

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6851200号  
(P6851200)

(45) 発行日 令和3年3月31日 (2021.3.31)

(24) 登録日 令和3年3月11日 (2021.3.11)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46
<b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13 Z N A
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19

請求項の数 24 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-555527 (P2016-555527)	(73) 特許権者	514232085
(86) (22) 出願日	平成27年3月5日 (2015.3.5)		ユーシービー バイオファルマ エスアー ルエル
(65) 公表番号	特表2017-512063 (P2017-512063A)		ベルギー国 1 0 7 0 ブリュッセル ア レ デ ラ レシエルシエ 6 0
(43) 公表日	平成29年5月18日 (2017.5.18)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/054687	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開番号	W02015/132364		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開日	平成27年9月11日 (2015.9.11)	(72) 発明者	ファラー アラニ、ファルナツ
審査請求日	平成30年2月26日 (2018.2.26)		イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、 アイピーディー 氣付
(31) 優先権主張番号	1403912.7	(72) 発明者	グリフィン、ロバート アンソニー
(32) 優先日	平成26年3月5日 (2014.3.5)		イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック、 アイピーディー 氣付
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	1403913.5		
(32) 優先日	平成26年3月5日 (2014.3.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		

(54) 【発明の名称】 多量体 F c タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 つ以上のポリペプチド単量体単位を含む多量体融合タンパク質であって、  
それぞれのポリペプチド単量体単位が、2 つの重鎖 F c 領域を含む抗体 F c ドメインを含み、

前記 2 つの重鎖 F c 領域は、それぞれ、3 0 9 位にシステイン以外の任意のアミノ酸残基を含み、単量体単位を集合させて多量体にするテイルピースにその C 末端で融合しており、

それぞれのポリペプチド単量体単位が、抗体可変領域も N 末端融合パートナーも含まず、  
前記 2 つの重鎖 F c 領域は、それぞれ、

2 3 4 位のロイシン残基がフェニルアラニン残基で置換されており、3 3 1 位のプロリン残基がセリン残基で置換されている ( L 2 3 4 F / P 3 3 1 S ) I g G 1 の C H 2 及び C H 3 ドメイン、

2 3 4 位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されている ( F 2 3 4 L ) I g G 4 の C H 2 及び C H 3 ドメイン、

2 3 4 位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されており、2 9 6 位のフェニルアラニン残基がチロシン残基で置換されている ( F 2 3 4 L / F 2 9 6 Y ) I g G 4 の C H 2 及び C H 3 ドメイン、

3 2 7 位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、3 3 0 位のセリン残基がアラニン残基で置換されている ( G 3 2 7 A / S 3 3 0 A ) I g G 4 の C H 2 及び C H 3 ド

10

20

メイン、

３２７位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、３３１位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（Ｇ３２７Ａ／Ｓ３３１Ｐ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメイン、

３３０位のセリン残基がアラニン残基で置換されており、３３１位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（Ｓ３３０Ａ／Ｓ３３１Ｐ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメイン、又は

ＩｇＧ４のＣＨ２ドメイン及びＩｇＧ１のＣＨ３ドメインを含む、多量体融合タンパク質。

【請求項２】

前記テイルピースがＩｇＭ又はＩｇＡのテイルピースである、請求項１に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項３】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域がそのＮ末端にヒンジ領域を有する、請求項１又は２に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項４】

前記ヒンジ領域が突然変異配列ＣＰＰＣを含む、請求項３に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項５】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、２３４位のロイシン残基がフェニルアラニン残基で置換されており、３３１位のプロリン残基がセリン残基で置換されている（Ｌ２３４Ｆ／Ｐ３３１Ｓ）ＩｇＧ１のＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項６】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、２３４位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されている（Ｆ２３４Ｌ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項７】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、２３４位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されており、２９６位のフェニルアラニン残基がチロシン残基で置換されている（Ｆ２３４Ｌ／Ｆ２９６Ｙ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項８】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、３２７位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、３３０位のセリン残基がアラニン残基で置換されている（Ｇ３２７Ａ／Ｓ３３０Ａ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項９】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、３２７位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、３３１位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（Ｇ３２７Ａ／Ｓ３３１Ｐ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項１０】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、３３０位のセリン残基がアラニン残基で置換されており、３３１位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（Ｓ３３０Ａ／Ｓ３３１Ｐ）ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項１１】

それぞれの重鎖Ｆｃ領域が、ＩｇＧ４のＣＨ２ドメインとＩｇＧ１のＣＨ３ドメインを含むハイブリッドである、請求項１から４のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 2】

それぞれの重鎖 F c 領域が、配列番号 3 5 ~ 4 7 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸 6 ~ 2 2 2 に与えられる配列を含む又はそれからなる、請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項 1 3】

それぞれのポリペプチド単量体単位が、それぞれのポリペプチド鎖が配列番号 3 5 ~ 4 7 のうちのいずれか 1 つに与えられる配列を含む又はそれからなる 2 つの同一なポリペプチド鎖を含む又はそれからなる、請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質のポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖をコードする単離された DNA。

【請求項 1 5】

配列番号 5 2 ~ 5 9 のうちのいずれか 1 つに与えられる配列を含む又はそれからなる、請求項 1 4 に記載の単離された DNA。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 又は請求項 1 5 に記載の 1 つ又は複数の DNA を含むクローニング又は発現ベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の 1 つ又は複数のクローニング又は発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 1 8】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質の産生のための方法であって、請求項 1 7 に記載の宿主細胞をタンパク質発現及び多量体への集合に適した条件下で培養することと、多量体融合タンパク質を単離し、場合によって精製することを含む、上記方法。

【請求項 1 9】

薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 2 0】

治療において使用するための、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

免疫不全の治療において使用するための、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

前記免疫不全が、免疫性血小板減少症、ギラン・バレー症候群、川崎病、及び慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーから選択される、請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

免疫不全の治療のための医薬を調製するための、請求項 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載の多量体融合タンパク質の使用。

【請求項 2 4】

前記免疫不全が、免疫性血小板減少症、ギラン・バレー症候群、川崎病、及び慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーから選択される、請求項 2 3 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はヒト F c 受容体に結合する多量体融合タンパク質に関する。本発明は、多量体融合タンパク質を含む治療組成物及び免疫不全の治療におけるその使用にも関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫不全は、異なる兆候、症状、原因及び発症機序を有する多種多様な疾患を包含する。これらの疾患の多くは、病原性抗体及び / 又は病原性免疫複合体の積極的関与を特徴と

10

20

30

40

50

する。ITP（免疫性血小板減少症、免疫性血小板紫斑病、特発性血小板減少症紫斑病と不定に呼ばれる）などの一部の疾患では、病原性抗体の標的抗原（Hoernberg, Scand J Immunol, Vol 74(5), p489-495, 2011）及び疾患過程はある程度はよく理解されている。そのような免疫不全は多くの場合、様々な従来の薬剤を単独療法として又は組み合わせて治療されている。そのような薬剤の例は、多数の副作用に関連している副腎皮質ステロイド、静注用免疫グロブリン（IVIg）及び抗Dである。

#### 【0003】

抗体は、多くの場合、免疫グロブリンと呼ばれるが、2つの同一な重（H）鎖及び2つの同一な軽（L）鎖を含み、鎖間ジスルフィド結合により共に保持されているY字型の分子である。それぞれの鎖は、配列が異なり抗原結合の原因となる1つの可変ドメイン（V）からなる。それぞれの鎖は少なくとも1つの定常ドメイン（C）からなる。軽鎖では、単一の定常ドメインがある。重鎖では、アイソタイプに応じて、少なくとも3つ、時に4つの定常ドメインがある（IgG、IgA及びIgDは3つを有し、IgM及びIgEは4つ有する）。

#### 【0004】

ヒトでは、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMと呼ばれる5つの異なるクラス又はアイソタイプの免疫グロブリンがある。これらのクラスすべてが基本的な4鎖Y字型構造を有しているが、その重鎖は異なり、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、及び $\alpha$ と呼ばれる。IgAは、IgA1及びIgA2と呼ばれる2つのサブクラスにさらに細区分することができる。IgGには、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4と呼ばれる4つのサブクラスがある。

#### 【0005】

抗体のFcドメインは典型的には、それぞれの重鎖のうち二量体化してFcドメインを形成する少なくとも最後の2つの定常ドメインを含む。Fcドメインは、主にFcRnへの結合を通じて抗体半減期を決定すること、身体全体への分布、補体を固定する能力、及び細胞表面Fc受容体への結合を含む、抗体エフェクター機能を提供する原因である。

#### 【0006】

抗体アイソタイプ間の違いはFcドメインが最も明白であり、これにより抗原に結合すると異なるエフェクター機能が始動される。構造の違いは抗体の重合状態の違いをもたらす。したがって、IgG、IgE及びIgDは一般に単量体であり、IgMは五量体と六量体の両方として存在し、IgAは主に血清中では単量体として漿粘液性分泌物中では二量体として存在する。

#### 【0007】

静注用免疫グロブリン（IVIg）は、何千人もの健常な血液ドナー由来のプールされた免疫グロブリンである。IVIgは、低IgGレベルの患者において日和見感染を予防するためのIgG補充療法として最初に使用された（Baerenwaldt, Expert Rev Clin Immunol, Vol 6(3), p425-434, 2010に概説されている）。ITPを抱えた小児におけるIVIgの抗炎症特性の発見後（Imbach, Helv Paediatric Acta, Vol 36(1), p81-86, 1981）、IVIgは現在、ITP、ギラン・バレー症候群、川崎病、及び慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの治療に認可されている（Nimmerjahn, Annu Rev Immunol, Vol 26, p513-533, 2008）。

#### 【0008】

病原性免疫複合体に関連している疾患では、成分免疫グロブリン画分のわずかな部分が不釣り合いに効果的であることが提唱されてきた。微量（典型的には1～5%）のIgGがIVIg内に多量体形態で存在していることが観察されている。この多量体画分の大多数は二量体であり、三量体及びさらに高次の形態はもっと少量であると考えられている。レシピエント抗イディオタイプ抗体の結合による注入後に追加の二量体が形成される可能性があることも提唱されてきた。1つの説は、これらの多量体形態が、増強されたその結合力のせいで、低親和性Fc受容体への結合をめぐる免疫複合体と競合するということなのである（Augener, Blut, Vol 50, p249-252, 1985; Teeling, Blood Vol 98(4), p1095

10

20

30

40

50



-1099, 2001; Machino, Y., Clin Exp Immunol, Vol 162(3), p415-424, 2010; Machino, Y. et al., BBRC, Vol 418, p748-753, 2012)。別の説は、I V I G内のI g Gのシアル酸グリコフォーム、特にさらに高いレベルの2 - 6シアル酸形態の存在がFc受容体活性化状態の変化を引き起こすというものである(Samuelsson, Science, Vol 291, p484-486, 2001; Kaneko, Science, Vol 313, p670-673, 2006; Schwab, European J Immunol Vol 42, p826-830, 2012; Sondermann, PNAS, Vol 110(24), p9868-9872, 2013)。

#### 【0009】

病原性抗体に関連している疾患では、ヒトに投与された極めて大用量のI V I G (1 ~ 2 g / k g) がFcRnにより遂行される正常なI g G恒常性機序を効果的に無効にすることが提唱されてきた。實際上、ドナーI V I GによりレシピエントI g Gを大量希釈すると、異化反応が増強され患者の病原性抗体の血清半減期が短くなる。その有効性について提唱されている他の機序には、病原性抗体の抗イディオタイプ中和及び補体因子の一過的減少が含まれる(Mollnes, Mol Immunol, Vol 34, p719-729, 1997; Crow, Transfusion Medicine Reviews, Vol 22(2), p103-116, 2008; Schwab, I. and Nimmerjahn, F. Nature Reviews Immunology, Vol 13, p176-189, 2013)。

#### 【0010】

I V I Gの臨床利用には著しい不都合がある。I V I Gは、製造方法及びドナープールの固有の違いのせいで製造業者間で製品品質が変わりやすい(Siegel, Pharmacotherapy Vol 25(11) p78S-84S, 2005)。I V I Gは、典型的には1 ~ 2 g / k gの桁で極めて大用量で与えられる。この大用量は長期の注入期間を必要とし(4 ~ 8時間、複数日にわたる場合もある)、これは患者には不快になることがあり、注入関連有害事象をもたらすことがある。重篤有害事象が起こることがあり、I g A欠損個体での反応はよく理解されている。I V I Gを受けている患者でサイトカイン放出が観察されることもあるが、これは用量及び注入速度を慎重に制御することにより大部分が最小化する。患者あたりの大量使用及びヒトドナーへの依存の結果として、I V I Gの製造は高価であり世界的な供給は非常に制限されている。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

まとめると、I V I Gの不都合は、病原性抗体及び病原性免疫複合体の疾患生物学を妨害することができる分子の臨床供給、投与及び有効性の点から改善の必要性が存在することを意味する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

I V I G療法の潜在的代替法として使用するための重合体Fc融合タンパク質は文献に記載されている(Mekhaie l et al; Nature Scientific Reports 1:124, published 19<sup>th</sup> October 2011)。Mekhaie lらは、六量体h I g G 1 - Fc - L H 3 0 9 / 3 1 0 C Lテイルピースを記載している。このタンパク質は、309位のロイシンがシステインで置換され、310位のヒスチジンがロイシンで置換されている二重突然変異を含む。

#### 【0013】

L 3 0 9 C / H 3 1 0 L二重突然変異は単量体単位の重合には不可欠であると発明当時は考えられていた(Mekhaie l et al; 2011)。しかし、驚くべきことに、本発明者らはL 3 0 9 C / H 3 1 0 L二重突然変異の非存在下でも集合して効率的に多量体になる多量体融合タンパク質を作り出した。

#### 【0014】

309位にシステイン残基がなければ多量体融合タンパク質の単離及び精製が単純化され、したがってその製造性が改善される。309位にシステイン残基がなければ免疫原性の可能性も減少することができる。さらに、本発明の多量体融合タンパク質の安全性及び有効性を大いに改善する追加の改変が説明される。

#### 【0015】

10

20

30

40

50

したがって、本発明ではI V I G及び先行技術代替物の不都合の多くを解決する、製造性が改善され有効性が高まった改良多量体融合タンパク質を提供する。このタンパク質は、慎重に制御された条件下で大量に産生することができ、供給が制限され品質が変化しやすいという問題をなくす。さらに、有効性が高まったことでもっと少用量の投与が可能になり、有害事象のリスクが減少する。

【0016】

Mekhaie lらにより記載されたタンパク質は主にワクチンとしての使用のために開発され、典型的には、抗原、病原体関連分子パターン(PAMP)、薬物、リガンド、受容体、サイトカイン又はケモカインなどの「融合パートナー」と呼ばれる異なるタンパク質に融合された。一例では、本発明のタンパク質は融合パートナーを含まない。

10

【0017】

I g M又はI g Aのいずれか由来のカルボキシル末端テイルピースが全I g G分子定常領域のカルボキシル末端に付加され、組換えI g M様I g Gを産生する先行技術において重合体融合タンパク質が記載されている(Smith R.I.F. and Morrison, S.L. Biotechnology, Vol 12, p683-688, 1994; Smith R.I.F. et al, J Immunol, Vol 154, p2226-2236, 1995; Sorensen V. et al, J Immunol, Vol 156, p2858-2865, 1996)。研究されたI g G分子は可変領域を含むインタクトな免疫グロブリンであった。これとは対照的に、本発明の多量体融合タンパク質は抗体可変領域を含まない。

【0018】

したがって、本発明では、I V I G及び先行技術代替物の不都合の多くを解決する、製造性が改善され安全性及び有効性が高まった改良多量体融合タンパク質を提供する。このタンパク質は、慎重に制御された条件下で組換え的に大量に産生することができ、供給が制限され品質が変化しやすいという問題をなくす。さらに、安全性及び有効性が高まったことでもっと少用量の投与が可能になり、有害事象のリスクが著しく減少する。

20

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の多量体融合タンパク質は集合的に「Fc多量体」と名付けられており、この2つの用語は本明細書では互換的に使用される。

【0020】

他の方法で定義されなければ、本明細書で使用される専門用語及び科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書で言及される出版物及び特許はすべて参照により組み込まれる。

30

【0021】

本明細書に記載される実施形態のいずれでも組み合わせることができることは認識されるであろう。

【0022】

本明細書では、他の方法で明記されていなければ、E U付番方式を使用して抗体ドメイン中の残基に言及する。この方式は最初、Edelman et al, 1969により考案され、Kabat et al, 1987に詳細に説明されている。

Edelman et al, 1969; 「全 G免疫グロブリン分子の共有結合構造(The covalent structure of an entire G immunoglobulin molecule)」, PNAS Biochemistry Vol.63 pp78-85.

40

Kabat et al, 1987; 「免疫学的に興味深いタンパク質の配列において(in Sequences of Proteins of Immunological Interest)」, US Department of Health and Human Services, NIH, USA.

【0023】

当業者には既知であるように、特定の抗体アイソタイプについて位置番号及び/又はアミノ酸残基が与えられている場合、他の任意の抗体アイソタイプにおける対応する位置及び/又はアミノ酸残基に適用できることが意図されている。I g M又はI g Aに由来するテイルピース中のアミノ酸残基に言及する場合、当技術分野の従来的慣習に従って、与え

50

られた位置番号は天然に存在する I g M 又は I g A における残基の位置番号である。

【 0 0 2 4 】

本発明は、2つ以上のポリペプチド単量体単位を含む多量体融合タンパク質であって、それぞれのポリペプチド単量体単位が、2つの重鎖 F c 領域を含む抗体 F c ドメインを含み、

それぞれの重鎖 F c 領域が、309 位にシステイン以外の任意のアミノ酸残基を含み、単量体単位を集合させて多量体にするテイルピースにその C 末端で融合しており、

それぞれのポリペプチド単量体単位が、抗体可変領域を含まない、

上記多量体融合タンパク質を提供する。

【 0 0 2 5 】

一例では、本発明の多量体融合タンパク質は融合パートナーをさらに含む。用語「融合パートナー」は1つ又は複数の抗体可変ドメインを明確に排除する。典型的には用語「融合パートナー」とは抗原、病原体関連分子パターン ( P A M P )、薬物、リガンド、受容体、サイトカイン又はケモカインのことである。

前記融合パートナーは、存在している場合には、それぞれの重鎖 F c 領域の N 末端に融合される。融合パートナーは重鎖 F c 領域の N 末端に直接融合させることができる。代わりに、融合パートナーは、存在する場合にはヒンジを含んでいてもよい介在アミノ酸配列により間接的に融合させることができる。例えば、短いリンカー配列を融合パートナーと重鎖 F c 領域の間に与えることができる。

【 0 0 2 6 】

一例では、本発明のタンパク質は融合パートナーを含まない。

【 0 0 2 7 】

特に、本発明の多量体融合タンパク質は1つ又は複数の抗体可変領域を含まず、典型的にはこの分子は V H も V L 抗体可変領域も含まない。一例では、本発明の多量体融合タンパク質は F a b 断片を含まない。

【 0 0 2 8 】

本発明の多量体融合タンパク質のそれぞれのポリペプチド単量体単位は抗体 F c ドメインを含む。

【 0 0 2 9 】

本発明の抗体 F c ドメインは適切ないかなる種に由来していてもよい。一実施形態では、抗体 F c ドメインはヒト F c ドメインに由来している。

【 0 0 3 0 】

抗体 F c ドメインは、I g A (サブクラス I g A 1 及び I g A 2 を含む)、I g D、I g E、I g G (サブクラス I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 を含む)、及び I g M を含む、抗体の適切ないかなるクラス由来でもよい。一実施形態では、抗体 F c ドメインは I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 に由来する。一実施形態では、抗体 F c ドメインは I g G 1 に由来する。一実施形態では、抗体 F c ドメインは I g G 4 に由来する。

【 0 0 3 1 】

抗体 F c ドメインは、それぞれが重鎖 F c 領域と呼ばれる2つのポリペプチド鎖を含む。この2つの重鎖 F c 領域は二量体化して抗体 F c ドメインを作り出す。抗体 F c ドメイン内の2つの重鎖 F c 領域は互いに異なってもよいが、これらの F c 領域は通常は互いに同一であることは認識されるであろう。したがって、用語「重鎖 F c 領域」が下の本明細書で使用される場合、この用語は、同一の重鎖 F c 領域と二量体化して抗体 F c ドメインを作り出す単一の重鎖 F c 領域を指すのに使用される。

【 0 0 3 2 】

典型的にはそれぞれの重鎖 F c 領域は2つ若しくは3つの重鎖定常ドメインを含む又はそれからなる。

【 0 0 3 3 】

天然の抗体では、I g A、I g D 及び I g G の重鎖 F c 領域は、2つの重鎖定常ドメイ

10

20

30

40

50

ン（ＣＨ２及びＣＨ３）で構成されており、ＩｇＥ及びＩｇＭの重鎖Ｆｃ領域は３つの重鎖定常ドメイン（ＣＨ２、ＣＨ３及びＣＨ４）で構成されている。これらは二量体化してＦｃドメインを作り出す。

【００３４】

本発明では、重鎖Ｆｃ領域は、１つ又は複数の異なるクラスの抗体、例えば、１つ、２つ又は３つの異なるクラス由来の重鎖定常ドメインを含むことができる。

【００３５】

一実施形態では、重鎖Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１に由来するＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む。

【００３６】

一実施形態では、重鎖Ｆｃ領域は、ＩｇＧ２に由来するＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む。

【００３７】

一実施形態では、重鎖Ｆｃ領域は、ＩｇＧ３に由来するＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む。

【００３８】

一実施形態では、重鎖Ｆｃ領域は、ＩｇＧ４に由来するＣＨ２及びＣＨ３ドメインを含む。

【００３９】

本発明の多量体融合タンパク質は集合的に「Ｆｃ多量体」と名付けられており、この２つの用語は本明細書では互換的に使用される。

【００４０】

本発明者らは、ＣＨ３ドメインが本発明の多量体融合タンパク質の単量体単位の重合を制御するのに重要な役割を果たしていることを思いがけず見出した。重合は、Ｆｃ領域の由来となるＩｇＧサブクラスに応じて変化することが思いがけず見出された。ＩｇＧ１に由来するＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインを含むＦｃ多量体は非常に効率的に集合して六量体になり、この分子のおおよそ８０％が六量体形態で存在していた。これとは対照的に、ＩｇＧ４に由来するＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインを含むＦｃ多量体はもっと低いレベルの六量体を形成した。ＣＨ２ドメインが１つの特定のＩｇＧサブクラスに由来しＣＨ３ドメインが異なるＩｇＧサブクラスに由来するハイブリッドＦｃ領域を含むＦｃ多量体を調べると、六量体を形成する能力が主にＣＨ３ドメインによりコードされていることが明らかになった。ＩｇＧ１に由来するＣＨ３ドメインの存在は六量体化を著しく増加させる。ＣＨ３ドメインがＩｇＧ１に由来しＣＨ２ドメインがＩｇＧ４に由来するハイブリッドＦｃ多量体はＩｇＧ１野生型と全く同じくらい効率的に集合し、この分子のおおよそ８０％が六量体として見出された（例４及び図３）。したがって、ＩｇＧ４のＣＨ３ドメインをＩｇＧ１のＣＨ３ドメインで置き換えると、野生型ＩｇＧ４Ｆｃ多量体と比べて六量体化のレベルが改善される。こうして得られるハイブリッドは、ＩｇＧ４の望ましい特性の多くを保持しつつ高レベルの六量体形成という利点を有する。

【００４１】

さらに、ＩｇＧ１のＣＨ３ドメインは熱安定性を与えることで知られている（Garber and Demarest, Biochem and Biophys Res Comm, Vol 355 p751-757 2007）。したがって、ＩｇＧ１に由来するＣＨ３ドメインを含むハイブリッドＦｃ多量体は改善された安定性も有することになる。

【００４２】

したがって、一実施形態では、重鎖Ｆｃ領域はＩｇＧ１に由来するＣＨ３ドメインを含む。

【００４３】

一実施形態では、重鎖Ｆｃ領域はＩｇＧ４に由来するＣＨ２ドメインとＩｇＧ１に由来するＣＨ３ドメインを含む。

【００４４】

10

20

30

40

50

したがって、一実施形態では、本発明は、2つ以上のポリペプチド単量体単位を含む多量体融合タンパク質であって、

それぞれのポリペプチド単量体単位が、2つの重鎖Fc領域を含む抗体Fcドメインを含み、

それぞれの重鎖Fc領域が、309位にシステイン以外の任意のアミノ酸残基を含み、単量体単位を集合させて多量体にするテイルピースにそのC末端で融合しており、

それぞれの重鎖Fc領域が、IgG4に由来するCH2ドメインとIgG1に由来するCH3ドメインを含み、場合によりポリペプチド単量体単位が抗体可変領域を含まない、上記多量体融合タンパク質を提供する。

【0045】

10

本発明者らは、CH3ドメインの355位のアミノ酸が六量体化に極めて重要であることを立証してきた。IgG1 CH3ドメインの355位に通常見出されるアルギニン残基は、特に効率的な六量体化を促進することが分かっていた。本明細書の下に記載される例4を参照されたい。

【0046】

したがって、一実施形態では、重鎖Fc領域は355位にアルギニン残基を含む。

【0047】

IgG1 CH3ドメインの355位に通常見出されるアルギニン残基をシステイン残基で置換すると(R355C)野生型IgG1を超えて六量体形成が増加した。本明細書の下に記載される例4を参照されたい。

20

【0048】

したがって、一実施形態では、重鎖Fc領域は355位にシステイン残基を含む。

【0049】

IgG4に由来するCH3ドメインを含む本発明のFc多量体では、355位のグルタミン残基をアルギニン残基で置換すると(Q355R)六量体化が著しく増加される。したがって、IgG4 Fc多量体の比較的低い六量体化という問題は、単一のアミノ酸置換により解決することが可能である。これには、こうして得られるFc多量体が、IgG4の特徴的特性を保持しつつ極めて効率的に集合して六量体になるという利点がある。

【0050】

したがって、一実施形態では、重鎖Fc領域は、355位のグルタミン残基が別のアミノ酸で置換されているIgG4に由来するCH3ドメインを含む。

30

【0051】

したがって、一実施形態では、重鎖Fc領域は、355位のグルタミン残基がアルギニン残基(Q355R)又はシステイン残基(Q355C)で置換されているIgG4に由来するCH3ドメインを含む。

【0052】

一実施形態では、重鎖Fc領域は、IgMに由来するCH4ドメインを含む。IgM CH4ドメインは典型的にはCH3ドメインとテイルピース間に位置している。

【0053】

一実施形態では、重鎖Fc領域は、IgGに由来するCH2及びCH3ドメイン並びにIgMに由来するCH4ドメインを含む。

40

【0054】

本発明の重鎖Fc領域を産生するのに使用するための重鎖定常ドメインは、上記の天然に存在する定常ドメインの変異体を含むことができることは認識されるであろう。そのような変異体は、野生型定常ドメインと比べて1つ又は複数のアミノ酸変異を含むことができる。一例では、本発明の重鎖Fc領域は、野生型定常ドメインとは配列が異なる少なくとも1つの定常ドメインを含む。変異定常ドメインは野生型定常ドメインと比べて長くても短くてもよいことは認識されるであろう。好ましくは、変異定常ドメインは野生型定常ドメインと少なくとも50%同一である又は類似している。用語「同一性」は、本明細書で使用されるように、整列させた配列中のいかなる特定の位置でもアミノ酸残基が配列間

50

で同一であることを示す。用語「類似性」は、本明細書で使用されるように、整列させた配列中のいかなる特定の位置でもアミノ酸残基が配列間で類似する種類であることを示す。例えば、イソロイシン又はバリンの代わりにロイシンを使ってもよい。多くの場合互いに置き換えることが可能である他のアミノ酸には、

フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）

リシン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）

アスパラギン酸及びグルタミン酸（酸性側鎖を有するアミノ酸）

アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）、並びに

システイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）

が含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【0055】

同一性及び類似性の程度は容易に計算することが可能である（Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991）。一例では、変異定常ドメインは野生型定常ドメインに少なくとも60%同一である又は類似している。別の例では、変異定常ドメインは少なくとも70%同一である又は類似している。別の例では、変異定常ドメインは少なくとも80%同一である又は類似している。別の例では、変異定常ドメインは少なくとも90%同一である又は類似している。別の例では、変異定常ドメインは少なくとも95%同一である又は類似している。

20

#### 【0056】

それぞれの重鎖Fc領域は、ポリペプチド単量体単位を集合させて多量体にするテイルピースにそのC末端で融合している。

#### 【0057】

IgM及びIgAは、共通H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>抗体単位の共有結合多量体としてヒトにおいて天然に存在している。IgMはJ鎖を組み込んでいる場合は五量体として、又はJ鎖を欠く場合は六量体として存在する。IgAは単量体及び二量体形態として存在する。IgM及びIgAの重鎖は、テイルピースとして知られる、C末端定常ドメインまでの18アミノ酸伸長を有する。このテイルピースには、重合体中の重鎖間にジスルフィド結合を形成するシステイン残基が含まれ、重合において重要な役割を有すると考えられている。テイルピースはグリコシル化部位も含有する。

30

#### 【0058】

本発明のテイルピースは適切ないかなるアミノ酸配列でも含むことができる。本発明のテイルピースは天然に存在する抗体中に見出されるテイルピースでもよく、又は代わりに、天然のテイルピースとは長さ及び/若しくは組成が異なる改変されたテイルピースであってもよい。他の改変されたテイルピースは完全に合成的でもよく、長さ、柔軟性及びシステイン組成などの多量体化のために所望の特性を有するように設計することもできる。

40

#### 【0059】

テイルピースは適切ないかなる種に由来してもよい。抗体テイルピースは進化的に保存されており、硬骨類などの原始的な種を含む大半の種に見出される。一実施形態では、本発明のテイルピースはヒト抗体に由来する。

#### 【0060】

一実施形態では、テイルピースは、表1に示されるヒトIgM又はIgA由来の18アミノ酸テイルピース配列のすべて又は一部を含む。

#### 【0061】

テイルピースは重鎖Fc領域のC末端に直接融合させることができる。代わりに、テイルピースは介在アミノ酸配列によって間接的に融合させることができる。例えば、短い

50

ンカー配列をテイルピースと重鎖 F c 領域の間に与えてもよい。

【 0 0 6 2 】

本発明のテイルピースは、上記の天然の配列の変異体又は断片を含むことができる。I g M又はI g Aテイルピースの変異体は典型的には、表 1 に示される 1 8 アミノ酸位置のうちの 8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、又は 1 7 における天然の配列と同一であるアミノ酸配列を有する。断片は典型的には 8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、又は 1 7 アミノ酸を含む。テイルピースはハイブリッド I g M / I g Aテイルピースでもよい。変異体の断片も想定している。

【表 1】

表 1 テイルピース配列

テイルピース	配列	
IgM	PTLYNVSLVMSDTAGTCY	配列番号 1
IgA	PTHVNVSVVMAEVDGTCY	配列番号 2

【 0 0 6 3 】

本発明のそれぞれの重鎖 F c 領域は、場合により、その N 末端に天然の又は改変されたヒンジ領域を有することができる。

【 0 0 6 4 】

天然のヒンジ領域は、天然に存在する抗体中の F a b と F c ドメイン間に通常見出されると考えられるヒンジ領域である。改変されたヒンジ領域は天然のヒンジ領域とは長さ及び / 又は組成が異なる任意のヒンジである。そのようなヒンジは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サメ、ブタ、ハムスター、ラクダ、ラマ又はヤギヒンジ領域などの他の種由来のヒンジ領域を含むことが可能である。他の改変されたヒンジ領域は、重鎖 F c 領域のクラス又はサブクラスとは異なるクラス又はサブクラスの抗体に由来する完全なヒンジ領域を含むことができる。代わりに、改変されたヒンジ領域は、天然のヒンジの一部又はリピート中のそれぞれの単位が天然のヒンジ領域に由来する反復単位を含むことができる。追加の代替物では、天然のヒンジ領域は、1 つ若しくは複数のシステイン若しくは他の残基をセリン若しくはアラニンなどの中性の残基に変換することにより、又は適切に置かれた残基をシステイン残基に変換することにより改変することができる。そのような手段により、ヒンジ領域のシステイン残基の数を増やす又は減らすことができる。他の改変されたヒンジ領域は完全に合成的でもよく、長さ、システイン組成及び柔軟性などの所望の特性を有するように設計することもできる。

【 0 0 6 5 】

いくつかの改変されたヒンジ領域が既に、例えば、U S 5 6 7 7 4 2 5、W O 9 9 1 5 5 4 9、W O 2 0 0 5 0 0 3 1 7 0、W O 2 0 0 5 0 0 3 1 6 9、W O 2 0 0 5 0 0 3 1 7 0、W O 9 8 2 5 9 7 1 及び W O 2 0 0 5 0 0 3 1 7 1 に記載されており、これらの特許文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 6 】

適切なヒンジ配列の例は表 2 に示されている。

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、重鎖 F c 領域はその N 末端にインタクトなヒンジ領域を有する。

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、重鎖 F c 領域及びヒンジ領域は I g G 4 に由来し、ヒンジ領域は突然変異配列 C P P C ( 配列番号 1 1 ) を含む。ヒト I g G 4 のコアヒンジ領域は、配列 C P P C を含有する I g G 1 と比べた場合、配列 C P S C ( 配列番号 1 2 ) を含有する。I g G 4 配列中に存在するセリン残基はこの領域の柔軟性を増加させ、したがって、I g G 分子内のもう一方の重鎖に架橋して鎖間ジスルフィドを形成するのではなく分子の部分が同一タンパク質鎖内でジスルフィド結合 ( 鎖内ジスルフィド ) を形成する ( Angal S. et al

10

20

30

40

50

, Mol Immunol, Vol 30(1), p105-108, 1993)。セリン残基をプロリンに変えてIgG1と同じコア配列を与えると、IgG4ヒンジ領域における鎖間ジスルフィドの完全な形成が可能になり、したがって、精製された製品中の不均一性が減じられる。この改変されたアイソタイプはIgG4Pと名付けられる。

【表2】

表2. ヒンジ配列

ヒンジ	配列	
ヒトIgA1	VPSTPPTPSPSTPPTSPS	配列番号 3
ヒトIgA2	VPPPPP	配列番号 4
ヒトIgD	ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGE EKKKEKEKEEQEERETKTP	配列番号 5
ヒトIgG1	EPKSCDKTHTCPPCP	配列番号 6
ヒトIgG2	ERKCCVECP	配列番号 7
ヒトIgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	配列番号 8
ヒトIgG4	ESKYGPPCPSCP	配列番号 9
ヒトIgG4(P)	ESKYGPPCPPCP	配列番号 10
組換え v1	CPPC	配列番号 11
組換え v2	CPSC	配列番号 12
組換え v3	CPRC	配列番号 13
組換え v4	SPPC	配列番号 14
組換え v5	CPPS	配列番号 15
組換え v6	SPPS	配列番号 16
組換え v7	DKTHTCAA	配列番号 17
組換え v8	DKTHTCPPCPA	配列番号 18
組換え v9	DKTHTCPPCPATCPPCPA	配列番号 19
組換え v10	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA	配列番号 20
組換え v11	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY	配列番号 21
組換え v12	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY	配列番号 22
組換え v13	DKTHTCCVECPCPA	配列番号 23
組換え v14	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA	配列番号 24
組換え v15	DKTHTCPSCPA	配列番号 25

【0069】

本発明の多量体融合タンパク質は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12又はそれよりも多いポリペプチド単量体単位を含むことができる。そのようなタ



ンパク質は代わりに、それぞれ、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、十一量体、十二量体、等と呼ばれることもある。

【 0 0 7 0 】

多量体融合タンパク質は、一定範囲の数のポリペプチド単量体単位を有する、異なるサイズの多量体融合タンパク質の混合物を含むことができる。

【 0 0 7 1 】

一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は 6 又は 1 2 ポリペプチド単量体単位を含む。

【 0 0 7 2 】

一例では、本発明の多量体融合タンパク質は六量体である。

10

【 0 0 7 3 】

したがって、一例では、本発明は、6 ポリペプチド単量体単位からなる多量体融合タンパク質であって、

それぞれのポリペプチド単量体単位が抗体 F c ドメインとテイルピース領域からなり、それぞれの抗体 F c ドメインが、309 位のアミノ酸残基がシステイン以外の任意のアミノ酸残基である 2 つの重鎖 F c 領域からなり、場合によって、それぞれの重鎖 F c 領域が N 末端にヒンジ領域を有し、

テイルピース領域がそれぞれの重鎖 F c 領域の C 末端に融合されており単量体単位を集合させて多量体にする、

上記多量体融合タンパク質を提供する。

20

【 0 0 7 4 】

一例では、本発明の多量体融合タンパク質は精製された六量体である。一例では、用語「精製された」は、80 % よりも多い六量体、例えば、90 % 又は 95 % よりも多い六量体を意味する。試料中の六量体の量は、本明細書の下に記載される分析的サイズ排除クロマトグラフィーなどの任意の適切な方法を使用して決定することが可能であることは認識されるであろう。

【 0 0 7 5 】

一例では、本発明は、本発明の多量体融合タンパク質を 1 つよりも多い多量体、例えば、六量体及び十二量体の形態で含む混合物であるが、前記多量体融合タンパク質の六量体形態について濃縮されている上記混合物を提供する。

30

【 0 0 7 6 】

一例では、そのような混合物は 80 % よりも多い六量体を含むことができる。一例では、そのような混合物は 85 %、90 %、又は 95 % よりも多い六量体を含むことができる。

【 0 0 7 7 】

本発明のそれぞれのポリペプチド単量体単位は 2 つの個別のポリペプチド鎖を含む。特定のポリペプチド単量体単位内の 2 つのポリペプチド鎖は互いに同じでもよく、又は互いに異なっていてよい。一実施形態では、2 つのポリペプチド鎖は互いに同じである。

【 0 0 7 8 】

同様に、特定の多量体融合タンパク質内のポリペプチド単量体単位は互いに同じでもよく、又は互いに異なっていてよい。一実施形態では、ポリペプチド単量体単位は互いに同じである。

40

【 0 0 7 9 】

一実施形態では、ポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖は図 2 に提供されるアミノ酸配列を、場合によっては、代替のヒンジ又はテイルピース配列と一緒に含む。

【 0 0 8 0 】

したがって、一例では、本発明は、2 つ以上、好ましくは 6 つのポリペプチド単量体単位を含む又はそれからなる多量体融合タンパク質であって、

それぞれのポリペプチド単量体単位が 2 つの同一なポリペプチド鎖を含み、それぞれのポリペプチド鎖が配列番号 26 ~ 47 のいずれか 1 つに与えられる配列を含む又はそれから

50

なり、

それぞれのポリペプチド単量体単位が抗体可変領域を含まない、  
上記多量体融合タンパク質も提供する。

【0081】

一例では、本発明は、2つ以上、好ましくは6つのポリペプチド単量体単位を含む又はそれからなる多量体融合タンパク質であって、

それぞれのポリペプチド単量体単位が2つの同一なポリペプチド鎖を含み、それぞれのポリペプチド鎖が、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46及び配列番号47からなる群から選択される配列を含み又はそれからなり、

場合により、それぞれのポリペプチド単量体単位が抗体可変領域を含まない、  
上記多量体融合タンパク質も提供する。

【0082】

ヒンジ及びテイルピースが配列番号26～47に与えられる配列とは異なっていることがある一例では、本発明は、2つ以上ポリペプチド単量体単位を含む多量体融合タンパク質であって、

それぞれのポリペプチド単量体単位が、2つの重鎖Fc領域を含む抗体Fcドメインを含み、

それぞれの重鎖Fc領域が、配列番号26～29のいずれか1つのアミノ酸6～222若しくは配列番号32～47のいずれか1つのアミノ酸6～222に与えられる配列又は配列番号30若しくは31のアミノ酸6～333に与えられる配列を含み又はそれからなり、単量体単位を多量体に集合させるテイルピースにそのC末端で融合されており、ポリペプチド単量体単位が抗体可変領域を含まない、  
上記多量体融合タンパク質を提供する。

【0083】

典型的には、C末端でのテイルピースに加えて、それぞれの重鎖Fc領域はN末端にヒンジ配列をさらに含む。

【0084】

本発明の多量体融合タンパク質は、本明細書の下に記載するように、タンパク質の機能的特性、例えば、FcRn若しくは白血球受容体などのFc受容体への結合、補体への結合、改変されたジスルフィド結合構築又は変化したグリコシル化パターンを変化させる1つ又は複数の突然変異を含むことができる。これらの突然変異のいずれでも適切な任意の方法で組み合わせて所望の機能的特性を実現する、及び/又は他の突然変異と組み合わせてタンパク質の機能的特性を変化させることは認識されるであろう。

【0085】

本発明では、特に免疫不全の治療において使用するのに適したFc多量体を作り出した。Fc多量体は以下の特性を有するように操作した。

【0086】

免疫不全の治療において使用するためのFc多量体タンパク質の効力是可以する限り高いほうがよい。効力は、例6に記載される抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用の阻害を測定することにより決定することができる。

【0087】

望まれない副作用はできる限り低いほうがよい。望まれない副作用は、それぞれ例8、15及び16に記載されるサイトカイン放出、C1q結合及び血小板活性化を測定することにより決定することができる。

【0088】

IgG1に由来するCH2及びCH3ドメインを含み追加の突然変異が全くない野生型IgG1 Fc多量体のほうが、免疫不全の治療において使用するのに適していない可能

10

20

30

40

50

性がある。なぜならば、野生型 I g G 1 F c 多量体は高い効力の食作用阻害を示すが、サイトカイン放出、C 1 q 結合及び血小板活性化によって測定した場合、高レベルの望ましくない副作用も示すからである。

#### 【 0 0 8 9 】

I g G 4 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含む野生型 I g G 4 F c 多量体が生じる望ましくない副作用のレベルは非常に低い、その効力は I g G 1 の効力と比べて低い。にもかかわらず、図 7 で示されるように、野生型 I g G 4 F c 多量体の効力はそれでも I V I G の効力よりも有意に高い。

#### 【 0 0 9 0 】

一例では、本発明は、I g G 1 と I g G 4 野生型 F c 多量体の両方の望ましい特性を組み合わせようとして操作されており、望ましくない特性がない F c 多量体タンパク質も提供する。下の表 3 に示されるように、これらの F c 多量体は望ましくない副作用を許容レベルにまで減少させつつ、効果的レベルの効力を示す。これらの F c 多量体は免疫不全の治療において使用するのに特に有用であると予想される。

#### 【表 3】

**表 3**

Fc 多量体	食作用阻害	IFN $\gamma$ 放出	C1q 結合	血小板活性化
野生型 IgG1 Fc-多量体	「IgG1 様」の標準	「IgG1 様」の標準	「IgG1 様」の標準	「IgG1 様」の標準
野生型 IgG4 Fc-多量体	「IgG4 様」の標準	「IgG4 様」の標準	「IgG4 様」の標準	「IgG4 様」の標準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	高	中程度	IgG4 様	IgG4 様
ハイブリッド Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	中程度	IgG4 様	IgG4 様	低
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	中程度	IgG4 様	IgG4 様	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	中程度	IgG4 様	IgG4 様	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	中程度	IgG4 様	IgG4 様	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	中程度	IgG4 様	中程度	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	中程度	IgG4 様	中程度	IgG4 様

#### 【 0 0 9 1 】

一例では、本発明は、非改変の親多量体融合タンパク質と比べた場合、サイトカイン放出を減少させ及び / 又は血小板活性化を減少させ及び / 又は C 1 q 結合を減少させる 1 つ又は複数の突然変異を含む多量体融合タンパク質を提供する。一例では、非改変の親は I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含有する本発明の多量体融合タンパク質である。

サイトカイン放出、血小板活性化及び C 1 q 結合は当技術分野で既知の任意の適切な方法により測定することができる。一例では、サイトカイン放出は全血サイトカイン放出アッセイにおいて測定される。

一例では、血小板活性化は、活性化マーカーとして C D 6 2 p を使用してフローサイトメトリーにより測定される。

一例では、C 1 q 結合はE L I S Aにより測定される。

【 0 0 9 2 】

一例では、本発明は、非改変の親多量体融合タンパク質と比べた場合、抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用の障害の効力を増加させる1つ又は複数の突然変異を含む多量体融合タンパク質を提供する。一例では、非改変の親は、I g G 4に由来するC H 2及びC H 3ドメイン又はI g G 4由来のC H 2ドメイン及びI g G 1由来のC H 3ドメインを含有する本発明の多量体融合タンパク質である。

【 0 0 9 3 】

抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用の障害を測定するのに適したアッセイは当技術分野では既知であり、本明細書の実施例に記載されている。

10

【 0 0 9 4 】

したがって、一例では、本発明の多量体融合タンパク質のそれぞれの重鎖F c領域は、2 3 4位のロイシン残基及び/又は3 3 1位のプロリン残基及び/又は3 2 7位のアラニン及び/又は2 9 6位のチロシンが別のアミノ酸で置換されているI g G 1に由来するC H 2及びC H 3ドメインを含む。

【 0 0 9 5 】

一実施形態では、重鎖F c領域は、2 3 4位のロイシン残基がフェニルアラニン残基で置換されており、3 3 1位のプロリン残基がセリン残基で置換されている(L 2 3 4 F / P 3 3 1 S) I g G 1に由来するC H 2及びC H 3ドメインを含む。

【 0 0 9 6 】

20

一実施形態では、重鎖F c領域はI g G 4に由来するC H 2ドメインとI g G 1に由来するC H 3ドメインを含むハイブリッドである。

【 0 0 9 7 】

一例では、本発明の多量体融合タンパク質のそれぞれの重鎖F c領域は、I g G 4に由来するC H 2ドメイン並びに2 3 4位のフェニルアラニン残基、2 9 6位のフェニルアラニン残基、3 2 7位のグリシン残基、3 3 0位のセリン残基及び3 3 1位のセリン残基からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基が別のアミノ酸で置換されているI g G 4又はI g G 1に由来するC H 3ドメインを含む。

【 0 0 9 8 】

一例では、本発明の多量体融合タンパク質のそれぞれの重鎖F c領域は、I g G 4に由来するC H 2ドメイン並びにF 2 3 4、F 2 3 4とF 2 9 6、G 3 2 7、G 3 2 7とS 3 3 1、S 3 3 0とS 3 3 1、及びG 3 2 7とS 3 3 0からなる群から選択される1つ若しくは複数のアミノ酸残基又はアミノ酸の対が別のアミノ酸で置換されているI g G 4又はI g G 1に由来するC H 3ドメインを含む。

30

【 0 0 9 9 】

一実施形態では、重鎖F c領域は、2 3 4位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されている(F 2 3 4 L) I g G 4に由来するC H 2及びC H 3ドメインを含む。

【 0 1 0 0 】

一実施形態では、重鎖F c領域は、2 3 4位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されており、2 9 6位のフェニルアラニン残基がチロシン残基で置換されている(F 2 3 4 L / F 2 9 6 Y) I g G 4に由来するC H 2及びC H 3ドメインを含む。

40

【 0 1 0 1 】

一実施形態では、重鎖F c領域は、3 2 7位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、3 3 0位のセリン残基がアラニン残基で置換されている(G 3 2 7 A / S 3 3 0 A) I g G 4に由来するC H 2及びC H 3ドメインを含む。

【 0 1 0 2 】

一実施形態では、重鎖F c領域は、3 2 7位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、3 3 1位のセリン残基がプロリン残基で置換されている(G 3 2 7 A / S 3 3 1 P) I g G 4に由来するC H 2及びC H 3ドメインを含む。

【 0 1 0 3 】

50

－実施形態では、重鎖 F c 領域は、330位のセリン残基がアラニン残基で置換されており、331位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（S330A / S331P）IgG4に由来するCH2及びCH3ドメインを含む。

【0104】

－実施形態では、重鎖 F c 領域は、IgG4に由来するCH2ドメインとIgG1に由来するCH3ドメインを含み、234位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されている（F234L）ハイブリッドである。

【0105】

－実施形態では、重鎖 F c 領域は、IgG4に由来するCH2ドメインとIgG1に由来するCH3ドメインを含み、234位のフェニルアラニン残基がロイシン残基で置換されており、296位のフェニルアラニンがチロシン残基で置換されている（F234L / F296Y）ハイブリッドである。

【0106】

－実施形態では、重鎖 F c 領域は、IgG4に由来するCH2ドメインとIgG1に由来するCH3ドメインを含み、327位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、330位のセリン残基がアラニン残基で置換されている（G327A / S330A）ハイブリッドである。

【0107】

－実施形態では、重鎖 F c 領域は、IgG4に由来するCH2ドメインとIgG1に由来するCH3ドメインを含み、327位のグリシン残基がアラニン残基で置換されており、331位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（G327A / S331P）ハイブリッドである。

【0108】

－実施形態では、重鎖 F c 領域は、IgG4に由来するCH2ドメインとIgG1に由来するCH3ドメインを含み、330位のセリン残基がアラニン残基で置換されており、331位のセリン残基がプロリン残基で置換されている（S330A / S331P）ハイブリッドである。

【0109】

本発明の多量体融合タンパク質は、対応するポリペプチド単量体単位及び／又は天然の免疫グロブリンと比べて、1つ又は複数のFc受容体（FcR）への改変された結合を示すことができる。任意の特定のFc受容体への結合は増加することもあれば減少することもある。－実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は、そのFc受容体結合プロファイルを変える1つ又は複数の突然変異を含む。

【0110】

本明細書で使用される用語「突然変異」は、1つ又は複数のアミノ酸の置換、付加又は欠失を含むことができる。

【0111】

ヒト細胞は、FcR、FcR、FcR、FcR<sub>n</sub>及びグリカン受容体から選択されるいくつかの膜結合FcRを発現することが可能である。一部の細胞は可溶性（外部ドメイン）FcRを発現することもできる（概説は、Fridman et al., (1993) J Leukocyte Biology 54: 504-512）。FcRは、IgG結合の親和性（高／低）及び生物学的効果（活性化する／阻害する）によりさらに分割することが可能である。ヒトFcRIは唯一の「高親和性」受容体であると広く考えられており、その他はすべて中程度～低いと考えられている。FcRIIbはその細胞内ITIMモチーフのおかげで「阻害」機能性を有する唯一の受容体であり、その他はすべてITAMモチーフのおかげで「活性化する」又は共通のFcR-鎖と対合すると考えられている。FcRIIIbも、活性化性であるが、GPiアンカーを経て細胞と会合する点で独特である。全体では、ヒトは6つの「標準」FcR：FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIbを発現する。これらの配列に加えて、多数の配列又はアロタイプ変異体がこれらのファミリーに広がっている。これらの一部は重要な機能

10

20

30

40

50

的結果を有することが見出されており、したがってそれ独自の受容体サブタイプであると考えられることもある。例には、FcRIIa<sup>H134R</sup>、FcRIIb<sup>I190T</sup>、FcRIIIa<sup>F158V</sup>及びFcRIIIb<sup>NA1</sup>、FcRIIIb<sup>NA2</sup>、FcRIIIb<sup>S</sup>が含まれる。それぞれの受容体配列はIgGの4サブクラス：IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4に対して異なる親和性を有することが明らかにされている（Bruhns Blood (1993) Vol 113, p3716-3725）。他の種はいくらか異なる数及び機能性のFcRを有しており、マウス系は現在まで最もよく研究されており、4つのFcR：FcRI、FcRIIb、FcRIII、FcRIVを含む（Bruhns, Blood (2012) Vol 119, p5640-5649）。細胞上のヒトFcRIは通常は、IgG1/IgG3/IgG4に対するその親和性（約 $10^{-8}$  M）及び血清中のこれらIgGの濃度（約10 mg/ml）のせいで正常な血清条件では単量体IgGにより「占有されている」と考えられている。したがって、その表面にFcRIを抱えている細胞は、結合している多特異性のIgGを通して代理的にその抗原性環境を「スクリーニングする」又は「試料採取する」ことができると考えられている。IgGサブクラスに対する親和性もずっと低い（約 $10^{-5}$  ~  $10^{-7}$  Mの範囲で）その他の受容体は通常は「占有されていない」と考えられている。したがって、低親和性受容体は、抗体関連免疫複合体の検出及びこれによる活性化に対して固有に感受性である。抗体免疫複合体中のFc密度が増加すると、低親和性FcRへの結合「力」の機能的親和性が増加する。これはいくつかの方法を使用して*in vitro*で実証されてきた（Shields R.L. et al, J Biol Chem, Vol 276(9), p6591-6604, 2001; Lux et al., J Immunol (2013) Vol 190, p4315-4323）。これは、ヒトにおいてITPを治療するための抗RhDの使用における主要な作用様式の1つとも含意されてきた（Crow Transfusion Medicine Reviews (2008) Vol 22, p103-116）。

#### 【0112】

多くの細胞型が複数種のFcRを発現しており、したがってFcRを抱えている細胞へのIgG又は抗体免疫複合体の結合は、生物学的文脈に応じて、複数の複雑な結果を有することが可能である。最も簡単には、細胞は活性化性、阻害性又は混合されたシグナルのいずれかを受けることが可能である。これにより、食作用（例えば、マクロファージ及び好中球）、抗原プロセッシング（例えば、樹状細胞）、減少したIgG産生（例えば、B細胞）又は脱顆粒（例えば、好中球、マスト細胞）などの事象が生じることがある。FcRIIbからの阻害性シグナルは活性化性シグナルのそれよりも優位に立つことが可能であることを支持するデータが存在する（Proulx Clinical Immunology (2010) 135: 422-429）。

#### 【0113】

サイトカインは、免疫系の細胞を調節する又はウイルス感染した若しくは前癌性の宿主細胞などの標的細胞の死滅をもたらす極めて強力なタンパク質のファミリーである。治療タンパク質として単独で又はターゲティング部分への融合後に使用するためにその高レベルの効力が調べられてきた。IL-2、TNF、G-CSF、GM-CSF、IFN、IFN、IFNはすべてヒトにおいて使用するために調べられてきた。その極端な効力は、重篤な又は生命を脅かす病態の患者においては使用がかなり制限される広範囲の副作用又は有害事象により証明された。

#### 【0114】

*in vivo*でのサイトカインの産生は、抗体又は免疫グロブリンなどの治療タンパク質の全身投与後に誘発されることがある。サイトカイン産生は短命であり、注入又は皮下注射による投与中及びその直後などの一時的になることがある。例えば、静脈内免疫グロブリンの注入により、一般的な注入関連事象：発熱、悪寒及び嘔吐と関連するTNF、IL-6、IL-8及びIFNが産生されることが知られている（Aukrust P et al, Blood, Vol 84, p2136-2143, 1994）。サイトカイン産生は、例えば、いわゆる「腫瘍崩壊症候群」におけるように、エフェクター細胞の活性化のせいで寿命がもっと長くなり薬物作用様式に関係する場合がある。極端な例は、薬物の投与により「サイトカインストー

ム」が引き起こされる場合に生命を危うくすることであった (Suntharalingam G et al, N Engl J Med, Vol 355, p1018-1028, 2006)。

【 0 1 1 5 】

操作された組換えタンパク質のサイトカイン放リスクを理解し最小化する明白な必要性が存在する。抗体のFcドメインを含有し、機能的に多価になることができる組換えタンパク質は特別な注意が必要である。

【 0 1 1 6 】

多量体Fcドメインの本研究では、全血サイトカイン放出アッセイを配置し、サイトカイン放出を最小化することを目的として変異原性の効果を調べた (例7)。

【 0 1 1 7 】

血小板 (Platelets (thrombocytes)) は血液中に非常に大量に存在する小さな無核細胞である。血小板は、凝固因子及び他の細胞と共に、血餅を形成することにより出血の休止に関与する。血小板はいくつかの疾患に関与している。低い血小板数「血小板減少症」はいくつかの要因により引き起こされることがあり、挫傷及び出血が増加する。偶発的な凝固「血栓症」には、脳卒中及び深部静脈血栓症などの事象が含まれる。ヒト及び非ヒト霊長類血小板はその表面でFcRIIaを発現するが、マウス血小板はこれを発現しない。血小板は、予め形成されている「密顆粒」及び「アルファ顆粒」により並びに強力なイムノカイン及びヒスタミン、セロトニン、トロンボキサン、PAF、PDGF、TGF-IL1 と他にも多数などの他の分子の放出によって血管損傷に極めて迅速に応答することが可能である (Semple Nature Reviews Immunology 2011 11: 265-274)。

【 0 1 1 8 】

血小板はヒトに投与される薬物の毒性学に機構的に関与してきた。ある種の抗体は、その標的抗原とFcドメインの両方が血小板と相互作用して、血小板を活性化し、血栓症を引き起こすことができるので、特に興味深いことが分かっていた (Horsewood 1991 78(4):1019-1026)。抗CD40 Mabについては直接二重結合機序が提唱されてきた (Langer Thrombosis and Haemostasis 2005 93:1127-1146)。代わりに、血栓症は、「HIT症候群」(ヘパリン起因性血小板減少症)におけるなどの血小板と相互作用することが可能である標的分子と抗体が架橋することにより間接的に引き起こされることがある。未分画ヘパリンはおおよそ12%のレシピエントにおいて静脈血栓症と関連していた (Levine Chest 2006 130: 681-687)。VEGFを標的にするMabなどの他の例では、作用機序は、ヘパリンがVEGFと抗体と血小板の間で架橋として作用することを含む可能性がある (Scappaticci 2007 J National Cancer Institute 99:1232-1239; Meyer J. Thrombosis and Haemostasis 2009 7:171-181)。血栓症はIgGの凝集によっても引き起こされることがあり、したがってIgGを生産する場合には製品品質が重要であり、おそらく多量体Fcドメインを生産する場合には特に重要である (Ginsberg J. Experimental Medicine 1978 147:207-218)。

【 0 1 1 9 】

血小板活性化は血栓症の前兆であるが、必ずしも血栓症に関与するわけではない。血小板活性化はセロトニン放出アッセイにより又はCD62p、CD63若しくはPAC-1などの活性化マーカーを追跡することによりin vitroで追跡することが可能である。血小板凝集は、全血、血小板豊富な血漿又は洗浄血小板凝集アッセイにより直接in vitroで観察することが可能である。血小板上でのヒトFcRIIa発現のトランスジェニックマウスを使用すれば、血栓症又は減少した凝固をin vivoで研究することも可能である。多量体Fcドメインタンパク質の構築は、血栓症に関して予見可能なリスクをもたらす、したがって、本発明では、Fc操作及び血小板活性化アッセイはFc多量体の安全性を理解し保証するために配置されている。

【 0 1 2 0 】

FcRnは成人及び小児の血清中におけるIgGの長い半減期を維持するのに重大な役割を有する。この受容体は酸性ペシクル (pH < 6.5) でIgGに結合して、IgG分子を分解から保護し、次にpHが7.4と高いとIgG分子を血液中に放出する。

10

20

30

40

50

## 【0121】

FcRnは白血球Fc受容体と似ておらず、それどころかMHCクラスI分子に構造的類似性がある。FcRnは、3つの細胞外ドメインを含む膜結合鎖に非共有結合している<sub>2</sub>ミクログロブリン鎖で構成されているヘテロ二量体である。炭水化物鎖を含む、これらのドメインの1つは、<sub>2</sub>ミクログロブリンと共に、FcのCH2とCH3ドメインの間の部位と相互作用する。相互作用はIgG上のpH<6.5で正に荷電しているヒスチジン残基に架けられた塩橋を含む。pHがさらに高いと、His残基はその正の電荷を失い、FcRn-IgG相互作用は弱くなってIgGが解離する。

## 【0122】

IVI療法上の潜在的代替法として使用するための重合体Fc融合タンパク質はこれまで文献に記載されているが、このタンパク質はヒトFcRnには結合しない。したがって、このタンパク質はin vivoでは機能性が減少する(Mekhaielet al; Nature Scientific Reports 1:124, published 19<sup>th</sup>October 2011)。

10

## 【0123】

Mekhaieletらは、重合体ヒトFc融合タンパク質である六量体hIgG1-Fc-LH309/310CLテイルピースを記載している。このタンパク質は309位のロイシンがシステインで置換され、310位のヒスチジンがロイシンで置換されている二重突然変異を含む。H310はヒトFcRnへの結合には重大なので、Mekhaieletにより記載されているタンパク質はヒトFcRnに結合することができない。

## 【0124】

L309C/H310L二重突然変異は単量体単位の重合には不可欠であると、発明当時は考えられていた(Mekhaielet al; 2011)。しかし、驚くべきことに、本発明者らは、L309C/H310L二重突然変異がなくても効率的に集合して多量体になる多量体融合タンパク質を作り出した。

20

## 【0125】

L309C突然変異により作り出されるシステイン残基は、隣接する単量体単位上のL309Cシステインと鎖間ジスルフィド結合を形成すると考えられている。これらのジスルフィドはH310のすぐ近くに位置しているので、その存在によりFcRn結合が妨害される可能性がある。本発明の多量体融合タンパク質では、L309C突然変異がないのでFcRnへの無妨害の結合が可能になる。

30

## 【0126】

さらに、309位にシステイン残基がないと、多量体融合タンパク質の単離及び精製が単純化し、したがってその製造性が改善される。309位にシステイン残基がないと免疫原性の可能性も減少する可能性がある。

## 【0127】

さらに、310位に、及び好ましくは435位にもヒスチジン残基を保持することにより、本発明の多量体融合タンパク質はヒトFcRnに結合することができ、分解から保護されて、半減期が長くなり機能性はさらに大きくなる。

## 【0128】

したがって、一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質はヒトFcRnに結合する。

40

## 【0129】

一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は310位に、及び好ましくは435位にもヒスチジン残基を有する。これらのヒスチジン残基はヒトFcRn結合に重要である。一実施形態では、310位及び435位のヒスチジン残基は天然の残基であり、すなわち、310位及び435位は突然変異していない。代わりに、これらのヒスチジン残基の1つ又は両方は突然変異の結果として存在していてもよい。

## 【0130】

本発明の多量体融合タンパク質は、FcRnへのその結合を変化させる1つ又は複数の突然変異を含むことができる。変化した結合は、結合の増加であっても結合の減少であっ

50



てもよい。

【0131】

一実施形態では、多量体融合タンパク質は、対応する天然の免疫グロブリンよりも大きな親和性及び結合力でFcRnに結合するように1つ又は複数の突然変異を含む。

【0132】

一実施形態では、Fcドメインは250位のスレオニン残基をグルタミン残基で置換することにより(T250Q)突然変異している。

【0133】

一実施形態では、Fcドメインは252位のメチオニン残基をチロシン残基で置換することにより(M252Y)突然変異している。

10

【0134】

一実施形態では、Fcドメインは254位のセリン残基をスレオニン残基で置換することにより(S254T)突然変異している。

【0135】

一実施形態では、Fcドメインは256位のスレオニン残基をグルタミン酸残基で置換することにより(T256E)突然変異している。

【0136】

一実施形態では、Fcドメインは307位のスレオニン残基をアラニン残基で置換することにより(T307A)突然変異している。

【0137】

一実施形態では、Fcドメインは307位のスレオニン残基をプロリン残基で置換することにより(T307P)突然変異している。

20

【0138】

一実施形態では、Fcドメインは308位のバリン残基をシステイン残基で置換することにより(V308C)突然変異している。

【0139】

一実施形態では、Fcドメインは308位のバリン残基をフェニルアラニン残基で置換することにより(V308F)突然変異している。

【0140】

一実施形態では、Fcドメインは308位のバリン残基をプロリン残基で置換することにより(V308P)突然変異している。

30

【0141】

一実施形態では、Fcドメインは311位のグルタミン残基をアラニン残基で置換することにより(Q311A)突然変異している。

【0142】

一実施形態では、Fcドメインは311位のグルタミン残基をアルギニン残基で置換することにより(Q311R)突然変異している。

【0143】

一実施形態では、Fcドメインは428位のメチオニン残基をロイシン残基で置換することにより(M428L)突然変異している。

40

【0144】

一実施形態では、Fcドメインは433位のヒスチジン残基をリシン残基で置換することにより(H433K)突然変異している。

【0145】

一実施形態では、Fcドメインは434位のアスパラギン残基をフェニルアラニン残基で置換することにより(N434F)突然変異している。

【0146】

一実施形態では、Fcドメインは434位のアスパラギン残基をチロシン残基で置換することにより(N434Y)突然変異している。

【0147】

50

－実施形態では、Fcドメインは252位のメチオニン残基をチロシン残基で、254位のセリン残基をスレオニン残基で、256位のスレオニン残基をグルタミン酸残基で置換することにより(M252Y/S254T/T256E)突然変異している。

【0148】

－実施形態では、Fcドメインは308位のバリン残基をプロリン残基で、434位のアスパラギン残基をチロシン残基で置換することにより(V308P/N434Y)突然変異している。

【0149】

－実施形態では、Fcドメインは252位のメチオニン残基をチロシン残基で、254位のセリン残基をスレオニン残基で、256位のスレオニン残基をグルタミン酸残基で、433位のスチジン残基をリシン残基で、434位のアスパラギン残基をフェニルアラニン残基で置換することにより(M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F)突然変異している。

10

【0150】

－実施形態では、多量体融合タンパク質は、対応する天然の免疫グロブリンよりも低い親和性及び結合力でFcRnに結合するように1つ又は複数の突然変異を含む。－実施形態では、310位のヒスチジン残基は別のアミノ酸残基に突然変異している。一例では、310位のヒスチジン残基はロイシン残基で置換される(H310L)。

【0151】

上に収載される突然変異のいずれでも組み合わせてFcRn結合を変化させ得ることは認識されるであろう。

20

【0152】

本発明の多量体融合タンパク質は、FcRIIbへのその結合を増加させる1つ又は複数の突然変異を含むことができる。FcRIIbはヒトにおける唯一の阻害性受容体であり、B細胞上で見出される唯一のFc受容体である。B細胞及びその病原性抗体は多くの免疫疾患の核心にあり、したがって、多量体融合タンパク質はこれらの疾患に対して改善された療法を提供することができる。

【0153】

－実施形態では、Fcドメインは238位のプロリン残基をアスパラギン酸残基で置換することにより(P238D)突然変異している。

30

【0154】

－実施形態では、Fcドメインは258位のグルタミン酸残基をアラニン残基で置換することにより(E258A)突然変異している。

【0155】

－実施形態では、Fcドメインは267位のセリン残基をアラニン残基で置換することにより(S267A)突然変異している。

【0156】

－実施形態では、Fcドメインは267位のセリン残基をグルタミン酸残基で置換することにより(S267E)突然変異している。

【0157】

40

－実施形態では、Fcドメインは328位のロイシン残基をフェニルアラニン残基で置換することにより(L328F)突然変異している。

【0158】

－実施形態では、Fcドメインは258位のグルタミン酸残基をアラニン残基で、267位のセリン残基をアラニン残基で置換することにより(E258A/S267A)突然変異している。

【0159】

－実施形態では、Fcドメインは267位のセリン残基をグルタミン酸残基で、328位のロイシン残基をフェニルアラニン残基で置換することにより(S267E/L328F)突然変異している。

50

## 【 0 1 6 0 】

上に収載される突然変異のいずれでも組み合わせて F c R I I b 結合を増加させ得ることは認識されるであろう。

## 【 0 1 6 1 】

本発明の一実施形態では、F c R への減少した結合を示す多量体融合タンパク質を提供する。F c R への減少した結合は、病原性抗体に関連する免疫疾患の治療において使用するための改善された療法を提供することができる。

## 【 0 1 6 2 】

一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は F c R へのその結合を減少させる 1 つ又は複数の突然変異を含む。

10

## 【 0 1 6 3 】

一実施形態では、F c R への結合を減少させる突然変異は、I g G 1 に由来する F c ドメインを含む本発明の多量体融合タンパク質において使用される。

## 【 0 1 6 4 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 4 位のロイシン残基をアラニン残基で置換することにより ( L 2 3 4 A ) 突然変異している。

## 【 0 1 6 5 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 4 位のフェニルアラニン残基をアラニン残基で置換することにより ( F 2 3 4 A ) 突然変異している。

## 【 0 1 6 6 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 5 位のロイシン残基をアラニン残基で置換することにより ( L 2 3 5 A ) 突然変異している。

20

## 【 0 1 6 7 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 6 位のグリシン残基をアルギニン残基で置換することにより ( G 2 3 6 R ) 突然変異している。

## 【 0 1 6 8 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 9 7 位のアスパラギン残基をアラニン残基 ( N 2 9 7 A ) 又はグルタミン残基 ( N 2 9 7 Q ) で置換することにより突然変異している。

## 【 0 1 6 9 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 9 8 位のセリン残基をアラニン残基で置換することにより ( S 2 9 8 A ) 突然変異している。

30

## 【 0 1 7 0 】

一実施形態では、F c ドメインは 3 2 8 位のロイシン残基をアルギニン残基で置換することにより ( L 3 2 8 R ) 突然変異している。

## 【 0 1 7 1 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 4 位のロイシン残基をアラニン残基で、2 3 5 位のロイシン残基をアラニン残基で置換することにより ( L 2 3 4 A / L 2 3 5 A ) 突然変異している。

## 【 0 1 7 2 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 4 位のフェニルアラニン残基をアラニン残基で、2 3 5 位のロイシン残基をアラニン残基で置換することにより ( F 2 3 4 A / L 2 3 5 A ) 突然変異している。

40

## 【 0 1 7 3 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 6 位のグリシン残基をアルギニン残基で、3 2 8 位のロイシン残基をアルギニン残基で置換することにより ( G 2 3 6 R / L 3 2 8 R ) 突然変異している。

## 【 0 1 7 4 】

上に収載される突然変異のいずれでも組み合わせて F c R 結合を減少させ得ることは認識されるであろう。

## 【 0 1 7 5 】

50

一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は、F c R I I I へのその結合に影響を与えることなく F c R I I I a へのその結合を減少させる 1 つ又は複数の突然変異を含む。

【0176】

一実施形態では、F c ドメインは 239 位のセリン残基をアラニン残基で置換することにより (S239A) 突然変異している。

【0177】

一実施形態では、F c ドメインは 269 位のグルタミン酸残基をアラニン残基で置換することにより (E269A) 突然変異している。

【0178】

一実施形態では、F c ドメインは 293 位のグルタミン酸残基をアラニン残基で置換することにより (E293A) 突然変異している。

【0179】

一実施形態では、F c ドメインは 296 位のチロシン残基をフェニルアラニン残基で置換することにより (Y296F) 突然変異している。

【0180】

一実施形態では、F c ドメインは 303 位のバリン残基をアラニン残基で置換することにより (V303A) 突然変異している。

【0181】

一実施形態では、F c ドメインは 327 位のアラニン残基をグリシン残基で置換することにより (A327G) 突然変異している。

【0182】

一実施形態では、F c ドメインは 338 位のリシン残基をアラニン残基で置換することにより (K338A) 突然変異している。

【0183】

一実施形態では、F c ドメインは 376 位のアスパラギン酸残基をアラニン残基で置換することにより (D376A) 突然変異している。

【0184】

上に収載される突然変異のいずれでも組み合わせて F c R I I I a 結合を減少させ得ることは認識されるであろう。

【0185】

本発明の多量体融合タンパク質は、補体へのその結合を変化させる 1 つ又は複数の突然変異を含むことができる。変化された補体結合は結合の増加であってもよいし結合の減少であってもよい。

【0186】

一実施形態では、このタンパク質は C1q へのその結合を減少させる 1 つ又は複数の突然変異を含む。古典的な補体経路の開始は、抗原結合 IgG 及び IgM の C H2 ドメインへの六量体 C1q タンパク質の結合から始まる。本発明の多量体融合タンパク質は抗原結合部位を持たず、したがって、C1q への著しい結合を示すとは予想されないであろう。しかし、C1q 結合を減少させる 1 つ又は複数の突然変異の存在により、抗原会合の非存在下では補体を活性化しないことが保証され、したがって安全性がさらに大きな改善された療法が提供されることになる。

【0187】

したがって、一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は C1q へのその結合を減少させる 1 つ又は複数の突然変異を含む。

【0188】

一実施形態では、F c ドメインは 234 位のロイシン残基をアラニン残基で置換することにより (L234A) 突然変異している。

【0189】

一実施形態では、F c ドメインは 235 位のロイシン残基をアラニン残基で置換するこ

10

20

30

40

50

とにより ( L 2 3 5 A ) 突然変異している。

【 0 1 9 0 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 5 位のロイシン残基をグルタミン酸残基で置換することにより ( L 2 3 5 E ) 突然変異している。

【 0 1 9 1 】

一実施形態では、F c ドメインは 2 3 7 位のグリシン残基をアラニン残基で置換することにより ( G 2 3 7 A ) 突然変異している。

【 0 1 9 2 】

一実施形態では、F c ドメインは 3 2 2 位のリシン残基をアラニン残基で置換することにより ( K 3 2 2 A ) 突然変異している。

【 0 1 9 3 】

一実施形態では、F c ドメインは 3 3 1 位のプロリン残基をアラニン残基で置換することにより ( P 3 3 1 A ) 突然変異している。

【 0 1 9 4 】

一実施形態では、F c ドメインは 3 3 1 位のプロリン残基をセリン残基で置換することにより ( P 3 3 1 S ) 突然変異している。

【 0 1 9 5 】

一実施形態では、多量体融合タンパク質は I g G 4 に由来する F c ドメインを含む。I g G 4 は I g G 1 よりも天然に低い補体活性化プロファイルを有するが、F c R のさらに弱い結合も有する。したがって、一実施形態では、I g G 4 を含む多量体融合タンパク質は、F c R 結合を増加させる 1 つ又は複数の突然変異も含む。

【 0 1 9 6 】

上に収載される突然変異のいずれでも組み合わせて C 1 q 結合を減少させ得ることは認識されるであろう。

【 0 1 9 7 】

本発明の多量体融合タンパク質は、システイン残基を作り出す又は除去する 1 つ又は複数の突然変異も含むことができる。システイン残基は、ポリペプチド単量体単位の個々の対間にジスルフィド架橋を形成することにより、多量体融合タンパク質の自発的集合に重要な役割がある。代わりに、システイン残基は遊離の S H 基の化学修飾に使用することができる。したがって、システイン残基の数及び / 又は位置を変えることにより、多量体融合タンパク質の構造を改変して改善された治療特性を有するタンパク質を産生することが可能である。

【 0 1 9 8 】

本発明の多量体融合タンパク質は 3 0 9 位にシステイン残基を含まない。3 0 9 位のアミノ酸残基はシステイン以外のいかなるアミノ酸残基でもよい。一実施形態では、3 0 9 位のアミノ酸残基は、対応する天然に存在する抗体中に見出される野生型残基である。例えば、天然に存在するヒト I g G 1、I g G 3 及び I g G 4 中の 3 0 9 位に見出される野生型残基はロイシン残基であり、天然に存在する I g G 2 に見出される野生型残基はバリン残基である。

【 0 1 9 9 】

一実施形態では、抗体 F c ドメインは 3 0 8 位のバリン残基をシステイン残基で置換することにより ( V 3 0 8 C ) 突然変異している。

【 0 2 0 0 】

本発明の一実施形態では、含むジスルフィド結合及び / 又はグリコシル化部位がもっと少なく、製造性が改善されている多量体融合タンパク質を提供する。これらのタンパク質は、ジスルフィド結合構造及び翻訳後グリコシル化パターンの複雑さが少なく、したがって、製造するのがもっと簡単であり費用も少なくなる。

【 0 2 0 1 】

一実施形態では、ヒンジ領域の 2 つのジスルフィド結合は、コアヒンジ配列 C P P C を S P P S に突然変異させることにより除去されている。

10

20

30

40

50

## 【0202】

－実施形態では、テイルピース中のジスルフィド結合は、575位のシステイン残基をセリン、スレオニン又はアラニン残基で置換することにより（C575S、C575T、又はC575A）除去されている。

## 【0203】

－実施形態では、コアヒンジ配列CPPCはSPPSに突然変異し、575位のテイルピースシステイン残基はセリン、スレオニン又はアラニン残基で置換されている（C575S、C575T、又はC575A）。

## 【0204】

－実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は、実質的に非共有結合ドメイン間相互作用を含む。

10

## 【0205】

－実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は、産物の実質的な割合が六量体になるように細胞内で発現される。

## 【0206】

実質的な割合は、好ましくは50%以上、例えば、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～100%である。

## 【0207】

－実施形態では、CH2ドメイン中のグリコシル化部位は、297位のアスパラギン残基をアラニン残基（N297A）又はグルタミン残基（N297Q）で置換することにより除去されている。改善された製造性に加えて、これらのアグリコシル突然変異体は本明細書の上に記載されるFcR結合を減少もさせる。

20

## 【0208】

－実施形態では、テイルピース中のグリコシル化部位は、563位のアスパラギン残基をアラニン残基（N563A）又はグルタミン残基（N563Q）で置換することにより除去されている。

## 【0209】

－実施形態では、CH2ドメイン中のグリコシル化部位とテイルピース中のグリコシル化部位は両方とも、297位のアスパラギン残基をアラニン残基又はグルタミン残基で置換し、563位のアスパラギン残基をアラニン残基又はグルタミン残基で置換することにより（N297A/N563A又はN297A/N563Q又はN297Q/N563A又はN297Q/N563Q）除去されている。

30

## 【0210】

上に収載される突然変異のいずれでも組み合わせられることは認識されるであろう。

## 【0211】

本発明は、本発明のポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖、又はその成分部分をコードする単離されたDNA配列も提供する。DNA配列は、例えば、化学処理により産生される合成DNA、cDNA、ゲノムDNA又はその任意の組合せを含むことができる。

## 【0212】

本発明のポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖をコードするDNA配列は当業者に周知である方法により得ることが可能である。例えば、ポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖の一部又はすべてをコードするDNA配列は、決定されているDNA配列から又は対応するアミノ酸配列に基づいて、望み通りに合成することができる。本発明に従った適切なDNA配列の例は配列番号50～59に提供されている。

40

## 【0213】

分子生物学の標準技法を使用して本発明のポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖をコードするDNA配列を調製することができる。所望のDNA配列はオリゴヌクレオチド合成技法を使用して完全に又は一部合成することができる。部位特異的突然変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法を必要に応じて使用してもよい。

## 【0214】

50

本発明は、本発明の１つ又は複数のＤＮＡ配列を含むクローニング又は発現ベクターに関する。したがって、本発明のポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖、又はその成分部分をコードする１つ又は複数のＤＮＡ配列を含むクローニング又は発現ベクターが提供される。

【０２１５】

ベクターを構築することができる一般的方法、トランスフェクション法及び培養法は当業者には周知である。この点に関しては、"Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishingを参照する。

【０２１６】

本発明の多量体融合タンパク質をコードする１つ又は複数のＤＮＡ配列を含む１つ又は複数のクローニング又は発現ベクターを含む宿主細胞も提供される。いかなる適切な宿主細胞／ベクター系でも本発明の多量体融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列の発現のために使用することができる。細菌、例えば、大腸菌（*E.coli*）系及び酵母類（*Saccharomyces*）若しくはピキア（*Pichia*）などの他の微生物系を使用することができる、又は真核、例えば、哺乳動物宿主細胞発現系も使用することができる。適切な哺乳動物宿主細胞にはＣＨＯ細胞が含まれる。本発明において使用するのに適した種類のチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）には、ＤＨＦＲ選択可能マーカーと一緒に使用することができるＣＨＯ－ＤＧ４４細胞及びＣＨＯ－ＤＸＢ１１細胞などの、*d h f r*－ＣＨＯ細胞、又はグルタミンシンセターゼ選択可能マーカーと一緒に使用することができるＣＨＯＫ１－Ｓ

【０２１７】

本発明は、本発明に従った多量体融合タンパク質の産生のための工程であって、融合タンパク質の発現及び多量体への集合に適した条件下で本発明のベクターを含有する宿主細胞を培養することと、多量体融合タンパク質を単離し、場合によって精製することを含む、上記工程も提供する。

【０２１８】

本発明の多量体融合タンパク質は宿主細胞から良好なレベルで発現される。したがって、多量体融合タンパク質の特性は商業的処理に貢献する。

【０２１９】

本発明の多量体融合タンパク質は、任意の適切な方法を使用して作製することができる。一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質は、凝集を最小化する条件下で産生することができる。一例では、凝集は培養培地、培養液上清、又は精製培地に保存剤を添加することにより最小化することができる。適切な保存剤の例には、Ｎメチルマレイミド、ヨード酢酸、メルカプトエタノール、メルカプトエチルアミン、グルタチオン、又はシステインなどのチオールキャッピング剤が含まれる。他の例には、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコール四酢酸（ＥＧＴＡ）などのジスルフィド阻害剤、又はｐＨ６．０より下への酸性化が含まれる。

【０２２０】

一実施形態では、本発明の多量体融合タンパク質を精製するための工程であって、不純物がカラム上に保持され抗体は溶出されるように、陰イオン交換クロマトグラフィーを非結合様式で実施するステップを含む上記工程が提供される。

【０２２１】

一実施形態では、精製はＦｃＲ<sub>n</sub>、Ｆｃ－Ｒ又はＣ反応性タンパク質カラム上での親和性捕獲を用いる。

【０２２２】

一実施形態では、精製はプロテインＡを用いる。

【０２２３】

この工程において使用するのに適したイオン交換樹脂には、Ｑ．ＦＦ樹脂（ＧＥ－Ｈ

10

20

30

40

50

a l t h c a r e から供給される)が含まれる。このステップは、例えば、pH 約 8 で実施することができる。

この工程は、例えば、4 . 5 などの約 4 ~ 5 の pH で実施される、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いる最初の捕獲ステップをさらに含むことができる。陽イオン交換クロマトグラフィーは、例えば、C a p t o S 樹脂又は S P セファロース F F ( G E - H e a l t h c a r e から供給される)などの樹脂を用いることができる。次に、抗体又は断片は、例えば、200 mM の濃度で塩化ナトリウムなどのイオン食塩水を用いて樹脂から溶出させることが可能である。

したがって、クロマトグラフィーステップ(単数又は複数)は、必要に応じて 1 回又は複数回の洗浄ステップを含むことができる。

精製工程は、ダイアフィルトレーションステップなどの、1 つ又は複数の濾過ステップも含むことができる。

#### 【0224】

必要な数のポリペプチド単量体単位を有する多量体は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーにより、分子サイズに応じて分離することが可能である。

#### 【0225】

したがって、一実施形態では、エンドトキシン及び/又は宿主細胞タンパク質若しくは DNA から実質的に精製された、特にエンドトキシン及び/又は宿主細胞タンパク質若しくは DNA が無い或いは実質的に無い本発明に従った精製された多量体融合タンパク質が提供される。

#### 【0226】

上で使用される精製された形態は、91、92、93、94、95、96、97、98、99 % w / w 又はそれよりも純粋な、などの少なくとも 90 % 純度を指すことを意図されている。

#### 【0227】

エンドトキシンが実質的に無いことは一般的に、mg 産物当たり 0 . 5 又は 0 . 1 E U などの mg 抗体産物当たり 1 E U 又はそれよりも少ないエンドトキシン含有量を指すことを意図されている。

#### 【0228】

宿主細胞タンパク質又は DNA が実質的に無いことは一般的に、必要に応じて、mg 当たり 100 µg 又はそれよりも少ない、特に mg 当たり 20 µg などの、mg の抗体産物当たり宿主細胞タンパク質及び/又は DNA 含有量 400 µg 又はそれよりも少ないことを指すことを意図されている。

#### 【0229】

本発明の多量体融合タンパク質は病態の治療及び/又は予防において有用なので、本発明は、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体のうちの 1 つ又は複数と組み合わせて本発明の多量体融合タンパク質を含む医薬又は診断用組成物も提供する。したがって、医薬を製造するための本発明のタンパク質の使用が提供される。組成物は、通常は薬学的に許容される担体を含むことになる無菌の医薬組成物の一部として普通は供給されることになる。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含むことができる。

#### 【0230】

本発明は医薬又は診断用組成物の調製のための工程であって、本発明の多量体融合タンパク質を薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体のうちの 1 つ又は複数と一緒に添加し混合することを含む上記工程も提供する。

#### 【0231】

多量体融合タンパク質は医薬又は診断用組成物中の唯一の活性成分であってもよく、他の抗体成分又はステロイド若しくは他の薬物分子などの非抗体成分を含む他の活性成分を伴っていてもよい。

#### 【0232】

医薬組成物は、治療的有效量の本発明の多量体融合タンパク質を適切に含む。本明細書

10

20

30

40

50



で使用される用語「治療的有効量」とは、標的にされた疾患若しくは状態を治療する、寛解する若しくは予防するのに、又は検出可能な治療的若しくは予防的効果を示すのに必要な治療剤の量のことである。いかなる医療でも、治療的有効量は、最初は細胞培養アッセイにおいて又は動物モデルにおいて、通常は齧歯類、ウサギ、イヌ、ブタ若しくは霊長類においてのいずれかで評価することが可能である。動物モデルを使用して適切な濃度範囲及び投与経路を決定することもできる。次に、そのような情報を使用して、ヒトにおける投与のための有用な用量及び経路を決定することが可能である。

【0233】

ヒト対象のための正確な治療的有効量は、疾患状態の重症度、対象の全体的健康、対象の年齢、体重及び性別、食事、投与時間及び頻度、複合薬（単数又は複数）、反応感受性並びに療法に対する耐性／応答に依拠することになる。この量は通例の実験法により決定することが可能であり、臨床医の判断の範囲内である。一般に、治療的有効量は、 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 500 \text{ mg/kg}$ 、例えば、 $100 \text{ mg/kg}$ などの $0.1 \text{ mg/kg} \sim 200 \text{ mg/kg}$ になる。医薬組成物は、都合よく、用量当たり予め決められた量の本発明の活性剤を含有する単位用量形態で提供することができる。

10

【0234】

本開示に従った多量体融合タンパク質の治療用量は、*in vivo*では明らかな毒性的効果は全く示していない。

【0235】

本発明に従った多量体融合タンパク質の一実施形態では、単一用量は循環IgGレベルの最大90%の減少を提供することができる。

20

【0236】

組成物は患者に個別に投与してもよいし、他の薬剤、薬物又はホルモンと組み合わせて（例えば、同時に、順次に又は別々に）投与してもよい。

【0237】

一実施形態では、本開示に従った多量体融合タンパク質は、ステロイド、特にプレドニゾンなどの免疫抑制剤療法と一緒に用いられる。

【0238】

一実施形態では、本開示に従った多量体融合タンパク質はリツキシマブ又は他のB細胞療法と組み合わせて用いられる。

30

【0239】

一実施形態では、本開示に従った多量体融合タンパク質は、任意のB細胞若しくはT細胞調節剤又は免疫調節剤と一緒に用いられる。例には、メトトレキサート、ミコフェノール酸及びアザチオプリンが含まれる。

【0240】

本発明の多量体融合タンパク質が投与される用量は、治療する状態の性質、存在する疾患の程度及び多量体融合タンパク質が予防的に使用されているのか既存の状態を治療するために使用されているのかどうかに依拠する。

【0241】

投与頻度は多量体融合タンパク質の半減期及びその効果の持続時間に依拠することになる。多量体融合タンパク質の半減期が短ければ（例えば、2～10時間）、1日当たり1回又は複数回の投与をする必要がある。代わりに、多量体融合タンパク質の半減期が長ければ（例えば、2～15日間）及び／又は持続性の薬力学的効果があれば、1日に1回、1週間に1回又は1若しくは2か月ごとに1回投与するだけでよい。

40

【0242】

一実施形態では、用量は隔週で、すなわち、月2回送達される。

【0243】

本明細書で用いられる半減期は、循環中、例えば、血清／血漿中の分子の持続時間を指すことが意図されている。

【0244】

50

本明細書で用いられる薬力学とは、本開示に従った多量体融合タンパク質の生物学的作用のプロファイル、特に持続時間のことである。

【0245】

薬学的に許容される担体はそれ自体が組成物を受ける個体にとって有害な抗体の産生を誘発するべきではなく、毒性をもつべきではない。適切な担体は、タンパク質、ポリペプチド、リボソーム、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体アミノ酸、アミノ酸共重合体及び不活性ウイルス粒子などの大きくゆっくり代謝される巨大分子であってもよい。薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸、リン酸塩及び硫酸塩などの鉱酸塩、又は酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩及び安息香酸塩などの有機酸の塩を使用することが可能である。

10

【0246】

治療組成物中の薬学的に許容される担体は、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールなどの液体をさらに含有することができる。さらに、湿潤剤若しくは乳化剤又はpH緩衝物質などの補助物質がそのような組成物中に存在していてもよい。そのような担体を使えば、医薬組成物は患者が経口摂取するための錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ジェル、シロップ、スラリー及び懸濁液として処方することが可能になる。

【0247】

投与のための適切な形態には、例えば、注射又は注入による、例えば、ボラス注射又は持続注入による、非経口投与に適した形態が含まれる。産物が注射又は注入目的である場合、産物は、油性又は水性媒体中で懸濁液、溶液又は乳濁液の形態をとってもよく、懸濁剤、保存剤、安定化剤及び/又は分散剤などの調合剤を含有していてもよい。タンパク質はナノ粒子の形態であってもよい。代わりに、抗体分子は、使用前に適切な無菌液で再構成するために乾燥形態であってもよい。

20

【0248】

処方された後は、本発明の組成物は対象に直接投与することが可能である。治療される対象は動物でも可能である。しかし、1つ又は複数の実施形態では、組成物はヒト対象への投与のために適応される。

【0249】

適宜、本開示に従った製剤では、最終製剤のpHは多量体融合タンパク質の等電点の値には類似しておらず、例えば、タンパク質のpIが8~9又はそれよりも上の範囲である場合、製剤pHの7は適切であることがある。理論に縛られたくはないが、これにより最終的には、最終製剤に改善された安定性を与えることができ、例えば、多量体融合タンパク質が溶液のままであると考えられる。

30

【0250】

一例では、4.0~7.0の範囲のpHでの医薬製剤は、1~200mg/mLの本開示に従ったタンパク質分子、1~100mMの緩衝液、0.001~1%の界面活性剤、a) 10~500mMの安定化剤、b) 10~500mMの安定化剤と5~500mMの等張化剤、又はc) 5~500mMの等張化剤を含む。

【0251】

本発明の医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、くも膜下腔内、脳室内、経皮的(transdermal)、経皮的(transcutaneous)(例えば、WO98/20734参照)、皮下、腹腔内、鼻腔内、経腸的、局所的、舌下、腔内又は直腸経路を含むがこれらに限定されない任意の数の経路により投与することができる。皮下噴射器を使用して本発明の医薬組成物を投与することもできる。典型的には、治療組成物は液体溶液又は懸濁液のいずれかとして注射液として調製することができる。注射に先立って液体媒体中の溶液又は懸濁液に適した固形形態も調製することができる。

40

【0252】

組成物の直接送達是一般に、皮下に、腹腔内に、静脈内に若しくは筋肉内に注射により達成される、又は組織の間質腔に送達されることになる。組成物は病変内に投与することも可能である。投薬治療は単一用量予定でも複数用量予定でもよい。

50

## 【0253】

組成物中の活性成分はタンパク質分子になることは認識されるであろう。したがって、活性成分は胃腸管中での分解に感受性になる。したがって、組成物を胃腸管を使用する経路により投与するつもりであれば、組成物は、タンパク質を分解から保護するが胃腸管により吸収された後はタンパク質を放出する薬剤を含有する必要がある。

## 【0254】

薬学的に許容される担体についての徹底的な考察はRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991)で入手可能である。一実施形態では、製剤は、吸入を含む局所投与のための製剤として提供される。

## 【0255】

適切な可吸入調製物には、可吸入粉末、推進用ガスを含有する計量エアロゾル又は推進用ガスのない可吸入液が含まれる。活性物質を含有する本開示に従った可吸入粉末は、活性物質のみから又は活性物質と生理的に許容される賦形剤の混合物からなっているてもよい。これらの可吸入粉末は、単糖類（例えば、グルコース又はアラビノース）、二糖類（例えば、ラクトース、ショ糖、マルトース）、オリゴ糖及び多糖類（例えば、デキストラン）、ポリアルコール（例えば、ソルビトール、マンニトール、キシリトール）、塩（例えば、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム）又はこれらの互いの混合物を含むことができる。単糖類又は二糖類は適切に使用され、ラクトース又はグルコースの使用は、特にその水和物の形態であるが、水和物の形態だけに限るわけではない。

## 【0256】

肺における沈着のための粒子は、1～9ミクロン、例えば、1～5 μmなどの10ミクロン未満の粒子サイズが必要である。活性成分（例えば、抗体又は断片）の粒子サイズは極めて重要である。

## 【0257】

可吸入エアロゾルを調製するために使用することが可能である推進用ガスは当技術分野では既知である。適切な推進用ガスは、nプロパン、nブタン又はイソブタンなどの炭化水素並びにメタン、エタン、プロパン、ブタン、シクロプロパン若しくはシクロブタンの塩素化及び/又はフッ素化誘導体などのハロゲン化炭化水素の中から選択される。上記推進用ガスは単独で又はその混合物で使用してもよい。

## 【0258】

特に適した推進用ガスは、TG11、TG12、TG134a及びTG227の中から選択されるハロゲン化アルカン誘導体である。ハロゲン化炭化水素のうち、TG134a（1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン）及びTG227（1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパン）並びにその混合物が特に適切である。

## 【0259】

推進用ガス含有可吸入エアロゾルは、共溶媒、安定化剤、表面活性剤（界面活性剤）、抗酸化剤、潤滑剤などの他の成分及びpHを調整するための手段も含有してよい。これらの成分はすべて当技術分野では既知である。

## 【0260】

本発明に従った推進用ガス含有可吸入エアロゾルは最大5重量%の活性物質を含有することができる。本発明に従ったエアロゾルは、例えば、0.002～5重量%、0.01～3重量%、0.015～2重量%、0.1～2重量%、0.5～2重量%、又は0.5～1重量%の活性成分を含有する。

## 【0261】

代わりに、肺への局所投与は、例えば、ネブライザー、例えば、圧縮機に接続されたネブライザー（例えば、Pari Respiratory Equipment, Inc.、Richmond, Va.製のPari Master (R) 圧縮機に接続されたPari LC-Jet Plus (R) ネブライザー）などの装置を用いて液体溶液又は懸濁剤の投与によるものでもよい。

## 【0262】

本発明の多量体融合タンパク質は溶媒中に分散して、例えば、溶液又は懸濁液の形態で送達することが可能である。本発明の多量体融合タンパク質は、適切な生理溶液、例えば、生理食塩水又は他の薬学的に許容される溶媒又は緩衝液に懸濁することが可能である。当技術分野で既知の緩衝液は、約 4.0 ~ 5.0 の pH を達成するように、1 ml の水当たり 0.05 mg ~ 0.15 mg エデト酸二ナトリウム、8.0 mg ~ 9.0 mg NaCl、0.15 mg ~ 0.25 mg ポリソルベート、0.25 mg ~ 0.30 mg 無水クエン酸、及び 0.45 mg ~ 0.55 mg クエン酸ナトリウムを含有することができる。懸濁剤は、例えば、凍結乾燥させたタンパク質を用いることが可能である。

#### 【0263】

治療懸濁液又は溶液製剤は、1つ又は複数の賦形剤も含有することが可能である。賦形剤は当技術分野では周知であり、緩衝液（例えば、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液及び炭酸水素緩衝液）、アミノ酸、尿素、アルコール、アスコルビン酸、リン脂質、タンパク質（例えば、血清アルブミン）、EDTA、塩化ナトリウム、リポソーム、マンニトール、ソルビトール及びグリセロールが含まれる。溶液又は懸濁液はリポソーム又は生分解性マイクロスフェアに被包することが可能である。製剤は一般に、無菌製造工程を用いることから実質的に無菌で提供されることになる。

10

#### 【0264】

これには、製剤のために使用される緩衝溶媒 / 溶液の濾過による生産及び無菌化、無菌緩衝溶媒溶液中のタンパク質の無菌懸濁液、及び当業者にはよく知られている方法による無菌容器内への製剤の分注が含まれ得る。

20

#### 【0265】

本開示に従った噴霧可能な製剤は、例えば、ホイルエンベロープに包装された単一用量単位（例えば、密封プラスチック容器又はバイアル）として提供することができる。それぞれのバイアルは、体積、例えば、2 ml の溶媒 / 溶液緩衝液に単位用量を含有する。

#### 【0266】

本明細書に開示される多量体融合タンパク質は、噴霧療法による送達に適している場合もある。

#### 【0267】

本発明のタンパク質は遺伝子治療の使用により投与できることも想定している。これを実現するためには、適切な DNA 成分の制御下でタンパク質分子のポリペプチド鎖をコードする DNA 配列は、ポリペプチド鎖が DNA 配列から発現されて *in situ* で構築されるように、患者内に導入される。

30

#### 【0268】

一実施形態では、治療において使用するために本発明の多量体融合タンパク質を提供する。

#### 【0269】

一実施形態では、免疫不全の治療において使用するために本発明の多量体融合タンパク質を提供する。

#### 【0270】

一実施形態では、免疫不全の治療のための医薬を調製するための本発明の多量体融合タンパク質の使用を提供する。

40

#### 【0271】

本発明の多量体融合タンパク質を使用して治療することができる免疫不全の例には、免疫性血小板減少症（ITP）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、川崎病及びギラン・バレー症候群（GBS）が含まれる。

#### 【0272】

本発明は、自己免疫疾患、例えば、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、急性壊死性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、ANCA 関連血管炎、強直性脊椎炎、抗 GBM / 抗 TBM 腎炎、抗リン脂質抗体症候群（APS）、自己免疫血管浮腫、自己免疫再生不良性貧血、自己免疫自律神経障害、自己免疫

50

性肝炎、自己免疫高脂血症、自己免疫免疫不全症、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性膵炎、自己免疫網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫蕁麻疹、軸索及び爪ニューロパチー、パロー病、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、慢性再発性多巣性骨髄炎（CRMO）、チャーク・ストラウス症候群、癰痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋症、クレスト病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性ニューロパチー、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、拡張型心筋症、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性血管中心性線維症（Eosinophilic angiocentric fibrosis）、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エヴァンス症候群、線維性肺胞炎、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症（GPA）ウェゲナー参照、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳炎（Hashimoto's encephalitis）、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、特発性低補体血症性尿細管間質性腎炎（Idiopathic hypocomplementemic tubulointerstitial nephritis）、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、IgG4関連疾患、IgG4関連硬化性疾患、免疫調節性リポタンパク質、炎症性大動脈瘤、炎症性偽腫瘍、封入体筋炎、インスリン依存性糖尿病（1型）、間質性膀胱炎、若年性関節炎、若年性糖尿病、川崎症候群、キュットナー腫瘍、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状IgA病（LAD）、ループス（SLE）、ライム病、慢性縦隔線維症、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、ミクリッツ症候群、混合性結合組織病（MCTD）、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、結合組織増殖症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎（デビック病）、好中球減少症、眼部癰痕性類天疱瘡、視神経炎、オーモンド病（後腹膜線維症）、回帰性リウマチ、PANDAS（連鎖球菌に関連する小児自己免疫精神神経障害）、傍腫瘍性小脳変性症、異常タンパク性多発ニューロパチー（Paraproteinemic polyneuropathies）、発作性夜間血色素尿症（PNH）、パリー・ロンベルク症候群（Parry Romberg syndrome）、パーソネージ・ターナー症候群、毛様体扁平部炎（周辺性ブドウ膜炎）、尋常性天疱瘡、大動脈周囲炎、動脈周囲炎、末梢神経障害、静脈周囲脳髄膜炎、悪性貧血、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、1型、2型及び3型自己免疫多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、レイノー現象、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発軟骨炎、下肢静止不能症候群、後腹膜線維症（オーモンド病）、リウマチ熱、関節リウマチ、リーダー甲状腺炎、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎（SBE）、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、血栓性、血小板減少性紫斑病（TTP）、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患（UCTD）、ブドウ膜炎、血管炎、水疱性皮膚炎、白斑、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、温特発性溶血性貧血（Warm idiopathic haemolytic anaemia）及びウェゲナー肉芽腫症（現在では、多発血管炎性肉芽腫症（GPA）と呼ばれる）の制御において使用するための多量体融合タンパク質（又は多量体融合タンパク質を含む組成物）も提供する。

#### 【0273】

一実施形態では、本開示に従った多量体融合タンパク質及び断片は、癰癤又は発作の治療又は予防に用いられる。

#### 【0274】

一実施形態では、本開示に従った多量体融合タンパク質及び断片は、多発性硬化症の治療又は予防に用いられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 7 5 】

一実施形態では、本開示に従った多量体融合タンパク質及び断片は、

- ・抗 H L A 抗体に起因する移植ドナーミスマッチ
- ・胎児及び新生児同種免疫性血小板減少症、F N A I T（又は新生児同種免疫性血小板減少症、N A I T P 若しくは N A I T 若しくは N A T、又は胎児母体同種免疫性血小板減少症、F M A I T P 若しくは F M A I T）を含む同種免疫疾患 / 徴候の治療又は予防に用いられる。

## 【 0 2 7 6 】

追加の徴候には、ヒト患者及び多量体融合タンパク質療法と他の療法、I V I g、リツキサン、血漿交換療法の組合せからの F c 含有生物製剤薬の急速なクリアランスが含まれる。例えば、多量体融合タンパク質療法はリツキサン療法に続いて用いることができる。

10

## 【 0 2 7 7 】

一実施形態では、本開示の多量体融合タンパク質は、

- ・慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（C I D P）
  - ・ギラン・バレー症候群
  - ・異常タンパク性多発ニューロパチー
  - ・視神経脊髄炎（N M O、N M O スペクトル障害又は N M O スペクトル疾患）、及び
  - ・重症筋無力症
- などの神経学障害の治療又は予防に用いられる。

20

## 【 0 2 7 8 】

一実施形態では、本開示の多量体融合タンパク質は、

- ・水疱性類天疱瘡
  - ・尋常性天疱瘡
  - ・A N C A 関連血管炎
  - ・拡張型心筋症
- などの皮膚科障害に用いられる。

## 【 0 2 7 9 】

一実施形態では、本開示の多量体融合タンパク質は、

- ・特発性血小板減少性紫斑病（I T P）
  - ・血栓性血小板減少性紫斑病（T T P）
  - ・温特発性溶血性貧血
  - ・グッドパスチャー症候群
  - ・抗 H L A 抗体に起因する移植ドナーミスマッチ
- などの免疫学又は血液学障害に用いられる。

30

## 【 0 2 8 0 】

一実施形態では、障害は、重症筋無力症、視神経脊髄炎、C I D P、ギラン・バレー症候群、異常タンパク性多発ニューロパチー、難治性癲癇、I T P / T T P、溶血性貧血、グッドパスチャー症候群、A B O ミスマッチ、ループス腎炎、腎血管炎、強皮症、繊維性肺肺炎、拡張型心筋症、グレーブス病、1 型糖尿病、自己免疫性糖尿病、天疱瘡、強皮症、ループス、A N C A 血管炎、皮膚筋炎、シェーグレン症候群及び関節リウマチから選択される。

40

## 【 0 2 8 1 】

一実施形態では、障害は、自己免疫性多腺性内分泌症候群 1 型（autoimmune polyendocrine syndrome types 1）（A P E C E D 又はウィタカー症候群）及び 2 型（シュミット症候群）、汎発性脱毛症、筋無力症クリーゼ、甲状腺クリーゼ、甲状腺関連眼病、甲状腺眼障害、自己免疫性糖尿病、自己抗体関連脳炎及び / 又は脳症、落葉状天疱瘡、表皮水疱症、疱疹状皮膚炎、シデナム舞踏病、急性運動性軸索型ニューロパチー（A M A N）、ミラー・フィッシャー症候群、多巣性運動ニューロパチー（M M N）、眼球クロオヌス、炎症性筋疾患、アイザック症候群（自己免疫性神経性筋強直症）、腫瘍随伴症候群並びに辺縁系脳炎から選択される。

50

## 【 0 2 8 2 】

本開示に従った多量体融合タンパク質は治療又は予防において用いることができる。

## 【 0 2 8 3 】

本発明は、個体において望ましくない抗体の濃度を減少させる方法であって、個体に治療的有效用量の本明細書に記載される多量体融合タンパク質を投与するステップを含む上記方法も提供する。

## 【 0 2 8 4 】

本発明の多量体融合タンパク質は診断、例えば、B細胞関連リンパ腫などのFc受容体に関連する病状のin vivo診断及び画像診断においても使用することができる。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【 0 2 8 5 】

【図1】本発明に従った発現構築物及び多量体融合タンパク質の例を示す図である。SPはシグナルペプチドであり、CH2及びCH3は重鎖定常ドメインであり、TPはテイルピースである。

【図2(a)】例となる配列を示す図である。2(a)はポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖の例となるアミノ酸配列を示す図である。それぞれの配列では、テイルピース配列は下線が施され、いかなる突然変異もボールド及び下線で示されている。ヒンジはボールドである。IgM由来のCH4ドメインを含む構築物では、この領域はイタリック体で示されている。

【図2(b)】例となる配列を示す図である。2(b)はIgG1に由来するCH2及びCH3ドメイン又はIgG4に由来するCH2及びCH3ドメインを含むFc多量体ポリペプチド鎖の例となるアミノ酸配列を示す図である。それぞれの配列では、IgG1とIgG4間の違いの位置はボールドであり、強調されている。

20

【図2(c)】例となる配列を示す図である。2(c)はIgG1のある種の選択された特性とIgG4のある種の選択された特性を組み合わせるように設計されたFc多量体の例となるアミノ酸配列を示す図である。突然変異はボールド及び下線で示されている。

【図2(d)】例となる配列を示す図である。2(d)はドメイン交換により操作されたハイブリッド重鎖Fc領域を有するFc多量体の例となるアミノ酸配列を示す図である。

【図2(e)】例となる配列を示す図である。2(e)はハイブリッド重鎖Fc領域及び追加の突然変異を有し、IgG1のある種の選択された特性とIgG4のある種の選択された特性を組み合わせるように操作されたFc多量体の例となるアミノ酸配列を示す図である。

30

【図2(f)】例となる配列を示す図である。2(f)はB72.3シグナルペプチドのDNA及びアミノ酸配列を示す図である。(i) DNA配列、(ii) アミノ酸配列。

【図2(g)】例となる配列を示す図である。2(g)はFc多量体の例となるアミノ酸配列を示す図である。

【図3(a)】Fc多量体集合におけるCH3ドメインの役割を示す図である。3(a)はFc多量体の六量体化に対するIgG1/IgG4 CH3ドメイン交換の効果を示すサイズ排除クロマトグラフィートレースを示す図である。

【図3(b)】Fc多量体集合におけるCH3ドメインの役割を示す図である。3(b)はIgG1 Fc IgM tpの六量体化に対するCH3ドメインの点突然変異の効果を示す図である。

40

【図3(c)】Fc多量体集合におけるCH3ドメインの役割を示す図である。3(c)はIgG4 Fc IgM tpの高レベルの六量体化が点突然変異Q355Rにより達成されることを示す図である。

【図3(d)】Fc多量体集合におけるCH3ドメインの役割を示す図である。3(d)はIgG1 Fc IgM tpにおけるすべての他のアミノ酸へのR355の突然変異誘発の効果を示す図である。

【図4】表面プラズモン共鳴分析により測定されるFc多量体のFcRnへの結合を示している。トレースは、多量体濃度範囲、2.5 μM、1.25 μM、0.625 μM、0

50

・ 3 1 2 5  $\mu$ M、0・1 5 6 2 5  $\mu$ M、0・0 7 8 1 2 5  $\mu$ M、0・0 3 9 0 6 2 5  $\mu$ M についての結合を示す図である。示されているFc多量体はすべて3 1 0 位にヒスチジンを含んでいた。4 ( a ) は低密度FcRnへのh I g G 1 Fc多量体I g M t p L 3 0 9 Cの結合を示す図である。4 ( b ) は低密度FcRnへのh I g G 1 Fc多量体I g M t pの結合を示す図である。4 ( c ) は高密度FcRnへのh I g G 1 Fc多量体I g M t p L 3 0 9 Cの結合を示す図である。4 ( d ) は高密度FcRnへのh I g G 1 Fc多量体I g M t pの結合を示す図である。

【図5】マクロファージ食作用のFc多量体阻害を示す図である。データは、ヒトI g G 1又はI g G 4由来で、I g Mテイルピース単独で又はI g MテイルピースとL 3 0 9 Cで六量体又は十二量体形態に重合されているFc多量体はすべて、ヒトI V I Gよりも有意に良好な効力及び最大レベルの阻害を示すことを明らかにしている。

10

【図6】マクロファージ食作用のFc多量体阻害を示す図である。データは、I g G 1とI g G 4 Fc領域の間の違いの選択された位置に単一交差突然変異を含むFc多量体の阻害効果を示している。

【図7】マクロファージ食作用のFc多量体阻害を示す図である。データは、免疫不全の治療において使用するために設計されたFc多量体の阻害効果を示している。

【図8】Fc多量体によるサイトカイン放出の刺激を示す図である。データは、野生型I g G 1 Fc多量体は、L 3 0 9 Cがあってもなくても、非常に高いレベルのサイトカイン放出を刺激することを実証した。サイトカインの観察されたレベルは陽性対照の抗C D 5 2抗体、キャンパスによって生じるレベルよりも高かった。これとは著しく対照的に、Fc R及びC 1 q不活性「L A L A」突然変異を含むI g G 4 Fc多量体及びI g G 1 Fc多量体(L 2 3 4 A、L 2 3 5 A)は、実質的のゼロのサイトカイン放出を生じた。

20

【図9】Fc多量体によるサイトカイン放出の刺激を示す図である。データは、I g G 1とI g G 4 Fc領域の間の違いの選択された位置に単一交差突然変異を含むFc多量体の効果を示している。

【図10】Fc多量体によるサイトカイン放出の刺激を示す図である。データは、サイトカイン放出を調節する突然変異で操作されたFc多量体の効果を示している。

【図11】Fc多量体によるFcRn媒介I g Gリサイクリングの阻害を示す図である。

【図12】、急性血小板減少症のi n v i v oモデルにおける血小板損失のFc多量体による予防を示す図である。グラフは、B a l b / cマウスを使用する5つの独立した実験の凝集結果を示している。

30

【図13】、慢性血小板減少症のi n v i v oモデルにおける血小板損失のFc多量体による予防を示す図である。( a ) 3日目に投与された単一用量の1 0 m g / k g Fc多量体。( b ) 3、4、5、及び6日目に投与された4連続毎日用量、用量あたり1 0 m g / k g。グラフ上のポイントごとに群サイズはn = 6であった。

【図14】Fc多量体のC 1 qへの結合を示す図である。

【図15】Fc多量体による血小板活性化を示す図である。

【実施例】

【0 2 8 6】

40

(例1)

分子生物学

Fc多量体DNA配列は、PCR、制限・ライゲーションクローニング、点突然変異誘発(Quick change)及びサンガー配列決定法を含む標準分子生物学的方法を使用して構築した。発現構築物は、CHO細胞において一過性発現と安定的発現の両方に適している発現プラスミド(p N A F L、p N A F H)にクローニングした。適切な発現ベクターの他の例にはp C D N A 3 (I n v i t r o g e n)が含まれる。

【0 2 8 7】

本発明に従った発現構築物及び多量体融合タンパク質の図は図1に示されている。

【0 2 8 8】

50



ポリペプチド単量体単位のポリペプチド鎖の例となるアミノ酸配列を示す図は、図 2 (a) ~ (e) に提供されている。それぞれの配列では、テイルピース配列は下線が施され、いかなる突然変異もボールド及び下線で示されている。I g M 由来の C H 4 ドメインを含む構築物では、この領域はイタリック体で示されている。

【 0 2 8 9 】

I g G 1 / I g G 4 交差突然変異

F c ドメイン中のある種の鍵となる重要なアミノ酸残基が I g G 1 において見出されるアミノ酸残基にマッチするように設計され、他の鍵となる重要なアミノ酸残基が I g G 4 に見出されるアミノ酸残基にマッチするように設計された種々の F c 多量体変異体を構築した。表 4 に要約されているように、I g G 1 と I g G 4 は C H 2 ドメイン中の 7 つの位置で及び C H 3 ドメイン中の 6 つの位置で互いに異なっている。

10

【表 4】

**表 4**

<u>位置の数</u>	<u>IgG1</u> <u>アミノ酸残基</u>	<u>IgG4</u> <u>アミノ酸残基</u>	IgG1 の IgG4 への 突然変異	IgG4 の IgG1 への 突然変異
234	L	F	L234F	F234L
268	H	Q	H268Q	Q268H
274	K	Q	K274Q	Q274K
296	Y	F	Y296F	F296Y
327	A	G	A327G	G327A
330	A	S	A330S	S330A
331	P	S	P331S	S331P
355	R	Q	R355Q	Q355R
356	D	E	D356E	E356D
358	L	M	L358M	M358L
409	K	R	K409R	R409K
419	Q	E	Q419E	E419Q
445	P	L	P445L	L445P

20

30

【 0 2 9 0 】

I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメイン又は I g G 4 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含む F c 多量体ポリペプチド鎖の例となるアミノ酸配列を示す図は、図 2 (b) に提供されている。それぞれの配列では、I g G 1 と I g G 4 間の違いの位置はボールドであり強調されている。

40

【 0 2 9 1 】

I g G 1 のある種の選択された特性と I g G 4 のある種の選択された特性を組み合わせるように設計された F c 多量体の例となるアミノ酸配列を示す図は図 2 (c) に提供されている。突然変異はボールド及び下線で示されている。

【 0 2 9 2 】

対象の特定の配列は、出発点として I g G 1 又は I g G 4 F c ドメイン配列のどちらかを使用し、関連する突然変異を作製して作り出すことができることは認識されるである

50

う。例えば、突然変異 F 2 3 4 L を有する I g G 4 C H 2 ドメインは、突然変異 H 2 6 8 Q、K 2 7 4 Q、Y 2 9 6 F、A 3 2 7 G、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S を有する I g G 1 C H 2 ドメインと同じである。

【 0 2 9 3 】

#### F c 領域ドメイン交換

C H 2 ドメインが一特定の I g G サブクラスに由来し C H 3 ドメインが異なる I g G サブクラスに由来しているハイブリッド重鎖 F c 領域を含む F c 多量体変異体も構築した。ハイブリッド重鎖 F c 領域を有する F c 多量体の例となるアミノ酸配列を示す図は図 2 ( d ) に提供されている。

【 0 2 9 4 】

ハイブリッド重鎖 F c 領域及び追加の突然変異を有し、I g G 1 のある種の選択された特性と I g G 4 のある種の選択された特性を組み合わせるように設計されている F c 多量体の例となるアミノ酸配列を示す図は図 2 ( e ) に提供されている。

【 0 2 9 5 】

( 例 2 )

#### 発現

リポフェクタミン又は電気穿孔法を使用してトランスフェクトされた H E K 2 9 3 又は C H O 細胞の「一過性」発現を使用して小規模発現を実施した。培養物は、C D - C H O ( L o n z a ) 又は P r o C H O 5 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) 培地において 5 0 ~ 2 0 0 0 m l の範囲のスケールで 5 ~ 1 0 日間、振盪フラスコ又は攪拌バッグ中で増殖させた。細胞は遠心分離により除去し、培養液上清は精製するまで 4 で保存した。細胞を除去した後、いくつかの培養物には保存剤を添加した。

【 0 2 9 6 】

結果によれば、多量体融合タンパク質が十分発現されていることが実証された。

【 0 2 9 7 】

多量体融合タンパク質を発現するのに使用したシグナルペプチドは、達成される発現レベルに影響を及ぼすことが分かった。抗体 B 7 2 . 3 由来のシグナルペプチドは先行技術に記載されていた I L - 2 シグナルペプチド配列よりも高い発現レベルをもたらした。

【 0 2 9 8 】

B 7 2 . 3 シグナルペプチドの D N A 及びアミノ酸配列は図 2 f に示されている。

【 0 2 9 9 】

( 例 3 )

#### 精製及び分析

F c 多量体は、p H の点検 / 6 . 5 以上への調整後プロテイン A クロマトグラフィーとともに p H 3 . 4 緩衝液を使用する溶出ステップにより培養液上清から精製した。溶出液は 1 M T r i s p H 8 . 5 を使用して直ちに p H 約 7 . 0 まで中和し、その後 4 で保存した。分析的サイズ排除クロマトグラフィーを使用し、S 2 0 0 カラム及び画分採取を使用して種々の多量体形態の F c ドメインを分離した。画分は分析し、G 3 0 0 0 H P L C 並びに還元及び非還元 S D S - P A G E 分析後プールした。エンドトキシンはカプトガニアメボサイトライゼート ( L A L ) アッセイを使用して試験し、アッセイで使

【 0 3 0 0 】

多量体融合タンパク質は主に六量体形態で発現され精製され、一部のタンパク質は十二量体及び他の形態であることが分かった。結果によれば、タンパク質は 3 0 9 位にシステインがなくても効果的に集合して多量体になることが実証される。

【 0 3 0 1 】

保存剤の存在下で多量体融合タンパク質を精製すると凝集する傾向が減少し、さらに均一な構造を有する改善された調製物が産生された。効果的であることが明らかにされている保存剤の例には、N エチルマレイミド ( N E M ) 及びグルタチオン ( G S H ) などのチオールキャッピング剤；並びにエチレンジアミン四酢酸 ( E D T A ) などのジスルフィド

10

20

30

40

50

阻害剤が含まれる。

【 0 3 0 2 】

( 例 4 )

F c 多量体集合における C H 3 ドメインの役割

多量体化の程度は思いがけないことに、F c 領域が由来する元の I g G サブクラスに応じて変動することが分かった。I g G 1 に由来する C H 2 ドメインと C H 3 ドメインを含む F c 多量体は非常に効率的に六量体に集合し、その分子のおおよそ 8 0 % が六量体形態で存在していた。これとは対照的に、I g G 4 に由来する C H 2 ドメインと C H 3 ドメインを含む F c 多量体はもっと低いレベルの六量体を形成した。C H 2 ドメインが一特定の I g G サブクラスに由来しており C H 3 ドメインが異なる I g G サブクラスに由来しているハイブリッド F c 領域を含む F c 多量体を調べると、六量体を形成する能力が主に C H 3 ドメインにコードされていることが明らかになった。I g G 1 に由来する C H 3 ドメインが存在すると六量体化が著しく増加する。C H 3 ドメインが I g G 1 に由来しており C H 2 ドメインが I g G 4 に由来しているハイブリッド F c 多量体は I g G 1 野生型と同じくらいの効率で六量体化し、その分子のおおよそ 8 0 % が六量体として見出された。したがって、I g G 4 の C H 3 ドメインを I g G 1 のもので置き換えると、野生型 I g G 4 F c 多量体と比べて六量体化のレベルを改善する。こうして得られたハイブリッドは、I g G 4 の望ましい特性の多くを保持しつつ高いレベルの六量体形成をするという利点がある。図 3 ( a )。

10

【 0 3 0 3 】

20

I g G 1 と I g G 4 の C H 3 ドメインは例 1 に記載した 6 つの位置で異なる。I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含む F c 多量体から始めて、これらの位置のそれぞれが I g G 1 残基から I g G 4 残基に次々に突然変異した。結果によれば、3 5 5 位のアミノ酸が六量体化には極めて重要であることが実証された。野生型 I g G 1 中の 3 5 5 位に見出されるアミノ酸のアルギニンが効率的な六量体化を促進する。野生型 I g G 4 に見出されるアミノ酸のグルタミンでは六量体化は低くなる。I g G 1 と I g G 4 C H 3 ドメインの間の違いのその他の位置は六量体化に影響を与えなかった。図 3 ( b )。

【 0 3 0 4 】

I g G 4 に由来する C H 3 ドメインを含む F c 多量体では、3 5 5 位のグルタミン残基をアルギニン残基で置換すると ( Q 3 5 5 R ) 高いレベルの六量体化が生じた。したがって、I g G 4 F c 多量体の比較的低い六量体化という問題は単一アミノ酸置換により解決することが可能である。これは、こうして得られる F c 多量体が I g G 4 の特徴的な特性を保持したまま高い効率で六量体に集合するという利点を有する。図 3 ( c )。

30

【 0 3 0 5 】

I g G 1 F c 多量体では、3 5 5 位のアルギニンをシステインで置換すると ( R 3 5 5 C ) 六量体形成を野生型 I g G 1 以上に増加させた。理論に縛られたいくはないが、この結果から、3 5 5 位のシステイン残基はテイルピース中のシステインとジスルフィド結合を形成することができる可能性があることが示唆される。その他のすべてのアミノ酸への R 3 5 5 の突然変異誘発では、I g G 1 F c 多量体における六量体形成のさらなる増強は生じなかった。図 3 ( d )。

40

【 0 3 0 6 】

( 例 5 )

F c 多量体と F c R の相互作用についての親和性測定

多量体融合タンパク質と F c R 及び F c R n を含む F c 受容体 ( F c R ) の相互作用についての親和性 / 結合力測定は、F c R 担持細胞系での表面プラズモン共鳴、競合 E L I S A 及び競合結合研究を含む周知の方法を使用して実施することが可能である。F c R の可溶性細胞外ドメイン ( E C D ) は、B i a c o r e T 2 0 0 での B I A c o r e センサーチップ上への非特異的固定化又はタグ特異的捕獲による表面プラズモン共鳴実験において使用した。ヒト F c R n 細胞外ドメインは、ヒト F c R n アルファ鎖細胞外ドメインと 2 マイクログロブリンの間の非共有結合複合体として提供された。多量体融合タンバ

50

ク質は、相互作用の強さを最もよく決定するために、受容体上、種々の濃度及び流速で滴定した。データはBiacore T200 Evaluationソフトウェアを使用して解析した。

【0307】

図4は、表面プラズモン共鳴分析により測定した、FcRnへの多量体融合タンパク質の結合についてのデータを示している。トレースは、多量体濃度範囲、2.5 μM、1.25 μM、0.625 μM、0.3125 μM、0.15625 μM、0.078125 μM、0.0390625 μMについての結合を示す。示されているFc多量体はすべて310位にヒスチジンを含んでいた。

(a)は低密度FcRnへのヒトIgG1 Fc多量体IgM t p L309Cの結合を示している。

10

(b)は低密度FcRnへのヒトIgG1 Fc多量体IgM t pの結合を示している。

(c)は高密度FcRnへのヒトIgG1 Fc多量体IgM t p L309Cの結合を示している。

(d)は高密度FcRnへのヒトIgG1 Fc多量体IgM t pの結合を示している。

【0308】

(a)及び(c)において使用される構築物は309位にロイシンからシステインへの置換を含有する。

20

【0309】

結果によれば、310位にヒスチジンを含むFc多量体はヒトFcRnに結合することが実証された。

【0310】

ヒトFcRnへの結合を増加させると考えられた突然変異を取り込んだいくつかのFc多量体も生成した。

【0311】

表5は、pH6.0でのヒトFcRnへの突然変異単量体ヒトIgG1 Fc断片の結合の解離定数を示す。突然変異によりヒトFcRnへの結合が増加した。しかし、単量体断片の相互作用の強さはそれでも弱く、解離定数はマイクロモル濃度の範囲であった。突然変異Fcドメインの多量体化は、本発明に記載されるように、結合力の利益を与え、したがって相互作用の強さを大いに改善することができる。

30

## 【表 5】

**表 5. pH6.0 でのヒト FcRn への突然変異  
単量体 IgG1 Fc 断片の結合**

試料突然変異	KD (M)	KD (μM)
IgG1 Fc, WT	9.78E-07	0.98
IgG1 Fc, L309S	1.25E-06	1.25
IgG1 Fc, Q311A	7.69E-07	0.77
IgG1 Fc, T307A	5.65E-07	0.57
IgG1 Fc, T307P	6.93E-07	0.69
IgG1 Fc, V308C	7.00E-07	0.70
IgG1 Fc, V308F	3.32E-07	0.33
IgG1 Fc, V308P	1.36E-07	0.14
IgG1 Fc, WT	1.07E-06	1.07

## 【 0 3 1 2 】

(例 6)

B 細胞標的のマクロファージ食作用

ヒトマクロファージによる B 細胞の抗体依存性食作用を測定するアッセイを設計した。マクロファージを調製するため、ヒト末梢血単核球 (P B M C) を先ず密度勾配遠心分離により新鮮血から単離した。次に、単核球は、P B M C を 6 ウェル組織培養被覆プレートにおいて 37 で 1 時間インキュベートし、それに続いて非付着性細胞を除去することにより選択した。付着性単核球は、マクロファージコロニー刺激因子 (M C S F) での 5 日培養によりマクロファージに分化した。次に、ヒト B 細胞は、P B M C の単離とそれに続く M A C S を使用する負の選択により B 細胞を精製することにより、別々の (同種) ドナーから調製した (B cell isolation kit II、Miltenyi B i o t e c h)。いくつかのアッセイで、B 細胞はカルボキシフルオセインサクシニミジルエステル (C F S E) (M o l e c u l a r P r o b e s) で標識した。分化したマクロファージと B 細胞は抗 C D 2 0 m A b (リツキシマブ) の存在下、1 対 5 比で共培養し、B 細胞の抗体依存性食作用を誘導した。多量体融合タンパク質又は対照は指示濃度で添加し、細胞は 37、5 % C O<sub>2</sub> で 1 ~ 2 4 時間インキュベートした。それぞれの時点の終了時、細胞は遠心分離し 4 で F A C S 緩衝液に再懸濁してそれ以上の食作用を停止し、B 細胞はフローサイトメトリーによる分析前に抗 C D 1 9 アロフィコシアニン (A P C) で表面染色した。マクロファージはその自己蛍光 / 側方散乱性により、B 細胞はその C F S E / C D 1 9 標識化により識別した。C D 1 9 標識化に対して陰性の C F S E 陽性マクロファージは貪食された B 細胞を含有すると仮定した。

## 【 0 3 1 3 】

結果によれば、本発明の多量体融合タンパク質はヒトマクロファージによる B 細胞枯渇を抑制することが実証された (図 5)。データによれば、ヒト I g G 1 又は I g G 4 由来で、I g M テイルピース単独、又は I g M テイルピースと L 3 0 9 C により六量体又は十二量体形態に重合された F c 多量体はすべて、効力と最大レベルの抑制をヒト I V I G と

10

20

30

40

50

比べて有意に良好に示すことが明らかになっている。

【0314】

十二量体形態と六量体形態が等しく強力であるという証拠は、製品製造及び安全性にとり有益である。なぜならば、六量体から微量の十二量体を除去するための追加の精製の必要性がないからである。

【0315】

C F S E 染色 B 細胞を使用するフローサイトメトリー分析により、その作用機序がマクロファージ食作用の阻害であり、B 細胞死滅でも他の手段によるアポトーシスでもないことが確かめられた。

【0316】

任意の F c 多量体構築物のマクロファージ食作用を阻害する能力を評価するため、その活性を本明細書の上に記載するアッセイにおいて測定し、I g G 1 及び I g G 4 野生型 F c 多量体の活性と比較した。次に、それぞれの突然変異体の活性を、I g G 1 及び I g G 4 野生型 F c 多量体について得られたものとその濃度対効果曲線の目視比較に基づいて「I g G 1 様」、「高」、「中程度」、「低」、又は「I g G 4 様」としてまとめた。

【0317】

I g G 1 と I g G 4 F c 領域の差異の 8 つの位置のそれぞれで単一交差突然変異を含む F c 多量体についての結果は図 6 に示しており、表 6 にまとめている。

【0318】

野生型 I g G 1 F c 多量体は、I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含むが、抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用を強力に阻害する。I g G 1 F c 多量体中の単一突然変異の 2 つ ( A 3 3 0 S 、 K 4 0 9 R ) は食作用阻害の効力に全く効果を及ぼさない。6 つの単一突然変異 ( L 2 3 4 F 、 H 2 6 8 Q 、 K 2 7 4 Q 、 Y 2 9 6 F 、 A 3 2 7 G 及び P 3 3 1 S ) では食作用阻害の効力に中程度の減少が生じる。残基 L 2 3 4 F 及び A 3 2 7 G は、突然変異させると、食作用阻害の比較的高い効力を維持しつつサイトカイン放出が著しく減少するので特に興味深い ( 例 8 参照 ) 。特性をこのように組み合わせれば、自己免疫不全の治療に有用になる。

【0319】

野生型 I g G 4 F c 多量体は抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用を阻害するが、I g G 1 F c 多量体ほど強力ではない。I g G 4 F c 多量体中の単一突然変異の 2 つ ( F 2 3 4 L 及び G 3 2 7 A ) は食作用阻害の効力を中程度に増加させる。I g G 4 中の突然変異の 6 つ ( Q 2 6 8 H 、 Q 2 7 4 K 、 F 2 9 6 Y 、 S 3 3 0 A 、 S 3 3 1 P 、 R 4 0 9 K ) は個別に突然変異した場合は食作用阻害に全く効果を及ぼさない。残基 F 2 3 4 L 及び G 3 2 7 A は、どちらかを個別に突然変異させると食作用の阻害において I g G 4 F c 多量体の効力を増強するが、サイトカイン産生の増加には全く効果を及ぼさないので特に興味深い ( 例 8 参照 ) 。特性をこのように組み合わせれば、自己免疫不全の治療に有用になる。

10

20

30

【表 6】

表 6

<u>Fc 多量体</u>	<u>食作用阻害の効力</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	「IgG1 様」の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	高
IgG1 Fc IgM tp L309 H268Q	高
IgG1 Fc IgM tp L309 K274Q	高
IgG1 Fc IgM tp L309 Y296F	高
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	高
IgG1 Fc IgM tp L309 A330S	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	高
IgG1 Fc IgM tp L309 K409R	IgG1 様
IgG4 Fc IgM tp L309	「IgG4 様」の基準
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 Q268H	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 Q274K	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 F296Y	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A	低
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S331P	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 R409K	IgG4 様

10

20

30

## 【 0 3 2 0 】

免疫不全の治療での使用のために設計された追加の F c 多量体構築物の結果は図 7 に示されており、表 7 にまとめられている。

## 【 0 3 2 1 】

野生型 I g G 1 及び I g G 4 F c 多量体は抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用を I V I G よりも強力に阻害する。

## 【 0 3 2 2 】

L 2 3 4 F ( サイトカイン産生を減少させる ) 又は L 2 3 4 F と P 3 3 1 S ( サイトカイン産生及び C 1 q 結合を減少させる、例 8 及び 1 5 参照 ) を含む I g G 1 F c 多量体は、野生型 I g G 1 F c 多量体と比べて食作用阻害の効力を中程度に減少させたが、それでも野生型 I g G 4 F c 多量体又は I V I G と比べて極めて強力である。

40

## 【 0 3 2 3 】

突然変異 F 2 3 4 L ; F 2 3 4 L と F 2 9 6 Y ; G 3 2 7 A と S 3 3 1 P ; S 3 3 0 A と S 3 3 1 P ; 又は G 3 2 7 A と S 3 3 0 A を含む I g G 4 F c 多量体は野生型 I g G 4 F c 多量体と比べて食作用阻害における効力を増強した。

## 【表 7】

表 7.

Fc 多量体	食作用阻害の効力
IgG1 Fc IgM tp L309	「IgG1 様」の基準
IgG4 Fc IgM tp L309	「IgG4 様」の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	高
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	高
ハイブリッド Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	中程度

## 【 0 3 2 4 】

(例 7)

I g G F I T C ビーズの T H P 1 細胞食作用

T H P 1 細胞は継代 7 でプレートアウトし、計数して、 $5 \times 10^5$  細胞 / m l で再懸濁した。200  $\mu$  l の細胞を 96 ウェル平底プレートのそれぞれのウェルに添加した (ウェル当たり  $1 \times 10^5$  細胞)。ウサギ I g G で被覆したビーズ (C a m b r i d g e b i o s c i e n c e C A Y 5 0 0 2 9 0 - 1 e a ) をそれぞれのウェルに直接添加し、混合し (10 希釈度中 1、10  $\mu$  l / ウェル)、時点 1 時間、2 時間、4 時間、8 時間放置した。ゼロ時点は、氷上、氷冷緩衝液中の細胞にビーズを添加することによりもたらされた。それぞれの時点の終了時、細胞は 300 g で 3 分間遠心分離した。細胞は、1 対 20 の希釈度のトリパンプルー原液を含有する F A C S 緩衝液中に 2 分間再懸濁した。細胞は 150  $\mu$  l の F A C S 緩衝液で洗浄し、遠心分離し、200  $\mu$  l の F A C S 緩衝液に再懸濁し F A C S 用に準備された丸底プレートに移した。細胞は、フローサイトメトリーによる分析前に、もう 1 度遠心分離し 200  $\mu$  l の F A C S 緩衝液に再懸濁した。T H P 1 細胞は前方及び側方散乱でゲートをかけ、ビーズの取り込みは F I T C 蛍光として測定した。

## 【 0 3 2 5 】

(例 8)

ヒト全血サイトカイン放出アッセイ

新鮮血をリチウムヘパリンバキュテナーにおいてドナーから採取した。対象の F c 多量体構築物又は対照は指示濃度まで無菌 P B S 中に連続希釈した。12.5  $\mu$  l の F c 多量体又は対照をアッセイプレートに添加し、続いて 237.5  $\mu$  l の全血を添加した。プレートは C O <sub>2</sub> 補充なしで 24 時間、37 ° でインキュベートした。プレートは 1800 r p m で 5 分間遠心分離し、サイトカイン分析のために血清を除去した。サイトカイン分析は M e s o S c a l e D i s c o v e r y サイトカインマルチプレックスにより、製造業者のプロトコルに従って実施し、S e c t o r I m a g e r 6 0 0 0 上で読み取った。

## 【 0 3 2 6 】

結果は図 8 に示している。データによれば、野生型 I g G 1 F c 多量体は L 3 0 9 C があってもなくても、非常に高いレベルのサイトカイン放出を刺激することが実証された



。観察されたサイトカインのレベルは、陽性対照キャンパスにより産生されるサイトカインのレベルよりも高かった。これとは著しく対照的に、I g G 4 F c 多量体、及び F c R と C 1 q 不活性「L A L A」突然変異（L 2 3 4 A L 2 3 5 A）を含む I g G 1 F c 多量体が生じるサイトカイン放出は実質的にゼロであった。

【0327】

サイトカイン放出に対する任意の F c 多量体構築物の効果を評価するため、本明細書の上に記載されるアッセイにおいてその活性を測定し、I g G 1 及び I g G 4 野生型 F c 多量体の活性と比較した。次に、突然変異体の活性を、I g G 1 及び I g G 4 野生型 F c 多量体について得られたものとその濃度対効果曲線の目視比較に基づいて「I g G 1 様」、「高」、「中程度」、「低」、又は「I g G 4 様」としてまとめた。

10

【0328】

I g G 1 と I g G 4 F c 領域の差異の選択された位置に単一交差突然変異を含む F c 多量体についての結果は図 9 に示しており、表 8 にまとめている。

【0329】

結果によれば、野生型 I g G 1 F c 多量体は、I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含むが、極めて著しいレベルのサイトカインの放出を刺激することが立証された。示されている結果は I F N についてである。T N F については類似する結果が観察された。

【0330】

単一突然変異の 2 つ（L 2 3 4 F、A 3 2 7 G）は I g G 1 F c 多量体におけるサイトカイン放出を著しく減少させた。単一突然変異の 1 つ（Y 2 9 6 F）はサイトカイン放出の中程度の減少を生じた。突然変異の 1 つ（P 3 3 1 S）はサイトカイン放出を著しく増加させた。突然変異の 3 つ（H 2 6 8 Q、K 2 7 4 Q、A 3 3 0 S）はサイトカイン放出に全く効果を及ぼさなかった。

20

【0331】

これとは著しく対照的に、野生型 I g G 4 F c 多量体は、I g G 4 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含むが、実質的には全くサイトカイン放出を生じなかった。単一交差突然変異はどれも I g G 4 F c 多量体によるサイトカイン放出にいかなる効果も及ぼさず、I g G 1 F c 多量体におけるサイトカイン放出にとり重要であることが明らかにされた位置の突然変異でさえ効果はなかった。

30

【表 8】

表 8

<u>Fc 多量体</u>	<u>IFN <math>\gamma</math> 放出の刺激</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	「IgG1 様」の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	低
IgG1 Fc IgM tp L309 H268Q	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 K274Q	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 Y296F	中程度
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	低
IgG1 Fc IgM tp L309 A330S	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	IgG1 より高い
IgG1 Fc IgM tp L309 K409R	IgG1 より高い
IgG4 Fc IgM tp L309	「IgG4 様」の基準
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 Q268H	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 Q274K	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 F296Y	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S331P	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 R409K	IgG4 様

10

20

30

## 【 0 3 3 2 】

サイトカイン放出を調節するように設計された追加の F c 多量体構築物についての結果は図 10 に示されており、表 9 にまとめられている。

## 【 0 3 3 3 】

データによれば、I g G 1 F c 多量体によるサイトカイン放出は、L 2 3 4 F を単独で又は P 3 3 1 S と組み合わせて含むことにより I V I G におおよそ相当するレベルにまで減少させることが可能であることが示されている。そのような F c 多量体は免疫不全の治療に有用である可能性がある。他の有用な特性、例えば、食作用における増強された効力（例 6）があることが明らかにされている突然変異を含有するすべての I g G 4 F c 多量体は実質的にゼロレベルのサイトカイン放出を保持し、したがって、免疫不全の治療に有用である可能性がある。

40

## 【表 9】

表 9. Fc 多量体によるサイトカイン放出

Fc 多量体	IFN $\gamma$ 放出の刺激
IgG1 Fc IgM tp L309	「IgG1 様」の基準
IgG4 Fc IgM tp L309	「IgG4 様」の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	低
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	中程度
バイブリッド Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	IgG4 様

## 【 0 3 3 4 】

(例 9)

培養中の細胞における I g G リサイクリングに対する効果

細胞ベースのアッセイを、ヒト F c R n とヒト 2 M ダブル遺伝子ベクターをジェネシシ選択マーカーと一緒に安定的にトランスフェクトされているメイディン・ダービーイヌ腎臓 (M D C K) I I 細胞を使用して実施した。ヒト I g G をリサイクルし経細胞輸送することができる安定な細胞クローンを選択し、これをその後のすべての研究で使用した。この細胞は M D C K I I クローン 1 5 と呼ばれることになる。カニクイザル (「クローン 4 0」) 又はマウス F c R n のどちらかをトランスフェクトされた対応する M D C K 細胞系を、上記のものに等しいアッセイにおいて使用するために、同じように生成した。

## 【 0 3 3 5 】

F c R n の I g G リサイクリング能力を阻害する本発明の多量体融合タンパク質の能力を調べるために i n v i t r o アッセイを確立した。手短に言えば、M D C K I I クローン 1 5 細胞を酸性緩衝液 (p H 5 . 9) 中で多量体融合タンパク質の存在下又は非存在下でビオチン化ヒト I g G (1  $\mu$  g / m l) とインキュベートして F c R n に結合させた。6 0 分のパルス時間後、過剰なタンパク質はすべて除去し、細胞は中性 p H 緩衝液 (p H 7 . 2) 中でインキュベートし、表面露出結合 I g G を上清中に放出させた。M S D アッセイを使用して F c R n の阻害を追跡し、リサイクルされしたがって上清中の放出される I g G の量を検出した。

## 【 0 3 3 6 】

M D C K I I クローン 1 5 細胞は 9 6 ウェルプレートにおいてウェル当たり 1 5 0 0 0 細胞で蒔き、3 7 、5 % C O <sub>2</sub> で一晩インキュベートした。細胞は H B S S + (C a / M g) p H 5 . 9 + 1 % B S A 中多量体融合タンパク質の存在下及び非存在下、3 7 、5 % C O <sub>2</sub> で 1 時間、1  $\mu$  g / m l のビオチン化ヒト I g G (J a c k s o n) と一緒にインキュベートした。細胞は H B S S + p H 5 . 9 で洗浄し、その後 H B S S + p H 7 . 2 中 3 7 、5 % C O <sub>2</sub> で 2 時間インキュベートした。ライセートと上清は除去し、M S D アッセイ (抗ヒト I g G 捕獲抗体 (J a c k s o n) 及びストレプトアビジン - スルホタグ暴露抗体 (M S D) を使用する) を使用して全 I g G について分析した。阻害曲線は非線形回帰 (G r a p h p a d P r i s m) により解析して E C <sub>5 0</sub> を決定した。

## 【 0 3 3 7 】

結果によれば、本発明の多量体融合タンパク質はFcRn媒介IgGリサイクリングを阻害することが実証された(図11)。310位に天然のヒスチジン残基を保持するヒトIgG1-Fc/IgMテイルピース多量体は、309位にシステインがあってもなくても、FcRn媒介IgG細胞内輸送及びリサイクリングを濃度依存的な形態で遮断する。データによれば、L309Cを欠く形態はL309Cがある形態よりも強力であることがはっきり示されている。理論に縛られたくはないが、この違いは、FcRn結合に決定的に関与している310位のヒスチジン残基に隣接するL309Cジスルフィド結合による立体障害に起因する可能性がある。

#### 【0338】

表10は、Fc多量体のブロッキング活性に対する突然変異の効果を示している。FcRnへの結合を増加させる3つの突然変異、V308F、V308P及びT307Aは、IgG1-Fc/IgMテイルピース又はIgG4-Fc/IgMテイルピースを含むFc多量体において試験した。結果によれば、FcRn媒介IgG細胞内取り込み及びIgGリサイクリングを遮断するFc多量体の能力の著しい改善が示された。データによれば、IgG1又はIgG4-Fc領域のどちらかを含むFc多量体の効力を改善するためにはこれらの突然変異が有用であることが実証された。

#### 【0339】

310位のヒスチジンをロイシンで置換すると(H310L)、FcRn媒介IgG細胞内取り込み及びIgGリサイクリングを遮断するFc多量体の能力が破壊されることが明らかにされた。結果によれば、310位にヒスチジン残基を保持しているFc多量体のほうがFcRnへの結合がはるかに良好であり、IgG細胞内取り込み及びIgGリサイクリングのより強力なブロッカーであることが示されている。データによれば、本発明のFc多量体は半減期がさらに長く有効性のさらに大きな新しい改善された治療組成物を提供できることが確認されている。

10

20

## 【表 10】

表 10. IgG 細胞内取り込み及び IgG リサイクリングの Fc 多量体遮断に対する突然変異の効果

Fc 多量体突然変異体	IgG 細胞内取り込み の遮断 EC <sub>50</sub> (μg/ml)	IgG リサイクリングの 遮断 EC <sub>50</sub> (μg/ml)
IgG1 IgM テイルピース,野生型	4.4	0.33
IgG1 IgM テイルピース, V308F	0.12	0.073
IgG1 IgM テイルピース, V308P	0.34	0.55
IgG1 IgM テイルピース, T307A	0.54	0.35
IgG1 IgM テイルピース, H310L	検出可能な阻害なし	100 μg/ml で最大 45%阻害
IgG4 IgM テイルピース,野生型	5.9	1.0
IgG4 IgM テイルピース, V308F	0.42	0.56
IgG4 IgM テイルピース, V308P	0.51	0.42
IgG4 IgM テイルピース, T307A	0.50	試験せず

## 【0340】

(例 10)

急性 ITP における Fc 多量体の有効性

Fc 多量体の有効性を、血小板損失を抗 CD41 の投与により誘導している ITP のマウスモデルにおいて研究した。この抗体は血小板表面上の糖タンパク質 IIb に結合し、その血小板を破壊の標的にする。

ITP in vivo プロトコル

ベースライン血小板数を得るために投与に先立って 5 μl の血液試料をマウスの尾から採取した。

マウスには 1 mg / kg 又は 10 mg / kg の Fc 多量体を静脈内に投与した。

1 時間後 1 μg / マウスのラット抗マウス CD41 IgG1 抗体 (MWReg30) を腹腔内に投与した。

最終心臓穿刺は、抗 CD41 投与の 24 時間後に実施した。

FAC 染色プロトコル

5 μl の血液を尾静脈から採取した。最終試料では、血液は心臓穿刺によりヘパリンチューブ内に採取し 5 μl を染色用に採取した。

100 μl の抗体カクテルを 5 μl の血液試料に添加し、暗所において 4 で 20 分間インキュベートした。

5 ml の FAC 緩衝液を添加した。

それぞれの試料は 1 対 4 で希釈して「V 字形」底プレートで最終体積 200 μl にし、Beckton Dickinson FACS Canto 上で取得する準備ができるまで氷上に保った。

## 【表 11】

表 11.

抗体名/クローン	抗体色	希釈度	供給者/ロット番号
CD45 (30-F11)	PerCPCy5.5	1/400	Ebio E08336-1633
CD42d (1C2)	PE	1/200	Ebio E14346-104
Fc ブロック		1/200	

## 【0341】

10

## FACS 取得

設定体積 150  $\mu$ l の試料を流速 1.5  $\mu$ l / 秒で採取した。閾値は 200 に設定した。解析は FlowJo ソフトウェアで実施した。血小板数は CD45 - / CD42d + にゲートをかけた細胞から導き出した。

細胞数は、最初の 5  $\mu$ l の血液試料は 1 / 4000 に希釈されこのうちの 150  $\mu$ l は FACS 機械に流され、これは分析されている最初の試料の 0.1875  $\mu$ l に一致するという事実に基づいて試料希釈について補正した。5 / 0.1875 = 血小板 /  $\mu$ l では増倍係数  $\times 26.7$ 。

## 試薬

ラット抗マウス CD41 機能的等級精製されている (Ebiosciences、MWR eg30、ロット番号 E11914-1632)

20

エンドトキシンなし PBS (Sigma、D8537)

FACS 緩衝液: 0.1% の FCS、2 mM の EDTA

## 結果

1 mg / kg 用量でのヒト多量体融合タンパク質 (「Fc 多量体」) は十分に許容的であった。しかし、これらのタンパク質はモデルでのこの用量では効果的ではなかった。陽性結果は 10 mg / kg のヒト Fc 多量体を使用して観察された。IgM 又は IgA テイルピースのどちらかを有する Fc 多量体は、1  $\mu$ g / マウスの抗 CD41 の注射によって引き起こされる血小板減少を著しく阻害した。

## 【0342】

30

結果によれば、Fc 多量体は急性免疫性血小板減少症の *in vivo* モデルで血小板損失を防ぐことが実証された。血小板損失の統計的に有意な減少は、10 mg / kg の用量での、L309C 有りとなしの両方でのヒト IgG1 Fc / IgM テイルピース多量体及び L309C 有りのヒト IgG4 Fc / IgM テイルピース多量体を使用して達成した (図 12)。したがって、テイルピースだけを通じて、又は L309C ジスルフィドとテイルピースを介して六量体化された多量体融合タンパク質は *in vivo* で効果的である。ヒト IVIG はこのモデルでは 1000 mg / kg というのはるかに高い用量のみで活性である。10 mg / kg の当用量では、IVIG は血小板損失を防ぐには不活性であることが分かった。

## 【0343】

40

(例 11)

## 慢性 ITP における Fc 多量体の有効性

Fc 多量体の有効性を、ミニポンプを使用して持続時間の間抗 CD41 を投与することにより血小板損失が誘導されている慢性 ITP のマウスモデルにおいて研究した。

ITP *in vivo* プロトコル

ベースライン血小板数を得るために投与に先立って 5  $\mu$ l の尾出血を行った。

ラット抗マウス CD41 を 82.5  $\mu$ g / ml の濃度 (57.75  $\mu$ l のラット抗マウス CD41 Ab + 642.25  $\mu$ l の PBS / BSA (1.5 mg / ml)) で含有するアルゼットミニポンプを皮下に植えた。ポンプは流速 0.5  $\mu$ l / 時を有し、1 日当たり 0.99  $\mu$ g の抗 CD41 の相当量を投与する。

50

血小板数を得るための5  $\mu$  lの尾出血は毎日行った。

定常状態の血小板数に到達した時点で、マウスに1 g / k gのI V I G、又はF c多量体を一定範囲の用量で静脈内に投与する。

7日目、最終心臓穿刺を実施した。

#### F A C 染色プロトコル

尾部静脈を経て5  $\mu$  lの血液を採取する。最終試料では、心臓穿刺によりヘパリンチューブ内に血液を採取し、染色のために5  $\mu$  l採取する。

100  $\mu$  lの抗体カクテルを添加し、暗所で4、20分間インキュベートする。

5 mlのF A C緩衝液を添加する。

それぞれの試料を1対4で希釈して「V字形」底プレートで最終体積200  $\mu$  lにし、B D F A C s C a n t o上で取得する準備ができるまで氷上に保つ。

【表12】

表 12

抗体名/クローン	抗体色	希釈度	供給者/ロット番号
CD45 (30-F11)	PerCPCy5.5	1/400	Ebio E08336-1633
CD42d (1C2)	PE	1/200	Ebio E14346-104
Fc ブロック		1/200	

【0344】

#### F A C S 取得

設定体積150  $\mu$  lの試料を流速1.5  $\mu$  l / 秒で収集する。閾値は200に設定する。解析はF l o w J oソフトウェアで実施する。血小板数はC D 4 5 - C D 4 2 d + にゲートをかけた細胞から導き出す。

細胞数は、最初の5  $\mu$  lの血液試料は1 / 4000に希釈されこのうちの150  $\mu$  lはF A C s 機械に流されこれは分析されている最初の試料の0.1875  $\mu$  lに一致することに基づいて試料希釈について補正する。5 / 0.1875 = 血小板 /  $\mu$  lでは増倍係数×26.7。

【0345】

#### 試薬

ラット抗マウスC D 4 1機能的等級精製されている(E b i o s c i e n c e s、M W R e g 30、ロット番号E 1 1 9 1 4 - 1 6 3 2)

エンドトキシンなしP B S (S i g m a、D 8 5 3 7)

F A C 緩衝液：0.1%のF C S、2 mMのE D T A

10 mg / k g I g G 1 I g M t p、(I D : P B 0 0 0 0 2 3 8)、E W B E - 0 1 7 5 5 3、5.69 mg / mg、

エンドトキシン(Endotoxin) < 0.35 EU / mg

I g G 1 F c I g M t p L 3 0 9 C、(I D : P B 0 0 0 0 1 9 8)、E W B E - 0 1 7 4 0 0、6.49 mg / ml、エンドトキシン< 0.46 EU / mg

I V I G : G a m m u n e x ロット番号26NK1N1

【0346】

結果によれば、多量体融合タンパク質は慢性血小板減少症のi n v i v oモデルにおいて血小板損失を防ぐことが実証された。図13は、(a)単一用量の10 mg / k g F c多量体、3日目に投与、及び(b)4日連続毎日投与、用量当たり10 mg / k g、3、4、5及び6日目に投与、を使用して達成された効果を示している。多用量のF c多量体は、血小板損失を防ぐのにその有効性を増加させた。ヒトI V I Gははるかに高用量の1000 mg / k gでのみ効果があった。

【0347】

(例12)

質量分析による六量体 Fc 多量体のジスルフィド結合及びグリカン分析方法

六量体 Fc 多量体の精製された試料 (100 µg) は、55 mM の Tris - HCl pH 8.0 中 8 M 尿素の存在下で変性し、22 mM のヨードアセトアミド (IAM) と一緒に 37 °C で 60 分間インキュベートすることにより遊離のチオールを捕獲した。尿素濃度は限外濾過を使用して 6 M まで減少させタンパク質は Lys C / トリプシン混合物 (Promega) を用いて 37 °C で 3 時間消化した。試料は 5 体積の緩衝液でさらに希釈し、消化は 37 °C で一晩続けた。ペプチドは収集し、Water Oasis HLB カートリッジで脱塩し、遠心式エバポレータを使用して乾燥させ、0.2 % 蟻酸を含有する水 (溶媒 A) 中に再構成した。

10

**【0348】**

試料 (7.5 µL、約 7 µg) は溶媒 A で平衡された 2.1 × 150 mm の C18 カラム (Waters 1.7 µm PST 300A) 上に 150 µL / 分で充填し、40 °C で操作した。ペプチドは、50 % 溶媒 B (4 対 4 対 1 のアセトニトリル : 1 - プロパノール : 水 / 0.2 % 蟻酸) までの 60 分勾配により、MS<sup>E</sup> +ve-ion モードで操作する Waters Xevo 質量分析計中に溶出させた。MS<sup>E</sup> データは、低及び高衝突エネルギーの交互スキャンからなるが、溶出中範囲 100 ~ 1900 m/z にわたり収集した。ランニング後、消化物は自動回収装置バイアルに 10 mM のトリス (ヒドロキシプロピル) ホスフィン (THP) 溶液を直接添加することにより還元し、室温で 1 時間超インキュベートした。次に還元された試料はもう 1 度分析された。

20

**【0349】**

MS<sup>E</sup> データは Waters Biopharma Lynx (商標) (BPL) を使用して関連 Fc 多量体配列に対して検索した。遊離のジスルフィドチオールの割合は、THP 還元消化物中の IAM 標識対遊離ペプチドの比から計算した。グリカンプロファイルは、消化物中で検出された種々の糖ペプチドアイソフォームから決定した。

**【0350】**結果

L309C 有り及びなしでの Fc 多量体 (IgG1 Fc / IgM テイルピース) のグリカン分析の結果は表 13 に示している。グリカン構造は表 8 に示している。

**【0351】**

30

データは、IgG1 Fc 領域のグリコシル化部位である、N297 の高い占有率を示しており、この位置で見出されている遊離のアスパラギン残基は 10 % 未満である。N297 でのグリコシル化は主にフコシル化二分岐複合体、第 1 に G0F であった。IgM テイルピース部位、N563 の占有率は約 50 % であり、天然の IgM で見出された約 20 % のレベルよりも高かった。N563 でのグリコシル化は主に高マンノースであった。



## 【表 13】

表 13. グリカン分析

		占有率	G0F-N	G2-F	G1-F	G0-F	M6	M5
IgG1	CH2	93%	14%	5%	20%	38%	1%	15%
Fc IgM	N297							
tp	テイル	59%	<1%	7%	5%	2%	24%	20%
L309C	ピース							
	N563							
IgG1	CH2	91%	14%	<1%	26%	34%	<1%	15%
Fc IgM	N297							
tp	テイル	45%	1%	4%	3%	<1%	14%	22%
	ピース							
	N563							

10

## 【0352】

鎖間ジスルフィド結合の分析の結果は表 14 に示している。鎖内ジスルフィド結合についても同様の結果が得られた。データによれば、Fc 多量体中のシステイン残基の高い割合がジスルフィド結合されていることが実証された。相当量のスクランブルされたジスルフィド結合がある証拠はなく、予想されたジペプチドはすべてが還元前は高レベルで見出された。

20

## 【表 14】

表 14. 鎖間ジスルフィド結合

		DSB (%)	「遊離の」チオール (%)
IgG1	ヒンジ	97	3
Fc IgM	CH2	89	10
tp	L309C-L309C		
L309C	テイル	84	14
	ピース		
	C575-C575		
IgG1	ヒンジ	96	4
IgM tp	テイル	80	19
	ピース		
	C575-C575		

30

40

## 【0353】

## (例 13)

## Fc 多量体の C1q への結合

Fc 多量体の C1q への結合は、Abnova Corporation 製、カタログ番号 KA1274、ロット番号 V14-111723527 の C1q ELISA キット

50

を使用して、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）により測定した。F c 多量体構築物は500 μg / ml から4 μg / ml までずっと5倍希釈で滴定した。100 μl のそれぞれのF c 多量体構築物を適切なウェルに添加し、1時間攪拌して結合を可能にする。次に、製造業者のプロトコルに従ってアッセイを実施し、プレートリーダー上、吸光度450 nmで分析した。

#### 【0354】

任意のF c 多量体構築物のC1qへの結合を評価するため、その活性を測定し、IgG1及びIgG4野生型F c 多量体の活性と比較した。次に、突然変異体の活性を、IgG1及びIgG4野生型F c 多量体について得られたものとその濃度対効果曲線の目視比較に基づいて「IgG1様」、「高」、「中程度」、「低」、又は「IgG4様」としてまとめた。

10

#### 【0355】

結果は図14に示しており表15にまとめている。

#### 【0356】

結果によれば、野生型IgG1 F c 多量体は、IgG1に由来するCH2及びCH3ドメインを含むが、C1qに強力に結合することが実証された。これとは対照的に、野生型IgG4 F c 多量体は、IgG4に由来するCH2及びCH3ドメインを含むが、C1qへの結合は非常に弱い。F c 多量体中のC1q結合を規定する支配的残基は331位のプロリン（P331）であることが分かった。このプロリン残基をセリンで置換すると（P331S）、IgG1に由来するCH2ドメインを有するF c 多量体におけるC1q結合が効果的に減少した。逆突然変異、S331P、はIgG4に由来するCH2ドメインを有するF c 多量体におけるC1q結合を増加させた。

20

#### 【表15】

**表 15. Fc 多量体中の C1q への結合**

Fc 多量体	C1q 結合
IgG1 Fc IgM tp L309	「IgG1 様」の基準
IgG4 Fc IgM tp L309	「IgG4 様」の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	低
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	IgG4 様
ハイブリッド Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	中程度

30

40

#### 【0357】

（例14）

#### 血小板活性化

F c 多量体による血小板活性化はフローサイトメトリーにより分析した。2倍希釈のF c 多量体をRMP I 培養液中で調製しFACSチューブに移した。最終濃度は100 μg / ml から下がって3.12 μg / ml であった。チューブ当たり5 μl の新鮮な全血（

50

最小限 2 人のヒトドナーから) を添加した。血小板は抗 C D 4 2 b 標識 M a b を使用してゲートをかけ、活性化はマーカー C D 6 2 p、C D 6 3 及び P A C - 1 に対する M a b を用いて追跡した。( B e c t o n D i c k i n s o n、B D C D 4 2 b A P C カタログ番号 5 5 1 0 6 1、B D C D 6 2 p P E カタログ番号 5 5 0 5 6 1、B D C D 6 3 P E - C y - 7 カタログ番号 5 6 1 9 8 2、B D P A C - 1 F I T C カタログ番号 3 4 0 5 0 7)。細胞はフローサイトメトリーによる分析前に 5 0 0  $\mu$  l のパラホルムアルデヒド 1 % の添加により固定化した。

【 0 3 5 8 】

C D 6 2 p は試験した 3 つのマーカーのうち最も感受性が高いことが分かった。

【 0 3 5 9 】

任意の F c 多量体構築物による血小板活性化を評価するため、その活性を測定し、I g G 1 及び I g G 4 野生型 F c 多量体の活性と比較した。次に、突然変異体の活性を、I g G 1 及び I g G 4 野生型 F c 多量体について得られたものとその濃度対効果曲線の目視比較に基づいて「I g G 1 様」、「高」、「中程度」、「低」、又は「I g G 4 様」としてまとめた。

【 0 3 6 0 】

C D 6 2 p 発現の誘導についての結果は図 1 5 に示しており表 1 6 にまとめている。

【 0 3 6 1 】

結果によれば、野生型 I g G 1 F c 多量体は、I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含むが、著しいレベルの血小板活性化をもたらすことが実証された。

【 0 3 6 2 】

2 つの突然変異、L 2 3 4 F 及び A 3 2 7 G が I g G 1 F c 多量体からのサイトカイン放出を減少させるのに有用であることを例 8 で明らかにした。これら 2 つの突然変異のうち、L 2 3 4 F は、I g G 1 野生型 F c ドメインと比べて血小板活性化のレベルを大いに減少させ、A 3 2 7 G 突然変異を有する F c 多量体は著しいレベルの血小板活性化を保持している。したがって、L 2 3 4 F は極めて有用な突然変異であり、マクロファージ食作用の阻害における効力の消失はわずかなだけでサイトカイン放出及び血小板活性化を減少させる。

【 0 3 6 3 】

L 2 3 4 F に P 3 3 1 S ( 例 1 3 において有用な C 1 q 減少突然変異であることが明らかにされている ) を追加すると ( L 2 3 4 F P 3 3 1 S )、血小板活性化のレベルが低くなる。この二重突然変異体は、低サイトカイン、低血小板活性化及びゼロ C 1 q 結合を達成する手段である。したがって、この突然変異の組合せは特に有用であり、免疫不全の治療のための新しい療法を提供すると予想される。

【 0 3 6 4 】

L 2 3 4 F は A 3 2 7 G よりも優位である可能性がある。なぜならば、三重 L 2 3 4 F A 3 2 7 G P 3 3 1 S 突然変異体の血小板活性化は低いからである。

【 0 3 6 5 】

野生型 I g G 4 F c 多量体は、I g G 4 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含むが、血小板活性化は実質的にゼロである。

【 0 3 6 6 】

C H 3 ドメインを I g G 1 の C H 3 ドメインと交換してもこれらの減少したレベルの血小板活性化を保持する。

【 0 3 6 7 】

F 2 3 4 L 突然変異は血小板活性化のレベルは低く ( 効力を増強させた ) が、野生型 I g G 4 F c 多量体と比べると血小板活性化を増加させる。

【 0 3 6 8 】

F 2 9 6 Y は、血小板活性化をさらに増加させることなく、F 2 3 4 L と組み合わせることが可能である。この所見は、F 2 3 4 L F 2 9 6 Y が I g G 4 野生型 F c 多量体と比べると効力を増強させたので、重要である。したがって、この突然変異の組合せは特に

10

20

30

40

50

有用であり、免疫不全の治療のための新しい療法を提供すると予想される。

【 0 3 6 9 】

G 3 2 7 A 突然変異は血小板活性化を増加させない。この所見は、高レベルの血小板活性化を保持した I g G 1 F c 多量体中の逆突然変異 A 3 2 7 G の結果を考慮すると驚きである。

【 0 3 7 0 】

I g G 4 W T よりも効力も増強したある種の二重突然変異体 ( G 3 2 7 A S 3 3 0 A 、 G 3 2 7 A S 3 3 1 P 及び S 3 3 0 A S 3 3 1 P ) は血小板活性化のレベルが非常に低く ( I g G 4 様 ) 、免疫不全の治療のための新しい療法を提供すると予想される。

【 表 1 6 】

表 16. Fc 多量体による血小板活性化

Fc 多量体	CD62p
IgG1 Fc IgM tp L309	「IgG1 様」の基準
IgG4 Fc IgM tp L309	「IgG4 様」の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	低
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	IgG4 様
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G A330S P331S	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G P331S	IgG1 様
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F A327G P331S	中程度
ハイブリッド Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	低
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	低

【 0 3 7 1 】

( 例 1 5 )

F c 多量体変異体の操作

以前の例は、免疫不全の治療において使用するのに特に適している F c 多量体が作り出されたことを説明している。以下の特性を有する F c 多量体を生成する目的で F c 多量体を操作した。

抗体被覆標的細胞のマクロファージ食作用の阻害

F c 多量体の効力はある限り高いほうがよい。

サイトカイン放出

F c 多量体によるサイトカイン放出の刺激はある限り低いほうがよい。

C 1 q 結合

F c 多量体の C 1 q への結合はある限り低いほうがよい。

血小板活性化

F c 多量体による血小板活性化はある限り低いほうがよい。

【 0 3 7 2 】

10

20

30

40

50

しかし、以前の例の研究では、副作用の減少を達成するためには最大効力とわずかに低い効力の間で妥協する必要があることが説明された。

【 0 3 7 3 】

I g G 1 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含み、追加の突然変異が全くない野生型 I g G 1 F c 多量体は免疫不全の治療において使用するには適切さが低い可能性がある。なぜならば、野生型 I g G 1 F c 多量体は食作用阻害の高い効力を示すが、サイトカイン放出、C 1 q 結合及び血小板活性化によって測定した場合、高いレベルの望ましくない副作用も示すからである。

【 0 3 7 4 】

I g G 4 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含む野生型 I g G 4 F c 多量体が生じる望ましくない副作用のレベルは非常に低い、その効力は I g G 1 の効力に比べて低い。にもかかわらず、図 7 に示すように、それでも野生型 I g G 4 F c 多量体の効力は I V I G の効力に比べて有意に高い。

【 0 3 7 5 】

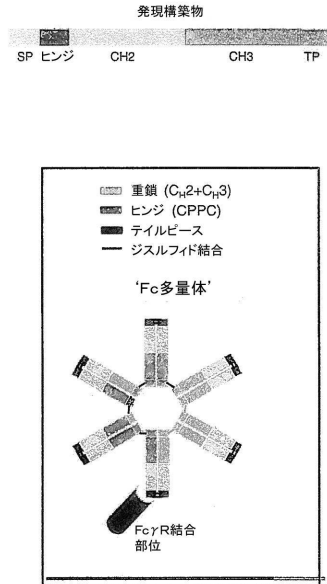
I g G 1 と I g G 4 野生型 F c 多量体の両方の望ましい特性を組み合わせ、望ましくない特性のない F c 多量体を設計した。下の表 1 7 に示すように、これらの F c 多量体は望ましくない副作用を許容可能なレベルにまで減少させつつ、効果的レベルの効力を示す。これらの F c 多量体は免疫不全の治療において使用するのに特に有用であると予想される。

【表 1 7 】

**表 17**

<u>Fc 多量体</u>	<u>食作用阻害</u>	<u>IFN<math>\gamma</math> 放出</u>	<u>C1q 結合</u>	<u>血小板 活性化</u>
野生型 IgG1 Fc 多量体	「IgG1 様」 の基準	「IgG1 様」 の基準	「IgG1 様」 の基準	「IgG1 様」 の基準
野生型 IgG4 Fc 多量体	「IgG4 様」 の基準	「IgG4 様」 の基準	「IgG4 様」 の基準	「IgG4 様」 の基準
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	高	中程度	IgG4 様	IgG4 様
ハイブリッド Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	中程度	IgG4 様	IgG4 様	低
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	中程度	IgG4 様	IgG4 様	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	中程度	IgG4 様	IgG4 様	中程度
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	中程度	IgG4 様	IgG4 様	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	中程度	IgG4 様	中程度	IgG4 様
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	中程度	IgG4 様	中程度	IgG4 様

## 【図 1】



## 【図 2 ( a ) - 1】

## 1. ヒト IgG1 Fc多量体 IgM tp 配列番号: 26

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

## 2. ヒト IgG4 Fc多量体 IgM tp 配列番号: 27

CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT  
VDKSRWQEGNVFSCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

## 3. ヒト IgG1 Fc多量体 IgA tp 配列番号: 28

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLVNVSVVMAEVDGTCY

## 4. ヒト IgG4 Fc多量体 IgA tp 配列番号: 29

CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT  
VDKSRWQEGNVFSCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLVNVSVVMAEVDGTCY

## 5. ヒト IgG1 Fc多量体 Cμ4-IgM tp 配列番号: 30

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKVALHHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATI  
TCLVTGFSADVFVQWQMGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETY  
TCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

## 【図 2 ( a ) - 2】

## 6. ヒト IgG4 Fc多量体 Cμ4-IgM tp 配列番号 31

CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT  
VDKSRWQEGNVFSCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKVALHHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATI  
TCLVTGFSADVFVQWQMGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETY  
TCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

## 7. ヒト IgG1 Fc多量体 IgM tp S267A 配列番号 32

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

## 【図 2 ( b )】

## IgG1 Fc IgM tp 配列番号: 33

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMS  
DAGTCY

## IgG4 Fc IgM tp 配列番号: 34

CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMS  
DAGTCY

## 【図 2 ( c ) - 1】

## IgG1 Fc IgM tp L234F 配列番号: 35

CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMS  
DAGTCY

## IgG1 Fc IgM tp L234F P331S 配列番号: 36

CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMS  
DAGTCY

## IgG4 Fc IgM tp P234L 配列番号: 37

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMS  
DAGTCY

## IgG4 Fc IgM tp P234L P296Y 配列番号: 38

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKPTLYNVSLVMS  
DAGTCY

## 【図 2 ( c ) - 2】

IgG4 Fc IgM tp G327A S330A 配列番号: 39

CPPCPAPEFL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPASIEKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

IgG4 Fc IgM tp G327A S331P 配列番号: 40

CPPCPAPEFL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPASP~~I~~EKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

IgG4 Fc IgM tp S330A S331P 配列番号: 41

CPPCPAPEFL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KGLPASP~~I~~EKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

## 【図 2 ( d )】

IgG1 CH2 IgG4 CH3 IgM tp 配列番号: 42

CPPCPAPELL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

IgG4 CH2 IgG1 CH3 IgM tp 配列番号: 43

CPPCPAPEFL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

## 【図 2 ( e ) - 1】

IgG4 CH2 / IgG1 CH3 ハイブリッド IgM tp F234L 配列番号: 44

CPPCPAPELL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

IgG4 CH2 / IgG1 CH3 ハイブリッド IgM tp G327A S331P 配列番号: 45

CPPCPAPEFL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPASP~~I~~EKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

IgG4 CH2 / IgG1 CH3 ハイブリッド IgM tp F234L F296Y 配列番号: 46

CPPCPAPELL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

## 【図 2 ( e ) - 2】

IgG4 CH2 / IgG1 CH3 ハイブリッド IgM tp G327A S330A 配列番号: 47

CPPCPAPEFL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEV  
H NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPASIEKT ISKAKGQ  
PRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDS  
DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GKPTLYNVSL VMS  
DTAGTCY

## 【図 2 ( f )】

(i)

atggaatgggtcctgggtcttctggttttccctttctgtcacaaacgggggtgcacagc

配列番号: 48

(ii)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS 配列番号: 49

## 【図 2 ( g ) - 1】

IgG1 Fc IgM tp L309 配列番号: 50

tgtccaccgtgtccagcaccctgaactcctgtgggggaccgtcagctcttccctctcccccaaa  
acccaaggacacccctcatgatctcccgaccctcgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga  
gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagtggaaggcgtggaggtgcataatgcc  
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgt  
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagaagtgaagggtctccaaagaagccctcc  
cagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac  
accctgtcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaa  
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagcgggagacaact  
acaagaccacgcctccgtgctggactccgacgcggtccttcttccctacagcaagctcacc  
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct  
gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaacgcacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

IgG4 Fc IgM tp L309 配列番号: 51

tgtccacccttgtccagctcctgagtttcttggcggtccttctgtgttccctctccctccaaa  
gcctaaggacacccctgatgatctccagaacaccagaagtgaacctgcgtggttagtgatgta  
gccaggaagacccctgaggtccagttcaactggtagtggaaggcgttgaggtccataaacgcc  
aaaaccaagccacgagaggagcagttcaactcaacctaccgtgtggtgtctgtgctcactgt  
cctgcatcaggatgtgctgaacggcgaaggagtagaagtgaagggtcagcaacaaggagcagtc  
caagctccatcgagaagaccattagcaaaagccaagggtcagcctagggaaaccacaggtgtat  
acattgctccctcacaggaggagatgaccaagaaccaggtcagttcgacatgcctgggtgaa  
agggttctatccctccgatatcgacgtcgaatgggaagcaatggccagcctgagaacaact  
acaaaaccactccaccgtccttgatagcgatggcagtttcttccctgtacagccgtctgact  
gtggataagtctcgatggcaggagggttaacgtattcagctgcagcgtcatgcatgaagcctt  
gcacaaccactacacccagaatacctgtctctgtcactcgggaagccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

## 【図 2 ( g ) - 3】

IgG4 Fc IgM tp L309 F234L 配列番号: 54

tgtccacccttgtccagctcctgagttacttggcggtccttctgtgttccctctccctccaaa  
gcctaaggacacccctgatgatctccagaacaccagaagtgaacctgcgtggttagtgatgta  
gccaggaagacccctgaggtccagttcaactggtagtggaaggcgttgaggtccataaacgcc  
aaaaccaagccacgagaggagcagttcaactcaacctaccgtgtggtgtctgtgctcactgt  
cctgcatcaggatgtgctgaacggcgaaggagtagaagtgaagggtcagcaacaagggactgc  
caagctccatcgagaagaccattagcaaaagccaagggtcagcctagggaaaccacaggtgtat  
acattgctccctcacaggaggagatgaccaagaaccaggtcagttcgacatgcctgggtgaa  
agggttctatccctccgatatcgacgtcgaatgggaagcaatggccagcctgagaacaact  
acaaaaccactccaccgtccttgatagcgatggcagtttcttccctgtacagccgtctgact  
gtggataagtctcgatggcaggagggttaacgtattcagctgcagcgtcatgcatgaagcctt  
gcacaaccactacacccagaatacctgtctctgtcactcgggaagccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y 配列番号: 55

tgtccacccttgtccagctcctgagttacttggcggtccttctgtgttccctctccctccaaa  
gcctaaggacacccctgatgatctccagaacaccagaagtgaacctgcgtggttagtgatgta  
gccaggaagacccctgaggtccagttcaactggtagtggaaggcgttgaggtccataaacgcc  
aaaaccaagccacgagaggagcagttcaactcaacctaccgtgtggtgtctgtgctcactgt  
cctgcatcaggatgtgctgaacggcgaaggagtagaagtgaagggtcagcaacaagggactgc  
caagctccatcgagaagaccattagcaaaagccaagggtcagcctagggaaaccacaggtgtat  
acattgctccctcacaggaggagatgaccaagaaccaggtcagttcgacatgcctgggtgaa  
agggttctatccctccgatatcgacgtcgaatgggaagcaatggccagcctgagaacaact  
acaaaaccactccaccgtccttgatagcgatggcagtttcttccctgtacagccgtctgact  
gtggataagtctcgatggcaggagggttaacgtattcagctgcagcgtcatgcatgaagcctt  
gcacaaccactacacccagaatacctgtctctgtcactcgggaagccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

## 【図 2 ( g ) - 2】

IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S 配列番号: 52

tgtccaccgtgtccagcaccctgaatctctgtgggggaccgtcagctcttccctctcccccaaa  
acccaaggacacccctcatgatctcccgaccctcgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga  
gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagtggaaggcgttgaggtgcataatgcc  
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgt  
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagaagtgaagggtctccaaagaagccctcc  
cagccagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac  
accctgtcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaa  
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagcgggagacaact  
acaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctcatagcaagctcacc  
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct  
gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaacgcacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

ハイブリッド IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 配列番号: 53

tgtccaccgtgtccagcaccctgagttctgtgggggaccatcagttcttccgttcccccaaa  
acccaaggacacccctcatgatctcccgaccctcgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtga  
gccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtagtggtggcgtggaggtgcataatgcc  
aagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgt  
cctgcaccaggactggctgaacggcgaaggagtagaagtgaagggtctccaaagaagcctcc  
cgctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac  
accctgtcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaa  
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagcgggagacaact  
acaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctcatagcaagctcacc  
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct  
gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaacgcacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

## 【図 2 ( g ) - 4】

IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A 配列番号: 56

tgtccacccttgtccagctcctgagtttcttggcggtccttctgtgttccctctccctccaaa  
gcctaaggacacccctgatgatctccagaacaccagaagtgaacctgcgtggttagtgatgta  
gccaggaagacccctgaggtccagttcaactggtagtggaaggcgttgaggtccataaacgcc  
aaaaccaagccacgagaggagcagttcaactcaacctaccgtgtggtgtctgtgctcactgt  
cctgcatcaggatgtgctgaacggcgaaggagtagaagtgaagggtcagcaacaagggactgc  
cagcctccatcgagaagaccattagcaaaagccaagggtcagcctagggaaaccaaggtgtat  
acattgctccctcacaggaggagatgaccaagaaccaggtcagttcgacatgcctgggtgaa  
agggttctatccctccgatatcgacgtcgaatgggaagcaatggccagcctgagaacaact  
acaaaaccactccaccgtccttgatagcgatggcagtttcttccctgtacagccgtctgact  
gtggataagtctcgatggcaggagggttaacgtattcagctgcagcgtcatgcatgaagcctt  
gcacaaccactacacccagaatacctgtctctgtcactcgggaagccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat

IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P 配列番号: 57

tgtccacccttgtccagctcctgagtttcttggcggtccttctgtgttccctctccctccaaa  
gcctaaggacacccctgatgatctccagaacaccagaagtgaacctgcgtggttagtgatgta  
gccaggaagacccctgaggtccagttcaactggtagtggaaggcgttgaggtccataaacgcc  
aaaaccaagccacgagaggagcagttcaactcaacctaccgtgtggtgtctgtgctcactgt  
cctgcatcaggatgtgctgaacggcgaaggagtagaagtgaagggtcagcaacaagggactgc  
caagccccatcgagaagaccattagcaaaagccaagggtcagcctagggaaaccacaggtgtat  
acattgctccctcacaggaggagatgaccaagaaccaggtcagttcgacatgcctgggtgaa  
agggttctatccctccgatatcgacgtcgaatgggaagcaatggccagcctgagaacaact  
acaaaaccactccaccgtccttgatagcgatggcagtttcttccctgtacagccgtctgact  
gtggataagtctcgatggcaggagggttaacgtattcagctgcagcgtcatgcatgaagcctt  
gcacaaccactacacccagaatacctgtctctgtcactcgggaagccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggacacctgctat



## 【図 2 ( g ) - 5】

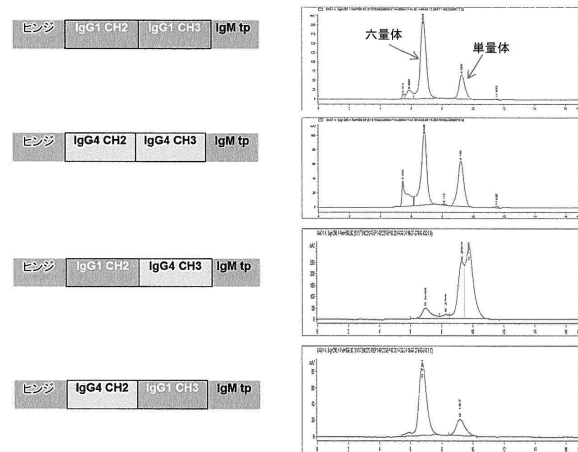
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P 配列番号: 58

tgtccacctgtccagctcctgagtttcttggcggctccttctgtgttcccttccctccaaa  
gcctaaggacacctgatgatctccagaacaccagaagtacctgcgtggtgagtggtta  
gccaggaagacctgaggtccagcttcaactggtatgtggacggcgttgaggtccataacgcc  
aaaaccaagccacgagaggagcagttcaactcaacctaccgtgtggtgtctgtgctcactgt  
cctgcacaggtatggctgaacggcaaggagtagcaagtgaagggtcagcaacaaggagctgc  
cagcccccatcgagaagaccattagcaaaagccaagggtcagcctagggaaccacaggtgtat  
acattgcctccctcacaggaggagatgaccaagaaccaggtcagctcgacatgcctggtgaa  
agggttctatccctccgatatcgagtcgaatgggaaagcaatggccagcctgagaacaact  
acaaaaccactccaccgtccttcatagcgatggcagttctctcctgtacagccgtctgact  
gtggataagtctcgatggcaggagggttaacgtatcagctgcagcgtcatgcataagcctt  
gcacaaccactacaccagaaatccctgtctctgtcactcggaagccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggcacctgctat

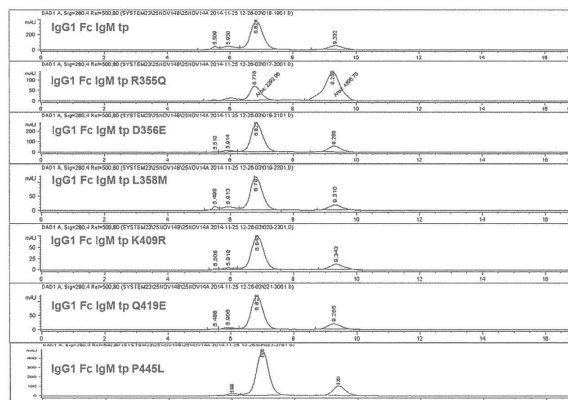
IgG4 CH2-IgG1 CH3 IgM tp L309 F234L F296Y 配列番号: 59

tgccaccgtgccagcacctgagtactggggggaccatcagttcttctgttcccccaaa  
acccaaggacactctcatgatctccggaccctcagggtcacgtgcgtggtggtgagctga  
gccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgcc  
aagacaaagccgcgggaggagcagtagataacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct  
cctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtagcaagtgaagggtctccaacaaggcctcc  
cgtcctccatcgagaaaacatctccaaagccaaggcagccccgagaaccacaggtgtac  
accctgcccccatccgggagtagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaa  
aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaact  
acaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcac  
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagcgtcttctcatgctcctgtagcatgaggctct  
gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaccgacccctgtataacg  
tgagcctggtgatgagcgataccgcgggcacctgctat

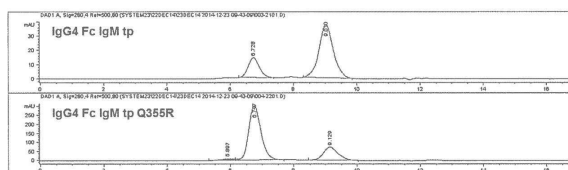
## 【図 3 ( a )】



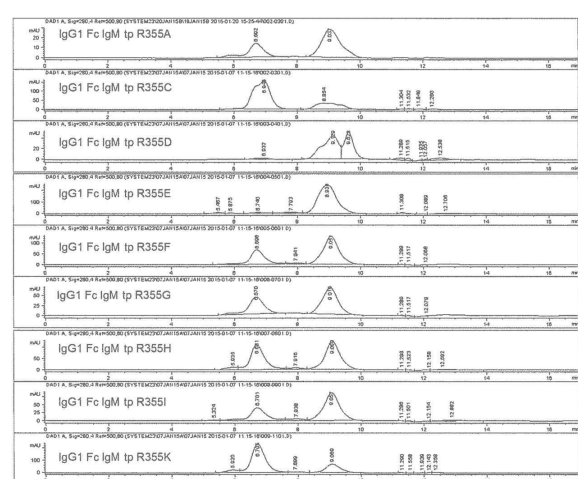
## 【図 3 ( b )】



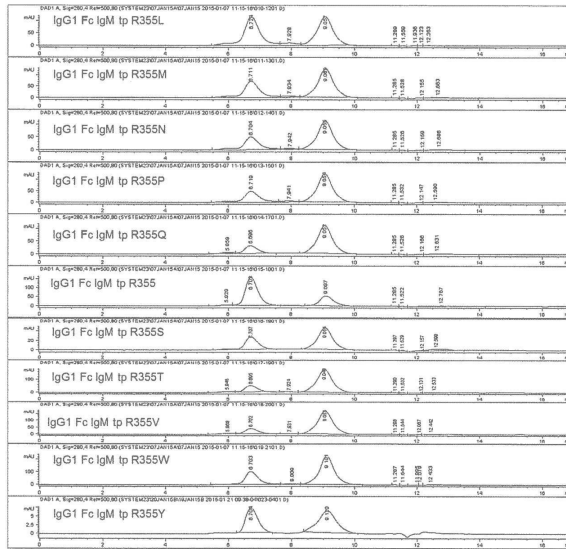
## 【図 3 ( c )】



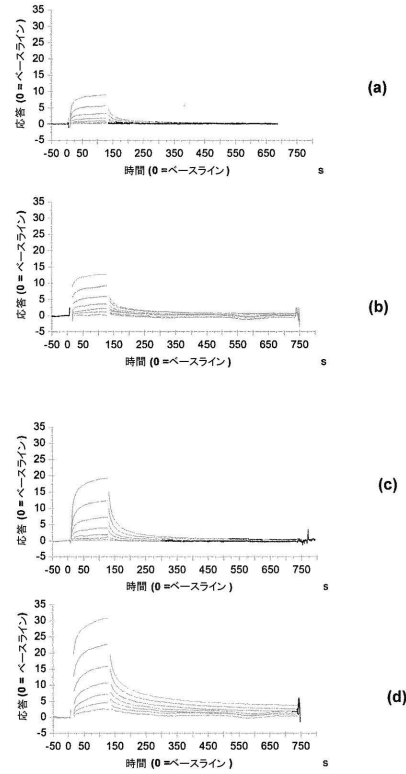
## 【図 3 ( d ) - 1】



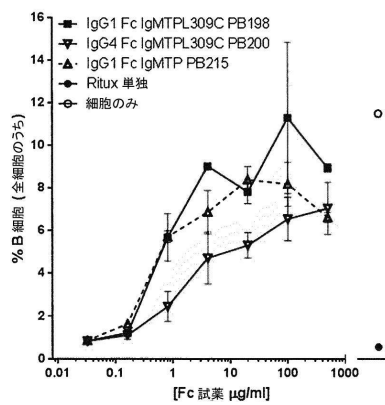
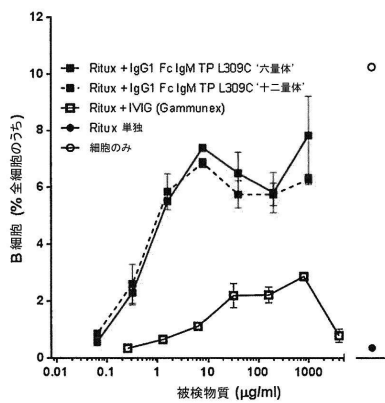
【図 3 (d) - 2】



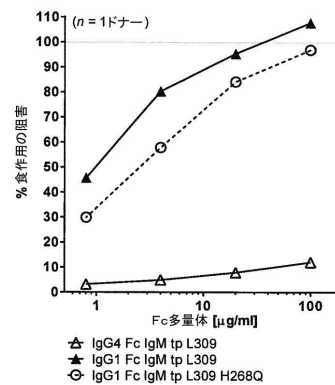
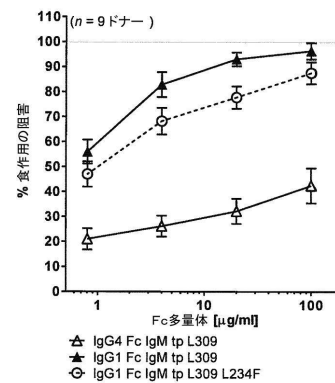
【図 4】



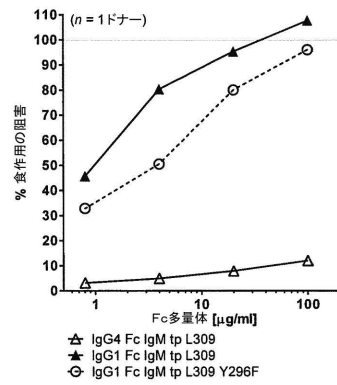
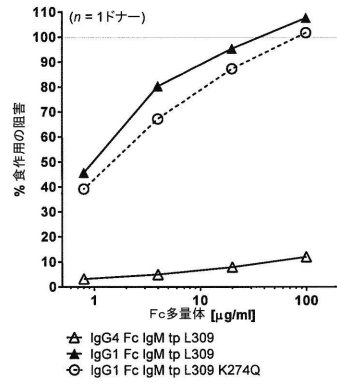
【図 5】



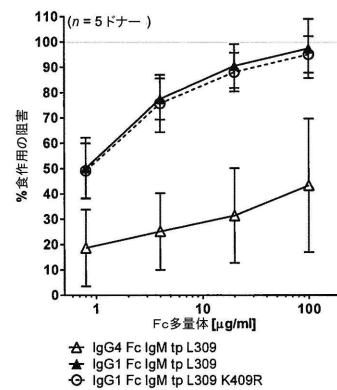
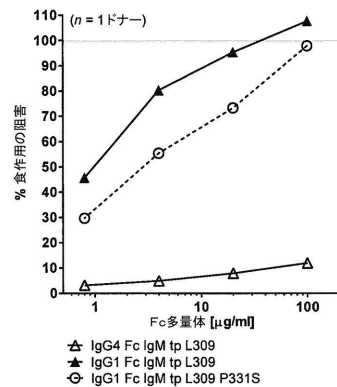
【図 6 - 1】



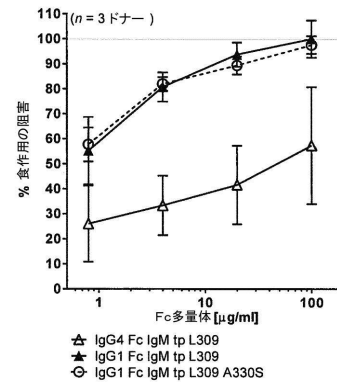
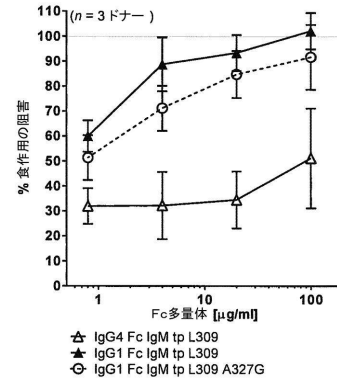
【図 6 - 2】



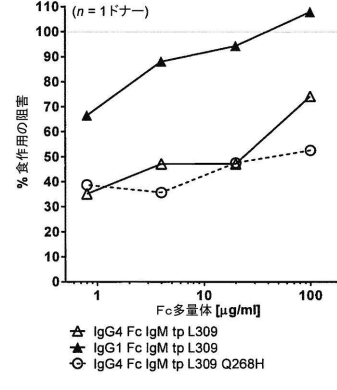
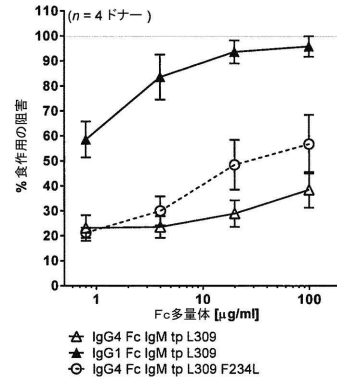
【図 6 - 4】



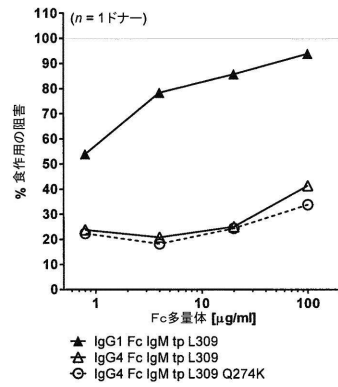
【図 6 - 3】



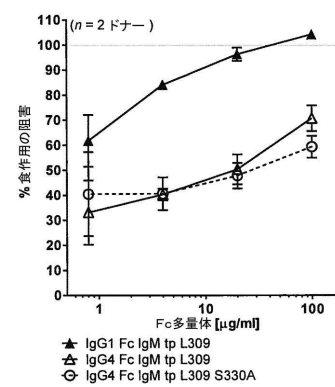
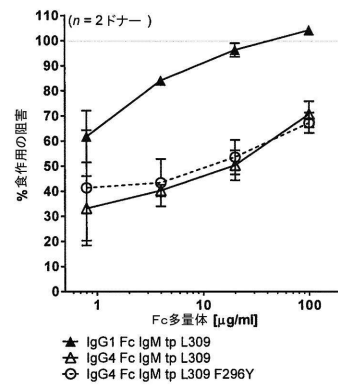
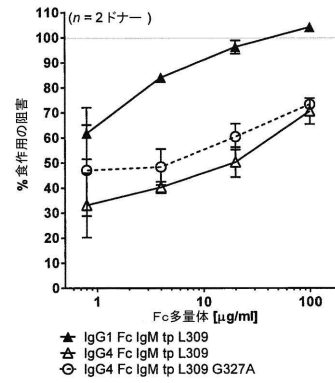
【図 6 - 5】



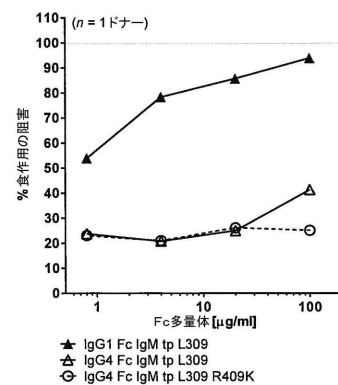
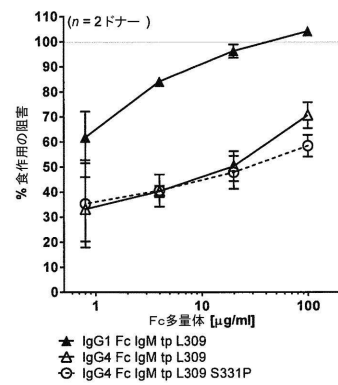
【図 6 - 6】



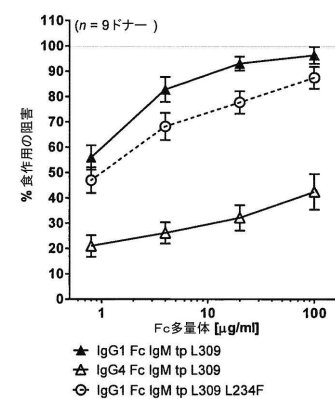
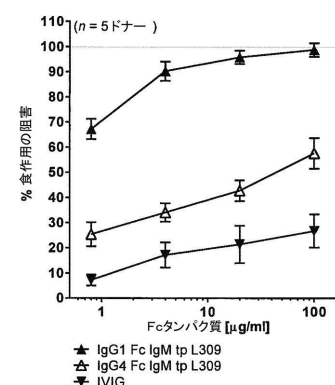
【図 6 - 7】



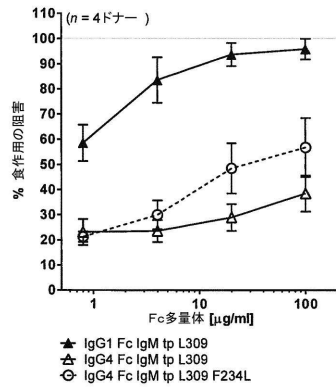
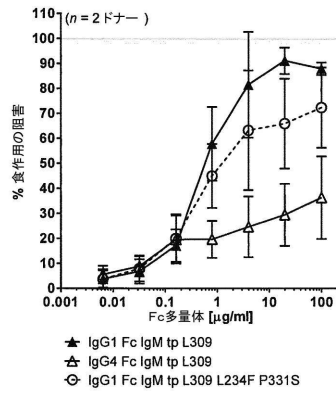
【図 6 - 8】



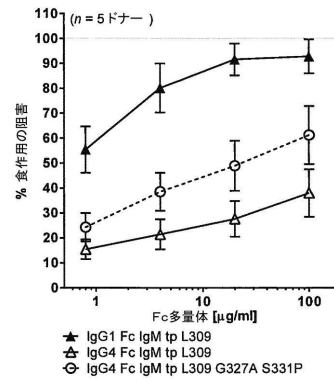
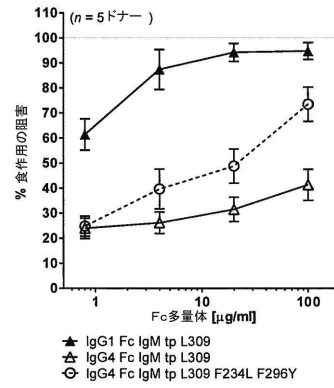
【図 7 - 1】



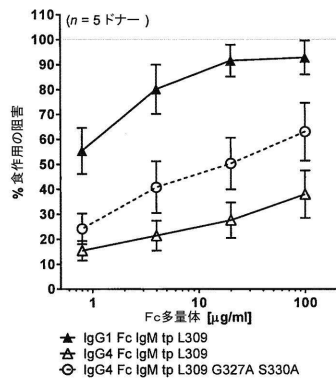
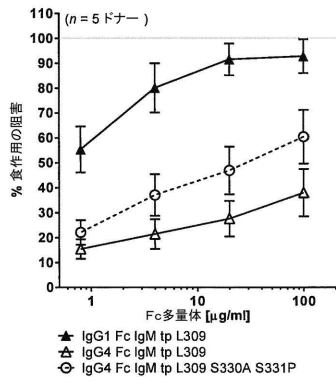
【図 7 - 2】



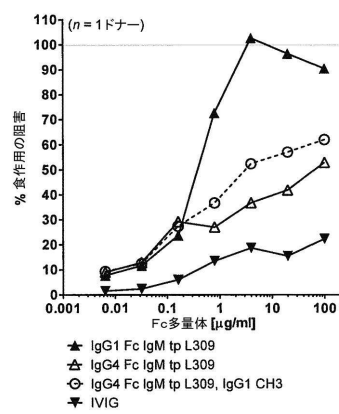
【図 7 - 3】



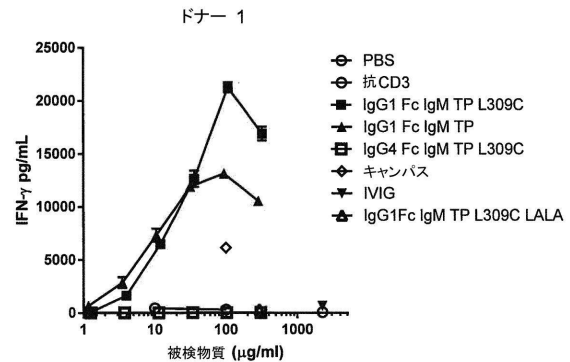
【図 7 - 4】



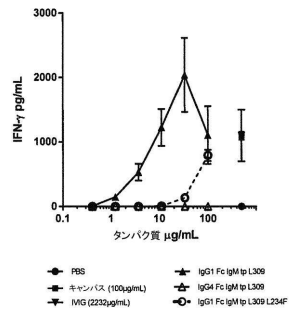
【図 7 - 5】



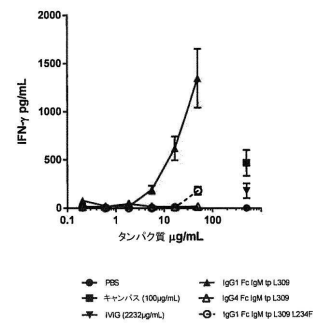
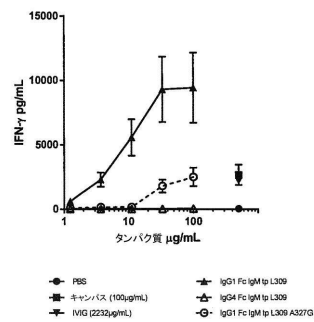
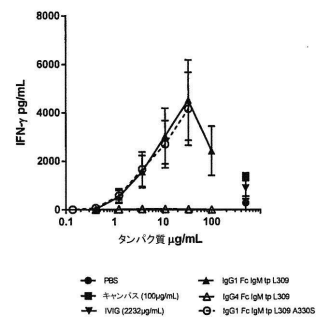
【図 8】



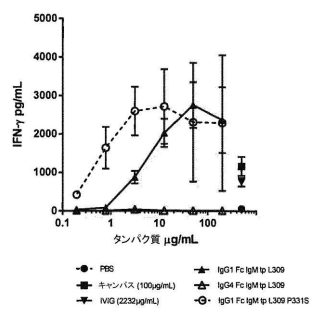
【図 9 - 1】



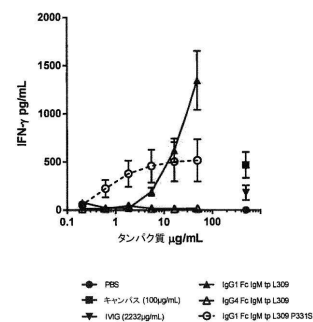
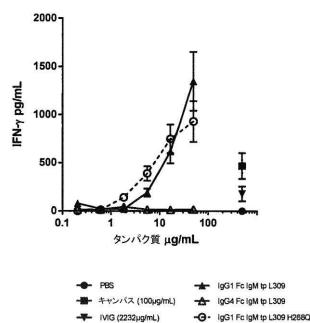
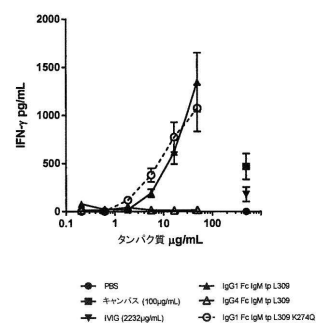
【図 9 - 2】



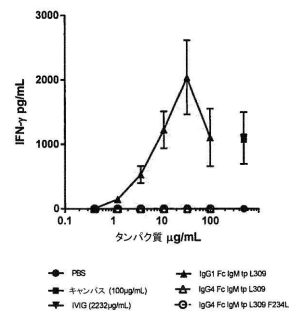
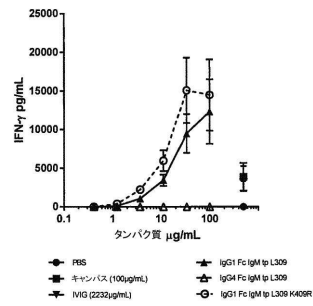
【図 9 - 3】



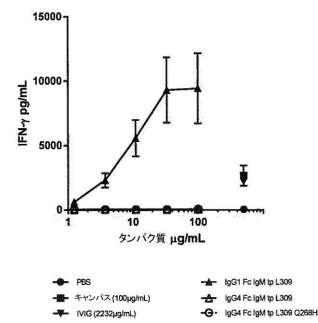
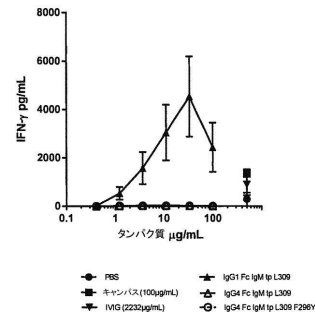
【図 9 - 4】



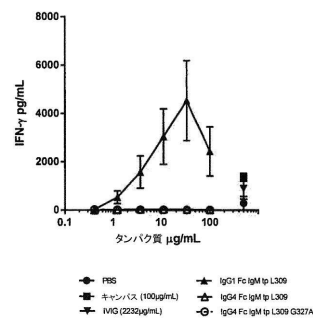
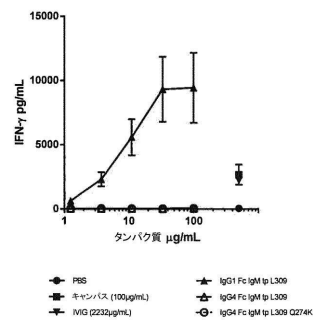
【図 9 - 5】



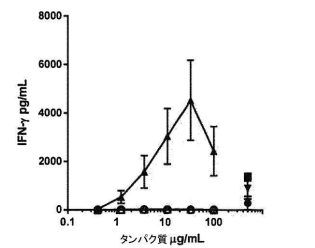
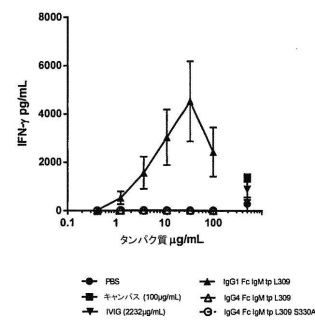
【図 9 - 6】



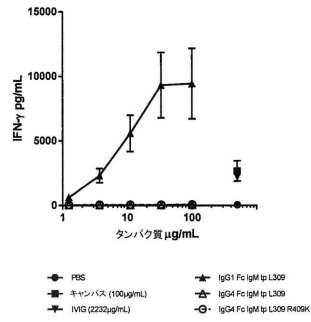
【図 9 - 7】



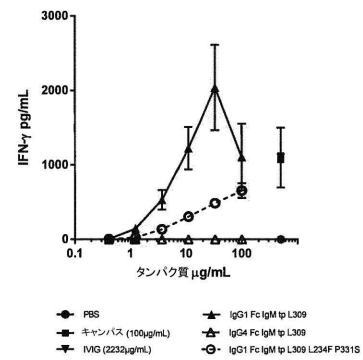
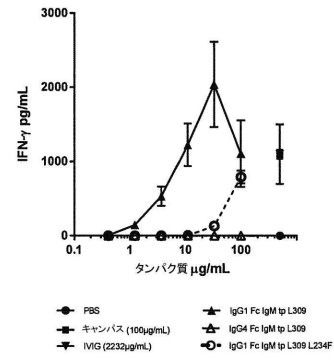
【図 9 - 8】



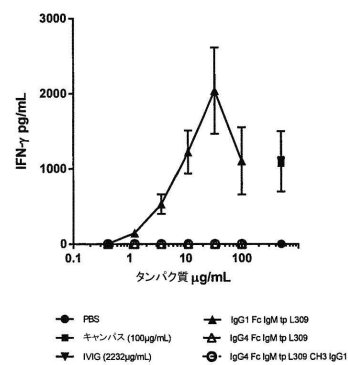
【図 9 - 9】



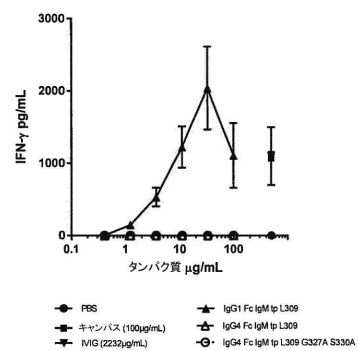
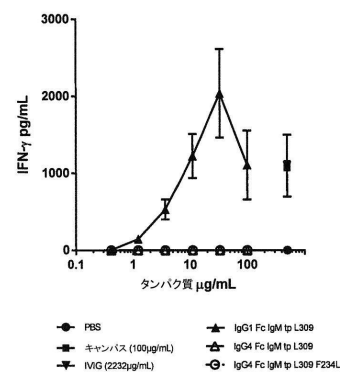
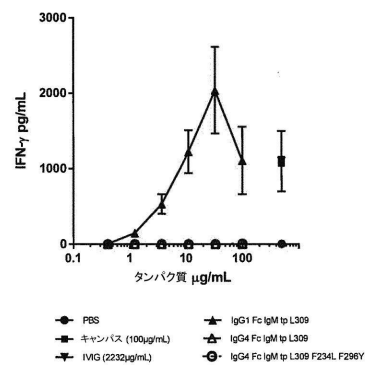
【図 10 - 1】



【図 10 - 2】

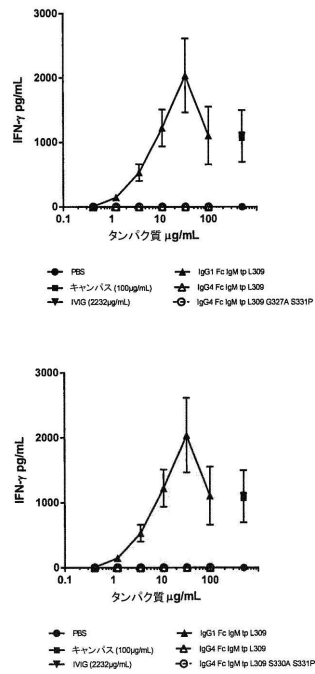


【図 10 - 3】

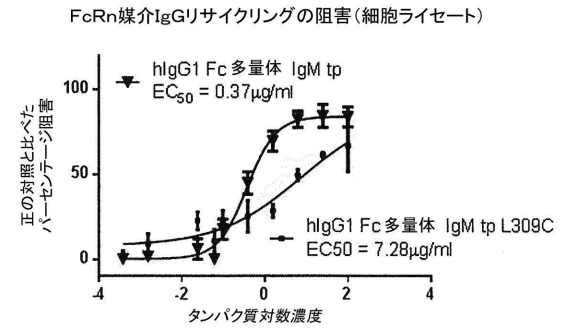




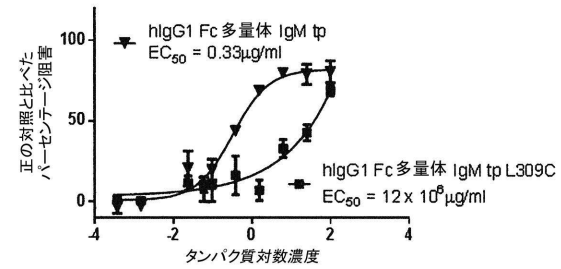
【図 1 0 - 4】



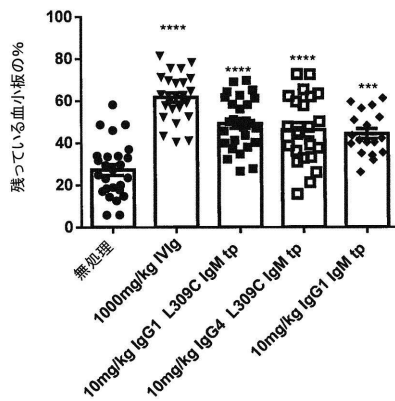
【図 1 1】



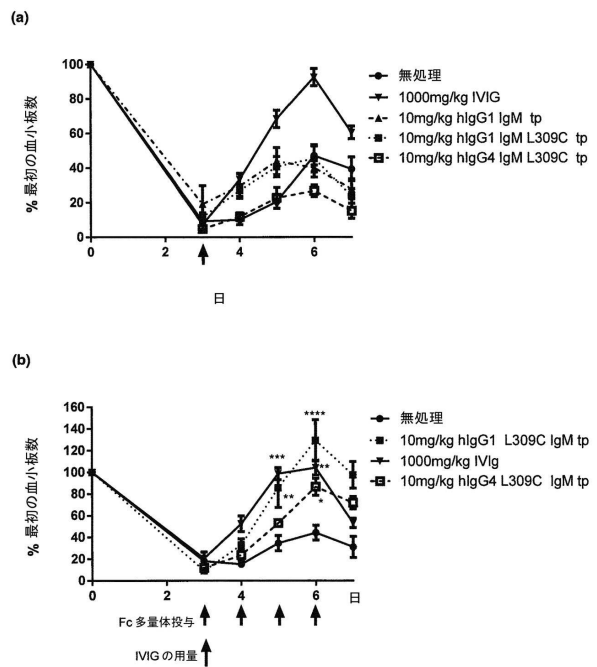
FcRn媒介IgGリサイクリングの阻害(培養培地)



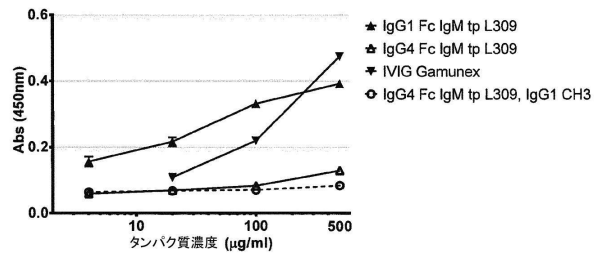
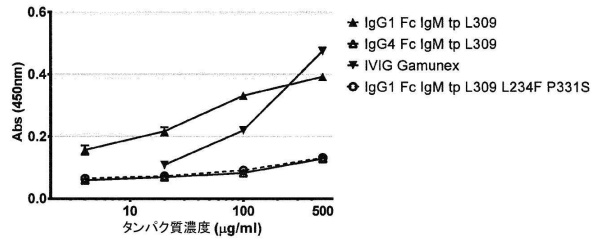
【図 1 2】



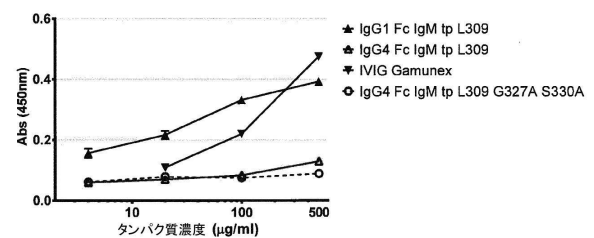
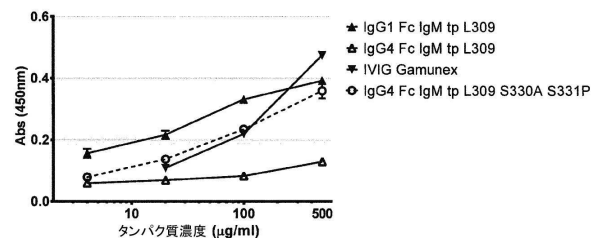
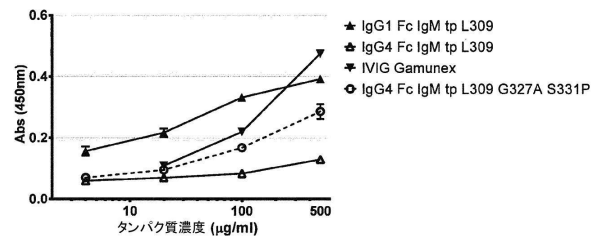
【図 1 3】



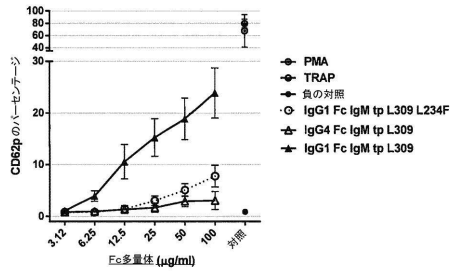
【 図 1 4 - 2 】



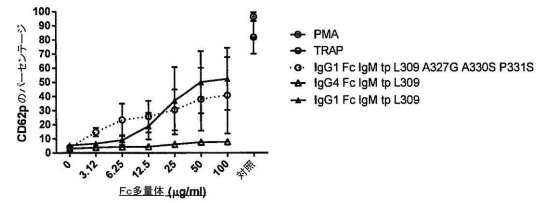
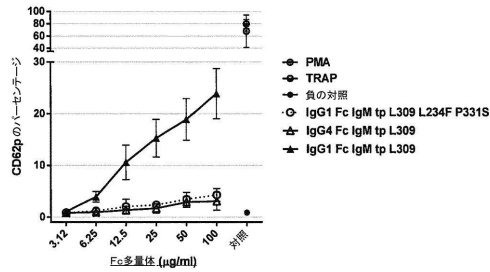
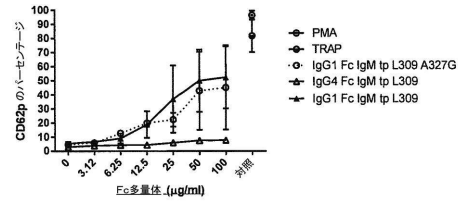
【 図 1 4 - 4 】



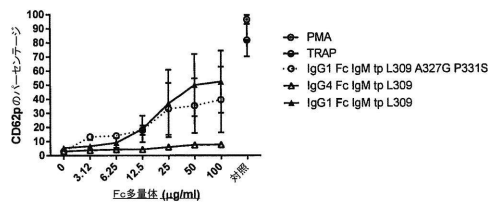
【図 15 - 1】



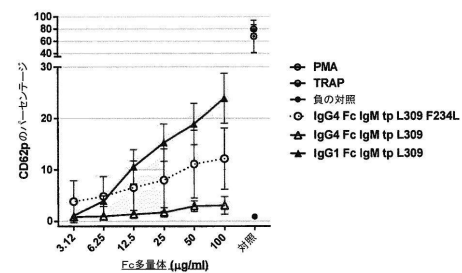
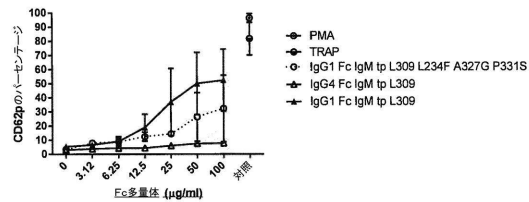
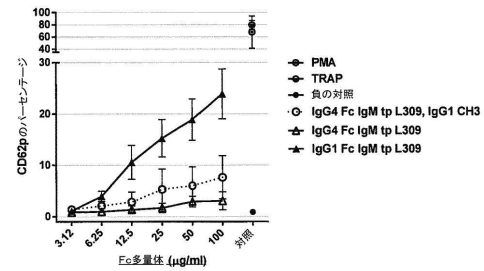
【図 15 - 2】



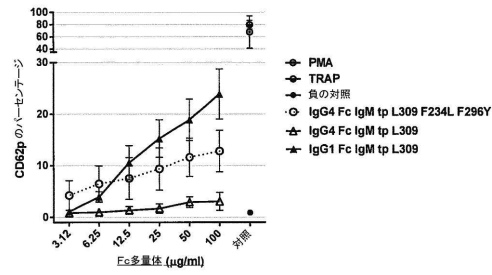
【図 15 - 3】



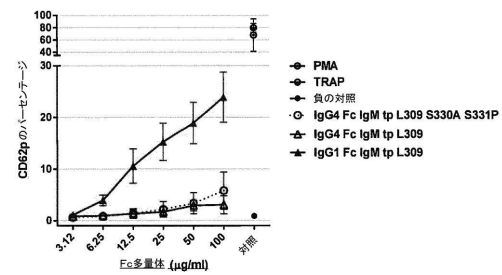
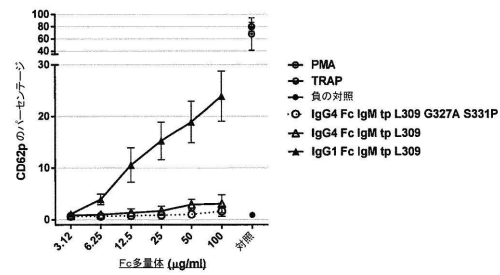
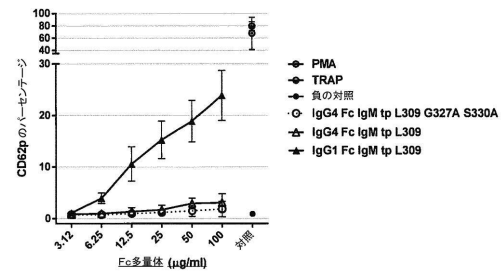
【図 15 - 4】



【図 15 - 5】



【図 15 - 6】



【配列表】

0006851200000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	

(31)優先権主張番号 1405952.1

(32)優先日 平成26年4月2日(2014.4.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1412646.0

(32)優先日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(72)発明者 ハンフリーズ、デイヴィッド ポール

イギリス国、パークシャー、スラウ、パス ロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディ  
ー 気付

(72)発明者 ピーターズ、シャーリー ジェイン

イギリス国、パークシャー、スラウ、パス ロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディ  
ー 気付

(72)発明者 スミス、ブライアン ジョン

イギリス国、パークシャー、スラウ、パス ロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディ  
ー 気付

(72)発明者 スティーブンス、ポール エドワード

イギリス国、パークシャー、スラウ、パス ロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディ  
ー 気付

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第2014/022592(WO, A1)

特表2011-513465(JP, A)

国際公開第2010/085682(WO, A1)

Scientific Reports (2011), Vol.1, No.124, p.1-11

Nature Biotechnology(2007), Vol.25, No.12, p.1369-1372

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00~19/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq