

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6744855号
(P6744855)

(45) 発行日 令和2年8月19日(2020.8.19)

(24) 登録日 令和2年8月4日(2020.8.4)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 Z N A J
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18
BO 1 J 20/281 (2006.01)	BO 1 J 20/281 R
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5
BO 1 D 15/16 (2006.01)	BO 1 D 15/16

請求項の数 6 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2017-500408 (P2017-500408)	(73) 特許権者	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) (22) 出願日	平成27年3月17日(2015.3.17)		
(65) 公表番号	特表2017-517745 (P2017-517745A)		
(43) 公表日	平成29年6月29日(2017.6.29)		
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/055482		
(87) 國際公開番号	W02015/140126		
(87) 國際公開日	平成27年9月24日(2015.9.24)		
審査請求日	平成30年3月2日(2018.3.2)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(31) 優先権主張番号	14161103.8	(72) 発明者	エムリッヒ, トーマス ドイツ国、82393 イッフェルドルフ
(32) 優先日	平成26年3月21日(2014.3.21)		、ヴァルトシュトラーセ 21
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)	(72) 発明者	ケッテンベルガー, フーベルト ドイツ国、81369 ミュンヘン、パッ
(31) 優先権主張番号	14165987.0		サウアー・シュトラーセ 30
(32) 優先日	平成26年4月25日(2014.4.25)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体の in vivo での半減期の in vitro での予測

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記工程 :

- a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n アフィニティークロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定すること、
 b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n アフィニティークロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定することを含み、

これにより、参照抗体に対して長い in vivo での半減期を有する抗体を選択する場合には、i) 工程 a) で決定された参照抗体の保持時間より少なくとも 5 % 長い工程 a) で決定された保持時間、及び、i ii) 工程 b) で決定された保持時間の 5 % 以内である工程 a) で決定された保持時間を有する抗体が選択され、

また、これにより、参照抗体に対して短い in vivo での半減期を有する抗体を選択する場合には、i) 工程 a) で決定された参照抗体の保持時間より少なくとも 5 % 短い工程 a) で決定された保持時間、及び、i ii) 工程 b) で決定された保持時間の 5 % 以内である工程 a) で決定された保持時間を有する抗体が選択され、

正の線形 pH 勾配が、pH 5.5 ~ pH 8.8 であり、

塩が、塩化ナトリウムであり、

第1の塩濃度が、50 mM ~ 200 mM であり、

第2の塩濃度が、300 mM ~ 600 mM であり、

10

20

抗体が、クラス I g G の抗体である。
参照抗体に対して長い又は短い in vivo での半減期を有する抗体を選択するための
方法。

【請求項 2】

この方法は、IgG1、IgG3、又はIgG4サブクラスの抗体と比較して相対的に長い in vivo での半減期を有する抗体を選択するためのものであり、

参照抗体の第1の保持時間より少なくとも5%長い第1の保持時間有し、第2の保持時間の5%以内である第1の保持時間有する抗体を選択することによる、
請求項1記載の方法。

【請求項 3】

更に、突然変異N434Aを有するIgG Fc領域の保持時間を決定し、

a) 参照抗体の第1の保持時間より少なくとも5%長い第1の保持時間有し、互いに5%以内の第1の保持時間と第2の保持時間有し、突然変異N434Aを有するFc領域の保持時間より少なくとも5%短い第1の保持時間有する抗体を選択することにより、相対的に長い in vivo での半減期を有する抗体を選択すること、又は

b) 参照抗体の第1の保持時間より少なくとも5%短い第1の保持時間有し、互いに5%以内の第1の保持時間と第2の保持時間有する抗体を選択することにより、相対的に短い in vivo での半減期を有する抗体を選択することによる、
請求項1記載の方法。

【請求項 4】

第1の塩濃度が、140mMである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

第2の塩濃度が、400mMである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

保持時間が少なくとも5%異なる場合、保持時間が、塩濃度の平方根上の1に比例する($\sim 1 / \sqrt{c(salt)}$)、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リコンビナント抗体技術の分野、特に、テーラーメイド抗体の分野におけるものである。本明細書には、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムで決定された保持時間に基づいて、抗体の in vivo での半減期を予測する方法が報告されている。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

クラスGのヒト免疫グロブリン(IgG)は、ターゲット抗原に対する特異性を伝達する2つの抗原結合(Fab)領域と、Fcレセプターとの相互作用を担う定常領域(Fc領域)とを含有する([1、2])。ヒトIgGのサブクラス1、2、及び4は、21日の平均血清半減期を有する。この半減期は、他のどの公知の血清タンパク質の半減期よりも長い([3])。この長い半減期は、Fc領域と新生児Fcレセプター(FcRn)との間の相互作用により、主に媒介される([4、5])。これは、IgG又はFc含有融合タンパク質が幅広いクラスの治療薬として使用される理由の1つである。

【0003】

新生児FcレセプターFcRnは、IgG及びアルブミン両方のホメオスタシス胎盤を通過する母方のIgG輸送、及び、抗原-IgG免疫複合体食作用において、関与する膜結合レセプターである([6、9])。ヒトFcRnは、グリコシル化クラスI主要組織適合複合体様タンパク質(-FcRn)及び₂ミクログロブリン(₂m)サブユニットからなるヘテロ二量体である([10])。FcRnは、Fc領域のC_H2-C_H3領域中の部位に結合し([11～14])、2つのFcRn分子は、Fc領域に同時に結合することができる([15、16])。FcRnとFc領域との間の親和性は、pH依

10

20

30

40

50

存性である。このpH依存性は、エンドソームのpH5～6において、ナノモル濃度の親和性を示し、生理学的pHである7.4ではほとんど結合性を示さない([13、17、18])。IgGに長い半減期を伝達する基礎となるメカニズムは、3つの根本的な工程により説明することができる。まず、IgGは、種々の細胞種による非特異的飲作用に供される([19、20])。第二に、IgGは、pH5～6の酸性エンドソームにおいて、FcRnと遭遇し、結合することにより、IgGをリソソーム分解から保護する([11、21])。最後に、IgGは、7.4の生理学的pHにおいて、細胞外空間に放出される[4]。この厳密なpH依存性の結合・放出メカニズムは、IgGリサイクリングに重要であり、異なるpH値における結合特性の任意の偏りは、IgGの循環半減期に強く影響を及ぼす場合がある([22])。

10

【0004】

また、Fab領域は、Fc領域とFcRnとの特異的相互作用に加えて、FcRn結合性に寄与することが示唆されている([23～25])。例えば、中性pHでのFab媒介性残存結合性は、一連の治療抗体の薬物動態特性と関連しており、この関連は、pH7.3においてFcRnに過剰な結合性を有するIgGには、短い終末相半減期の問題があることを示している([24])。近年、Schlothauer et al.([25])は、FcRnとIgGとの間を解離させるための生理学的条件を厳密に模倣した、新規なpH勾配FcRn親和性クロマトグラフィー法を記載している。更に、彼らは、同一のFc領域を有するIgGが、FcRnからのその解離において異なることを示し、このため、FcRn結合におけるFab領域の影響を示した。

20

【0005】

しかしながら、Fab領域がどのようにFcRn結合に影響を及ぼすのかという基礎をなすメカニズムは、未だに解明されていない。

【0006】

モノクローナル抗体の機能性を決定するための分析用FcRn親和性クロマトグラフィーが、Schlothauer, T., et al.([25])に報告されている。Wang, W., et al.([24])は、同一のFc配列を有するモノクローナル抗体が、薬物動態事象を伴って、FcRnに異なって結合し得ることを報告している。ヒトIgG1のFcドメインを含有する治療タンパク質の血清半減期のレギュレーションにおける新生児FcRnの重要性は、Suzuki, T., et al.([23])に報告されている。Igawa, T., et al.([37])は、可変領域を操作することにより、IgG抗体の除去が低下することを報告している。免疫グロブリンGのFc領域を操作して、in vivoでの抗体レベルをモデュレーションすることが、Vaccaro, C., et al.([22])に報告されている。Prabhat, P., et al.([40])は、多焦点平面顕鏡法を使用することによる、FcレセプターであるFcRnのエキソサイトシスをもたらす細胞内リサイクリング経路の解明を報告している。モノクローナル抗体についての薬物動態、薬力学、及び免疫原性適合性評価戦略が、Putnam, W.S., et al.に報告されている([36])。Boswell, C.A., et al.([38])は、抗体組織分布及び薬物動態における電荷作用を報告している。ビオチンでの化学修飾後の放射性ヨウ化キメラTNT-1、-2、及び-3モノクローナル抗体の薬物動態特性及び生体分布が、Khawli, L.A., et al.に報告されている([35])。

30

【0007】

国際公開公報第2013/120929号には、Fcレセプターベースの親和性クロマトグラフィーが報告されている。米国特許出願公開公報第2011/0111406号には、複数回抗原に抗原結合分子を結合させる方法が報告されている。米国特許出願公開公報第2014/0013456号には、ヒスチジン操作軽鎖抗体及びこれを生成するための遺伝子操作された非ヒト動物が報告されている。

40

【0008】

近年、FcRn相互作用におけるFab領域の影響が議論されている([23、24、25])。

【0009】

50

しかしながら、同じ Fc 領域を有する抗体は、単純に、同様の PK プロファイルを有するわけではない。FcRn 結合に対する Fab 領域の更なる寄与が報告されているが、基礎となすメカニズムは、不明なままである（[47]、[24]、[25]）。

【0010】

Fc 領域と FcRn との特異的相互作用に加えて、Fab 領域も、FcRn - IgG 相互作用に寄与することが示唆されている（[37]、[24]、[25]）。

【0011】

後に公開された Li, B., et al.（[48]）は、フレームワークの選択が、分子電荷の差異により、ヒト化治療抗体の薬物動態に影響を及ぼす場合があることを報告している。

【0012】

Sampei, Z., et al.（[49]）は、因子 VVIIA 補助因子活性の機能を模倣する、非対称二重特異性 IgG 抗体の特定及び多次元最適化を報告している。

10

【0013】

Wang et al.（[24]）は、異なるターゲット特異性及び Fab 領域を有するが、同一の Fc 配列を有する IgG が、異なる FcRn 親和性を有する場合があることを報告している。生理学的 pH 近くでの Fab 媒介性残存結合性は、一連の治療抗体の薬物動態特性と関連しており、この関連は、pH 7.3 において FcRn に過剰な結合性を有する IgG には、短い終末相半減期の問題があることを示している。

【0014】

近年、Schlothauer et al.（[25]）は、FcRn と IgG との間を解離させるための生理学的条件を厳密に模倣した、新規な pH 勾配 FcRn 親和性クロマトグラフィー法を記載している。更に、彼らは、同一の Fc 領域を有する IgG が、in vitro における FcRn からのその解離において異なることを示しており、このため、FcRn - IgG 相互作用における Fab 領域の影響を示した。

20

【0015】

Benson, J.M., et al.（[50]）は、ウステキヌマブ：インターロイキン-12 及びインターロイキン-23 をターゲットとする、免疫媒介性障害の処置のためのヒトモノクローナル抗体の発見及びメカニズムを報告している。

【0016】

抗体ブリアキヌマブのアミノ酸配列は、国際公開公報第 2013/087911 号（配列番号 39 及び配列番号 40）に報告されている。抗体ウステキヌマブのアミノ酸配列は、国際公開公報第 2013/087911 号（配列番号 37 及び配列番号 38）に報告されている。抗体ベバシズマブのアミノ酸配列は、Drug Bank entry DB00112 に報告されている。

30

【発明の概要】

【0017】

Fv ドメイン中の電荷分布が、抗体 - FcRn 結合性に影響を及ぼし、抗体と FcRn との間の更なる相互作用をもたらすことが見出された。これは、特に pH 7.4 での抗体 - FcRn 複合体の解離に関する FcRn 結合特性を変化させることにより、抗体の FcRn 依存性終末相半減期を短縮する。

40

【0018】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第 1 の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第 2 の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程 a) で決定された保持時間と工程 b) で決定された保持時間とが実質的に異なる場合、抗体の in vivo での半減期に影響を及ぼす抗体 - Fab - FcRn 相互作用の存在が決定される、

抗体の in vivo での半減期に影響を及ぼす抗体 - Fab - FcRn 相互作用の存

50

在を決定する方法である。

【0019】

抗体 - F a b - F c R n 相互作用は、抗体の F a b 領域と F c R n との間の相互作用である。この相互作用は、少しでも存在する場合、抗体が F c R n と結合した後に生じる。このため、この相互作用の確立は、2 工程プロセスである。第1工程において、抗体 - F c R n 複合体、より正確には、抗体 - F c - F c R n 複合体が形成される。抗体 - F c - F c R n 複合体が形成された後の第2の工程は、抗体 - F a b - F c R n 相互作用の確立である。これから分かるように、全長抗体についてのみ、これらの2つの相互作用、すなわち、抗体 - F c - F c R n 相互作用及び抗体 - F a b - F c R n 相互作用を確立することができる。

10

【0020】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程 a) で決定された保持時間と工程 b) で決定された保持時間が実質的に異なる場合、in vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体 - F c R n 複合体における F a b - F c R n 相互作用の存在が決定される。

in vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体 - F c R n 複合体における F a b - F c R n 相互作用の存在を決定する方法である。

20

【0021】

本明細書に報告された別の態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程 a) で決定された保持時間と工程 b) で決定された保持時間が実質的に異なる場合、抗体は、IgG クラスの標準的 / 天然の抗体と比較して相対的に短い in vivoでの半減期を有する。

30

抗体の相対的な in vivoでの半減期を決定する方法である。

【0022】

一実施態様では、IgG クラスの抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、又は IgG4 サブクラスの抗体である。一実施態様では、IgG クラスの抗体は、IgG1、IgG3、又は IgG4 サブクラスの抗体である。一実施態様では、IgG クラスの抗体は、IgG1 又は IgG4 サブクラスの抗体である。一実施態様では、IgG クラスの抗体は、IgG1 サブクラスの抗体である。一実施態様では、IgG クラスの抗体は、IgG4 サブクラスの抗体である。

【0023】

本明細書に報告された更なる態様は、下記工程：

40

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、i) 工程 a) で決定された変異抗体の保持時間が、工程 a) で決定されたその親抗体の保持時間より長く、ii) 工程 a) で決定された変異抗体の保持時間と工程 b) で決定された変異抗体の保持時間が実質的に同じである場合、その親抗体に対して変異抗体の in vivoでの半減期が長くなり、また、これにより、i) 工程 a) で決定された変異抗体の保持時間が、工程 a) で決定されたその親抗体の保持時間より短く、ii) 工程 a) で決定された変異抗体の保持時間と工程 b) で決定された変異抗体の保持

50

時間が実質的に同じである場合、その親抗体に対して変異抗体の *in vivo* での半減期が短くなる、

その親抗体に対する変異抗体の *in vivo* での半減期の伸長又は短縮を決定する方法である。

【0024】

本明細書に報告された別の態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、参照抗体に対して長い *in vivo* での半減期を有する抗体を選択する場合には、i) 工程 a) で決定された参照抗体の保持時間より長い工程 a) で決定された保持時間、及び、ii) 工程 b) で決定された保持時間と実質的に同じ工程 a) で決定された保持時間を有する抗体が選択され、また、これにより、参照抗体に対して短い *in vivo* での半減期を有する抗体を選択する場合には、i) 工程 a) で決定された参照抗体の保持時間より短い工程 a) で決定された保持時間、及び、ii) 工程 b) で決定された保持時間と実質的に同じ工程 a) で決定された保持時間を有する抗体が選択される、

参照抗体に対して伸長又は短縮した *in vivo* での半減期を有する抗体を選択する方法である。

【0025】

本明細書に報告された別の態様は、

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程 b) で決定された保持時間と実質的に異なる工程 a) で決定された保持時間を有する抗体が選択され、また、これにより、抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼす抗体 - Fab - FcRn相互作用を有さない抗体を選択する、

抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼす抗体 - Fab - FcRn相互作用を有さない抗体を選択する方法である。

【0026】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 本明細書に報告された方法により選択された、参照抗体に対して伸長又は短縮した *in vivo* での半減期を有する抗体をコードする1つ以上の核酸を含む細胞を提供する工程と、

b) 該細胞を培養培地中で培養し、該細胞又は該培養培地から抗体を回収することにより、抗体を製造する工程とを含む、

抗体を製造する方法である。

【0027】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

抗体軽鎖中の27、55、及び94位(Kabatによるナンバリング)の荷電アミノ酸残基を、疎水性又は中性の親水性アミノ酸残基に変化させることにより、抗体の *in vivo* での半減期を伸長する工程を含む、

抗体の *in vivo* での半減期を伸長する方法である。

【0028】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 塩勾配溶出による第1のpH値におけるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 塩勾配溶出による第2のpH値におけるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

10

20

30

40

50

これにより、工程 a) で決定された抗体及び参照抗体の保持時間の比が、工程 b) で決定された抗体及び参照抗体の保持時間の比と実質的に異なる場合、抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼす抗体 - F a b - F c R n 相互作用の存在が決定される、

抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼす抗体 - F a b - F c R n 相互作用の存在を決定する方法である。

【0029】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 変異抗体及びその親抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、p H 6 における K_D 値を決定する工程と、

b) 高塩濃度の存在下での正の線形 p H 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフイーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体とその親抗体との間で工程 b) で決定された保持時間が実質的に異なる場合、抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼす抗体 - F a b - F c R n 相互作用の存在が決定される、

抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼす抗体 - F a b - F c R n 相互作用の存在を決定する方法である。

【0030】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 変異抗体及びその親抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、p H 6 における K_D 値を決定する工程と、

b) 高塩濃度の存在下での正の線形 p H 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフイーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より短い / 小さい場合、抗体は、その親抗体と比較して相対的に短い *in vivo* での半減期を有し、また、これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より長い / 大きい場合、抗体は、その親抗体と比較して相対的に長い *in vivo* での半減期を有する、

抗体の相対的な *in vivo* での半減期を決定する方法である。

【0031】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 変異抗体及びその親抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、p H 6 における K_D 値を決定する工程と、

b) 高塩濃度の存在下での正の線形 p H 勾配溶出による F c R n 親和性クロマトグラフイーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より短い / 小さい場合、抗体は、その親抗体と比較して短い *in vivo* での半減期を有し、また、これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より長い / 大きい場合、抗体は、その親抗体と比較して長い *in vivo* での半減期を有する、

抗体の *in vivo* での半減期の伸長又は短縮を決定する方法である。

【0032】

一実施態様では、抗体は、全長抗体である。

【0033】

全態様の一実施態様では、正の線形 p H 勾配は、約 p H 5 . 5 ~ 約 p H 8 . 8 である。

【0034】

全態様の一実施態様では、塩は、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、クエン酸ナトリウム、又はクエン酸カリウムから選択される。

【0035】

全態様の一実施態様では、塩は、塩化ナトリウムである。

10

20

30

40

50

【0036】

全態様の一実施態様では、第1の塩濃度は、50mM～200mMである。

【0037】

全態様の一実施態様では、第1の塩濃度は、約140mMである。

【0038】

全態様の一実施態様では、第2の塩濃度は、300mM～600mMである。

【0039】

全態様の一実施態様では、第2の塩濃度は、約400mMである。

【0040】

全態様の一実施態様では、工程a)と工程b)とで実質的に異なる保持時間は、少なくとも5%異なる。 10

【0041】

全態様の一実施態様では、工程a)と工程b)とで実質的に異なる保持時間は、少なくとも10%異なる。

【0042】

全態様の一実施態様では、工程a)と工程b)とで実質的に異なる保持時間は、少なくとも15%異なる。

【0043】

全態様の一実施態様では、保持時間が工程a)と工程b)とで実質的に異なる場合、工程a)における保持時間は、工程b)におけるより大きい/長い。 20

【0044】

全態様の一実施態様では、保持時間が工程a)と工程b)とで実質的に異なる場合、工程b)における保持時間は、工程a)におけるより小さい/短い。

【0045】

全態様の一実施態様では、保持時間が工程a)と工程b)とで実質的に異なる場合、保持時間は、塩濃度の平方根の上の $1(\sim 1/\sqrt{c(salt)})$ に比例する。

【0046】

全態様の一実施態様では、親又は参照抗体は、サブクラスIgG1について、配列番号01(重鎖)及び配列番号02(軽鎖)を有する抗-IL-1R抗体、ならびに、サブクラスIgG4について、配列番号03(重鎖)及び配列番号04(軽鎖)を有する抗-IL-1R抗体である。 30

【0047】

全態様の一実施態様では、親又は参照抗体は、サブクラスIgG1について、配列番号36(重鎖)及び配列番号37(軽鎖)を有する抗-HER2抗体、ならびに、サブクラスIgG4について、配列番号38(重鎖)及び配列番号39(軽鎖)を有する抗-HER2抗体である。

【0048】

全態様の一実施態様では、親又は参照抗体は、図5に示された軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を有するウステキヌマブである。

【0049】

全態様の一実施態様では、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムは、新生児Fcレセプター(FcRn)とベータ-2-ミクログロブリン(b2m)との非共有複合体を含む。

【0050】

全態様の一実施態様では、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムは、新生児Fcレセプター(FcRn)とベータ-2-ミクログロブリン(b2m)との共有複合体を含む。

【0051】

全態様の一実施態様では、新生児Fcレセプター(FcRn)とベータ-2-ミクログロブリン(b2m)との複合体は、固体相に結合している。 50

【0052】

全態様の一実施態様では、固体相は、クロマトグラフィー材料である。

【0053】

全態様の一実施態様では、新生児Fcレセプター(FcRn)とベータ-2-ミクログロブリン(b2m)との複合体は、ビオチン化されており、固体相は、ストレプトアビジョンで誘導体化されている。

【0054】

全態様の一実施態様では、ベータ-2-ミクログロブリンは、新生児Fcレセプター(FcRn)と同じ種由来である。

【0055】

全態様の一実施態様では、ベータ-2-ミクログロブリンは、FcRnとは異なる種由来である。

【0056】

全態様の一実施態様では、FcRnは、ヒトFcRn、カニクイザルFcRn、マウスFcRn、ラットFcRn、ヒツジFcRn、イヌFcRn、ブタFcRn、ミニブタFcRn、及びウサギFcRnから選択される。

【0057】

全態様の一実施態様では、抗体は、単特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメント、又は、二重特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメント、又は、三重特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメント、又は、四重特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメントである。

【0058】

一実施態様では、抗体は、クラスIgGの抗体である。一実施態様では、抗体は、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4の抗体である。一実施態様では、抗体は、サブクラスIgG1又はIgG4の抗体である。

【0059】

発明の詳細な説明

FcRn-mAb (mAb = モノクローナル抗体) 相互作用の構造解析の結果を組み合わせることにより、Fvドメイン及び特に軽鎖可変ドメイン(VL)が、FcRn-mAb解離に主な影響を提供するという結論がもたらされる。この発見は、Fvドメインが同じ抗体のFcRn結合部位から離れているため、予測されなかった。

【0060】

抗体は、pH 6.0での親和性において、差異を示さなかったため、Fab領域は、pH 6.0での結合性に影響を有さないと考えられる。対照的に、FcRnと抗体との間の解離は、Fab領域により影響を受けた。

【0061】

in vitroでのFcRn-IgG解離pHは、in vivoでの終末相半減期と直線的に関係した。まとめると、これらの発見は、より高いpH値においてより遅い解離を示す抗体は、細胞内に戻るように輸送され、その後、血液循環に戻って放出される代わりに分解されるとの仮定を支持している。

【0062】

Fvドメイン中の電荷分布は、抗体-FcRn結合性に影響を及ぼし、抗体とFcRnとの間の更なる相互作用をもたらすことが見出された。これは、特にpH 7.4での抗体-FcRn複合体の解離に関するFcRn結合特性を変化させることにより、抗体のFcRn依存性終末相半減期を短縮する。

【0063】

I. 定義

「a」及び「an」という用語は、1又は2又は3又は4又は5又は6、及び最大10⁹を意味する。

【0064】

10

20

30

40

50

「約」という用語は、その後に続く数値の + / - 20 % の範囲を意味する。一実施態様では、約という用語は、その後に続く数値の + / - 10 % の範囲を意味する。一実施態様では、約という用語は、その後に続く数値の + / - 5 % の範囲を意味する。

【0065】

「含む (comprising)」という用語は、「からなる (consisting of)」という用語も含む。

【0066】

「変化」という用語は、改変抗体又は融合ポリペプチドを得るための、親抗体又は融合ポリペプチド、例えば、Fc領域の少なくともFcRn結合部を含む融合ポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸残基の突然変異（置換）、挿入（付加）、変化（誘導体化）、又は欠失を意味する。突然変異」という用語は、指定されたアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基に置換されることを意味する。例えば、突然変異L234Aは、抗体Fc領域（ポリペプチド）中の234位（EUインデックスによるナンバリング）のアミノ酸残基リシンが、アミノ酸残基アラニンにより置換されること（アラニンによるリシンの置換）を意味する。

10

【0067】

「アミノ酸突然変異」という用語は、少なくとも1つの既存のアミノ酸残基の別の異なるアミノ酸残基による置換（=アミノ酸残基の置き換え）を意味する。置き換えるアミノ酸残基は、「天然のアミノ酸残基」であることができ、アラニン（三文字表記：ala、一文字表記：A）、アルギニン（arg、R）、アスパラギン（asn、N）、アスパラギン酸（asp、D）、システイン（cys、C）、グルタミン（gln、Q）、グルタミン酸（glu、E）、グリシン（gly、G）、ヒスチジン（his、H）、イソロイシン（ile、I）、ロイシン（leu、L）、リシン（lys、K）、メチオニン（met、M）、フェニルアラニン（phe、F）、プロリン（pro、P）、セリン（ser、S）、スレオニン（thr、T）、トリプトファン（trp、W）、チロシン（tyr、Y）、及びバリン（val、V）からなる群より選択することができる。置き換えるアミノ酸残基は、「非天然のアミノ酸残基」でもよい。例えば、米国特許第6,586,207号、国際公開公報第98/48032号、同第03/073238号、米国特許出願公開公報第2004/0214988号、国際公開公報第2005/35727号、同第2005/74524号、Chin, J.W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 9026-9027; Chin, J.W. and Schultz, P.G., ChemBioChem 11 (2002) 1135-1137; Chin, J.W., et al., PICAS United States of America 99 (2002) 11020-11024; 及びWang, L. and Schultz, P.G., Chem. (2002) 1-10を参照のこと（全ての文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

20

【0068】

「アミノ酸挿入」という用語は、アミノ酸配列中の所定の位置における、少なくとも1つのアミノ酸残基の（付加的な）組み込みを意味する。一実施態様では、挿入は、1つ又は2つのアミノ酸残基の挿入であろう。挿入されたアミノ酸残基は、任意の天然又は非天然のアミノ酸残基であることができる。

30

【0069】

「アミノ酸欠失」という用語は、アミノ酸配列中の所定の位置における、少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を意味する。

40

【0070】

本明細書において、「抗体」という用語は、広い意味で使用され、種々の抗体構造体を包含する。この抗体構造体は、それらが全長抗体であり、所望の抗原-及び/又はFcRn-結合活性を示す限り、モノクローナル抗体及び多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体）を含むが、これらに限定されない。

【0071】

「（抗原に対する）結合性」という用語は、in vitroアッセイ法での抗体の結合性を意味する。一実施態様では、結合性は、抗体が抗原の表面に結合し、抗原の抗体に

50

に対する結合性が表面プラズモン共鳴 (S P R) により測定される、結合アッセイ法において決定される。結合性は、例えば、 10^{-8} M以下、一部の実施態様では、 10^{-13} ~ 10^{-8} M、一部の実施態様では、 10^{-13} ~ 10^{-9} Mの結合親和性 (K_D) を意味する。

【0072】

結合性は、BIAcoreアッセイ法 (GE Healthcare Biosensor AB, Uppsala, Sweden) により調査することができる。結合親和性は、 k_a (抗体 / 抗原複合体からの抗体が会合する速度定数)、 k_d (解離定数)、及び K_D (k_d / k_a) という用語により定義される。

【0073】

「バッファー物質」という用語は、例えば、酸性又は塩基性物質の付加又は放出により、溶液中で、溶液のpH値の変化を平らにすることができる物質を意味する。

【0074】

「C H 2 - ドメイン」という用語は、ほぼEU位置231からEU位置340 (K_{ab} a t によるEUナンバリングシステム)に向かって伸びる抗体重鎖ポリペプチドの部分を意味する。一実施態様では、C H 2 ドメインは、配列番号05:

【表1】

APELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVWDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQ E STYRWSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKKTIS KAK.

10

20

のアミノ酸配列を有する。

【0075】

「C H 3 - ドメイン」という用語は、ほぼEU位置341からEU位置446に向かって伸びる抗体重鎖ポリペプチドの部分を意味する。一実施態様では、C H 3 ドメインは、配列番号06:

【表2】

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPG.

30

のアミノ酸配列を有する。

【0076】

抗体の「クラス」は、その重鎖により保持されている定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。抗体には、5つの主要なクラス: Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、及びIg Mが存在する。これらの幾つかは、更に、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、Ig G₄、Ig A₁、及びIg A₂に分類することができる。種々のクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、₁、₂、₃、₄、及びμと呼ばれる。

40

【0077】

作用剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、所望の治療的又は予防的結果を達成するのに必要な用量及び期間において有効な量を指す。

【0078】

「F c 融合ポリペプチド」という用語は、結合ドメイン(例えば、抗原結合ドメイン、例えば、一本鎖抗体又はポリペプチド、例えば、レセプターのリガンド)と、所望のターゲット-及び/又はプロテインA及び/又はF c R n 結合活性を示す抗体F c 領域との融合物を意味する。

【0079】

「ヒト起源のF c 領域」という用語は、ヒンジ領域、C H 2 ドメイン、及びC H 3 ドメ

50

インの内の少なくとも一部を含有する、ヒト起源の免疫グロブリン重鎖のC末端領域を意味する。一実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226又はPro230から、重鎖のカルボキシル末端に向かって伸びる。一実施態様では、Fc領域は、配列番号07のアミノ酸配列を有する。ただし、Fc領域のC末端リシン(Lys447)は、存在してもよいし、又は、存在しなくてもよい。本明細書において特に断らない限り、Fc領域又は定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91 3242に記載され、EUインデックスとも呼ばれる、EUナンバリングシステムに従う。Fc領域は、2つの重鎖Fc領域ポリペプチドから構成される。このポリペプチドは、ポリペプチド間ジスルフィド結合を形成するヒンジ領域のシステイン残基を介して、互いに共有結合することができる。
10

【0080】

「FcRn」という用語は、ヒト新生児Fcレセプターを意味する。FcRnは、リボソーム分解経路からIgGを救助するのに機能し、低下したクリアランス及び伸長した半減期をもたらす。FcRnは、2つのポリペプチド：50kDaクラスI主要組織適合性複合体様タンパク質(-FcRn)と、15kDa-2-ミクログロブリン(2m)とかなるヘテロ二量体タンパク質である。FcRnは、IgGのFc領域のCH2-CH3部分に、高い親和性で結合する。IgGとFcRnとの間の相互作用は、厳密にpH依存性であり、1つのIgGがその2つの重鎖を介して2つのFcRn分子に結合する、1:2の化学量論で生じる(Huber, A.H., et al., J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083)。FcRn結合は、エンドソーム中において、酸性pH(pH<6.5)で生じ、IgGが、中性の細胞表面(約7.4のpH)で放出される。この相互作用のpH感受性は、エンドソームの酸性環境内でレセプターに結合することにより、細胞中に飲作用されたIgGを細胞内分解からFcRn媒介性保護するのを促進する。ついで、FcRnは、細胞表面へのIgGのリサイクリングを促進し、その結果、細胞外の中性pH環境へのFcRn-IgG複合体の露出によって、血流に放出する。
20

【0081】

「Fc領域のFcRn結合部分」という用語は、ほぼEU位置243からEU位置261に向かって、ならびに、ほぼEU位置275からEU位置293に向かって、ならびに、ほぼEU位置302からEU位置319に向かって、ならびに、ほぼEU位置336からEU位置348に向かって、ならびに、ほぼEU位置367からEU位置393及びEU位置408に向かって、ならびに、ほぼEU位置424からEU位置440に向かって伸びる抗体重鎖ポリペプチドの部分を意味する。一実施態様では、KabatのEUナンバリングによる1つ以上の下記アミノ酸残基が改変される。
30

【表3】

F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439, 及びS440
40

(EUナンバリング)。

【0082】

「全長抗体」という用語は、ネイティブな抗体構造と実質的に同様の構造を有する抗体
50

を意味する。全長抗体は、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む2つの全長抗体軽鎖と、重鎖可変ドメイン、第1の定常ドメイン、ヒンジ領域、第2の定常ドメイン、及び第3の定常ドメインを含む2つの全長抗体重鎖とを含む。全長抗体は、更なるドメイン、例えば、全長抗体の1つ以上の鎖にコンジュゲーションした、更なるscFv又はscFabを含んでもよい。これらのコンジュゲートも、全長抗体という用語に包含される。

【0083】

「ヒンジ領域」という用語は、例えば、KabatのEUナンバリングシステムによる約216位から約230位に向かう、CH1ドメインとCH2ドメインとを結合する抗体重鎖ポリペプチドの部分を意味する。一実施態様では、ヒンジ領域は、KabatのEUナンバリングシステムによる残基221～230を含む短縮化ヒンジ領域である。ヒンジ領域は、通常、同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチドからなる二量体分子である。ヒンジ領域は、一般的には、約25個のアミノ酸残基を含み、抗原結合領域を独立して動かせるようにフレキシブルである。ヒンジ領域は、3つのドメイン：上部、中央、及び下部ヒンジドメインに細分することができる (Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083)。

【0084】

「ホスト細胞」、「ホスト細胞株」、及び「ホスト細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外来性核酸が導入されている細胞を指し、このような細胞の子孫を含む。ホスト細胞は、「トランスフォーマント」及び「トランスフォーメーションされた細胞」を含む。「トランスフォーマント」及び「トランスフォーメーションされた細胞」は、初代のトランスフォーメーションされた細胞、及び継代回数に関わらずそれらから得られた子孫を含む。子孫は、親細胞に対して核酸含量が完全に同一でなくてもよく、突然変異を含有してもよい。元々トランスフォーメーションされた細胞についてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫は、本明細書に含まれる。

【0085】

「から得られた」という用語は、アミノ酸配列が、少なくとも1つの位置に改変を導入することにより、親アミノ酸配列から得られることを意味する。このため、得られたアミノ酸配列は、対応する親アミノ酸配列とは、少なくとも1つの対応する位置（抗体Fc領域についてのKabat EUインデックスによるナンバリング）において異なる。一実施態様では、親アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列は、対応する位置において、1～15個のアミノ酸残基により異なる。一実施態様では、親アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列は、対応する位置において、1～10個のアミノ酸残基により異なる。一実施態様では、親アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列は、対応する位置において、1～6個のアミノ酸残基により異なる。同様に、得られたアミノ酸配列は、その親アミノ酸配列に対して、高いアミノ酸配列同一性を有する。一実施態様では、親アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列は、80%以上のアミノ酸配列同一性を有する。一実施態様では、親アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列は、90%以上のアミノ酸配列同一性を有する。一実施態様では、親アミノ酸配列から得られたアミノ酸配列は、95%以上のアミノ酸配列同一性を有する。

【0086】

「ヒトFc領域ポリペプチド」という用語は、「ネイティブ」又は「野生型」のヒトFc領域ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を意味する。「変異(ヒト)Fc領域ポリペプチド」という用語は、少なくとも1つの「アミノ酸改変」により、「ネイティブ」又は「野生型」のヒトFc領域ポリペプチドから得られたアミノ酸配列を意味する。「ヒトFc領域」は、2つのヒトFc領域ポリペプチドからなる。「変異(ヒト)Fc領域」は、2つのFc領域ポリペプチドからなり、両方とも、変異(ヒト)Fc領域ポリペプチドであることができ、又は、一方がヒトFc領域ポリペプチドであり、他方が変異(ヒト)Fc領域ポリペプチドである。

【0087】

一実施態様では、ヒトFc領域ポリペプチドは、配列番号07のヒトIgG1Fc領域

10

20

30

30

40

50

ポリペプチド、又は、配列番号 0 8 のヒト I g G 2 F c 領域ポリペプチド、又は、配列番号 0 9 のヒト I g G 3 F c 領域ポリペプチド、又は、配列番号 1 0 のヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドのアミノ酸配列を有する。一実施態様では、F c 領域ポリペプチドは、配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 の F c 領域ポリペプチドから得られ、配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 の F c 領域ポリペプチドと比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸突然変異を有する。一実施態様では、F c 領域ポリペプチドは、約 1 ~ 約 10 個のアミノ酸突然変異、及び一実施態様では、約 1 ~ 約 5 個のアミノ酸突然変異を含む / 有する。一実施態様では、F c 領域ポリペプチドは、配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 のヒト F c 領域ポリペプチドに対して、少なくとも約 80 % の相同性を有する。一実施態様では、F c 領域ポリペプチドは、配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 のヒト F c 領域ポリペプチドに対して、少なくとも約 90 % の相同性を有する。一実施態様では、F c 領域ポリペプチドは、配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 のヒト F c 領域ポリペプチドに対して、少なくとも約 95 % の相同性を有する。

【 0 0 8 8 】

配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 のヒト F c 領域ポリペプチドから得られた F c 領域ポリペプチドは、含有されるアミノ酸改変により定義される。このため、例えば、P 3 2 9 G という用語は、配列番号 0 7 又は 0 8 又は 0 9 又は 1 0 のヒト F c 領域ポリペプチドに対して、アミノ酸位置 3 2 9 において、プロリンからグリシンへの突然変異を有する、F c 領域ポリペプチド由来ヒト F c 領域ポリペプチドを意味する。

【 0 0 8 9 】

本発明で検討された全ての重鎖位置について、ナンバリングは、E U インデックスに従う。E U インデックス又は K a b a t における E U インデックス又は K a b a t E U インデックス又は E U ナンバリングスキームは、抗体の E U ナンバリングを指す (Edelman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85、同文献は、その全体が参照により組み入れられる)。軽鎖残基のナンバリングは、K a b a t 命名法に従う (Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91 3242)。

【 0 0 9 0 】

ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 4】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 0 7) .

を有する。

【 0 0 9 1 】

突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 5】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 1) .

10

20

30

40

50

を有する。

【 0 0 9 2 】

Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及びY 4 0 7 V突然変異を有するヒトI g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 6】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 2) .

10

を有する。

【 0 0 9 3 】

S 3 5 4 C、T 3 6 6 W突然変異を有するヒトI g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 7】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 3) .

20

を有する。

【 0 0 9 4 】

L 2 3 4 A、L 2 3 5 A突然変異とY 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V突然変異とを有するヒトI g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 8】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 4) .

30

40

を有する。

【 0 0 9 5 】

L 2 3 4 A、L 2 3 5 AとS 3 5 4 C、T 3 6 6 W突然変異とを有するヒトI g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表9】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
 FYPSDLIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号15).

を有する。

10

【0096】

P329G 突然変異を有するヒト IgG1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表10】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDLIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号16).

20

を有する。

【0097】

L234A、L235A 突然変異と P329G 突然変異とを有するヒト IgG1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表11】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDLIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号17).

30

を有する。

【0098】

P329G 突然変異と Y349C、T366S、L368A、Y407V 突然変異とを有するヒト IgG1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表12】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
 FYPSDLIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号18).

40

を有する。

【0099】

50

P 3 2 9 G 突然変異と S 3 5 4 C、T 3 6 6 W 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 13】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 19) .

10

を有する。

【0100】

L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G と Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0
 7 V 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 14】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 20) .

20

を有する。

【0101】

L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G 突然変異と S 3 5 4 C、T 3 6 6 W 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 15】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 21) .

30

を有する。

【0102】

ヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 16】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 10) .

40

を有する。

【0103】

50

S 2 2 8 P 及び L 2 3 5 E 突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 17】

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 2 2) .

10

を有する。

【0104】

S 2 2 8 P、L 2 3 5 E 突然変異と P 3 2 9 G 突然変異とを有するヒト I g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 18】

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 2 3) .

20

を有する。

【0105】

S 3 5 4 C、T 3 6 6 W 突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 19】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 2 4) .

30

を有する。

【0106】

Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域由来 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 20】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 2 5) .

を有する。

50

【0107】

S 2 2 8 P、L 2 3 5 E と S 3 5 4 C、T 3 6 6 W 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表21】

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号26) .

10

を有する。

【0108】

S 2 2 8 P、L 2 3 5 E と Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表22】

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号27) .

20

を有する。

【0109】

P 3 2 9 G 突然変異を有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表23】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号28) .

30

を有する。

【0110】

P 3 2 9 G と Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表24】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号29) .

40

50

を有する。

【0111】

P 3 2 9 G と S 3 5 4 C、T 3 6 6 W 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表25】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号30) .

10

を有する。

【0112】

S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G と Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0
7 V 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表26】

ESKYGPPCPCCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号31) .

20

を有する。

【0113】

S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G と S 3 5 4 C、T 3 6 6 W 突然変異とを有するヒト Ig G 1 Fc 領域由来 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

30

【表27】

ESKYGPPCPCCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号32) .

40

を有する。

【0114】

種々のヒト Fc 領域のアライメントを、以下に示す (EUナンバリング)。

【表28】

2	2	
3	5	
0	0	
IGG1	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED	
IGG2	... VECPPCP APP.VAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED	
IGG3	DTTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED	
IGG4	... PPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED	
	-- HINGE - -- CH2 -----	
		10
IGG1	PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK	
IGG2	PEVQFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK	
IGG3	PEVQFKWYVD GVEVHNNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK	
IGG4	PEVQFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK	
	-- CH2 -----	
IGG1	CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK	
IGG2	CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK	
IGG3	CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK	20
IGG4	CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK	
	-- CH2 ----- CH2 -- -- CH3 -----	
IGG1	GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG	
IGG2	GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG	
IGG3	GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG	
IGG4	GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDs DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG	
	-- CH3 -----	
IGG1	NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	30
IGG2	NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	
IGG3	N1FSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK	
IGG4	NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	
	-- CH3 -----	

【0115】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基とヒトFR由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろうし、この場合、全て又は実質的に全てのHVR（例えば、CDR）は、非ヒト抗体のHVRに対応し、全て又は実質的に全てのFRは、ヒト抗体のFRに対応する。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体から得られた抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けている抗体を指す。

【0116】

「個体」又は「対象」は、哺乳類である。哺乳類は、飼育動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、靈長類（例えば、ヒト及び非ヒト靈長類、例えば、サル）、ウサギ、ならびにげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様では、個体又は対象は、ヒトである。

【0117】

「単離された」抗体は、その天然の環境中での成分から分離されている抗体である。一部の実施態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、S D S - P A G E、等電点電気泳動（I E F）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー又はイオン交換もしくは逆相H P L C）により決定された場合、95%又は99%超の純度に精製される。抗体純度を評価する方法のレビューについては、例えば、Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87を参照のこと。

【0118】

「単離された」核酸は、その天然の環境中での成分から分離されている核酸分子を指す。単離された核酸は、通常核酸分子を含有するが、核酸分子が、染色体外又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する、細胞に含有される核酸分子を含む。

10

【0119】

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体集団から得られた抗体を指す。すなわち、該集団を含む個々の抗体は、例えば、自然発生的突然変異を含有し、又は、モノクローナル抗体調製物の生成中に生じる、可能性のある変異抗体を除いて、同一であり、及び／又は、同じエピトープに結合する。このような変異体は、一般的には、少量存在する。ポリクローナル抗体調製物が、典型的には、種々の決定因子（エピトープ）に対する種々の抗体を含むのとは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定因子に対する。このため、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均一な集団から得られた抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に使用されるモノクローナル抗体は、各種の技術により調製することができる。同技術は、ハイブリドーマ法、リコンビナントD N A法、ファージ-ディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリンローカスの全部又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない。このような方法及びモノクローナル抗体を調製する他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

20

【0120】

「ネイティブな抗体」は、可変性の構造を有する天然の免疫グロブリン分子を指す。例えば、ネイティブなI g G抗体は、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から構成される。同重鎖は、ジスルフィド結合している。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（V H）、続けて、3つの定常ドメイン（C H 1、C H 2、及びC H 3）を有する。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（V L）、続けて、定常軽鎖（C L）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2種類の内的一方に割り当てることができる。

30

【0121】

「負の線形p H勾配」という用語は、高い（すなわち、中性又はアルカリ性）p H値から開始して、より低い（すなわち、中性又は酸性）p H値で終了するp H勾配を意味する。一実施態様では、負の線形p H勾配は、約8.8のp H値で開始し、約5.5のp H値で終了する。

40

【0122】

「非天然アミノ酸残基」という用語は、上記列記された天然アミノ酸残基以外のアミノ酸残基を意味し、ポリペプチド鎖中で、隣接するアミノ酸残基に共有結合することができる。非天然アミノ酸残基の例は、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリンである。更なる例は、Ellman, et al., Meth. Enzym. 202 (1991) 301-336に列記されている。非天然アミノ酸残基を合成する例示的な方法は、例えば、Noren, et al., Science 244 (1989) 182及び上記Ellman et al.に報告されている。

【0123】

「医薬製剤」という用語は、活性成分の生物学的活性が有効であるように含有されており、該製剤が投与されるであろう対象に対して許容できない毒性を示す更なる成分を含有

50

していない形態にある調製物を指す。

【0124】

「薬学的に許容し得る担体」は、対象に対して非毒性である活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容し得る担体は、バッファー、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含むが、これらに限定されない。

【0125】

本明細書で使用する場合、「プラスミド」という用語は、連結される別の核酸を伝播可能な核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造体としてのプラスミドと、導入されているホスト細胞のゲノム内に組み込まれているプラスミドとを含む。特定のプラスミドは、操作可能に連結している核酸の発現を指示することができる。本明細書において、このようなプラスミドは、「発現プラスミド」と呼ばれる。

10

【0126】

「正の線形pH勾配」という用語は、低い（すなわち、より酸性）pH値で開始して、より高い（すなわち、ほぼ酸性でない、中性、又はアルカリ性）pH値で終了するpH勾配を意味する。一実施態様では、正の線形pH勾配は、約5.5のpH値で開始し、約8.8のpH値で終了する。

【0127】

本明細書で使用する場合、「リコンビナント抗体」という用語は、リコンビナント手段により、調製、発現、作製、又は単離される全ての抗体（キメラ、ヒト化、及びヒト）を意味する。リコンビナント抗体は、ホスト細胞、例えば、NS0もしくはCHO細胞、又は、ホスト細胞内にトランスフェクションされたリコンビナント発現プラスミドを使用して発現されるヒト免疫グロブリン遺伝子又は抗体についてトランスジェニックな動物（例えば、マウス）から単離された抗体を含む。このようなリコンビナント抗体は、再配置された状態で、可変領域及び定常領域を有する。本明細書で報告されたリコンビナント抗体は、in vivoでの体細胞超突然変異に供することができる。このため、リコンビナント抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系VH及びVL配列から得られ、同配列に関するが、in vivoでのヒト抗体生殖系レパートリー内には天然に存在しない場合がある配列である。

20

【0128】

「固体相」は、非流体物質を意味し、ポリマー、金属（常磁性、強磁性粒子）、ガラス、及びセラミック等の材料から形成された粒子（微小粒子及びビーズを含む）；ゲル状物質、例えば、シリカ、アルミナ、及びポリマーゲル；キャピラリー（ポリマー、金属、ガラス、及び/又はセラミックで形成することができる）；ゼオライト及び他の多孔性物質；電極；マイクロタイタープレート；固体ストリップ；ならびにキュベット、チューブ、又は他の分光計サンプル容器を含む。アッセイ法における固体相成分は、不活性な固体表面とは区別される。その場合、「固体支持体」は、その表面の少なくとも1つの部分を含有する。同部分は、分子と化学的に相互作用することを意図している。固体相は、定常部品、例えば、チップ、チューブ、ストリップ、キュベット、もしくはマイクロタイタープレートでもよく、又は、非定常部品、例えば、ビーズもしくは微小粒子でもよい。微小粒子は、均一なアッセイフォーマットのための固体支持体としても使用することができる。タンパク質及び他の物質の非共有又は共有付着の両方を可能にする各種の微小粒子を使用することができる。このような粒子は、ポリマー粒子、例えば、ポリスチレン及びポリ（メチルメタクリラート）；金粒子、例えば、金ナノ粒子及び金コロイド；ならびにセラミック粒子、例えば、シリカ、ガラス；ならびに金属酸化物粒子を含む。例えば、Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features, May 1 (1998) 322A-327Aを参照のこと。同文献は、参照により本明細書に組み入れられる。一実施態様では、固体支持体は、セファロースである。

30

【0129】

「実質的に同じ」という用語は、2つの値、例えば、2種類の異なる抗体のFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間が、互いに5%以内であること、すなわち、

40

50

5 %未満で異なることを意味する。例えば、80分の第1の保持時間と84分の第2の保持時間とは、実質的に同じである。一方、80分の保持時間と85分の保持時間とは、実質的に同じではなく、これらの保持時間は異なる。一実施態様では、実質的に同じは、2つの値が、互いに3.5%以内であること、すなわち、3.5%以下で異なることを意味する。一実施態様では、実質的に同じは、2つの値が、互いに2.5%以内であること、すなわち、2.5%以下で異なることを意味する。2つの値の内の小さい方は、この計算の基礎となる。

【0130】

本明細書で使用する場合、「処置」(及び、その文法上の変形、例えば、「処置する」又は「処置すること」)は、処置される個体の自然経過を変える試みにおける臨床的介在を指し、予防のため、又は、臨床病理の進行中のいずれかで行うことができる。処置の望ましい効果は、疾患の発生又は再発を予防すること、兆候の緩和、疾患の直接又は間接的の病理進行のいずれかの除去、転移の予防、疾患進行速度の減速、疾患状態の緩和又は軽減、ならびに寛解又は改善された予後を含む。一部の実施態様では、本明細書で報告された抗体又はFc領域融合ポリペプチドは、疾患の発生を遅延させ、又は、疾患の進行を遅らせるのに使用される。

10

【0131】

本願内で使用する場合、「価」という用語は、(抗体)分子中の特定数の結合部位の存在を意味する。なお、「二価」、「四価」、及び「六価」という用語はそれぞれ、(抗体)分子中の、2つの結合部位、4つの結合部位、及び6つの結合部位の存在を意味する。好ましい一実施態様において、本明細書で報告される二重特異性抗体は、「二価」である。

20

【0132】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗体のその抗原への結合に関する抗体重鎖又は軽鎖のドメインを指す。抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVL)は、概ね同様の構造を有する。各ドメインは、4つのフレームワーク領域(FR)と、3つの超可変領域(HVR)とを含む(例えば、Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照のこと)。抗原結合特異性を付与するには、1つのVH又はVLドメインで十分であることができる。更に、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを使用し、相補なVL又はVHドメインそれぞれのライプラリをスクリーニングして、単離することができる。例えば、Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照のこと。

30

【0133】

「変異体」、「改变抗体」、及び「改变融合ポリペプチド」という用語は、親分子のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する分子を意味する。典型的には、このような分子は、1つ以上の変化、挿入、又は欠失を有する。一実施態様では、改变抗体又は改变融合ポリペプチドは、天然由来でないFc領域の少なくとも一部を含むアミノ酸配列を含む。このような分子は、親抗体又は親融合ポリペプチドに対して、100%未満の配列同一性を有する。一実施態様では、変異抗体又は変異融合ポリペプチドは、親抗体又は親融合ポリペプチドのアミノ酸配列に対して、約75%～100%未満、特に、約80%～100%未満、特に、約85%～100%未満、特に、約90%～100%未満、及び特に、約95%～100%未満のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。一実施態様では、親抗体又は親融合ポリペプチドと、変異抗体又は変異融合ポリペプチドとは、1つ(単独)、2つ、又は3つのアミノ酸残基で異なる。

40

【0134】

I I . 本明細書に報告された方法

本発明は、少なくとも一部において、Fvドメイン中の電荷分布が抗体-FcRn結合性に影響を及ぼし、抗体とFcRnとの間の更なる相互作用をもたらすという発見に基づいている。これは、特にpH7.4での抗体-FcRn複合体の解離に関するFcRn結

50

合特性を変化させることにより、抗体の F c R n 依存性終末相半減期を短縮する。

【 0 1 3 5 】

a) 新生児 F c レセプター (F c R n)

新生児 F c レセプター (F c R n) は、 in vivo における Ig G クラスの抗体の代謝運命に重要である。 F c R n は、リボソーム分解経路から野生型 Ig G を救助するのに機能し、低下したクリアランス及び伸長した半減期をもたらす。 F c R n は、 2 つのポリペプチド : 50 kDa クラス I 主要組織適合性複合体様タンパク質 (- F c R n) と、 15 kDa 2 - ミクログロブリン (2 m) とからなるヘテロ二量体タンパク質である。 F c R n は、クラス Ig G の抗体の、 F c 領域の C H 2 - C H 3 部分に、高い親和性で結合する。クラス Ig G の抗体と F c R n との間の相互作用は、 pH 依存性であり、 1 : 2 の化学量論で生じる。すなわち、 1 つの Ig G 抗体分子が、その 2 つの重鎖 F c 領域ポリペプチドを介して、 2 つの F c R n 分子に相互作用することができる (例えは、 [1 6] を参照のこと) 。

【 0 1 3 6 】

このため、 in vitro での Ig G F c R n 結合特性 / 特徴は、血液循環中のその in vivo 薬物動態特性を示している。

【 0 1 3 7 】

F c R n と Ig G クラスの抗体の、 F c 領域との間の相互作用には、重鎖 C H 2 ドメイン及び C H 3 ドメインの種々のアミノ酸残基が関与している。 F c R n と相互作用するアミノ酸残基は、ほぼ E U 位置 243 と E U 位置 261 との間、ほぼ E U 位置 275 と E U 位置 293 との間、ほぼ E U 位置 302 と E U 位置 319 との間、ほぼ E U 位置 336 と E U 位置 348 との間、ほぼ E U 位置 367 と E U 位置 393 との間、 E U 位置 408 及び、ほぼ E U 位置 424 と E U 位置 440 との間に位置している。より具体的には、 K a b a t の E U ナンバリングによる下記アミノ酸残基が、 F c 領域と F c R n との間の相互作用に関与している。

【 表 2 9 】

F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439, 及び S440.

【 0 1 3 8 】

部位特異的突然変異誘発研究から、 F c R n に対する Ig G の F c 領域中の重要な結合部位は、ヒスチジン 310 、ヒスチジン 435 、及びイソロイシン 253 であり、より少ない程度で、ヒスチジン 433 及びチロシン 436 であることが証明されている (例えは、 Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825 ; Raghavan, M., et al., Biochem. 34 (1995) 14649-146579 ; Medesan, C., et al., J. Immunol. 158 (1997) 221 1-2217 を参照のこと) 。

【 0 1 3 9 】

F c R n に対する Ig G 結合性を向上させる方法は、 Ig G を種々のアミノ酸残基 : スレオニン 250 、メチオニン 252 、セリン 254 、スレオニン 256 、スレオニン 307 、グルタミン酸 380 、メチオニン 428 、ヒスチジン 433 、及びアスパラギン 434 で突然変異させることにより行われてきた (Kuo, T.T., et al., J. Clin. Immunol. 30 (2000) 15-21) 。

0 (2010) 777-789を参照のこと)。

【0140】

一部の場合では、血液循環中での短い半減期を有する抗体が望ましい。例えば、硝子体内適用の薬剤は、眼における長い半減期と、患者の循環における短い半減期を有するべきである。このような抗体は、疾患部位、例えば、眼における向上した曝露の利点も有する。

【0141】

FcRn結合性とそれに関する血液循環中での半減期に影響を及ぼす種々の突然変異が公知である。マウスFc - マウスFcRn相互作用に重要なFc領域残基は、部位特異的突然変異誘発により特定されている(例えば、Dall'Acqua, W.F., et al. *J. Immunol.* 169 (2002) 5171-5180を参照のこと)。残基I253、H310、H433、N434、及びH435(KabatによるEUナンバリング)は、この相互作用に関与している(Medesan, C., et al., *Eur. J. Immunol.* 26 (1996) 2533-2536; Firan, M., et al., *Int. Immunol.* 13 (2001) 993-1002; Kim, J.K., et al., *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 542-548)。残基I253、H310、及びH435は、ヒトFcとマウスFcRnとの相互作用に重要であることが見出された(Kim, J.K., et al., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2819-2825)。残基M252Y、S254T、T256Eは、タンパク質 - タンパク質相互作用研究により、FcRn結合性を改善させることが、Dall'Acqua et al.により記載されている(Dall'Acqua, W.F., et al. *J. Biol. Chem.* 281(2006) 23514-23524)。

ヒトFc - ヒトFcRn複合体の研究から、残基I253、S254、H435、及びY436は、この相互作用に重要であることが示されている(Firan, M., et al., *Int. Immunol.* 13 (2001) 993-1002; Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604)。Yeung, Y.A., et al. (*J. Immunol.* 182 (2009) 7667-7671)には、残基248 ~ 259及び301 ~ 317及び376 ~ 382及び424 ~ 437の種々の突然変異体が報告され、試験されている。例示的な突然変異体及びFcRn結合性におけるその効果を、下記表1に列記する。

【0142】

【表 3 0】

表 1: 種々のFc領域突然変異と、FcRn結合性及びin vivoでの半減期におけるその影響の併記

突然変異	FcRn結合性における効果	循環中での半減期	参考文献
H285 H310Q/H433N (マウス IgG1)	低下 (マウス)	短縮 (マウス)	Kim, J.K., Scand. J. Immunol. 40 (1994) 457- 465
I253A H310A H435A H436A (マウス IgG1)	低下 (マウス)	短縮 (マウス)	Ghetie, V. and Ward, E.S., Immunol. Today 18 (1997) 592- 598
T252L/T254S/T256F T252A/T254S/T256A (マウス IgG1)	向上 (マウス)	伸長 (マウス)	Ghetie, V. and Ward, E.S., Immunol. Today 18 (1997) 592- 598
I253A H310A H435A H436A H433A/N434Q (マウス IgG1)	低下 (マウス)	短縮 (マウス)	Medesan, C., et al., J. Immunol. 158 (1997) 2211- 2217
I253A H310A H435A H435R (ヒト IgG1)	低下 muFcRnに対する結合性 H310A: < 0.1 rel (マウス)	短縮 (マウス)	Kim, J.K., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819- 2825
H433A (ヒト IgG1)	muFcRnに対する結合性 1.1 rel、 huFcRnに対する結合性 0.4 rel (マウス)		Kim, J.K., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819- 2825

10

20

30

40

突然変異	F c R n 結合性における効果	循環中での半減期	参考文献
I253A S254A H435A Y436A (ヒト IgG1)	低下 h u F c R n に対する相対的結合性 < 0.1	短縮	Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
R255A K288A L309A S415A H433A (ヒト IgG1)	低下 (ヒト)	短縮	Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
P238A T256A E272A V305A T307A Q311A D312A K317A D376A A378Q E380A E382A S424A N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (ヒト IgG1)	向上 (ヒト)	伸長	Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
H435A (ヒト化 IgG1)	低下 h u F c R n に対する結合性 < 0.1 rel	短縮	Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002

10

20

30

突然変異	F c R n 結合性における効果	循環中での半減期	参考文献
I253A(結合せず) M252W M252Y M252Y/T256Q M252F/T256D N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E G385A/Q386P/N389S H433K/N434F/Y436H H433R/N434Y/Y436H G385R/Q386T/P387R/N389P M252Y/S254T/T256E/H433K /N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E/G385R /Q386T/P387R/N389P (ヒト Ig G 1)	向上 (マウス及び ヒト)	短縮 (マウス)	Dall'Acqua, J. Immunol. 169 (2002) 5171- 5180
M428L T250Q/M428L (ヒト Ig G 2)	向上 (ヒト)	伸長 (サル)	Hinton, P.R., et al., J. Biol. Chem. 279 (2004) 6213- 6216
M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (ヒト Ig G)	向上 (ヒト)	伸長 (マウス)	Vaccaro, C., et al., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1283- 1288
T307A/E380A/N434A (キメラ Ig G 1)	向上	トランスジェニック マウスにおいて伸長	Pop, L.M., et al., Int. Immunopharm acol. 5 (2005) 1279-1290
T250Q E380A M428L N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (ヒト Ig G 1)	向上 (ヒト)	トランスジェニック マウスにおいて伸長	Petkova, S.B., et al., Int. Immunol 18 (2006) 1759- 1769
I253A (ヒト Ig G 1)	低下 (ヒト)	トランスジェニック マウスにおいて短縮	Petkova, S.B., et al., Int. Immunol 18 (2006) 1759- 1769

10

20

30

40

突然変異	FcRn結合性における効果	循環中での半減期	参考文献
S239D/A330L/I332E M252Y/S254T/T256E (ヒト化)	向上 (ヒト及び カニクイザル)	カニクイザルにおいて伸長	Dall'Acqua, W.F., et al., J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524
T250Q M428L T250Q/M428L (ヒト IgG1)	向上 (ヒト)	アカゲザルにおいて 伸長	Hinton, P.R., et al., J. Immunol. 176 (2006) 346- 356
T250Q/M428L P257I/Q311I (ヒト化 IgG1)	向上 (マウス及び カニクイザル)	カニクイザルにおいて変化なし、マウスにおいて伸長	Datta- Mannan, A., et al., J. Biol. Chem. 282 (2007) 1709- 1717
P257I/Q311I P257I/N434H D376V/N434H (ヒト化 IgG1)	pH 6において 向上 (ヒト、 カニクイザル、 マウス)	マウス P257I / N434Hにおいて 短縮、カニクイザル において短縮	Datta- Mannan, A., et al., Drug Metab. Dispos. 35 (2007) 86-94
FcRn結合無効化 I253 H310 H433 H435 FcRn結合低下: Y436 FcRn結合向上: T250 N252 S254 T256 T307 M428 N434	向上及び低下	FcRnに対する IgGの結合能低下により、その血清持続性が低下する。より高い親和性のFcRn-IgG相互作用により、血清中の IgG及びFc結合薬剤の半減期が伸長する。	Ropeenian, D.C. and Akilesh, S., Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715- 725
N434A T307Q/N434A T307Q/N434S V308P/N434A T307Q/E380A/N434A (ヒト IgG1)	向上 (カニクイザル)	カニクイザルにおいて伸長	Yeung, Y.A., et al., Cancer Res. 70 (2010) 3269-3277

10

20

30

40

突然変異	FcRn結合性における効果	循環中での半減期	参考文献
256P	中性pHにおいて向上		国際公開公報 第2011/122011号
280K			
339T			
385H			
428L			
434W/Y/F/A/H (ヒトIgG)			

10

【0143】

Fvドメイン中の電荷分布が、抗体-FcRn結合性に影響を及ぼし、抗体とFcRnとの間の更なる相互作用をもたらすことができる事が見出された。これは、特にpH7.4での抗体-FcRn複合体の解離に関するFcRn結合特性を変化させることにより、抗体のFcRn依存性終末相半減期に影響を及ぼす(短縮する)。

【0144】

ヒト新生児Fcレセプター(FcRn)は、IgG異化に重要な役割を果たす。in vitroでのIgG-FcRn結合特性/特徴は、そのin vivo薬物動態特性を示している。このようなin vitro法は、繰り返しのin vivo研究を避けること(動物実験、時間、及び費用の削減)ができるため、抗体開発において非常に価値があるであろう。

20

【0145】

IgG-FcRn相互作用は、プラズモン表面共鳴(SPR)アッセイ法を使用して分析することができる(Wang, W., et al., Drug Metab. Disp. 39 (2011) 1469-1477; Datta-Mannan, A., et al., Drug Metab. Disp. 40 (2012) 1545-1555; Vaughn, D.E. and Bjorkman, P.J., Biochemistry 36 (1997) 9374-9380; Raghavan, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 11200-11204; Martin, W.L. and Bjorkman, P.J., Biochemistry 38 (1999) 12639-12647)。

【0146】

熱量及び非対称流れ場流動分別法も、FcRnに対するIgG結合親和性を評価するのに記載されている(Huber, A.H., et al., J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083; Polastrini, J., et al., Anal. Biochem. 414 (2011) 88-98)。

30

【0147】

複合体アッセイ法に加えて、SPRにより決定されるin vitroでのFcRn結合パラメータとin vivoでの抗体の血清半減期との間の相関を調査する幾つかの研究は、これまで、改善された結合反応条件及び適切なモデリングにも関わらず、このような相関を説明できていない(Gurbaxani, B., et al., Mol. Immunol. 43 (2006) 1462-1473; Gurbaxani, B.M. and Morrison, S.L., Mol. Immunol. 43 (2006) 1379-1389; Gurbaxani, B., Clin. Immunol. 122 (2007) 121-124)。

【0148】

40

SPR技術により測定された、pH6及び中性pHでのIgG1のFcRnに対する親和性を改善するためのIgG1のFc領域の操作は、カニクイザルにおいて改善された薬物動態をもたらさなかった(Yeung, Y.A., et al., J. Immunol. 182 (2009) 7663-7671)。ただし、pH7.4でのFcRnに対する同時の顕著な結合性を伴わずに、pH6において、N434A IgG1変異体におけるFcRn親和性がわずかにのみ向上したことは、靈長類において改善された薬物動態をもたらし、これは、pH7.4でのFcRn放出の重要性を説明している(上記Yeung, Y.A.,を参照のこと)。

【0149】

例えば、IgG-FcRn相互作用のSPR分析は、サンプルの予測又は予想外の結合特性を示す定性的結果を提供するが、予想外の結合性の原因のヒントも、予想外の結合性

50

を有する抗体量の定量的推測も提供しない。

【0150】

正の線形勾配溶出を使用する FcRn 親和性クロマトグラフィー法は、国際公開公報第 2013 / 120929 号に報告されている。

【0151】

b) FcRn - Fab 電荷媒介性相互作用

Fc 領域の特定の操作は、Fc 領域とFcRnとの間の相互作用を変化させることにより、PK パラメータに影響を及ぼすことが公知であり、特定のPK 特性を有する治療抗体を設計するのに使用してきた [33, 34]。

【0152】

近年、FcRn 相互作用におけるFab 領域の影響が議論されてきたが、同じ野生型ヒトFc 領域配列であるが、Fab 領域が異なる抗体の場合に、FcRn 親和性において差異を示し、PK が変化した。この相互作用のメカニズムは、不明なままである [23, 24]。

【0153】

FcRn 媒介性 IgG ホメオスタシスに対するFab 領域の影響因子を示すために、抗体ペアであるブリアキヌマブ (Ozespa (商標)) とウステキヌマブ (Stelara (商標)) とを、モデル系として使用した。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブは両方とも、完全なヒトモノクローナル IgG1 抗体である。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブは、インターロイキン 12 (IL-12) 及びインターロイキン 23 (IL-23) の同じヒト p40 - サブユニットに結合し [26]、対応するマウス IL-12 及び IL-23 に対して交差反応性でない [27, 28]。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブはそれぞれ、V_H5 の V 1D 生殖系ファミリーである可変重鎖及び軽鎖ドメインを有し、IgG1 抗体、ならびに、V_H3 の V 1 生殖系ファミリーである可変重鎖及び軽鎖ドメインを有し、IgG1 抗体である。異なる可変ドメインに加えて、ブリアキヌマブ及びウステキヌマブは、定常ドメイン中の幾つかのアロタイプ特異的アミノ酸において差異を示す (図 5 を参照のこと)。ただし、これらのアミノ酸残基は、(同じ抗体の) FcRn 結合領域の外側であるため、FcRn 依存性 PK において役割を果たさないと考えることができる [11]。興味深いことに、ウステキヌマブは、22日の (報告された) 中央終末相半減期を有する [29] が、一方で、ブリアキヌマブは、8 ~ 9日のみの終末相半減期を有する [26, 30, 31]。

【0154】

c) 電荷分布及び pH 依存性の正味電荷

ブリアキヌマブは、7.4 の生理学的 pH において不均一な電荷分布を示す (例えば、ウステキヌマブの公開されている結晶構造 [27] 及びブリアキヌマブの相同性モデルを参照のこと)。ブリアキヌマブは、Fv ドメイン上に大きな正に電荷した領域を示す (図 1a を参照のこと)。この領域は、ウステキヌマブには存在しない (図 1b を参照のこと)。更に、FcRn は、強力で、広い負に電荷した領域を有する (図 1c を参照のこと)。ただし、この領域は、同じ抗体のFc 領域結合性に関与しない。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブはそれぞれ、9.7 及び 9.4 の算出等電点を有する。更に、ブリアキヌマブの正味電荷は、pH 範囲全体にわたって、わずかにより正である (図 1d を参照のこと)。

【0155】

pH 6.0 でのブリアキヌマブ及びウステキヌマブのFcRn 結合親和性は同等である。すなわち、両方の値は、最大で 1 衡又は規模、一実施態様では、最大 5 倍異なる。一方、FcRn からの解離は、非常に異なる。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブの変異体を使用して、相互作用は、主に静電的であり、正に荷電した領域 (以下を参照のこと) の範囲に相關することを示すことができる。

【0156】

d) pH 依存性 FcRn - IgG 相互作用

10

20

30

40

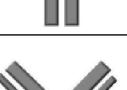
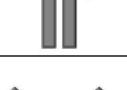
50

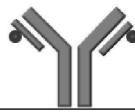
ブリアキヌマブ及びウステキヌマブの10個の変異体が合成され、FcRn親和性クロマトグラフィーにより、そのFcRn結合特性に関して特徴決定されている（表2を参照のこと）。変異体において、可変領域が改変されており、pH6でのFcRn結合親和性及びFcRn解離について、表面プラズモン共鳴（SPR）及びFcRn親和性クロマトグラフィーをそれぞれ使用して試験されている（表3を参照のこと）。

【0157】

表2：ブリアキヌマブ及びウステキヌマブの体系的に操作された変異体。Fc、LC、及びCDR等の構造部分を、ブリアキヌマブ（明部）とウステキヌマブ（暗部）との間で交換した：mA b 1～6。ブリアキヌマブのHC中の3つ及び5つの塩基性アミノ酸をそれぞれ、mA b 7及びmA b 8のために、（部位特異的突然変異誘発により）アラニン残基に交換した。mA b 9は、軽鎖CDR中の3つの塩基性アミノ酸がアラニン残基に交換されたブリアキヌマブである。mA b 10は、HC中の5つの塩基性アミノ酸の更なる交換を有するmA b 9を表す。1つの塩基性アミノ酸の交換を、円で示し、交換された3つのアミノ酸を、1つの円として描画し、交換された5つのアミノ酸を、2つの円として描画する。

【表 3 1】

No	名称	説明		F c R n カラム保持時間 [分]	p H 勾配	p H 勾配 + 高塩	塩 勾配	T1/2[時間]
1	ブリアキヌマブ	ブリアキヌマブ 野生型		93.7	83.1	59.6	48	
2	ウステキヌマブ	ウステキヌマブ 野生型		84.3	80.4	31.3	137	10
3	mAb 1	ウステキヌマブ Fv + ブリアキヌマブ 定常ドメイン		84.3	80.4	33.0		
4	mAb 2	ブリアキヌマブ Fv + ウステキヌマブ 定常ドメイン		93.0	83.0	58.5		
5	mAb 3	ウステキヌマブ HC + ブリアキヌマブ LC		92.4	83.0	53.9		20
6	mAb 4	ブリアキヌマブ HC + ウステキヌマブ LC		84.5	80.9	34.0		
7	mAb 5	ブリアキヌマブ 上にウステキヌマブ CDR		85.1	80.9	37.4		
8	mAb 6	ウステキヌマブ 上にブリアキヌマブ CDR		86.2	81.4	40.7		30
9	mAb 7	ブリアキヌマブ R19HCA、 K64HCA、 R83HCA*		90.4	82.7	52.1		
10	mAb 8	ブリアキヌマブ R16HCA、 R19HCA、 K57HCA、 K64HCA、 R83HCA*		90.1	82.6	49.5	78	40

No	名称	説明		F c R n カラム保持時間 [分]			T1/2[時間]
11	mAb 9	ブリアキヌマブ R 27 LCA、 R 55 LCA、 R 94 LCA*		86.2	81.6	38.1	109
12	mAb 10	ブリアキヌマブ R 16 HCA、 R 19 HCA、 K 57 HCA、 K 64 HCA、 R 83 HCA、 R 27 LCA、 R 55 LCA、 R 94 LCA*		85.0	81.3	22.4	

【 0 1 5 8 】

表3：全ての試験した抗体のF c R n 結合親和性及び電荷分布。抗体を、F c R n カラムの保持時間に従って分取する。平衡解離定数 K_D を、定常状態の親和性として算出し、ウステキヌマブの K_D に対して正規化した。相対 K_D 値（ウステキヌマブ = 1）の比較を、平均（n = 3）±標準偏差（SD）として表す。pH 6.0 及び pH 7.4 でのFvドメインの等電点及び正味電荷を算出した（SaWI-Tools）。F c R n カラムの保持時間は、pH 6.0 又は pH 7.4 でのFvドメインの等電点又は正味電荷とは相関しない。

【表3 2】

名称	ウステキヌマブ	mAb 1	mAb 4	mAb 5	mAb 6	mAb 9	mAb 8	mAb 7	mAb 3	mAb 2	ブリアキヌマブ
保持時間 [分]	84.3	84.3	84.5	85.1	86.2	86.2	90.1	90.4	92.4	93.0	93.7
rel. K_D	1.00 ± 0.22	1.0 ± 0.08	0.5 ± 0.16	0.9 ± 0.17	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.07	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06	0.3 ± 0.19	0.2 ± 0.07
calc. pI (IgG)	9.4	9.5	9.5	9.6	9.4	9.4	9.3	9.4	9.5	9.4	9.7
q(VL) pH 6.0	2.1	2.1	2.1	2.1	3.9	0.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
q(VL) pH 7.4	1.9	1.9	1.9	1.9	3.0	0.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
q(VH) pH 6.0	3.1	3.1	6.4	4.1	5.4	6.4	1.4	3.4	3.1	6.4	6.4
q(VH) pH 7.4	2.9	2.9	4.3	3.9	3.3	4.3	-0.7	1.3	2.9	4.3	4.3
q(Fv) pH 6.0	5.2	5.2	8.4	6.1	9.2	7.2	5.2	7.2	6.9	10.2	10.2
q(Fv) pH 7.4	4.9	4.9	6.2	5.9	6.3	4.3	2.3	4.3	6.0	7.3	7.3

【 0 1 5 9 】

pH 6 でのF c R n 結合親和性は、11個全ての抗体について狭い範囲にある（表3を参照のこと）。平衡解離定数（ K_D ）を、ウステキヌマブに対して算出した（ウステキヌマブ = 1.0）。ブリアキヌマブは、0.2の相対 K_D を有した。9つの変異体は、ブリアキヌマブとウステキヌマブとの間の範囲にあった。このため、異なる in vivo で

10

20

30

40

50

の終末相半減期は、pH 6.0 での異なる FcRn 結合性によるものではないということを結論付けることができる。

【0160】

本明細書で報告された一態様は、下記工程：

a) 変異抗体及びその親抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH 6 における K_D 値を決定する工程と、

b) 高塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体とその親抗体との間の工程 b) で決定された保持時間が、実質的に異なる場合、in vivo での半減期に影響を及ぼす抗体 - Fc - FcRn 複合体における抗体 - Fab - FcRn 相互作用の存在が決定される。
10

抗体の in vivo での半減期に影響を及ぼす抗体 - Fc - FcRn 複合体における抗体 - Fab - FcRn 相互作用の存在を決定する方法である。

【0161】

本明細書で報告された一態様は、下記工程：

a) 変異抗体及びその親抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH 6 における K_D 値を決定する工程と、

b) 高塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、
20

これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より短い / 小さい場合、抗体は、その親抗体と比較して相対的に短い in vivo での半減期を有し、また、これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より長い / 大きい場合、抗体は、その親抗体と比較して相対的に長い in vivo での半減期を有する、

抗体の相対的な in vivo での半減期を決定する方法である。

【0162】

本明細書で報告された一態様は、下記工程：

a) 変異抗体及びその親抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH 6 における K_D 値を決定する工程と、
30

b) 高塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より短い / 小さい場合、抗体は、その親抗体と比較して短い in vivo での半減期を有し、また、これにより、 K_D 値が、最大 10 倍異なり、変異抗体の工程 b) で決定された保持時間が、その親抗体の保持時間より長い / 大きい場合、抗体は、その親抗体と比較して長い in vivo での半減期を有する、

抗体の in vivo での半減期の伸長又は短縮を決定する方法である。

【0163】

12 個の抗体の溶出プロファイルを、正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性カラムを使用して分析した（図 2 を参照のこと）。ウステキヌマブ、及びブリアキヌマブの正常部上にウステキヌマブの Fv ドメインを有する mAb 1 は、84 分付近の区別できない保持時間を示した。このことは、Fv ドメインが FcRn との相互作用に影響を及ぼすことを示している。一方、ブリアキヌマブは、94 分の保持時間で溶出したため、ウステキヌマブと比較して明らかに異なる保持時間を持つ。ブリアキヌマブの IgE 開裂 Fc 領域（85.7 分）とウステキヌマブ（85.2 分）の区別できない保持時間は、Fc 領域の役割を無視できることを示した。ウステキヌマブ LC (LC = 軽鎖、HC = 重鎖) 及びブリアキヌマブ HC を含有する mAb 4 は、ウステキヌマブに近い保持時間を有した。このことは、FcRn 結合における LC の影響を示す。
40
50

【0164】

変異抗体 mAb 5 及び mAb 6 は、ブリアキヌマブのフレームワーク上にウステキヌマブ CDR (重鎖及び軽鎖の部分) を有し、及びその逆を有する。ブリアキヌマブ上にウステキヌマブ CDR をグラフト化すること (mAb 5) により、mAb 5 の保持時間は、ウステキヌマブの保持時間に近づくようにシフトした。ウステキヌマブ上にブリアキヌマブ CDR をグラフト化すること (mAb 6) により、ウステキヌマブにもっと近づいた溶出プロファイルが説明 / 表示された。

【0165】

ブリアキヌマブからウステキヌマブの方向への強力な保持時間シフトが、軽鎖 CDR 中の 3 つの正に電荷した残基をアラニン残基に突然変異させたブリアキヌマブ変異体である mAb 9 について観察された。 10

【0166】

ブリアキヌマブの重鎖中の 3 つ及び 5 つの正に電荷した残基をそれぞれ、mAb 7 及び mAb 8 において突然変異させた。これらの変異体では、保持時間は、ブリアキヌマブに對してシフトした。

【0167】

ウステキヌマブの HC 及びブリアキヌマブの LC を含む mAb 3 と、ウステキヌマブの定常ドメイン上にブリアキヌマブの Fv ドメインを含有する mAb 2 とは両方とも、ブリアキヌマブの近くで溶出した。 20

【0168】

まとめると、データから、Fv ドメインは、FcRn 解離に影響を及ぼし、(pH 6.0 での) FcRn 結合に影響を及ぼさないことが示される。

【0169】

FcRn カラム保持時間を、抗体の等電点及び正味電荷と整列させた。リソソームの pH 6.0 又は生理学的 pH 7.4 において、FcRn カラム保持時間と、Fv ドメインの等電点又は正味電荷との間には、相間を見ることができない (表 3 を参照のこと)。ただし、測定した FcRn カラム保持時間は、特に、軽鎖可変ドメイン周囲の正に電荷した領域の程度を共に伸長した (図 2 を参照のこと)。 30

【0170】

本明細書で報告された一態様は、

抗体軽鎖中の 27、55、及び 94 位 (Kabat によるナンバリング) の荷電アミノ酸残基を、疎水性又は中性の親水性アミノ酸残基に変化させることにより、抗体の in vivo での半減期を伸長する工程を含む、

抗体の in vivo での半減期を伸長する方法である。

【0171】

アミノ酸は、共通する側鎖特性に従って分類することができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性で親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎮配向性に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族性：Trp、Tyr、Phe。 40

【0172】

酸性及び塩基性アミノ酸残基は、荷電したアミノ酸残基のグループにまとめられる。

【0173】

また、FcRn カラム保持時間を、移動相中の増大したイオン強度での種々の設定において、すなわち、増大した塩濃度の存在下において決定した。電荷媒介性相互作用は、高イオン強度条件下において、弱められるのが公知である。一方、疎水性相互作用は、典型的には、塩により強められる。ブリアキヌマブの FcRn カラム保持時間が塩の存在下で短縮され、電荷スクリーニングのデバイ - ヒュッケル法に示唆されたように、イオン強度 50

の逆平方根に比例したことが見出された [32]。ウステキヌマブの保持時間は、基本的に影響を受けないままであった（図 6 を参照のこと）。このため、過剰な FcRn - ブリアキヌマブ相互作用の相当な部分が、荷電媒介性である。

【 0174 】

上記をまとめると、操作された変異体の FcRn 親和性クロマトグラフィーは、同じ Fv ドメインを有する抗体 (mAb1 及び mAb2) と、同じ LC を有する抗体 (mAb3 及び mAb4) とは、ほぼ同一の FcRn カラム保持時間で溶出することを示した。更に、ブリアキヌマブ上にウステキヌマブ CDR をグラフト化すること (mAb5) により、溶出 pH は、ウステキヌマブの溶出 pH に近づくようにシフトする。このため、軽鎖 CDR は、ブリアキヌマブの FcRn 結合性に主な影響を提供する。

10

【 0175 】

ウステキヌマブ上にブリアキヌマブ CDR をグラフト化すること (mAb6) により、ウステキヌマブにもっと近づいた溶出プロファイルが示された。このため、理論に拘束されるものではないが、抗体 - FcRn 相互作用は、より小さく正に電荷した領域を形成することによるより、ブリアキヌマブの大きな正に電荷した領域を破壊することにより影響を受ける可能性がある。MD シミュレーション（以下を参照のこと）により示唆されるように、正に電荷した Fv ドメインと FcRn 中の負に電荷した領域との間を直接安定化する相互作用は、容易に実行できる。このため、FcRn - Fv 相互作用は、生理学的条件下での、FcRn - IgG 複合体の通常より遅い解離をもたらすことができる。

【 0176 】

20

e) ヒト FcRn トランスジェニックマウスにおける薬物動態の FcRn 溶出 pH との相関

以前の研究において、抗体と内皮細胞表面上の負に電荷した基との間での静電相互作用に影響を及ぼすことにより、正味電荷が、変化した薬物動態特性のための駆動力となることが議論されてきた [35, 36]。例えば、Igawa et al. [37] は、可変領域中の操作によるより低い等電点 (pI) を有する IgG4 抗体が、より遅い速度の流動相飲作用、続けて、低下した除去速度を有することを観察した。更に、Boswell et al. [38] は、pI の差異が、PK に影響を及ぼす少なくとも 1 つのユニットに必要であったと提案した。

【 0177 】

30

ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、mAb8、及び mAb9 の pI は、9.3 ~ 9.7 で変動する。したがって、流動相飲作用における pI の差異による影響は最小であると仮定することができる。ただし、高イオン強度条件下でのブリアキヌマブのより短い FcRn カラム保持時間（上記を参照のこと）と、MD シミュレーションにおけるウステキヌマブと比較した FcRn - Fv 相互作用に対するより高い静電的寄与（以下を参照のこと）とから、特異的に位置した電荷が、FcRn - IgG 相互作用における主な影響因子であることができることが示される。Fv ドメイン中における電荷の影響を、突然変異させたブリアキヌマブ HC 中の 3 つ (mAb7) 及び 5 つ (mAb8) の正に電荷した残基を有する突然変異体と、軽鎖 CDR 中に突然変異させた 3 つの正に電荷した残基を有するブリアキヌマブ (mAb9) とを使用して分析した。mAb7 及び mAb8 は、保持時間が、ウステキヌマブの方向に小さくシフトすることを示す。このことから、電荷媒介性相互作用が確認される。一方、mAb9 は、保持時間が、ウステキヌマブの方向に大きくシフトすることを示す。このため、軽鎖 CDR 中に特異的に位置する電荷は、FcRn 解離に強力に影響を及ぼす。

40

【 0178 】

ブリアキヌマブの可変ドメイン中の突然変異させた荷電残基の FcRn 結合性における影響がモデュレーションされた in vivo での PK 特性に変換されるかどうかを評価するために、ヒト FcRn トランスジェニックマウスにおける PK 研究を行った。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブと共に、ブリアキヌマブとウステキヌマブとの間の FcRn カラム保持時間を有したブリアキヌマブの 2 つの変異体 (mAb8 及び mAb9) を試験

50

した。4つの抗体の分布及び除去プロセスは、他の IgG PK 研究と一致する（図 3 a を参照のこと）。ブリアキヌマブは、 - 期において、他の抗体より速い減少を示した。興味深いことに、ブリアキヌマブ及びウステキヌマブはそれぞれ、48 時間及び 137 時間の終末相半減期を示した（図 3 b を参照のこと）。Fv ドメイン中により小さい正に電荷した領域を有する変異体 mAb8 及び mAb9 はそれぞれ、78 時間及び 109 時間の終末相半減期を有した。統計学的有意差を、ブリアキヌマブ及びウステキヌマブ、ブリアキヌマブ及び mAb9、ならびにウステキヌマブ及び mAb8 の終末相半減期間で検出することができた。ウステキヌマブ、mAb9、mAb8、及びブリアキヌマブはそれぞれ、7.4、7.5、7.7、及び 7.9 の溶出 pH に対応して、84.3、86.2、90.1、及び 93.7 分で溶出した。このため、4つの IgG の終末相半減期は、in vitro での FcRn カラム溶出 pH 値と直線的に相關することが見出された（図 3 b を参照のこと）。 10

【0179】

PK 実験において、終末相半減期を試験した。この試験は、FcRn リサイクリングが優勢である排出相において排他的に算出される [39]。4つの抗体の終末相半減期は、in vitro での FcRn カラム溶出 pH と直線的に相關する。FcRn カラム溶出 pH が高いほど、終末相半減期がより短いため、このことは FcRn カラムが、in vitro での FcRn 解離のための予測 / 知覚ツールであることを実証する。終末相半減期と FcRn カラム溶出 pH との間の相關から、生理学的 pH での速い FcRn - IgG 解離の重要性が確認される。 20

【0180】

理論に拘束されるものではないが、FcRn - IgG 複合体は、pH 6.0 のエンドソーム中で構築されるため、ほとんど結合しない場合には、IgG リサイクリングがほとんどなく、より速いクリアランスがもたらされる。エキソサイト - シスにより、FcRn - IgG 複合体は、細胞膜に放出される。この場合、IgG と FcRn との解離は、7.4 の生理学的 pH において、短時間に行われる必要がある [40]。その結果、生理学的 pH での解離は、伸長した半減期にも重要である [22、40]。

【0181】

このため、より高い pH 値での解離が、FcRn からのより遅い解離を示すことが見出された。理論に拘束されるものではないが、このことは、血液循環に戻るように抗体を放出する代わりに、リソソーム中での抗体の分解をもたらす。 30

【0182】

このため、IgG の Fv ドメイン中の電荷は、IgG と FcRn との間の相互作用を変化させることにより、終末相半減期に影響を及ぼすことが見出された。FcRn と相互作用する Fab の構造部分が位置しており、相互作用は、荷電媒介性であることが実証された。PK 研究から、in vitro での FcRn - IgG 解離と in vivo での終末相半減期との間の直線的相關が証明された。

【0183】

f) FcRn - IgG モデルの分子動力学 (MD) シミュレーション

ヒト FcRn - Fc 複合体の相同性モデルを、公開されているラット FcRn 構造をテンプレートとして使用して生成した。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブの Fv ドメインの位置を、完全な IgG1 (PDB コード 1HZH) の結晶構造に基づいてモデル化した。これらの相同性モデルは、1つの完全な IgG 分子上に FcRn (-2 m を含む - FcRn) の 2 つのコピーを含有する（図 4 a を参照のこと）。FcRn と Fv ドメインとの間の距離は、開始構造において 40 超であり、生理学的条件下において、約 8 のディビー長を超える [32]。FcRn - IgG 複合体の動力学を、分子動力学シミュレーションにより、100 ns の期間にわたって、顕在する水及び生理学的イオン強度においてシミュレーションした。シミュレーションの経過中に、2 つの Fab 領域の一方が、FcRn の先端に近づき、シミュレーション時間の残りの間この配置で持続した（図 4 b、c、d を参照のこと）。Fv ドメインと相互作用することが見出された FcRn 上の領域 40

は、今まででは、IgG結合性に関与するとは説明されていなかった。驚くべきことに、MDシミュレーションにおいて、ブリアキヌマブだけでなくウステキヌマブも、FcとFcRnとが互いに相互作用するコンホーメーションが仮定された（図4b、cを参照のこと）。両複合体において、非対称な開始構造中の2種類の異なるペアのFcとFcRnドメインが互いに接近したことが見出された。FcRn-Fc相互作用に対する静電的寄与は、ブリアキヌマブにおいて、ウステキヌマブの程度より約2倍高いことが見出された（図4eを参照のこと）。

【0184】

まとめると、FcRn-IgG複合体のFabアームの固有のフレキシビリティが構造的に、FcドメインとFcRnの先端との直接的な安定化相互作用を可能にすることが見出された。
10

【0185】

g) 本発明の方法

g. i) 種々の塩濃度での正の線形pH勾配による溶出

本明細書において、下記2つの工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含む、方法が報告されている。
20

【0186】

第2の塩濃度は、一般的には、第1の塩濃度より高い/大きい。このため、これらの塩濃度は、ほぼ同一でない。すなわち、これらの濃度は、少なくとも10%、一実施態様では、少なくとも20%異なる。

【0187】

この方法について、単純なクロマトグラフィー法において、種々の塩濃度の存在下で得られた保持時間を比較することにより（図13を参照のこと）、又は、全長抗体及びそのFc領域の保持時間を比較することにより、抗体-Fc-FcRn複合体における抗体-Fab-FcRn相互作用の存在を決定することができる。これは、抗体-Fab-FcRn相互作用が抗体のin vivoでの半減期に影響を及ぼすため重要である。
30

【0188】

抗体/参照抗体ペアについて、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでのその保持時間に関する種々の関係と、そのFcRn相互作用に関する種々の関係とが存在する。

1) 抗体及び参照抗体は、工程a)及び工程b)において実質的に同じ保持時間有する。この場合、両抗体のin vivoでの半減期は、実質的に同じであるべきである。すなわち、in vivoでの半減期は、抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受けない。又は

2) 抗体及び参照抗体は、工程a)において実質的に同じ保持時間有するが、工程b)において異なる保持時間有する。この場合、抗体のin vivoでの半減期は、参照抗体のin vivoでの半減期より短い。すなわち、in vivoでの半減期は、抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受ける。
40

【0189】

本抗体は、親抗体の変異抗体であることができる。この場合、参照抗体は、親抗体である。

【0190】

一事例では、参照抗体は、IgE開裂又はパパイン開裂後のそのFc領域と実質的に同じ保持時間有する抗体である。

【0191】

今日知られている多様な疾患及び将来証明されるであろう疾患をも処置する治療法を提供するために、テーラーメイド抗体及びFc領域含有ポリペプチドの必要性が存在する。

【0192】

10

20

30

40

50

抗体のFcRn結合特性をテーラーメイドするために、FcRn相互作用に関与する残基を改変し、得られた改変抗体を試験しなければならない。要求される特徴に合致しなければ、同じプロセスを再度行う。

【0193】

このため、改変抗体における特徴の変化を分析するためのin vivoでの研究を必要としない単純なクロマトグラフィー法に基づいて、改変抗体の特徴的特性の変化を予測する方法を提供するのは有益であろう。

【0194】

一部の事例では、伸長した半減期を有する抗体が望ましい。例えば、処置を必要とする患者の循環中で伸長した半減期を有する薬剤は、用量を減らす、又は、投与間隔を広げる必要がある。このような抗体は、疾患部位、例えば、腫瘍に対する向上した曝露の利点も有する。

【0195】

in vivoでの半減期は、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間と相関する。これは、特に、抗体とFcRnとの間の相互作用がほぼ、抗体Fc領域中の残基によってのみ媒介される場合に当てはまる。ただし、抗体Fc領域の外側、例えば、抗体-Fab中の残基も、FcRnと相互作用する場合でも、この相関を、更に確認する必要がある。これは、低塩濃度及び高塩濃度又はインタクトな抗体及びFv領域開裂抗体(=Fc領域)の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィー法における保持時間の変化を利用する、本明細書で報告された方法により行うことができる。保持時間が、低から高に向かう塩濃度の変化、又は、Fc領域の開裂により実質的に影響を受けない場合、抗体-Fab-FcRn相互作用は存在せず、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでのより長い保持時間は、伸長したin vivoでの半減期と相関する。ただし、低から高に向かう塩濃度の変化、又は、Fc領域の開裂により、保持時間が影響を受ける場合、特に、保持時間が短縮される場合、in vivoでの半減期は、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムにおける保持時間とは異なって相関する。すなわち、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムにおけるより長い保持時間は、生理学的pHでの低下した抗体-FcRn解離、及び、理論に拘束されるものではないが、抗体の向上したリソソーム分解のために、より短いin vivoでの半減期に相関する。

【0196】

本明細書で使用されるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムは、マトリックスと、マトリックス結合クロマトグラフ官能基とを含む。この場合、このマトリックス結合クロマトグラフ官能基は、新生児Fcレセプター(FcRn)とベータ-2-ミクログロブリンとの非共有複合体を含む。

【0197】

一般的には、本明細書に報告された方法のための開始点は、FcRnに対するその結合性により特徴付けられた、親又は参照抗体である。

【0198】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程a)で決定された保持時間と工程b)で決定された保持時間が実質的に異なる場合、in vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体-Fc-FcRn複合体における抗体-Fab-FcRn相互作用の存在が決定される。

in vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体-Fc-FcRn複合体における抗体-Fab-FcRn相互作用の存在を決定するための本明細書に報告された方法の使用である。

10

20

30

40

50

【0199】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程a)で決定された保持時間と工程b)で決定された保持時間とが実質的に異なる場合、in vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体-Fc-FcRn複合体における抗体-Fab-FcRn相互作用の存在が決定される、

in vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体-Fc-FcRn複合体における抗体-Fab-FcRn相互作用の存在を決定する方法である。 10

【0200】

変異抗体は、親抗体ポリペプチドと比較した場合、又は、参照抗体と比較した場合、FcRnに対する向上又は低下した結合性のいずれかを示すため、親/参照抗体と比較して、血清中での変化した半減期を有する。

【0201】

一般的には、FcRnに対する向上した親和性（すなわち、親抗体又は参照抗体と比較して、FcRnカラムにおける伸長した保持時間）を有するFc領域変異体は、まず、FcRnに対する低下した親和性（すなわち、親抗体又は参照抗体と比較して、FcRnカラムにおける短縮した保持時間）を有するものと比較して、より長い血清半減期を有することが予測される。 20

【0202】

この予測されたin vivoでの半減期を、その後確認する必要がある。この確認のために、本明細書に報告された方法を使用することができる。

【0203】

伸長したin vivoでの半減期を有する抗体変異体は、哺乳類、特にヒトを処置する方法における適用を有する。この場合、例えば、慢性疾患又は障害の処置において、投与された抗体の半減期は、長いのが望ましい。

【0204】

FcRnに対して低下した親和性を有する抗体変異体は、哺乳類、特にヒトを処置する方法における適用を有する。この場合、例えば、in vivoでの画像診断において、投与された抗体又は融合ポリペプチドの半減期は、短いのが望ましい。 30

【0205】

低下したFcRn結合親和性を有する抗体変異体は、おそらく胎盤を通過できる可能性が高いため、妊婦における、特に、胎児の疾患又は障害の処置に使用することができる。加えて、低下したFcRn結合親和性は、脳、腎臓、及び/又は肝臓への適用/輸送を意図した薬剤に望ましい場合がある。

【0206】

本明細書に報告された一態様は、血管系から腎臓の糸球体の上皮を通過する低下した輸送を示す抗体を特定するための、本明細書に報告された方法の使用である。 40

【0207】

本明細書に報告された一態様は、脳から血管空間内への血液脳関門を通過する低下した輸送を示す抗体を特定するための、本明細書に報告された方法の使用である。

【0208】

本明細書に報告された全態様の一実施態様では、FcRnは、ヒトFcRn、カニクイザルFcRn、マウスFcRn、ラットFcRn、ヒツジFcRn、イヌFcRn、ブタFcRn、ミニブタFcRn、及びウサギFcRnから選択される。

【0209】

本明細書に報告された全態様の一実施態様では、ベータ-2-ミクログロブリンは、FcRnと同じ種由来である。 50

【0210】

本明細書に報告された全態様の一実施態様では、ベータ-2-ミクログロブリンは、FcRnとは異なる種由来である。

【0211】

一実施態様では、親抗体は、少なくとも1つの結合ドメインと、少なくとも1つのFc領域とを含む。一実施態様では、親抗体は、2つの結合ドメインと、2つのFc領域とを含む。

【0212】

一実施態様では、親抗体は、生物学的作用を媒介し、細胞に対するネガティブ又はポジティブシグナルの伝達を媒介するターゲット（一実施態様では、細胞表面レセプターに結合可能なりガンド又はリガンドに結合可能な細胞表面レセプター）に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインを含む。一実施態様では、親抗体は、減少又は除去のためにターゲッティングされる抗原（一実施態様では、細胞表面抗原又は可溶性抗原）に特異的な少なくとも1つの結合ドメインと、少なくとも1つのFc領域とを含む。

10

【0213】

ターゲットに特異的に結合する抗体は、関連する抗原（例えば、精製抗原、このような抗原を含む細胞もしくは細胞抽出物、又はこのような抗原をコードするDNA）と、場合により、補助剤との複数回の皮下又は腹腔内注入により、哺乳類中に生じさせることができる。

【0214】

20

一実施態様では、抗体は、全長抗体である。

【0215】

一実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0216】

一実施態様では、親抗体は、二重特異性抗体である。

【0217】

一実施態様では、親抗体は、キメラ抗体である。

【0218】

先の全態様の一実施態様では、pHは、約pH5.5から約pH8.8に向かう勾配である。

30

【0219】

一般的には、FcRnの可溶性細胞外ドメイン（ヒトFcRnについて、配列番号33）と、C末端His-Aviタグ（配列番号34）とを、哺乳類の細胞中において、²-ミクログロブリン（ヒトベータ-2-ミクログロブリンについて、配列番号35）と共に共発現させた。非共有FcRn-ミクログロブリン複合体をビオチン化し、ストレプトアビジン誘導体化セファロースにロードした。

【0220】

本明細書に報告された全態様の一実施態様では、新生児Fcレセプター（FcRn）とベータ-2-ミクログロブリンとの非共有複合体は、固体相に結合している。

【0221】

40

一実施態様では、固体相に対する非共有複合体のコンジュゲーションは、N末端及び/又は-アミノ基（リシン）、種々のリシンの-アミノ基、カルボキシ-、スルフヒドリル-、ヒドロキシリ-、及び/又は抗体のアミノ酸骨格のフェノール性官能基、ならびに/又は、抗体の炭水化物構造の糖アルコール基を介した化学結合により行われる。

【0222】

一実施態様では、非共有複合体は、特異的結合対を介して、固体相にコンジュゲートする。一実施態様では、非共有複合体は、ビオチンにコンジュゲートし、固体相への固定化は、固体支持体固定化アビジン又はストレプトアビジンを介して行われる。

【0223】

特異的結合対（第1の成分/第2の成分）は、一実施態様では、ストレプトアビジン又

50

はアビジン / ビオチン、抗体 / 抗原（例えば、Hermanson, G.T., et al., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (1996)を参照のこと）、レクチン / 多糖類、ステロイド / ステロイド結合タンパク質、ホルモン / ホルモンレセプター、酵素 / 基質、IgG / プロテインA及び / 又はG等から選択される。

【0224】

原理的に、任意のバッファー物質を、本明細書に報告された方法に使用することができる。

【0225】

マウスFc - マウスFcRn相互作用に重要なFc残基は、部位特異的突然変異誘発により特定されている（例えば、Dall'Acqua, W.F., et al. *J. Immunol.* 169 (2002) 5171-5180を参照のこと）。残基I253、H310、H433、N434、及びH435（KabatによるEUナンバリング）は、この相互作用に関与する（Medesan, C., et al., *Eur. J. Immunol.* 26 (1996) 2533; Firan, M., et al., *Int. Immunol.* 13 (2001) 993; Kim, J.K., et al., *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 542）。残基I253、H310、及びH435は、ヒトFcとマウスFcRnとの相互作用に重要であることが見出された（Kim, J.K., et al., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2819）。残基M252Y、S254T、T256Eは、タンパク質 - タンパク質相互作用研究により、FcRn結合が改善されることが、Dall'Acqua et al.により説明されている（Dall'Acqua, W.F., et al. *J. Biol. Chem.* 281(2006) 23514-23524）。ヒトFc - ヒトFcRn複合体の研究から、残基I253、S254、H435、及びY436が、この相互作用に重要であることが示されている（Firan, M., et al., *Int. Immunol.* 13 (2001) 993; Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604）。Yeung, Y.A., et al. (*J. Immunol.* 182 (2009) 7667-7671)には、残基248～259及び301～317及び376～382及び424～437の種々の突然変異体が報告され、試験されている。

【0226】

【表33】

表4: 種々の溶出バッファー及び勾配で得られた種々の抗体の保持

溶出バッファー	ベースとなる方法	保持時間 [分]					10
		ブリアキヌマブ	ウステキヌマブ	抗-Ox40L抗体	抗-Aベータ抗体	抗-HER2抗体(I253H-突然変異体)	
50 mM NaClを含む20 mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例5	未検	未検	43	44	未検	
140 mM NaClを含む20 mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例2	93.7	84.3	未検	未検	未検	
150 mM NaClを含む20 mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例5	未検	未検	45	45.5	結合せず	20
150 mM NaClを含む20 mM HEPE S、pH 8.6に調整	実施例5	未検	未検	48	48.5	未検	
300 mM NaClを含む20 mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例5	未検	未検	42.5	43	未検	
400 mM NaClを含む20 mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例3	83.1	80.4	未検	未検	未検	30

YTE-突然変異体という用語は、三重突然変異体M252Y/S254T/T256Eを意味する。

【0227】

一実施態様では、薬学的に許容し得るバッファー物質、例えば、リン酸又はその塩、酢酸又はその塩、クエン酸又はその塩、モルホリン又はその塩、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)又はその塩、ヒスチジン又はその塩、グリシン又はその塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)又はその塩、(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)又はその塩が使用される。

【0228】

一実施態様では、バッファー物質は、リン酸もしくはその塩、又は、酢酸もしくはその塩、又は、クエン酸もしくはその塩、又は、ヒスチジンもしくはその塩から選択される。

【0229】

一実施態様では、バッファー物質は、10 mM~500 mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、10 mM~300 mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、10 mM~250 mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、10 mM~100 mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、15 mM~50 mMの濃度

10

20

30

40

50

を有する。一実施態様では、バッファー物質は、約 20 mM の濃度を有する。

【0230】

正の線形 pH 勾配のための例示的な開始溶液は、一実施態様では、pH 5.5 に調整された、20 mM MES 及び 140 mM NaCl を含む。

【0231】

正の線形 pH 勾配のための例示的な終了溶液は、一実施態様では、pH 8.8 に調整された、20 mM TRIS 及び 140 mM NaCl を含む。

【0232】

勾配中に、開始溶液と終了溶液との混合物が、FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムにアプライされる。これにより、正の線形勾配は、100% 開始溶液（すなわち、純粹な開始溶液）で開始して、その後、開始溶液の割合が、100% から 0% に減少し、終了溶液の割合が、0% から 100% に増加する。これにより、正の線形 pH 勾配後に、100% 終了溶液を、カラムにアプライする。

【0233】

一実施態様では、開始溶液と終了溶液は、更なる塩を含む。一実施態様では、更なる塩は、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、クエン酸ナトリウム、又はクエン酸カリウムから選択される。一実施態様では、該溶液は、50 mM ~ 1000 mM 更なる塩を含む。一実施態様では、該溶液は、50 mM ~ 750 mM 更なる塩を含む。一実施態様では、該溶液は、50 mM ~ 500 mM 更なる塩を含む。一実施態様では、該溶液は、約 140 mM ~ 約 400 mM 更なる塩を含む。

【0234】

一実施態様では、開始溶液と終了溶液は、塩化ナトリウムを含む。一実施態様では、開始溶液と終了溶液は、約 140 mM ~ 約 400 mM 塩化ナトリウムを含む。

【0235】

ある種の塩及びバッファー物質が、保持時間及び分解能に影響を及ぼすことが見出された。抗体を FcRn に結合させるのに最適な塩濃度を決定することができる (140 mM NaCl)。塩濃度がより高い (400 mM) 場合、FcRn に対する結合性は、溶液のイオン強度の増大による、電荷相互作用による干渉のために低下し、より短い保持時間が得られる。

【0236】

このため、本明細書に報告された方法において、工程 a) 及び工程 b) に使用される溶液と、工程 a) 及び工程 b) に適用される勾配と、工程 a) 及び工程 b) におけるカラムのローディングと、工程 a) 及び工程 b) におけるカラム寸法及び FcRn 親和性クロマトグラフィー材料の量と、工程 a) 及び工程 b) における FcRn 親和性クロマトグラフィー材料中の FcRn 親和性リガンド密度と、工程 a) 及び工程 b) における固体相への FcRn のコンジュゲーションと、工程 a) 及び工程 b) における b2m 及び FcRn の性質は、同じであるか又は同一である。このため、本明細書に報告された方法において、工程 a) 及び工程 b) における FcRn 親和性クロマトグラフィーは、塩濃度を除いて、同一の条件下において行われる。同塩濃度は、工程 a) と工程 b) との間で異なる。一実施態様では、第 2 の塩濃度は、第 1 の塩濃度より大きい。一実施態様では、第 2 の塩濃度は、第 1 の塩濃度の少なくとも 2 倍である。

【0237】

図 7 から分かるように、アプライされる抗体量は、溶出ピークの曲線下面積に対して直線的な相関を示す。

【0238】

8 つの抗体を、完全な抗体として、かつ、酵素 I des による開裂後として分析した。開裂を、SDS page 及び分析用 SEC により制御した。Fc 領域及び抗体 - Fab を、調製用 SEC により分離した。

【0239】

10

20

30

40

50

【表34】

表5: 完全な抗体、抗体-Fab、及びFc領域の保持時間の比較

決定に使用された実施例	抗体	保持時間 [分]		
		完全な抗体	Fc領域	抗体-Fab
5	抗-IGF-1R抗体	44.5	45	結合せず
5	抗-IL13R α 抗体	44.5	45	結合せず
5	抗-HER2抗体	45	45	結合せず
5	抗-IL6R抗体	45	45	結合せず
5	抗-Ox40L抗体	45	45	結合せず
2	ブリアキヌマブ	93.7	85.7	未検
2	ウステキヌマブ	84.3	85.2	未検

10

20

【0240】

一般的には、野生型Fc領域を有する抗体(IgG1又はIgG2又はIgG4)の保持時間は、実施例5の条件下において、45~49分で変動する(36個の抗原に対して35個の治療抗体について試験、データを示さず)。実施例2の条件を使用する場合、保持時間は、勾配がより長いため、約85分に伸長する。

【0241】

【表35】

表6: カラム材料1グラム当たりの固定されたFcRnレセプター量に対する保持時間(実施例5のクロマトグラフィー条件)

30

溶出バッファー: 150mM NaClを含む 20mM Tris/HCl 1、pH 8.8に調整	保持時間 [分]	
	抗-Ox40L抗体	抗-Aベータ抗体
1. 2mg FcRn/g 固体相	42.5	42.5
3mg FcRn/g 固体相	45	45.5
6mg FcRn/g 固体相	48.5	49
12mg FcRn/g 固体相	48.5	49

40

【0242】

一般的には、本明細書に報告された方法及び使用における保持時間は、pH勾配の傾き及び利用される塩濃度に依存する。野生型抗体が参照として使用される場合、より弱い結合性は、より短い保持時間(=より早い溶出)により示される。一方、より強い結合性は、より長い保持時間(=より遅い溶出)により示される。

【0243】

IgGのFc領域における種々の突然変異体は、FcRnカラムにおいて異なって挙動し、改变された保持時間を示す。

50

【0244】

例えば、抗体 - IGF - 1R 抗体突然変異体YTEは、伸長した保持時間を見出す（図8を参照のこと）。

【0245】

【表36】

表7: Fc領域突然変異に関する保持時間の変化

抗体	保持時間 [分]
抗-IGF-1R抗体 (野生型)	44.5
抗-IGF-1R抗体 (YTE-突然変異体)	57.5

10

YTE-突然変異体という用語は、三重突然変異体M252Y/S254T/T256Eを意味する。

【0246】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程a)で決定された保持時間と工程b)で決定された保持時間が実質的に異なる場合、抗体は、IgG1、IgG3、又はIgG4のサブクラスの標準的/天然の抗体と比較して相対的に短いin vivoでの半減期を有する、

抗体の相対的なin vivoでの半減期を決定する方法である。

【0247】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程a)で決定された保持時間と工程b)で決定された保持時間が実質的に異なる場合、抗体は、IgG1、IgG3、又はIgG4のサブクラスの標準的/天然の抗体と比較して相対的に短いin vivoでの半減期を有する、

抗体の相対的なin vivoでの半減期を決定するための本明細書に報告された方法の使用である。

【0248】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、i)工程a)で決定された変異抗体の保持時間が、工程a)で決定されたその親抗体の保持時間より大きく/長く、ii)工程a)で決定された変異抗体の保持時間と工程b)で決定された変異抗体の保持時間が実質的に同じである場合、その親抗体に対する変異抗体のin vivoでの半減期が伸長され、また、これにより、i)工程a)で決定された変異抗体の保持時間が、工程a)で決定されたその親抗体の保持時間より小さく/短く、ii)工程a)で決定された変異抗体の保持時間と工程b)で決定された変異抗体の保持時間が実質的に同じである場合、その親抗体に対する変異抗体のin

vivoでの半減期が短縮される、

40

50

その親抗体に対する変異抗体の *in vivo* での半減期の伸長又は短縮を決定する方法である。

【0249】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの変異抗体及びその親抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、i) 工程a) で決定された変異抗体の保持時間が、工程a) で決定されたその親抗体の保持時間より大きく／長く、ii) 工程a) で決定された変異抗体の保持時間と工程b) で決定された変異抗体の保持時間が実質的に同じである場合、その親抗体に対する変異抗体の *in vivo* での半減期が伸長され、また、これにより、i) 工程a) で決定された変異抗体の保持時間が、工程a) で決定されたその親抗体の保持時間より小さく／短く、ii) 工程a) で決定された変異抗体の保持時間と工程b) で決定された変異抗体の保持時間が実質的に同じである場合、その親抗体に対する変異抗体の *in vivo* での半減期が短縮される、

その親抗体に対する変異抗体の *in vivo* での半減期の伸長又は短縮を決定するための本明細書に報告された方法の使用である。

【0250】

FcRnカラムからの遅い溶出を示した抗体、すなわち、FcRnカラムでのより長い保持を有し、抗体Fab - FcRn相互作用を示さない抗体が、より長い *in vivo* での半減期を有したことが見出された（実施例6を参照のこと）。

【0251】

【表37】

表8: *in vivo* データ

抗体	保持時間 [分]	<i>in vivo</i> での半減期 [時間]
抗-Aベータ抗体 (野生型)	45.5 (実施例5)	103 +/- 51
抗-IGF-1R抗体 (野生型)	45.5 (実施例5)	97 +/- 9
抗-IGF-1R抗体 (YTE-突然変異体)	58 (実施例5)	211 +/- 41
ブリアキヌマブ	93.7 (実施例2)	48
HC突然変異R16A、 R19A、K57A、K 64A、R83Aを有す るブリアキヌマブ	90.1 (実施例2)	78
LC突然変異R27A、 R55A、R94Aを有す るブリアキヌマブ	86.2 (実施例2)	109
ウステキヌマブ	84.3 (実施例2)	137

YTE-突然変異体という用語は、三重突然変異体M252Y/S254T/T256Eを意味する。

【0252】

本明細書に報告された一態様は、抗体の *in vivo* での半減期を決定するための本明細書に報告された方法の使用である。

【0253】

野生型IgG及びFc領域中にYTE-突然変異を有するIgG変異体について行われ

10

20

30

40

50

た *in vitro* 及び *in vivo* での実験のセットは、ヒト FcRn にトラスジェニックなマウスによる *in vivo* での薬物動態研究の相関と共に、FcRn 親和性クロマトグラフィーにおける半定量的相関の知見を示した (Spiekerman, G.M., et al. J. Exp. Med. 196 (2002) 303-310 ; Dall'Acqua, W.F., et al., J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524)。YTE-突然変異は、顕著に伸長した半減期及びより遅い血漿クリアランスをもたらす。より長い *in vivo* での半減期は、FcRn クロマトグラフィーにおけるより長い保持時間に対応した。近年、Fc 操作トラスシズマブ変異体の伸長した半減期が、フローサイトメトリーにより測定された場合、FcRn に対する *in vitro* での結合性を向上させたことが示された (Petkova, S.B., et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769)。11 倍の改善された FcRn 親和性を有する抗-VEGF IgG1 抗体であるベバシズマブの変異体は、ヒト FcRn トランスジェニックマウスにおいて 5 倍の伸長した半減期を有し、カニクイザルにおいて 3 倍長い半減期を有することが示された (Zalevsky, J., et al., Nat. Biotechnol. 28 (2010) 157-159)。

【0254】

抗体フォーマットは、FcRn カラムに対する結合性に影響を有さないことが示された。このことは、ノブ-into-ホールフォーマット及び幾つかの二重特異性抗体フォーマットについて示された。このため、本明細書に報告された方法は、新規な抗体フォーマットの評価に使用することができる。

【0255】

一実施態様では、複合体は、モノビオチン化されている。

20

【0256】

一実施態様では、リガンドとして新生児 Fc レセプター (FcRn) とベータ-2-ミクログロブリンとの非共有複合体を含むクロマトグラフィー材料は、本明細書に報告された方法及び使用において、少なくとも 100 サイクルの安定性を有する。サイクルは、各方法又は使用における第 1 の pH 値から第 2 の pH 値に向かう pH 勾配である。これにより、材料の再生のために、条件の更なる変更を、本方法又は使用の終了条件以外に必要としない。このため、一実施態様では、サイクルは、約 pH 5.5 の pH 値から約 pH 8.8 の pH 値に向かう pH 勾配である。

【0257】

g. iii) 抗体及びその Fc 領域の同じ塩濃度での正の線形 pH 勾配による溶出

30

本明細書において、下記 2 つの工程：

a) 第 1 の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 第 1 の塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体の Fc 領域の保持時間を決定する工程とを含む、方法が報告されている。

【0258】

この方法について、抗体及びその Fc 領域の保持時間を比較することにより、単純なクロマトグラフィー法において、抗体-Fc-FcRn 複合体における抗体-Fab-FcRn 相互作用の存在を決定することができる。Fc 領域は、例えば、酵素 Ides 又はパパインによる酵素的開裂により得ることができ、又は、リコンビナントに生成することができる。このことは、抗体-Fab-FcRn 相互作用が、抗体の *in vivo* での半減期に影響を及ぼすため重要である。

40

【0259】

抗体 / 抗体 - Fc 領域ペアについて、FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでのその保持時間に関する種々の関係と、同様に、その FcRn 相互作用に関する種々の関係とが存在する。

1) 抗体及びその Fc 領域は、実質的に同じ保持時間を有する。この場合、抗体の *in vivo* での半減期は、抗体-Fab-FcRn 相互作用により影響を受けない。

2) 抗体及びその Fc 領域は、異なる保持時間を有し、Fc 領域の保持時間は、抗体の

50

保持時間より短い。この場合、抗体の *in vivo* での半減期は、抗体 - F a b - F c R n 相互作用により影響を受ける。

【0260】

当該抗体が変異抗体である場合、更なる態様を考慮する必要がある。変異抗体では、抗体 - F c - F c R n 相互作用と、抗体 - F a b - F c R n 相互作用とは、親抗体に対して導入された改変により変化する場合がある。

【0261】

このため、親抗体、変異抗体、及びそれらの各 F c 領域間に、下記の可能性のある関係が存在する（図 10 を参照のこと）。

1) 親抗体（1）、変異抗体（3）、及びそれらの F c 領域（2、4）は、実質的に同じ保持時間有する。この場合、変異抗体の *in vivo* での半減期は、i) 抗体 - F a b - F c R n 相互作用により影響を受けず、ii) 親抗体の *in vivo* での半減期に対応する（図 10 A を参照のこと）。 10

2) 変異抗体（3）及びその F c 領域（4）は、異なる保持時間有し、変異抗体の F c 領域の保持時間は、変異抗体の保持時間より短く、親抗体（1）、親抗体の F c 領域（2）、及び変異抗体の F c 領域（4）は、実質的に同じ保持時間有する。この場合、変異抗体の *in vivo* での半減期は、i) 抗体 - F a b - F c R n 相互作用により影響を受け、ii) 親抗体の *in vivo* での半減期より短い（図 10 B を参照のこと）。

3) 親抗体（1）及び変異抗体（3）は、異なる保持時間有し、変異抗体の F c 領域（4）の保持時間は、変異抗体（3）の保持時間と実質的に同じであり、変異抗体の保持時間は、親抗体（1）の保持時間より長い。この場合、変異抗体の *in vivo* での半減期は、i) 抗体 - F a b - F c R n 相互作用により影響を受けず、ii) 親抗体の *in vivo* での半減期より長い（図 10 C を参照のこと）。 20

4) 親抗体（1）及び変異抗体（3）は、異なる保持時間有し、変異抗体の F c 領域（4）の保持時間は、変異抗体（3）の保持時間と実質的に同じであり、変異抗体（3）の保持時間は、親抗体（1）の保持時間より短い。この場合、変異抗体の *in vivo* での半減期は、i) 抗体 - F a b - F c R n 相互作用により影響を受けず、ii) 親抗体の *in vivo* での半減期より短い。

5) 親抗体（1）及び変異抗体（3）は、異なる保持時間有し、変異抗体の F c 領域（4）の保持時間は、変異抗体（3）の保持時間とは異なり、親抗体（1）及びその F c 領域（2）の保持時間とも異なり、変異抗体の F c 領域（4）の保持時間は、変異抗体（3）の保持時間と親抗体（4）の保持時間との間である。この場合、変異抗体の *in vivo* での半減期は、i) 抗体 - F a b - F c R n 相互作用により影響を受け、ii) 親抗体の *in vivo* での半減期とは異なる（図 10 D を参照のこと）。 30

【0262】

一事例では、参照抗体は、I d e S 開裂又はパパイン開裂後のその F c 領域と実質的に同じ保持時間を有する抗体である。

【0263】

上記概説されたように、抗体 - F a b - F c R n 相互作用は、抗体の *in vivo* での半減期に影響を有する場合がある。また、上記概説されたように、抗体 - F c - F c R n 相互作用は、抗体の *in vivo* での半減期に影響を有する場合がある。このため、両相互作用を考慮する必要がある。 40

【0264】

例えば、Ropeenian及びAkilesh (Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715-725) は、例えば、ヒト化 Ig G 1 抗体である h u 4 D 5 (ハーセプチニン ; Genentech ; E R B B 2 特異的モノクローナル抗体) 変異体 A s n 4 3 4 A 1 a (N 4 3 4 A) 及び三重置換変異体 T h r 3 0 7 A 1 a / A s n 4 3 4 A 1 a / G l u 3 8 0 A 1 a (T 3 0 7 A / N 4 3 4 A / Q 3 8 0 A) がそれぞれ、p H 6 . 0 において、野生型 h u 4 D 5 抗体より、3 倍及び 12 倍高い親和性でヒト F c R n に結合することを報告している。予期しなかったことに、F c R n トランスジェニックヒト化マウスにおいて、これら 2 つの変異抗体の半減期は、 50

基本的に同等であった。この矛盾は、Ropeenian及びAkileshによれば、pH 7.4でのFcRnに対する三重置換変異体の向上した親和性により説明することができる。pH 7.4及びpH 6.0における結合親和性が改善するFc領域突然変異は、その半減期を伸長するよりもむしろ、実際には、in vivoでの抗体のクリアランスを加速させている可能性がある。

【0265】

このため、変異抗体のFc領域の保持時間が、境界保持時間より長いかどうかを、更に考慮する必要がある。理論に拘束されるものではないが、この境界保持時間は、pH 7.4での相互作用がpH 7.4での抗体-FcRn複合体の解離が減少するほど向上し、抗体の向上した分解をもたらす作用をもたらす（図11を参照のこと）。 10

【0266】

本発明の一態様は、下記工程（図12を参照のこと）：

a) 同じ溶出条件を使用するFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの、i) 抗体(3)、ii) 該抗体のFc領域(4)、iii) 参照抗体(1)、iv) 参照抗体のFc領域(2)、及びv) Fc領域中に突然変異N434Aを有する参照抗体(5)の保持時間を決定する工程と、

b) 抗体を選択する工程であって、

b-i) 参照抗体(1)、変異抗体(3)、及びそれらのFc領域(2、4)が、実質的に同じ保持時間を有し、抗体の保持時間が、Fc領域中に突然変異N434Aを有する参照抗体(5)の保持時間より短い抗体を選択することにより、in vivoでの半減期が、i) 抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受けず、ii) 親抗体のin vivoでの半減期に対応する（図12Aを参照のこと）抗体を選択し、 20

b-ii) 抗体(3)及びそのFc領域(4)が、異なる保持時間を有し、該抗体のFc領域(4)の保持時間が、抗体(3)の保持時間より短く、参照抗体(1)又はそのFc領域(2)の保持時間と同じ、又は、参照抗体(1)又はそのFc領域(2)の保持時間より長く、参照抗体(1)、参照抗体のFc領域(2)、及び抗体(3)の保持時間が、Fc領域中に突然変異N434Aを有する参照抗体(5)の保持時間より短い抗体を選択することにより、in vivoでの半減期が、i) 抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受け、ii) 参照抗体のin vivoでの半減期より短い（図12Bを参照のこと）抗体を選択し、 30

b-iii) 参照抗体(1)及び抗体(3)が、異なる保持時間を有し、抗体のFc領域(4)の保持時間が、抗体(3)の保持時間と実質的に同じであり、抗体(3)の保持時間が、参照抗体(1)の保持時間より長く、抗体(3)の保持時間が、Fc領域中に突然変異N434Aを有する参照抗体(5)の保持時間より短い抗体を選択することにより、in vivoでの半減期が、i) 抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受けず、ii) 参照抗体のin vivoでの半減期より長い（図12Cを参照のこと）抗体を選択し、

b-iv) 参照抗体(1)及び抗体(3)が、異なる保持時間を有し、抗体のFc領域(4)の保持時間が、抗体(3)の保持時間と実質的に同じであり、抗体(3)の保持時間が、参照抗体(1)の保持時間より短く、抗体(3)の保持時間が、Fc領域中に突然変異N434Aを有する参照抗体(5)の保持時間より短い抗体を選択することにより、in vivoでの半減期が、i) 抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受けず、ii) 参照抗体のin vivoでの半減期より短い（図12Dを参照のこと）抗体を選択し、 40

b-v) 参照抗体(1)及び抗体(3)が、異なる保持時間を有し、抗体のFc領域(4)の保持時間が、抗体(3)の保持時間とは異なり、参照抗体(1)及びそのFc領域(2)の保持時間とも異なり、抗体のFc領域(3)の保持時間が、抗体(3)の保持時間と参照抗体(1)の保持時間との間であり、抗体(3)の保持時間が、Fc領域中に突然変異N434Aを有する参照抗体(5)の保持時間より短い抗体を選択することにより、in vivoでの半減期が、i) 抗体-Fab-FcRn相互作用により影響を受 50

け、i i) 参照抗体の*in vivo*での半減期とは異なる(図12Eを参照のこと)抗体を選択する工程、とを含む、

抗体を選択する方法である。

【0267】

一実施態様では、溶出は、一定の塩濃度での正の線形pH勾配によるか、又は、一定のpH値での線形塩勾配を使用することによる。

【0268】

一実施態様では、抗体は、親抗体の変異抗体であり、参照抗体は、親抗体である。一実施態様では、変異抗体は、抗体-Fab又は/及び抗体-Fc領域中のアミノ酸変化を有する。

10

【0269】

g. i i i) 塩勾配による溶出

本明細書において、下記工程：

a) 塩勾配溶出による第1のpH値におけるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程と、

b) 塩勾配溶出による第2のpH値におけるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程とを含む、方法が報告される。

【0270】

一定塩濃度でのpH勾配による溶出に加えて、一定pH値での塩勾配による溶出も、抗体-Fc-FcRn複合体における抗体-Fab-FcRn相互作用が存在するか否かを決定するのに使用することができることが見出された。

20

【0271】

既に上記概説されたように、抗体-Fab-FcRn相互作用は、抗体-Fc-FcRn複合体が形成された後に、少しでも存在する場合、確立される二次的相互作用である。

【0272】

両相互作用、すなわち、抗体-Fc-FcRn相互作用及び抗体-Fab-FcRn相互作用は、電荷媒介性非共有相互作用である。

【0273】

本明細書に報告された一態様は、下記工程：

a) 塩勾配溶出による第1のpH値におけるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程と、

30

b) 塩勾配溶出による第2のpH値におけるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程とを含み、

これにより、工程a)で決定された抗体及び参照抗体の保持時間の比が、工程b)で決定された抗体及び参照抗体の保持時間の比と実質的に異なる場合、抗体の*in vivo*での半減期に影響を及ぼす抗体-Fab-FcRn相互作用の存在が決定される、

抗体の*in vivo*での半減期に影響を及ぼす抗体-Fab-FcRn相互作用の存在を決定する方法である。

【0274】

一実施態様では、第1のpH値は、5.5である。一実施態様では、第2のpH値は、8.8である。

40

【0275】

一実施態様では、工程a)及び工程b)における塩勾配は同一である。

【0276】

一実施態様では、塩勾配は、塩化ナトリウム勾配である。

【0277】

一実施態様では、塩勾配は、0mM~250mM塩である。

【0278】

h) ベバシズマブ及びベバシズマブ突然変異体

CDR中に電荷パッチを有さない別の分子は、LC-CDR中に正の電荷パッチを形成

50

して、この位置での正の電荷が一般的に抗体の F c R n 結合親和性に影響を及ぼすという上記で報告された知見を実証するのに選択される。

【 0 2 7 9 】

ベバシズマブは、 L C - C D R 中にわずかな電荷のみを有しているため、選択された。ブリアキヌマブを使用して特定された 3 つの塩基性アミノ酸残基は、アルギニン残基 R 2 7 、 R 5 5 、及び R 9 4 である。ベバシズマブのアミノ酸配列において、アスパラギン酸 D 2 7 、ロイシン L 5 4 、及びスレオニン T 9 3 は、リシン残基に交換され、正の電荷パッチを形成する（図 1 4 を参照のこと）。

【 0 2 8 0 】

ベバシズマブ - 野生型及びベバシズマブ - 突然変異体の F c R n 親和性クロマトグラムは、表 9 に示される。各保持時間は、下記表 9 に列記される。

【 0 2 8 1 】

【表 3 8 】

表 9: ベバシズマブ - 野生型及びベバシズマブ - 突然変異体の F c R n カラム保持時間

サンプル	保持時間 [分]
ウステキヌマブ	83.6
ブリアキブマブ	91.6
ベバシズマブ - 野生型	84.7
ベバシズマブ - 突然変異体	86.9

【 0 2 8 2 】

ベバシズマブ - 野生型は、 8 4 . 7 分の保持時間有する。一方、ベバシズマブ - 突然変異体は、 8 6 . 9 分後に溶出する。このため、ベバシズマブの F v 中の正の電荷パッチは、保持時間を 2 . 2 分シフトさせる。この結果から、 I g G 1 の F v 中の電荷は、一般的に F c R n 結合親和性に影響を及ぼすこと、特に、 F c R n からの解離が影響を受けることが示される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 8 3 】

【 図 1 】電荷分布及び pH 依存性正味電荷。 pH 7 . 4 においてプロトン化され、 2 k_B T / e で描かれたタンパク質の等ポテンシャル表面。黒：正 / 負。（ a ）ブリアキヌマブ。軽鎖を、薄い灰色で示す。重鎖を、濃い灰色で示す。中央及び右側の画像の視野はそれぞれ、垂直及び水平軸についての回転による、左側のパネル中の視野に関する。（ b ）ウステキヌマブ。軽鎖及び重鎖はそれぞれ、薄い及び濃い灰色で着色されている。視野は、（ a ）と同一である。（ c ）ヒト F c R n 相同性モデルの 2 k_B T / e で描かれた等ポテンシャル表面。 F c ドメインを、明確性のために示す。（ d ）配列をベースに算出した正味電荷 v s ブリアキヌマブ及びウステキヌマブの pH 。タンパク質構造を、 DiscoveryStudio Pro で作製した。

【 図 2 】 pH 依存性 F c R n - I g G 相互作用。 1 1 個の I g G 変異体の F c R n 親和性クロマトグラムを、明確性のために、強度正規化した。 pH 7 . 4 でプロトン化された構造モデルの分子表面提示を、 2 k_B T / e で描かれた等ポテンシャル表面と重ねた。視野は、図 1 a の右側パネルと同一であり、 C D R 領域に焦点を当てる。第 2 の水平軸は、オフライン pH 測定から内挿した溶出 pH を示す。

【 図 3 】ヒト F c R n トランスジェニックマウスでの薬物動態における F c R n 溶出 pH の効果。抗体を、 1 群当たり 6 匹の動物に対して、一回の i . v . ボーラス注射（ 1 0 mg / kg ）として投与した。データ点は、平均 ± 標準偏差を表す。（ a ）ブリアキヌマブ（オレンジ色）、ウステキヌマブ（緑色）、 m A b 8 （紫色）、及び m A b 9 （青色）の血液

10

20

30

40

50

レベル曲線。(b)終末相半減期とFcRnカラム溶出pHとの間の相関。

【図4】FcRn-IgGモデルの分子動力学シミュレーション。(a)シミュレーション開始時のコンホーメーション。破線は、Fv領域とFcRn中の2つの例となるアミノ酸間の距離を示す。この距離は、パネル(c)中で示されるように、MDシミュレーション中に近づく。色は、図1と同一である。(b)シミュレーション終了時のコンホーメーション(t=100ns)。ボックスは、(c)に示される分子の部分を示す。(c)FcRnとFvドメインとの間の相互作用の詳細図。フレームワーク、CDR、及びFcRn残基の相互作用は、ブリアキヌマブとウステキヌマブとにおいて異なることに留意されたい。(d)シミュレーションの経過中での残基245(FcRn)と100(ウステキヌマブLC)及び29(ブリアキブマブLC)との間の距離。(e)シミュレーション終了時の相互作用エネルギー(96、97、98、99、及び100nsでのコンホーメーションの平均及び標準偏差)。「VDW」及び「静電」はそれぞれ、FcRn-Fab相互作用に対するファンデルワールス及び静電的寄与を意味する。タンパク質構造を、PyMol(商標)(Schrodinger LLC)により作製した。

【図5】ブリアキヌマブ及びウステキヌマブの軽鎖及び重鎖の配列アライメント。VH及びVL領域を、イタリック体で示す。CDRを、アスタリスク(*)でマークする。ハッシュ(#)¹⁰は、開始構造におけるFcRnに近接した(<4)アミノ酸を意味する。記号

【化1】

□

10

20

は、MD目的でFcRnに対するジスルフィド架橋を確立するために、Cysに突然変異させた残基をマークする。

【図6】ブリアキヌマブ及びウステキヌマブのFcRn親和性カラム保持時間の塩依存性。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブを、増加するNaCl量の存在下でのpH勾配溶出によるFcRn親和性カラムクロマトグラフィーに供した。データを、溶解した塩による電荷遮蔽効果を説明する逆平方根関数に当てはめる。ブリアキヌマブの保持時間は、

【数1】

$$\frac{1}{\sqrt{c(NaCl)}} \quad (r^2=0.898)$$

30

で短縮する。一方、ウステキヌマブの保持時間は、基本的に影響を受けないままである。

【図7】本明細書に報告された、アプライした抗体とFcRnカラムを使用するクロマトグラフィーの曲線下面積との直線性。

【図8】本明細書に報告されたFcRnカラムにおける、抗-IGF-1R抗体野生型及びYTE-突然変異体のクロマトグラム。

【図9】アバスチン-野生型及びアバスチン-突然変異体のFcRn親和性クロマトグラム。

【図10A】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1：親抗体、2：親抗体のFc領域、3：変異抗体、4：変異抗体のFc領域；実線：完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線：Fc領域のみ；A：野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし；B：野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり；C：改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし；D：改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり。

【図10B】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1：親抗体、2：親抗体のFc領域、3：変異抗体、4：変異抗体のFc領域；実線：完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線：Fc領域のみ；A：野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし；B：野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり；C：改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし；D：改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり。

40

50

+ Fc領域)、破線: Fc領域のみ; A: 野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし; B: 野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり; C: 改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし; D: 改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり。

【図10C】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:親抗体、2:親抗体のFc領域、3:変異抗体、4:変異抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ; A:野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし; B:野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり; C:改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし; D:改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり。

【図10D】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:親抗体、2:親抗体のFc領域、3:変異抗体、4:変異抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ; A:野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし; B:野生型様Fc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり; C:改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用なし; D:改善されたFcRn結合性を有する操作されたFc領域、抗体-Fab-FcRn相互作用あり。

【図11】改善されたFcRn結合性を有し、抗体-Fab-FcRn相互作用を有するが、抗体-FcRn相互作用が改善されたクリアランスをもたらすため、*in vivo*での半減期(境界保持時間を超える保持時間)が短縮している、操作された抗体を示すスキーム。

【図12A】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:参照抗体、2:参照抗体のFc領域、3:抗体、4:抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ。

【図12B】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:参照抗体、2:参照抗体のFc領域、3:抗体、4:抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ。

【図12C】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:参照抗体、2:参照抗体のFc領域、3:抗体、4:抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ。

【図12D】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:参照抗体、2:参照抗体のFc領域、3:抗体、4:抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ。

【図12E】Fc領域と抗体-Fabとの抗体-FcRn相互作用に依存する、FcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの保持時間変化のスキーム。1:参照抗体、2:参照抗体のFc領域、3:抗体、4:抗体のFc領域; 実線:完全な抗体(抗体-Fab+Fc領域)、破線:Fc領域のみ。

【図13】FcRn親和性クロマトグラフィーの保持時間の塩濃度への依存性と、抗体-Fab-FcRn相互作用。

【図14】ベバシズマブ及びベバシズマブ変異体の軽鎖可変ドメインの配列アライメント。同一及び類似するアミノ酸を、灰色で示す。CDRを、アスタリスク(*)でマークする。

10

20

30

40

50

【図15】ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及びmAb1～6のIL-12相互作用。
1:ブリアキヌマブ、2:ウステキヌマブ、3:mAb1、4:mAb2、5:mAb3
、6:mAb4、7:mAb5、8:mAb6。

【図16】ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及びmAb7～10のIL-12相互作用。
1:ブリアキヌマブ、2:ウステキヌマブ、3:mAb7、4:mAb8、5:mAb9
、6:mAb10。

【0284】

具体的な実施態様

1. 下記工程：

i) 第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第1の保持時間を決定し、第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第2の保持時間を決定する工程、又は

ii) 第1のpH値での線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第1の保持時間を決定し、第2のpH値での線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第2の保持時間を決定する工程、又は

iii) 抗体及び参照抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH6における K_D 値を決定し、高塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程、又は

iv) 抗体及び参照抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH6における K_D 値を決定し、線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程、又は

v) 正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程、又は

vi) 高pH値での線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程、又は

vii) 抗体及びそのFc領域について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH6における K_D 値を決定し、高塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程、又は

viii) 抗体及びそのFc領域について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH6における K_D 値を決定し、高pH値での線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程を含み、

a) 第2の保持時間と実質的に同じ第1の保持時間を有する抗体、又は

b) 参照抗体の K_D 値とは最大10倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間を有する抗体、又は

c) そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間を有する抗体、又は

d) そのFc領域の K_D 値とは最大10倍異なる K_D 値を有し、そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間を有する抗体

を選択することによる、抗体を選択する方法。

【0285】

2. 下記工程：

第1の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第1の保持時間を決定し、第2の塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第2の保持時間を決定する工程と、

a) 第2の保持時間と実質的に同じ第1の保持時間を有する抗体、又は

b) 参照抗体の K_D 値とは最大10倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間を有する抗体、又は

10

20

30

40

50

c) その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 d) その Fc 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体
 を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0286】

3. 下記工程：

第 1 の pH 値での線形塩勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第 1 の保持時間を決定し、第 2 の pH 値での線形塩勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の第 2 の保持時間を決定する工程と、

10

a) 第 2 の保持時間と実質的に同じ第 1 の保持時間有する抗体、又は
 b) 参照抗体の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 c) その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 d) その Fc 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体
 を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0287】

4. 下記工程：

抗体及び参照抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH 6 における K_D 値を決定し、高塩濃度の存在下での正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程と、

20

a) 第 2 の保持時間と実質的に同じ第 1 の保持時間有する抗体、又は
 b) 参照抗体の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 c) その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 d) その Fc 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体
 を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0288】

30

5. 下記工程：

抗体及び参照抗体について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH 6 における K_D 値を決定し、線形塩勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及び参照抗体の保持時間を決定する工程と、

a) 第 2 の保持時間と実質的に同じ第 1 の保持時間有する抗体、又は
 b) 参照抗体の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 c) その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 d) その Fc 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体
 を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

40

【0289】

6. 下記工程：

正の線形 pH 勾配溶出による FcRn 親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びその Fc 領域の保持時間を決定する工程と、

a) 第 2 の保持時間と実質的に同じ第 1 の保持時間有する抗体、又は
 b) 参照抗体の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 c) その Fc 領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
 d) その Fc 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その Fc 領域の保持

50

時間と実質的に同じ保持時間有する抗体を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0290】

7. 下記工程：

高pH値での線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程と、

- a) 第2の保持時間と実質的に同じ第1の保持時間有する抗体、又は
- b) 参照抗体のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
- c) そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
- d) そのFc領域のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体

を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0291】

8. 下記工程：

抗体及びそのFc領域について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH6におけるKD値を決定し、高塩濃度の存在下での正の線形pH勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程と、

- a) 第2の保持時間と実質的に同じ第1の保持時間有する抗体、又は
- b) 参照抗体のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
- c) そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
- d) そのFc領域のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体

を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0292】

9. 下記工程：

抗体及びそのFc領域について、表面プラズモン共鳴を使用して、pH6におけるKD値を決定し、高pH値での線形塩勾配溶出によるFcRn親和性クロマトグラフィーカラムでの抗体及びそのFc領域の保持時間を決定する工程と、

- a) 第2の保持時間と実質的に同じ第1の保持時間有する抗体、又は
- b) 参照抗体のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、参照抗体の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
- c) そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体、又は
- d) そのFc領域のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、そのFc領域の保持時間と実質的に同じ保持時間有する抗体

を選択する工程とを含む、抗体を選択する方法。

【0293】

10. 抗体のin vivoでの半減期に影響を及ぼす抗体-Fab-FcRn相互作用を含まない抗体を選択するためのものである、実施態様1~10のいずれか1つに記載の方法。

【0294】

11. IgG1、IgG3、又はIgG4サブクラスの抗体と比較して相対的に長いin vivoでの半減期有する抗体を選択するためのものであり、

更に、参照抗体又は参照Fc領域の保持時間を決定し、

a) 参照抗体の第1の保持時間より長い第1の保持時間有し、第2の保持時間と実質的に同じである第1の保持時間有する抗体、又は

b) 参照抗体のKD値とは最大10倍異なるKD値有し、参照抗体の保持時間より長い保持時間有する抗体、又は

c) そのFc領域の保持時間と実質的に同じであり、参照抗体の保持時間より長い保

10

20

30

40

50

持時間有する抗体、又は

d) その Fc 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その Fc 領域の保持時間と実質的に同じであり、参照抗体の保持時間より長い保持時間有する抗体を選択することによる、実施態様 1、6、7、8、及び 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0295】

12. 参照抗体に対して相対的に伸長又は短縮した抗体の in vivo での半減期を決定するためのものであり、

更に、参照抗体又は参照 Fc 領域の保持時間を決定し、

更に、突然変異 N434A を有する IgG Fc 領域の保持時間を決定し、

a) 参照抗体の第 1 の保持時間より長い第 1 の保持時間を有し、実質的に同じであり第 1 の保持時間と第 2 の保持時間を有し、突然変異 N434A を有する Fc 領域の保持時間より短い第 1 の保持時間を有する抗体を選択することにより、相対的に長い in vivo での半減期を有する抗体を選択し、又は

b) 参照抗体の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間より長い保持時間を有し、突然変異 N434A を有する Fc 領域の保持時間より短い第 1 の保持時間を有する抗体を選択することにより、相対的に長い in vivo での半減期を有する抗体を選択し、又は

c) 参照抗体の第 1 の保持時間より短い第 1 の保持時間を有し、実質的に同じである第 1 の保持時間と第 2 の保持時間を有する抗体を選択することにより、相対的に短い in vivo での半減期を有する抗体を選択し、又は

d) 参照抗体の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、参照抗体の保持時間より短い保持時間を有する抗体を選択することにより、相対的に長い in vivo での半減期を有する抗体を選択することによる、実施態様 1、6、7、8、及び 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0296】

13. (正の) 線形 pH 勾配が、約 pH 5.5 ~ 約 pH 8.8 である、実施態様 1、2、4、6、8、及び 10 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0297】

14. 塩が、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、クエン酸ナトリウム、又はクエン酸カリウムから選択される、実施態様 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0298】

15. 塩が、塩化ナトリウムである、実施態様 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0299】

16. 第 1 の塩濃度が、50 mM ~ 200 mM である、実施態様 1、2、及び 10 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0300】

17. 第 1 の塩濃度が、約 140 mM である、実施態様 1、2、及び 10 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0301】

18. 第 2 の塩濃度が、300 mM ~ 600 mM である、実施態様 1、2、及び 10 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0302】

19. 第 2 の塩濃度が、約 400 mM である、実施態様 1、2、及び 10 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0303】

20. 線形塩勾配が、0 mM 塩から 500 mM 塩に向かう、実施態様 1、3、5、7、及び 9 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0304】

21. 線形塩勾配が、0 mM 塩から 250 mM 塩に向かう、実施態様 1、3、5、7、及

10

20

30

40

50

び 9 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 0 5 】

2 2 . 第 1 の pH 値が、約 5 . 5 である、実施態様 1 、 3 、及び 1 0 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 0 6 】

2 3 . 第 2 の pH 値が、約 7 . 4 である、実施態様 1 、 3 、及び 1 0 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 0 7 】

2 4 . 高塩濃度が、2 5 0 mM ~ 6 0 0 mM である、実施態様 1 、 4 、 8 、及び 1 0 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 0 8 】

2 5 . 高塩濃度が、約 4 0 0 mM である、実施態様 1 、 4 、 8 、及び 1 0 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 0 9 】

2 6 . 高 pH 値が、pH 6 . 5 ~ pH 8 . 8 である、実施態様 1 、 7 、及び 9 ~ 2 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 0 】

2 7 . 高 pH 値が、約 pH 7 . 4 である、実施態様 1 、 7 、及び 9 ~ 2 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 1 】

2 8 . 実質的に異なる保持時間が、少なくとも 5 % 異なる、実施態様 1 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 2 】

2 9 . 実質的に異なる保持時間が、少なくとも 1 0 % 異なる、実施態様 1 ~ 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 3 】

3 0 . 実質的に異なる保持時間が、少なくとも 1 5 % 異なる、実施態様 1 ~ 2 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 4 】

3 1 . 実質的に同じ保持時間が、5 % 未満で異なる、実施態様 1 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 5 】

3 2 . 実質的に同じ保持時間が、3 . 5 % 以下で異なる、実施態様 1 ~ 3 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 6 】

3 3 . 実質的に同じ保持時間が、2 . 5 % 以下で異なる、実施態様 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 7 】

3 4 . 保持時間が実質的に異なる場合、保持時間が、塩濃度の平方根の上の 1 (~ 1 / S Q R T (c (s a l t))) に比例する、実施態様 1 ~ 3 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 8 】

3 5 . 参照抗体が、サブクラス Ig G 1 について、配列番号 0 1 (重鎖) 及び配列番号 0 2 (軽鎖) を有する抗 - I L - 1 R 抗体、ならびに、サブクラス Ig G 4 について、配列番号 0 3 (重鎖) 及び配列番号 0 4 (軽鎖) を有する抗 - I L - 1 R 抗体、又は、サブクラス Ig G 1 について、配列番号 3 6 (重鎖) 及び配列番号 3 7 (軽鎖) を有する抗 - H E R 2 抗体、ならびに、サブクラス Ig G 4 について、配列番号 3 8 (重鎖) 及び配列番号 3 9 (軽鎖) を有する抗 - H E R 2 抗体のいずれかである、実施態様 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 1 9 】

10

20

30

40

50

36. $F_c R_n$ 親和性クロマトグラフィーカラムが、新生児 F_c レセプター ($F_c R_n$) とベータ-2-ミクログロブリン ($b_2 m$) との非共有複合体を含む、実施態様 1～35 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0320】

37. $F_c R_n$ 親和性クロマトグラフィーカラムが、新生児 F_c レセプター ($F_c R_n$) とベータ-2-ミクログロブリン ($b_2 m$) との共有複合体を含む、実施態様 1～36 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0321】

38. 新生児 F_c レセプター ($F_c R_n$) とベータ-2-ミクログロブリン ($b_2 m$) との複合体が、固体相に結合している、実施態様 36 又は 37 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

【0322】

39. 固体相が、クロマトグラフィー材料である、実施態様 38 記載の方法。

【0323】

40. 新生児 F_c レセプター ($F_c R_n$) とベータ-2-ミクログロブリン ($b_2 m$) との複合体が、ビオチン化されており、固体相が、ストレプトアビシンで誘導体化されている、実施態様 36～39 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0324】

41. ベータ-2-ミクログロブリンが、新生児 F_c レセプター ($F_c R_n$) と同じ種由来である、実施態様 36～40 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【0325】

42. ベータ-2-ミクログロブリンが、 $F_c R_n$ とは異なる種由来である、実施態様 36～40 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0326】

43. $F_c R_n$ が、ヒト $F_c R_n$ 、カニクイザル $F_c R_n$ 、マウス $F_c R_n$ 、ラット $F_c R_n$ 、ヒツジ $F_c R_n$ 、イヌ $F_c R_n$ 、ブタ $F_c R_n$ 、ミニブタ $F_c R_n$ 、及びウサギ $F_c R_n$ から選択される、実施態様 1～42 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0327】

44. 抗体が、単特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメント、又は、二重特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメント、又は、三重特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメント、又は、四重特異性抗体もしくは融合ポリペプチドの抗体フラグメントである、実施態様 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

【0328】

45. 抗体が、全長抗体である、実施態様 1～44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0329】

46. モノクローナル抗体である、実施態様 1～45 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0330】

47. 下記工程：

a) 実施態様 1～46 のいずれか 1 つに記載の方法により選択された抗体をコードする 40
1 つ以上の核酸を含む細胞を提供する工程と、

b) 該細胞を培養培地中で培養する工程と、

c) 該細胞又は該培養培地から抗体を回収することにより、抗体を製造する工程とを含む、

抗体を製造する方法。

【0331】

参考文献リスト

【表 3 9】

1. Edelman, G.M., Scand. J. Immunol. 34 (1991) 1-22.
2. Reff, M.E. and Heard, C., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 40 (2001) 25-35.
3. Waldmann, T.A. and Strober, W., Prog. Allergy 13 (1969) 1-110.
4. Ghetie, V. and Ward, E.S., Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 739-766.
5. Chaudhury, C., et al., J. Exp. Med. 197 (2003) 315-322.
6. Brambell, F.W., et al., Nature 203 (1964) 1352-1354.
7. Brambell, F.W., Proc. Nutr. Soc. 28 (1969) 35-41. 10
8. Simister, N.E. and Mostov, K.E., Nature 337 (1989) 184-187.
9. Ropeenian, D.C., et al., J. Immunol. 170 (2003) 3528-3533.
10. Kuo, T.T., et al., J. Clin. Immunol. 30 (2010) 777-789.
11. Ropeenian, D.C. and Akilesh, S., Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715-725.
12. Martin, W.L., et al., Mol. Cell 7 (2001) 867-877.
13. Goebel, N.A., et al., Mol. Biol. Cell 19 (2008) 5490-5505.
14. Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542-548.
15. Sanchez, L.M., et al., Biochemistry 38 (1999) 9471-9476.
16. Huber, A.H., et al., J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083. 20
17. Ober, R.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 11076-11081.
18. Ober, R.J., et al., J. Immunol. 172 (2004) 2021-2029.
19. Akilesh, S., et al., J. Immunol. 179 (2007) 4580-4588.
20. Montoyo, H.P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 2788-2793.
21. Rodewald, R., J. Cell Biol. 71 (1976) 666-669.
22. Vaccaro, C., et al., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1283-1288.
23. Suzuki, T., et al., J. Immunol. 184 (2010) 1968-1976.
24. Wang, W., et al., Drug Metab Dispos. 39 (2011) 1469-1477. 30
25. Schlothauer, T., et al., MAbs. 5 (2013) 576-586.
26. Gandhi, M., et al., Semin. Cutan. Med. Surg. 29 (2010) 48-52.
27. Luo, J., et al., J. Mol. Biol. 402 (2010) 797-812.
28. Traczewski, P. and Rudnicka, L., BioDrugs. 26 (2012) 9-20.
29. Zhu, Y., et al., J. Clin. Pharmacol. 49 (2009) 162-175.
30. Lima, X.T., et al. Expert. Opin. Biol. Ther. 9 (2009) 1107-1113.
31. Weger, W., Br. J. Pharmacol. 160 (2010) 810-820.
32. Israelachvili, J.N., Intermolecular and Surface Forces, Academic Press Inc. (1985). 40
33. Petkova, S.B., et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769.
34. Dall'Acqua, W.F., et al., J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524.

35. Khawli, L.A., et al., *Cancer Biother. Radiopharm.* 17 (2002) 359-370.
36. Putnam, W.S., et al., *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 509-516.
37. Igawa, T., et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (2010) 385-392.
38. Boswell, C.A., et al., *Bioconjug. Chem.* 21 (2010) 2153-2163.
39. Ropeenian, D.C., et al., *Methods Mol. Biol.* 602 (2010) 93-104.
40. Prabhat, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 5889-5894.
41. Faber, C., et al., *Immunotechnology*. 3 (1998) 253-270.
42. Li, L., et al., *BMC. Biophys.* 5 (2012) 9. 10
43. Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.
44. Hess, B., et al., *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435-447.
45. Kortkhonja, E., et al., *MAbs*. 5 (2013) 306-322.
46. Jorgensen, W.L., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11225-11236.
47. Zalevsky, J., et al., *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 157-159.
48. Li, B., et al. (mAbs 6 (2014) 1255-1264).
49. Sampei, Z., et al. (PLoS One 8 (2013) e57479.
50. Benson, J.M., et al., *mAbs* 3 (2011) 535-545.
51. Ding, C., et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 515-522. 20
52. Weber, J., and Keam, S. J., *BioDrugs*. 23 (2009) 53-61.

【実施例】

【0332】

下記実施例、図面、及び配列を、本発明の理解を手助けするのに提供する。その真の範囲は、添付の特許請求の範囲に説明されている。変更は、本発明の本質を逸脱することなく、説明された手法においてなされ得ることが理解される。

【0333】

材料及び方法

抗体

実験に使用した抗体は、ウステキヌマブ (CINTO 1275, Stelara (商標)、C A S 登録番号815610-63-0、配列番号42及び43の可変ドメイン)と、ブリアキヌマブ (ABT 874, J 695, Ozespa (商標)、配列番号40及び41の可変ドメイン)と、ウステキヌマブ及びブリアキヌマブの10個の変異体及び突然変異体 (以下、それぞれmAb1～mAb10と呼ぶ)とした。合計12個のIgGを調査した (表2を参照のこと)。

【0334】

合成遺伝子を、ウステキヌマブ、ブリアキヌマブ、mAb5、及びmAb6について、Geneart (Life technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA)において生成した。部位特異的突然変異誘発を、特定のアミノ酸を交換し、mAb1、mAb2、mAb7、mAb8、及びmAb9を生成するのに使用した。mAb3を、ウステキヌマブ重鎖とブリアキヌマブ軽鎖とをコードするプラスミドによりトランスフェクションした。mAb4はその逆とした。

【0335】

本明細書で使用したモノクローナル抗体を、HEK293細胞中で一過性に発現した (以下を参照のこと)。精製を、プロテインAクロマトグラフィーにより、標準的な手法を使用して行った (以下を参照のこと)。

【0336】

生化学的特性決定には、サイズ排除クロマトグラフィー (Waters BioSuit (商標) 2507.8 × 300 mm、溶出液: 200 mM KH₂PO₄、250 mM KCl、pH 7.0) 及びBioAnalyzer 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用する分子

10

20

30

40

50

量分布分析が含まれる。

【0337】

Fcフラグメントを、FabRICATOR - キット (GENOVIS, Lund, Sweden) を使用して、37で30分以内の抗体のIdeS消化により得た。

【0338】

発現プラスミド

上記された抗体の発現のために、一過性発現（例えば、HEK293-F）細胞のための変異体の発現プラスミドを、CMV - イントロンAプロモーターによるもしくはよらないcDNA構築、又は、CMVプロモーターによるゲノム構築のいずれかに基づいて適用した。

【0339】

抗体発現力セットに加えて、プラスミドは、

E.coli中でのこのプラスミドの複製を可能にする複製起点、

E.coliにアンピシリン抵抗性を付与する - ラクタマーゼ遺伝子、及び

真核細胞における選択マーカーとしてのMus musculus由来のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子

を含んだ。

【0340】

抗体遺伝子の転写ユニットを、下記エレメントで構成した。

5'端における固有の制限部位、

ヒトサイトメガロウイルス由来の前初期エンハンサー及びプロモーター、

続けて、cDNA構築の場合には、イントロンA配列、

ヒト抗体遺伝子の5' - 非翻訳領域、

免疫グロブリン重鎖のシグナル配列、

免疫グロブリンエクソン イントロン構築を伴うcDNA又はゲノム構築のいずれかとしてのヒト抗体鎖、

ポリアデニル化シグナル配列を伴う3' 非翻訳領域、及び

3'端における固有の制限部位

【0341】

抗体鎖を含む融合遺伝子を、PCR及び/又は遺伝子合成により生成し、公知のリコンビナント法及び技術、例えば、各プラスミド中の固有の制限部位を使用する核酸セグメントによる連結により構築した。サブクローニングした核酸配列を、DNAシークエンシングにより検証した。一過性トランスフェクションのために、大量のプラスミドを、トランスフォーメンションされたE. coli培養物からのプラスミド調製により調製した（Nucleobond AX, Macherey-Nagel）。

【0342】

細胞培養技術

標準的な細胞培養技術を、Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Incに記載されているように使用した。

【0343】

HEK293-F系における一過性トランスフェクション

抗体を、（例えば、重鎖と、対応する軽鎖とをコードする）各プラスミドによる一過性トランスフェクションにより、HEK293-F細胞 (Invitrogen) を使用して、製造メーカーの説明書に従って生成した。簡潔に述べると、振とうフラスコ又は攪拌発酵槽のいずれかにおいて、血清を含まないFreeStyle (商標) 293発現培地 (Invitrogen) 中で懸濁状に増殖させたHEK293-F細胞 (Invitrogen) を、各発現プラスミドと、293 fectin(商標)又はフェクチン (Invitrogen) との混合物によりトランスフェクションした。2 L 振とうフラスコ (Corning) に対して、HEK293-F細胞を、600mL中に 1×10^6 個/mLの密度で播種し、120 rpm、8% CO₂ でインキュベーションした。その翌日、細胞を、約1.5 × 10⁶ 個/mLの細胞密度で、A) Opti-MEM (Invitrogen) 20mL (各重鎖及び等モル比で対応

10

20

30

40

50

する軽鎖をコードする、600 µg トータルプラスミドDNA (1 µg/mL) を含む)と、B) Opti-MEM 20mL + 293 fectin又はフェクチン 1.2mL (2 µL/mL)との混合物 約42mLによりトランスフェクションした。グルコース消費に従って、グルコース溶液を、発酵の経過中に加えた。分泌された抗体を含有する上清を、5~10日後に収集した。抗体を、上清から直接精製するか、又は、上清を、凍結及び保存するかのいずれかをした。

【0344】

精製

抗体を、細胞培養上清から、MabSelectSure-Sepharose (商標) (GE Healthcare, Sweden) を使用する親和性クロマトグラフィー、ブチル-セファロース (GE Healthcare, Sweden) を使用する疎水性相互作用クロマトグラフィー、及びSuperdex 200サイズ排除 (GE Healthcare, Sweden) クロマトグラフィーにより精製した。

【0345】

簡潔に述べると、無菌ろ過細胞培養上清を、PBSバッファー (10 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl、及び2.7 mM KCl、pH 7.4) で平衡化したMabSelectSuRe樹脂上に捕捉し、平衡化バッファーで洗浄し、25 mM クエン酸ナトリウム (pH 3.0) で溶出した。溶出した抗体画分をプールし、2 M Tris (pH 9.0) で中和した。抗体プールを、疎水性相互作用クロマトグラフィーのために、1.6 M 硫酸アンモニウム溶液を加えて、0.8 M 硫酸アンモニウムの最終濃度にし、酢酸を使用してpHを5.0に調整することにより調製した。35 mM 酢酸ナトリウム、0.8 M 硫酸アンモニウム (pH 5.0) によりブチル-セファロース樹脂を平衡化した後、抗体を、該樹脂にアプライし、平衡化バッファーで洗浄し、35 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) に向かう線形勾配により溶出した。抗体含有画分をプールし、サイズ排除クロマトグラフィーにより、20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl (pH 6.0) により平衡化したSuperdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden) カラムを使用して、更に精製した。抗体含有画分をプールし、Vivaspin限外ろ過装置 (Sartorius Stedim Biotech S.A., France) を使用して、必要とされる濃度に濃縮し、-80°で保存した。

【0346】

【表40】

表10: 抗体の収量

サンプル	最終精製産物量 [mg]	最終精製産物濃度 [mg/mL]
ブリアキヌマブ	23.50	2.36
ウステキヌマブ	12.55	2.67
mAb 1	6.96	2.32
mAb 2	1.89	1.66
mAb 3	4.26	2.14
mAb 4	3.50	2.1
mAb 5	13.64	3.03
mAb 6	2.04	0.4
mAb 7	11.60	2.9
mAb 8	23.25	3.1
mAb 9	16.80	3.15
mAb 10	33.00	4.08

【0347】

純度及び抗体の完全性を、マイクロ流体Labchip技術 (Caliper Life Science, USA) を使用するCE-SDSにより、各精製工程後に分析した。タンパク質溶液 5 µLを、HTタンパク質発現試薬キットを使用し、製造メーカーの説明書に従って、CE-SDS分析用に調製し、LabChip GXIIシステムにおいて、HTタンパク質発現チップを使用して分析した。データを、LabChip GXソフトウェアを使用して分析した。

10

20

30

40

50

【0348】

表11：全てのmAbの生化学的特性決定の概観

濃度を、3回の測定の平均として提供する。単量体含量を、SECクロマトグラムの積分により決定する。抗体種の純度を、インタクトなmAbのCE-SDSにより、DTT還元後に決定する。疎水性を、低及び高疎水性RSに対して表す。

【表41】

サンプル	濃度 [mg/mL]	SEC [%]	CE-SDS [%]			疎水性 [%]
		単量体含量	インタクトな mAb	HC	LC	
ブリアキヌマブ	2.36	99.9	92	67	33	7
ウステキヌマブ	2.67	99.0	84	64	32	-1
mAb 1	2.32	99.4	74	66	31	-6
mAb 2	1.66	98.1	91	64	32	8
mAb 3	2.14	99.3	80	66	28	8
mAb 4	2.10	99.8	82	64	32	-4
mAb 5	3.03	99.5	90	70	30	13
mAb 6	0.40	97.1	95	66	32	12
mAb 7	2.90	97.2	85	65	33	13
mAb 8	3.10	98.9	85	64	34	24
mAb 9	3.15	99.1	80	70	29	16
mAb 10	4.08	98.6	88	70	28	34

【0349】

機能性特定決定

機能性特定決定には、ブリアキヌマブ及びウステキヌマブが正しく生成され、ターゲットへの結合性も機能しているかを試験するための、ターゲット(ヒトIL-12)との相互作用分析が含まれる。mAb変異体を、Fab領域において変更し、これらの変更がターゲット結合性を変化させるかを試験する。更に、マウスIL-12/-23とのマウスPK研究に使用される抗体の相互作用を、マウス研究におけるターゲット媒介性クリアランス効果を除外するのに分析する。加えて、マウスFcレセプターI(muFcRI)に対する結合レベルを測定する。マウスFcRIに対するより強い結合性は、抗原提示細胞へのより速い取込みによるPK研究におけるより速い減少をもたらす場合があるためである。

【0350】

ヒトIL-12との相互作用

ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及び変異体は、IL-12結合性に影響を及ぼす場合があるFab領域において構造的差異を有するため、全てのmAbの結果を、詳細に提供する。

【0351】

ELISA

交差交換を有する変異体(mAb1~6)及び変更された電荷分布を有する変異体(mAb7~10)の吸光度-濃度曲線を、図15及び16それぞれに示す。各mAbの濃度を、ブリアキヌマブ検量線の当てはめを使用して算出し、ブリアキヌマブに対するIL-12結合性(ブリアキヌマブ=100%)を得た。30%以下の結合性の差異を、ブリアキヌマブと同様のIL-12に対する結合性を示すと評価した。30%以上の差異は、IL-12に対する結合性が低下したことを示す。ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及び交換されたFvドメインを有するmAb(mAb1及びmAb2)は、同様のIL-12結合プロファイルを示す。ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及びmAb2の結合性は、20%ウインドウの範囲であり、mAb3の結合性は、30%ウインドウの範囲である。交換されたLCを有するmAb(mAb3及びmAb4)と、交換されたCDRを有する

10

20

30

40

50

mAb (*mAb* 5 及び *mAb* 6) は、 *IL-12* に結合しない。

【0352】

改変された電荷分布を有するブリアキヌマブ変異体 (*mAb* 7 ~ 9) は、ブリアキヌマブに対して 30% の範囲で、 *IL-12* に結合する。これは、同様の *IL-12* 結合性を示す。*mAb* 10 のみが、ブリアキヌマブと比較して 63% の結合性で、低下した *IL-12* 結合性を示す。

【0353】

表面プラズモン共鳴

S P R を、ターゲット特異的 E L I S A の結果を確認するのに使用した。ウステキヌマブ及びブリアキヌマブは、ほぼ同一の会合速度定数 (k_a) (k_a (ブリアキヌマブ) 8×10^5 l/Ms v s. k_a (ウステキヌマブ) 9×10^5 l/Ms) を有する。*IL-12* と *mAb* との解離は、非常に遅いため、解離速度定数 (k_d)、及びその後の、平行解離定数 (K_D) の算出は、実際の値とは異なる場合がある。この設定における方法の限界に関わらず、算出値は、一般的な評価を提供することができ、E L I S A での結果を確認するのに使用することができる。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブは、高い親和性で *IL-12* に結合し、 K_D は、低いnM範囲 (K_D (ブリアキヌマブ) = 0.2 nM v s. K_D (ウステキヌマブ) = 0.07 nM) にある。それぞれ 8×10^5 l/Ms、 6×10^{-5} l/s、及び 70 pM の k_a 、 k_d 、及び K_D 値を有するブリアキヌマブの測定された親和性は、文献データ (k_a = 5×10^5 l/Ms、 k_d = 5.1×10^{-5} l/s、 K_D = 100 pM) と一致している ([51])。 *IL-12* に対するウステキヌマブの高い親和性も、文献に記載されている ([52])。

【0354】

表 12 に、ターゲット相互作用の算出された反応速度パラメータをまとめる。交換された Fv ドメインを有するモノクローナル抗体 (*mAb* 1 及び *mAb* 2) と、改変された電荷分布を有する *mAb* (*mAb* 7 ~ 10) は、ブリアキヌマブ及びウステキヌマブと同様の *IL-12* に対する親和性を有する。*mAb* 3 及び *mAb* 5 は、 *IL-12* に結合せず、*mAb* 4 及び *mAb* 6 は、 *IL-12* に対して非常に弱い結合性を示す。データは、E L I S A での結果と一致している。

【0355】

【表 4 2】

表 12: mAb 及び IL-12 の SPR パラメータ。 K_D 、 k_a 、 及び k_d を、 定常状態親和性を使用して算出した。

サンプル	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [nM]
ウステキヌマブ	$9*10^5$	$1.8*10^{-4}$	0.20
ブリアキヌマブ	$8*10^5$	$6*10^{-5}$	0.07
mAb 1	$1.7*10^6$	$4.1*10^{-4}$	0.24
mAb 2	$1.2*10^6$	$3*10^{-4}$	0.25
mAb 3	結合せず	結合せず	結合せず
mAb 4	$1.2*10^7$	2.3	191
mAb 5	結合せず	結合せず	結合せず
mAb 6	$2*10^6$	$1.9*10^{-2}$	9.62
mAb 7	$1*10^6$	$7.9*10^{-5}$	0.08
mAb 8	$1.2*10^6$	$9.1*10^{-5}$	0.07
mAb 9	$8.8*10^6$	$1.3*10^{-4}$	0.01
mAb 10	$1.4*10^7$	$1.3*10^{-4}$	0.01

【0356】

pH 6.0 での FcRn - mAb 親和性

K_D を、ウステキヌマブに対して算出した（ウステキヌマブ = 1.0）。 K_D 値の評価のために、差異が、ウステキヌマブ - FcRn K_D に対して小数第一位より小さかった場合、mAb と FcRn との親和性を、ウステキヌマブ - FcRn 親和性と同様であると評価した。 K_D の差異が、ウステキヌマブ - FcRn K_D に対して小数第一位より大きかった場合、 K_D を、異なると評価した。pH 6.0 での FcRn 親和性は、全ての mAb について狭い範囲にあった。ブリアキヌマブは、0.2 の相対的な K_D を有した。変異体は、1.1 の相対的な K_D を有した mAb 10 を除いて、ブリアキヌマブとウステキヌマブとの間の範囲にあった。

【0357】

10

20

30

【表43】

表13: 全てのmA b のFc R nに対する相対的なK_D。相対的なK_D値
(ウステキヌマブ=1)を、平均 (n=3) ± 標準偏差として
表す。

サンプル	rel. K _D
ウステキヌマブ	1
ブリアキヌマブ	0.2 ± 0.07
mAb 1	1.0 ± 0.22
mAb 2	0.3 ± 0.19
mAb 3	0.2 ± 0.06
mAb 4	0.5 ± 0.08
mAb 5	0.9 ± 0.16
mAb 6	0.4 ± 0.17
mAb 7	0.2 ± 0.03
mAb 8	0.4 ± 0.07
mAb 9	0.4 ± 0.04
mAb 10	1.1 ± 0.09

10

20

【0358】

Fc R n - mA b 解離

Fc R n と mA b との解離を、 SPR 及び Fc R n 親和性クロマトグラフィーにより分析した。

【0359】

SPR を使用する Fc R n - mA b 解離

K_D 値の評価について、1 μMを下回る K_D を、中程度の親和性を示すと評価し、1 ~ 5 μMの K_D を、弱い親和性を示すと評価し、5 μM超の K_D を、Fc R n に対する結合性を示さないと評価した。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブは、pH 6.0 において同様の親和性を示した。ウステキヌマブは、pH 6.6 において非常に弱い親和性を示し、pH 6.8 において親和性を示さなかった。対照的に、ブリアキヌマブは、pH 6.8 まで中程度の親和性を示し、pH 7.0 において弱い親和性を示し、pH 7.2 において結合性を示さなかった。

30

【0360】

【表44】

表14: ブリアキヌマブ及びウステキヌマブのFcRnに対する K_D 。
 K_D を、増加するpH値のバッファーを使用して算出した。
5 μMより高いKD値を、結合せずと分類した。

	ブリアキヌマブ K_D [μM]	ウステキヌマブ K_D [μM]
pH 6.0	0.09	0.39
pH 6.4	0.10	1.00
pH 6.6	0.36	3.10
pH 6.8	0.60	結合せず
pH 7.0	4.20	結合せず
pH 7.2	結合せず	結合せず

10

【0361】

抗体の生化学的特性決定は、ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及び変異体間で、目立った差異を示さなかった。

【0362】

抗体フラグメントの生成

20

$F(ab') フラグメント及びFc領域フラグメントを、FabRICATOR - キット (GENOVIS, Lund, Sweden) を使用して、37 で30分間インキュベーションすることにより調製した。得られた開裂生成物である $F(ab') 及びFc領域を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラム (Superdex 200, GE Healthcare, Zurich, Switzerland)において、AKTA Explorerクロマトグラフィーシステム (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を使用して分離し、ピーク画分をプールした。分子量標準を、2つの開裂生成物をその保持時間に基づいて特定するのに、同じカラムに供給した。$$

【0363】

FcRn表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析

抗体のFcRnに対する結合特性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術により、BIAcore T100機器 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) を使用して分析した。このシステムは、分子間相互作用の研究に十分確立されている。それは、リガンド / 検体結合の連続的なリアルタイムモニタリングが可能であり、このため、種々のアッセイ設定における反応速度パラメータの決定が可能である。SPR技術は、金でコートしたバイオセンサチップの表面近くでの屈折率の測定に基づいている。屈折率の変化は、固定されたリガンドと溶液中の注入された検体との相互作用による表面での質量変化を示す。分子が表面に固定されたリガンドに結合すると、質量は増大する。解離した場合、質量は減少する。本アッセイ法では、FcRnレセプターを、BIAcore CM5-バイオセンサチップ (GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Sweden) 上に、アミンカップリングを介して、400応答単位 (RU) のレベルで固定化した。このアッセイ法を、ランニング及び希釈バッファーとして、PBS、0.05% Tween 20、pH 6.0 (GE Healthcare Bioscience) を使用して、室温で行った。200nM ネイティブ又は酸化抗体サンプルを、50 μL/分の流速で室温において注入した。会合時間を、180秒とし、解離相を、360秒とった。チップ表面の再生を、HBS-P (pH 8.0) の短い注入により達成した。SPRデータの評価を、注入後180秒と注入後300秒での生物学的応答シグナルの高さの比較により行った。対応するパラメータを、RU最大レベル (注入後180秒) 及び後期安定性 (注入終了後300秒) とする。

30

【0364】

h u FcRnとIgGとについての定常状態結合レベル及び平衡解離定数 (K_D) を、pH 6.0において、BIAcore T100 SPR機器 (GE Healthcare, Little Chalfont, United

40

50

Kingdom) を使用して決定した。ヒト F c R n を、 BIACore CM5 - バイオセンサチップ (GE Healthcare Bioscience) 上に、アミンカップリングを介して、50応答単位 (RU) のレベルで固定化した。mAb 5 及び mAb 6 について、 CM4 - バイオセンサチップを使用した。このアッセイ法を、ランニング及び希釈バッファーとして、 pH 6.0 に調整した 0.05% Tween 20 を含む PBS (両方とも、 Roche Diagnostics, Mannheim, Germany から入手) を使用して、室温で行った。サンプルの濃度系列を、1500 nM ~ 23 nM の範囲で調製した。各サンプルを、5 μL/分の流速で注入した。600 及び 360 秒の会合及び解離時間を、それぞれ使用した。該チップを、0.05% Tween 20 を含む PBS (pH 7.5) の注入により再生した。平衡解離定数 K_D を、定常状態親和性として算出し、ウステキヌマブの K_D に対して正規化した。

10

【0365】

マウス

マウス F c R n - 鎮遺伝子を欠損しているが、ヒト F c R n - 鎮遺伝子について半接合トランスジェニックな B6.Cg-Fcgrtm1DcrTg (FCGRT) 276Dcr マウス (mu F c R n - / - hu F c R n tg + / - 、系統 276) を、薬物動態研究に使用した [39]。マウスの管理を、特定病原体不在条件下において行った。マウスを、 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から得た (メス、4 ~ 10 週齢、投与時体重 17 ~ 22 g)。全ての動物実験について、 Government of Upper Bavaria, Germany により承認を受け (許可番号 55.2-1-54-2532.2-28-10)、 AAALAC 認定動物施設において、実験動物の管理及び利用に関する欧洲連合基準に従って行った。動物を、標準的なケージに収容し、研究期間全体を通して、食餌及び水を自由に摂取できるようにした。

20

【0366】

薬物動態研究

単回用量の抗体を、外側尾静脈を介して、10 mg/kg の用量レベルで i.v. 注射した。マウスを、3つの群に6匹のマウスずつに分け、合計9回の血清収集時点 (投与後 0.08、2、8、24、48、168、336、504、及び 672 時間) をカバーした。各マウスを、 Isoflurane (商標) (CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) による浅麻酔下において行う後眼窩出血に2回供した。三回目の血液サンプルを、安楽死の時点で収集した。血液を、血清チューブ (Microvette 500Z-Gel, Sarstedt, Numbrecht, Germany) 中に収集した。2時間のインキュベーション後、サンプルを、9,300 g で 3 分間遠心分離し、血清を得た。遠心分離後、血清サンプルを、分析まで -20° で凍結保存した。

30

【0367】

ヒト抗体の血清濃度の決定

マウス血清中のウステキヌマブ、ブリアキヌマブ、mAb 8、及び mAb 9 の濃度を、特異的酵素結合免疫アッセイ法により決定した。抗体に特異的なビオチン化インターロイキン 12 及びジゴキシゲニン - 標識抗 - ヒト - Fc マウスモノクローナル抗体 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) をそれぞれ、捕捉及び検出に使用した。ストレプトアビジンコートしたマイクロタイタープレート (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) を、アッセイバッファー (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) で希釈したビオチン化捕捉抗体で、1時間コートした。洗浄後、血清サンプルを、種々の希釈で加え、続けて、更に1時間インキュベーションした。繰返し洗浄した後、結合したヒト抗体を、検出抗体、続けて、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP : Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) にコンジュゲートさせた抗 - ヒト - Fc マウスモノクローナル抗体とのその後のインキュベーションにより検出した。ABTS (2,2'-アジノ - デ [3-エチルベンズチアゾリンスルホナート] ; Roche Diagnostics, Germany) を、 HRP 基質として使用し、着色反応生成物を形成した。得られた反応生成物の吸光度を、490 nm での参照波長と共に 405 nm で、 Te can sunrise プレートリーダー (Mannedorf, Switzerland) を使用して読み取った。

40

【0368】

全ての血清サンプル、陽性及び陰性の対照サンプルを、2連分析し、参照標準に対して

50

較正した。

【0369】

PK分析

薬物動態パラメータを、WinNonlin(商標)1.1.1(Pharsight, CA, USA)を使用する非コンパートメント分析により算出した。

【0370】

簡潔に述べると、曲線下面積($AUC_{0-\infty}$)値を、抗体の非線形減少による対数台形法により算出し、最後の時点での観察された濃度からの外挿と共に、見かけの終末相速度定数 z を使用して、無限大に外挿した。

【0371】

血漿クリアランスを、 $AUC_{0-\infty}$ で割った線量率(D)として算出した。見かけの終末相半減期($T_{1/2}$)を、等式 $T_{1/2} = \ln 2 / z$ から導いた。

【0372】

統計学的分析

中心を外れた血清濃度を、Nalimov outlier検定を使用して検出し、更なる分析から除外した。

【0373】

テューキーの真の有意差検定(テューキーのHSD検定)を、終末相半減期において、統計学的な有意差の分析のための統計学的検定として使用した。

【0374】

pH依存性正味電荷の算出

pH依存性正味電荷(「滴定曲線」)を、オープンソースプログラムEMBOSS iepにより、全てのシステインがジスルフィド架橋に関与すると仮定して算出した。

【0375】

ブリアキヌマブ相同性モデルの生成及び等ポテンシャル表面の算出

ブリアキヌマブFabフラグメントについての相同性モデルを、テンプレートとしてPDB構造1AQK[41]を使用するモーダー9v7を使用して生成した。ブリアキヌマブ及びウステキヌマブFabについての等ポテンシャル表面を、このモデル(ブリアキヌマブ)又はウステキヌマブの結晶構造(PDB ID 3HMX)からそれぞれ算出した。構造を、DiscoveryStudio Pro, Version 3.5(Accelrys Inc., San Diego, USA)におけるCHARMm force fieldによる「prepare protein」プロトコールを使用して、pH 7.4及び0.145Mイオン強度においてプロトン化した。静電ポテンシャルを、DiscoveryStudio Proにおける「electrostatic potential」プロトコールを使用して算出した。このプロトコールは、DelPhiプログラムを呼び出す[42]。

【0376】

ブリアキヌマブ及びウステキヌマブ-FcRn複合体の分子動力学シミュレーション

完全なIgGとしてのブリアキヌマブ及びウステキヌマブの相同性モデルを、完全なIgG1の結晶構造(PDB ID 1HZH)により、テンプレートとしてグリカンを使用することなく、DiscoveryStudio Pro, Version 3.5を使用して構築した。この簡易化は、適切であったと考えられる。in vitroにおけるグリコシル化は、FcRn結合性に顕著な影響を有さないためである[43]。このテンプレート中のFabドメインを、そのC_H1及びC_Lドメインのアライメント後に、上記されたFab構造により置き換えた。ヒトFcRnの相同性モデルを、テンプレートとしてラットFcRn-Fc複合体(PDB ID 1I1A)を使用して、DiscoveryStudio Proにより構築した。欠けている残基を、DiscoveryStudio Proの「prepare protein」スクリプトにより構築した。ヒトFcRnの相同性モデルを、ブリアキヌマブ及びウステキヌマブIgGモデルの両重鎖に対して、FcRn周囲5内にあるラットFcドメインのC-アルファ原子と、ヒトFc領域におけるその相同的な対応物とを重ねることにより、モデル化した。MDシミュレーションについて、FcRn:Fc界面(FcRn中の残基108とFc中の残基255との間、図S1)におけるジスルフィド結合を、シミュレーション中に複合体が解離する

10

20

30

40

50

のを妨げるために導入した。得られた構造は、FcRn / 2mg ヘテロ二量体の 2 つのコピーを有する完全な IgG を表す。

【0377】

IgG - FcRn 複合体の分子動力学 (MD) シミュレーションを、GROMACS 4.6.2 シミュレーションソフトウェアパッケージ (www.gromacs.org から入手) [44] により、基本的に Kortkhonjia et al. [45] に記載されているように行った。シミュレーションを、Linux オペレーティングシステムで動作するコンピュータクラスターの 160 個のプロセッサのにおいて、平行して行った。OPLSAA force field [46] を使用し、構造を、約 128'000 TIP3 の水分子により完全に溶媒和した。塩化物又はナトリウム原子を加えて、系全体の電荷を中和した。周期的な境界条件による切頂八面体を、タンパク質周囲の 7.5 オングストローム境界と共に使用した。静電相互作用を、PME 積算を使用して、1.0 nm の実空間静電カットオフにより算出した。レナード - ジョーンズポテンシャルを、1.0 nm でカットオフした。LINCS を使用して、全てのタンパク質結合長を制限し、2 fs のタイムステップを可能にした。温度を、V-rescale アルゴリズムを使用して、300 K で一定に保った。エネルギー最少化 (ターゲット: 最大力 < 1000 kJ/mol/nm) に従って、30 ps での平衡化を行った。その後、100 ns の長さにわたって軌跡をシミュレーションした。

【0378】

IgG - FcRn 相互作用エネルギーの算出

MD 軌跡中に FcRn に近づく、FcRn と Fab ドメインとの間の非結合相互作用に対する静電的寄与を、DiscoveryStudio Pro により算出した。エネルギー算出について、タンパク質を、上記されたのと同じ設定で、pH 7.4、145 mM イオン強度、及び 37 の温度でプロトン化した。構造を、最大 1000 ステップの「smart minimizer」プロトコールにより最小化した。その後、相互作用エネルギーを、「calculate interaction energy」プロトコールを使用して、DiscoveryStudio Pro における CHARMM force field により算出した。顕在する水及び GBMV 静電モデルを使用した。この計算を、軌跡 (0 ns) の開始時と、1 ns 間隔で 96 ~ 100 ns とで行った。

【0379】

実施例 1

FcRn 親和性カラムの準備

HEK293 細胞中での FcRn の発現

FcRn を、FcRn とベータ - 2 - ミクログロブリンとのコード配列を含有する 2 つのプラスミドによる HEK293 細胞のトランスフェクションにより、一過性に発現させた。トランスフェクションされた細胞を、振とうフラスコ中において、36.5、120 rpm (振とう器振幅 5 cm)、湿度 80%、及び 7% CO₂ で培養した。該細胞を、2 ~ 3 日毎に、3 ~ 4 × 10⁵ 個 / mL の密度に希釈した。

【0380】

一過性発現のために、14 L のステンレス鋼製バイオリアクタを、培養容積 8 L で、36.5、pH 7.0 ± 0.2、pO₂ 35% (N₂ 及び空気でガス補給、合計ガス流量 200 mL · 分⁻¹)、及び 100 ~ 400 rpm 搅拌速度で開始した。細胞密度が 20 × 10⁵ 個 / mL に達した時点で、10 mg プラスミド DNA (両プラスミドの等モル量) を、Opti-MEM (Invitrogen) の 400 mL 中で希釈した。293fectin (Invitrogen) の 20 mL を、この混合物に加えた。ついで、混合物を、室温で 15 分間インキュベーションし、その後、発酵槽に移した。翌日から、細胞に、連続モードで栄養を供給した。フィード溶液を、1 日当たりに 500 mL の速度で加え、2 g/l を上回るレベルを維持するのに必要なグルコースを加えた。上清を、トランスフェクション後 7 日で、11 個のバケットを有するスイングヘッド遠心分離：4000 rpm で 90 分間を使用して収集した。上清 (13 L) を、Sartobran P フィルタ (0.45 μm + 0.2 μm、Sartorius) により浄化し、FcRn ベータ - 2 - ミクログロブリン複合体を、それから精製した。

【0381】

10

20

30

40

50

新生児Fcレセプターのビオチン化

3 mg FcRnを、150 mM 塩化ナトリウムを含有する20 mM リン酸二水素ナトリウムバッファー 5.3 mL中に溶解／希釈し、PBS 250 μ L及びcomplete protease inhibitor (complete ULTRA Tablets, Roche Diagnostics GmbH) 1錠を加えた。FcRnを、Avidityから入手したビオチン化キットを使用して、製造メーカーの説明書に従って、ビオチン化した (Bulk BIRA, Avidity LLC)。ビオチン化反応を、室温で一晩行った。

【0382】

ビオチン化FcRnを、150 mM NaClを含む20 mM リン酸二水素ナトリウムバッファー (pH 7.5) に対して、4で一晩透析して、過剰なビオチンを除去した。

【0383】

ストレプトアビジンセファロースへの結合

ストレプトアビジンセファロースに結合させるために、1グラム ストレプトアビジンセファロース (GE Healthcare, United Kingdom) を、ビオチン化し、透析したFcRnに加え、4で一晩インキュベーションした。FcRn誘導体化セファロースを、XKカラム (GE Healthcare, United Kingdom) 1mLに充填した。ついで、FcRnカラムを、140 mM 塩化ナトリウムを含有する20 mM 2-(N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩バッファー (pH 5.5) で平衡化した。

【0384】

実施例2

FcRn親和性カラム及びpH勾配を使用するクロマトグラフィー

レセプター誘導体化セファロースを、XKカラム (GE Healthcare) 1mLに充填し、ついで、FcRnカラムを、140 mM NaClを含む20 mM 2-(N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) バッファー (pH 5.5) で平衡化した。

【0385】

条件

カラム寸法： 50 mm × 5 mm

ベッド高さ： 5 cm

ローディング： 30 μ g サンプル

平衡化バッファー： 140 mM NaClを含む20 mM MES、pH 5.5に調整

溶出バッファー： 140 mM NaClを含む20 mM Tris/HCl、pH 8.8 30に調整

溶出： 7.5 CV 平衡化バッファー、120分間に100% 溶出バッファー、10 CV 溶出バッファー

【0386】

サンプルを、20 mM 2-(N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、140 mM 塩化ナトリウム (pH 5.5) 中で調製した。各サンプルは、1注入当たりに30 μ g mAbを含んだ。抗体を、pH 5.5から8.8に向かう線形pH勾配により、20 mM 2-(N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、140 mM 塩化ナトリウム (pH 5.5) 及び20 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンTRIS、140 mM 塩化ナトリウム (pH 8.8) を溶出液として使用し、0.5 mL/分の流速で、120分以内に溶出した。FcRnカラムクロマトグラフィーは、酸性pH (pH 5.5 ~ 6.0)において結合性を示し、より高いpH値において放出を示す。抗体の完全な溶出のために、pHを、勾配においてpH 8.8まで上昇させる。クロマトグラムを、Chromeleonソフトウェア (Dionex, Germany) を使用することにより、手作業で積分した。実験を、室温で行った。溶出プロファイルを、280 nmでの吸光度の連続的な測定により得た。特定の保持時間での溶出pHを決定するために、サンプルを、5分毎に回収し、pHを、オフラインで測定した。

【0387】

実施例3

FcRn親和性カラム、pH勾配、及び高塩条件を使用するクロマトグラフィー

10

20

30

40

50

レセプター誘導体化セファロースを、X Kカラム (GE Healthcare) 1mLに充填し、ついで、F c R nカラムを、400mM NaClを含有する20mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) バッファー (pH 5.5) で平衡化した。

【0388】

条件

カラム寸法 : 50 mm × 5 mm

ベッド高さ : 5 cm

ローディング : 30 µg サンプル

平衡化バッファー : 400mM NaClを含む20mM MES、pH 5.5に調整

溶出バッファー : 400mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8 10
に調整

溶出 : 7.5 CV 平衡化バッファー、120分間に100% 溶出バッファー、10 CV 溶出バッファー

【0389】

サンプルを、20mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、400mM 塩化ナトリウム (pH 5.5) 中で調製した。各サンプルは、1注入当たりに30 µg mAb を含んだ。抗体を、pH 5.5から8.8に向かう線形pH勾配により、20mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、400mM 塩化ナトリウム (pH 5.5) 及び20mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンTRIS、400mM 塩化ナトリウム (pH 8.8) を溶出液として使用し、0.5mL/分の流速で、120分以内に溶出した。F c R nカラムクロマトグラフィーは、酸性pH (pH 5.5 ~ 6.0) において結合性を示し、より高いpH値において放出を示す。抗体の完全な溶出のために、pHを、勾配においてpH 8.8まで向上させる。クロマトグラムを、Chromeleonソフトウェア (Dionex, Germany) を使用することにより、手作業で積分した。実験を、室温で行った。溶出プロファイルを、280nmでの吸光度の連続的な測定により得た。特定の保持時間での溶出pHを決定するために、サンプルを、5分毎に回収し、pHを、オフラインで測定した。

【0390】

実施例4

F c R n 親和性カラム及び塩勾配を使用するクロマトグラフィー

レセプター誘導体化セファロースを、X Kカラム (GE Healthcare) 1mLに充填し、ついで、F c R nカラムを、10mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) バッファー (pH 7.8) で平衡化した。

【0391】

条件

カラム寸法 : 50 mm × 5 mm

ベッド高さ : 5 cm

ローディング : 30 µg サンプル

平衡化バッファー : 10mM MES、pH 7.8に調整

溶出バッファー : 250mM NaClを含む10mM MES、pH 7.8に調整

溶出 : 7.5 CV 平衡化バッファー、60分間に100% 溶出バッファー、10 CV 溶出バッファー

【0392】

サンプルを、10mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩 (pH 7.8) 中で調製した。各サンプルは、1注入当たりに30 µg mAb を含んだ。抗体を、0nMから250nMに向かう塩化ナトリウムの線形塩濃度により、10mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩 (pH 7.8) 及び10mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、250mM 塩化ナトリウム (pH 7.8) を溶出液として使用し、0.5mL/分の流速で、60分以内に溶出した。実験を、室温で行った。溶出プロファイルを、280nmでの吸光度の連続的

な測定により得た。クロマトグラムを、Chromelionソフトウェア (Dionex, Germany) を使用することにより、手作業で積分した。

【0393】

実施例5

FcRn親和性カラムを使用するクロマトグラフィー

レセプター誘導体化セファロースを、XKカラム (GE Healthcare) 1mLに充填し、ついで、FcRnカラムを、150mM NaClを含有する20mM 2- (N-モルホリン)-エタンスルホン酸 (MES) バッファー (pH 5.5) で平衡化した。

【0394】

条件

10

カラム寸法 : 50 mm × 5 mm

ベッド高さ : 5 cm

ローディング : 50 µg サンプル

平衡化バッファー : 150mM NaClを含む20mM MES、pH 5.5に調整

溶出バッファー : 150mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8に調整

溶出 : 7.5 CV 平衡化バッファー、30 CVの間に100% 溶出バッファー、10 CV 溶出バッファー

【0395】

50～100 µg タンパク質を含有する抗体又は融合タンパク質サンプルを、pH 5.5に調整し、AKTA explorer 10 XT又はDionex Summit (Dionex, Idstein, Germany) を使用するFcRnカラムにアプライした。ついで、5 cmのベッド高さを有するカラムを、20mM MES、150mM NaCl (pH 5.5) の平衡化バッファー 5～10カラム量で洗浄した。親和性結合したFc含有タンパク質を、20mM Tris/HCl、150mM NaCl (pH 8.8) へのpH勾配により、30カラム量で溶出した。変換抗体の完全な溶出のために、pHを、勾配において、pH 8.8まで上昇させた。実験を、室温で行った。溶出プロファイルを、280 nmでの吸光度の連続的な測定により得た。サンプル注入後、検体ピークXが検出器に達するのに掛かった時間を、保持時間と呼んだ。

20

【0396】

実施例6

30

FcRnカラムにおける保持時間とin vivoでの半減期との相関

in vivoでの半減期を、10 mg/kg (n = 8) の単回i.v.投与後に、ヒトFcRnトランスジェニックC57BL/6Jマウスにおいて測定し、FcRnカラムにおける保持時間と比較した (表15を参照のこと)。FcRnカラムから遅い溶出を示した抗体は、FcRnトランスジェニックマウスにおいて、より長い半減期を有したことが見出された。

【0397】

【表45】

表15.

40

抗体	保持時間 [分]	in vivoでの半減期 [時間]
抗-Aベータ抗体 (野生型)	45.5	103 +/- 51
抗-IGF-1R抗体 (野生型)	45.5	97 +/- 9
抗-IGF-1R抗体 (YTE-突然変異体)	58	211 +/- 41

【0398】

実施例7

ヒトFcRn、マウスFcRn、及びカニクイザルFcRnの精製

ヘキサヒストグ付きタンパク質を含有する澄んだ上清を、Ni-NTA親和性クロマト

50

グラフィー樹脂 (Qiagen, Hanrechtikon, Switzerland) に、4でロードした。500 mM NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウムバッファー、pH 7.4 と、100 mM イミダゾールを含有する 20 mM リン酸ナトリウムバッファーとのそれによる洗浄工程後、タンパク質を、2 mL/分の流速において、300 mM イミダゾールを含有する同じバッファーによるバッチ溶出を使用して、AKTA Primクロマトグラフィーシステム (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) で溶出した。画分をプールし、500 mM NaCl を含有するリン酸ナトリウムバッファー中ににおいて、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex (商標) 200, GE Healthcare, Zurich, Switzerland) で更に精製した。精製タンパク質を、Nanodrop分光計 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) を使用して定量し、SDS PAGE により、MES バッファー中の NuPAGE 4~12% Bis-Triplets ゲルにおいて、変性及び還元条件下で分析した。 10

【0399】

実施例 8

マウス及びカニクイザル FcRn 親和性カラムクロマトグラフィー

下記表 16 に、カニクイザル由来の FcRn を含む親和性カラムでの例示的なヒト抗体の保持時間を提供する。データを、下記条件を使用して得た。溶出バッファー：20 mM TRIS/HCl、150 mM NaCl、pH 8.5。更なる説明は、実施例 2 を参照のこと。YTE-突然変異体という用語は、三重突然変異体 M252Y/S254T/T256E を意味する。 20

【0400】

【表 46】

表 16.

抗体	保持時間 [分]
抗-IGF-1R 抗体 (野生型)	51.2
抗-IGF-1R 抗体 (YTE-突然変異体)	63.0

【0401】

下記表 17 に、マウス FcRn での例示的なヒト抗体の保持時間を提供する。データを、下記条件を使用して得た。セファロース 1mL に結合させた 1.2 mg レセプター。溶出バッファー：20 mM TRIS/HCl、150 mM NaCl、pH 8.5。更なる説明は、実施例 2 を参照のこと。溶出バッファーの pH が 9.5 に調整されない限り、YTE-突然変異体を溶出することができなかったため、YTE-突然変異体は、この表には含まれていない。 30

【0402】

【表 47】

表 17.

抗体	保持時間 [分]
抗-IGF-1R 抗体 (野生型)	48.8

【0403】

カニクイザル FcRn 親和性カラムは、ヒト化抗体の結合性に関してヒト FcRn 親和性カラムと同様に挙動した。一方、マウス FcRn カラムに対するヒト化抗体の結合性は、より遅い保持から分かるように、ヒト FcRn 親和性カラムに対するより強い。 40

【0404】

実施例 9

抗体フラグメントの生成

F(ab')₂ フラグメント及び Fc 領域フラグメントを、抗体 50 μg当たりに 1 μg IDES システインプロテアーゼを加え、37 で 2 時間インキュベーションすること

50

により、100 mM Tris (pH 8.0) で 1 : 1 希釀した全長抗体を開裂させて調製した。得られた開裂生成物である $F(ab') 及び Fc を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラム (Superdex 200, GE Healthcare, Zurich, Switzerland) において、AKTA Explorer クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) で分離し、ピーク画分をプールした。2つ開裂生成物をその保持時間に基づいて特定するのに、分子量標準を同じカラムに供給した。$

【0405】

全長抗体の保持時間は、顕著に変動した。対照的に、全ての試験抗体の各 Fc 部分の保持時間は、実際には、互いに異ならなかった (1%未満)。

【0406】

プラスミンを、全長抗体の開裂に使用した場合、同じ知見が得られた (データを示さず)。

【0407】

実施例 10

ヒト $FcRn$ マウスにおける薬物動態研究

全ての手法を、実験動物ケア評価認証協会 (www.aaalac.org) のガイドラインに従って行った。この研究は、Regional Council of Oberbayern, Germany により承認された。

【0408】

マウス $FcRn$ を欠損しているが、ヒト $FcRn$ について半接合トランスジェニックな (hu $FcRn$ (276) - / tg (30、31))、オス及びメスの C57BL/6J マウス (バックグラウンド) を、薬物動態研究全体を通して使用した。

【0409】

投与の時点で、動物は、体重 17 ~ 25 g であった。各抗体を、尾静脈を介して、単回静脈内ボーラス注射として与えた。マウスの限られた血液量のために、4匹のオス及び4匹のメスの各動物の3つの群は、9回のサンプリング時点、すなわち、1動物当たりに3回のサンプリング時点をカバーするのに必要であった。血液サンプルを、群1において、投与後5分、24時間、及び336時間、群2において、投与後2時間、168時間、及び504時間、ならびに、群3において、投与後8時間、48時間、672時間で採取した。血液サンプル 約 100 μ L を、眼球後ろの穿孔により取得し、室温で 60 分間保存して、凝固させた。血清サンプル 少なくとも 40 μ L を、9,300 \times g、4 で 3 分間の遠心分離により取得し、直ちに凍結させ、アッセイするまで -20 で保存した。

【0410】

マウス血清中のヒト治療抗体の血清濃度を、投与された抗体及びその変異体の抗原結合領域 (Fab) に特異的な抗原捕捉酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA) により決定した。全ての試薬又はサンプルを、室温において、400 rpm での振とう器上でインキュベーションした。各洗浄工程は、三回のサイクルを含んだ。簡潔に述べると、ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレートを、アッセイバッファーで希釈したビオチン化抗体でコートした。リン酸緩衝生理食塩水 - ポリソルベート 20 (Tween 20) での洗浄後、種々の希釈での血清サンプルを加え、1時間インキュベーションした。洗浄後、結合したヒト治療抗体を、マウス IgG と交差反応しない、ジゴキシゲニンとコンジュゲートさせたヒト Fc 特異的モノクローナル抗体 Fab フラグメントとの、その後のインキュベーションにより検出した。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とコンジュゲートさせた抗 - ジゴキシゲニン抗体を加え、1時間インキュベーションした。洗浄後、ABTS (2,2'-アジノ-ジ[3-エチルベンズチアゾリンスルホナート] ; Roche Diagnostics, Germany) を、HRP 基質として加え、着色反応生成物を形成した。得られた反応生成物の吸光度を、490 nm での参照波長と共に 405 nm で読み取った。全ての血清サンプル及び陽性又は陰性の対照サンプルを、繰返しで分析し、参照標準に対して較正した。

【0411】

薬物動態パラメータを、薬物動態評価プログラムである WinNonlin (商標) (Pharsight

10

20

30

40

50

, St. Louis, MO, USA) version 5.2.1を使用する非コンパートメント分析により算出した。簡潔に述べると、濃度 / 時間曲線下面積 A U C (0 - 6 7 2) を、時間 0 ~ 無限大に向かって、線形台形則（線形内挿法）により算出した。見かけの終末相半減期 ($T_{1/2}$) を、等式 $T_{1/2} = \ln 2 / z$ から導いた。全身クリアランス (C L) を、用量 / A U C として算出した。野生型抗体とその変異体との間での薬物動態パラメータにおける統計学的な有意差を、A N O V A 分析により決定した。

【 0 4 1 2 】

マウス F c R n を欠損しているが、ヒト F c R n について半接合トランスジェニックな (hu F c R n (2 7 6) - / t g) C57BL/6Jマウスにおける薬物動態研究から、Y T E 突然変異が、抗体の薬物動態を向上させることができた。統計学的有意性のレベルにおいて、Y T E 突然変異は、野生型抗体との比較において、1.74倍高いA U C (0 - 6 7 2) 、1.95倍遅いクリアランス、及び2.2倍長い終末相半減期を有した（表 1 4 ）。

【 0 4 1 3 】

表 1 8 : 野生型抗体及びその三重突然変異体 Y T E についての薬物動態パラメータを、ヒト F c R n トランスジェニックマウスに対する 10 mg/kg の単回 i . v . ボーラス注射後に、E L I S A により測定された血清濃度の非コンパートメント分析により得た。平均 \pm S D 、1群当たりに $n = 8$ 。野生型抗体との比較における有意性のA N O V A 分析 (++ 、 $p < 0.001$) 。A U C (0 - 6 7 2) は、0 ~ 6 7 2 時間の血清濃度 - 時間曲線下面積である。

【表 4 8 】

抗体	AUC(0-672) [h* μ g/ml]	クリアランス [mL/分/kg]	終末相半減期 [時間]
野生型抗体	15.693 \pm 1.879	0.0107 \pm 0.0013	96.8 \pm 8.9
Y T E - 突然変異体	27.359 \pm 2.731	0.0055 \pm 0.0006	211.4 \pm 40.6

【 0 4 1 4 】

実施例 1 1

ヒト F c R n マウスにおける薬物動態研究

全ての手法を、実験動物ケア評価認証協会 (www.aaalac.org) のガイドラインに従って行った。この研究は、Regional Council of Oberbayern, Germanyにより承認された。

【 0 4 1 5 】

マウス F c R n を欠損しているが、ヒト F c R n について半接合トランスジェニックな (hu F c R n (2 7 6) - / t g (3 0 、 3 1)) 、オス及びメスのC57BL/6Jマウス（バックグラウンド）を、薬物動態研究全体を通して使用した。

【 0 4 1 6 】

4 つの抗体 : ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、m A b 8 、及びm A b 9 を、i n v i v o 研究に使用した。

【 0 4 1 7 】

各抗体を、単回静脈内ボーラス注射 (10 mg/kg) として与えた。マウスの限られた血液量のために、各 6 匹の動物の 3 つの群が、9 回のサンプリング時点をカバーするのに必要であった。最後のサンプリング時点を、投与後 4 週間とした。

【 0 4 1 8 】

結果を、図 3 に示す。

【 0 4 1 9 】

【表49】

表19: ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、ならびに、変異抗体であるmAb 8及びmAb 9についての薬物動態パラメータ

mAb	AUC _{0-inf} [h* μ g/mL]	C ₁ [mL/分/kg]	V _{ss} [L/kg]	T _{1/2} [時間]
ブリアキヌマブ	4228 ± 119	0.0394 ± 0.001	0.162 ± 0.015	48 ± 9
ウステキヌマブ	12238 ± 864	0.0137 ± 0.001	0.116 ± 0.006	137 ± 48
mAb 8	11459 ± 843	0.0146 ± 0.001	0.101 ± 0.013	78 ± 22
mAb 9	16039 ± 936	0.0104 ± 0.001	0.099 ± 0.011	109 ± 13

10

【0420】

ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける終末相半減期の差異が異なるFcRn-mAb相互作用により生じたことを確認するために、FcRnノックアウトマウスにおける第2のin vivo研究を行った。この研究に使用したマウス数を減らすために、3つの抗体：ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、及びmAb 9のみを使用した。

【0421】

10 mg/kg 抗体のi.v.投与後に、全ての抗体のクリアランスは、FcRn媒介性 IgGリサイクリングが行われないため、ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおけるより、FcRnノックアウトマウスにおいて非常に速い。アルファ及びベータ相における分割を、明確に定義できない。抗体が非常に速く除去されるためである。ブリアキヌマブは、ウステキヌマブ及びmAb 9と比較して、投与後最初の数時間において、より速い分布を伴って、異なる薬物動態挙動を有することを実証することができる。これらの知見は、ヒトFcRnトランスジェニックマウスでも観察された。このことは、投与後の最初の数時間における分布プロセスが、FcRn媒介性でないことを示している。

20

【0422】

下記PKパラメータ：AUC_{0-inf}、C₁、V_{ss}、及びT_{1/2}を算出し、まとめた。

【0423】

【表50】

30

表20: FcRnノックアウトマウスにおけるPKパラメータ。PKパラメータを、1群当たりに6匹の動物に対する10 mg/kgの投与後に算出した。PKデータを、平均±標準偏差で表す。

サンプル	AUC _{0-inf} [h*mg/mL]	C ₁ [mL/分/kg]	V _{ss} [L/kg]	T _{1/2} [時間]
ブリアキヌマブ	1.0 ± 0.1	0.163 ± 0.008	0.113 ± 0.004	10.6 ± 0.6
ウステキヌマブ	3.3 ± 0.1	0.051 ± 0.002	0.077 ± 0.004	22.8 ± 1.1
mAb 9	2.9 ± 0.1	0.059 ± 0.003	0.093 ± 0.005	23.2 ± 1.2

40

【0424】

ウステキヌマブ及びmAb 9は、AUC_{0-inf}、C₁、V_{ss}、及びT_{1/2}に関して同等である。ブリアキヌマブは、ウステキヌマブ及びmAb 9より、小さいAUC_{0-inf}、速いC₁、及び短いT_{1/2}を有する。T_{1/2}の算出は、実際の値とは異なる場合がある。終末相半減期をより正確に算出するのには、3及び4日後の時点が必要であったであろうためである。

【0425】

終末相半減期の統計学的分析を、テューキーのHSD検定を使用して算出した。統計学的な有意性を、ブリアキヌマブとウステキヌマブ間、及び、ブリアキヌマブとmAb 9間の終末相半減期で検出することができた。

50

【0426】

ADAの形成を、薬剤/ADA免疫複合体の検出により試験した。FcRnノックアウトマウスにおいて、10mg/kg ブリアキヌマブの投与は、約168~192時間(7~8日)後に、ブリアキヌマブ/ADA免疫複合体の形成をもたらした。

【0427】

表21: FcRnノックアウトマウスにおけるブリアキヌマブ投与後のADA-陽性サンプル

FcRnノックアウトマウスにおける10mg/kg ブリアキヌマブのi.v.投与後の各サンプリング時点の血清濃度。ADA-陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤/ADA免疫複合体の形成について、それぞれ*及び**として示す。

10

【表51】

時間 [h/d]	M1 [μg/mL]	M2 [μg/mL]	M3 [μg/mL]	M4 [μg/mL]	M5 [μg/mL]	M6 [μg/mL]
0.08	192	181	200	187	186	178
2	86	79	74	91	89	91
8	31	32	36	31	29	33
24/1	6.7	12	7.9	11	6.9	8.0
48/2	1.8	2.3	2.7	2.6	2.4	2.2
168/7	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.
192/8	b.l.q. *	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **
216/9	b.l.q. *	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **
336/14	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *

b. l. q. =定量限界未満

20

【0428】

mAb9の投与後に、薬剤/ADA免疫複合体も、約168時間(7日、表28)後に最初に検出された。ウステキヌマブの投与後には、ウステキヌマブ/ADA複合体は、FcRnノックアウトマウスにおいて検出されなかった(表27)。ブリアキヌマブ及びmAb9の濃度-時間曲線は、ADA形成による速い減少を示していない。ウステキヌマブ及びmAb9は、非常に類似する濃度-時間曲線を有する。このことは、mAb9投与後のADA形成がPKに影響を及ぼさないことを示している。

30

【0429】

表22:ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおけるブリアキヌマブの血清濃度
血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量i.v.注射の投与後に決定する。ADA-陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤/ADA免疫複合体の形成について、それぞれ*及び**として示す。

【表52】

時間 [h/d]	M1 [μg/mL]	M2 [μg/mL]	M3 [μg/mL]	M4 [μg/mL]	M5 [μg/mL]	M6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	201	174	188	192	214	194	194	13
2	109	105	106	105	110	110	107	2.4
8	50	53	53	54	56	58	54	2.8
24/1	37	32	30	34	35	35	34	2.4
48/2	27	23	24	27	24	28	25	2.2
168/7	6.2	5.4	6.7	6.7 *	6.4	6.8	6.4	0.5
336/14	0.4	1.0 *	0.1 **	0.2 **	0.7 *	0.1 **	0.4	0.4
504/21	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	-				
672/28	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q.	-

40

【0430】

50

表 2 3 : ヒト F c R n トランスジェニックマウスにおけるウステキヌマブの血清濃度
血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量 i . v . 注射の
投与後に決定する。ADA - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / ADA 免疫複合体
の形成について、それぞれ * 及び ** として示す。

【表 5 3】

時間 [h / d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	205	219	212	225	202	226	215	10
2	156	161	191	175	153	215	175	24
8	120	116	110	114	114	115	115	3.2
24/ 1	73	77	72	73*	69	76	73	2.9
48/ 2	58	57	64	57	56	59	59	2.7
168/ 7	18	19	27	22	20	25	22	3.5
336/ 14	7.2	6.8	8.0	6.2	8.3	4.8	6.9	1.3
504/ 21	2.2	2.2	2.5	2.3	2.5	3.0 *	2.5	0.3
672/ 28	0.9	0.8	2.1	1.1	1.0	1.8	1.3	0.5

【0 4 3 1】

表 2 4 : ヒト F c R n トランスジェニックマウスにおける mAb 8 の血清濃度
血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量 i . v . 注射の
投与後に決定する。ADA - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / ADA 免疫複合体
の形成について、それぞれ * 及び ** として示す。

【表 5 4】

時間 [h / d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	241	177	174	203	220	217	206	26
2	146	175	155	120	109	146	142	24
8	90	95	97	106	108	85	97	8.7
24/ 1	76	55	55	59	80	72	66	10.9
48/ 2	65	52	56	71	71	68	64	8.1
168/ 7	24	28	25	28	27	21 **	25	2.6
336/ 14	7.7	2.9 *	4.4	1.3 *	2.4 **	6.7 *	4.2	2.5
504/ 21	3.1	0.1 **	2.3	2.1	0.1 **	0.1	1.3	1.4
672/ 28	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	-

【0 4 3 2】

表 2 5 : ヒト F c R n トランスジェニックマウスにおける mAb 9 の血清濃度
血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量 i . v . 注射の
投与後に決定する。ADA - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / ADA 免疫複合体
の形成について、それぞれ * 及び ** として示す。

【表 5 5】

時間 [h / d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	194	254	198	270	295	233	241	40
2	151	183	124	143	165	137	150	21
8	126	104	109	89	111	114	109	12
24/ 1	73	80	64	89	94	77	80	11
48/ 2	65	81	66	69	83	60	71	9.2
168/ 7	34	37	31	30 *	38	36	34	3.1
336/ 14	13	15 **	14 **	15 **	13 **	9.6 **	13	1.9
504/ 21	4.2	0.3 **	4.5 *	4.9 **	0.1 **	4.8 **	3.1	2.3
672/ 28	0.1 **	2.4 *	1.4 *	1.5 *	2.5	0.1 *	1.3	1.1

10

20

30

40

50

【0433】

表26：FcRnノックアウトマウスにおけるブリアキヌマブの血清濃度

血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量i.v.注射の投与後に決定する。ADA-陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤/ADA免疫複合体の形成について、それぞれ*及び**として示す。

【表56】

時間 [h/d]	M1 [μg/mL]	M2 [μg/mL]	M3 [μg/mL]	M4 [μg/mL]	M5 [μg/mL]	M6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	192	181	200	187	186	178	187	8.0
2	86	79	74	91	89	91	85	7.1
8	31	32	36	31	29	33	32	2.3
24/1	6.7	12	7.9	11	6.9	8.0	8.7	2.1
48/2	1.8	2.3	2.7	2.6	2.4	2.2	2.3	0.3
168/7	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q.	-
192/8	b.l.q. *	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q.	-
216/9	b.l.q. *	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	-
336/14	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q.	-

10

【0434】

表27：FcRnノックアウトマウスにおけるウステキヌマブの血清濃度

20

血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量i.v.注射の投与後に決定する。

【表57】

時間 [h/d]	M1 [μg/mL]	M2 [μg/mL]	M3 [μg/mL]	M4 [μg/mL]	M5 [μg/mL]	M6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	209	221	229	228	220	219	221	7.4
2	153	164	158	155	157	149	156	4.8
8	80	95	88	96	104	95	93	8.0
24/1	50	47	37	44	38	37	42	5.5
48/2	16	16	17	13	11	14	15	2.2
168/7	0.4	0.6	0.4	0.3	0.6	0.4	0.5	0.1
192/8	0.5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4	0.2	0.2
216/9	b.l.q.	-						
336/14	b.l.q.	-						

30

【0435】

表28：FcRnノックアウトマウスにおけるmAb9の血清濃度

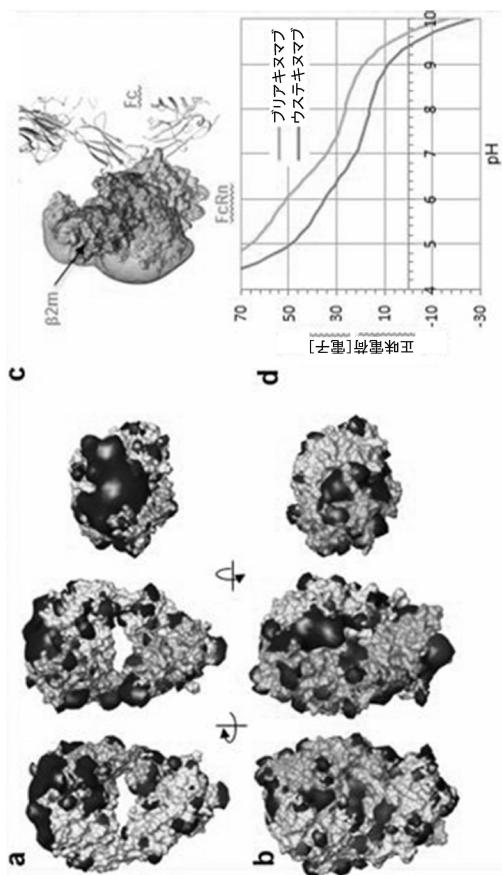
血清濃度を、1群当たりに6匹の動物に対する、10mg/kgの単回用量i.v.注射の投与後に決定する。ADA-陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤/ADA免疫複合体の形成について、それぞれ*及び**として示す。

【表 5 8】

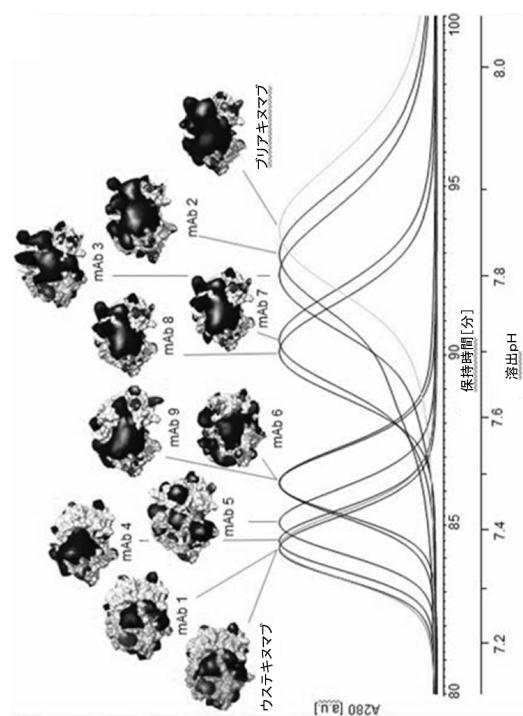
時間 [h / d]	M 1 [μ g/mL]	M 2 [μ g/mL]	M 3 [μ g/mL]	M 4 [μ g/mL]	M 5 [μ g/mL]	M 6 [μ g/mL]	平均 [μ g/mL]	SD [μ g/mL]
0.08	249	292	232	214	242	226	242	27
2	119	130	139	136	123	129	129	7.3
8	62	65	74	80	83	87	75	10
24/ 1	31	37	37	32	35	36	35	2.6
48/ 2	16	15	17	12	13	16	15	1.9
168/ 7	0.2 *	0.4 **	0.5	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1
192/ 8	0.2	0.1 **	0.2	0.1 **	0.1 **	0.2	0.2	0.2
216/ 9	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	-
336/ 14	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q. *	b.l.q.	b.l.q.	-

10

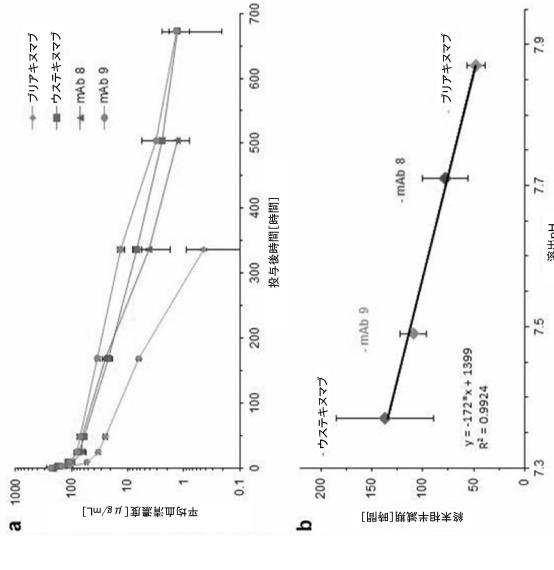
【図 1】



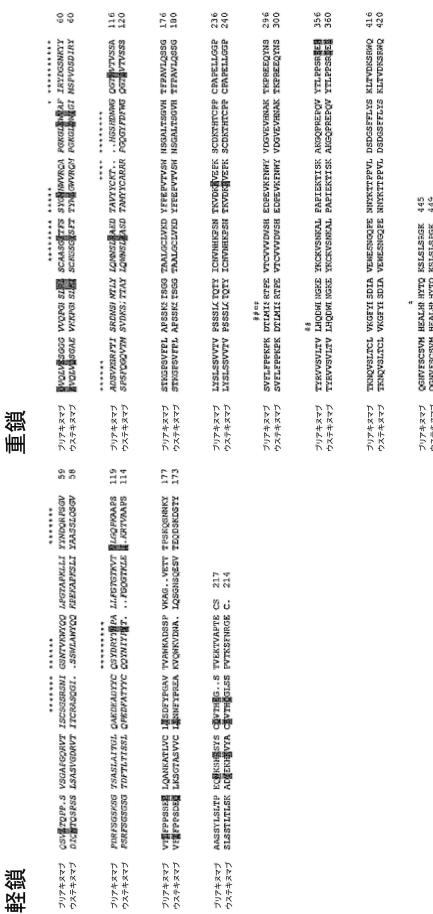
【図 2】



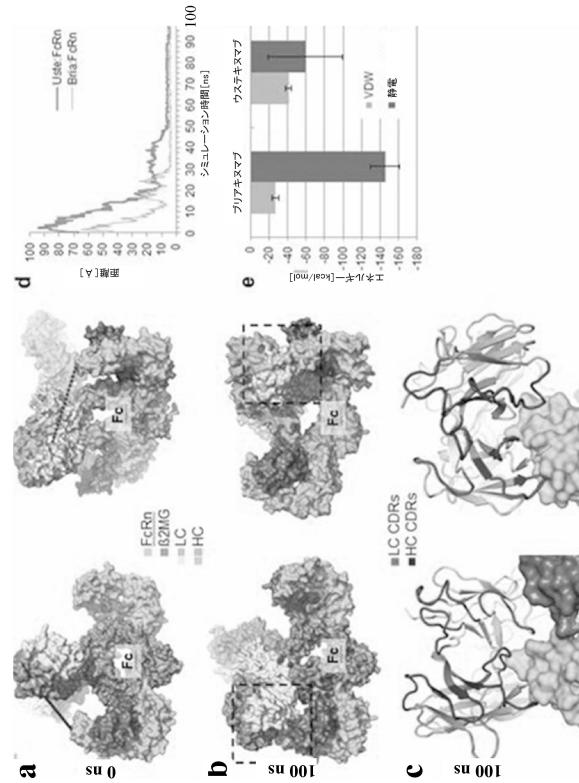
【図3】



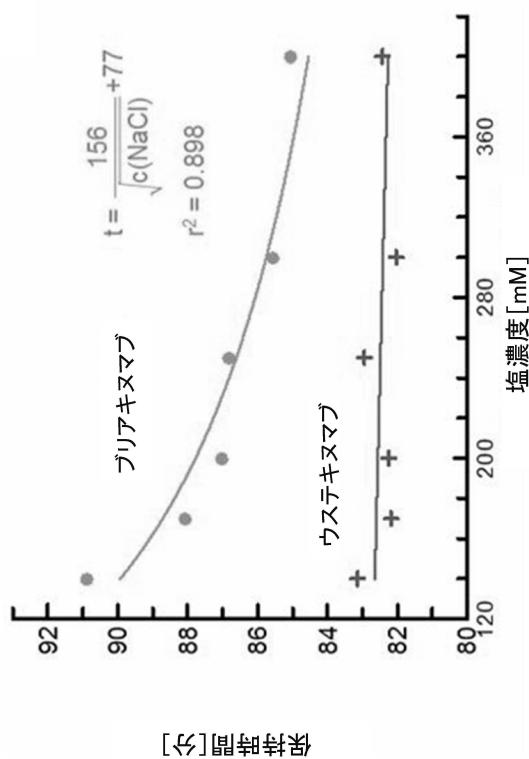
【 四 5 】



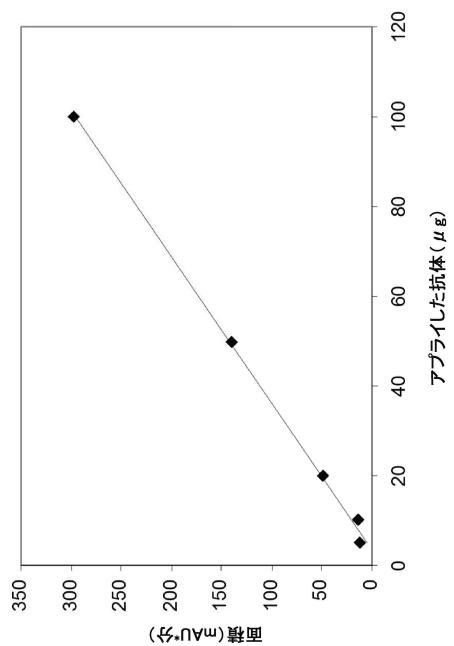
【図4】



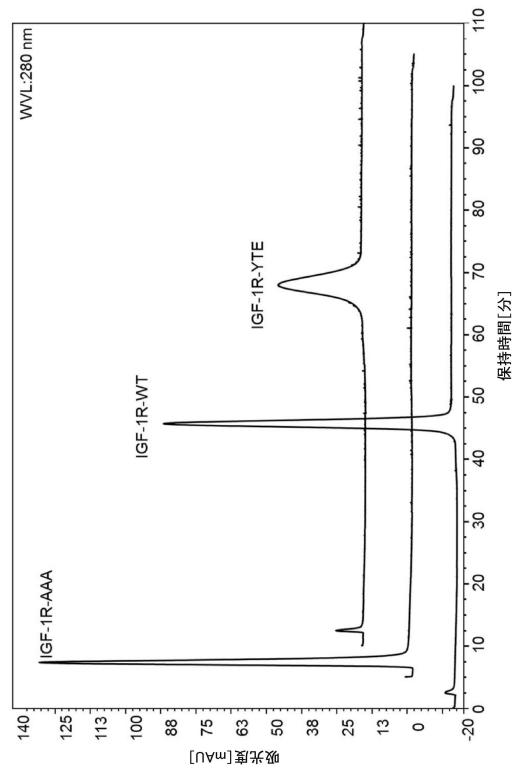
【 四 6 】



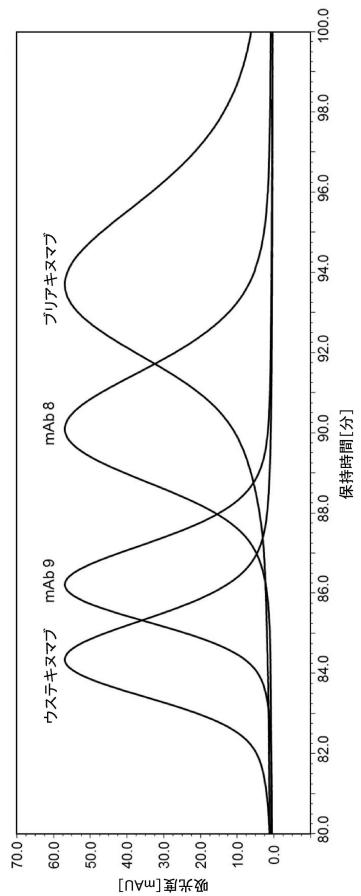
【図7】



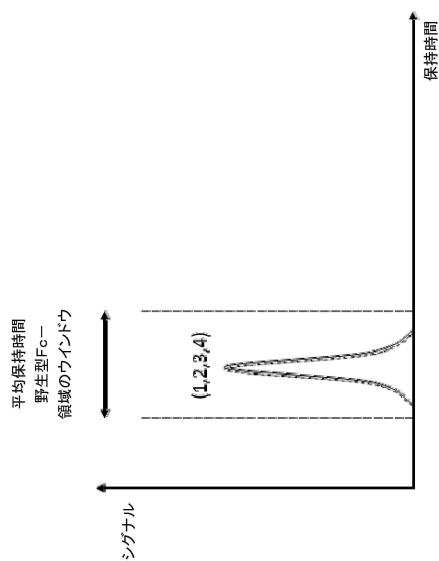
【図8】



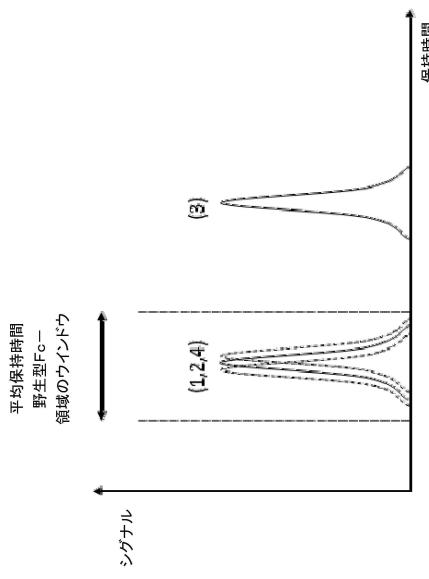
【図9】



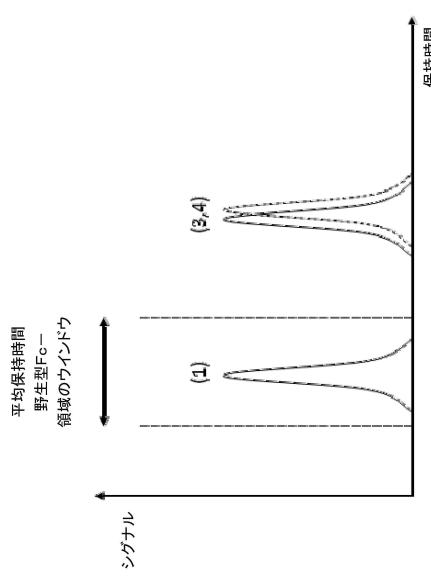
【図10 A】



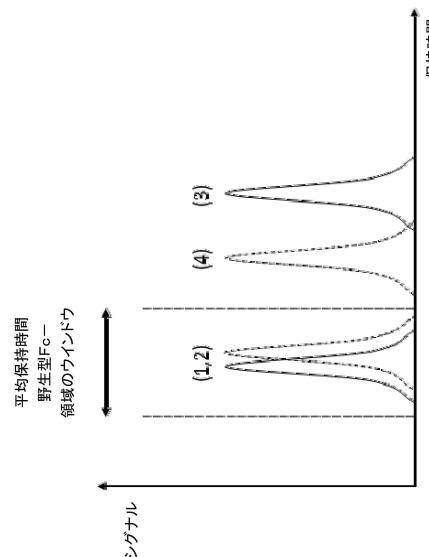
【図 10 B】



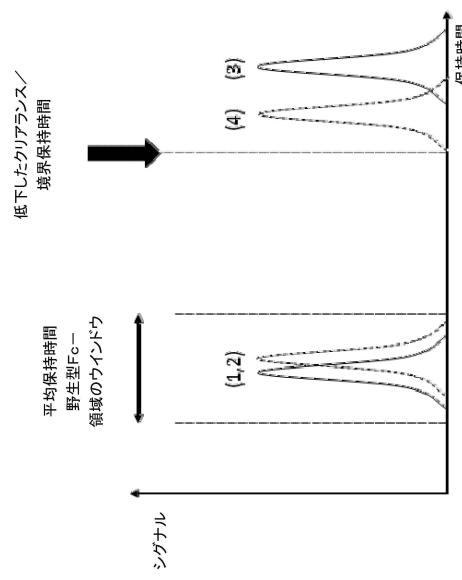
【図 10 C】



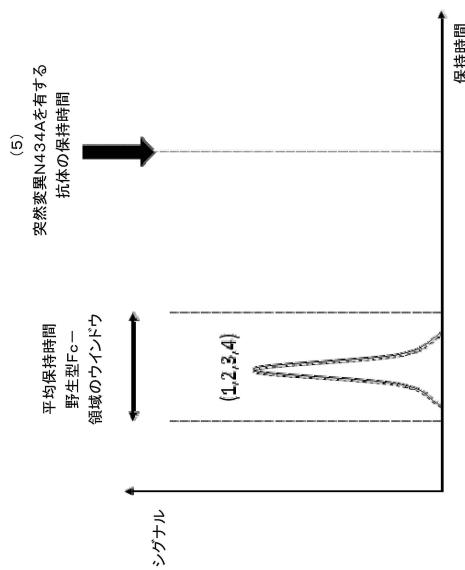
【図 10 D】



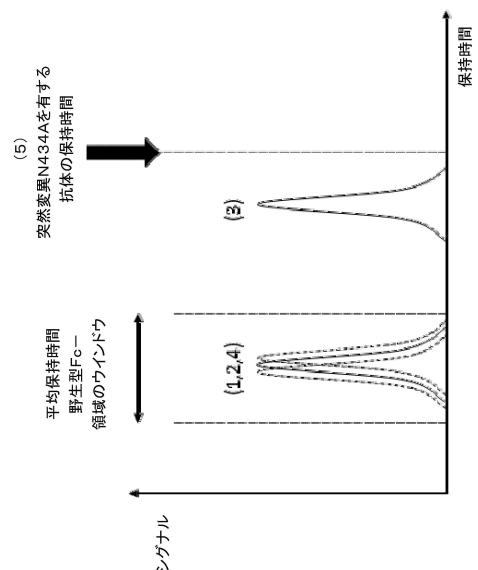
【図 11】



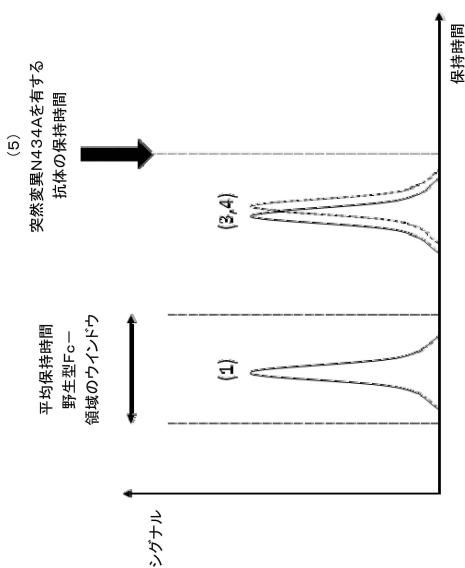
【図 1 2 A】



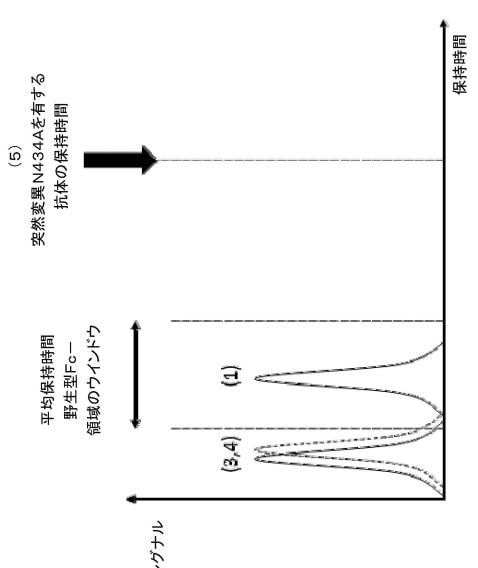
【図 1 2 B】



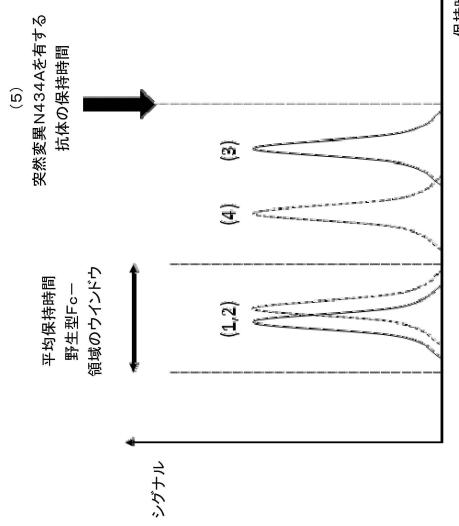
【図 1 2 C】



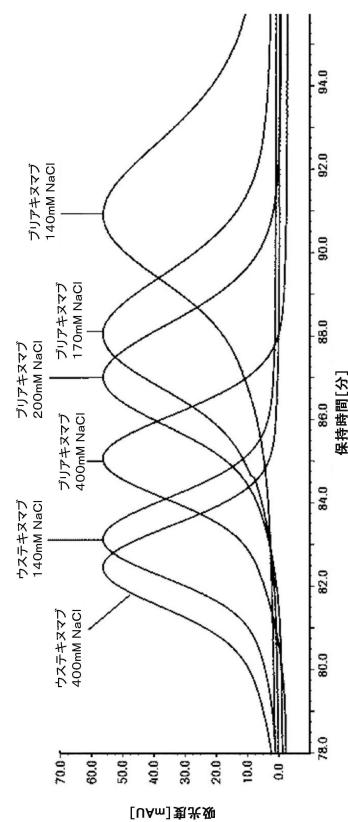
【図 1 2 D】



【 1 2 E 】

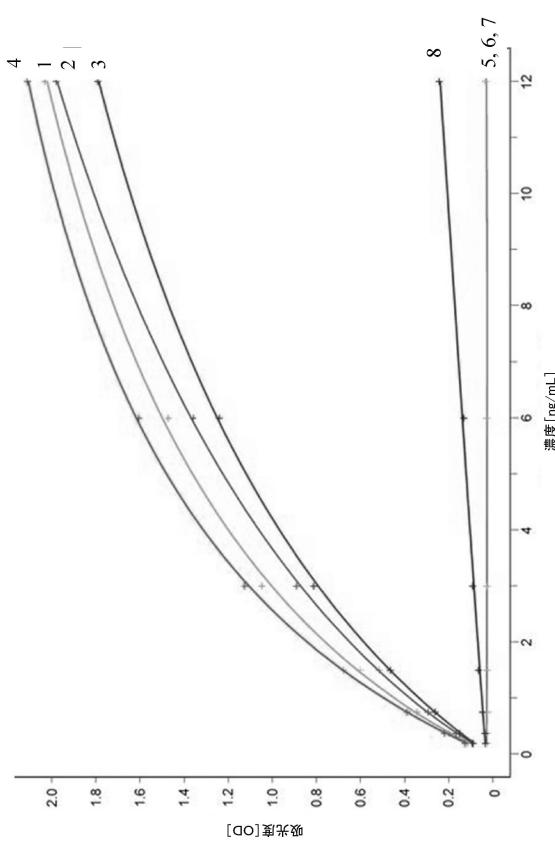


【図13】

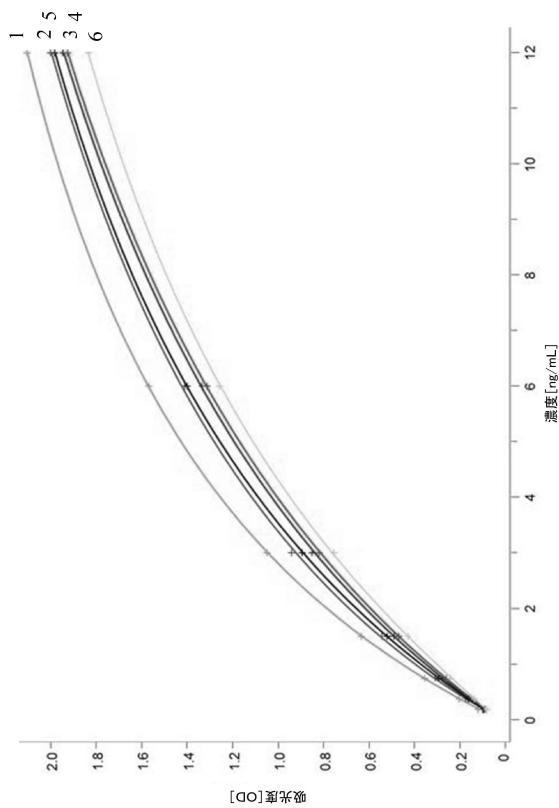


【図 1 4】

*****	DIMOTOPSS	ISASVURIT	ITCSAURIT	NYLAWORKP	GRAPKIVITP	TSISSEGVPS
*****	DIMOTOPSS	ISASVURIT	ITCSAURIT	NYLAWORKZ	GRAPKIVITZ	TSISSEGVPS
*****	RFSSGSGGD	FTLITISSQF	EDFATYCCQG	TSITVNTFGQ	GIKVLEKRTV	
*****	RFSSGSGGD	FTLITISSQF	EDFATYCCQG	TSKSPVNTFGQ	GIKVLEKRTV	
*****	RFSSGSGGD	FTLITISSQF	EDFATYCCQG	TSKSPVNTFGQ	GIKVLEKRTV	



【図 1 6】



【配列表】

0006744855000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 シュロットハウアー, ティルマン
ドイツ国、82377 ペンツベルク、ゾンマーシュトラーセ 3ア-
ド

(72)発明者 ショック, アンゲラ
ドイツ国、81547 ミュンヘン、ザレックシュトラーセ 6

審査官 高田 亜希

(56)参考文献 カナダ国特許出願公開第02860600 (CA, A1)

国際公開第2013/120929 (WO, A1)

TILMAN SCHLOTHAUER; PETRA RUEGER; JAN OLAF STRACKE; ET AL, ANALYTICAL FCRN AFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES, MABS, 2013
年 7月 1日, VOL:5, NR:4, PAGE(S):576 - 586, U R L, <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.24981>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 30/00 - 30/96

C 07 K 1/00 - 19/00

G 01 N 33/48 - 33/98

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)