抗原結合領域、ならびに本発明のアミノ酸を含み得る。例示的なCD20結合領域には、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO2004/035607号に記載されたオフアツムマブ(2F2)、7D8 および11B8、ならびにリツキシマブ(WO 2005/103081号)のものが含まれる。例示的なCD38結合領域には、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO2006/099875号に記載された003およびダラツムマブ(005)のものが含まれる。

【0308】

一態様において、二重特異性抗体は、同じまたは異なる標的上の異なるエピトープと結合する。すなわち、第1および第2のポリペプチドの結合領域は、一態様において、同じ標的ではあるが異なるエピトープと結合する。別の態様において、第1および第2のポリペプチドの結合領域は、異なる標的と結合し得る。

【0309】

別の態様において、第1および第2のポリペプチドの結合領域は、異なる細胞上の異なる標的と結合し得る。

【0310】

一態様において、ヒトIgG1重鎖における、E345、E430に対応する位置における第1および第2のポリペプチドにおけるアミノ酸、およびS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置に対応するアミノ酸は、それぞれ、DでもEでもない；Eではない；Sではない；Yではない；Eではない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではなく、同じでも異なってもよい。

【0311】

さらなる態様において、1つまたは複数のさらなるアミノ酸は、本明細書に記載した通りであってよい。特定の態様において、ヘテロ二量体タンパク質のポリペプチドのそれぞれにおいて、K439に対応する位置におけるアミノ酸はDまたはEである。別の特定の態様において、S440に対応する位置におけるアミノ酸はKまたはRである。したがって、特定の態様において、前記第1のポリペプチドでは、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸はEではなく、ヒトIgG1重鎖におけるS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置に対応する少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Y、K、RまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではなく、ヒトIgG1重鎖におけるK439に対応する位置におけるアミノ酸はDまたはEであり、前記第2のポリペプチドでは、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置におけるアミノ酸はEではなく、ヒトIgG1重鎖における位置S440におけるアミノ酸はKまたはRである。

【0312】

Fc融合タンパク質

本発明の一面において、本発明の二量体タンパク質の任意の局面または態様は、融合タンパク質の一部である。本発明の融合タンパク質は、天然には単一のタンパク質として発現されない、2種以上の共有結合性に連結されたタンパク質断片からなるタンパク質を指すことができる。融合タンパク質は、例えば、当技術分野において一般的に公知である組換えクローニングおよび発現の技術によって作製することもでき、または融合タンパク質を作る方法が生成後であってもよい。そのようなプロセスの例には、当技術分野において一般的に公知であるインテイン、タンパク質リガーゼ、または他の酵素プロセスがある

。すなわち、本発明の融合タンパク質は、それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域およびCH3領域を含む第1および第2のポリペプチドを含む前記二量体タンパク質であると解釈され、ここで前記第1および/または第2のポリペプチドは結合領域をさらに含み得る。

【0313】

したがって、本発明の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、結合領域をさらに含み得る。本発明の結合領域は、標的と結合し得るポリペプチド配列であると解釈される。したがって、結合領域は、細胞、細菌、ビリオンなどに付随する標的と結合し得るタンパク質、タンパク質リガンド、受容体、抗原結合領域、またはリガンド結合領域であってもよい。結合領域は、例えば、受容体、受容体リガンド、リガンド、サイトカイン、ホルモン、または免疫グロブリンもしくは抗体の抗原結合領域の一部であってもよい。

10

【0314】

一態様において、結合領域は、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、およびTNF α からなる群より選択されるサイトカインである。

【0315】

一態様において、結合領域は抗原結合領域である。いくつかの態様において、前記二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドは、Fc領域に加えて、抗体の他の領域の1つまたは複数またはすべて、すなわち、CH1領域、VH領域、CL領域および/またはVL領域を含む。したがって、一態様において、前記第1のポリペプチドは全長抗体である。別の態様において、前記第2のポリペプチドは全長抗体である。

20

【0316】

別の態様において、結合領域は毒素、例えば天然に存在する毒素である。

【0317】

結合体

一局面において、本発明の二量体タンパク質は、任意でポリペプチドの少なくとも一方とリンカーを介して結合体化された、薬物、毒素、放射性標識、放射線不透過性物質、常磁性物質、蛍光性物質、リン光性物質、超音波用増強剤、シアル酸付加、またはポリエチレングリコール(PEG)をさらに含む。

30

【0318】

一態様において、前記二量体タンパク質は融合タンパク質の一部である。

【0319】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は放射性標識を含む。

【0320】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は放射線不透過性物質を含む。

【0321】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は常磁性物質を含む。

【0322】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は蛍光性物質を含む。

40

【0323】

一態様において、本発明の二量体タンパク質はリン光性物質を含む。

【0324】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は超音波用増強剤を含む。

【0325】

一態様において、本発明の二量体タンパク質はポリエチレングリコール(PEG)を含む。

。

【0326】

別の局面において、本発明の二量体タンパク質は、C末端では毒素または標識などの別

50

の分子と結合体化されていない。一態様において、二量体タンパク質は別の部位、典型的にはオリゴマー形成を妨げない部位で別の分子と結合体化されている。例えば、二量体タンパク質は、その他方の部位で、毒素（放射性同位体を含む）、プロドラッグまたは薬物からなる群より選択される化合物と連結されている。そのような化合物は、例えば癌治療において、標的細胞の致死をより有効にできる。したがって、結果として得られる二量体タンパク質は免疫結合体である。

【0327】

したがって、さらなる局面において、本発明は、1つまたは複数の治療用部分、例えば細胞毒素、化学療法薬、サイトカイン、免疫抑制剤および/または放射性同位体などと連結または結合体化された抗体などの二量体タンパク質を提供する。そのような結合体化は、本明細書において「免疫結合体」または「薬物結合体」と称される。1つまたは複数の細胞毒素を含む免疫結合体は「イムノトキシン」と称される。

【0328】

細胞毒素または細胞傷害剤には、細胞にとって有害な（例えば、細胞を死滅させる）任意の薬剤が含まれる。本発明の免疫結合体を形成させるのに適した治療薬には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、マイタンシンまたはその類似体もしくは誘導体、ネオカルジノスタチン、カリケアミシン類、エスベラミシン類、ダイネミシン類、リダマイシン、ケダルシジンまたはその類似体もしくは誘導体を含むエンジン系抗腫瘍抗生物質、アントラサイクリン類、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロ-テストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリピンなど）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導体、例えばカルボプラチンなど；ならびにデュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、CC-1065（別名ラケルマイシン）またはCC-1065の類似体もしくは誘導体）、ドラスタチン、ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアセピン類（PDB）またはそれらの類似体、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、プレオマイシン、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC）など）、有糸分裂阻害剤（例えば、チューブリン阻害薬）、例えばモノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF、またはドラスタチン10の他の類似体もしくは誘導体など；ヒストンデアセチラーゼ阻害薬、例えばヒドロキサム酸トリコスタチンA、ボリノスタット（SAHA）、ベリノスタット、LAQ824、およびパノビノスタットならびにベンズアミド類、エンチノスタット、CI994、モセチノスタット、ならびに脂肪酸化合物、例えばフェニルブチレートおよびバルプロ酸など、プロテアソーム阻害薬、例えばダノプレビル、ボルテゾミブなど、アマトキシン類、例えば α -アマンチンなど、ジフテリア毒素および関連分子（例えば、ジフテリアA鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子）；リシン毒素（例えば、リシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素など）、コレラ毒素、志賀毒素様毒素（SLT-I、SLT-II、SLT-III）、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズBowman-Birkプロテアーゼインヒビター、緑膿菌外毒素、アロリン、サボリン、モデシン、ゲラニン（gelanin）、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、ニガウリ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaire officinalis*）インヒビタ

10

20

30

40

50

ー、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシン毒素が含まれる。他の適した結合体化分子には、抗菌性/溶解性ペプチド、例えばCLIP、マガイニン2、メリチン、セクロピンおよびP18など；リボヌクレアーゼ（RNアーゼ）、DNアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ヨウシュヤマゴボウ（pokeweed）抗ウイルスタンパク質、ジフテリン毒素、ならびに緑膿菌内毒素が含まれる。例えば、Pastan et al., Cell 47, 641 (1986)およびGoldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994)を参照されたい。本明細書の他所に記載されたように本発明の二量体タンパク質と組み合わせて投与し得る治療薬、例えば、抗癌サイトカインまたはケモカインなども、本発明の二量体タンパク質との結合体化のために有用な治療用部分の候補である。

【0329】

10

一態様において、本発明の薬物結合体は、アウリスタチン類またはアウリスタチンペプチド類似体および誘導体（US5635483号；US5780588号）と結合体化された、本明細書に開示された二量体タンパク質を含む。アウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解ならびに核分裂および細胞分裂を妨げること（Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584）、ならびに抗癌活性（US5663149号）および抗真菌活性（Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42: 2961-2965）を有することが示されている。アウリスタチン薬物部分を、リンカーによって、ペプチド薬物部分のN（アミノ）末端またはC（カルボキシ）末端を介して二量体タンパク質と結びつけることもできる。

【0330】

20

例示的なアウリスタチンの態様には、2004年3月28日に掲載されたSenter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volume 45, abstract number 623に開示され、US 2005/0238649号に記載されている、N末端結合型モノメチルアウリスタチン薬物部分DEおよびDFが含まれる。

【0331】

例示的なアウリスタチンの態様はMMAE（モノメチルアウリスタチンE）である。別の例示的なアウリスタチン態様はMMAF（モノメチルアウリスタチンF）である。

【0332】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、結合体化された核酸または核酸結合分子を含む。1つのそのような態様において、結合体化される核酸は細胞傷害性リボヌクレアーゼ、アンチセンス核酸、抑制性RNA分子（例えば、siRNA分子）または免疫賦活性核酸（例えば、免疫賦活性CpGモチーフを含有するDNA分子）である。別の態様において、本発明の二量体タンパク質は、アプタマーまたはリボザイムと結合体化されている。

30

【0333】

一態様において、1つまたは複数の放射性標識アミノ酸を含む二量体タンパク質が提供される。放射性標識された二量体タンパク質は、診断目的および治療目的の両方に用いることができる（放射性標識分子との結合体化は、別の考えられる特徴である）。ポリペプチドに対する標識の非限定的な例には、3H、14C、15N、35S、90Y、99Tcおよび125I、131Iおよび186Reが含まれる。放射性標識アミノ酸および関連したペプチド誘導体を調製するための方法は当技術分野において公知である（例えば、Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd Ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) ならびにU.S. 4,681,581号、U.S. 4,735,210号、U.S. 5,101,827号、U.S. 5,102,990号（US RE35,500号）、U.S. 5,648,471号およびU.S. 5,697,902号を参照）。例えば、放射性同位体をクロラミン-T法によって結合体化させることができる。

40

【0334】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、放射性同位体または放射性同位体を含むキレートに結合体化される。例えば、二量体タンパク質を、二量体タンパク質を放射性同位体と錯体化することを可能にするキレート剤リンカー、例えば、DOTA、DTPAまたはチウキセタンと結合体化させてもよい。二量体タンパク質はさらに、または代替的に、1つまたは複数の放射性標識アミノ酸または他の放射性標識分子を含むか、またはそれら

50

と結合体化されてもよい。放射性標識された二量体タンパク質は、診断目的および治療目的の両方に用いることができる。一態様において、本発明の二量体タンパク質は、放射体と結合体化される。放射性同位体の非限定的な例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bs 、 ^{225}Ac および ^{227}Th が含まれる。

【0335】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN、IFN、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNFからなる群より選択されるサイトカインと結合体化させることができる。

【0336】

また、本発明の二量体タンパク質を、例えばそれらの血中半減期を延ばすために、ポリマーとの共有結合体化によって化学的に修飾することもできる。例示的なポリマーおよびそれらをペプチドに結びつけるための方法は、例えば、US 4,766,106号、US 4,179,337号、US 4,495,285号およびUS 4,609,546号に説明されている。そのほかのポリマーには、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール (PEG) (例えば、約1,000～約40,000、例えば約2,000～約20,000などの分子量を有するPEG) が含まれる。

【0337】

Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)およびNygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)によって記載された方法を含む当技術分野において公知の任意の方法を使用して、本発明の二量体タンパク質を上記のものなどの結合体化される分子と結合体化させることができる。そのような二量体タンパク質は、もう一方の部分を、二量体タンパク質またはその断片 (例えば、抗体H鎖またはL鎖) のN末端側またはC末端側に対して化学的に結合体化させることによって作製できる (例えば、Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)を参照)。また、そのような結合体化された二量体タンパク質誘導体を、適宜、内部の残基または糖での結合体化によって作製することもできる。

【0338】

これらの薬剤は、本発明の二量体タンパク質と直接的または間接的にカップリングさせることができる。第2の薬剤の間接的カップリングの一例は、二重特異性抗体におけるシステイン残基またはリジン残基に対する、スペーサー部分またはリンカー部分を介したカップリングである。一態様において、二量体タンパク質は、インビボで活性化されて治療用薬物になることができるプロドラッグ分子と、スペーサーまたはリンカーを介して結合体化される。いくつかの態様において、リンカーは細胞内条件下で切断可能になり、その結果、リンカーの切断によって細胞内環境で二量体タンパク質から薬物単位が放出される。いくつかの態様において、リンカーは、細胞内環境 (例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラの内部) に存在する切断性物質によって切断可能である。例えば、スペーサーまたはリンカーは、腫瘍細胞に付随する酵素または他の腫瘍特異的条件によって切断可能になることができ、それにより、活性薬物が形成される。そのようなプロドラッグ技術およびリンカーの例は、Syntarga BV, et al.によるWO02083180号、WO 20040434 93号、WO2007018431号、WO2007089149号、WO2009017394号およびWO201062171号に記載されている。また、適した抗体-プロドラッグ技術およびデュオカルマイシン類似体については、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,989,452 (Medarex) 号にも記載がある。リンカーはさらに、または代替的に、例えば、リソソーム性またはエンドソーム性プロテアーゼを非限定的に含む細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであってもよい。いくつかの態様において、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切断性物質にはカテプシンBおよびDならびにプラスミンが含まれ、これらはすべて、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞内での活性薬物の放出をもたらすことが知られている (例えば、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123を参照)。1つの具体

10

20

30

40

50

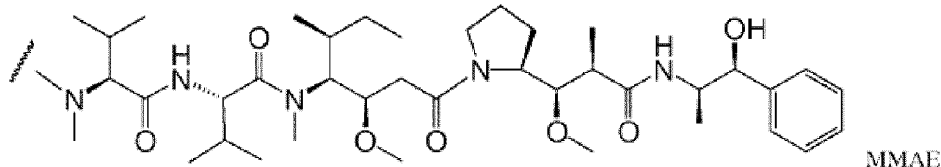
的な態様において、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチジルリンカーは、Val-Cit（バリン-シトルリン）リンカーまたはPhe-Lys（フェニルアラニン-リジン）リンカーである（例えば、Val-Citリンカーによるドキシソルピシンの合成、およびPhe-Lysリンカーの種々の例を記載しているUS6214345号を参照）。Val-CitリンカーおよびPhe-Lysリンカーの構造の例には、下記のMC-vc-PAB、MC-vc-GABA、MC-Phe-Lys-PABまたはMC-Phe-Lys-GABAが非限定的に含まれ、ここでMCはマレイミドカプロイルの略号であり、vcはVal-Citの略号であり、PABはp-アミノベンジルカルバメートの略号であり、GABAはγ-アミノ酪酸の略号である。治療薬の細胞内タンパク質分解放出を用いることの1つの利点は、薬剤は結合体化されると典型的には弱毒化されること、および結合体の血清中安定性が典型的には高いことである。

10

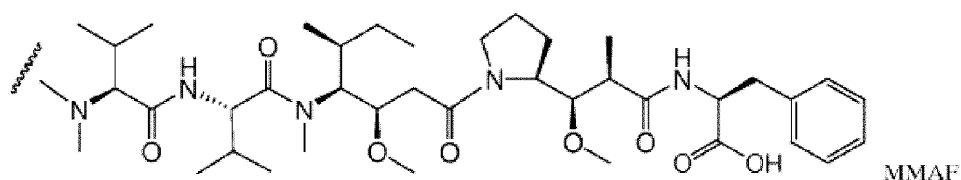
【0339】

さらに別の態様において、リンカー単位は切断不能であり、薬物は二量体タンパク質または抗体の分解によって放出される（US 2005/0238649号を参照）。典型的には、そのようなリンカーは細胞外環境に対して実質的に感受性ではない。本明細書で用いる場合、リンカーの文脈における「細胞外環境に対して実質的に感受性ではない」とは、二量体タンパク質薬物結合体化合物が細胞外環境内（例えば、血漿中）に存在する場合に、二量体タンパク質薬物結合体化合物の試料中のリンカーの20%以下、典型的には約15%以下、より典型的には約10%以下、さらにより典型的には約5%以下、約3%以下または約1%以下しか切断されないことを意味する。リンカーが細胞外環境に対して実質的に感受性ではないか否かは、例えば、二量体タンパク質薬物結合体化合物を血漿とともに所定の期間（例えば、2、4、8、16または24時間）にわたってインキュベートし、続いて血漿中に存在する遊離薬物の量を定量することによって決定できる。MMAEまたはMMAFとさまざまなリンカー成分とを含む例示的な態様は、以下の構造を有する（ここでAbは抗体を意味し、薬物負荷（または抗体分子1つ当たりの細胞分裂阻害薬または細胞傷害性薬物の平均数）を表すpは1～約8であり、例えば、pは4～6、例えば3～5などであってもよく、またはpは1、2、3、4、5、6、7もしくは8であってもよい）。

20



30



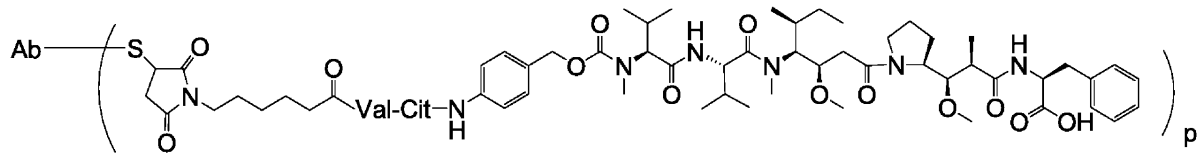
【0340】

切断可能なリンカーをアウリスタチンと組み合わせる例には、MC-vc-PAB-MMAF（vcMMAFとも表記）およびMC-vc-PAB-MMAF（vcMMAEとも表記）が含まれ、ここでMCはマレイミドカプロイルの略号であり、vcはVal-Cit（バリン-シトルリン）を基にしたリンカーの略号であり、PABはp-アミノベンジルカルバメートの略号である。

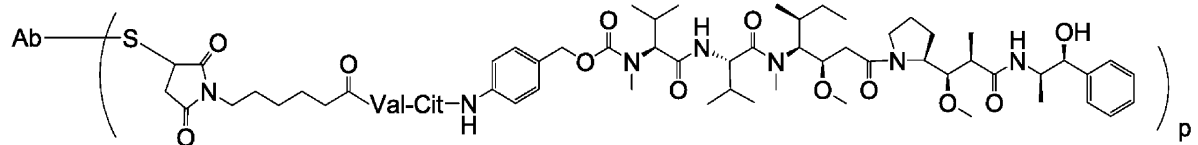
40

【0341】

他の例にはアウリスタチンと非切断性リンカーとの組み合わせ、例えばmcMMAFなどが含まれる（mc（この文脈ではMCはmcと同じである）はマレイミドカプロイルの略号である）。



Ab-MC-vc-PAB-MMAF (vcMMAF)



Ab-MC-vc-PAB-MMAE (vcMMAE)

【 0 3 4 2 】

一態様において、薬物リンカー部分はvcMMAEである。vcMMAE薬物リンカー部分および結合体化の方法は、WO2004010957号、US7659241号、US7829531号、US7851437号およびUS 11/833,028号（Seattle Genetics, Inc.）（それらは参照により本明細書に組み入れられる）に開示されており、vcMMAE薬物リンカー部分は、それらの中に開示されているものと類似の方法を用いて、システインの箇所で二量体タンパク質と結合される。

【 0 3 4 3 】

一態様において、薬物リンカー部分はmcMMAFである。mcMMAF薬物リンカー部分および結合体化の方法は、US7498298号、US 11/833,954号およびWO2005081711号（Seattle Genetics, Inc.）（それらは参照により本明細書に組み入れられる）に開示されており、mcMMAF薬物リンカー部分は、それらの中に開示されているものと類似の方法を用いて、システインの箇所で二量体タンパク質と結合される。

【 0 3 4 4 】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、例えば二重特異性抗体を放射性同位体に対して結合体化させることを可能にするキレート剤リンカー、例えばチウキセタンと結びつけられる。

【 0 3 4 5 】

一態様において、二量体タンパク質は、毒素またはペイロード（例えば、薬物；中性pHよりも低いpHにおいて最適な機能を有するもの）に対して結合体化されている。

【 0 3 4 6 】

一態様において、二量体タンパク質の第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドの両方が、同じ1つまたは複数の治療用部分に対して直接的または間接的にカップリングされる。

【 0 3 4 7 】

一態様において、二量体タンパク質の第一のポリペプチドまたは第二のポリペプチドのみが、1つまたは複数の治療用部分に対して直接的または間接的にカップリングされる。

【 0 3 4 8 】

一態様において、二量体タンパク質の第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドは、複数の異なる治療用部分に対して直接的または間接的にカップリングされる。例えば、二量体タンパク質が二重特異性抗体であって、2つの異なる単一特異性抗体、例えば第1および第2の抗体の制御されたFabアーム交換によって調製される態様において、そのような二重特異性抗体は、異なる治療用部分と結合体化または会合している単一特異性抗体を用いることによって得ることができる。

【 0 3 4 9 】

オリゴマー

本発明は、一部には、免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域およびCH3領域ならびに任意でヒンジ領域を含む二量体タンパク質が、オリゴマー（例えば六量体）を、標的分子と結合した場合だけではなく、溶液中でも形成し得るという発見に基づく。オリゴマー形

10

20

30

40

50

成は隣接Fc領域の非共有結合性会合を介して起こり、実施例に記載しているように、特に、E345、E430およびS440における変異を有する抗体で観察されている。

【0350】

一局面において、本発明は、それぞれが本明細書に記載された任意の局面または態様の、非共有結合的に会合した少なくとも2つの二量体タンパク質を含むオリゴマーに関する。

【0351】

一態様において、本発明は、それぞれが前述の局面または態様のいずれか1つによる、非共有結合的に会合した6つの二量体タンパク質を含む六量体を提供する。一態様において、六量体の少なくとも1つ、例えば少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは6つの二量体タンパク質は、抗体である。

10

【0352】

一態様において、本発明は、非共有結合的に会合した6つの二量体タンパク質を含むオリゴマーであって、該二量体タンパク質のうち少なくとも1つが本発明の任意の局面または態様の二量体タンパク質であり、該二量体タンパク質のうち少なくとも1つが、少なくともCH2領域およびCH3領域ならびに任意でヒンジ領域を含むFcドメインを含む抗体である、オリゴマーを提供する。

【0353】

一態様において、本発明は、非共有結合的に会合した6つの分子（例えば二量体タンパク質）を含む六量体であって、該分子のうち少なくとも1つが前述の任意の局面または態様の二量体タンパク質であり、該分子のうち少なくとも1つが、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置の少なくとも1つがそれぞれE、EおよびSである、少なくともCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含むFcドメインを含む抗体である、六量体を提供する。一態様において、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり、モノクローナル抗体は任意で、以下の項で「第2の抗体」と表記される公知の抗体から選択される。

20

【0354】

組成物

本発明はまた、任意で、前述の任意の局面または態様のオリゴマー（例えば六量体）の形態にある、1つまたは複数の本発明の二量体タンパク質を含む組成物にも関する。本発明の組成物は、本発明の二量体タンパク質および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物であってよい。薬学的組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されたものなどの従来の手法に従って、薬学的に許容される担体または希釈剤、ならびに他の任意の公知の補助剤および添加剤とともに製剤化できる。

30

【0355】

本発明の組成物は、本発明の任意の局面または態様の二量体タンパク質、1つまたは複数の抗体、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物であってよい。

【0356】

特定の態様において、組成物は、本発明の任意の局面または態様の第1の二量体タンパク質および本発明の任意の局面または態様の第2の二量体タンパク質、ならびに薬学的に許容される担体を含む。薬学的に許容される担体または希釈剤、ならびに他の任意の公知の補助剤および添加剤は、本発明の二量体タンパク質および選択される投与様式に適しているべきである。担体および薬学的組成物の他の構成成分に関する適性は、抗体結合時に、本発明の二量体タンパク質または薬学的組成物の所望の生物学的特性に及ぼす重大な負の影響がないこと（例えば、実質的な影響に満たない（相対的障害が10%またはそれ未満、相対的障害が5%またはそれ未満など））に基づいて判定される。

40

【0357】

また、本発明の薬学的組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、界面活性剤（例えば、非イオン性界面活性剤、例えばTween-20またはTween-80など）、安定化剤（例えば、糖、

50

糖アルコール、例えばソルビトールおよびマンニトールなど、またはタンパク質非含有アミノ酸)、保存料、組織固定剤、溶解補助剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適した他の材料を含んでもよい。

【0358】

薬学的に許容される担体には、本発明の二量体タンパク質と生理的に適合性のある、任意のおよびすべての適した溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが含まれる。

【0359】

本発明の薬学的組成物中に使用し得る適した水性および非水性担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油、およびゴマ油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル、ならびに/またはさまざまな緩衝液が含まれる。他の担体も薬学の技術分野では周知である。

【0360】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散系、滅菌注射用溶液または分散系の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。薬学活性のある物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は、当技術分野において公知である。従来の任意の媒質または作用物質が二量体タンパク質と不適合性でない限り、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。

【0361】

適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散系の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および表面活性剤の使用によって、維持できる。

【0362】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば、(1)水溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2)油溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸バルミテート、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど；および(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸なども含み得る。

【0363】

本発明の薬学的組成物はまた、組成物中に、糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロールなど、または塩化ナトリウムといった等張剤も含み得る。

【0364】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を増強し得る、選択される投与経路にとって適切な1つまたは複数の補助剤、例えば、保存料、湿潤剤、乳化剤、分散剤、保存料または緩衝剤も含有し得る。本発明の二量体タンパク質を、例えばインプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル封入送達システムを含む制御放出剤のように、化合物を急速放出から保護すると考えられる担体を用いて調製してもよい。そのような担体には、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリル、生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの単独のもの、またはワックスもしくは当技術分野において周知の他の材料を伴ったものが含まれ得る。そのような製剤の調製のための方法は、当業者に一般に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0365】

一態様において、本発明の二量体タンパク質は、インピボでの適正な分布が確実に得られるように製剤化できる。非経口的投与のための薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散系、および滅菌注射用溶液または分散系の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。薬学活性のある物質のためのそのような媒質および作用物質の使用は、当技術分野において公知である。従来の任意の媒質または作用物質が二量体タンパク質と不適合性でない限り、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用を想定している。補足的な活性化化合物を組成物中に組み入れることもできる。

【0366】

注射用の薬学的組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適する他の秩序立った構造として製剤化できる。担体が、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適した混合物、植物油、例えばオリーブ油、および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルを含有する水性溶媒または非水性溶媒または分散媒であってもよい。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散系の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および表面活性剤の使用によって、維持できる。多くの場合には、糖、多価アルコール、例えばグリセロール、マンニトール、ソルビトールなど、または塩化ナトリウムといった等張剤を含めることが好ましいと考えられる。注射用組成物の長期的な吸収は、組成物中に吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによって成し遂げられる。滅菌注射用溶液は、必要に応じて例えば上記に列挙したような成分の1つまたは組み合わせとともに、必要な量の二量体タンパク質を適切な溶媒中に組み入れ、その後に滅菌精密濾過を行うことによって調製できる。一般に、分散系は、基本的な分散媒、および例えば上記に列挙したもののからの必要な他の成分を含有する滅菌媒体中に二量体タンパク質を組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例には、有効成分に任意の別の所望の成分が加わったものの粉末が、あらかじめ滅菌濾過したそれらの溶液から得られる、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）がある。

【0367】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて例えば上記に列挙したような成分の1つまたは組み合わせとともに、必要な量の二量体タンパク質を適切な溶媒中に組み入れ、その後に滅菌精密濾過を行うことによって調製できる。一般に、分散系は、基本的な分散媒、および例えば上記に列挙したもののからの必要な他の成分を含有する滅菌媒体中に二量体タンパク質を組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例には、有効成分に任意の別の所望の成分が加わったものの粉末が、あらかじめ滅菌濾過したそれらの溶液から得られる、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）がある。

【0368】

pH

本発明の組成物は、pHを制御し、それにより、存在する二量体タンパク質のオリゴマー形成状態を制御するための、適した緩衝系を含むことができる。例えば、6.4またはそれ未満のpH、例えばpH 5.0などでは、本発明の二量体タンパク質は典型的には主として単量体形態、すなわち単一の二量体タンパク質の状態にあり、一方、6.4を上回るpH、例えばpH 6.8では、二量体タンパク質は主としてオリゴマー形態（例えば六量体形態）にある。二量体タンパク質の六量体形態は、互いに非共有結合的に会合して六量体形態を形成した6つの二量体タンパク質で構成される。「単量体形態」という用語は、本発明の二量体タンパク質の文脈において、互いに非共有結合的に会合していない二量体タンパク質で構成される、単一の個々の二量体タンパク質のことを指す。実施例31は、pHを調整することによってこのことがどのように観察されるかを記載している。

【0369】

一態様において、組成物は、水性緩衝液である薬学的に許容される担体を含む。

【0370】

一態様において、水性緩衝液のpHは少なくとも約6.5、例えば6.5～約9.0、例えば約7.0～約8.0、例えば約7.4である。pHをこの範囲内および/または生理的pH付近に維持するのに適した緩衝系には、リン酸緩衝系が含まれる。したがって、一態様において、水性緩衝液はリン酸緩衝系である。一態様において、二量体タンパク質は、pHが約6.8のリン酸緩衝液中で、主としてオリゴマー形態（例えば六量体形態など）にある、

【0371】

一態様において、水性緩衝液のpHはpH 6.5未満、例えば約4.0～6.4、例えば約5.0～約6.0である。pHをこの範囲内に維持するのに適した緩衝系には、クエン酸、酢酸、ヒスチジンおよび/またはグリシンをベースとする緩衝系が含まれる。したがって、一態様において、緩衝系は、酢酸、ヒスチジン、グリシン、クエン酸、ニコチン酸、乳酸、および/またはコハク酸をベースとする緩衝系である。そのような緩衝系は、緩衝系の組み合わせであってもよい。一態様において、二量体タンパク質は、6.0未満（例えば約5.0など）のpHで主として単量体形態にあり、すなわち、単一の二量体タンパク質である。

【0372】

実施例31に示すように、本発明の二量体タンパク質のオリゴマー形成は、pHによって制御し得る可逆的過程である。このことは、精製カラム、経層流濾過、全量濾過および/またはナノ濾過デバイスなどの凝固を、抗体などの最終生成物の活性を損なうことなく、pHを低下させることによって回避し得る精製段階のような、二量体タンパク質の製造中の処理における用途には有用な可能性があると考えられる。その上、精製中のpHを6.8未満、例えば、5.0および5.5に低下させることにより、主として単量体形態にある二量体タンパク質としての精製収量を向上させることができ、それにより、実施例32によって実証されているように、二量体タンパク質の六量体形態よりも凝固の可能性を低くできる。その上、精製中のpHを6.8未満に低下させることにより、弱い陽イオン交換樹脂を用いるといったクロマトグラフィーによる非特異的凝集物の除去も可能になる。そうして、ひとたび二量体タンパク質が6.8未満のpHで精製されたところで、溶液のpHをpH 6.8前後に高めることによって、オリゴマー形態（例えば六量体形態）を回復させることができる。

【0373】

混合物

いくつかの局面において、本発明は、二量体タンパク質および第2の分子を含む組成物を提供し、ここで第2の分子も、それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含む第1および第2のポリペプチドを含む。したがって、二量体タンパク質は、本発明の任意の局面または態様の二量体タンパク質、例えば親二量体タンパク質の二量体タンパク質、例えば親二量体タンパク質の変異型二量体タンパク質などであると解釈されるべきである。

【0374】

組成物中の二量体タンパク質および第2の分子の相対量は、形成されるオリゴマー/六量体における種々の各二量体タンパク質の単位の平均数をモジュレートするように調整し得ることが有利である。このことにより、ひいては、二量体タンパク質および第2の分子の1つまたは複数が標的と結合する場合の、エフェクター機能および/または標的結合特性を最適化するための手段がもたらされる。

【0375】

二量体タンパク質と第2の分子の混合物を含む組成物の具体的な局面および態様は、以下に記載されている。本発明のあらゆる種類の二量体タンパク質およびあらゆる種類の第2のFc含有性分子、例えば、リガンド結合領域を有するFc融合タンパク質に適用可能であるが、抗体分子を両方の構成成分として特に想定している。

【0376】

一局面において、本発明の組成物は、本発明の任意の局面または態様の第1の二量体タンパク質、本発明の任意の局面または態様の第2の二量体タンパク質、および薬学的に許

容される担体を含む。

【 0 3 7 7 】

一局面において、第2の分子は、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸の少なくとも1つが、ネイティブ性IgG1重鎖においてこの位置に正常に存在するものであるものである。例えば、第2の分子の重鎖ポリペプチドは、E345、E430およびS440に対応する位置のそれぞれにそれぞれE、EおよびSを含み得る。この局面によれば、第2の分子はそれ故に、例えば、E345、E430およびS440の3つすべてにおいてアミノ酸置換を有しない、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgEもしくはIgM抗体のネイティブ性Fc領域配列、または特に少なくともIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4 Fc配列を含み得る。

10

【 0 3 7 8 】

一態様において、第2の分子は抗体であり、特に、既に臨床または前臨床に用いられている周知の抗体、適した安全性プロフィールを有する抗体である。さらなる態様において、前記第2の抗体は、適した安全性プロフィールを有するが、十分に有効でなくてもよい。

【 0 3 7 9 】

一態様においては、二量体タンパク質も抗体であり、このため組成物は第1の抗体および第2の抗体を含み、ここで第1の抗体のみが本発明の二量体タンパク質である。エフェクター機能を増大させることのできる変異を含む第1の抗体と、そのような変異を含まない第2の抗体の組み合わせは、実施例17に示すように、エフェクター機能の増大をもたらす。このため、理論には拘束されないが、例えば、この方法を用いて、安全であることは証明されているがそれ単独では特定の用途に十分に有効ではない治療用抗体を第2の抗体として、本発明の二量体タンパク質と組み合わせ、それにより、有効である組み合わせを生じさせることができると考えられる。

20

【 0 3 8 0 】

適切な第2の抗体の例には、以下からなる群より選択される任意のものが非限定的に含まれる：(90Y)クリバツズマブテトラキセタン；(90Y)タカツズマブテトラキセタン；(99mTc)ファノレソマブ；(99mTc)ノフェツモマブメルペンタン；(99mTc)ピンツモマブ；3F8；8H9；アバゴボマブ；アバタセプト；アブシキシマブ；アクトクスマブ；アダリムマブ；アデカツムマブ；アフエリモマブ；アフリベルセプト；アフツズマブ；アラシズマブペゴール；アルビグルチド；ALD518；アレファセプト；アレムツズマブ；アリロクマブ；アルツモマブ；アルツモマブペンテテート；アルビルセプトストロクス；アマツキシマブ；AMG714 / HuMax-IL15；アナツモマブマフェナトクス；アンルキンズマブ (= IMA-638)；アポリズマブ；アルシツモマブ；アセリズマブ；アタシセプト；アチヌマブ；アトリズマブ (= トシリズマブ)；アトロリムマブ；バミネルセプト；バピネオズマブ；バシリキシマブ；バピツキシマブ；ベクツモマブ；ベラタセプト；ベリムマブ；ベンラリズマブ；ベルチリムマブ；ベシレソマブ；ベカシズマブ；ベズロトクスマブ；ビシロマブ；ピファルセプト；ピバツズマブ；ピバツズマブメルタンシン；プリナツモマブ；プロソズマブ；ブレンツキシマブベドチン；ブリアキヌマブ；プリオバセプト；プロダルマブ；カナキヌマブ；カンツズマブメルタンシン；カンツズマブラブタンシン；カブラシズマブズマブ；カプロマブ；カプロマブペンデチド；カルルマブ；カツマクソマブ；CC49；セデリズマブ；セルトリズマブペゴール；セツキシマブ；Ch.14.18；シタツズマブボガトクス；シクスツムマブ；クラザキズマブ；クレノリキシマブ；クリバツズマブテトラキセタン；コナツムマブ；コンベルセプト；CR6261；クレネズマブ；ダセツズマブ；ダクリズマブ；ダランテルセプト；ダロツズマブ；ダラツムマブ；デムシズマブ；デノスマブ；デツモマブ；ドルリモマブアリトクス；ドロジツマブ；デュラグルチド；エクロメキシマブ；エクリズマブ；エドバコマブ；エドレコロマブ；エファリズマブ；エフングマブ；エロツズマブ；エルシリモマブ；エナバツズマブ；エンリモマブ；エンリモマブペゴール；エノキズマブ；エンシツキシマブ；エピツモマブ；エピツモマブシツキセタン；エラプズマブ；エルリズマブ；エルツマクソマブ；エタネルセプト；エタラシズマブ；エトロリズマブ；エ

30

40

50

キシビビルマブ；ファノレソマブ；ファラリモマブ；ファレツズマブ；ファシヌマブ；FB
 TA05；フェルビズマブ；フェザキヌマブ；フィクラツズマブ；フィジツムマブ；フランボ
 ルマブ；フォントリズマブ；フォルアルマブ；フォラビルマブ；フレソリムマブ；フルヌマ
 マブ；ガリキシマブ；ガニツマブ；ガンテネルマブ；ガビリモマブ；ゲムツズマブ；ゲム
 ツズマブオゾガミシン；ゲボキズマブ；ギレンツキシマブ；グレムバツムマブ；グレムバ
 ツムマブベドチン；ゴリムマブ；ゴミリキシマブ；GS6624；抗CD74抗体；WO 2011/110642
 号に開示されているような抗cMet抗体；WO 2011/147986号またはWO 2011/147982号に開示
 されているような抗Her2抗体；WO 2004/058797号に開示されているような抗IL8抗体；WO
 2004/045512号に開示されているような抗TAC抗体；WO 2010/066803号またはWO 2011/1577
 41号に開示されているような抗組織因子（TF）抗体；イバリズマブ；イブリツモマブチウ
 キセタン；イクルクマブ；イゴボマブ；イムシロマブ；インクラクマブ；インダツキシマ
 ブラブタンシン；インフリキシマブ；イノリモマブ；イノツズマブオゾガミシン；インテ
 ツムマブ；ヨード（124I）ギレンツキシマブ；イピリムマブ；イラツムマブ；イトリズマ
 ブ；イクセキズマブ；ケリキシマブ；ラベツズマブ；レブリキズマブ；レマレソマブ；レ
 ネルセプト；レルデリムマブ；レキサツムマブ；リビビルマブ；リンツズマブ；ロルボツ
 ズマブメルタンシン；ルカツムマブ；ルミリキシマブ；マバツムマブ；マスリモマブ；マ
 ツズマブ；マブリリムマブ；メボリズマブ；メテリムマブ；ミラツズマブ；ミンレツモマ
 ブ；ミロコセプト；ミツモマブ；モガムリズマブ；モロリムマブ；モタビズマブ；モキセ
 ツモマブ；パストトクス；ムロモナブ-CD3；ナコロマブタフェナトクス；ナミルマブ；ナ
 プツモマブエスタフェナトクス；ナルナツマブ；ナタリズマブ；ネバクマブ；ネシツムマ
 ブ；ネレリモマブ；ニモツズマブ；ニボルマブ；ノフェツモマブ；メルペンタン；オビニ
 ツズマブ；オカラツズマブ；オクレリズマブ；オヅリモマブ；オフアツムマブ；オララツ
 マブ；オロキズマブ；オマリズマブ；オナルツズマブ；オネルセプト；オボルツズマブモ
 ナトクス；オレゴボマブ；オテリキシズマブ；オキセルマブ；オゾラリズマブ；パギバキ
 シマブ；パリビズマブ；パニツムマブ；パノバクマブ；パスコリズマブ；パテクリズマブ
 ；パトリツマブ；ペグスネルセプト；ペムツモマブ；ペルツズマブ；ペキセリズマブ；ピ
 ンツモマブ；プラクルマブ；ポネズマブ；プリリキシマブ；プリツムマブ；PRO 140；キ
 リズマブ；ラコツモマブ；ラドレツマブ；ラフィビルマブ；ラムシルマブ；ラニビズマブ
 ；ラキシバクマブ；レガビルマブ；レスリズマブ；RG1507 / HuMax- IGF1R；RG1512 / HuMax
 -pセレクチン；リロナセプト；リロツムマブ；リツキシマブ；ロバツムマブ；ロレツマブ
 ；ロモソズマブ；ロンタリズマブ；ロベリズマブ；ルブリズマブ；サマリズマブ；サリル
 マブ；サツモマブ；サツモマブペンデチド；セクキヌマブ；セビルマブ；シブロッツズマブ
 ；シファリムマブ；シルツキシマブ；シブリズマブ；シルクマブ；ソラネズマブ；ソリト
 マブ；ソネブシズマブ；ソソツズマブ；ソタテルセプト；スタムルマブ；スレソマブ；ス
 ビズマブ；タバルマブ；タカツズマブテトラキセタン；タドシズマブ；タリズマブ；タネ
 ズマブ；タブリツモマブパブトクス；テフィバズマブ；テリモマブアリトクス；テナツモ
 マブ；テネリキシマブ；テブリズマブ；テプロツムマブ；TGN1412；チシリムマブ（＝ト
 レメリムマブ）；チガツズマブ；TNX-650；トシリズマブ（＝アトリズマブ）；トラリズ
 マブ；トラブセル；トシツモマブ；トラロキヌマブ；トラスツズマブ；トラスツズマブエ
 ムタンシン；TRBS07；トレバナニブ；トレガリズマブ；トレメリムマブ；ツコツズマブセル
 モロイキン；ツビルマブ；ウブリツキシマブ；ウレルマブ；ウルトキサズマブ；ウステ
 キニマブ；ババリキシマブ；バテリズマブ；ベドリズマブ；ベルツズマブ；ベパリモマブ
 ；ベセンクマブ；ビシリズマブ；ボロシキシマブ；ボルセツズマブマフォドチン；ボツム
 マブ；ザルツムマブ；ザノリムマブ；ジラリムマブ；およびゾリモマブアリトクス。

【0381】

一局面において、第2の分子は本発明の第2の二量体タンパク質である。この局面による
 組成物はしたがって、上記のように、それぞれが本発明のいずれかの局面または態様の、
 2種以上の異なる二量体タンパク質の混合物を含む。典型的には、続いて、正しいpH条件
 および／または標的結合条件下で、2種以上の異なる二量体タンパク質を含む六量体を、
 組成物中、特に水溶液中または緩衝液中で形成させることができる。本発明の第1および

10

20

30

40

50

第2の二量体タンパク質は、実施例3に示すように、野生型または天然型のいずれかの二量体タンパク質と比較して、互いにオリゴマー化する選好性を有すると考えられる。

【0382】

一態様において、組成物は第1の二量体タンパク質および第2の二量体タンパク質を含み、任意で、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0383】

一態様において、本発明は、第1および第2の二量体タンパク質を含む組成物であって、第1および第2の二量体タンパク質が両方とも第1および第2のポリペプチドを含み、前記第1および第2の二量体タンパク質の前記第1および/または第2の(例えば両方の)ポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸がEではなく、かつ、ヒトIgG1重鎖における位置に対応するS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸が、各位置についてそれぞれ、Y、W、KまたはRである;Yではない;DでもEでもない;Tではない;Eではない;Nではない;Qではない;Iではない;およびSではない、組成物に関し得る。第1および第2の二量体タンパク質は、本発明の任意の二量体タンパク質であってよい。

10

【0384】

一態様において、第1および第2の二量体タンパク質の一方または両方は重鎖ポリペプチドを含み、ここで一方または両方(例えばそれぞれ)のポリペプチドに関して、E345に対応する位置にあるアミノ酸は、例えば、R、Q、N、K、Y、A、C、D、F、G、H、I、L、M、P、S、T、VおよびWからなる群より、例えばR、Q、N、KおよびYからなる群より別個に選択される。

20

【0385】

一態様において、第1および第2の二量体タンパク質の一方または両方は重鎖ポリペプチドを含み、ここで一方または両方(例えばそれぞれ)のポリペプチドに関して、E430に対応する位置にあるアミノ酸は、例えば、G、T、S、F、H、A、C、D、I、K、L、M、N、P、Q、R、V、WおよびYからなる群より、例えばG、T、S、FおよびHからなる群より別個に選択される。

【0386】

一態様において、第1および第2の二量体タンパク質の一方または両方は重鎖ポリペプチドを含み、ここで一方または両方(例えばそれぞれ)のポリペプチドに関して、ヒトIgG1重鎖における位置に対応する、S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置の少なくとも1つにおけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Y、R、KまたはWである;Yではない;DでもEでもない;Tではない;Eではない;Nではない;Qではない;Iではない;およびSではない。

30

【0387】

一態様において、前記第1および/または第2の(例えば両方の)二量体タンパク質は重鎖ポリペプチドを含み、ここで一方または両方(例えばそれぞれ)のポリペプチドに関して、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、GおよびYである。

40

【0388】

一態様において、前記第1および/または第2の二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれK、GおよびYである。

【0389】

一態様において、前記第1および/または第2の二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、SおよびYである。

【0390】

一態様において、前記第1および/または第2の二量体タンパク質の前記第1および/ま

50

たは第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、GおよびWである。

【0391】

一態様において、前記第1および/または第2の二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびY436に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、GおよびIである。

【0392】

別の態様において、第1および第2の二量体タンパク質の一方または両方は重鎖ポリペプチドを含み、ここでE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR ; G ; およびYまたはWであり、Y436、D / E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254の1つまたは少なくとも1つは、それぞれ、Yではない ; DでもEでもない ; Tではない ; Eではない ; Nではない ; Qではない ; Iではない ; およびSではない。

【0393】

一態様において、前記第1または第2の二量体タンパク質のいずれかは、指示されたアミノ酸を前記第1および第2のポリペプチドの両方に含み、他方の二量体タンパク質は指示されたアミノ酸を前記第1または第2のポリペプチドのいずれかのみを含む。

【0394】

一態様において、前記第1および第2の二量体タンパク質は両方とも、指示されたアミノ酸を前記第1および第2のポリペプチドの両方に含む。

【0395】

いくつかの態様において、重鎖ポリペプチドにおけるある特定の位置にあるアミノ酸は、2つの二量体タンパク質の非共有結合性会合の強さまたは特異性を調整するために、第1および第2の二量体タンパク質間で異なる。これは、例えば、上記のように、K439、S440、K447、K448、および/またはK449に対応する位置に特定のアミノ酸を有する第1および/または第2の二量体タンパク質を用いることによって達成できる。

【0396】

一態様において、第1の二量体タンパク質のポリペプチドは、Kではない、K439に対応する位置におけるアミノ酸を含み、第2の二量体タンパク質のポリペプチドは、Sではない、S440に対応する位置におけるアミノ酸を含み、ただし、S440におけるアミノ酸がYでもWでもないことを条件とする。例えば、第1の二量体タンパク質において、K439に対応する位置におけるアミノ酸はDまたはEであってよく、かつ、および第2の二量体タンパク質において、S440に対応する位置におけるアミノ酸は、K、HまたはR（例えばKまたはR）であってよい。同様の戦略を、K447、448および449に対応する位置におけるアミノ酸の組み合わせに対して用いることもできる。表2は、併せて用いようとする第1の二量体タンパク質および第2の二量体タンパク質におけるこれらの位置に関する例示的なアミノ酸を、「+」記号によって区分けして示している。これらの局面および態様のいずれの1つにおいても、第1および第2の二量体タンパク質の一方または両方が抗体であってよい（例えば、それぞれAb1およびAb2）。

【0397】

（表2）2つの二量体タンパク質の中にさらに存在し得る例示的な位置およびアミノ酸（例えば、Ab1 + Ab2）

アミノ酸の対(IgG1)	例示的な置換	好ましい置換
K439 + S440	439DER + 440DEKR	439E + 440K
K447 + K447/448	447DE + 447KRH/448P	447E + 447/448P
K447 + K447/448/449	447DE + 447KRH/448KRH/449P	447E + 447K/448K/449P

【0398】

さらなる態様において、前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK439に対応する位置にあるアミノ酸はEまたはD、任意でEであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるS440に対応する位置にあるアミノ酸はKまたはR、任意でKである。

【0399】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、K、Q、NまたはY；G、S、T、FまたはH；DまたはE；およびYまたはWであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、K、Q、NまたはY；G、S、T、FまたはH；およびKまたはRである。さらなる態様において、第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるY436に対応する位置にあるアミノ酸はIである。

10

【0400】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK439に対応する位置にあるアミノ酸はEまたはD、任意でEであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるS440に対応する位置にあるアミノ酸はKまたはR、任意でKであり、およびヒトIgG1重鎖における位置に対応するY436、D／E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置における少なくとも1つのアミノ酸は、それぞれ、Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない。

20

【0401】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、G、EおよびYであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、G、KおよびKである。

【0402】

30

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれR、G、EおよびYであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸はそれぞれR、GおよびKである。

【0403】

代替的な態様において、第1の二量体タンパク質の第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1ヒト重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸は、それぞれK、GおよびYであるか；または代替的にそれぞれR、GおよびWであるか；または代替的にそれぞれR、GおよびKであり、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびY436に対応する位置におけるアミノ酸は、それぞれR、GおよびIである。その上、第2の二量体タンパク質の第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置にあるアミノ酸はそれぞれK、GおよびKであるか；または代替的にそれぞれR、SおよびKであるか；または代替的にそれぞれR、GおよびRであるか；または代替的にそれぞれR、SおよびRである。

40

【0404】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、K439およびS440に対応する位置にあるアミノ酸はそれぞれR、G、EおよびYであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および／または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、Y436およびS440に

50

対応する位置にあるアミノ酸はそれぞれR、G、IおよびKである。

【0405】

さらなる態様において、前記第1の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK447に対応する位置にあるアミノ酸はDまたはEであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK447に対応する位置にあるアミノ酸はK、RまたはHであり、ヒトIgG1重鎖における448に対応する位置にあるアミノ酸はPである。

【0406】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK447に対応する位置にあるアミノ酸はDまたはEであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK447に対応する位置にあるアミノ酸はK、RまたはHであり、ヒトIgG1重鎖における448に対応する位置にあるアミノ酸はK、RまたはHであり、ヒトIgG1重鎖における449に対応する位置にあるアミノ酸はPである。

【0407】

一態様において、第1の二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK439およびK447に対応する位置にあるアミノ酸はそれぞれ、DまたはE；およびDまたはEであり、前記第2の二量体タンパク質の前記第1および第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるS440、K447および448に対応する位置にあるアミノ酸はそれぞれ、KまたはR；K、RまたはH；およびPである。

【0408】

一態様において、前記第1または第2の二量体タンパク質のいずれかは、指示されたアミノ酸を前記第1および第2のポリペプチドの両方に含み、他方の二量体タンパク質は指示されたアミノ酸を前記第1または第2のポリペプチドのいずれかのみを含む。

【0409】

一態様において、前記第1および第2の二量体タンパク質の両方は、指示されたアミノ酸を前記第1および第2のポリペプチドの両方に含む。さらなる態様において、第1または第2の二量体タンパク質は抗体であってよく、他方の二量体タンパク質は、本明細書に記載するような融合タンパク質または結合体であってよい。

【0410】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、S440およびK447に対応するアミノ酸位置はそれぞれR、G、YおよびD/Eであり、前記第2の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、S440、K447および448に対応するアミノ酸位置はそれぞれR、G、Y、K/R/HおよびPであるか、またはその反対である。

【0411】

一態様において、前記第1の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、S440およびK447に対応するアミノ酸位置はそれぞれR、G、YおよびD/Eであり、前記第2の二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、S440、K447、448および449に対応するアミノ酸位置はそれぞれR、G、Y、K/R/H、K/R/HおよびPであるか、またはその反対である。

【0412】

特定の態様において、第1および第2の二量体タンパク質を含む組成物で、前記第1および第2の二量体タンパク質の第1および第2のポリペプチドの両方は、指示されたアミノ酸を特定の位置に含む。

【0413】

一態様において、前記第1および第2の二量体タンパク質の少なくとも1つは抗体である。

10

20

30

40

50

【0414】

一態様において、第1および第2の二量体タンパク質の両方は抗体である。

【0415】

一態様において、前記二量体タンパク質の前記第1および/または第2のもの、例えば少なくとも1つはヘテロ二量体タンパク質、例えば二重特異性抗体である。それは、本明細書に記載の任意のヘテロ二量体タンパク質であってよい。

【0416】

一態様において、前記第1および第2の抗体は、同じ抗原の同じエピトープと結合する。

【0417】

一態様において、前記第1および第2の抗体は、同じ重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含む。

10

【0418】

一態様において、前記第1および第2の抗体は、異なる抗原と結合するか、または同じ抗原の異なるエピトープと結合する。

【0419】

別の態様において、前記二量体タンパク質の前記第1および/または第2のもの、例えば少なくとも1つは、融合タンパク質である。

【0420】

前述の局面または態様の組成物の二量体タンパク質は、特定の標的と結合する結合領域を含み得る。

20

【0421】

一態様において、組成物は、本発明の任意の局面または態様の少なくとも1つのさらなる二量体タンパク質、例えば3つもしくは6つ、または例えば4つ、5つ、7つ、8つ、9つもしくはそれより多くの二量体タンパク質を含む。

【0422】

別の態様において、前記二量体タンパク質の前記第1および/または第2のもの、例えば少なくとも1つは、Fc断片である。

【0423】

一態様において、組成物は、本発明の任意の局面または態様の、2種より多くの、例えば3種、4種、5種または6種の異なる二量体タンパク質を含む。

30

【0424】

特定の態様において、組成物は1つまたは複数の二量体タンパク質および1つのFc断片を含み、ここで前記1つまたは複数の二量体タンパク質は第1および第2のポリペプチドを含み、第1または第2のポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸はEではなく、かつ、ヒトIgG1重鎖における位置に対応する、S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Y、W、KまたはRである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではなく；かつ、前記Fc断片は第1および第2のポリペプチドを含み、ここで前記第1および第2のポリペプチドの両方において、ヒトIgG1重鎖におけるE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸はEではなく、かつ、ヒトIgG1重鎖における位置に対応する、S440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸は、各位置についてそれぞれ、Y、W、KまたはRである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない。さらなる態様において、1つまたは複数の二量体タンパク質および/またはFc断片は、融合タンパク質または結合体であってよい。

40

【0425】

一態様において、組成物は本発明の任意の局面または態様の2つの二量体タンパク質を含み、ここで前記第1の二量体タンパク質は第1のプロドラッグと連結しており、前記第2の二量体タンパク質は第2のプロドラッグと連結している。例えば、第1および第2のプロ

50

ドラッグの一方は、他方を活性化できる。

【0426】

一態様においては、第1および第2の二量体タンパク質の一方のみが標的結合領域を含む。これは例えば、「Fcのみ」の二量体タンパク質が治療用または診断用化合物と結合体化されている薬学的組成物を、標的に対する結合特異性を有する二量体タンパク質と混合する場合に用いることができる。

【0427】

一態様においては、第1および第2の二量体タンパク質の両方が標的結合領域を含む。第1および第2の二量体タンパク質がヘテロ二量体タンパク質である場合、それらは同じ標的上の異なるエピトープ、または異なる標的と結合できる。そのような結合に関しては任意の組み合わせが予期される。各二量体タンパク質に関して異なるエピトープおよび/または標的を選択することにより、六量体形成が、エピトープまたは標的の両方を発現する細胞、細菌またはビリオン上で主として起こるように最適化できる。これにより、特定の種類の細胞に対する免疫応答を導く機序がもたらされる。さらに、同じ標的分子上の異なるエピトープと結合する二量体タンパク質の混合物により、同様の効果をポリクローナル抗体として得ることができる。

【0428】

いくつかの態様において、第1および第2の二量体タンパク質の少なくとも1つは、本明細書に定義するような抗体である。

【0429】

一態様において、第1および第2の二量体タンパク質の両方は抗体であり、第1および第2の抗体に相当する。一態様において、抗体は同じ抗原の同じエピトープと結合する。任意で、2つの抗体の抗原結合領域は同一であり、すなわち、同じ重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含む。

【0430】

別の態様において、第1および第2の抗体は、異なる抗原と結合するか、または同じ抗原の異なるエピトープと結合する。

【0431】

別の態様において、第1および第2の抗体は、異なる細胞上の異なる抗原と結合する。

【0432】

一態様において、第1および第2の抗体はそれぞれ、単一特異性、二重特異性および多重特異性抗体からなる群より選択され得るが、これらには限定されない。さらに、上記の局面または態様の任意のものにおいて、第1および第2の二量体タンパク質の少なくとも1つは、例えば、上記に列記した「第2の抗体」から選択される、臨床または前臨床に用いられている公知の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む抗体であってよい。

【0433】

組成物の非限定的な例には、

a) 結合領域を含む第1の二量体タンパク質；

b) 第1および第2の二量体タンパク質（該第1および第2の二量体タンパク質は、同じ標的上の異なるエピトープまたは異なる標的と結合する）；

c) 本発明の第1の二量体タンパク質（該第1の二量体タンパク質は、ヒトIgG1重鎖におけるK439に対応する位置にKではないアミノ酸を含む）、および本発明の第2の二量体タンパク質（ヒトIgG1重鎖におけるS440に対応する位置にSでもYでもWでもないアミノ酸を含む）ここで、任意で、第1の二量体タンパク質では位置K439におけるアミノ酸がEであり、第2の二量体タンパク質では位置S440におけるアミノ酸がKである；

d) 本発明の第1の二量体タンパク質および第2の二量体タンパク質（第2の二量体タンパク質においてヒトIgG1重鎖のE345およびE430に対応する位置にあるアミノ酸は、Eではない）；

e) 本発明の第1の二量体タンパク質および第2の二量体タンパク質（例えば第2の抗体、ここで第2の二量体タンパク質においてヒトIgG1重鎖のE345またはE430に対応する位置に

10

20

30

40

50

あるアミノ酸はEではない) ;

f) 第1の二量体タンパク質および第2の二量体タンパク質(第1または第2の二量体タンパク質のいずれかは、該第1または第2の二量体タンパク質の1つまたは複数のエフェクター機能および/または薬物動態プロファイルをモジュレートするアミノ酸変異を含む)が含まれる。

【0434】

また、第1および第2の二量体タンパク質が、a)~e)に記載された局面の組み合わせを含んでもよい。例えば、第1および第2の二量体タンパク質は、特に、b)およびc)に記載された特徴の両方を含むことができる。

【0435】

一態様において、第1および第2の二量体タンパク質の組み合わせが、その標的を発現する細胞またはビリオン上の標的と結合すると、特異性が増大する。

【0436】

上記の局面または態様の任意のものにおいて、組成物は、本発明の少なくとも1つのさらなる二量体タンパク質を含み得る。例えば、組成物は、それぞれが本発明の1つの局面または態様の、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、またはそれより多くの二量体タンパク質を含み得る。各二量体タンパク質の相対量は、形成される六量体の所望の特性(例えば、標的細胞特異性、エフェクター機能、六量体結合力および/または安定性)が最適化されるように調整できる。さらに、同じ標的上の異なるエピトープと結合する二量体タンパク質を含む組成物が、ポリクローナル抗体の組成物に類似しているか、またはそのように機能してもよい。

【0437】

上記の組成物のそれぞれに含まれる二量体タンパク質および第2の分子は、例えば、画像化または治療法において、同時、別々または逐次的に用いるための、キット・オブ・パーツとしても提供できる。

【0438】

方法

本発明はまた、それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2およびCH3を含む第1および第2のポリペプチドを含む親二量体タンパク質の溶液中でのオリゴマー形成および/またはエフェクター機能を増大させる方法であって、第1および/または第2のポリペプチドに、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430に対応する位置、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される位置におけるアミノ酸置換を導入する段階を含む方法にも関する。

【0439】

一態様において、エフェクター機能は補体依存性細胞傷害作用(CDC)である。

【0440】

一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドは、前記第1および第2のポリペプチド間の共有結合を可能にする領域をさらに含み得る。

【0441】

一態様において、前記第1および/または第2のポリペプチドは、ヒンジ領域をさらに含み得る。

【0442】

一態様において、本方法は、前記第1および第2のポリペプチドに、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430に対応する位置、ならびにS440、Y436、D/E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸置換を導入する段階を含む。

【0443】

一態様において、本方法は、前記第1および第2のポリペプチドに、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430に対応する位置、ならびにS440、Y436、E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ

10

20

30

40

50

酸置換を導入する段階を含む。

【 0 4 4 4 】

したがって、一態様において、本発明はまた、それぞれが免疫グロブリン重鎖の少なくともCH2領域、CH3領域およびヒンジ領域を含む第1および第2のポリペプチドを含む親二量体タンパク質のエフェクター機能または溶液中でのオリゴマー形成の一方または両方を増大させる方法であって、各ポリペプチドに、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430およびS440に対応する位置にアミノ酸置換を導入する段階を含む方法にも関する。

【 0 4 4 5 】

一態様において、アミノ酸置換は、ヒトIgG1重鎖における少なくともE345、E430およびS440に対応する位置にある。

10

【 0 4 4 6 】

一態様において、E345に対応する位置におけるアミノ酸置換は、各ポリペプチドに関して、345R、345Q、345N、345K、345Y、345A、345C、345D、345F、345G、345H、345I、345L、345M、345P、345S、345T、345Vおよび345Wからなる群より、例えば345R、345Q、345N、345Kおよび345Yからなる群より選択される。

【 0 4 4 7 】

一態様において、E430に対応する位置におけるアミノ酸置換は、各ポリペプチドに関して、430G、430T、430S、430F、430H、430A、430C、430D、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430Q、430R、430V、430Wおよび430Yからなる群より、例えば430G、430T、430S、430Fおよび430Hからなる群より選択される。

20

【 0 4 4 8 】

一態様において、S440に対応する位置におけるアミノ酸置換は、各ポリペプチドにおいて、440Yまたは440Wである。

【 0 4 4 9 】

一態様において、E345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換は、それぞれ345R、430Gおよび440Yである。

【 0 4 5 0 】

一態様において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換は、それぞれ345K、430Gおよび440Yである。

【 0 4 5 1 】

30

一態様において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換は、それぞれ345R、430Sおよび440Yである。

【 0 4 5 2 】

一態様において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換は、それぞれ345R、430Gおよび440Wである。

【 0 4 5 3 】

一態様において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430およびY436に対応する位置におけるアミノ酸置換は、それぞれ345R、430Gおよび436Iである。

【 0 4 5 4 】

一態様において、ヒトIgG1重鎖におけるE345、E430、Y436およびS440に対応する位置におけるアミノ酸置換は、それぞれ345R、430G、436Iおよび440Yである。

40

【 0 4 5 5 】

前述の態様の任意の1つにおいて、重鎖配列のアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgMおよびIgEからなる群より選択され得る。

【 0 4 5 6 】

前述の態様の任意の1つにおいて、重鎖は哺乳動物由来のものであってよい。

【 0 4 5 7 】

前述の態様の任意の1つにおいて、重鎖は霊長動物またはネズミ科動物由来、例えばヒト由来のものであってよい。

【 0 4 5 8 】

50

前述の態様の任意の1つにおいて、各ポリペプチドは、同じ抗原と結合してもよい第1および第2の抗原結合領域を形成する、軽鎖可変領域および定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖配列と会合している免疫グロブリン重鎖可変領域を含み得る。

【0459】

前述の態様において、二量体タンパク質の各ポリペプチドは、全長重鎖定常領域、例えば全長ヒトIgG1重鎖定常領域を含み得る。

【0460】

前述の態様の任意の1つにおいて、親二量体タンパク質は、抗体、例えば、全長IgG1抗体であってよい。

【0461】

本発明はまた、前述の態様の任意の1つの方法によって調製される、本明細書に記載された任意の局面または態様の任意の二量体タンパク質も提供する。

【0462】

本発明はまた、前述の態様の任意の1つの方法によって調製される変異型二量体タンパク質、例えば変異型抗体も提供する。具体的には、本発明の方法による親二量体タンパク質における指定の位置への変異の導入により、本発明の二量体タンパク質を生じさせることができる。そこで、二量体タンパク質は親二量体タンパク質の変異体、例えば変異型二量体タンパク質とみなすことができる。したがって、本発明の方法を、本明細書に記載したような任意の二量体タンパク質を得る目的で行うことができる。

【0463】

本発明はまた、6.8未満のpH、例えば5.0~6.5、例えば5.0~6.0、例えば5.0~5.5を用い、その後にpHを6.8超またはpH 7.0超に高める、プロテインAまたはプロテインGカラムによる精製を含む、本発明の二量体タンパク質の精製のための方法にも関する。pHを調整するための緩衝液は、本明細書に記載したもののいずれであってもよい。

【0464】

キット・オブ・パーツ

本発明はまた、画像化、診断法または治療法において同時、別々または逐次的に用いるための、本明細書に記載の任意の局面または態様の第1の二量体タンパク質および本明細書に記載の任意の局面または態様の第2の二量体タンパク質を含むキット・オブ・パーツにも関する。

【0465】

使用

本明細書に記載したように、本発明の二量体タンパク質は、溶液中で六量体構造を形成し、その結果、IgM分子に類似する。その上、上記のように、組み合わせの異なる構成成分が同じ標的上の異なるエпитープと結合する、本発明の第1および第2の二量体タンパク質の組み合わせ、または任意で本発明の二量体タンパク質ではない第2の分子との組み合わせにより、ポリクローナル抗体組成物に類似する組成物が作り出されることが予見される。本発明の二量体タンパク質のこれらの特徴および他の特徴により、これはある種の用途には特に適したものとなる。

【0466】

IgM様特徴

・IgMは、感染性微生物に対する免疫応答において主要な役割を果たす。これは古典的補体経路の強力な活性化因子である。

・糖質に対する抗体は、多くの場合、IgMアイソタイプのものである。糖質は、細菌感染症、真菌感染症またはウイルス感染症、癌および自己免疫疾患の治療のための有望な標的である。

・IgM抗体は、免疫調節特性を有すること、ならびにエリテマトーデス(SLE)および多発性硬化症のようないくつかの自己免疫疾患において防御的であることが記載されている。IgMはまた、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞および脳卒中、脳小血管疾患およびアルツハイマー病において防御的役割を果たすと考えられている(Groenwall et al 2012, Fr

10

20

30

40

50

ontiers in Immunology 3, 1-10)。

- ・癌細胞に対する天然型抗体は多くの場合、IgMアイソタイプのものである。
- ・IgM（および多量体IgA）は、粘膜表面の管腔側上での免疫排除において機能を果たす。受動免疫処置のために、防御レベルのIgM（および多量体IgA）を、粘膜表面に直接送達できる。
- ・IgMをベースにした製品が、自己免疫疾患、癌および感染症の適応症に対して開発中である。

【0467】

本発明の二量体タンパク質は、pHが調整された、例えばpH 6.5～7.0の溶液中では、上記に列記したIgM様特徴を模倣することができ、このため、本発明の二量体タンパク質を前記の適応症のいずれかの治療のために用い得ることが予期される。

10

【0468】

加えて、溶液のpHを調整することにより、本発明の二量体タンパク質は単量体形態、すなわち単一の二量体タンパク質であることも、または六量体形態であることもできる（実施例32に記載したように）。「単量体形態」という用語は、本発明の二量体タンパク質の文脈において、互いに非共有結合的に会合していない二量体タンパク質で構成される、単一の個々の二量体タンパク質のことを指す。「六量体形態」に言及する場合、これは非共有結合的に会合した6つの単一の二量体タンパク質の複合体と解釈されるべきである。IgG分子に対して用いられる標準的な生産および精製の方法は、本発明の二量体タンパク質に対しても、それらが単量体形態にある場合には用い得ると予期され、これには例えば、限定はされないが、精製のためのプロテインA樹脂およびプロテインA変異体樹脂の使用、ならびに例えばプロセス管理に適用されるプロテインAおよびプロテインA変異体ベースの免疫グロブリンドメイン検出アッセイの使用、ならびにタンパク質精製中に付随する凝集物を除去するための陽イオン交換クロマトグラフィーの使用、およびウイルス排除のためのナノ濾過の使用などがあり、それにより、IgMタンパク質の生産または精製の際に遭遇することの多い問題が回避される。

20

【0469】

迅速なクリアランス

- ・本発明の二量体タンパク質の六量体形態は、本明細書に記載したような迅速なクリアランスを防ぐ技術と併せて用いなければ、急速にクリアランスされる。同じく急速にクリアランスされるFab断片製品が、中毒、毒物中毒の治療のため、および過剰または多量のリガンドおよび／または可溶性因子を枯渇させるために開発／使用されている。
- ・本発明の二量体タンパク質は、類似の用途を有し得る可能性がある。
- ・本発明の二量体タンパク質はまた、細胞標的治療に対するシンクを形成すると考えられる可溶型／脱落型の膜タンパク質を枯渇させるためにも用い得ると考えられる。

30

【0470】

ポリクローナル性の局面

- ・ポリクローナル抗体製品は相乗作用（より優れた活性）の可能性があり、治療法に対する獲得抵抗性を克服し得る可能性がある
- ・ポリクローナル抗体製品は、ウイルス感染症または細菌感染症、毒液注入、（免疫性血小板減少性紫斑病）、ジゴキシン毒性、腎移植急性拒絶反応および癌の治療のために開発／使用されている。

40

このように、本発明の二量体タンパク質は類似した用途を有し、このため、前記適応症のいずれかの治療に用いるのに適している。

【0471】

したがって、一態様において、本発明の二量体タンパク質は、以下の適応症のいずれかの治療のために用いられ得る：全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、視神経脊髄炎、シェーグレン症候群、CREST症候群、眼球クローヌス、炎症性ミオパチー、混合性結合組織病、全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、セリアック病、ミラー・フィッシャー症候群、急性運動性軸索型ニューロパチー、多病巣性運動性ニューロパチーMMN、関節

50

リウマチ、骨関節炎、自己免疫性肝炎、抗リン脂質症候群、ウェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、チャーグ・ストラウス症候群、多発性筋炎、硬化筋炎、重症筋無力症、ランバート・イートン筋無力症症候群、橋本甲状腺炎、グレーブス病、腫瘍随伴性小脳症候群、全身硬直症候群、辺縁系脳炎、シデナム舞蹈病、PANDAS、脳炎、辺縁系脳炎、真性糖尿病1型、運動失調、持続性部分てんかん、発性血小板減少性紫斑病、悪性貧血、アジソン貧血、自己免疫性性腺機能不全、自己免疫性溶血性疾患、例えば血液学的自己免疫性貧血およびHIV関連血小板減少症など、天疱瘡、水泡性類天疱瘡、疱疹状皮膚炎（Dermatitis hepetiformis）、リニアIgA皮膚症、白斑、グッドパスチャー症候群、心筋炎、特発性拡張型心筋症、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む自己免疫疾患、癌、細菌感染症、ウイルス感染症および真菌感染症、中毒および毒液注入、または血管疾患または他の疾患。

10

【0472】

癌の例には、さまざまな種類の癌、例えば以下のものが非限定的に含まれる：中枢神経系の腫瘍、頭頸部癌、肺癌（非小細胞肺癌など）、乳癌（トリプル陰性乳癌）、食道癌、胃癌、肝臓癌および胆管癌、膵癌、結腸直腸癌、膀胱癌、腎臓癌、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、悪性黒色腫、肉腫（軟部組織、例えば骨および筋肉）、原発起源不明の腫瘍（すなわち、原発不明）、白血病、骨髄癌（多発性骨髄腫など）急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ芽球性白血病および非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性白血病（AML）、皮膚癌、神経膠腫、脳悪性腫瘍、子宮癌ならびに直腸癌。

【0473】

したがって、一局面において、本発明は、疾患、例えば癌、自己免疫疾患、感染症、真性糖尿病、臓器移植拒絶反応、眼科疾患および液性系におけるC1q枯渇などを予防または治療するための方法であって、本発明のいずれかの局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物、キット・オブ・パーツの投与を含む方法に関する。

20

【0474】

一態様において、癌は腫瘍、例えば脳腫瘍である。本発明の二量体タンパク質は、腫瘍、例えば脳腫瘍の中への直接的な注射によって、腫瘍血管内の血流を機械的に閉塞させるために用いることができる。本発明の任意の局面または態様の二量体タンパク質は、オリゴマー、例えば二量体、三量体および六量体を形成する能力の点から、腫瘍内に機械的閉塞を誘導するために特に有用な可能性がある。本発明の二量体タンパク質（例えば抗体）を癌の治療に用いる場合、それは腫瘍微小環境の低pHに起因するエフェクター機構の抑制を克服するのに特に有用である。

30

【0475】

一態様において、本発明のいずれかの局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツは、毒素またはペイロード/薬物のpH依存性送達を利用することによる腫瘍の治療に用いるためのものである。そのような用途では、本発明の二量体タンパク質（例えば抗体）を、腫瘍部位のより低いpHで最適な機能を果たす毒素または薬物と融合させた場合に、腫瘍部位のpHがより低いことを利用できる。

【0476】

一態様において、本方法は、本発明の任意の局面または態様の第1の二量体タンパク質に第1のプロドラッグを連結させたもの、および本発明の任意の局面または態様の第2の二量体タンパク質に第2のプロドラッグを連結させたものを血流に投与する段階を含む。

40

【0477】

一局面において、本発明は、免疫調節エフェクター機能、例えばCD32bおよびKIRを通じて媒介されるものを誘導する方法であって、本発明のいずれかの局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツの投与を、任意で二量体タンパク質のシアル酸付加と組み合わせる含む方法に関する。そのような方法において、本発明の二量体タンパク質は標的分子のクラスター化を誘導し、それにより、免疫調節エフェクター機能を誘導すると考えられる。したがって、本発明の二量体タンパク質は、静脈内免疫グロブリン（IVIG）に代わるものとして用いることができる。

【0478】

50

一態様において、本発明のいずれかの局面または態様の二量体タンパク質（例えば抗体）またはFc融合タンパク質は、標的分子、例えばリガンド、受容体、毒素、C1q、IgE、抗移植片抗体（antibodie）、ヒト抗ヒト抗体（HAHA）、抗薬物抗体（ADA）、ヒト抗マウス抗体（HAMA）、ヒト抗キメラ抗体（HACA）、薬学的化合物、および免疫調節化合物の血流からのクリアランスを亢進するために用いることができる。

【0479】

本発明の二量体タンパク質、例えばFc断片を抗原と融合させたものは、オリゴマー形態、例えば六量体分子では免疫刺激効果が向上している可能性があり、これはオリゴマーが、例えば、前記抗原を対象とするB細胞受容体のクラスター化を刺激する抗原複合体をもたらし、抗原を多価形態で提示することによって初期の低親和性B細胞受容体の親和性成熟を促すためである。このことは、本発明の二量体タンパク質が溶液中にあるか、または細胞、ピリオン、ウイルス様粒子の表面上に提示されるか、リボソーム中に埋め込まれるか、または当技術分野において一般的に公知である膜貫通タンパク質の提示を支える他の形態にある場合の両方で得られる可能性がある。したがって、一態様において、本発明のいずれかの局面または態様の二量体タンパク質、例えばFc断片は、ワクチン接種、免疫処置および免疫応答刺激に用いるためのものである。したがって、一態様において、本発明はまた、本明細書に記載したような二量体タンパク質の投与を含む、ワクチン接種、免疫処置および免疫応答刺激のための方法にも関する。

【0480】

本発明の二量体タンパク質を、溶液中および表面上（例えば限定はされないが細胞、ピリオン、ウイルス様粒子、リボソーム、マイクロチップ、固体表面、多孔性足場の表面上）の両方で、または当技術分野において一般的に公知であるタンパク質提示のための他の方法で、任意でpH依存性様式で集合することのできる、超分子構造を作り出すために用いてもよい。

【0481】

一態様において、前記二量体タンパク質の第1および/または第2のポリペプチドは、異なるFcドメイン含有ポリペプチド中のFabドメインと特異的に結合するタンパク質結合ドメイン、例えばFabドメインを含み得る。二量体タンパク質およびその標的分子を、任意でpH制御様式で集合することのできる、超分子構造の形成のために用いることができる。

【0482】

一態様において、本発明の任意の局面または態様の二量体タンパク質は、タンパク質結晶化に用いるためのものである。二量体タンパク質は、pH制御様式でオリゴマー構造を形成するその能力のために、特に有用な可能性がある。

【0483】

一態様において、本発明は、本明細書に記載された任意の局面または態様の二量体タンパク質を、診断用キット、例えば凝集アッセイにおける免疫複合体形成に用いる方法に関する。凝集アッセイの一例はクームス試験である。

【0484】

細菌感染症の例には、黄色ブドウ球菌感染症、例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、緑膿菌感染症、表皮ブドウ球菌、肺炎連鎖球菌、炭疽菌、クラミジア・トラコマチス、大腸菌、サルモネラ菌、赤痢菌、エルシニア属菌、ネズミチフス菌、髄膜炎菌、および結核菌からなる群より選択される細菌によって引き起こされる感染症が非限定的に含まれる。ウイルス感染症および真菌感染症の例には、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、RVS、アスペルギルス、カンジダ・アルビカンズ、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、単純ヘルペスウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、およびトリインフルエンザウイルスが非限定的に含まれる。中毒および毒液注入の例には、ジゴキシン、コルヒチン、爬虫類の毒液、例えば蛇毒、昆虫の毒液、例えばミツバチ、スズメバチおよびケムシの毒液、クモ毒、微生物の内毒素および外毒素、例えばボツリヌス（botox）

linum) 神経毒素、破傷風毒素、ブドウ球菌毒素、毒素、炭疽毒素、ジフテリア毒素、百日咳 (Pertussis) 毒素、志賀毒素、志賀毒素様毒素が非限定的に含まれる。

【0485】

血管疾患および他の疾患の例には、例えば、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞および脳卒中、脳小血管疾患、アルツハイマー病、ならびに高脂肪食により誘発される肝臓でのインスリン抵抗性および全身の糖耐性におけるC1qの枯渇、ならびに臓器移植の前または後の抗移植片抗体のクリアランスがある。

【0486】

一局面において、本発明は、疾患、例えば細菌感染症、ウイルス感染症または寄生虫感染症、自己免疫疾患、癌、炎症の治療に、および/または細菌感染症によって引き起こされる敗血症性ショックのリスクを低下させるために用いるための、本明細書に記載の任意の局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツに関する。

10

【0487】

細菌感染症の治療および/または敗血症性ショックのリスクの低下のために、本発明の二量体タンパク質は、例えば、リポ多糖 (LPS)、リポオリゴ糖 (LOS)、デルタ内毒素、ボツリヌス毒素、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 外毒素、細菌スーパー抗原、耐熱性エンテロトキシン、細胞溶解素、チャネル形成毒素、酵素活性毒素またはマイコトキシンと特異的に結合する結合領域を含み得る。

【0488】

20

別の局面において、本発明は、ヒトまたは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部の画像化における、前述の態様の任意の1つによる二量体タンパク質、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツの使用を提供する。一局面において、本発明は、ヒトまたは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するための方法であって、本明細書に記載の任意の局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツを投与する段階を含む方法に関する。

【0489】

別の局面において、本発明は、細菌感染症、ウイルス感染症または寄生虫感染症を治療するため、ヒトもしくは他の哺乳動物の身体の少なくとも一部を画像化するため、またはヒトもしくは他の哺乳動物の身体からの標的分子のクリアランスをモジュレートするための方法であって、本明細書に記載の任意の局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物またはキット・オブ・パーツを投与する段階を含む方法に関する。

30

【0490】

別の局面において、本発明は、疾患、例えば癌、自己免疫疾患、臓器移植拒絶反応、および液性系におけるC1q枯渇を予防または治療するための方法であって、本明細書に記載の任意の局面または態様の二量体タンパク質、オリゴマー、六量体、組成物、キット・オブ・パーツの投与を含む方法に関する。

【実施例】

【0491】

実施例1

40

CD38抗体005変異体の設計および作製

ヒトモノクローナル抗体HuMab 005は、ヒトCD38を対象とする、WO/2006/099875号に記載されている完全ヒトIgG1、抗体である。本明細書ではそれを、Fc変異がCDC活性を増強し得ることを検証するためのモデル抗体として用いた。試験した変異は表3に列記されている。

【0492】

種々の変異体についてDNA構築物を調製し、IgG1m(f)アロタイプを有するHuMab 005の重鎖を変異誘発反応のためのテンプレートとして用いて一過性にトランスフェクトさせた。手短に述べると、Quikchange部位指定変異誘発キット (Stratagene, US) を用いて変異体を調製した。所望の変異をコードする順方向および逆方向プライマーを用いて、IgG1m

50

(f) アロタイプを有する005重鎖をコードする全長プラスミドDNAテンプレートを複製した。その結果得られたDNA混合物を、ソースプラスミドDNAを取り除くためにDpnIを用いて消化した上で、大腸菌の形質転換に用いた。その結果得られたコロニーから単離された変異型プラスミドDNAを、DNAシーケンシング (Agowa, Germany) によって確かめた。抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードするプラスミドDNA混合物を、293fectin (Invitrogen, US) を本質的には製造元による記載の通りに用いて、Freestyle HEK293F細胞 (Invitrogen, US) に一過性にトランスフェクトさせた。

【 0 4 9 3 】

補体活性化およびCDCにおけるオリゴマーFc-Fc相互作用の機能関連性について検討するために、005のFc-Fcサイドオン型相互作用およびCDC活性を損なわせることを目指して、Fc : Fc境界面にある疎水性パッチ内のアミノ酸を変異させた。1HZH結晶構造に基づいて選ばれた、CH2-CH3ドメインで疎水性パッチ内に露出していることが記載されている位置で電荷を変化させるために、変異I253DおよびH433Aを導入した (Burton Mol Immunol 1985 Mar;22(3):161-206) 。

【 0 4 9 4 】

1HZH結晶構造により、I253およびH433が、パートナー抗体の対向するFc位置上の2つの異なるポケットと結合することが示されている。C1qに対する直接の結合部位の破壊が、CDCに対して観察された効果の原因であるという可能性を否定するために、変異体K439EおよびS440Kを作製した。図4に示されているように、K439およびS440はFc : Fc境界面の反対側で互いに向かいあっており、そのため、Fc : Fc相互作用を阻害することによって単一変異体としてCDCの喪失を誘導するK439EおよびS440Kを設計したが、これらは互いに相互作用した場合には、抗体混合物におけるFc : Fc相互作用の回復が原因でCDCを回復させると予想された。

【 0 4 9 5 】

(表3) 005 (HuMax-CD38) のCH2-CH3ドメインに導入した変異のセット

変異	荷電	野生型アミノ酸	荷電	変異型アミノ酸
I253D	=		-	
E345R	-		+	
H433A	δ+		=	
K439E	+		-	
S440K	=		+	

(=) 荷電なし

(-) 負荷電

(+) 正荷電

(+) 部分的正荷電

【 0 4 9 6 】

実施例2

HuMab-005変異体による細胞上でのCD38結合

CD38陽性のDaudi細胞およびRaji細胞に対する非精製抗体試料の結合を、FACS分析によって分析した。10⁵個の細胞を、ポリスチレン製96ウェル丸底プレート中にて、100 μL中で、RPMI1640 / 0.1% BSA中にある抗体調製物の系列希釈物 (0.01、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μg / mL) とともに、4 で30分間インキュベートした。RPMI1640 / 0.1% BSAにて2回洗浄した後に、細胞を、FITC結合ウサギF(ab')₂抗ヒトIgG (カタログ番号F0056; DAKO; 1 : 150) とともに、50 μL中で、4 で30分間インキュベートした。次に、細胞をPBS / 0.1% BSA / 0.02% アジドにて2回洗浄し、100 μL PBS / 0.1% BSA / 0.02% アジド中に再懸濁させた上で、FACS Cantoll (BD Biosciences) で分析した。結合曲線はGraphPad Prism V5.01ソフトウェアを用いて解析した。陰性対照として、擬似トランスフェクトした細胞の上清を用いた。

【0497】

Daudi細胞に対するHuMab 005の結合は、CH2-CH3ドメインにおける点変異の導入により、それほど大きな影響は受けなかった。試験した抗体はすべて、Daudi細胞と用量依存的な様式で結合した。幾分低下した結合を示した005-E345Rを除き、試験した変異体のすべてで、結合は野生型HuMab-005と同程度であった。しかし、いかなる理論にも拘束されないものの、結合がより低下していることは、二次抗体による結合低下の結果である可能性がある。005-E345Rによる実際の結合力は005-WTと比較して同程度であるかまたはさらに増強されている可能性もあるが、直接標識された抗体がないため、本発明者らはこのことを確かめることができなかった。

【0498】

10

Raji細胞に対するHuMab-005の結合も、CH2-CH3ドメインにおける点変異の導入によってそれほど大きな影響を受けなかった。試験した抗体はすべて、Raji細胞と用量依存的な様式で結合した。最大結合は、005-I253DおよびH433A変異体については野生型005のものと同程度であり、005-E435R、K439E、S440K変異体および005-K439E + 005-S440Kの組み合わせについてはより低下していた。しかし、いかなる理論にも拘束されないものの、結合がより低下していることは、二次抗体による結合低下の結果（エピトープの遮蔽）である可能性がある。

【0499】

実施例3

CD38抗体005の変異体による、CD38陽性細胞でのCDCアッセイ

20

0.1×10^6 個のDaudi細胞またはRaji細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ Lで、一連の濃度（0.01、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μ g/mL）の非精製抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、25 μ Lの正常ヒト血清をC1qの供給源として添加し（最終濃度20%）、37 のインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加し、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0500】

E435R変異がCDCに与える影響について、Wien133細胞において種々の濃度の正常ヒト血清（NHS）を用いてさらに分析した。 0.1×10^6 個のWien133細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積50 μ Lで、一連の濃度（0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μ g/mL）の非精製抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、C1qの供給源としてNHSを、総容積100 μ Lで、20%または50% NHSのいずれかの最終濃度に達するまで添加した。反応混合物を37 のインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウム添加し、細胞溶解をFACSによって決定した。

30

【0501】

図5は、005-I253D、H443A、K439EおよびS440KがDaudi細胞（図5A）およびRaji細胞（図5B）の両方においてCDC活性の完全な喪失を示し、一方、005-E345R変異体がいずれの細胞株においても強く増強されたCDC活性を示したことを示している。7D8のデータと同等に、いずれも単一変異体としてはCDCの喪失をもたらす005-K439E + 005-S440Kの組み合わせは、CDCの回復をもたらした。驚いたことに、005-E435Rは、野生型005がCDCによる致死を誘導できないWien133細胞においてもCDCを強く誘導した（図5C）。Wien133細胞における005-E345RによるCDC致死は、20%および50%のいずれの血清濃度でも観察された（図5C）。Raji細胞において、7D8-E345Rおよび005-E345Rは両方とも、50%血清中でインビトロでのCDCの増強を示し、20%血清中でも同程度の活性であった（図5D）。

40

【0502】

CH2-CH3領域におけるE345R変異が、試験したCD20抗体7D8およびCD38抗体005の両方においてCDC活性の増強をもたらしたことから、E345R変異はCDCを誘導または増強するために適用し得る一般的な抗体改変であると考えられる。

【0503】

50

実施例4

CDCを増強する変異E345Rを含むIgG1抗体は、野生型抗体よりも、Fc結合ペプチドDCAWHLGELVWCTによるCDCの阻害に対する感受性が低い

IgGのFc:Fc境界面にある疎水性パッチ中のアミノ酸位置を変異させることによって、CDC活性が損なわれること、または増強されることが見いだされた。b12結晶構造において観察されているような、Fc-Fc境界面での相互作用、およびそれ故に可能性としてオリゴマー（例えば、六量体環）構造の形成がCDC活性に及ぼす関与についてさらに調べた。すなわち、野生型IgG Fcの表面上の疎水性パッチ領域におけるコンセンサス結合部位を標的とする、13残基のペプチド（DCAWHLGELVWCT（SEQ ID NO:7））を用いた（Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83）。実際に、種々の異なる分子との相互作用に向けて備わっている適応領域としてのIgG Fcの表面上のコンセンサス結合部位の実体（Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83）は、IgG1 b12結晶構造においてFc-Fc相互作用に参与する疎水性パッチにおけるコアアミノ酸の実体と一致する（Saphire et al., Science 2001 Aug 10; 293(5532): 1155-9）。結合境界面のすべてに存在する相互作用は、共通する6つのアミノ酸のセット（Met-252、Ile-253、Ser-254、Asn-434、His-435およびTyr-436）、ならびに共通の骨格接触によって媒介される（Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83）。そのため、Fc結合ペプチドはFc-Fc相互作用に影響を及ぼし、その結果としてCDC活性にも影響を及ぼすと予想される。

【0504】

0.1×10^6 個のDaudi細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、75 μ L中で、1.0 μ g/mLの非精製抗体とともに振盪機上にて室温で10分間ブレインキュベートした。一連の濃度（最終濃度は0.06~60 μ g/mLの範囲）のFc結合ペプチドDCAWHLGELVWCTの25 μ Lをオプソニン化細胞に添加して、室温で振盪機上で10分間インキュベートした。次に、25 μ LのNHSを補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37℃のインキュベーター内で45分間インキュベートした。0.1% BSAを加えた25 μ Lの氷冷RPMI培地を添加することによって反応を停止させた。15 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加し、細胞溶解をFACS分析によって決定した。

【0505】

野生型005（図6）によって媒介されるCDCは、Fc結合ペプチドDCAWHLGELVWCTによって用量依存的な様式で阻害されることが見いだされた。これらの競合データも同じく、IgGの疎水性パッチでのFc-Fc相互作用がCDC活性に参与することを示唆している。CDCが増強されたIgG1-005-E345R変異体は、その対応する野生型抗体と比較して、Fc結合ペプチドによる競合に関する感受性が低く、このことはE345R変異がFc-Fc相互作用の安定性の増強をもたらした、その結果としてCDCの増強をもたらすことを示唆する。

【0506】

実施例5

2つの異なるモノクローナル抗体の混合物において、E345Rを補完性の阻害性変異K439EおよびS440Kと組み合わせることによる、増強されたCDCの特異性の増強

実施例3に記載したように、CD38抗体005の変異K439EおよびS440Kは、モノクローナル抗体としてのCDC活性を低下させた。これらの変異を含有する005抗体を混合することにより、CDCが回復した。すなわち、有効なCDCは、両方の変異型抗体による結合を同時に受けた細胞に限定された。同様に、WO2004/035607に記載のCD20抗体7D8についてデータが観察された（データ示さず）。

【0507】

CDC誘導の増強を、2つの特異的抗原を同時に発現する標的細胞に限定して、それらの複合発現をCDC誘導の増強を選択的に向上させるために利用することは、有利である可能性がある。また、CDC誘導の増強を、同一の細胞表面抗原と2つの異なるエピトープで同時に結合するか、または2つの交差競合する類似もしくは同一のエピトープで結合する抗体である、少なくとも2つの異なる抗体の混合物による結合を同時に受けた標的細胞に限定することも、有利である可能性がある。

【0508】

10

20

30

40

50

このように、CDC誘導の増強を、CD20およびCD38抗体による結合を同時に受けた細胞に限定するために、抗体7D8-E345R / K439E、7D8-E345R / S440K、005-E345R / S440Kおよび005-E345R / K439Eにおいて、CDCを増強する変異E345RをCDC阻害性変異と組み合わせた。これらの抗体を、以下のようなCDC実験において、別々に添加するか、または1:1で混合した。0.1 × 10⁶個のWien133細胞（Daudi細胞またはRaji細胞などの他の細胞種を用いてもよい）を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μL中で、一連の濃度の非精製抗体（7D8-E345R / K439E、7D8-E345R / S440K、005-E345R / S440Kまたは005-E345R / K439Eについては3倍希釈で最終濃度0.056 ~ 10,000ng / mLに）または抗体混合物（最終濃度0.01 μg / mLのCD20抗体を0 ~ 333ng / mLのCD38抗体の3倍希釈物と混合；または3.3 μg / mLのCD38抗体を0.0056 ~ 1,000ng / mLのCD20抗体の3倍希釈物と混合）とともに、振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、25 μLの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37 °Cのインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μLのヨウ化プロビジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【 0 5 0 9 】

一連の濃度の005-E345R / K439E抗体または005-E345R / S440K抗体を、0.01 μg / mLという固定濃度の7D8二重変異型抗体（図7Aから決定されるような、単一の薬剤としてWien133細胞に対するCDCが最小限である最大濃度）と混合して、005-E345R / K439E + 7D8-E345R / S440Kまたは005-E345R / S440K + 7D8-E345R / K439Eという補完的な組み合わせを作り出した。図7Cは、固定濃度の補完的な7D8-E345R / K439Eまたは7D8-E345R / S440K CD20抗体のそれぞれの存在下で、005二重変異体CD38抗体がCDCを用量依存的に誘導したことを示している。これらの補完的な組み合わせによるCDC活性（図7C）は、単一の薬剤としての005-E345R単一変異体（エンハンサー）抗体と同等であった（図7B）。対照的に、無関係な抗体b12の存在下では、005-E345R / K439Eおよび005-E345R / S440Kはいずれも、試験した濃度系列においてほとんどCDCを示さなかった（図7Bに示されている単一の薬剤としての005-E345R / K439Eまたは005-E345R / S440Kと同等）。

【 0 5 1 0 】

一連の濃度の7D8-E345R / K439Eまたは7D8-E345R / S440K抗体を、3.3 μg / mLという固定濃度の005二重変異型抗体（図7Bから決定されるように、単一の薬剤としてWien133細胞においてわずかな、ただし限定的なCDCを示す）と混合して、7D8-E345R / K439E + 005-E345R / S440Kまたは7D8-E345R / S440K + 005-E345R / K439Eという補完的な組み合わせを作り出した。図7Dは、補完的な005-E345R / K439Eまたは005-E345R / S440K CD38抗体のそれぞれの存在下で、細胞1個当たり数個にとどまる7D8二重変異型抗体分子に相当するような最も低い試験濃度であっても、7D8二重変異体CD20抗体がCDCを極めて効率的に誘導したことを示している。7D8および005抗体と補完的なK439EおよびS440K変異の混合物によって観察されたCDC増強への、細胞膜上でのFc尾部の密度の増大の寄与を否定するために、非補完的な変異との抗体の組み合わせについても試験した。図7Dは、非補完的な組み合わせが、補完的な組み合わせよりも効率的ではないFc-Fc相互作用の結果として、補完的な組み合わせよりもはるかに弱いCDC活性を示したことを示している。

【 0 5 1 1 】

これらのデータは、治療用抗体による（増強された）CDCの誘導を、2つの補完的な抗体の、この場合には異なる抗原特異性を有するものの混合物と同時に結合する細胞に限定することができ、それにより、両方の抗原の同時発現を要求することによって標的細胞特異性を高め得ることを示唆している。

【 0 5 1 2 】

図7Aおよび7Bに見てとれるように、7D8-E345R / K439E、005-E345R / S440K、7D8-E345R / S440Kおよび005-E345R / K439Eは、7D8-E345R単独と比較して、限定的なCDC効率を呈した。さらに、7D8-E345R / K439Eおよび7D8-E345R / S440Kの混合物が、単一の薬剤としての野生型7D8抗体と比較して、効率の増強されたCDCを可能にしたことも見てとれる。同様に、005-E345R / K439Eおよび005-E345R / S440Kの混合物も、単一の薬剤としての野生型005

抗体と比較して、効率の増強されたCDCを可能にしたことも観察された（データは提示せず）。

【0513】

実施例6

CDCアッセイによって検出されたFc:Fc相互作用を介する抗体オリゴマー形成を刺激する変異を同定するための、変異体スクリーニングアプローチの使用

実施例3に記載したように、標的抗原CD38を認識する抗体についてのCDCを、前記抗原をさまざまなレベルで発現する複数の細胞株に対して増強する、アミノ酸変異が同定された。驚いたことに、単一点変異E345Rは、抗CD38抗体005に対するWien133細胞のCDC依存性細胞溶解をもたらすには十分であるが、これらの細胞を野生型IgG1フォーマットでのCDCに

10

【0514】

Fc:Fc境界面上またはその周辺にある他の変異が、類似の様式でオリゴマー形成およびCDCを刺激し得る可能性もある。または、変異が、例えばFc:Fc相互作用をアロステリック性に誘導することによって、オリゴマー形成を間接的に刺激し得る可能性もある。

【0515】

他のアミノ酸変異がFc媒介性抗体オリゴマー形成を刺激し得るか否かを決定する目的で、抗CD38IgG1-005変異体ライブラリーを、個別的に、さらには例えばFc:Fc境界面にまたがって相互作用するアミノ酸の対を選択するためのペアワイズ様式で混合するかの両方として、CDCアッセイを用いてスクリーニングした。しかしながら、同じ戦略を、他の抗体、例えば別のIgG1抗体またはIgG3抗体などに対して適用することもできる。

20

【0516】

表4に表記した位置での変異のフォーカスド・ライブラリーを作製した。変異は、Quikchange部位指定変異誘発キット（Stratagene, US）を用いて、IgG1-005 Fc領域に導入した。手短に述べると、所望のそれぞれの変異位置について、所望の場所で縮重コドンコードする順方向および逆方向プライマーを用いて、IgG1m(f)アロタイプを有する005重鎖の全長プラスミドDNAテンプレートを複製した。その結果得られたDNA混合物を、ソースプラスミドDNAを取り除くためにDpnIで消化した上で、大腸菌の形質転換に用いた。その結果得られたコロニーをプールして培養し、これらのプールからプラスミドDNAを単離した上で、大腸菌に形質転換導入してクローン性コロニーを得た。その結果得られたコロニーから単離された変異型プラスミドDNAを、DNAシーケンシング（LGC genomics, Berlin, Germany）によって確かめた。プラスミドDNAからPCRによって発現カセットを増幅し、IgG1-005抗体の変異型重鎖および野生型軽鎖の両方を含有するDNA混合物を、293fectin（Invitrogen, US）を本質的には製造元による記載の通りに用いて、Freestyle HEK293F細胞（Invitrogen, US）に一過性にトランスフェクトした。抗体変異体を含有するトランスフェクト細胞の上清を収集した。変異型抗体上清を、以下のように、個別的におよびペアワイズ混合物の両方として、CDCアッセイでスクリーニングした。

30

【0517】

0.1×10^6 個のDaudi細胞またはWien-133細胞（Raji細胞などの他の細胞種を用いてもよい）を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、1.0 μ g/mlの非精製抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートした。次に、30 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度30%）、37℃のインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

40

【0518】

表4、表5および表6に記載された変異を、単一変異体として、または例えばFc:Fc境界面にまたがる変異に面する他の変異体と混合した上で、CDC効率によって検出されるオリゴマー形成をそれらが増強する能力に関して選別した。変異を、任意で、FcRn、プロテインAもしくはプロテインGの結合、ADCC、ADCP、またはFcドメインによって媒介される他のエフェクター機能をそれらが損なわない能力に関してさらにスクリーニングすることもで

50

きる。そのような点変異を1つのFcドメイン中に組み合わせることにより、オリゴマー形成およびCDC効率をさらに刺激できる。

【 0 5 1 9 】

CD38抗体005に組み入れたCH2-CH3領域における変異を、Daudi細胞に対するCDCによって決定されるようなオリゴマー形成をそれらが阻害する能力について試験した。変異型抗体の溶解を野生型005と比較し、後者の溶解を100%に設定した。阻害に関するカットオフは溶解率66%以下に設定した。このようにして測定したところ、試験した変異のほとんどがCDCを阻害した(表4参照)。

【 0 5 2 0 】

CD38抗体005に組み入れたCH2-CH3領域における変異を、Wien133細胞に対するCDCによって決定されるようなオリゴマー形成をそれらが増強する能力について試験した(表5)。野生型CD38抗体005は、Wien133細胞に対するCDCを誘導できない。39%以上の細胞溶解を呈する変異体を増強性として評価した。全く予想外のことに、アミノ酸E345およびE430から得られた置換の事実上すべてが、CDCによる細胞溶解を刺激した。この結果を検証するために、アミノ酸E345、E430およびS440を部位指定変異誘発によってそれぞれの可能な変異に置換した上で、新たなヒト血清バッチを用いて、それらがWien133細胞のCDCによって決定されるようなオリゴマー形成を増強する能力に関して試験したところ、幾分より有効な溶解が生じた(表6)。この場合にも、E345およびE430のすべての置換物が、Wien133細胞の有効なCDCを誘導した。

【 0 5 2 1 】

以下の好ましい変異が、Wien133細胞の39%以上の細胞溶解を引き起こした。
P247G,

I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y および S440W

【 0 5 2 2 】

(表4) 1.0 μg/mlのIgG1-005抗体点変異物の存在下におけるDaudi細胞の溶解率。IgG1-005野生型は、これらの条件下で細胞の66%を溶解させた。別のアミノ酸に置換した個々の位置のそれぞれを左外欄に記している。個々の位置の横列に、それぞれの特定の位置で置換されたアミノ酸を記し、それに続いて、測定された溶解率を括弧内に示している。

位置	A (42)	C (67)	D (91)	F (93)	G (95)	H (80)	I (89)	K (96)	L (13)	M (83)	N (78)	R (93)	S (93)	T (10)	V (9)	W (82)		
P247	A (42)	C (67)	D (91)	F (93)	G (95)	H (80)	I (89)	K (96)	L (13)	M (83)	N (78)	R (93)	S (93)	T (10)	V (9)	W (82)		
I253	A (17)	D (12)	K (13)	M (6)	N (5)	R (7)	S (6)	V (94)										
S254	E (14)	F (75)	G (100)	H (46)	I (93)	K (86)	L (99)	P (4)	T (8)	W (7)								
H310	K (6)	W (87)																
Q311	A (53)	C (72)	E (5)	F (90)	G (68)	H (72)	I (92)	K (93)	L (96)	N (53)	P (97)	R (87)	S (66)	T (54)	W (93)	Y (85)		
E345	A (85)	C (91)	F (95)	G (86)	H (83)	I (96)	K (94)	L (98)	M (94)	N (97)	P (74)	R (98)	S (93)	T (82)	V (92)	W (95)	Y (95)	
D/E35 6	G (88)	I (95)	L (94)	R (97)	T (97)	V (98)												
T359	G (88)	N (93)	P (87)	R (96)														
E382	F (3)	K (3)	L (99)	M (90)	P (3)	V (96)	W (3)											
G385	D (28)	H (9)	Q (24)	R (27)	S (14)	T (10)												
Q386	A (56)	C (18)	D (6)	E (9)	F (11)	G (10)	H (26)	I (42)	K (98)	L (15)	N (25)	P (6)	R (10)	S (43)	T (12)	V (53)	W (13)	Y (42)
E430	A (97)	F (97)	G (99)	H (98)	L (95)	P (95)	Q (90)	R (96)	S (94)	V (98)								

10

20

30

40

N434	D (5)	E (5)	K (5)	R (5)	S (6)	W (98)													
Y436	I (98)	K (7)	L (10)	R (35)	S (8)	T (7)	W (6)												
Q438	E (5)	K (6)	S (5)	T (8)	W (10)	Y (31)													
K439	A (6)	D (5)	H (5)	L (5)	P (8)	T (4)	Y (7)												
S440	A (61)	C (10)	D (95)	E (24)	F (13)	G (40)	I (8)	N (33)	R (11)	T (28)	Y (98)								
K447	E (20)	*del(90)																	

10

20

30

40

* 「del」は、表記の位置にアミノ酸残基の欠失があったことを意味する。

50

【 0 5 2 3 】

(表5) 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG1-005抗体点変異物の存在下におけるWien-133細胞の溶解率。IgG1-005野生型は、これらの条件下で細胞の3%を溶解させた。別のアミノ酸に置換した個々の位置のそれぞれを左外欄に記している。個々の位置の横列に、それぞれの特定の位置で置換されたアミノ酸を記し、それに続いて、測定された溶解率を括弧内に示している。

位置	A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)	
P247	A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)	
1253	A (11)	D (9)	K (3)	M (3)	N (3)	R (4)	S (3)	V (51)									
S254	E (14)	F (10)	G (32)	H (2)	I (15)	K (12)	L (65)	P (2)	T (9)	W (9)							
H310	K (3)	W (13)															
Q311	A (9)	C (4)	E (3)	F (19)	G (4)	H (6)	I (28)	K (16)	L (55)	N (6)	P (12)	R (18)	S (9)	T (3)	W (41)	Y (12)	
E345	A (57)	C (22)	F (48)	G (47)	H (49)	I (59)	K (42)	L (72)	M (67)	P (51)	R (64)	S (60)	T (53)	V (67)	W (52)	Y (70)	
D/E356	G (39)	I (31)	L (30)	R (64)	T (32)	V (13)											
T359	G (2)	N (3)	P (4)	R (40)													
E382	F (2)	K (2)	L (44)	M (21)	P (3)	V (53)	W (2)										
G385	D (5)	H (4)	N (18)	Q (4)	R (14)	S (4)	T (4)										
Q386	A (3)	C (4)	D (4)	E (4)	F (3)	G (3)	H (3)	I (4)	K (60)	L (3)	N (4)	P (2)	R (4)	S (3)	T (3)	V (3)	Y (4)
E430	A (54)	F (68)	G (55)	H (57)	L (58)	P (56)	Q (31)	R (39)	S (20)	V (53)							
N434	D (2)	E (2)	K (2)	R (2)	S (3)	W (18)											
Y436	I (49)	K (3)	L (4)	R (3)	S (3)	T (2)	W (3)										
Q438	E (3)	K (3)	S (2)	T (2)	W (2)	Y (2)											
K439	A (3)	D (2)	H (2)	L (2)	P (2)	T (2)	Y (4)										
S440	A (3)	C (3)	D (6)	E (2)	F (2)	G (3)	I (2)	N (2)	R (2)	T (3)	Y (64)						

(表6) 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の IgG1-005 抗体点変異物の存在下における Wien-133 細胞の溶解率。IgG1-005 野生型は、これらの条件下で細胞の 12% を溶解させた。別のアミノ酸に置換した個々の位置のそれぞれを左外欄に記している。個々の位置の横列に、それぞれの特定の位置で置換されたアミノ酸を記し、それに続いて、測定された溶解率を括弧内に示している。

位置	A	C	D	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
E345	(94)	(87)	(76)	(95)	(95)	(94)	(93)	(97)	(94)	(96)	(93)	(97)	(98)	(94)	(93)	(92)	(96)	(93)	(94)
E430	(95)	(79)	(91)	(96)	(96)	(95)	(96)	(83)	(94)	(75)	(95)	(97)	(86)	(92)	(96)	(97)	(96)	(98)	(97)
S440	(12)	(8)	(41)	(9)	F (7)	(8)	H	I (7)	K	L (7)	M	N	P	Q	R	T	V	W	Y

【 0 5 2 5 】

10

20

30

40

50

実施例7

B細胞リンパ腫皮下異種移植モデルにおけるIgG1-005-E345Rのインビボ活性

IgG1-005-E345R抗体のインビボ抗腫瘍活性を、Raji-luc #2D1細胞による皮下モデルにおいて評価した。これらの細胞は細胞1個当たりほぼ150,000個のCD38分子（QIFIKIT分析による決定、データは提示せず）および高度の補体防御受容体発現を示す。腫瘍接種および測定に関するプロトコルは、実施例20に記載したものと基本的には同じである。第0日に、200 μ L PBS中にある 5×10^6 個のRaji-luc #2D1細胞をSCIDマウスの右側腹部に皮下注射した。平均腫瘍体積が100mm³となった時点（第7日前後）で、マウスを複数群（n=7）に分けて、マウス1匹当たり抗体500 μ g（25mg/kg）の単回用量の腹腔内（i.p.）注射を行った。処置群を表7に示している。大きな苦痛を避けるために、腫瘍の測定は、1500mm³というエンドポイント腫瘍体積に達するまで、腫瘍が潰瘍化を示すまで、または重篤な臨床徴候が観察されるまで行った。

【0526】

図8Aは、全群がまだ揃っていた第21日での平均腫瘍増殖を示している。野生型抗体IgG1-005は腫瘍増殖を幾分阻害したが、これは統計学的に有意ではなかった。第21日において無関係な抗体対照と比較して腫瘍増殖を有意に阻害したのは、IgG1-005-E345Rのみであった（一元配置ANOVA分析で $p < 0.05$ ）。

【0527】

図8Bは、腫瘍サイズが500mm³よりも小さいマウスのパーセンテージに関するKaplan-Meierプロットを示している。IgG1-005-E345R抗体を投与したマウスでは、陰性対照抗体IgG1-b12（Mantel-Cox分析で $p < 0.001$ ）または野生型IgG1-005を投与したマウス（ $p < 0.05$ ）と比較して、腫瘍形成が有意に遅延した。

【0528】

これらのデータは、CD38抗体005におけるE345R変異がインビボ抗腫瘍活性の増強をもたらしたことを示している。

【0529】

（表7）処置群および投与

群	抗体	用量
1. 野生型	IgG1-005-WT	500 μ g (= 25 mg/kg)
2. CDC増強性変異体	IgG1-005-E345R	500 μ g (= 25 mg/kg)
3. 無関係なAb対照	IgG1-b12	500 μ g (= 25 mg/kg)

【0530】

実施例8

一価標的結合はE345R抗体のCDC活性をさらに増強する

b12結晶構造において観察されるIgG1六量体環の分子表面は、六量体環内の各IgGについて、2つのC1q結合部位のうち一方は環構造に対して上向きであって、もう一方の部位は下向きであり、さらに各抗体の1つのFabアームは上方に配向し、1つは下方に配向して、その結果、抗原結合にかかわるのは抗体1つ当たり1つのFabアームのみであることを明らかに示しており、このことは六量体抗体環における抗体分子1つ当たりの結合が一価であることを示唆する。一価であることにより、抗体が抗原結合に際して六量体化に適合した配向をとっている可能性がある。この仮説を検証するために、E345R変異を有する二重特異性CD38/EGFR抗体のCDC活性を、この二重特異性抗体がCD38を介して一価でしか結合できないCD38陽性でEGFR陰性のWien133細胞において試験して、同じくE345R変異を有する二価結合CD38抗体のCDC活性と比較した。ヒトモノクローナル抗体HuMax-EGFr（2F8、WO 2004/056847号に記載）を、この実施例に記載したEGFR抗体の基礎になるものとして用いた。

【0531】

二重特異性抗体は、DuoBody（商標）プラットフォームにより、すなわち、WO 2011/147

10

20

30

40

50

986号に記載されたような2-MEA誘導性Fabアーム交換により、インビトロで作製した。この方法の基礎となっているのは、特定のアッセイ条件下でヘテロ二量体の形成を促進する補完的なCH3ドメインの使用である。この方法による二重特異性抗体の生成が可能になるように、CH3ドメインにある種の変異を保有するIgG1分子を作製した：親IgG1抗体の一方にはF405L変異があり、もう一方の親IgG1抗体にはK409R変異がある。二重特異性抗体を作製するために、これらの2つの親抗体を、各抗体が最終濃度0.5mg/mLとなるように、総容積100 μ LのTE中にて、25mM 2-メルカプトエチルアミン-HCl (2-MEA) とともに、37 °Cで90分間インキュベートした。この還元反応は、スピンカラム (Microcon遠心濾過器, 30k, Millipore) を製造元のプロトコルを用いることによって還元剤2-MEAが除去されると停止する。

10

【0532】

CDCアッセイのために、 0.1×10^6 個のWien133細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、一連の濃度 (0.01 ~ 10.0 μ g/mL) の抗体とともに振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、25 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し (最終濃度20%)、37 °Cのインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0533】

図9は、予想された通り、E345R変異を有しないCD38抗体 (野生型IgG1-005およびIgG-b12-K409R \times IgG1-005-F405L) が、Wien133細胞の致死を誘導しなかったことを示している。同じく、EGFR陰性Wien133細胞と結合しなかったEGFR抗体IgG1-2F8-E345R / F405L (データは提示せず) も、予想された通り、CDCを誘導しなかった。K409R変異の導入は、IgG1-005-E345R抗体がWien133細胞においてほぼ60%の致死を誘導する能力 (実施例10に記載) に影響を及ぼさなかった。興味深いことに、CD38陽性でEGFR陰性のWien133細胞において一価でしか結合できない二重特異性CD38 / EGFR抗体であるIgG1-005-E345R / K409R \times IgG1-2F8-E345R / F405Lは、最大CDC致死の増強を示した (ほぼ60%の致死からほぼ100%に)。

20

【0534】

これらのデータは、一価標的化により、CDCを増強するE345R変異を含有する抗体の最大致死能力をさらに増強し得ることを示している。その上、これらのデータは、増強されたCDC活性によって計測されるようなオリゴマー形成を増強する変異E345Rを、DuoBodyなどの他の抗体フォーマットにも適用し得ることを示している。

30

【0535】

実施例9

オリゴマー形成増強性E345R変異は、DuoBody (商標) などの他の抗体フォーマットに適用し得る

E345R変異の効果を、DuoBodyフォーマットの二重特異性抗体において試験した。CDCアッセイを、CD20陽性でCD38陽性のWien133細胞およびRaji細胞においてCD20 / CD38二重特異性抗体を用いて行った。

【0536】

二重特異性抗体を、実施例8に記載した通りに作製した。CDCアッセイのために、 0.1×10^6 個のWien133細胞またはRaji細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、一連の濃度 (0.01 ~ 30.0 μ g/mL) の抗体とともに振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、25 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し (最終濃度20%)、37 °Cのインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

40

【0537】

図10は、E345R変異の導入により、Wien 133細胞 (図10A) およびRaji細胞 (図10B) に対する二重特異性IgG1-005-F405L \times IgG1-7D8-K409R抗体のCDCが増強されたことを示し

50

ている。これらのデータは、オリゴマー形成を増強する変異E345Rを、CDC活性を増強するために他の抗体フォーマットに適用し得ることを示している。

【0538】

実施例10

E345RはEGFR抗体2F8によるCDCを回復させ、一価標的結合によってそれをさらに増強できる

実施例3および12に記載したように、E345Rは種々の血液腫瘍標的を認識する抗体（CD20およびCD38）についてのCDCを増強するか、または回復させた。この分析を固形腫瘍抗原にも拡張するために、EGFR抗体2F8のCDC能力に対するE345Rの効果を、A431類表皮癌細胞において試験した。さらに、E345R媒介性CDC誘導に対する一価EGFR標的化の効果についても、EGFR陽性でCD20陰性のA431細胞において二重特異性EGFR × CD20抗体（IgG1-2F8-E345R / F405L × IgG1-7D8-E345R / K409R）を用いて試験した。

【0539】

二重特異性抗体を、実施例8に記載した通りに作製した。CDCアッセイのために、 5×10^6 個のA431細胞を、 $100 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr によって37℃で1時間標識した。細胞をPBSで3回洗浄し、培地中に 1×10^5 個/mLの濃度で再懸濁させた。25,000個の標識細胞を、丸底96ウェルプレート中に、総容積 $100 \mu\text{L}$ 中で、一連の濃度（3倍希釈で $0 \sim 30 \mu\text{g/mL}$ ）の非精製抗体とともに室温で15分間インキュベートした。次に、 $50 \mu\text{L}$ の正常ヒト血清希釈物を補体の供給源として添加し（最終濃度25%）、37℃のインキュベーター内で1時間インキュベートした。細胞を遠心沈降させ（ $300 \times g$ で3分間）、 $25 \mu\text{L}$ の上清を、白色96ウェルoptiplate（PerkinElmer）中の $100 \mu\text{L}$ マイクロシンチ（microscint）に添加して、振盪機（750rpm）上での15分間のインキュベーションを行った。 ^{51}Cr 放出を、シンチレーションカウンターにて1分間当たりのカウント数（cpm）として決定した。最大溶解（100%）は、Triton X-100で処理した細胞の上清中で測定された ^{51}Cr レベルによって決定した。自然発生的な溶解は、抗体を伴わずにインキュベートした細胞の上清中で測定された ^{51}Cr レベルによって決定した。特異的細胞溶解は、式：特異的溶解 = $100 \times (\text{試料cpm} - \text{自然発生的cpm}) / (\text{最大cpm} - \text{自然発生的cpm})$ 。

【0540】

図11は、IgG1-2F8-E345R / F405LはA431細胞をCDCによって溶解させ得るが、一方、野生型2F8はA431細胞を死滅させることができないことを示している。これらのデータは、E345R変異の導入によってEGFR抗体2F8においてCDC活性を回復させ得ることを示している。このことは、CDCを増強するE345R変異の適用可能範囲を、固形腫瘍抗原を標的とする抗体にも拡張し得る可能性を示すものである。

【0541】

二重特異性EGFR × CD20抗体であるIgG-2F8-E345R / F405L × IgG1-7D8-E345R / K409Rは、EGFR陽性でCD20陰性のA431細胞において、CDCのさらなる増強を示した。

【0542】

これらのデータは、実施例8に記載されたCD38結合抗体に関して仮定したように、一価であることにより、Fc-Fc相互作用の形成およびその後のCDC誘導が助長されるという仮説をさらに裏づけるものである。

【0543】

実施例11

E345Rは、CD38抗体003ならびにCD20抗体11B8およびリツキシマブによるCDCを増強するか、または回復させる

実施例3および12に記載したように、E345Rは、前記抗原をさまざまなレベルで発現する複数の細胞株に対して試験されたように、いくつかの抗体のCDC活性を、異なる標的特異性（CD20、CD38およびEGFR）で増強するか、または誘導する。このことから、E345R変異の導入は、既存の抗体についてのCDCを増強するかまたは回復させるための一般的な機序であると判断された。このことをさらに裏づけるために、CDCに対するE345R変異の効果を、Daudi細胞およびWien133細胞に対する固有のCDC活性がさまざまであるさらなる抗体：W

10

20

30

40

50

O 2006/099875号に記載されたCD38抗体003、ならびにWO 2005/103081号に記載されたCD20抗体リツキシマブ（I型）および11B8（II型）に関しても試験した。CD20抗体は2つのサブグループに分けることができる（Beers et al. Seminars in Hematology 47, (2) 2010, 107-114）。I型CD20抗体は、原形質膜中のCD20分子を脂質ラフト中に再分布させ、そのことで抗体Fc領域をクラスター化してC1q結合を向上させることによって、補体を活性化してCDCを誘発する顕著な能力を呈する。II型CD20抗体はCD20分布を明らかに変化させず、それに付随するクラスター化も伴わず、それらはCDCへの効果が比較的低い。

【0544】

0.1 × 10⁶個のDaudi細胞またはRaji細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積70 μL中で、一連の濃度（0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μg/mL）の非精製抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートした。次に、30 μLの正常ヒト血清をC1qの供給源として添加し（最終濃度30%）、37 °Cのインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μLのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0545】

図12は、E345R変異により、試験した抗体のすべてについて、（A）Daudi細胞および（B）Wien133細胞の両方に対するCDCが増強されたことを示している。興味深いことに、用いた濃度ではすべての抗体が野生型フォーマットではCDCを誘導しなかったが、E345R変異の導入後にはCDCを効率的に誘導した：Daudi細胞に対するCD38 mAb 003およびCD20 II型mAb 11B8、ならびにWien133細胞に対するCD38 mAb 005および003ならびにCD20 II型mAb 11B8。これらのデータは、抗体オリゴマー形成の増強、より具体的にはE345R変異の導入によるそれが、既存の抗体によるCDCを増強させるため、または回復させるための一般的な機序であることを示唆する。

【0546】

実施例12

E345Rは組織因子抗体の細胞内移行を増強する

増強されたオリゴマー形成によって抗体細胞内移行の増強が誘導されるか否かについて検討するために、野生型およびE345R変異型の組織因子（TF）抗体の共局在試験を、リソソームマーカーLAMP1を用いて、共焦点顕微鏡検査によって行った。

【0547】

SK-OV-3細胞を、標準的な組織培養培地中にて、カバーガラス（厚さ1.5ミクロン、Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany）上で37 °Cで1日間増殖させた。リソソーム活性をブロックするために、細胞を50 μg/mLロイペプチン（Sigma）とともに細胞を1時間ブレインキュベートし、その後に10 μg/mLの組織因子（TF）抗体（WO 2010/066803号）を添加した。細胞を37 °Cでさらに1時間、3時間または16時間インキュベートした。その後に、細胞をPBSで洗浄し、4%ホルムアミド（Klinipath）とともに室温（RT）で30分間インキュベートした。スライドをブロッキング緩衝液（0.1%サポニン [Roche] および2% BSA [Roche] を加えたPBS）で洗浄して、ホルムアミドを失活させるために20mM NH₄Clを含むブロッキング緩衝液とともに20分間インキュベートした。スライドをブロッキング緩衝液で再び洗浄して、リソソームLAMP1を同定するためのマウス-抗ヒトCD107a-APC（BD Pharmingen）とTF抗体を同定するためのヤギ-抗ヒトIgG-FITC（Jackson）との混合液とともに、室温で45分間インキュベートした。スライドをブロッキング緩衝液で再び洗浄した上で、20 μLのマウント用培地（6gのグリセロール [Sigma] および2.4gのMowiol 4-8 [Omnilabo] を6mLの蒸留水に添加して、それに12mLの0.2M Tris [Sigma] pH8.5を添加し、その後に50 ~ 60 °Cで10分間のインキュベーションを行ったもの；マウント用培地は定量分取して-20 °Cで貯蔵した）を用いて顕微鏡スライドに一晩かけてマウントした。63倍の1.32-0.6油浸対物レンズおよびLAS-AFソフトウェアを装備したLeica SPE-II共焦点顕微鏡（Leica Microsystems）を用いて、スライドを撮像した。

【0548】

12ビットのグレイスケールTIFF画像を、MetaMorph（登録商標）ソフトウェア（Meta Se

10

20

30

40

50

riesバージョン6.1、Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, USA)を用いて、共局在に関して解析した。画像はスタックとして取り込み、バックグラウンドを差し引いた。すべてのFITC画像およびすべてのAPC画像に対して同一の閾値設定を用いた(手動で設定)。共局在は、関心対象領域(ROI)におけるFITCのピクセル強度として示され、ここでROIはAPC陽性領域のすべてで構成される。異なるTF抗体で染色された異なるスライドを比較するために、APCのピクセル強度を用いて画像を正規化した。マウス-抗ヒトCD107a-APCを、リソソームマーカーLAMP1(CD107a)を染色するために用いた。LAMP1のピクセル強度は、撮像したさまざまなTF抗体間で異なっているべきではない。

【0549】

FITCとAPCとの共局在に関する正規化された値は、式 $[(FITCのTPI \times 共局在率) / 100] \times [1 / APCのTPI]$ に従い、任意単位として表される。

共局在率 = APCピクセルと共局在するFITCのTPI / APCのTPI

TPI、総ピクセル強度

【0550】

図13は、APC標識したリソソームマーカーと重なり合う、野生型およびE345R変異型のTF抗体のFITCピクセル強度の量を示している。試験した各抗体または条件について、ほぼ1個、3個または5個を上回る細胞を含む1枚のスライドからの3つの異なる画像を解析した。各スライド内の異なる画像間には差異が観察された。しかし依然として、抗体011および098に対するE345R変異が、野生型011および098と比較した場合に、1時間インキュベーション後のリソソーム共局在の増強をもたらしたことは明白であった。これらの結果は、変異E345Rがより迅速な細胞内移行およびリソソーム共局在を誘導し、それによって抗体薬物結合体を増強し得ることを示している。

【0551】

実施例13

CD20発現は同程度であるが膜結合型補体調節タンパク質のレベルが異なる種々のB細胞株における、リツキシマブ中のE345R変異によるCDCの増強

実施例11および14は、Daudi細胞およびWien133細胞に対する野生型リツキシマブのCDC活性が、E345R変異を導入することによって増強されたことを示している。この増強されたCDC活性は、Fc-Fc相互作用のE345R媒介性安定化に起因する。続いて、それに伴って形成された標的細胞膜上の六量体抗体環構造が、細胞膜の近傍にある活性化補体成分の捕捉および濃縮を助長することによって、膜傷害性複合体の有効な生成を促進させることができる。この有効な補体活性化の結果として、膜結合型補体調節タンパク質(mCRP)による阻害効果が部分的に克服され得ると考えられる。CD55、CD46およびCD59などのmCRPの過剰発現は、モノクローナル抗腫瘍抗体を用いる免疫療法の奏効のための障害になると考えられている(Juriansz et al., Mol Immunol 1999 36 :929-39; Fishelson et al. Mol Immunol 2003 40: 109-23, Gorter et al., Immunol Today 1999 20: 576-82, Zell et al., Clin Exp Immunol. 2007 Dec 150(3): 576-84)。このことから、mCRPであるCD46、CD55およびCD59のレベルは異なるがCD20標的発現のレベルは同等である一連のB細胞株に対するリツキシマブ-E345Rの活性を、野生型リツキシマブのそれと比較した。

【0552】

B細胞株であるDaudi、WIL2-S、WSU-NHL、MEC-2およびARH-77は、QIFIKIT分析による決定で、同等量のCD20分子を発現する(特異的抗体結合能力 sABCがほぼ250,000)(データは提示せず)。これらの細胞株の間での補体調節タンパク質の発現レベルを比較するために、CD46(マウス抗ヒトCD46、CBL488、クローンJ4.48 Chemicon)、CD55(マウス抗ヒトCD55、CBL511、クローンBRIC216、Chemicon)およびCD59(マウス抗ヒトCD59、MCA1054x、クローンMEM-43、Serotec)のレベルを決定するためのQIFIKIT分析を行った。

【0553】

CDCアッセイのために、 0.1×10^6 個の細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、飽和性の一連の濃度(4倍希釈で0.002~40.0 μ g/mL)の抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートした。次に、25 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給

10

20

30

40

50

源として添加し（最終濃度20%）、37 のインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。最大CDC媒介性致死を、GraphPad PRISM 5における非線形適合の最良適合値の最上位のものを用いて、独立した2回の実験から算出した。

【0554】

図14A~Dは、野生型リツキシマブへのE345Rの導入により、試験したすべてのB細胞株についての最大溶解の増強およびEC₅₀の低下によって観察されたように、CDC活性の増強がもたらされたことを示している。

【0555】

図14Eは、リツキシマブ-E345R変異体によって誘導される最大CDC媒介性致死が、膜結合型補体調節タンパク質の発現レベルとは無関係に、野生型リツキシマブよりも常に高度であったことを示している。これらのデータは、腫瘍細胞がE345Rを含有する抗体による抗体媒介性補体攻撃を回避する効果はより低いことから、E345Rの導入により、モノクローナル抗体の治療能力が増強されることを示している。

【0556】

実施例14

野生型抗体およびE345R抗体に関するCDC動態の比較

実施例3（Daudi、RajiおよびWien133に対するCD38抗体005）および実施例11（DaudiおよびWien133に対するCD38抗体003ならびにCD20抗体リツキシマブおよび11B8）に記載された種々の細胞株に対する種々の抗体に関するEC₅₀値の低下および最大溶解の増強によって観察されたように、Fc:Fc相互作用を安定化するE345R変異の導入は、CDCを増強させるか、または回復させることが示された。次に、野生型抗体とE345R抗体との間でのCDC活性の差をさらに解明するために、CDC反応の動態を分析した。

【0557】

0.1 $\times 10^6$ 個のRaji細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、飽和濃度（10.0 μ g/mL）の抗体とともに振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、25 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37 のインキュベーター内で、0~60分間の範囲にわたる種々の期間にわたってインキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0558】

図15Aは、野生型CD20抗体IgG1-7D8がRaji細胞の80%という最大CDC媒介性致死を示し、試験条件下で5分後には既にそれに達したことを示している。しかし、IgG-7D8-E345Rについては、Raji細胞の80%致死がより迅速に、3分後には観察された。また、IgG-7D8-E345Rによる最大溶解（95%）にも5分後には到達した。

【0559】

図15Bは、用いたRaji細胞においてCDCを誘導する効力が7D8よりも弱い野生型CD20抗体リツキシマブについても、E345R変異の導入により、標的細胞のより迅速な致死がもたらされたことを示している。野生型リツキシマブは32%という最大CDC媒介性致死を示し、それには20分後に到達した。リツキシマブ-E345Rはおよそ3分後に32%の致死に既に到達しており、注目すべきことに、リツキシマブ-E345Rによる最大溶解（85%）にも20分後に到達した。

【0560】

図15C+Dは、野生型CD38抗体IgG1-003およびIgG1-005によるCDC媒介性致死に対して抵抗性である、用いたRaji細胞を、E345R変異を導入することによって迅速に死滅させることができたことを示している。IgG1-003-E345RおよびIgG1-005-E345Rは、最大CDC（それぞれ50%および60%）を既に5分間後に示した。

【0561】

以上をまとめると、E345R抗体は、それらの野生型対応物よりも効力が強く、そのこと

10

20

30

40

50

は、より高い活性（より低いEC₅₀）、最大溶解の増強、およびCDC反応のより迅速な動態の組み合わせに起因する。

【0562】

実施例15

E345R変異を伴うか、または伴わない二重特異性抗体に関するCDC動態の比較

実施例9には、DuoBodyプラットフォームによって作製されたCD38×CD20二重特異性抗体であるIgG1-005-F405L × IgG1-7D8-K409Rに対してE345R変異を適用して、Raji細胞およびWien133細胞でのCDCアッセイにおけるEC₅₀の低下によって観察されたように、致死能力の増強をもたらす得ることが記載されている。次に、E345Rを伴うCD38×CD20二重特異性抗体とそれを伴わないものとの間でのCDC活性の差をさらに解明するために、CDC反応の動態を分析した。

10

【0563】

0.1×10⁶個のRaji細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100μL中で、飽和濃度（10.0μg/mL）の抗体とともに振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートした。次に、25μLの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37℃のインキュベーター内で、0～60分間の範囲にわたる種々の期間にわたってインキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10μLのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0564】

図16は、二重特異性抗体IgG1-005-F405L × IgG1-7D8-K409Rが83%という最大CDC媒介性致死を誘導し、10分後にはそれに達していたことを示している。E345Rの導入は、IgG1-005-E345R-F405L × IgG1-7D8-E345R-K409Rによる最大致死の増強をもたらす（98%）、2分後には既にそれに達していた。これらのデータは、Fc-Fcを安定化するE345R変異を二重特異性抗体に導入することにより、標的細胞のCDC媒介性致死の迅速化がもたらされることを示している。

20

【0565】

実施例16

E345Rを伴うおよび伴わない一価結合抗体に関するCDC動態の比較

実施例8は、一価標的結合により、CD38陽性でEGFR陰性のWien133細胞に対するCD38×EGFR二重特異性抗体による最大溶解の増強によって観察されたように、E345R抗体のCDC活性がさらに増強されたことを示している。次に、E345Rを伴う一価性結合抗体とそれを伴わないものとの間でのCDC媒介性致死能力の差をさらに解明するために、CDC反応の動態を分析した。

30

【0566】

E345R変異を伴うかまたは伴わない二重特異性CD38×EGFR抗体およびCD20×EGFR抗体を、実施例8に記載したようにDuoBodyプラットフォームによってインビトロで作製した。CD38×EGFR二重特異性抗体のCDC活性を、二重特異性抗体がCD38を介して一価でしか結合できない、CD38陽性でEGFR陰性のRaji細胞において試験した。0.1×10⁶個のRaji細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100μL中で、飽和濃度（10.0μg/mL）の抗体とともに振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートした。次に、25μLの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37℃のインキュベーター内で、0～60分間の範囲にわたる種々の期間にわたってインキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10μLのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

40

【0567】

図17は、二重特異性抗体CD38×EGFR（IgG1-005-K409R × IgG1-2F8-F405L）が、55%という最大CDC媒介性致死を誘導し、およそ10分後にはそれに到達したことを示している。E345Rの導入は最大致死の増強をもたらす（96%）、それには5分以内に既に到達した。

【0568】

図17は、二重特異性抗体CD20×EGFR（IgG1-7D8-K409R × IgG1-2F8-F405L）が、85%と

50

いう最大CDC媒介性致死を誘導し、およそ5分後にはそれに到達したことを示している。しかし、E345Rが導入されたCD20×EGFR抗体を用いた場合には、85%の溶解がより迅速に、2分後には観察された。また、E345R CD20×EGFR抗体による最大溶解（97%）にも5分後には到達した。

【0569】

以上をまとめると、これらの一価結合抗体へのE345R変異の導入によって、より効力の強い抗体がもたらされ、そのことは、最大溶解の増強と、CDC反応のより迅速な動態との組み合わせに起因する。

【0570】

実施例17

治療用抗体とE345R/Q386K抗体との組み合わせによるCDC

実施例6に記載したように、IgG1-005に由来する変異型CD38抗体は、野生型抗体のE345位置をグルタミン酸（E）以外の任意のアミノ酸に置換することによって、Wien133細胞において有効なCDCを誘導できた。このことは、CDCの前提条件としてのオリゴマー形成が、抗体の位置345でのグルタミン酸側鎖の存在によって妨げられることを示唆する。1つのFc上のE345は、六量体抗体環構造において対向する第2のFc部分上のQ386に近接しているため、第1の抗体におけるオリゴマー形成のE345媒介性妨害は、第2の抗体のQ386位置での置換によっておそらく取り除かれ得ると考えられる。これにより、続いて、第1の抗体におけるE345が、第2の抗体における変異させた386位置と、この両方の抗体を組み合わせた場合に、より良好に相互作用することが可能になると考えられる。この仮説を検証するために、Wien133に対して、一例として野生型抗体（IgG1-003、IgG1-005またはIgG1-11B8）をIgG1-005-E345R/Q386KまたはIgG1-005-E345R/Q386K/E430Gと混合するCDCアッセイを行った。

【0571】

0.1×10^6 個のWien133細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、一連の濃度（3.33倍希釈で0.0001～20.0 μ g/mL）の非精製IgG1-005-E345R/Q386K、IgG1-005-E345R/Q386K/E430Gまたは対照抗体とともに、1.0または10.0 μ g/mLの野生型IgG1-003、IgG1-005またはIgG1-11B8抗体の存在下または非存在下で、振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、25 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37 のインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0572】

図18A/B/Cは、CD38抗体IgG1-005-E345R/Q386Kが、Wien133細胞のCDC媒介性溶解を用量依存的な様式で誘導したことを示している（破線）。IgG1-005-E345R/Q386Kと、1 μ g/mLまたは10 μ g/mLの野生型CD38抗体IgG1-003（図18A）または野生型CD20抗体IgG1-11B8（図18B）とを組み合わせることにより、最大細胞溶解の増強がもたらされた。IgG1-005-E345R/Q386Kと野生型IgG1-005とを組み合わせることにより、CDCが用量依存的な様式で阻害されたが、これはおそらく結合部位をめぐる競合によると考えられる（図18C）。

【0573】

図18D/E/Fは、CD38抗体IgG1-005-E345R/Q386K/E430Gに関する同様のデータを示している。

【0574】

これらのデータは、野生型抗体IgG1-003およびIgG1-11B8が、IgG1-005-E345R/Q386KまたはIgG1-005-E345R/Q386K/E430Gと組み合わせられた場合に、抗体オリゴマー形成およびCDC活性化にかかわったことを示している。そのような組み合わせでは、野生型抗体に存在するE345位置によるオリゴマー形成の妨害が、変異型抗体におけるQ386置換によって、少なくとも部分的には取り除かれ得ると考えられる。本出願は特に、リツキシマブ、オファツムマブ、ダラツムマブまたはトラスツズマブといった、E345位置において野生型である抗体を用いる治療法を改良する上で興味深い。また、そのようなオリゴマー形成誘導

10

20

30

40

50

性の抗体は、腫瘍細胞または細菌のような標的細胞を対象とする患者自身の抗体との細胞結合型複合体の形成も促進し得る可能性がある。

【0575】

実施例6は、それらの特定の変異が、CD38抗体IgG1-005に組み入れられた場合にWien133細胞に対する有効なCDCを誘導した、変異を受けるとCDCを増強する、E345のほかの複数のアミノ酸、例えばE430およびS440を記載している。I253およびY436変異体を除き、同定されたオリゴマー形成を増強する変異は、六量体環構造において、対向性の第2のFc部分上の変異していないアミノ酸と接触している。したがって、同定されたオリゴマー形成を増強する変異は、単独または組み合わせのいずれでも、変異していない抗体とのオリゴマー形成をも促進すると予想することができ、実施例6で適用したものと類似の選別戦略によって、そのような変異体のさらなる最適化を達成し得ると考えられる。

10

【0576】

実施例18

E345RはIgG2、IgG3およびIgG4抗体アイソタイプにおけるCDCを誘導した

オリゴマー形成促進性変異の導入によって、非IgG1抗体アイソタイプのCDC活性が刺激され得るか否かを検討するために、当技術分野において公知の方法によって、CD38抗体IgG1-005のアイソタイプ変異体をヒトIgG2、IgG3またはIgG4の定常ドメインを用いて作製し、IgG2-005、IgG3-005およびIgG4-005を得た。さらに、オリゴマー形成増強性E345R変異をこれらの抗体すべてに導入して、IgG2-005-E345R、IgG3-005-E345RおよびIgG4-005-E345Rを得た。同様の様式で、CD38抗体IgG1-003からIgG2-003およびIgG2-003-E345Rも作製した。種々のアイソタイプのCDC活性を、インビトロCDCアッセイにおいて比較した。

20

【0577】

0.1×10^6 個のWien133細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μ L中で、10 μ g/mLの非精製抗体とともに振盪機上にて室温で15分間ブレインキュベートした。IgG1-005-E345Rを3.0 μ g/mLで添加した。次に、25 μ Lの正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度20%）、37 のインキュベーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に載せることによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加して、細胞溶解をFACSによって決定した。

【0578】

図19は、IgG2-005、IgG2-003、IgG3-005およびIgG4-005が、試験した条件下では、（A）Daudi細胞も（B）Wien133細胞も効率的に溶解させることができなかったことを示している（観察されたほぼ20%の溶解はバックグラウンドと考えられた）。E345R変異の導入により、試験したすべてのIgGアイソタイプに関して、Daudi細胞に対する強力なCDCが可能となった。これらの結果はWien133細胞に対するCDCを用いても確認されたものの、IgG3-005-E345Rは他のアイソタイプ変異体と比較して限定されたCDC活性を呈した。これらのデータは、E345Rなどのオリゴマー形成を増強する変異を、IgG1に加えて、IgG2、IgG3およびIgG4抗体のCDC活性を促進するためにも適応し得ることを示している。

30

【0579】

実施例19

患者由来のCD38陽性B細胞慢性リンパ球白血病（CLL）細胞についてのエキスピボCDCアッセイにおけるIgG1-005およびIgG1-005-E345RによるCDC

40

CLL患者試料由来の凍結保存された初代細胞を、CDB-IDIBAPS-Hospital Clinic (Dr. Elias Campo, Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain) からの血液学バイオバンク (hematopathology biobank) から、または米国国立心肺血液研究所 (National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI)) (Dr. Adrian Wiestner, NHLBI, Hematology Branch of the National Institutes of Health (NIH), Bethesda) による臨床研究例から得た。Hospital Clinic (Barcelona, Spain) の国際倫理委員会 (Institutional Ethics Committee) またはNIHの施設内審査委員会 (Institutional Review Board) およびヘルシンキ宣言 (Declaration of Helsinki

50

i) に準拠して、すべての患者からインフォームドコンセントを得た。すべての試料を、遺伝学的および免疫表現型的に特性決定した。

【0580】

CLL試料を、FACSによって決定したそのCD38発現に従って、2群にカテゴリー分けした：5件の試料は高CD38群（Daudi細胞上のCD38発現が50%～98%）に含められ、4件の試料は低CD38群（Daudi細胞上のCD38発現が0.5%～3%）に含められた。

【0581】

蛍光標識したCLL細胞（5μMカルセインAMによる標識）を、一連の濃度（10倍希釈で0.01～10μg/mL）の抗体とともにインキュベートした。次に、抗体でオプソニン化した細胞（100,000個/ウェル）に対して、正常ヒト血清を補体の供給源として添加し（最終濃度10%）、37℃で45分間インキュベートした。上清を回収し、細胞溶解の指標として、蛍光をSynergy（商標）HT蛍光光度計で読み取った。細胞致死は以下の通りに算出した：特異的溶解 = $100 \times (\text{試料} - \text{自然発生的溶解}) / (\text{最大溶解} - \text{自然発生的溶解})$ 、式中、最大溶解は1% Tritonで処理した細胞の試料によって決定され、自然発生的溶解は、抗体を伴わずに10% NHSの存在下で細胞をインキュベートした試料から決定される。

【0582】

図20は、IgG1-005-E345Rが、CD38発現が高度であるCLL初代細胞およびCD38発現が軽度であるCLL初代細胞のいずれに対しても、野生型IgG1-005と比較してCDC活性を強く増強したことを示している。

【0583】

実施例20

IgG1-005-E345R / E430G / S440Yは溶液中で非共有結合性六量体複合体を形成する

IgG1-005-E345R / E430G / S440Y三重変異体を、Quikchange部位指定変異誘発キット（Stratagene, US）を用いて調製した。手短に述べると、所望の変異E345Rをコードする順方向および逆方向プライマーを用いて、IgG1m(f) アロタイプを有するIgG1-005重鎖をコードする全長プラスミドDNAテンプレートを複製した。その結果得られたDNA混合物を、ソースプラスミドDNAを取り除くためにDpnIを用いて消化した上で、大腸菌の形質転換に用いた。その結果得られたコロニーから単離した変異型プラスミドDNAを、DNAシーケンシング（Agowa, Germany）によって確かめた。E430G変異は、同じ戦略を用いてIgG1-005-E345R骨格に導入した。S440Y変異は、同じ戦略を用いてIgG1-005-E345R / E430G骨格に導入した。抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードするプラスミドDNA混合物を、293fectin（Invitrogen, US）を本質的には製造元による記載の通りに用いて、Freestyle HEK293F細胞（Invitrogen, US）に一過性にトランスフェクトさせた。その結果得られた抗体は、両方の重鎖にE345R / E430G / S440Y三重変異を含むホモ二量体である。

【0584】

IgG1-005抗体およびIgG1-005-E345R / E430G / S440Y抗体を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。細胞培養上清を0.20μMデッドエンドフィルターに通して濾過し、その後に5mLプロテインAカラム（rProtein A FF, GE Healthcare, Uppsala, Sweden）にローディングして、0.1Mクエン酸-NaOH、pH 3によってIgGを溶出させた。溶出液を2M Tris-HCl、pH 9によって直ちに中和し、12.6mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、pH 7.4（B. Braun, Oss, Netherlands）に対して一晩透析した。透析後に、試料を0.20μMデッドエンドフィルターに通して滅菌濾過した。精製タンパク質を、SDS-PAGE、非変性PAGE、HP-SEC、多重角光散乱（MALS）および動的な光散乱（DLS）によって分析した。

【0585】

SDS-PAGEは、試料を中性pHで泳動させるLaemmli法（Laemmli 1970 Nature 227(5259): 680-5）の変法を用いて、4～12% NuPAGE Bis-Trisゲル（Invitrogen, Breda, Netherlands）上で還元条件および非還元条件下で行った。SDS-PAGEゲルをCoomassieで染色し、GeneGenius（Synoptics, Cambridge, UK）を用いてデジタル画像にした。図21は、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yが、ジスルフィド架橋した重鎖および軽鎖を有するIgG1抗体に典型的な挙動を呈したことを示している。非還元条件下では、見かけの分子量がおおよそ150kDa

10

20

30

40

50

である単一の分子種が視認されたが、一方、還元条件下では、見かけの分子量が50kDaの重鎖および26kDaの軽鎖が視認された。本発明者らは、変性条件下では、野生型IgG1抗体に非常に類似した挙動を呈する単量体分子が形成されると結論づけた。

【0586】

非変性PAGEを、Sebia Hydragel 15 / 30タンパク質ゲル (Westburg, Leusden, Netherlands)、アシッドバイオレット染色を用いて非還元条件下で行い、Hydrasys装置 (Sebia, Vilvoorde, Belgium) で泳動させた。図21は、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yが、びまん性が幾分高いものの、無関係なIgG1-b12対照抗体と同程度の高さに泳動されたことを示している。観察されたびまん性の染色は不安定な複合体の形成に起因する可能性があるが、これらのPAGE条件下では、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yは主として単量体IgG1分子のよう

10

【0587】

HP-SEC分画を、TSK HP-SECカラム (G3000SW_{xl}; Tosoh Biosciences, Omnilabo, Breda, Netherlands経由)、Waters 2487二重吸光度検出器 (Waters)、およびMini Dawn Treos MALS検出ユニット (Wyatt) に接続されたWaters Alliance 2975分離ユニット (Waters, Etten-Leur, Netherlands) を用いて行った。1.25 µg / mLタンパク質を含有する50 µL試料を、pH 6.8に緩衝化された0.1M Na₂SO₄ / 0.1Mリン酸ナトリウム中にて1mL / 分で分離させた。結果はEmpowerソフトウェア・バージョン2002を用いて処理し、ピークごとに総ピーク面積に占める割合として表した。図22は、野生型IgG1-005の99%超がインタクトな単量体IgGからなり、凝集物は事実上全く形成されなかったことを示している。図23は、三

20

【0588】

野生型IgG1-005およびIgG1-005-E345R / E430G / S440YのHP-SECプロファイルの重ね合わせを図24に示しており、これはこの2つの抗体の挙動の違いをさらに例証している。IgG1-005-E345R / E430G / S440Yは高MW複合体を明らかに形成したが、タンパク質のかなりの量が2つのピーク間で溶出したことから示されるように、これらの複合体はHP-SEC分離による影響を受けやすいと思われた。おそらく、HP-SEC分離によって引き起こされる剪断により、IgG1-005-E345R / E430G / S440Y単量体の集合によって形成される非共有結合性複合体を不安定したものと考えられる。

30

【0589】

IgG1-005-E345R / E430G / S440Y試料において観察されたオリゴマー複合体のサイズを評価するために、HP-SEC溶出液の平均分子量を多重角光散乱 (MALS) によって判定した。弱い単量体のピークが見かけの平均MW143kDa (予想では145.4kDa) で溶出したが、多量体ピークは見かけの平均MW772kDaで、すなわち単量体サブユニットおよそ5.4個分として溶出した。複合体のMWはおそらく、これらの条件下での複合体の不安定性からみて実際より小さく評価されている。例えば、六量体種が88%で単量体種が12%の混合物を共溶出させると、結果として観察される平均複合体サイズは5.4単量体単位になると考えられる。

【0590】

40

溶液中での見かけの分子量を評価するために、HP-SECマトリックスとの相互作用によって誘導される可能性のある剪断の非存在下で、動的光散乱 (DLS) 分析を行った。0.2 µm フィルターを通したIgG1-005 (3.80mg / mL) またはIgG1-005-E345R / E430G / S440Y (2.86 mg / mL) の入ったPBS pH 7.4の45 µLを、100 µL石英キュベットに入れてDynaPro-801装置 (Protein Solutions Inc / Wyatt, Dernbach, Germany) を用いて分析し、3回の独立した実験で、各実験当たり20回の連続測定の実行を行った。参照用にBSAのMWを用いて補正したところ、IgG1-005の見かけの分子量は141.7kDaであり (予想では145.4)、一方、IgG1-005-E345R / E430G / S440YのMWはおよそ875.6kDa、すなわち単量体サブユニット6.17個分を示した。IgG1-005抗体についてはオリゴマー形成の徴候は観察されず、一方、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yでは非常に有効な複合体形成が示唆された。

50

【 0 5 9 1 】

以上をまとめると、生物物理学的データにより、変異体IgG1-005-E345R / E430G / S440Yは、変性条件下では、SDS-PAGEによって観察されたように、単量体の、すなわち単一の二量体タンパク質であるジスルフィド架橋したIgG1様分子を形成するが、溶液中では、DLSによって観察されたように六量体複合体を形成することが示された。非変性PAGEによって付与される切断は複合体を完全に解離させるのに十分であり、一方、HP-SECは、単量体がわずかな割合で存在したことによって示されるように、主として六量体である複合体を部分的に不安定化した。

【 0 5 9 2 】

実施例21

IgG1-005、IgG1-005-E345R / E430G / S440YおよびIgG1-005-E345Rを用いた機能アッセイ
C1q結合ELISA

野生型IgG1-005、三重変異体IgG1-005-E345R-E430G-S440YおよびIgG1-005-E345RによるC1q結合を、精製抗体をプラスチック表面上に固定化してランダムな抗体多量体化を生じさせるELISAにおいて試験した。プールヒト血清をC1qの供給源として用いた。

【 0 5 9 3 】

96ウェルのMicrolon ELISAプレート (Greiner, Germany) を、PBS中にある抗体の系列希釈物 (2.5倍希釈で0.007 ~ 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲) により、4 で一晩かけてコーティングした。プレートを洗浄し、0.025% Tween 20および0.1%ゼラチンを加えた200 μL / ウェルの0.5倍PBSによってブロックした。インキュベーションの間に洗浄を行いながら、3% プールヒト血清 (Sanquin、製品番号M0008) とともに37 で1時間、100 μL / ウェルのウサギ抗ヒトC1q (DAKO、製品番号A0136、1 / 4,000) とともに室温で1時間、および検出用抗体としての100 μL / ウェルのブタ抗ウサギIgG-HRP (DAKO、P0399、1 : 10,000) とともに室温で1時間、逐次的にインキュベートした。現像は、1mg / mLの2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-硫酸) (ABTS; Roche, Mannheim, Germany) を用いて約30分間行った。反応を100 μL の2% シュウ酸の添加によって停止させた。吸光度を、マイクロプレートリーダー (Biotek, Winooski, VT) にて405nmで測定した。対数変換データを、Graph Pad Prismソフトウェアを用いて可変勾配によるシグモイド用量反応曲線に適合させることによって解析した。シグモイド用量反応曲線からEC50値を算出した。

【 0 5 9 4 】

図25および表8は、ELISAによる測定で、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yが、WT IgG1-005およびIgG1-005-E345Rよりも有効なC1q結合を示したことを示している (EC50値がより低い)。コーティングの有効性を3種の抗体で試験したところ、同程度であることが見いだされた (提示せず)。

【 0 5 9 5 】

(表 8) ELISAにおけるC1q結合に関するEC₅₀

抗体	EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
IgG1-005-WT	1.551
IgG1-005-E345R/E430G/S440Y	0.52
IgG1-005-E345R	0.836

【 0 5 9 6 】

CD38陽性Ramos細胞に対するCDCアッセイ

0.1 $\times 10^6$ 個のRamos細胞を、丸底96ウェルプレート中にて、総容積100 μL で、一連の濃度 (10、3、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.005、0.0025、0.0013、0.0006および0.0003 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の精製抗体とともに、振盪機上にて室温で15分間プレインキュベートした。次に、補体の供給源として25 μL の正常ヒト血清を添加し (20%最終濃度)、37 のインキュベ

ーター内で45分間インキュベートした。プレートを氷上に置くことによって反応を停止させた。10 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加し、細胞溶解をFACSによって判定した。

【 0 5 9 7 】

三相モデルを用いてIgG1-005-E345R / E430G / S440Yデータの適合化を行い、EC50値の中央値を算出した(表9)。IgG1-005-WTおよびIgG1-005-E345Rは、可変勾配を用いるシグモイド用量反応曲線の適合化によって適合させることができた。シグモイド用量反応曲線からEC50値を算出した(表9)。データの適合化にはGraphPad Prismソフトウェアを用いた(図26)。IgG1-005-E345R / E430G / S440Yは、Ramos細胞に対して、野生型IgG1-005抗体およびIgG1-005-E345R抗体と比較してCDC活性の増強を示した。IgG1-005-E345R / E430G / S440Yの三相モデルは、低濃度(0.0003 ~ 0.03 μ g / mL)では、安定な六量体の中にある抗体のすべてが、有効なCDCの誘導のために標的と結合する必要があるわけではないという事実によって説明できる。抗原のクラスター化は抗体の六量体化に必要ではないことから、實際上、細胞表面C1q結合部位は、既に低い抗体濃度でIgG1-005-E345R / E430G / S440Y結合によって作り出される。

【 0 5 9 8 】

(表9) CDCに関するEC50

抗体	EC ₅₀ (μ g / mL)
IgG1-005-WT	0.116
IgG1-005-E345R/E430G/S440Y	0.005 (中央値 EC50)
IgG1-005-E345R	0.026

【 0 5 9 9 】

CD38陽性Raji細胞を用いるADCCレポーターアッセイ

Raji標的細胞上でオプソニン化した抗CD38抗体のADCC活性を、エフェクター細胞における生物学的経路の活性化を定量するADCC生物発光レポーターアッセイ(Promega Madison, WI, USA)を用いて測定した。

【 0 6 0 0 】

このレポーターアッセイでは、エフェクター細胞として、Fc γ RIIIa受容体の遺伝子、V158(高親和性)変異体、およびルシフェラーゼ発現を作動させるNFAT(活性化T細胞核内因子)応答エレメントの後にクローニングされたホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子が安定的にトランスフェクトされたJurkat細胞を用いる。エフェクター細胞上のFc γ RIIIa受容体に対する抗体結合により、NFAT媒介性遺伝子転写が誘導され、それ故にルシフェラーゼ発現が誘導され、それを発光の読み取りによって定量する。Raji細胞を一連の濃度(250、71.4、20.4、5.8、1.7および0.5ng / mL)の精製抗体とともにインキュベートした。材料および方法のそれ以上の説明については、Promegaが提供している技術マニュアルを参照されたい。IgG1-005-E345R / E430G / S440Yは、Fc γ RIIIa受容体との係合後にNFAT経路活性化を誘導した。図27は、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yによってオプソニン化されたRaji細胞が、このレポーターアッセイによる測定で、エフェクター細胞のFc γ RIIIa媒介性活性化を誘導したことを示している。IgG1-005-E345R / E430G / S440Yに関するEC50値は、野生型IgG1-005およびIgG1-005-E345Rよりも高かった(表10)。しかし、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yに関する最大シグナルは野生型IgG1-005およびIgG1-005-E345Rよりも高かった(表10)。

【 0 6 0 1 】

(表10) ADCCレポーターアッセイに関するEC50および最大シグナル

抗体	EC ₅₀ (ng/mL)	最大シグナル (RLU)
IgG1-005-WT	9.5	334878
IgG1-005-E345R/E430G/S440Y	36	393802
IgG1-005-E345R	4.7	172293

【 0 6 0 2 】

実施例22

野生型IgG1-005と比較したIgG1-005-E345R / E430G / S440Yの薬物動態 (PK) 分析

10

この試験におけるマウスは、Central Laboratory Animal Facility (Utrecht, The Netherlands) のバリアユニットに収容し、フィルタートップケージに入れた上で、水および飼料を自由に摂取させた。実験はすべて、Utrecht大学の動物倫理委員会によって承認された。SCIDマウス (C.B-17 / lcrCrI-scid-BR, Charles-River) に対して、1群当たりマウス3匹を用いて、500 µgの抗体 (野生型IgG1-005またはIgG1-005-E345 / E430G / S440Y) を静脈内注射した。

【 0 6 0 3 】

抗体投与から10分後、4時間後、1日後、2日後、7日後、14日後および21日後に、伏在静脈から50 µLの血液試料を収集した。血液をヘパリン含有バイアル中に収集し、10,000gで5分間遠心分離した。抗体濃度の決定まで血漿を-20 °Cで貯蔵した。

20

【 0 6 0 4 】

特定のヒトIgG濃度は全hIgGおよびCD38特異的サンドイッチELISAを用いて決定した。全hIgG ELISAのためには、96ウェルMicrolon ELISAプレート (Greiner, Germany) に2 µg / mLの濃度でコーティングしたマウスmAb抗ヒトIgG- クローンMH16 (#M1268, CLB Sanquin, Netherlands) を捕捉用抗体として用いた。0.2% ウシ血清アルブミンを加えたPBSでプレートをブロックした後に、試料を添加し、ELISA緩衝液 (0.05% Tween 20および0.2% ウシ血清アルブミンを加えたPBS) 中に系列希釈した上で、室温 (RT) にて振盪機で1時間、プレート上でインキュベートした。プレートをその後に、ヤギ抗ヒトIgG免疫グロブリン (#109-035-098, Jackson, West Grace, PA) とともにインキュベートし、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンズチアゾリン-6-硫酸) (ABTS; Roche, Mannheim, Germany) で現像した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Biotek, Winooski, VT) で405nmで測定した。特異的CD38 ELISAのためには、Hisタグ付加CD38細胞外ドメインを、96ウェルMicrolon ELISAプレート (Greiner, Germany) に2 µg / mLの濃度でコーティングした。ELISA緩衝液でプレートをブロックした後に、ELISA緩衝液で系列希釈した試料を添加し、室温 (RT) にて振盪機で1時間、プレート上でインキュベートした。プレートをその後に、30ng / mLのマウス抗ヒトIgG1-HRP (Sanquin M1328、クローンMH161-1) とともにインキュベートし、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンズチアゾリン-6-硫酸) (ABTS; Roche, Mannheim, Germany) で現像した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Biotek, Winooski, VT) で405nmで測定した。

30

【 0 6 0 5 】

図28は、調べた時点のすべてで、血漿中ヒトIgG濃度が、変異体IgG1-005-E345R / E430G / S440Yの方がIgG1-005野生型よりもかなり低かったことを示している。図29は、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yのクリアランス速度が、WT IgG1-005のものよりもおよそ50倍の高さであったことを示している。

40

【 0 6 0 6 】

実施例23

IgG1-005-E345R / E430G / S440Yのオリゴマー状態は緩衝液の組成によって制御できる

IgG1-005抗体およびIgG1-005-E345R / E430G / S440Y抗体のHP-SEC分画を、TSK HP-SECカラム (G3000SW_{XL}; Toso Biosciences, Omnilabo, Breda, Netherlands経由)、Waters 2487二重 吸光度検出器 (Waters)、およびMini Dawn Treos MALS検出ユニット (Wyatt)

50

に接続されたWaters Alliance 2975分離ユニット (Waters, Etten-Leur, Netherlands) を用いて行った。1.0 µg/mLタンパク質を含有する50 µL試料を、種々の緩衝液条件下で1 mL/分で分離させた。結果はEmpowerソフトウェア・バージョン2002を用いて処理し、ピークごとに総ピーク面積に占める割合として表した。

【0607】

図30は、pH 6.8に緩衝化された0.1M Na₂SO₄ / 0.1Mリン酸ナトリウム中にて記録されたHP-SEC溶出プロファイルを示している。pH 6.8では、野生型IgG1-005抗体の99%超が単量体種として溶出した。対照的に、図31に示されたこの緩衝液中でのIgG1-005-E345R / E430G / S440YのHP-SECプロファイルは、オリゴマーの割合が77%である一方で、集団の23%が単量体種として溶出したことを示している。これらの条件下で動的光散乱を用いたパッチモード分析ではIgG1-005-E345R / E430G / S440Y単量体の軌跡は観察されなかったことからみて、実施例19に記載したように、単量体の残りのわずかな割合は、カラムで誘発された解離によって引き起こされた可能性がある。

【0608】

図32は、pH 6.8 (破線) およびpH 5.0 (実線) に緩衝化された0.15M NaCl / 0.1Mクエン酸中にて記録されたIgG1-005のHP-SEC溶出プロファイルの重ね合わせ図を示している。クエン酸緩衝液中でのIgG1-005のHP-SECプロファイルは、pH 6.8およびpH 5.0のいずれにおいても、pH 6.8のリン酸緩衝液中での挙動とほぼ同等であり、タンパク質の99%超が単量体種として溶出した。

【0609】

図33は、pH 6.8 (破線) およびpH 5.0 (実線) に緩衝化された0.15M NaCl / 0.1Mクエン酸中にて記録されたIgG1-005-E345R / E430G / S440YのHP-SEC溶出プロファイルの重ね合わせ図を示している。pH 6.8のリン酸塩中での挙動に一致して、pH 6.8のクエン酸中では、抗体は84%のオリゴマー形成を呈した。著しく対照的に、pHを5.0に低下させると、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yのオリゴマー形成は劇的に逆行した。多量体の割合は1%未満に急低下し、タンパク質の99%超が単量体種として溶出した。pH 6.8に緩衝化されたクエン酸中での有効なオリゴマー形成によって示されているように、オリゴマーの解体は低pH条件に特異的であり、クエン酸を緩衝液成分として用いることによって引き起こされなかった。

【0610】

以上をまとめると、pHを6.8から5.0に低下させることで、溶液相の中の抗体六量体を完全に解体させるには十分であり、この効果は、六量体抗体の集合のために極めて重要なFc : Fc境界面に存在するヒスチジンアミノ酸の荷電の改変によって説明し得ると考えられる。加えて、この挙動は、IgG1-005-E345R / E430G / S440Yのように、Fc媒介性自己集合を誘導する変異を含む抗体変異体に特異的であり、野生型抗体はいずれのpHレベルでも単量体のままであった。

【0611】

実施例24

Fc-Fc安定六量体変異E345R / E430G / S440Yの導入は、Fc結合性表面タンパク質を発現する細菌に対するIgG抗体の殺菌活性の増大をもたらすと考えられる

補体カスケード系は病原体に対する重要な宿主防御機構の1つであり、病原体を認識する上で3種の異なる活性化経路に分けることができる：i) 抗体媒介性古典的経路、これは病原体に結合した抗体に対するC1q結合によって活性化される、ii) レクチン経路、およびiii) 代替経路、この場合には補体系は病原体を直接認識し、抗体がなくても病原体によって誘発される。この3つの経路は、C3切断およびC3b沈着の段階で収束する。微生物は補体回避の複数の機序を生み出しており、その1つはプロテインAによって媒介される (Joiner Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:201-30; Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dec; 3(12):948-58)。プロテインAは黄色ブドウ球菌の細胞壁で最初に同定され、IgGのFc領域と結合することがよく知られている (Deisenhofer et al., Biochem (1981) 20, 2361-70; Uhlen et al., J. Biol. Chem (1984) 259,1695-1702)。これまでのところ、プロテイン

ンAの抗食作用効果および黄色ブドウ球菌の病的作用におけるその役割は、好中球Fc受容体による抗体配向の認識を誤ったものにさせる、プロテインAとIgGとの相互作用によって説明されている (Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dec;3(12):948-58)。実施例4では、B細胞特異的IgG1抗体によって媒介されるCDCが、競合性Fc結合性ペプチドDCAWHLGELVWC Tによって阻害されたことが示されている。このペプチドはIgG Fc上のコンセンサス結合部位を標的とし、これはプロテインA、プロテインGおよびリウマチ因子の結合部位と一致する (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83)。これらのデータに基づき、プロテインA媒介性の細菌補体回避機構は、Fc結合をめぐって競合することによって働いて、微生物特異的な抗体のFc-Fc相互作用の不安定化をもたらし、その結果として抗体媒介性補体活性化の阻害をもたらすと考えられている。さらに、実施例4には、CDCを増強するE345R変異を含むB細胞特異的IgG1抗体が、野生型の親抗体よりも、競合性Fc結合性ペプチドDCAWHLGELVWC TによるCDCの阻害に対する感受性が低いことも示されている。これらの結果を微生物上で発現されるFc結合タンパク質に外挿することにより、E345R変異によるIgG1 Fc-Fc相互作用の安定化の増大は、プロテインAなどの微生物表面タンパク質によるFc結合競合を介する病原体の回避戦略による補体阻害を受けにくい微生物特異的抗体につながると考えられる。その結果として、細菌を対象とするIgG抗体へのE345R変異の導入は、野生型の親抗体と比較して、細菌上でのC3b沈着の増大および殺菌活性の増大をもたらすと考えられる。微生物標的との結合の前に既にオリゴマー形成している安定化された六量体 (IgG-E345R / E430G / S440Y) は、E345R単一変異を含むIgG抗体よりも、例えば、プロテインA結合に対する抵抗力がさらに強いことが予想される。その結果として、微生物を対象とするIgG抗体へのE345R / E430G / S440Y変異の導入により、野生型の親抗体と比較して、C3b沈着の増加した微生物、および微生物活性の増大がもたらされると考えられる。

【 0 6 1 2 】

IgG1-005-E345R / E430 / S440Yのオリゴマー形成により、プロテインAに対する結合が阻害され得るか否かを検討するために、IgG1-005およびIgG1-005-E345R / E430 / S440Yの精製タンパク質調製物を、統計的に独立した (orthogonal) 2つの方法によって分析した：1) Nanodrop ND-1000分光光度計 (Isogen Life Science, Maarssen, Netherlands) を用いて波長280nmでの吸光度を測定することによるIgG濃度の決定。2) Octet Sample Diluent中でOctet QK装置 (Fortebio, Menlo Park, USA) を使い、使用準備済みのプロテインAセンサーチップ (Fortebio, Menlo Park, USA) をIgG標準物質 (Siemens) 基準曲線との直接比較で用いる、IgG濃度の決定。

【 0 6 1 3 】

A280によって決定された濃度とOctet-プロテインAを用いて決定された濃度との比を求めることにより、IgG1-005-E345R / E430 / S440YがIgG1-005よりも実際にプロテインAによる結合を受けにくいことが観察された (表11)。

【 0 6 1 4 】

(表 1 1) 280nmでの吸光度およびOctet-プロテインAによる抗体濃度

抗体	A280 ($\mu\text{g/ml}$)	Octet-プロテインA ($\mu\text{g/ml}$)	A280/プロテイン A \times 100 (%)
IgG1-005-E345R-E430G-S440Y	2905	2052.5	71%
IgG1-005	3818	3619.6	95%

【 0 6 1 5 】

補体媒介性の細菌死滅に関するインビトロでの指標として、好中球による食作用と、細菌上のC3b沈着に一致する血漿中でのC3aの生成との両方を、以下に記載するようにして決定できる。実際に、黄色ブドウ球菌上のC3b沈着は食作用の増強をもたらす、細菌死滅と相関することが記載されている (Roosjakkers et. al., Nature Immunology 2005: 6,920

-927)。

【0616】

指数的に増殖している細菌培養物を、0.1M 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) 中で100 µg/mLのFITCとともに37 °Cで1時間インキュベートすることにより、黄色ブドウ球菌をFITCで標識する。Ficoll勾配を用いてヒト多形核細胞 (PMN) を単離する。FITC標識した細菌を、変異E345R / E430G / S440Yを伴うかまたは伴わない一連の濃度の特異的抗体によってオプソニン化する。1 × 10⁸個のオプソニン化FITC標識細菌を、補体の供給源としての25% IgG枯濁血清の存在下で、総容積200 µL中で、ヒトPMNとともに37 °Cで25分間、激しく震盪しながらインキュベートすることによって、インピトロで食作用を行わせる。細胞を固定して、BD FACS溶解溶液との室温での15分間のインキュベーションにより、赤血球を溶解させる。洗淨後に、食作用をFACSによって測定する。好中球集団を前方散乱および側方散乱ゲーティングによって選別し、食作用を好中球集団における平均蛍光として表す。または、補体活性化およびC3b沈着の指標として、ELISAによって試料におけるC3a生成を測定する。

10

【0617】

E345R / E430G / S440Y変異を含む黄色ブドウ球菌特異的抗体は、野生型の親抗体よりも高度に、補体活性化および好中球による食作用を誘導すると考えられる。そのような実験に用い得ると考えられる抗体の一例は、ブドウ球菌の細胞壁に組み込まれているリポテイコ酸 (LTA) を標的とするキメラ性モノクローナルIgG1パギバキシマブ (BSYX-A110; Biosynexus) である (Baker, Nat Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1491-3; Weisman et al., Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5):639-44)。

20

【0618】

実施例25

E345R / E430G / S440Y三重変異を導入することによる非共有結合性六量体のIgG複合体の形成は、Fabドメインとは関係なく起こる

E345R / E430G / S440Y (RGY) 三重変異を導入することによる、非共有結合的に結合した六量体抗体複合体の溶液中での形成を、実施例20においてCD38抗体005に関して実証した。この実験では、Fabドメインが異なる他のヒトIgG1抗体 (CD20抗体7D8およびリツキシマブ、EGFR抗体2F8およびC. アルピカンスのマンナン抗体M1g1) の非共有結合性六量体のIgG複合体の形成。三重変異型抗体の作製および精製、ならびにHP-SEC分析は、本質的には実施例20に記載した通りに行った。

30

【0619】

図34は、すべての三重変異型抗体がオリゴマーを高い割合で示したことを示している: IgG1-7D8-RGY (67.2%) (図34A)、IgG1-ritux-RGY (83.6%) (図34B)、IgG1-2F8-RGY (74.5%) (図34C) およびIgG1-M1-RGY (74.5%) (図34D)。これらのデータは、溶液中での抗体の六量体への自己集合を誘導するためのE345R / E430G / S440Yというコンセプトを、Fabドメインの一次構造とは関係なく、IgG1配列に一般的に適用し得ることを示している。

【0620】

実施例26

患者由来のCD20陽性CLL細胞に対するエクスピボCDCアッセイにおける、E345R / E430G / S440Y三重変異を含むCD20抗体によるCDC

40

CLL末梢血単核細胞から単離された凍結CLL PB CD19+ / CD5+ B細胞 (再発性 / 不応性) を、Allcells, Emeryville, CAから購入した。96ウェルプレート当たり20,000個の細胞を用いた点を除き、実施例21に記載した通りにCDCを行った。CD20発現は、QIFIKIT、Dako, Glostrup, Denmarkによる39,000 Specific Antibody-Binding Capacity (sABC) によって決定した。図35は、E345R / E430G / S440Y三重変異を含むCD20抗体が、CD20陽性初代CLL細胞に対する機能的CDC活性を示したことを示している。E345R / E430G / S440Y変異の導入は、7D8による初代CLL細胞のより有効なCDC媒介性死滅 (EC50がより低い) をもたらした (図35A)、かつ、WT形式では全く死滅活性を示さなかったリツキシマブによる強力なCDCも可能にした (図35B)。

50

【0621】

実施例27

六量体化およびCDC増強の誘導のためのE345R / E430G / S440Y三重変異の導入は、異なる抗体アイソタイプに対しても適用し得る

当技術分野において公知の方法によって、CD38抗体IgG1-005のアイソタイプ変異体をヒトIgG2、IgG3またはIgG4の定常ドメインを用いて作製し、IgG2-005、IgG3-005およびIgG4-005を得た。さらに、三重変異E345R / E430G / S440Yをこれらのすべての抗体に導入して、IgG2-005-RGY、IgG3-005-RGYおよびIgG4-005-RGYを得た。

【0622】

これらの種々のアイソタイプのHP-SEC分析を、実施例20に記載した通りに行った。

10

【0623】

図36は、E345R / E430G / S440Y三重変異を含む、試験したアイソフォームが、溶液中で六量体複合体を形成したことを示している：IgG1-005-RGY（多量体79.2%）（図36A）、IgG2-005-RGY（多量体46.1%）（図36B）、IgG3-005-RGY（多量体37.8%）（図36C）およびIgG4-005-RGY（多量体84.4%）（図36D）。

【0624】

種々のアイソタイプのCDC活性を、実施例18に記載した通りのインビトロCDCアッセイにおいて、一連の濃度（2倍希釈で0.0003～10 μg / mL）の非精製抗体を試験することによって比較した。図37は、RGY三重変異の導入によって、試験したすべてのIgGアイソタイプにより、Daudi細胞に対する強力なCDC（図37A）が可能になったことを示している。これらの結果はWien133細胞に対するCDCでも確認されたが（図37B）、ただしIgG3-005-RGYは他のアイソタイプ変異体に比して限定的なCDC活性を示した。RGY三重変異型に関するこれらのデータは、実施例18、図19においてE345R変異型に関して示したものと同様である。

20

【0625】

実施例28

溶液中での非共有結合性オリゴマー複合体の形成を誘導するための変異の組み合わせ

実施例20は、3つの変異E345R、E430GおよびS440Y（RGY）を含む抗体IgG1-005が溶液中でオリゴマー複合体を形成することを述べている。これらの3つの位置のいずれか1つにアミノ酸置換を有する、この三重変異の変異体を含む抗体を、それらが溶液中でオリゴマー複合体を形成する能力に関して検討した。E345がA / C / D / F / G / H / I / K / L / M / N / P / Q / R / S / T / V / W / Yになるものからなる、考えられるE345R置換のクラスの一例として、E345KをE430G / S440Yと組み合わせせて検討した。E430がA / C / D / F / G / H / I / K / L / M / N / P / Q / R / S / T / V / W / Yになるものからなる、考えられるE430G置換のクラスの一例として、E430SをE345R / S440Yと組み合わせせて検討した。考えられるS440Y置換のクラスは、S440、Y436、D / E356、T359、E382、N434、Q438、I253およびS254からなる群より選択される少なくとも1つの位置におけるアミノ酸であって、各位置についてそれぞれ、YまたはWである；Yではない；DでもEでもない；Tではない；Eではない；Nではない；Qではない；Iではない；およびSではない、アミノ酸を有するタンパク質からなる。S440Y置換のこのクラスの一例として、Y436IおよびS440WをE345R / E430Gと組み合わせせて検討した。変異の組み合わせE345K / E430G / S440Y（KGYと表記）、E345R / E430S / S440Y（RSYと表記）、E345R / E430G / S440W（RGWと表記）またはE345R / E430G / Y436I（RGIと表記）を、当技術分野において公知の方法によってCD38抗体IgG1-005に導入して、それぞれIgG1-005-KGY、IgG1-005-RSY、IgG1-005-RGWおよびIgG1-005-RGIを得た。

30

40

【0626】

HP-SEC分析は実施例20に記載した通りに行った。図38は、IgG1-005-RGY（実施例20、図23）と同様に、IgG1-005-KGY（図38A）、IgG1-005-RSY（図38B）およびIgG1-005-RGW（図38C）が溶液中でさまざまな効率でオリゴマー複合体を形成したことを示している。変異体IgG1-005-KGYおよびIgG1-005-RGWについては、A280シグナルがオリゴマーと単量体ピークとの間に移動することが観察され、このことから、HP-SEC法が実施例20に記載したようにオリゴマー複合体の不安定化をもたらした可能性が示唆された。

50

【0627】

抗体のCDC活性を、実施例18に記載した通りのインビトロCDCアッセイにおいて、一連の濃度（3倍希釈で0.0003～10 μg/mL）の非精製抗体を試験することによって比較した。図39Aは、試験した三重変異組み合わせのすべてが、インビトロCDCアッセイにおいてWien13細胞を死滅させる能力をIgG-005に付与したが、野生型IgG-005は死滅を全く示さなかったことを示している。図39Bは、Ramos細胞も、試験した三重変異型抗体によって、野生型IgG1-005と比較してより効率的に死滅したことを示している。

【0628】

これらのデータは、溶液中でのオリゴマー形成および/またはCDCの誘導をIgG1-005-KGY、IgG1-005-RSY、IgG1-005-RGWおよびIgG1-005-RGIによって誘導し得ることを示しており、このことは、E345Rの任意の可能な天然アミノ酸による置換、E430Gの任意の可能な天然アミノ酸による置換、またはS440に対して可能なアミノ酸置換であるアミノ酸トリプトファンまたはチロシンから選択される変異を、それぞれE345R、E430GおよびS440Yの代わりに用い得ることを示唆している。その上、HP-SECのデータは、そのような置換により、オリゴマー複合体のFc含有ポリペプチドサブユニット間の相互作用の強さをモジュレートし得ることも示唆している。

【0629】

実施例29

E345R / E430G / S440Y三重変異を含む抗体は、ヘテロオリゴマー環として集合できる

実施例5、図7は、図4に図示された2つの相補的変異K439EまたはS440Kの一方を含む抗体ではそのCDC活性が阻害されるが、それらを混合するとCDC活性化を行える複合体が形成されることが考えられることを実証している。実施例20は、溶液中でオリゴマー複合体（六量体の複合体の可能性が最も高い）を形成し、野生型IgG1-005と比較してCDC活性の増強も示した（実施例21、図26）、抗体IgG1-005-E345R / E430G / S440Y（ここではIgG1-005-RGYと称する）の構築を述べている。実施例28は、IgG1-005-KGY、IgG1-005-RSY、IgG1-005-RGWおよびIgG1-005-RGIも、IgG1-005と比較してCDCの増強を示したことを述べている。溶液相でのオリゴマー形成が、自己相互作用性ではない抗体の混合物に限定されるか否かを検討するために、自己オリゴマー形成を妨げる2つの相補的変異K439EまたはS440Kのうちの一方をそれぞれが含む、IgG1-005-RGYの抗体変異体を作製した。

【0630】

変異K439Eを、当技術分野において公知の方法によってIgG1-005-E345R / E430G / S440Yに導入して、IgG1-005-E345R / E430G / K439E / S440Y（IgG1-005-RGEY）を得た。変異S440Kを、当技術分野において公知の方法によってIgG1-005-E345R / E430Gに導入して、IgG1-005-E345R / E430G / S440K（IgG1-005-RGK）を得た。変異Y436IおよびS440Kを、当技術分野において公知の方法によってIgG1-005-E345R / E430Gに導入して、IgG1-005-E345R / E430G / Y436I / S440K（IgG1-005-RGIK）を得た。IgG1-005-RGIKにY436Iを含めたことの根拠は、オリゴマー形成を増強する変異S440Yの欠如を代償することにあった。

【0631】

種々の抗体変異体および等モル抗体混合物のHP-SEC分析を、PBS（12.6mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、pH 7.4；B. Braun, Oss, Netherlands）を移動相として用いた点を除き、実施例20に記載した通りに行った。図40は、IgG1-005-RGYへのK439Eの導入により、IgG1-005-RGEYの自己オリゴマー形成が妨げられたことを示している（多量体2.7%）。同様に、IgG1-005-RGYにおけるS440Yを変異S440Kに置換することによっても、IgG1-005-RGKの自己オリゴマー形成が妨げられた（多量体2.2%）。注目されることとして、溶液相で単量体（すなわち、単一の二量体抗体）であるIgG1-005-RGEYとIgG1-005-RGKの混合物により、IgG1-005-RGY（多量体84%）よりも効率は低いものの、IgG1-005-RGYと同等のHP-SEC移動度（多量体65%）を有するオリゴマー種が形成された。

【0632】

図41は、IgG1-005-E345R / E430GへのY436I + S440Kの導入により、IgG1-005-RGIKの自己オリゴマー形成が妨げられたことを示している（多量体1.8%）。この場合も、溶液相で

単量体であるIgG1-005-RGEY + IgG1-005-RGIKの混合物により、オリゴマー種が形成されたが、これはIgG1-005-RGYと同等のHP-SEC移動度であり、今回は効率も高かった（多量体93%）。

【0633】

図42は、混合物IgG1-005-RGEY + IgG1-005-RGKと混合物IgG1-005-RGEY + IgG1-005-RGIKの直接比較を示しており、これはIgG1-005-RGIK（多量体65%）がIgG1-005-RGEYとのヘテロオリゴマー形成をIgG1-005-RGK（多量体93%）よりも効率的に誘導できたことを実証している。IgG1-005-RGIKにおけるより多くのオリゴマー形成およびCDCを増強する変異Y436Iの存在によって、IgG1-005-E345R / E430G / K439E / S440Yとの複合体の形成が安定化されるように思われる。

10

【0634】

以上をまとめると、変異E345R / E430Gに加えて、さらに自己オリゴマー形成阻害性変異K439E / S440YまたはS440KまたはY436I / S440Kを含むIgG1-005抗体は、相補的変異（一方の抗体にK439E、もう一方の抗体にS440K）を有する抗体分子を混合することによって、多量体複合体として再集合させることができる。

【0635】

実施例30

両方の構成成分がE345R / E430G / S440Y三重変異を含むならば、Fc断片を細胞結合性抗体によって細胞表面に動員させることができる

3つの変異E345R、E430GおよびS440Yを、当技術分野において公知の方法によってIgG1m（f）Fc断片に導入して、Fc-RGYを作り出した。実施例20に記載した通りに、タンパク質を発現させて精製した。Fc-RGY試料のHP-SEC分析を、実施例20に記載した通りに行った。図43は、総面積に対するピーク面積の割合による測定で、用いたHP-SEC条件下では、Fc-RGYのおよそ28%が単量体であり、72%がさまざまな状態として分布しているオリゴマーであることが示されたことを示している。

20

【0636】

次に、Fc-RGY断片が溶液中でIgG1-RGY抗体とのオリゴマー複合体の中に動員され得るかを検討した。このために、6 μ g / mLのAlexa-647標識Fc-RGY（Fc-RGY-A647）を、一連の濃度（3倍希釈で0.001 ~ 3 μ g / mL）のEGFR特異的またはCD20特異的な抗体とともに1 : 1で混合した。混合した直後に、試料を0.1 $\times 10^6$ 個のEGFR陽性A431細胞またはCD20陽性Daudi細胞に添加し、4 で45分間インキュベートした。細胞をRPMI1640 / 0.1% BSA（3分、1200rpm）で2回洗浄した後に、細胞をPBS / 0.1% BSA / 0.02% アジド中に再懸濁させて、FACS Canto II（BD Biosciences）にて分析した。

30

【0637】

図44Aは、Fc-RGY-A647をEGFR特異的IgG1-2F8-RGY抗体と混合することにより、EGFR陽性A431細胞上に用量依存的蛍光性シグナルが生じたことを示している。対照的に、CD20特異的IgG1-7D8-RGYは、Fc-RGY-A647をCD20陰性A431細胞に動員できなかった。Fc-RGY-A647をIgG1-2F8またはIgG1-2F8-E345Rのいずれかと混合した、試験した対照組み合わせはいずれも、蛍光性シグナルを生じなかった。同じく、CD20特異的IgG1-RTX-A647をIgG1-2F8またはIgG1-2F8-RGYと組み合わせた対照組み合わせはいずれも、A431細胞上の蛍光性シグナルを誘導しなかった。

40

【0638】

これらのデータは、A431細胞上のEGFRと結合するIgG1-2F8-RGY抗体をオリゴマー複合体に組み入れることにより、標識Fc-RGY断片がA431細胞に特異的に動員されたことを示している。

【0639】

同様に、図44Bは、CD20特異的抗体IgG1-7D8-RGYおよびIgG1-RTX-RGYが、Fc-RGY-A647断片をCD20陽性Daudi細胞に動員できたことを示している。対照的に、EGFR特異的IgG1-2F8-RGYは、Fc-RGY-A647をEGFR陰性Daudi細胞に動員できなかった。Fc-RGY-A647のみであるか、またはFc-RGY-A647をIgG1-7D8またはIgG1-RTXと混合した陰性対照試料では、Daudi細胞

50

上の蛍光性シグナルは生じなかった。

【 0 6 4 0 】

以上をまとめると、これらのデータは、Fc-RGY分子が溶液中で複合体を形成し得ること、および、細胞と特異的に結合するRGY含有抗体によって細胞に動員され得ることを示している。

【 0 6 4 1 】

実施例31

Fc-Fc相互作用を増強する変異を有する抗体分子の可逆的オリゴマー形成を、pHによって制御できる

実施例23により、ここではIgG1-005-RGYと略記する抗体IgG1-005-E345R / E430G / S440Yが、pH 6.8では六量体化する一方で、pHを5.0に低下させると六量体複合体が解体して個々の単量体サブユニットになることが示された。この特性を詳細に特徴づけるために、50 mM クエン酸および100mM Na₂HPO₄をさまざまな比で混合して、pH 5.0、5.5、6.0、6.5および7.0の移動相緩衝液を作製した。IgG1-005-RGY試料をこれらの緩衝液と交換させ、合致する移動相を用いるHP-SECによって分離した。図45Aは、pHを低下させると多量体複合体が単量体サブユニットに解体されたこと；多量体を混合物からなくすためにはおよそ5.0のpHが必要であったこと；および、pH 6.0で複合体のおよそ半分が解体されたことを示している。

【 0 6 4 2 】

pHの低下および上昇によって抗体のオリゴマー状態を可逆的な様式で制御し得ることは、製造過程での上流または下流の処理における用途にとって有用な可能性がある。pH媒介性解体が可逆的であるか否かを検討するために、抗体六量体を有する試料をpH 5.0にした上で2つの試料に分け、その一方をpH 7.0に戻した。図45Bは、pH 5.0に曝露させた後にpH 7.0に戻した試料（pH 7.0 rev）で、pH7.0に保った参照試料に極めて近い効率で抗体複合体が形成されたことを示している。

【 0 6 4 3 】

実施例32

IgG1-RGYタンパク質の精製および下流処理効率を、緩衝液pH条件の選択によって制御できる

プロテインA精製は抗体の下流処理の基礎となるものであり、抗体製造過程の多くで実行される。プロテインA結合部位は、ここではIgG1-005-RGYと略記するIgG1-005-E345R / E430G / S440Yの六量体化を媒介するFc : Fc相互作用境界面と部分的に重なり合うことから、六量体化を許容するpH 7.4、および実施例23で実証したように六量体化を阻止するpH 5.0でプロテインAカラムのローディングを試みた。

【 0 6 4 4 】

実施例20に、ここではIgG1-005-RGYと略記する抗体IgG1-005-E345R / E430G / S440Yのクローニングについて述べている。IgG1-005-RGYを、本質的には製造元（Invitrogen）によって記載された通りにEXPI293F細胞において発現させ、その後300gでの10分間の遠心分離によって上清を収集した。上清を、MiniKros M15S-260-01P Hollow Fiber Tangential Flow Filtrationデバイスをカットオフ50kDaのメンブレン（SpectrumLabs, Rancho Dominguez CA, USA）とともに用いて4倍に濃縮し、タンパク質濃度1.1g / Lの上清を得た。上清を2つの部分に分け、その一方は7.5という元のpHに保ち、もう一方のバッチは、1.0Mクエン酸-NaOH pH 3.0の滴加によってpHをpH 5.0に調整した。両方のバッチを0.20 μMデッドエンドフィルターに通して濾過した。

【 0 6 4 5 】

pH 7.5に保った上清バッチを、製造規模での下流処理条件を模倣した109cm / 時という低い流速で1.0mLのプロテインAカラム（HiTrap MabSelectSuRe, GE Healthcare, Uppsala, Sweden）にローディングし、それをPBS（12.6mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、pH 7.4；B. Braun, Oss, Netherlands）で連続洗浄した後に、結合したIgGタンパク質を0.1Mクエン酸-NaOH、pH 3.0を用いて溶出させた。溶出液を2M Tris-HCl、pH 9.0によって直ちに

10

20

30

40

50

中和し、PBSに対して一晩透析した。透析後に、試料を0.20 μ Mデッドエンドフィルターに通して滅菌濾過した。

【0646】

pH 5.0にしたバッチは、同じ1.0mLプロテインAカラム (HiTrap MabSelectSuRe) に109cm / 時の流速でローディングし、それを20mMクエン酸 / クエン酸、pH 5.0で連続洗浄した後に、結合したIgGタンパク質を0.1Mクエン酸-NaOH、pH 3.0を用いて溶出させた。溶出液を2M Tris-HCl、pH 9.0によって直ちに中和し、PBSに対して一晩透析した。透析後に、試料を0.20 μ Mデッドエンドフィルターに通して滅菌濾過した。

【0647】

両方のタンパク質精製による通過画分を収集し、5.0mLのMabSelect SuReカラムを用いて精製したところ、およそ50mgのタンパク質が得られ、このことから1.0mLのMabSelectSuReカラムが事実上飽和していたことが実証された。

【0648】

IgG1-005-RGYの収量は、透析した溶出試料のA280をNanodropデバイス (ThermoScientific, Wilmington DE, USA) を用いて測定することによって決定した。pH 7.0での1.0mL規模のプロテインA精製により、21.45mgのIgG1-005-RGYが得られ、一方、pH 5.0での精製では29.14mgのIgG1-005-RGYが得られた。以上のことから、IgG1-005-RGYを単量体に保つ条件下で抗体とプロテインAとの結合を行わせることによって、タンパク質収量がおおよそ36%増加すると結論づけられた。

【0649】

実施例33

安定な六量体のIgG2-005によるプログラム細胞死 (PCD)

三重変異E345R / E430G / S440Yを含むIgG抗体の種々のアイソタイプ変異体がプログラム細胞死 (PCD) を誘導し得るか否かを検討するために、抗体IgG2-005-E345R / E430G / S440Y (IgG2-005-RGY) を、当技術分野において公知の方法によって作製した。CD38を発現する 1.0×10^5 個のRamos細胞を、96ウェルU字底プレート (Nalgene Nunc) 中にて、野生型IgG2-005、IgG2-005-RGY、六量体のIgM-005、またはRamos細胞上では発現されていないEGFRを認識するヒト対照抗体IgG1-2F8およびIgG1-2F8-RGYの希釈系列 (10、3、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.005および0.0025 μ g / mL) の存在下で24時間培養した。これらの24時間後に、アネキシンV-FITC (アネキシン結合アッセイ; BD Biosciences, San Diego, California, USA) による染色を製造元の指示に従って行うことにより、PCDを定量した。アネキシンV-FITC陽性細胞の量を、FACS (BD) を用いて決定した。

【0650】

図46は、IgG2-005-RGYにより、野生型IgG2-005、ならびに対照抗体IgG1-2F8およびIgG1-2F8-RGYと比較してプログラム細胞死の能力の増強が実証されたことを示している。六量体のIgMは、試験した条件下でPCDを誘導しなかった。

【0651】

実施例34

CD38に対するIgG-005-RGYは、B細胞に対するCDCアッセイにおいて六量体のIgM-005よりも優れる

IgG1-005-RGYのCDC活性をIgMのものと比較するために、IgG1-005のVHドメインを当技術分野において公知の方法によってIgM骨格中にクローニングし、J鎖の非存在下で発現させて、CD38に対するIgM六量体を産生させた。IgG1-005-E345R / E430G / S440Y (ここではIgG1-005-RGYと称する) の構築は、実施例20に記載されている。

【0652】

種々の抗体のHP-SEC分析を、PBS (12.6mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、pH 7.4; B. Braun, Oss, Netherlands) を移動相として用いた点を除き、実施例20に記載した通りに行った。図47は、J鎖の非存在下で発現させたIgM-005により、六量体のIgG1-005-RGYと比較して六量体のIgMの分子量が大きいことから予想し得るように、HP-SECにおける移動度がIgG1-005-RGYよりも幾分高い分子が生じたことを示している。

【 0 6 5 3 】

IgG1-005-RGYのCDC活性を、実施例18に記載したようなインビトロCDCアッセイにおいて一連の濃度（2倍希釈で0.0003～10 μg/mL）の抗体を試験することによって、野生型IgG1-005および六量体のIgM-005と比較した。図48は、Daudi細胞およびWien133細胞に対して、IgG1-005-RGYが六量体のIgM-005よりも強力なCDC活性を示したことを示している。野生型IgG1-005はDaudi細胞に対してIgG1-005-RGYおよびIgM-005よりも弱いCDC活性を示し、Wien133細胞に対する死滅活性は示さなかった。IgG1-b12を非細胞結合性陰性対照抗体として用いた。分子量の異なる非共有結合性IgG複合体と共有結合性IgM複合体の比較が可能になるように、単量体の（すなわち、単一の二量体タンパク質）IgG1-005、六量体のIgG1-005-RGYおよび六量体のIgM-005の濃度を、C1q結合当量として示している。

10

【 0 6 5 4 】

以上をまとめると、IgG1-005-RGYは、標的細胞の補体媒介性溶解を、同等量のC1qと結合する抗体濃度でIgM-005よりも効率的に誘導した。

【 0 6 5 5 】

実施例35

抗EGFR抗体IgG1-2F8への三重変異E345R / E430G / S440Yの導入により、EGFR陽性固形腫瘍細胞株のCDC媒介性溶解の活性が高まる

固形腫瘍標的抗体への三重変異E345R / E430G / S440Yの導入が補体媒介性溶解の活性化を導くか否かを検討するために、IgG1-2F8-E345R / E430G / S440Y（ここではIgG1-2F8-RGYと称する）を、当技術分野において公知の方法によって作製した。

20

【 0 6 5 6 】

IgG1-2F8-RGYによるCDC活性を、EGFR陽性A431細胞株およびDifi腫瘍細胞株に対して試験し、野生型IgG1-2F8ならびに対照抗体IgG1-005およびIgG1-005-RGYと比較した。対照抗体は、A431細胞上でもDifi細胞上でも発現されないCD38を認識する。

【 0 6 5 7 】

リン酸緩衝液食塩水（PBS）中のトリプシン-EDTAを用いることによって固形腫瘍細胞を剥離させた後に、細胞を洗浄し、40 μmナイロン製細胞ストレーナー（DB Falcon（商標））に通過させた上で、PBS中に 1.0×10^6 個/mLの濃度で再懸濁させた。SYBR Green（SYBR Green 57563、DMSO中、Invitrogen、25000倍希釈）を用いて、細胞を37℃で30分間染色した。遠心分離（1200rpm、室温で5分間）の後に、細胞をRPMI1640 / 0.1% BSA中に 3.0×10^5 個/mLの濃度で再懸濁させた。抗体の系列希釈物（0.0003～10 μg/mL）を、TOPRO-3（TOPRO-3ヨウ化T3605、1600倍希釈）を加えたRPMI / 0.1% BSA中に調製した。細胞を、平底96ウェルプレート（black 96-Well ABI（商標）4315480 FMAT Plates）に1ウェル当たり30,000個ずつ播種した；抗体の系列希釈物の添加後に、プレートを振盪機（300rpm、室温）上で15分間インキュベートした。正常ヒト血清（NHS, Sanquin）を最終濃度20%として添加した。プレートを37℃で45分間インキュベートした。死細胞（TOPRO-3陽性）および全細胞（SYBR Green陽性）の量を、Celigo（登録商標）イメージングサイトメーター（Brooks Life Science Systems）を用いて決定した。結果を、GraphPad Prism 5.04を用いて解析した。

30

【 0 6 5 8 】

図49は、IgG1-2F8-RGYの方が野生型IgG1-2F8よりも、EGFR陽性固形腫瘍細胞の補体媒介性溶解を誘導する活性が大幅に高いことを示している。

40

【 0 6 5 9 】

実施例36

IgG1-005-RGYは、野生型IgG1-005とは対照的に、標的非依存的な補体活性化を示す

実施例20に、ここではIgG1-005-RGYと略記する抗体IgG1-005-E345R / E430G / S440Yのクローニングについて述べた。IgG1-005-RGYが標的細胞の非存在下で溶液中の補体を活性化し得るか否かを検討するために、古典的補体経路活性化のマーカーであるC4dの形成について分析した。補体活性化は、100 μg/mLの抗体を、90%正常ヒト血清中にて、タンパク質低結合性96ウェルポリプロピレン製マイクロプレート（U字型および滅菌済み；Greiner

50

650261) 中で37℃で1時間インキュベートした後に、C4d濃度を測定することによって判定した。C4d濃度は、ELISA (MicroVue C4d EIAキット、Quidel Corporation) を製造元の指示に従って行って測定した。溶液中での補体活性化に関する陽性対照として、熱凝集IgG (HAG) 試料を用いた。図50は、これらの条件下でHAGが有効なC4d生成を誘導した一方で、野生型IgG-005は補体活性化を示さなかったことを示している。対照的に、IgG1-005-RGYは、溶液中での補体活性化を示す、C4dレベルの上昇を誘導した。

【0660】

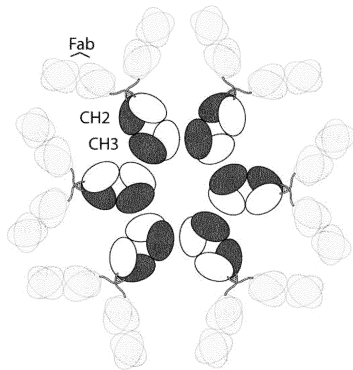
均等物

当業者は、通例の実験を用いて、本明細書に記載された本発明の具体的な態様の多くの均等物を認識し、または確認できるであろう。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲に含まれるものとする。従属請求項において開示された態様の任意のおよび全ての組み合わせも、本発明の範囲内にあると企図している。

10

【図1】

六量体IgG分子の形成



【図2-1】

```
IgG1 247 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL 306
IgG1f PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
IgG2 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
IgG3 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
IgG4 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
Ige SPFDLFIKSPITITCLVVDLAPSKGTNLTWSRASGKPVNHSTRKEEQKRGNTLTVTSTL
Iga1 ALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASG-VTFTWTPSSGKSAVQGP--PERDLGCGYSVSVL
Iga2 ALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASG-ATFTWTPSSGKSAVQGP--PERDLGCGYSVSVL
Igm SFASTFLTKSTKLTCLVTDLTYYDS-VTISWTRQNGEAVKTHNTNISESHPNATFSAVGEA
Igd AVQDLWLWDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAG-KVPTGGVEEGLERHSNGSQSQHSRL

IgG1 307 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS--KAKGQPREPQVYTLPPSREDELT--NQVS 364
IgG1f TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS--KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK--NQVS
IgG2 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS--KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK--NQVS
IgG3 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS--KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK--NQVS
IgG4 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS--KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK--NQVS
Ige PVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPALMRSTT--KTSGRAPRAPEVYAFATPEWPGSR--DKRT
Iga1 PGCAEPWNHGETFTCTAAYPEKSTPLTATLS--KSGNTRFEVHLLPPSEELALNELVT
Iga2 PGCAEPWNHGETFTCTAAYPEKSTPLTANIT--KSGNTRFEVHLLPPSEELALNELVT
Igm SICEDDWSNGERFTCTVTHDLPSPKQTIISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNRESAT
Igd TLPRLSLWAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLLASSDPPEAA---SW

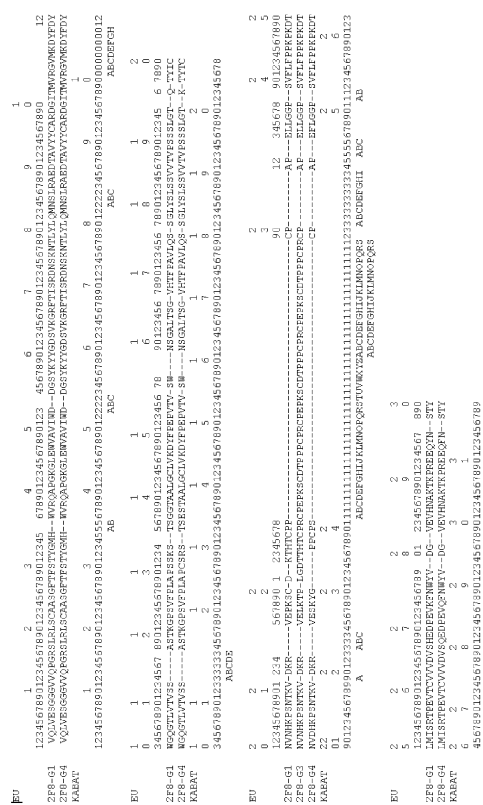
IgG1 365 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTPPVLDLSD--DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ 419
IgG1f LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTPPVLDLSD--DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
IgG2 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTPPVLDLSD--DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
IgG3 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTPPVLDLSD--DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
IgG4 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTPPVLDLSD--DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
Ige LACLINQFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTPQPKTK---GSGFFVFSRLVETRAEWEQ
Iga1 LTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTVASRQEPSSQGTITTTFAVTSILRVAEDWKK
Iga2 LTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTVASRQEPSSQGTITTTFAVTSILRVAEDWKK
Igm ITCLVTGFSADVFVQMMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEP--QAPGRYFAHSILTVSEEEWNT
Igd LLCEVSGFSPPNILLMLLEDQREVNSTSGFAPARPPQP--GSTTFWAVSVLVRPAPPSPQ

IgG1 420 GNVFSCSVMEALHN--HYTQKSLSLSPGK----- 447
IgG1f GNVFSCSVMEALHN--HYTQKSLSLSPGK-----
IgG2 GNVFSCSVMEALHN--HYTQKSLSLSPGK-----
IgG3 GNVFSCSVMEALHN--RFTQKSLSLSPGK-----
IgG4 GNVFSCSVMEALHN--HYTQKSLSLSPGK-----
Ige KDEFCIRAVHEAASPSTVQRAVSVNPGK-----
Iga1 GDTFSCHVGHEALPL--AFTQKIDRLAGKPTHNVSVMAEVDGTCY
Iga2 GDTFSCHVGHEALPL--AFTQKIDRLAGKPTHNVSVMAEVDGTCY
Igm GETYTCVA--HEALPN--RVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDGTAGTCY
Igd PATYTCVVSHEDSRLLNARSLSLEVSYVDHGMK-----
```

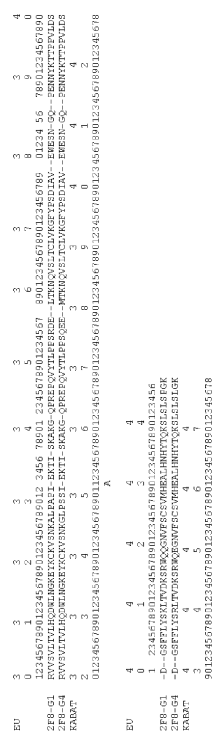
【図 2 - 2】

IgG1 = UniprotエントリーP01857のアミノ酸130-330
 IgG1f = IgG1アロタイプ変異体「f」
 IgG2 = UniprotエントリーP01859のアミノ酸126-326
 IgG3 = UniprotエントリーP01860のアミノ酸177-377
 IgG4 = UniprotエントリーP01861のアミノ酸127-327
 IgE = UniprotエントリーP01854のアミノ酸225-428
 IgA1 = UniprotエントリーP01876のアミノ酸133-353
 IgA2 = UniprotエントリーP01877のアミノ酸120-340
 IgM = UniprotエントリーP01871のアミノ酸230-452
 IgD = UniprotエントリーP01880のアミノ酸176-384

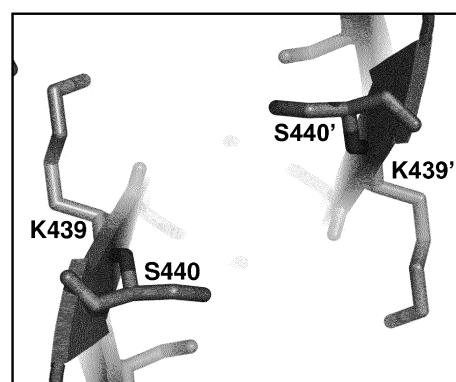
【図 3 A】



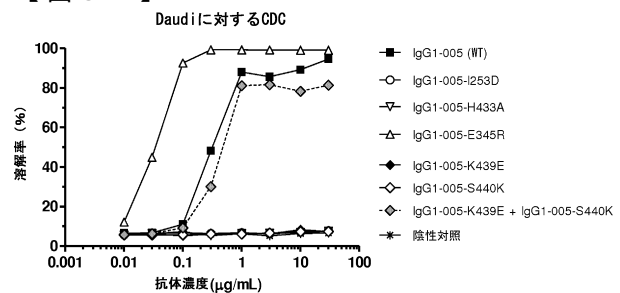
【図 3 B】



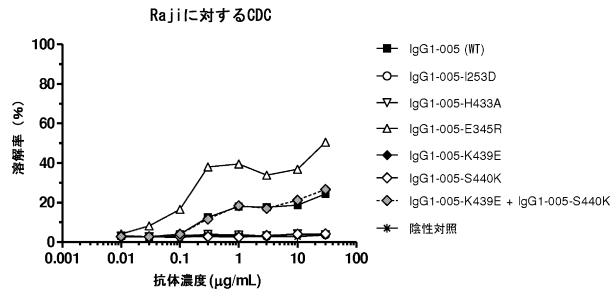
【図 4】



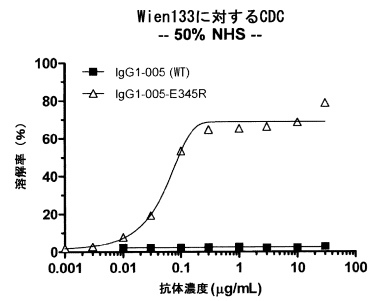
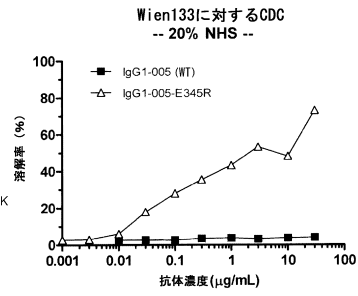
【図 5 A】



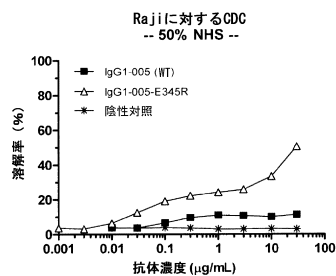
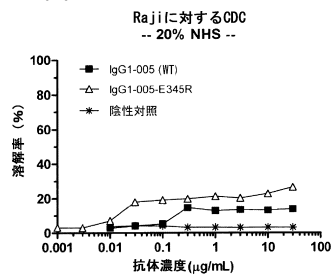
【図 5 B】



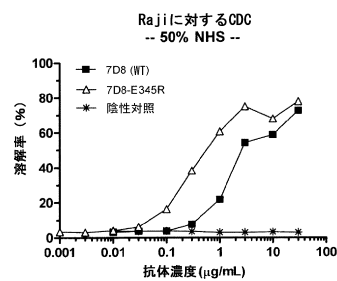
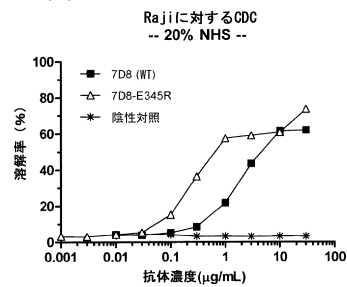
【図 5 C】



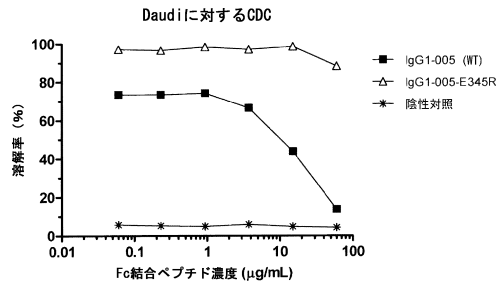
【図 5 D - 1】



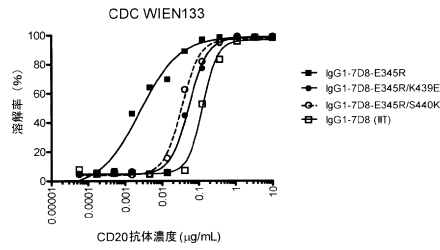
【図 5 D - 2】



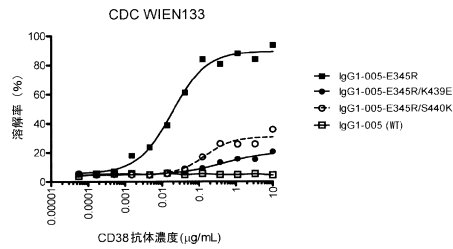
【図 6】



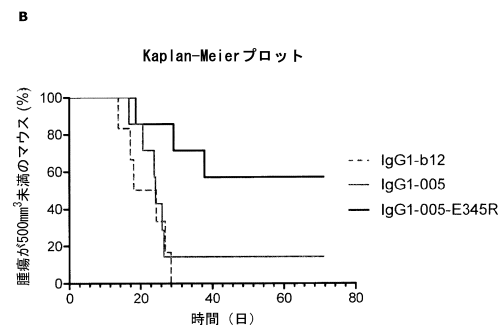
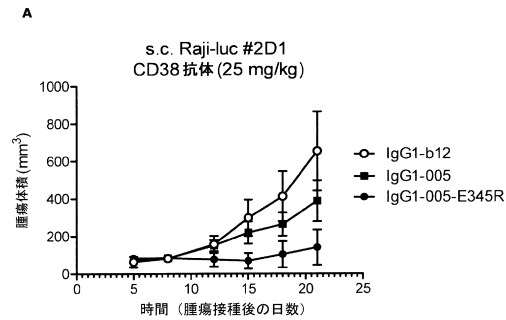
【図 7 A】



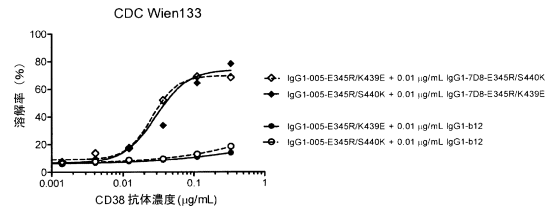
【図 7 B】



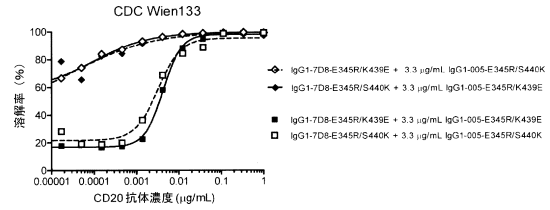
【図 8】



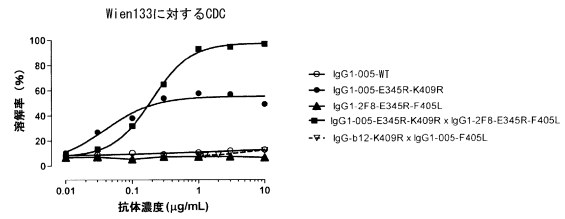
【図 7 C】



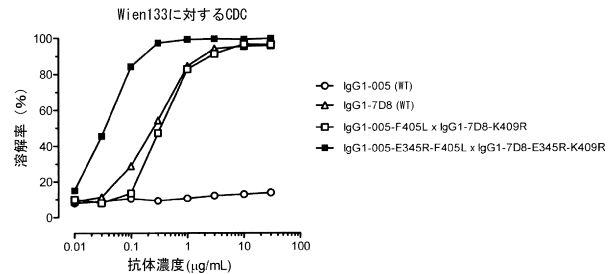
【図 7 D】



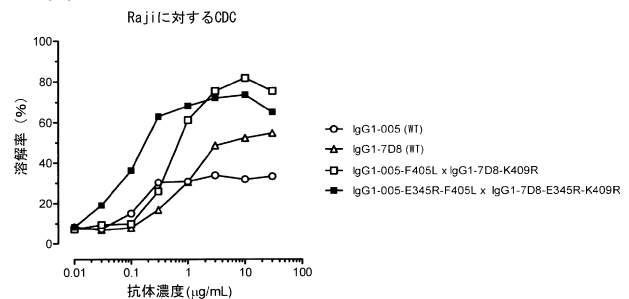
【図 9】



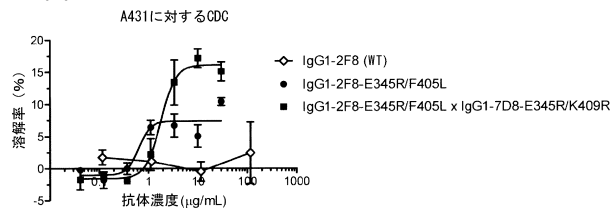
【図 10 A】



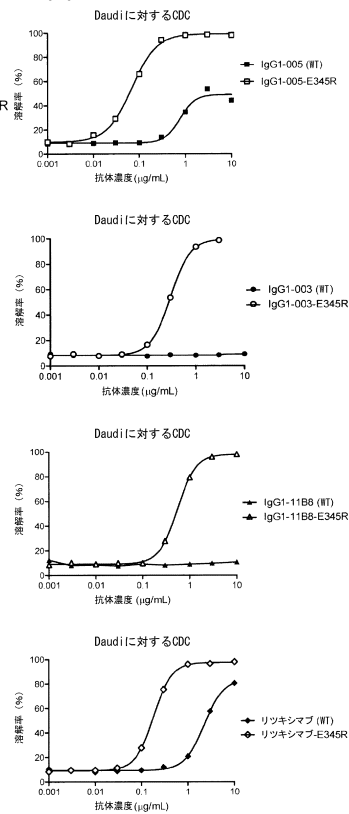
【図 10 B】



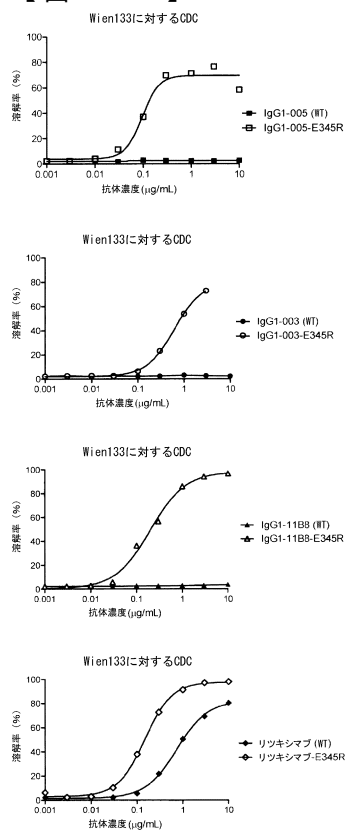
【図 1 1】



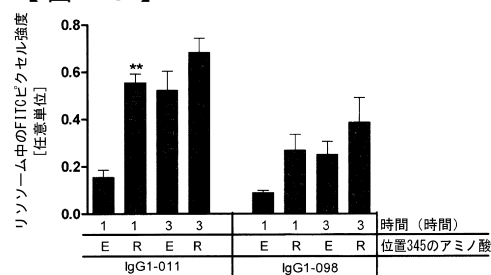
【図 1 2 A】



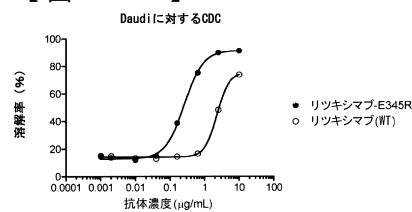
【図 1 2 B】



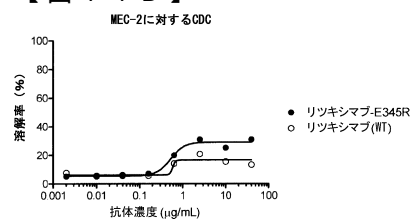
【図 1 3】



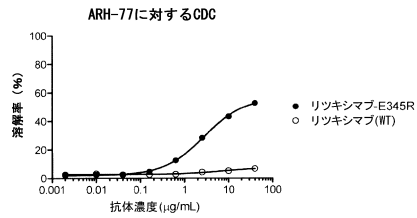
【図 1 4 A】



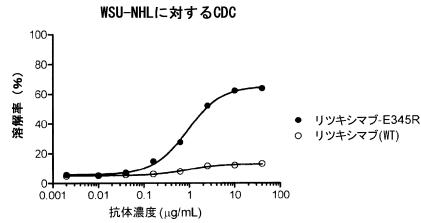
【図 1 4 B】



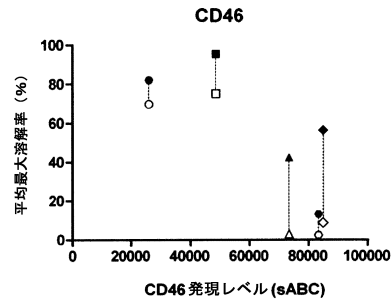
【図 14 C】



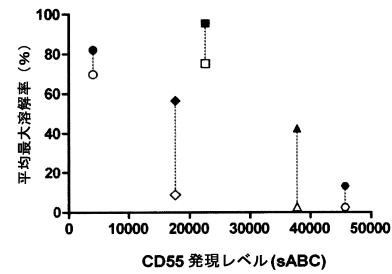
【図 14 D】



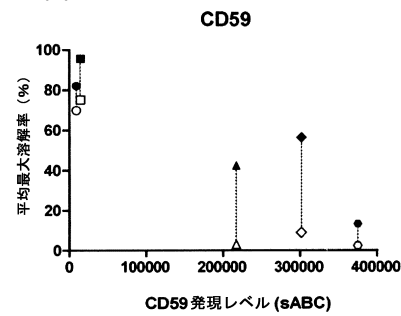
【図 14 E - 1】



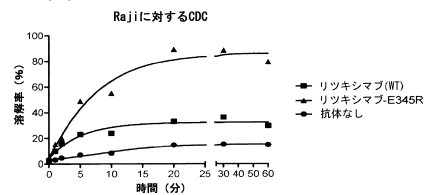
CD55



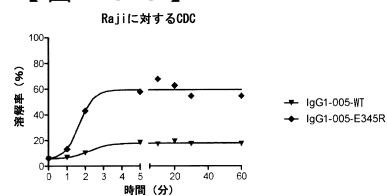
【図 14 E - 2】



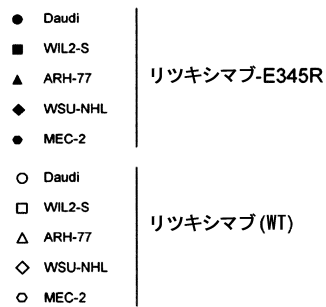
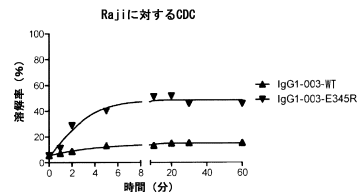
【図 15 B】



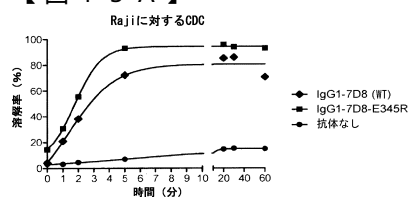
【図 15 C】



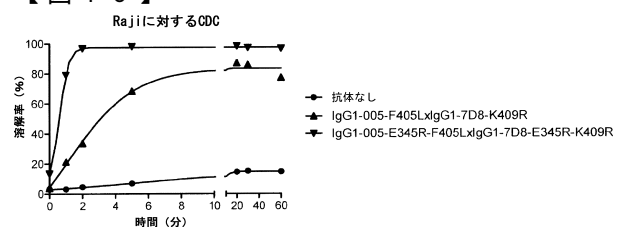
【図 15 D】



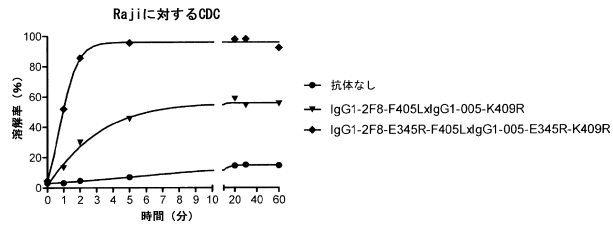
【図 15 A】



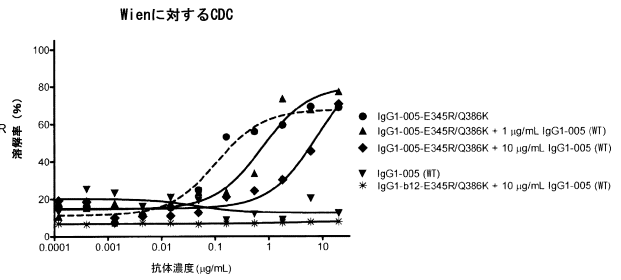
【図 16】



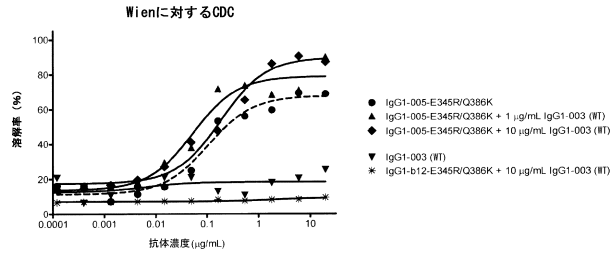
【図 17】



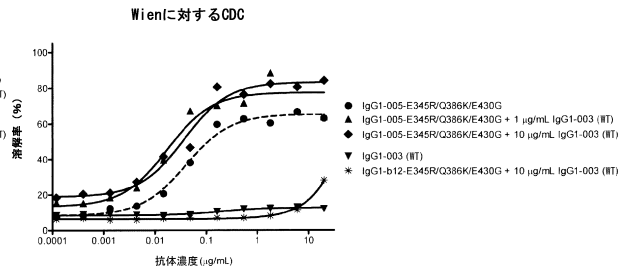
【図 18 C】



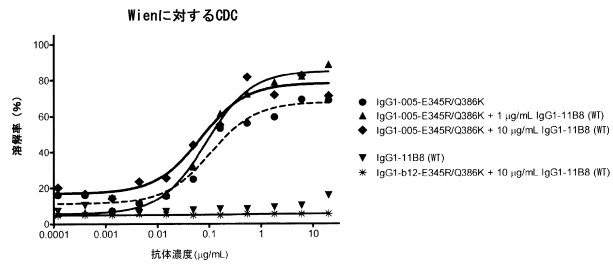
【図 18 A】



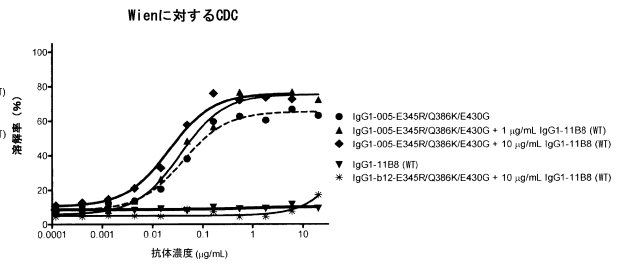
【図 18 D】



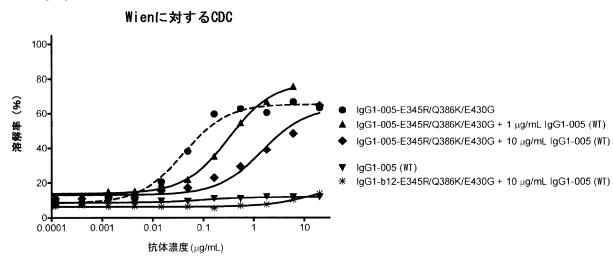
【図 18 B】



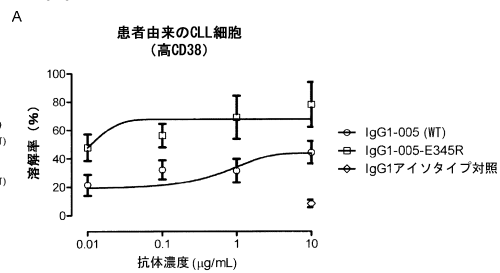
【図 18 E】



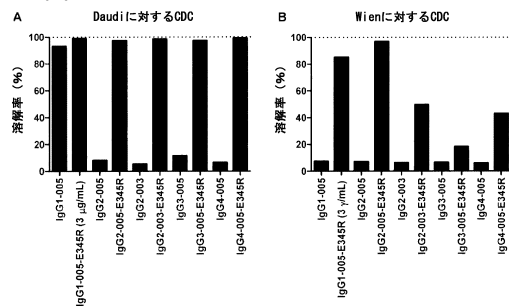
【図 18 F】



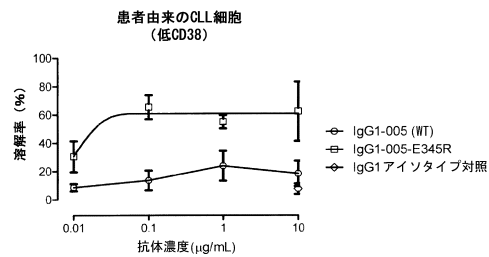
【図 20】



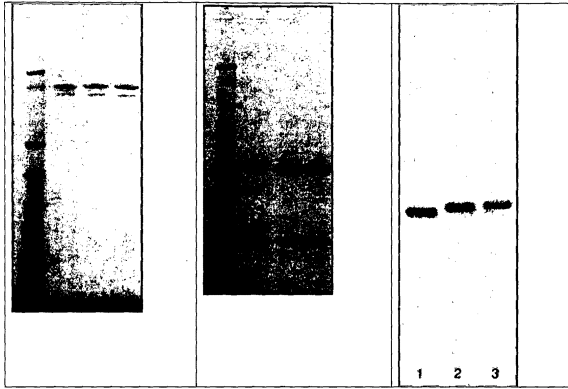
【図 19】



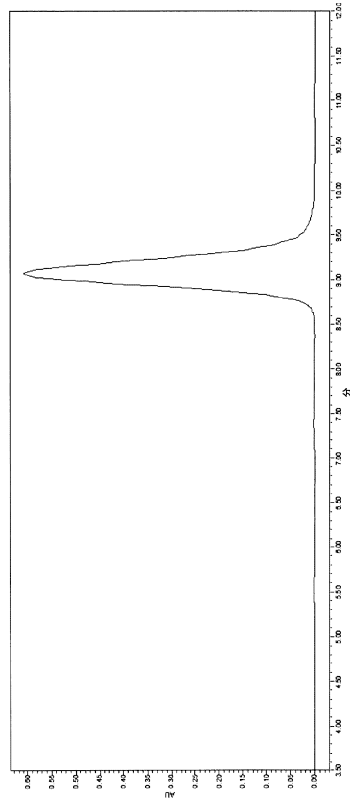
B



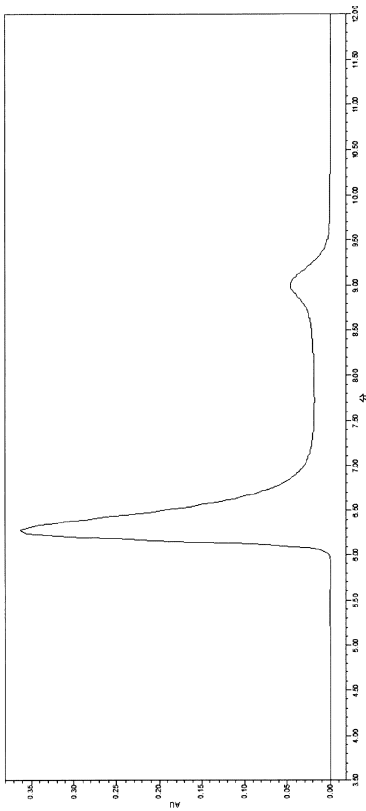
【図 2 1】



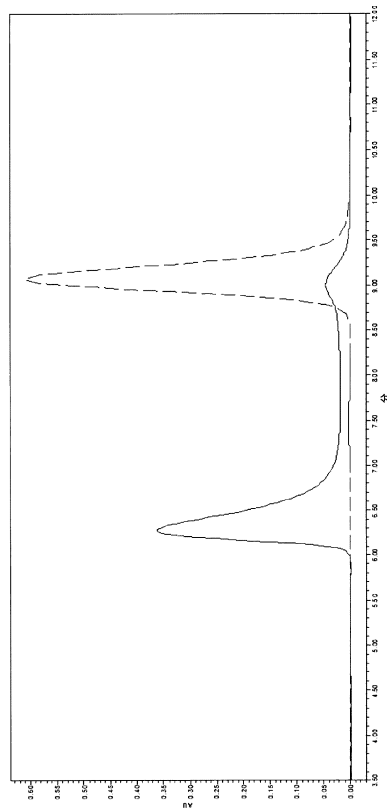
【図 2 2】



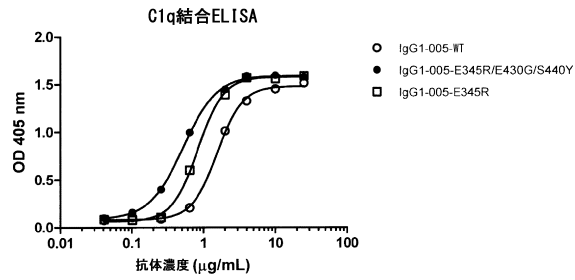
【図 2 3】



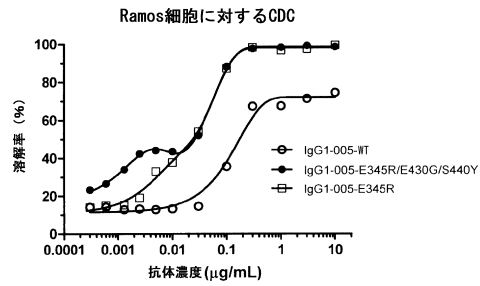
【図 2 4】



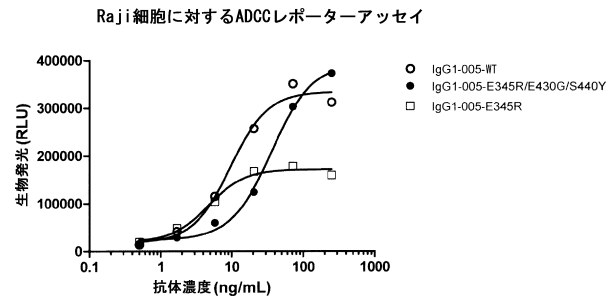
【図 25】



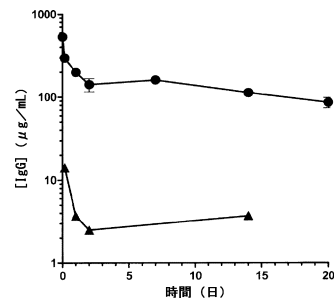
【図 26】



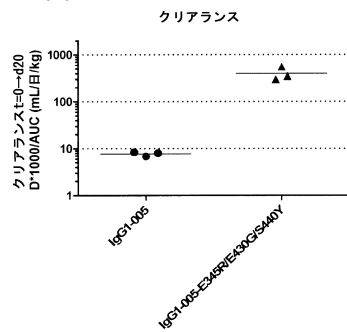
【図 27】



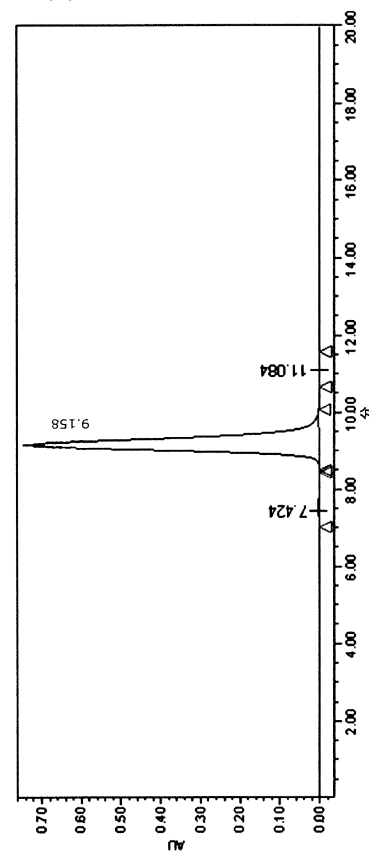
【図 28】



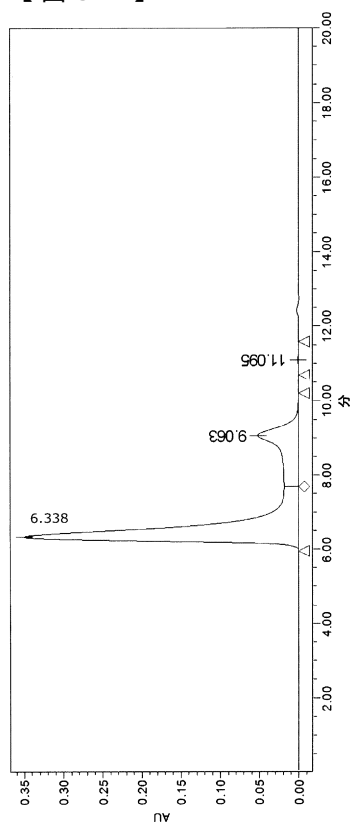
【図 29】



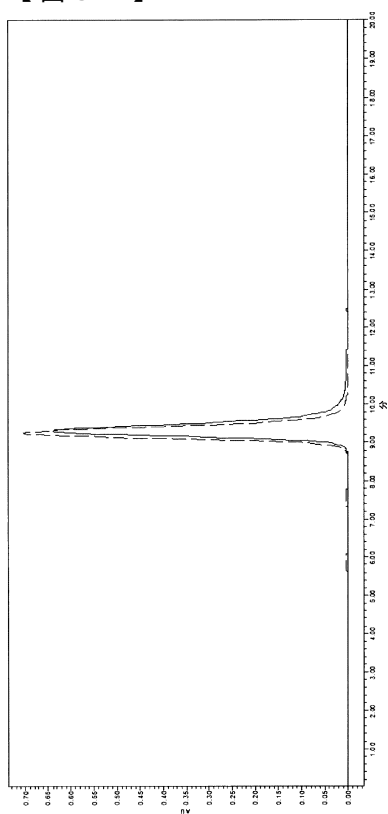
【図 30】



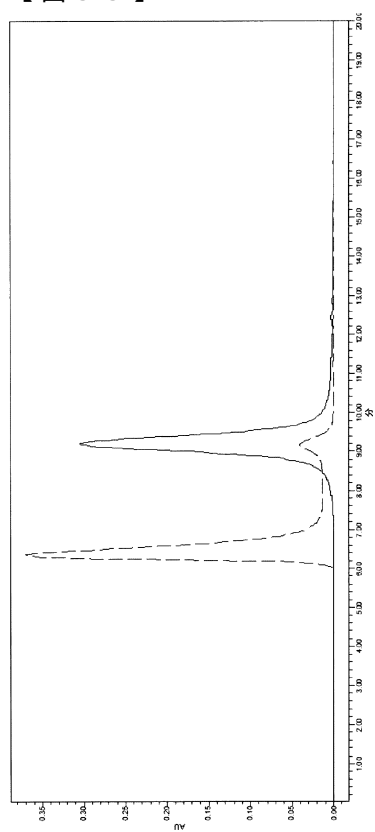
【図 3 1】



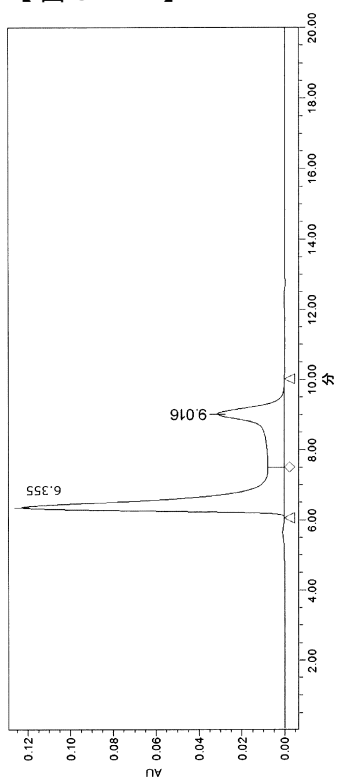
【図 3 2】



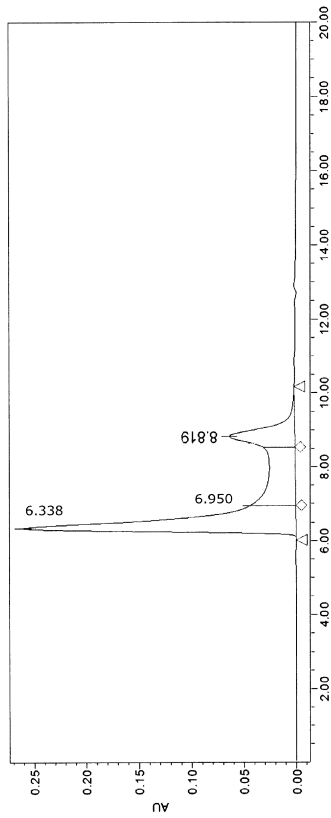
【図 3 3】



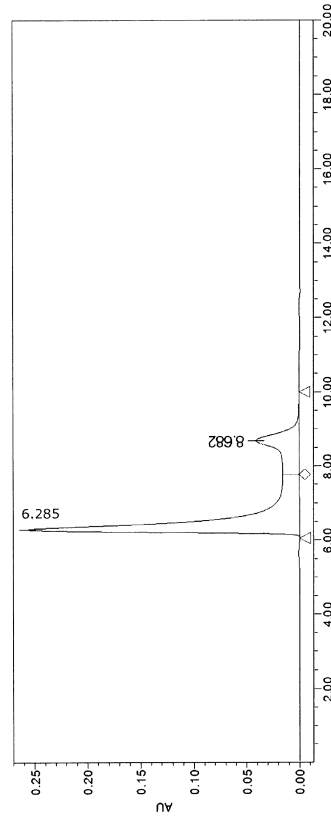
【図 3 4 A】



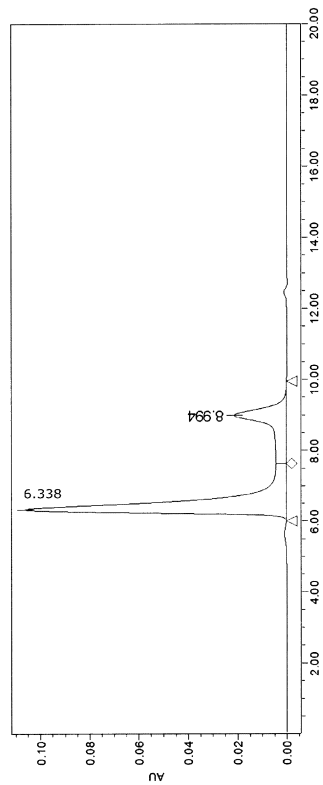
【図 3 4 B】



【図 3 4 C】

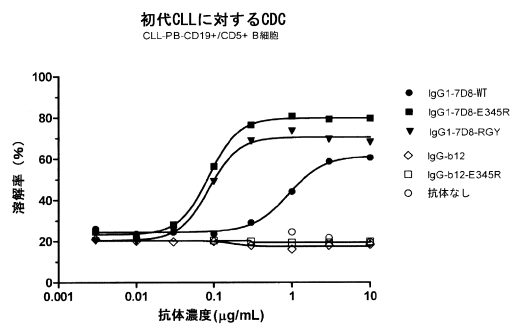


【図 3 4 D】

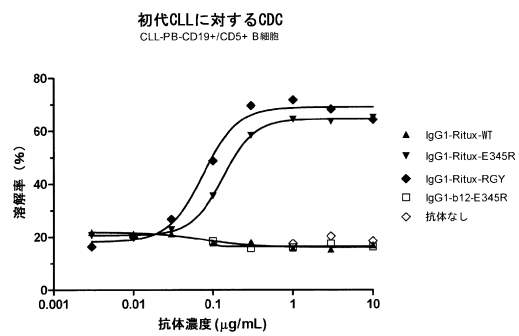


【図 3 5】

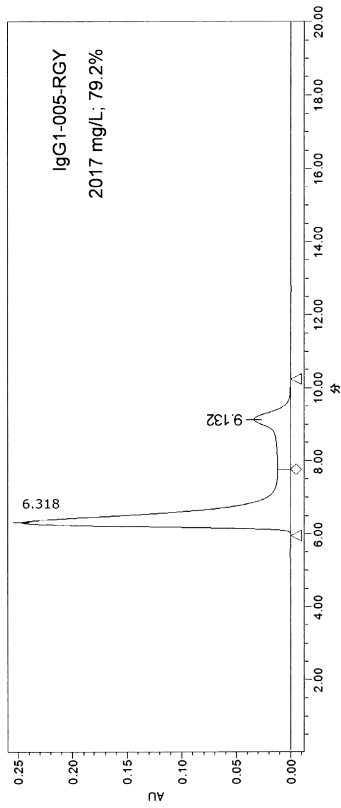
A



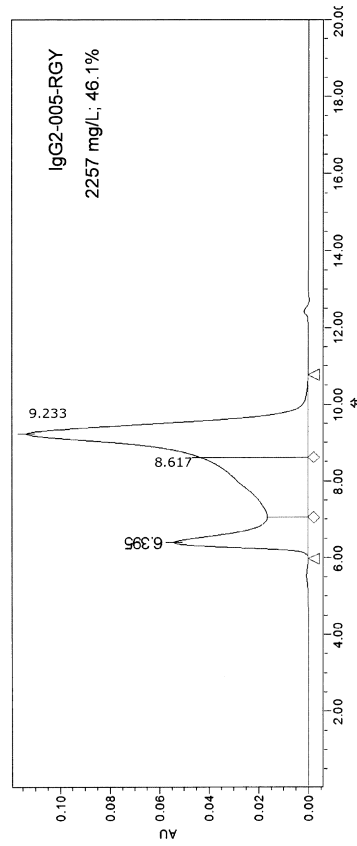
B



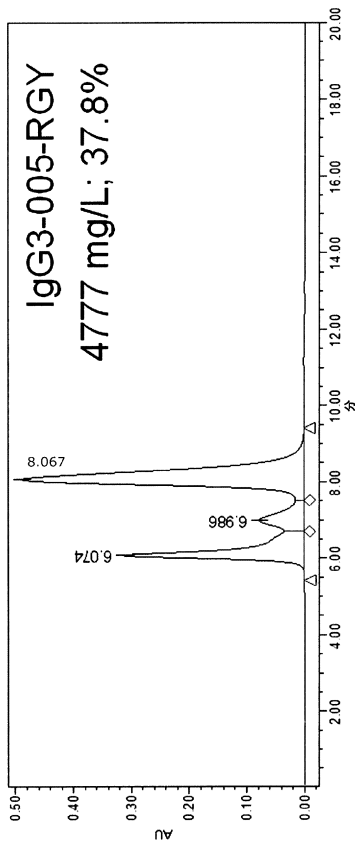
【図 3 6 A】



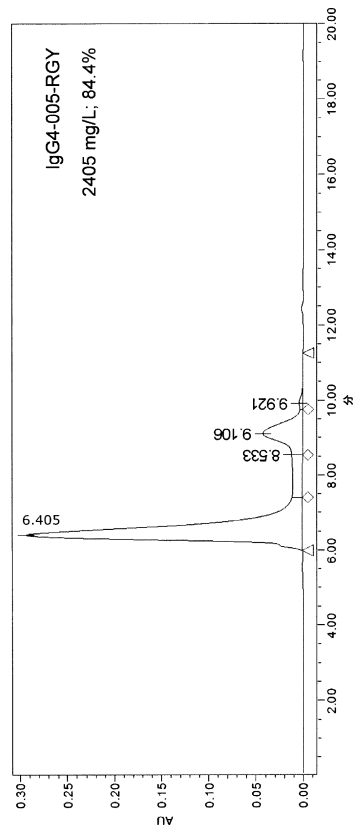
【図 3 6 B】



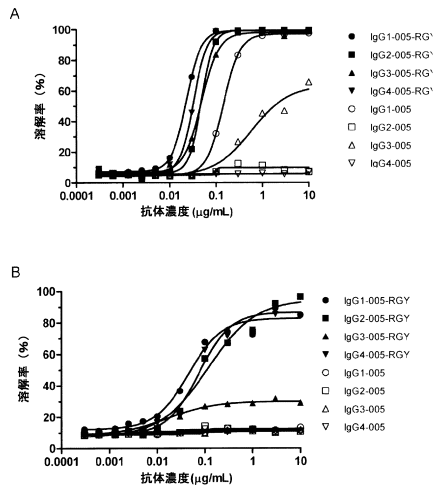
【図 3 6 C】



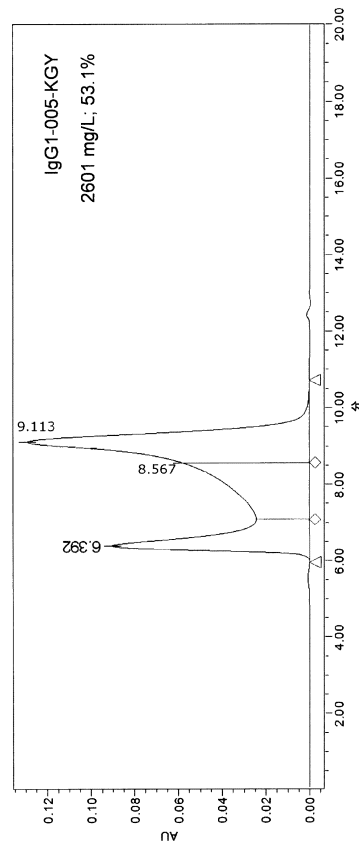
【図 3 6 D】



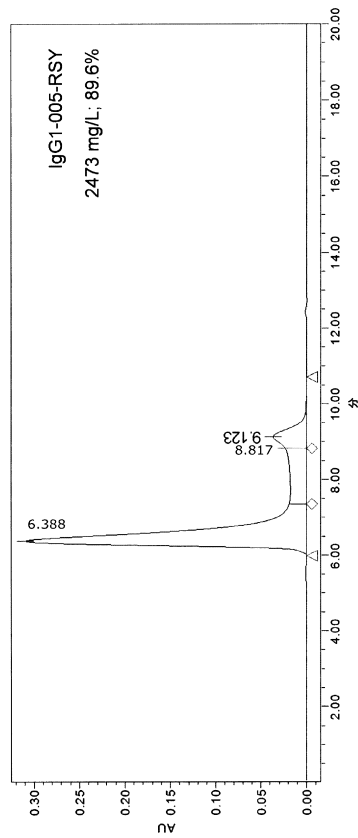
【図 37】



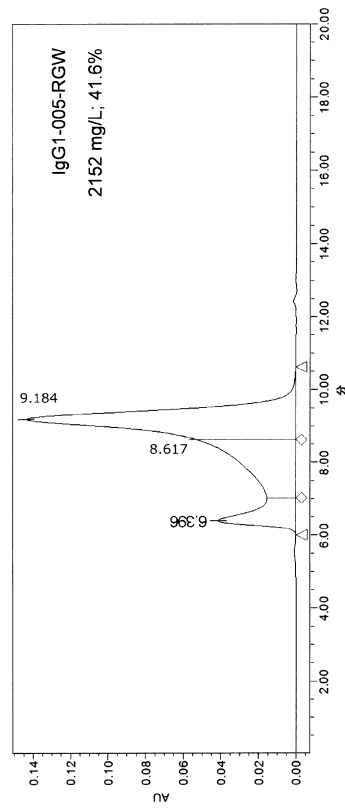
【図 38 A】



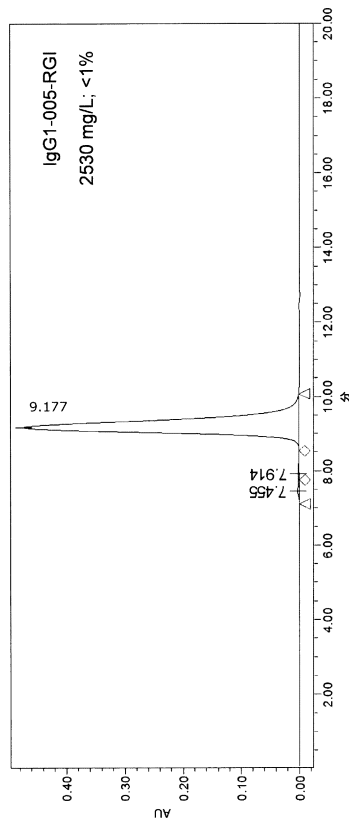
【図 38 B】



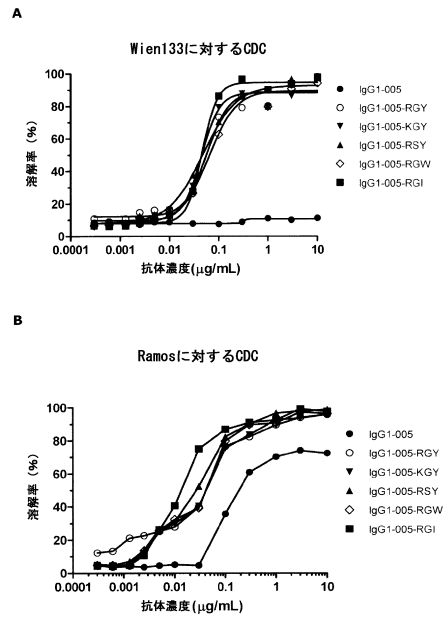
【図 38 C】



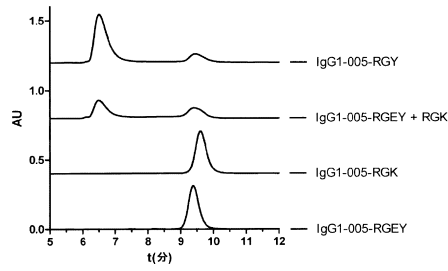
【図 38 D】



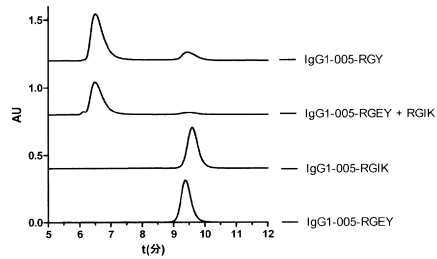
【図 39】



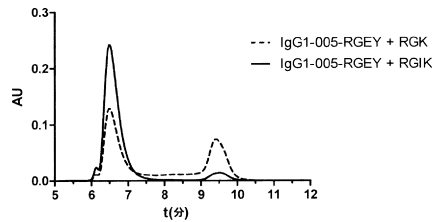
【図 40】



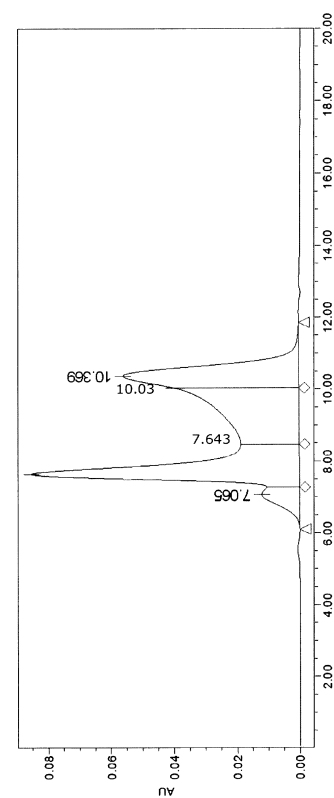
【図 41】



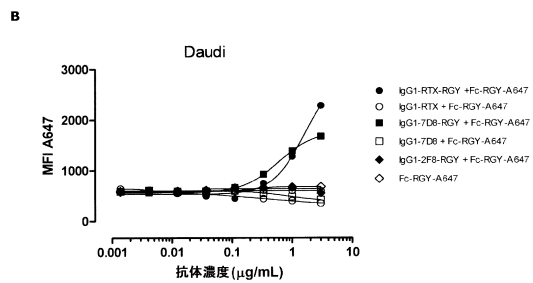
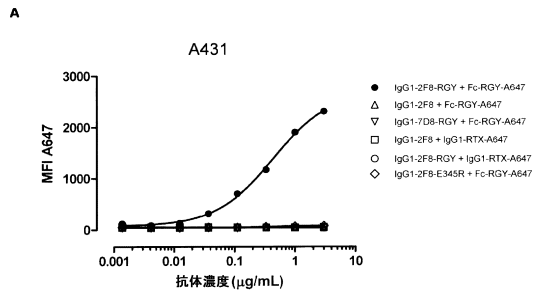
【図 42】



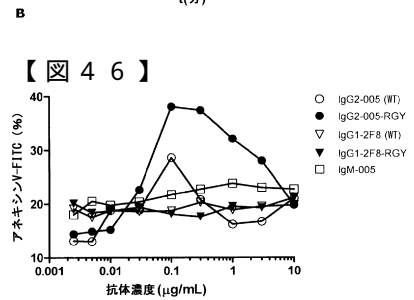
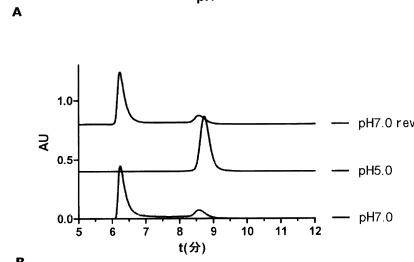
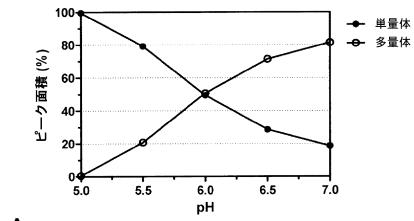
【図 43】



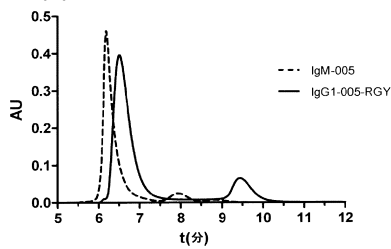
【図 4 4】



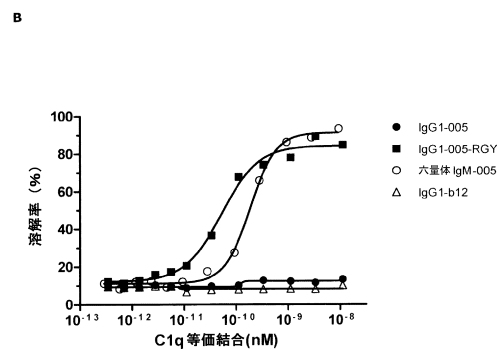
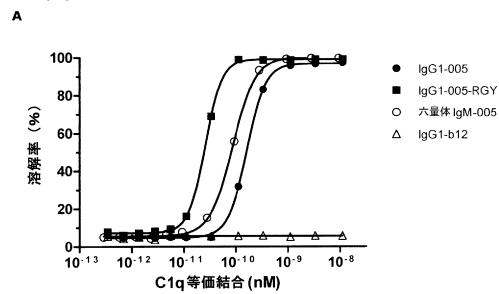
【図 4 5】



【図 4 7】

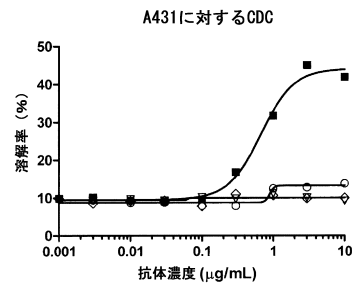


【図 4 8】

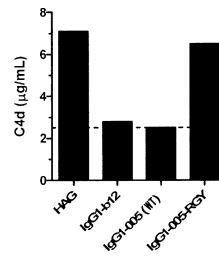


【図 49】

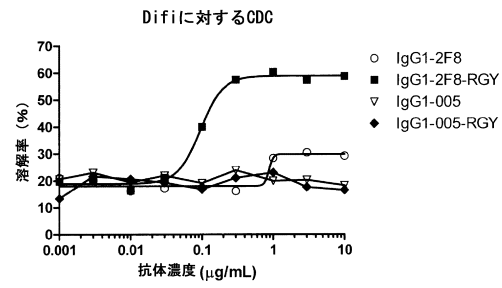
A



【図 50】



B



【配列表】

0006514103000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13

(31)優先権主張番号 61/751,045
 (32)優先日 平成25年1月10日(2013.1.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 デ ヨング ロブ エヌ .
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

(72)発明者 ビュースケンス フランク
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

(72)発明者 パルレン パウル
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

(72)発明者 ラブレイン アラン フランク
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

(72)発明者 スフルマン ジャニーヌ
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

(72)発明者 ブルグ アリエン
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

(72)発明者 ベルプローゲン サンドラ
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ . 内

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 特表2008-511292(JP,A)
 特表2008-504002(JP,A)
 国際公開第2010/106180(WO,A1)
 特表2008-519860(JP,A)
 特表2000-515731(JP,A)
 特表2014-520788(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

A61K 39/395

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)