

(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 I
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 Z N A J
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 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
(86) (22) 出願日	平成27年3月17日 (2015.3.17)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2017-517745 (P2017-517745A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/055482		T
(87) 国際公開番号	W02015/140126		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成27年9月24日 (2015.9.24)		グレンツァーヘルストラッセ124
審査請求日	平成30年3月2日 (2018.3.2)	(74) 代理人	110001508
(31) 優先権主張番号	14161103.8		特許業務法人 津国
(32) 優先日	平成26年3月21日 (2014.3.21)	(72) 発明者	エムリッヒ, トーマス
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ドイツ国、82393 イッフェルドルフ
(31) 優先権主張番号	14165987.0		、ヴァルトシュトラッセ 21
(32) 優先日	平成26年4月25日 (2014.4.25)	(72) 発明者	ケッテンベルガー, フーベルト
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ドイツ国、81369 ミュンヘン、パッ
			サウアー・シュトラッセ 30
			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 FcRn 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 FcRn 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、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、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、

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 i n v i v o 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、I g G 1、I g G 3、又は I g G 4 サブクラスの抗体と比較して相対的に長い i n v i v o 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 の保持時間を有し、第 2 の保持時間の 5 % 以内である第 1 の保持時間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 3】

更に、突然変異 N 4 3 4 A を有する I g G F c 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 の保持時間を有し、互いに 5 % 以内の第 1 の保持時間と第 2 の保持時間を有し、突然変異 N 4 3 4 A を有する F c 領域の保持時間より少なくとも 5 % 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 i n v i v o 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 の保持時間を有し、互いに 5 % 以内の第 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 i n v i v o 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、1 4 0 mM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、4 0 0 mM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、F c R n 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 i n v i v o 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 (I g G) 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 (F a b) 領域と、F c レセプターとの相互作用を担う定常領域 (F c 領域) とを含有する ([1、2])。ヒト I g G 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、F c 領域と新生児 F c レセプター (F c R n) との間の相互作用により、主に媒介される ([4、5])。これは、I g G 又は F c 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 F c レセプター F c R n は、I g G 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 I g G 輸送、及び、抗原 - I g G 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 F c R n 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 (- F c R n) 及び μ_2 ミクログロブリン ($\mu_2 m$) サブユニットからなるヘテロ二量体である ([10])。F c R n は、F c 領域の C_H2 - C_H3 領域中の部位に結合し ([11 ~ 14])、2 つの F c R n 分子は、F c 領域に同時に結合することができる ([15、16])。F c R n と F c 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。ピオチンでの化学修飾後の放射性ヨウ化キメラTNF-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

40

【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。

【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 F c 領域を有する抗体は、単純に、同様の P K プロファイルを有するわけではない。F c R n 結合に対する F a b 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（[4 7]、[2 4]、[2 5]）。

【 0 0 1 0 】

F c 領域と F c R n との特異的相互作用に加えて、F a b 領域も、F c R n - I g G 相互作用に寄与することが示唆されている（[3 7、2 4、2 5]）。

【 0 0 1 1 】

後に公開された Li, B., et al.（[4 8]）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。

【 0 0 1 2 】

Sampei, Z., et al.（[4 9]）は、因子 V I I I 補助因子活性の機能を模倣する、非対称二重特異性 I g G 抗体の特定及び多次元最適化を報告している。

【 0 0 1 3 】

Wang et al.（[2 4]）は、異なるターゲット特異性及び F a b 領域を有するが、同一の F c 配列を有する I g G が、異なる F c R n 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 F a b 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、p H 7 . 3 において F c R n に過剰な結合性を有する I g G には、短い終末相半減期の問題があることを示している。

【 0 0 1 4 】

近年、Schlothauer et al.（[2 5]）は、F c R n と I g G 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 F c R n 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 F c 領域を有する I g G が、i n v i t r o における F c R n 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、F c R n - I g G 相互作用における F a b 領域の影響を示した。

【 0 0 1 5 】

Benson, J.M., et al.（[5 0]）は、ウステキヌマブ：インターロイキン - 1 2 及びインターロイキン - 2 3 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。

【 0 0 1 6 】

抗体ブリアキヌマブのアミノ酸配列は、国際公開公報第 2 0 1 3 / 0 8 7 9 1 1 号（配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 ）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 2 0 1 3 / 0 8 7 9 1 1 号（配列番号 3 7 及び配列番号 3 8 ）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。

【発明の概要】

【 0 0 1 7 】

F v ドメイン中の電荷分布が、抗体 - F c R n 結合性に影響を及ぼし、抗体と F c R n 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 p H 7 . 4 での抗体 - F c R n 複合体の解離に関する F c R n 結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 0 1 8 】

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とが実質的に異なる場合、抗体の i n v i v o 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 i n v i v o 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

10

20

30

40

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とが実質的に異なる場合、i n v i v o 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、

i n v i v o 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とが実質的に異なる場合、抗体は、I g G クラスの標準的 / 天然の抗体と比較して相対的に短い i n v i v o での半減期を有する、

30

抗体の相対的な i n v i v o での半減期を決定する方法である。

【0022】

一実施態様では、I g G クラスの抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 サブクラスの抗体である。一実施態様では、I g G クラスの抗体は、I g G 1、I g G 3、又は I g G 4 サブクラスの抗体である。一実施態様では、I g G クラスの抗体は、I g G 1 又は I g G 4 サブクラスの抗体である。一実施態様では、I g G クラスの抗体は、I g G 1 サブクラスの抗体である。一実施態様では、I g G クラスの抗体は、I g G 4 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、i i) 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と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 i n v i v o 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、

i i) 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

時間と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 (Kabatt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、

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。

【 0 0 2 9 】

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 1 0 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。

【 0 0 3 0 】

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 1 0 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 1 0 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。

【 0 0 3 1 】

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 1 0 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 1 0 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。

【 0 0 3 2 】

一実施態様では、抗体は、全長抗体である。

【 0 0 3 3 】

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。

【 0 0 3 4 】

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。

【 0 0 3 5 】

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

【 0 0 3 6 】

全態様の一実施態様では、第 1 の塩濃度は、5 0 m M ~ 2 0 0 m M である。

【 0 0 3 7 】

全態様の一実施態様では、第 1 の塩濃度は、約 1 4 0 m M である。

【 0 0 3 8 】

全態様の一実施態様では、第 2 の塩濃度は、3 0 0 m M ~ 6 0 0 m M である。

【 0 0 3 9 】

全態様の一実施態様では、第 2 の塩濃度は、約 4 0 0 m M である。

【 0 0 4 0 】

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

【 0 0 4 1 】

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 1 0 % 異なる。

【 0 0 4 2 】

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 1 5 % 異なる。

【 0 0 4 3 】

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

【 0 0 4 4 】

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。

【 0 0 4 5 】

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 $1 (\sim 1 / S Q R T (c (s a l t)))$ に比例する。

【 0 0 4 6 】

全態様の一実施態様では、親又は参照抗体は、サブクラス I g 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 I g 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 抗体である。 30

【 0 0 4 7 】

全態様の一実施態様では、親又は参照抗体は、サブクラス I g 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 I g 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 抗体である。

【 0 0 4 8 】

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。

【 0 0 4 9 】

全態様の一実施態様では、F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムは、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。 40

【 0 0 5 0 】

全態様の一実施態様では、F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムは、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。

【 0 0 5 1 】

全態様の一実施態様では、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、pH6.0での親和性において、差異を示さなかったため、Fab領域は、pH6.0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た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

30

【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。

【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

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、 $10^{-13} \sim 10^{-8}$ M、一部の実施態様では、 $10^{-13} \sim 10^{-9}$ Mの結合親和性 (K_D) を意味する。

【 0 0 7 2 】

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。

【 0 0 7 3 】

「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。

10

【 0 0 7 4 】

「CH2 - ドメイン」という用語は、ほぼEU位置231からEU位置340 (K a b 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、CH2ドメインは、配列番号05 :

【表 1】

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

20

のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 7 5 】

「CH3 - 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、CH3ドメインは、配列番号06 :

【表 2】

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

30

のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 7 6 】

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 : I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g 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、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及びI g 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、
、及び μ と呼ばれる。

40

【 0 0 7 7 】

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。

【 0 0 7 8 】

「Fc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 Fc R n 結合活性を示す抗体 Fc 領域との融合物を意味する。

【 0 0 7 9 】

「ヒト起源のFc領域」という用語は、ヒンジ領域、CH2ドメイン、及びCH3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、E Uインデックスとも呼ばれる、E U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（ α -FcRn）と、15kDa β -ミクログロブリン（ β 2m）とから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E U位置243からE U位置261に向かって、ならびに、ほぼE U位置275からE U位置293に向かって、ならびに、ほぼE U位置302からE U位置319に向かって、ならびに、ほぼE U位置336からE U位置348に向かって、ならびに、ほぼE U位置367からE U位置393及びE U位置408に向かって、ならびに、ほぼE U位置424からE U位置440に向かって伸びる抗体重鎖ポリペプチドの部分の意味する。一実施態様では、KabatのE U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

(E U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s c F v又はs c F a b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、K a b a tのE U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、C H 1ドメインとC H 2ドメインとを結合する抗体重鎖ポリペプチドの部分の意味する。一実施態様では、ヒンジ領域は、K a b a tのE U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F c領域についてのK a b a t E U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F c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F c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)F c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F c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F c領域」は、2つのヒトF c領域ポリペプチドからなる。「変異(ヒト)F c領域」は、2つのF c領域ポリペプチドからなり、両方とも、変異(ヒト)F c領域ポリペプチドであることができ、又は、一方がヒトF c領域ポリペプチドであり、他方が変異(ヒト)F c領域ポリペプチドである。

【0087】

一実施態様では、ヒトF c領域ポリペプチドは、配列番号07のヒトI g G 1 F c領域

10

20

30

40

50

ポリペプチド、又は、配列番号 08 のヒト IgG2Fc 領域ポリペプチド、又は、配列番号 09 のヒト IgG3Fc 領域ポリペプチド、又は、配列番号 10 のヒト IgG4Fc 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、Fc 領域ポリペプチドは、配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 の Fc 領域ポリペプチドから得られ、配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 の Fc 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、Fc 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、Fc 領域ポリペプチドは、配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 のヒト Fc 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、Fc 領域ポリペプチドは、配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 のヒト Fc 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、Fc 領域ポリペプチドは、配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 のヒト Fc 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。

【0088】

配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 のヒト Fc 領域ポリペプチドから得られた Fc 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、P329G という用語は、配列番号 07 又は 08 又は 09 又は 10 のヒト Fc 領域ポリペプチドに対して、アミノ酸位置 329 において、プロリンからグリシンへの突然変異を有する、Fc 領域ポリペプチド由来ヒト Fc 領域ポリペプチドを意味する。

【0089】

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、EUI ンデックスに従う。EUI ンデックス又は Kabat における EUI ンデックス又は Kabat EUI ンデックス又は EUN ンバリングスキームは、抗体の EUN 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、Kabat 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)。

【0090】

ヒト IgG1 Fc 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 4】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 07) .

を有する。

【0091】

突然変異 L234A、L235A 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 5】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 11) .

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】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
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】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
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】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
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
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
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
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
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
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
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
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
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 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 1 3】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 9) .

10

を有する。

【0 1 0 0】

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 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 1 4】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 2 0) .

20

を有する。

【0 1 0 1】

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 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 1 5】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 2 1) .

30

を有する。

【0 1 0 2】

ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドは、下記アミノ酸配列：

【表 1 6】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 0) .

40

を有する。

【0 1 0 3】

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 1 7】

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 2 2) .

10

を有する。

【0 1 0 4】

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 1 8】

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 2 3) .

20

を有する。

【0 1 0 5】

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 1 9】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 2 4) .

30

を有する。

【0 1 0 6】

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 2 0】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPEEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRITVVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 2 5) .

40

を有する。

50

【 0 1 0 7 】

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 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 2 1】

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK（配列番号 2 6）。

10

を有する。

【 0 1 0 8 】

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 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 2 2】

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK（配列番号 2 7）。

20

を有する。

【 0 1 0 9 】

P 3 2 9 G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 2 3】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK（配列番号 2 8）。

30

を有する。

【 0 1 1 0 】

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 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 2 4】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK（配列番号 2 9）。

40

を有する。

【 0 1 1 1 】

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 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 2 5】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 3 0) .

10

を有する。

【 0 1 1 2 】

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 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 2 6】

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 3 1) .

20

を有する。

【 0 1 1 3 】

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 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 2 7】

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 3 2) .

30

40

を有する。

【 0 1 1 4 】

種々のヒト F c 領域のアライメントを、以下に示す (E U ナンバリング) 。

【表 2 8】

		2		2		
		3		5		
		0		0		
IGG1	DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	
IGG2	...VECPPCP	APP.VAGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	
IGG3	DTFPPCPRCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	
IGG4	...PPCPSCP	APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	
	-- HINGE --	-- CH2 -----				
				3		
				0		10
				0		
IGG1	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	
IGG2	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	
IGG3	PEVQFKWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	
IGG4	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	
	-- CH2 -----					
				3		
				5		
				0		
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 -----			
				4		
				0		
				0		
IGG1	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	
IGG2	GFYPSDISVE	WESNGQPENN	YKTTTPPMLD	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	
IGG3	GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YNTTPPMLD	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	
IGG4	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	DGSFFFLYSRL	TVDKSRWQEG	
	-- CH3 -----					
				4		
				4		30
				7		
IGG1	NVFSCSVME	ALHNHYTQKS	LSLSPGK			
IGG2	NVFSCSVME	ALHNHYTQKS	LSLSPGK			
IGG3	NIFSCSVME	ALHNRFTQKS	LSLSPGK			
IGG4	NVFSCSVME	ALHNHYTQKS	LSLSLGK			
	-- CH3 -----					

【0 1 1 5】

「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。

【0 1 1 6】

「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）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、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。

【0 1 1 7】

「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、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、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HPLC）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DNA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IgG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（VH）、続けて、3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）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（VL）、続けて、定常軽鎖（CL）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種類の内の一方に割り当てることができる。

30

【0121】

「負の線形pH勾配」という用語は、高い（すなわち、中性又はアルカリ性）pH値から開始して、より低い（すなわち、中性又は酸性）pH値で終了するpH勾配を意味する。一実施態様では、負の線形pH勾配は、約8.8のpH値で開始し、約5.5のpH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、導入されている宿主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、宿主細胞、例えば、NS0もしくはCHO細胞、又は、宿主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つの部分を含む。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（メチルメタクリレート）；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

40

【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、

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入を指し、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与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ブ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」、「改変抗体」、及び「改変融合ポリペプチド」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、改変抗体又は改変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】

II. 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 I g 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 I g 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 (α - F c R n) と、15 kDa β - ミクログロブリン (β 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 I g 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 I g 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 I g 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 (例えば、[1 6] を参照のこと)。

10

【 0 1 3 6 】

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

【 0 1 3 7 】

F c R n と I g 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 2 4 3 と E U 位置 2 6 1 との間、ほぼ E U 位置 2 7 5 と E U 位置 2 9 3 との間、ほぼ E U 位置 3 0 2 と E U 位置 3 1 9 との間、ほぼ E U 位置 3 3 6 と E U 位置 3 4 8 との間、ほぼ E U 位置 3 6 7 と E U 位置 3 9 3 との間、E U 位置 4 0 8 及び、ほぼ E U 位置 4 2 4 と E U 位置 4 4 0 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。

20

【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.

30

【 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 I g G の F c 領域中の重要な結合部位は、ヒスチジン 3 1 0、ヒスチジン 4 3 5、及びイソロイシン 2 5 3 であり、より少ない程度で、ヒスチジン 4 3 3 及びチロシン 4 3 6 であることが証明されている (例えば、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) 2211-2217 を参照のこと)。

40

【 0 1 3 9 】

F c R n に対する I g G 結合性を向上させる方法は、I g G を種々のアミノ酸残基：スレオニン 2 5 0、メチオニン 2 5 2、セリン 2 5 4、スレオニン 2 5 6、スレオニン 3 0 7、グルタミン酸 3 8 0、メチオニン 4 2 8、ヒスチジン 4 3 3、及びアスパラギン 4 3 4 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. 3

50

0 (2010) 777-789を参照のこと)。

【 0 1 4 0 】

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。

【 0 1 4 1 】

F c R n 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 F c - マウス F c R n 相互作用に重要な F c 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 10 69 (2002) 5171-5180を参照のこと)。残基 I 2 5 3、H 3 1 0、H 4 3 3、N 4 3 4、及び H 4 3 5 (K a b a t による E U 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) 54 2-548)。残基 I 2 5 3、H 3 1 0、及び H 4 3 5 は、ヒト F c とマウス F c R n 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 M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E は、タンパク質 - タンパク質相互作用研究により、F c R n 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 F c - ヒト F c R n 複合体の研究から、残基 I 2 5 3、S 2 5 4、H 4 3 5、及び Y 4 3 6 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 2 4 8 ~ 2 5 9 及び 3 0 1 ~ 3 1 7 及び 3 7 6 ~ 3 8 2 及び 4 2 4 ~ 4 3 7 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 F c R n 結合性におけるその効果を、下記表 1 に列記する。

【 0 1 4 2 】

【表 3 0】

表 1: 種々の F c 領域突然変異と、F c R n 結合性及び i n v i v o で
の半減期におけるその影響の併記

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
H285 H310Q/H433N (マウス I g G 1)	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 I g G 1)	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 I g G 1)	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 I g G 1)	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 I g G 1)	低下 m u F c R n に 対する結合性 H 3 1 0 A : < 0 . 1 r e l (マウス)	短縮 (マウス)	Kim, J.K., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819- 2825
H433A (ヒト I g G 1)	m u F c R n に 対する結合性 1 . 1 r e l、 h u F c R n に 対する結合性 0 . 4 r e l (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 I g G 1)	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 I g G 1)	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 I g G 1)	向上 (ヒト)	伸長	Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591- 6604
H435A (ヒト化 I g G 1)	低下 h u F c R n に 対する結合性 < 0. 1 r e l	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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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	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
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 I g G 1)	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 I g G 1)	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 I g G 1)	p H 6 において 向上 (ヒト、 カニクイザル、 マウス)	マウス P 2 5 7 I / N 4 3 4 H 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
F c R n 結合無効化 I253 H310 H433 H435 F c R n 結合低下: Y436 F c R n 結合向上: T250 N252 S254 T256 T307 M428 N434	向上及び低下	F c R n に対する I g G 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 F c R n - I g G 相互作用 により、血清中での I g G 及び F c 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 I g G 1)	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	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
256P 280K 339T 385H 428L 434W/Y/F/A/H (ヒト I g G)	中性 p H において向上		国際公開公報 第 2 0 1 1 / 1 2 2 0 1 1 号

10

【 0 1 4 3 】

F v ドメイン中の電荷分布が、抗体 - F c R n 結合性に影響を及ぼし、抗体と F c R n との間の更なる相互作用をもたらすことができることが見出された。これは、特に p H 7 . 4 での抗体 - F c R n 複合体の解離に関する F c R n 結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に影響を及ぼす（短縮する）。

【 0 1 4 4 】

ヒト新生児 F c レセプター（F c R n）は、I g G 異化に重要な役割を果たす。i n v i t r o での I g G - F c R n 結合特性 / 特徴は、その i n v i v o 薬物動態特性を示している。このような i n v i t r o 法は、繰り返しの i n v i v o 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

【 0 1 4 5 】

I g G - F c R n 相互作用は、プラズモン表面共鳴（S P R）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）。

【 0 1 4 6 】

熱量及び非対称流れ場流動分別法も、F c R n に対する I g G 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 ; Pollastrini, J., et al., Anal. Biochem. 414 (2011) 88-98）。

30

【 0 1 4 7 】

複合体アッセイ法に加えて、S P R により決定される i n v i t r o での F c R n 結合パラメータと i n v i v o 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）。

【 0 1 4 8 】

40

S P R 技術により測定された、p H 6 及び中性 p H での I g G 1 の F c R n に対する親和性を改善するための I g G 1 の F c 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、p H 7 . 4 での F c R n に対する同時の顕著な結合性を伴わずに、p H 6 において、N 4 3 4 A I g G 1 変異体における F c R n 親和性がわずかにのみ向上したことは、霊長類において改善された薬物動態をもたらす、これは、p H 7 . 4 での F c R n 放出の重要性を説明している（上記 Yeung, Y.A., を参照のこと）。

【 0 1 4 9 】

例えば、I g G - F c R n 相互作用の S P R 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されてきた[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V₁D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V₁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、Fd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】

pH6.0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桁又は規模、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)の範囲に相関することを示すことができる。

【0156】

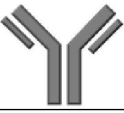






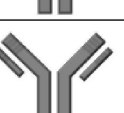
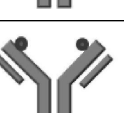
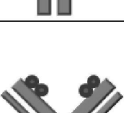
d) pH依存性FcRn - IgG相互作用

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。Fv、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: mAb1~6。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、mAb7及びmAb8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。mAb9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。mAb10は、HC中の5つの塩基性アミノ酸の更なる交換を有するmAb9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】

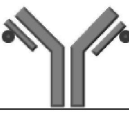

No	名称	説明		F c R n カラム保持時間 [分]			T1/2[時間]
				p H 勾配	p H 勾配＋ 高塩	塩 勾配	
1	ブリアキヌマブ	ブリアキヌマブ 野生型		93.7	83.1	59.6	48
2	ウステキヌマブ	ウステキヌマブ 野生型		84.3	80.4	31.3	137
3	mAb 1	ウステキヌマブ F v＋ブリアキ ヌマブ 定常ドメイン		84.3	80.4	33.0	
4	mAb 2	ブリアキヌマブ F v＋ウステキ ヌマブ 定常ドメイン		93.0	83.0	58.5	
5	mAb 3	ウステキヌマブ H C＋ ブリアキヌマブ L C		92.4	83.0	53.9	
6	mAb 4	ブリアキヌマブ H C＋ ウステキヌマブ L C		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 C D R		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 C D R		86.2	81.4	40.7	
9	mAb 7	ブリアキヌマブ R 1 9 H C A、 K 6 4 H C A、 R 8 3 H C A*		90.4	82.7	52.1	
10	mAb 8	ブリアキヌマブ R 1 6 H C A、 R 1 9 H C A、 K 5 7 H C A、 K 6 4 H C A、 R 8 3 H C A*		90.1	82.6	49.5	78

10

20

30

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 2 7 L C A、 R 5 5 L C A、 R 9 4 L C A *		86.2	81.6	38.1	109
12	mAb 10	ブリアキヌマブ R 1 6 H C A、 R 1 9 H C A、 K 5 7 H C A、 K 6 4 H C A、 R 8 3 H C A、 R 2 7 L C A、 R 5 5 L C A、 R 9 4 L C A *		85.0	81.3	22.4	

10

【 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（ $n = 3$ ） \pm 標準偏差（SD）として表す。pH 6.0 及び pH 7.4 での F v 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 F v ドメインの等電点又は正味電荷とは相関しない。

20

【 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	1.0 \pm 0.22	0.5 \pm 0.08	0.9 \pm 0.16	0.4 \pm 0.17	0.4 \pm 0.04	0.4 \pm 0.07	0.2 \pm 0.03	0.2 \pm 0.06	0.3 \pm 0.19	0.2 \pm 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

30

40

【 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

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、

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、 $pH 6$ 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、 $pH 6$ 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定常部上にウステキヌマブのFvドメインを有するmAb1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有した。ブリアキヌマブのIdeS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mAb4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。

【 0 1 6 4 】

変異抗体 m A b 5 及び m A b 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 C D R (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 C D R をグラフト化すること (m A b 5) により、m A b 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 C D R をグラフト化すること (m A b 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。

【 0 1 6 5 】

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 C D R 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 m A b 9 について観察された。

10

【 0 1 6 6 】

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、m A b 7 及び m A b 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、ブリアキヌマブに対してシフトした。

【 0 1 6 7 】

ウステキヌマブの H C 及びブリアキヌマブの L C を含む m A b 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 F v ドメインを含有する m A b 2 とは両方とも、ブリアキヌマブの近くで溶出した。

【 0 1 6 8 】

まとめると、データから、F v ドメインは、F c R n 解離に影響を及ぼし、(p H 6 . 0 での) F c R n 結合に影響を及ぼさないことが示される。

20

【 0 1 6 9 】

F c R n 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 p H 6 . 0 又は生理学的 p H 7 . 4 において、F c R n カラム保持時間と、F v 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 F c R n 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) 。

【 0 1 7 0 】

本明細書で報告された一態様は、

30

抗体軽鎖中の 2 7、5 5、及び 9 4 位 (K a b a t 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 i n v i v o での半減期を伸長する工程を含む、

抗体の i n v i v o での半減期を伸長する方法である。

【 0 1 7 1 】

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、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；

(2) 中性で親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；

(3) 酸性：A s p、G l u；

(4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；

40

(5) 鎖配向性に影響を及ぼす残基：G l y、P r o；

(6) 芳香族性：T r p、T y r、P h e。

【 0 1 7 2 】

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。

【 0 1 7 3 】

また、F c R n 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 F c R n 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 [3 2]。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 F c R n - プ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。

【 0 1 7 4 】

上記をまとめると、操作された変異体の F c R n 親和性クロマトグラフィーは、同じ F v ドメインを有する抗体 (m A b 1 及び m A b 2) と、同じ L C を有する抗体 (m A b 3 及び m A b 4) とは、ほぼ同一の F c R n 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 C D R をグラフト化すること (m A b 5) により、溶出 p H は、ウステキヌマブの溶出 p H に近づくようにシフトする。このため、軽鎖 C D R は、ブリアキヌマブの F c R n 結合性に主な影響を提供する。

10

【 0 1 7 5 】

ウステキヌマブ上にブリアキヌマブ C D R をグラフト化すること (m A b 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 - F c R n 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。M D 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 F v ドメインと F c R n 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、F c R n - F v 相互作用は、生理学的条件下での、F c R n - I g G 複合体の通常より遅い解離をもたらすことができる。

【 0 1 7 6 】

20

e) ヒト F c R n トランスジェニックマウスにおける薬物動態の F c R n 溶出 p H 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 [3 5 、 3 6]。例えば、Igawa et al., [3 7] は、可変領域中の操作によるより低い等電点 (p I) を有する I g G 4 抗体が、より遅い速度の流動相吸作用、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., [3 8] は、p I の差異が、P K 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。

【 0 1 7 7 】

30

ブリアキヌマブ、ウステキヌマブ、m A b 8、及び m A b 9 の p I は、9 . 3 ~ 9 . 7 で変動する。したがって、流動相吸作用における p I 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 F c R n カラム保持時間 (上記を参照のこと) と、M D シミュレーションにおけるウステキヌマブと比較した F c R n - F v 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、F c R n - I g G 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。F v 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 H C 中の 3 つ (m A b 7) 及び 5 つ (m A b 8) の正に電荷した残基を有する突然変異体と、軽鎖 C D R 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 (m A b 9) とを使用して分析した。m A b 7 及び m A b 8 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、m A b 9 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 C D R 中に特異的に位置する電荷は、F c R n 解離に強力に影響を及ぼす。

40

【 0 1 7 8 】

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 F c R n 結合性における影響がモデレーションされた i n v i v o での P K 特性に変換されるかどうかを評価するために、ヒト F c R n トランスジェニックマウスにおける P K 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 F c R n 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 (m A b 8 及び m A b 9) 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3a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3b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mA b 8及びmA b 9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mA b 9、ならびにウステキヌマブ及びmA b 8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、mA b 9、mA b 8、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値と直線的に相関することが見出された(図3b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と直線的に相関する。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との間の相関から、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、pH6.0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関が証明された。

【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(γ_2m を含む-FcRn)の2つのコピーを含有する(図4a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 Å超であり、生理学的条件下において、約8 Åのデイビー長を超える[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、100ns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4b、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

50

は、今までは、I g G 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、M D 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、F v と F c R n 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 4 b、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 F v 及び F c R n ドメインが互いに接近したことが見出された。F c R n - F v 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 4 e を参照のこと)。

【0184】

まとめると、F c R n - I g G 複合体の F a b アームの固有のフレキシビリティが構造的に、F v ドメインと F c R n 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 p H 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 p H 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 p H 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む、方法が報告されている。

【0186】

20

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 F c 領域の保持時間を比較することにより、抗体 - F c - F c R n 複合体における抗体 - F a b - F c R n 相互作用の存在を決定することができる。これは、抗体 - F a b - F c R n 相互作用が抗体の i n v i v o での半減期に影響を及ぼすため重要である。

【0188】

30

抗体 / 参照抗体ペアについて、F c R n 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 F c R n 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を有する。この場合、両抗体の i n v i v o での半減期は、実質的に同じであるべきである。すなわち、i n v i v o 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を有するが、工程 b) において異なる保持時間を有する。この場合、抗体の i n v i v o での半減期は、参照抗体の i n v i v o での半減期より短い。すなわち、i n v i v o 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。

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、I d e S 開裂又はババイン開裂後のその F c 領域と実質的に同じ保持時間を有する抗体である。

【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、テラーメイド抗体及び F c 領域含有ポリペプチドの必要性が存在する。

【0192】

50

抗体のFcRn結合特性をテラーメイドするために、FcRn相互作用に關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ための本明細書に報告された方法の使用である。

【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

【 0 2 1 0 】

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、F c R n とは異なる種由来である。

【 0 2 1 1 】

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F c 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F c 領域とを含む。

【 0 2 1 2 】

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F c 領域とを含む。

10

【 0 2 1 3 】

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。

【 0 2 1 4 】

一実施態様では、抗体は、全長抗体である。

20

【 0 2 1 5 】

一実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【 0 2 1 6 】

一実施態様では、親抗体は、二重特異性抗体である。

【 0 2 1 7 】

一実施態様では、親抗体は、キメラ抗体である。

【 0 2 1 8 】

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

【 0 2 1 9 】

一般的には、F c R n の可溶性細胞外ドメイン（ヒトF c R n 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F c R n - 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。

【 0 2 2 0 】

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

【 0 2 2 1 】

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 - 、ヒドロキシル - 、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。

40

【 0 2 2 2 】

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。

【 0 2 2 3 】

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、I g G / プロテイン A 及び / 又は G 等から選択される。

【 0 2 2 4 】

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。

【 0 2 2 5 】

マウス F c - マウス F c R n 相互作用に重要な F c 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 I 2 5 3、H 3 1 0、H 4 3 3、N 4 3 4、及び H 4 3 5 (K a b a t による E U 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 I 2 5 3、H 3 1 0、及び H 4 3 5 は、ヒト F c とマウス F c R n 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 M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E は、タンパク質 - タンパク質相互作用研究により、F c R n 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 F c - ヒト F c R n 複合体の研究から、残基 I 2 5 3、S 2 5 4、H 4 3 5、及び Y 4 3 6 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 2 4 8 ~ 2 5 9 及び 3 0 1 ~ 3 1 7 及び 3 7 6 ~ 3 8 2 及び 4 2 4 ~ 4 3 7 の種々の突然変異体が報告され、試験されている。

【 0 2 2 6 】

10

20

【表 3 3】

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]				
		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)
50mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例 5	未検	未検	43	44	未検
140mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例 2	93.7	84.3	未検	未検	未検
150mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例 5	未検	未検	45	45.5	結合せず
150mM NaClを含む20mM HEPES、pH 8.6に調整	実施例 5	未検	未検	48	48.5	未検
300mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例 5	未検	未検	42.5	43	未検
400mM NaClを含む20mM Tris/HCl、pH 8.8に調整	実施例 3	83.1	80.4	未検	未検	未検

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-ピペラジニエタンスルホン酸(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、10mM~500mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、10mM~300mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、10mM~250mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、10mM~100mMの濃度を有する。一実施態様では、バッファー物質は、15mM~50mMの濃度

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、純粋な開始溶液）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、50 mM ~ 750 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 IdS 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】

【表 3 4】

表 5: 完全な抗体、抗体－F a b、及びF c 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	F c 領域	抗体－F a b
5	抗－I G F－1 R 抗体	44.5	45	結合せず
5	抗－I L 1 3 R α 抗体	44.5	45	結合せず
5	抗－H E R 2 抗体	45	45	結合せず
5	抗－I L 6 R 抗体	45	45	結合せず
5	抗－O x 4 0 L 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

【0 2 4 0】

一般的には、野生型 F c 領域を有する抗体（I g G 1 又は I g G 2 又は I g G 4）の保持時間は、実施例 5 の条件下において、4 5 ～ 4 9 分で変動する（3 6 個の抗原に対して 3 5 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 8 5 分に伸長する。

【0 2 4 1】

【表 3 5】

表 6: カラム材料 1 グラム当たりの固定された F c R n 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）

溶出バッファー： 1 5 0 mM N a C l を含む 2 0 mM T r i s / H C l、p H 8. 8 に調整	保持時間 [分]	
	抗－O x 4 0 L 抗体	抗－A ベータ 抗体
1. 2 mg F c R n / g 固体相	42.5	42.5
3 mg F c R n / g 固体相	45	45.5
6 mg F c R n / g 固体相	48.5	49
1 2 mg F c R n / g 固体相	48.5	49

【0 2 4 2】

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、p H 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。

【0 2 4 3】

I g G の F c 領域における種々の突然変異体は、F c R n カラムにおいて異なって挙動し、改変された保持時間を示す。

【 0 2 4 4 】

例えば、抗体 - I G F - 1 R 抗体突然変異体 Y T E は、伸長した保持時間を示す（図 8 を参照のこと）。

【 0 2 4 5 】

【表 3 6】

表 7: F c 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-I G F - 1 R 抗体 (野生型)	44.5
抗-I G F - 1 R 抗体 (Y T E - 突然変異体)	57.5

10

Y T E - 突然変異体という用語は、三重突然変異体 M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E を意味する。

【 0 2 4 6 】

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 p H 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 p H 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、

20

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、抗体は、I g G 1、I g G 3、又は I g G 4 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 i n v i v o での半減期を有する、

抗体の相対的な i n v i v o での半減期を決定する方法である。

【 0 2 4 7 】

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 p H 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 p H 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、

30

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、抗体は、I g G 1、I g G 3、又は I g G 4 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 i n v i v o での半減期を有する、

抗体の相対的な i n v i v o 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。

【 0 2 4 8 】

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 p H 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、

40

b) 第 2 の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と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 i n v i v o 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と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 i n v i v o での半減期が短縮される、

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と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と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

た *in vitro* 及び *in vivo* での実験のセットは、ヒト FcRn にトラン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 操作トランスジス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 抗体であるペバジスマブの変異体は、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。

【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. ii) 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

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。

【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

10

20

30

40

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。

【 0 2 6 0 】

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。

【 0 2 6 1 】

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 1 0 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を有する。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、i i) 親抗体の *in vivo* での半減期に対応する（図 1 0 A を参照のこと）。

10

2) 変異抗体 (3) 及びその F c 領域 (4) は、異なる保持時間を有し、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を有する。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、i i) 親抗体の *in vivo* での半減期より短い（図 1 0 B を参照のこと）。

3) 親抗体 (1) 及び変異抗体 (3) は、異なる保持時間を有し、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、i i) 親抗体の *in vivo* での半減期より長い（図 1 0 C を参照のこと）。

20

4) 親抗体 (1) 及び変異抗体 (3) は、異なる保持時間を有し、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、i i) 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、異なる保持時間を有し、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、i i) 親抗体の *in vivo* での半減期とは異なる（図 1 0 D を参照のこと）。

30

【 0 2 6 2 】

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。

【 0 2 6 3 】

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

【 0 2 6 4 】

例えば、Ropeenian 及び Akilesh (Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715-725) は、例えば、ヒト化 I g G 1 抗体である h u 4 D 5 (ハーセプチン ; 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 l a (N 4 3 4 A) 及び三重置換変異体 T h r 3 0 7 A l a / A s n 4 3 4 A l a / G l u 3 8 0 A l 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 1 2 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 12 E 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、

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、0 mM ~ 250 mM 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FcRn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。

【0279】

ベバシズマブは、LC-CDR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R27、R55、及びR94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D27、ロイシンL54、及びスレオニンT93は、リシン残基に交換され、正の電荷パッチを形成する(図14を参照のこと)。

【0280】

ベバシズマブ-野生型及びベバシズマブ-突然変異体のFcRn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。

【0281】

【表38】

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FcRn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
ブリアキヌマブ	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

【0282】

ベバシズマブ-野生型は、84.7分の保持時間を有する。一方、ベバシズマブ-突然変異体は、86.9分後に溶出する。このため、ベバシズマブのFv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、IgG1のFv中の電荷は、一般的にFcRn結合親和性に影響を及ぼすこと、特に、FcRn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】

【0283】

【図1】電荷分布及びpH依存性正味電荷。pH7.4においてプロトン化され、2k_BT/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₂ミクログロブリン(₂m)を含む複合体におけるヒトFcRn相同性モデルの2k_BT/eで描かれた等ポテンシャル表面。Fc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FcRn-IgG相互作用。11個のIgG変異体のFcRn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。pH7.4でプロトン化された構造モデルの分子表面提示を、2k_BT/eで描かれた等ポテンシャル表面と重ねた。視野は、図1aの右側パネルと同一であり、CDR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FcRnトランスジェニックマウスでの薬物動態におけるFcRn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(10mg/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)、mAb8(紫色)、及びmAb9(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(ブリアキヌマブ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。

10

【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(#)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】

□

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】

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

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。

40

【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

50

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

【図 10 C】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：変異抗体、4：変異抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ；A：野生型様 F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用なし；B：野生型様 F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用あり；C：改善された F c R n 結合性を有する操作された F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用なし；D：改善された F c R n 結合性を有する操作された F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用あり。

10

【図 10 D】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：変異抗体、4：変異抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ；A：野生型様 F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用なし；B：野生型様 F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用あり；C：改善された F c R n 結合性を有する操作された F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用なし；D：改善された F c R n 結合性を有する操作された F c 領域、抗体 - F a b - F c R n 相互作用あり。

20

【図 11】改善された F c R n 結合性を有し、抗体 - F a b - F c R n 相互作用を有するが、抗体 - F c R n 相互作用が改善されたクリアランスをもたらすため、i n v i v o 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 12 A】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：抗体、4：抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ。

【図 12 B】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：抗体、4：抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ。

30

【図 12 C】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：抗体、4：抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ。

【図 12 D】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：抗体、4：抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ。

40

【図 12 E】F c 領域と抗体 - F a b との抗体 - F c R n 相互作用に依存する、F c R n 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 F c 領域、3：抗体、4：抗体の F c 領域；実線：完全な抗体（抗体 - F a b + F c 領域）、破線：F c 領域のみ。

【図 13】F c R n 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 - F a b - F c R n 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。C D R を、アスタリスク（*）でマークする。

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

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

【0288】

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

【0289】

6. 下記工程：

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及びその F c 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 F c 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 F c 領域の K_D 値とは最大 10 倍異なる K_D 値を有し、その F c 領域の保持

10

20

30

40

50

時間と実質的に同じ保持時間を有する抗体
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 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

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 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

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での半減期を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の保持時間を有し、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より長い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であり、参照抗体の保持時間より長い保持時間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。

【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pH5.5~約pH8.8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、50mM~200mM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140mM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、300mM~600mM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400mM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、0mM塩から500mM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、0mM塩から250mM塩に向かう、実施態様1、3、5、7、及

10

20

30

40

50

び 9 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0305】

22. 第 1 の pH 値が、約 5.5 である、実施態様 1、3、及び 10 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0306】

23. 第 2 の pH 値が、約 7.4 である、実施態様 1、3、及び 10 ~ 22 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0307】

24. 高塩濃度が、250 mM ~ 600 mM である、実施態様 1、4、8、及び 10 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0308】

25. 高塩濃度が、約 400 mM である、実施態様 1、4、8、及び 10 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0309】

26. 高 pH 値が、pH 6.5 ~ pH 8.8 である、実施態様 1、7、及び 9 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0310】

27. 高 pH 値が、約 pH 7.4 である、実施態様 1、7、及び 9 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0311】

20

28. 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 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0312】

29. 実質的に異なる保持時間が、少なくとも 10 % 異なる、実施態様 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0313】

30. 実質的に異なる保持時間が、少なくとも 15 % 異なる、実施態様 1 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0314】

31. 実質的に同じ保持時間が、5 % 未満で異なる、実施態様 1 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0315】

32. 実質的に同じ保持時間が、3.5 % 以下で異なる、実施態様 1 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0316】

33. 実質的に同じ保持時間が、2.5 % 以下で異なる、実施態様 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0317】

34. 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 $1 (\sim 1 / \sqrt{c(salt)})$ に比例する、実施態様 1 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0318】

35. 参照抗体が、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、又は、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 抗体のいずれかである、実施態様 1 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0319】

50

36. FcRn親和性クロマトグラフィーカラムが、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、実施態様1~35のいずれか1つに記載の方法。

【0320】

37. FcRn親和性クロマトグラフィーカラムが、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、実施態様1~36のいずれか1つに記載の方法。

【0321】

38. 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) との複合体が、ビオチン化されており、固体相が、ストレプトアビジ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Fcレセプター (FcRn) 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、FcRn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. FcRnが、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、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1つ以上の核酸を含む細胞を提供する工程と、

40

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.
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.
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.
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).
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. Kortkhonjia, 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. 20
51. Ding, C., et al., Curr. Opin. Investig. Drugs 9 (2008) 515-522.
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 (CNT0 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) 2507.8×300mm、溶出液: 200mM KH₂PO₄、250mM KCl、pH7.0) 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】

F c 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I d e S 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、C M V - イントロン A プロモーターによるもしくはよらない c D M A 構築、又は、C M V 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】

抗体発現カセットに加えて、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、c D N A 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c D N A 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、P C R 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、D N A 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、トランスフォーメーションされた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、600 mL中に 1×10^6 個/mLの密度で播種し、120 rpm、8% C O₂ でインキュベーションした。その翌日、細胞を、約 1.5×10^6 個/mLの細胞密度で、A) Opti-MEM (Invitrogen) 20 mL (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 20 mL + 293fectin又はフェクティン 1.2 mL (2 µL/mL)との混合物 約4.2 mL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 Na_2HPO_4 、1 mM KH_2PO_4 、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
ウスデキヌマブ	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。

【 0 3 4 8 】

表 1 1 : 全ての m A b 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 m A b の C E - S D S により、D T T 還元後に決定する。疎水性を、低及び高疎水性 R S に対して表す。

【表 4 1】

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 m A b	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

【 0 3 4 9 】

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 I L - 1 2 ）との相互作用分析が含まれる。m A b 変異体を、F a b 領域において改変し、これらの改変がターゲット結合性を变化させるかを試験する。更に、マウス I L - 1 2 / - 2 3 とのマウス P K 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 F c レセプター I (m u F c R I) に対する結合レベルを測定する。マウス F c R I 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 P K 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。

【 0 3 5 0 】

ヒト I L - 1 2 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、I L - 1 2 結合性に影響を及ぼす場合がある F a b 領域において構造的差異を有するため、全ての m A b の結果を、詳細に提供する。

【 0 3 5 1 】

E L I S A

交差交換を有する変異体 (m A b 1 ~ 6) 及び改変された電荷分布を有する変異体 (m A b 7 ~ 1 0) の吸光度 - 濃度曲線を、図 1 5 及び 1 6 それぞれに示す。各 m A b 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 I L - 1 2 結合性 (ブリアキヌマブ = 1 0 0 %) を得た。3 0 % 以下の結合性の差異を、ブリアキヌマブと同様の I L - 1 2 に対する結合性を示すと評価した。3 0 % 以上の差異は、I L - 1 2 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 F v ドメインを有する m A b (m A b 1 及び m A b 2) は、同様の I L - 1 2 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 m A b 2 の結合性は、2 0 % ウィンドウの範囲であり、m A b 3 の結合性は、3 0 % ウィンドウの範囲である。交換された L C を有する m A b (m A b 3 及び m A b 4) と、交換された C D R を有する

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

SPR を、ターゲット特異的 ELISA 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 vs. 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、ELISA 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 vs. 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、ELISA での結果と一致している。

【0355】

10

20

【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

10

20

【 0 3 5 6 】

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。

30

【 0 3 5 7 】

【表 4 3】

表 13: 全てのmAbのFcRn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】

FcRn - mAb 解離

FcRnとmAbとの解離を、SPR及びFcRn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FcRn - mAb 解離

K_D 値の評価について、1 μ Mを下回る K_D を、中程度の親和性を示すと評価し、1 ~ 5 μ Mの K_D を、弱い親和性を示すと評価し、5 μ M超の K_D を、FcRn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 4 4】

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。
 $5 \mu M$ より高い K_D 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 ^a
pH 7.0	4.20	結合せず ^a
pH 7.2	結合せず ^a	結合せず ^a

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

$F(ab')_2$ フラグメント及び Fc 領域フラグメントを、FabRICATOR - キット (GENO VIS, 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 $F(ab')_2$ 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、固定されたり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り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。200 nM 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

40

【0364】

$h u FcRn$ と $I g G$ 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

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 (G E 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。m A b 5 及び m A b 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、p H 6 . 0 に調整した 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S (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、1 5 0 0 n M ~ 2 3 n M の範囲で調製した。各サンプルを、5 μ L / 分の流速で注入した。6 0 0 及び 3 6 0 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 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S (p H 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 - 鎖遺伝子を欠損しているが、ヒト F c R n - 鎖遺伝子について半接合トランスジェニックな B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}Tg (FCGRT)276Dcr マウス (m u F c R n - / - h u F c R n t g + / -、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)、A A A L A C 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州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 , 3 0 0 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、m A b 8、及び m A b 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 - F c 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 (H R P : Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) にコンジュゲートさせた抗 - ジゴキシゲニン抗体とのその後のインキュベーションにより検出した。A B T S (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、H R P 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、Tecan 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】

P K 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 EMBOS 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] を使用するモデラー 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 0.145 M 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 1H2H) 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 CH1 及び CL 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 Å 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 / 2 mg 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、1.0nm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、1.0nm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、2fs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、300Kで一定に保った。エネルギー最少化(ターゲット:最大力<1000kJ/mol/nm)に従って、30psでの平衡化を行った。その後、100ns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、pH7.4、145mM 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(0ns)の開始時と、1ns間隔で96~100ns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、120rpm(振とう器振幅5cm)、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、14Lのステンレス鋼製バイオリアクタを、培養容積8Lで、36.5、pH7.0±0.2、pO₂35%(N₂及び空気でガス補給、合計ガス流量200ml・分⁻¹)、及び100~400rpm攪拌速度で開始した。細胞密度が20×10⁵個/mLに達した時点で、10mg プラスミドDNA(両プラスミドの等モル量)を、Opti-MEM(Invitrogen)の400mL中で希釈した。293fectin(Invitrogen)の20mL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日あたりに500mLの速度で加え、2g/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:4000rpmで90分間を使用して収集した。上清(13L)を、Sartobran Pフィルタ(0.45µm+0.2µm、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】

新生児 F c レセプターのビオチン化

3mg F c R nを、150mM 塩化ナトリウムを含有する20mM リン酸二水素ナトリウムバッファー 5.3mL中に溶解/希釈し、PBS 250 µL及びcomplete protease inhibitor (complete ULTRA Tablets, Roche Diagnostics GmbH) 1錠を加えた。F c R n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 F c R nを、150mM NaClを含む20mM 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 F c R n に加え、4 で一晩インキュベーションした。F c R n 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、F c R nカラムを、140mM 塩化ナトリウムを含有する20mM 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

F c R n 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、F c R nカラムを、140mM 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。

【0385】

条件

カラム寸法: 50mm x 5mm

ベッド高さ: 5cm

ローディング: 30 µg サンプル

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

溶出バッファー: 140mM 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、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、20mM 2 - (N - モルホリン) - エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、140mM 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、140mM 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、140mM 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まで上昇させる。クロマトグラムを、Chromleon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。

【0387】

実施例 3

F c R n 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

レセプター誘導体化セファロースを、X K カラム (GE Healthcare) 1 mL に充填し、ついで、F c R n カラムを、400 mM NaCl を含有する 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。

【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： 400 mM NaCl を含む 20 mM MES、pH 5.5 に調整

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

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、20 mM 2 - (N - モルホリン) - エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、400 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 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、20 mM 2 - (N - モルホリン) - エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、400 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、400 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。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、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。 20

【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 30

レセプター誘導体化セファロースを、X K カラム (GE Healthcare) 1 mL に充填し、ついで、F c R n カラムを、10 mM 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： 10 mM MES、pH 7.8 に調整

溶出バッファー： 250 mM NaCl を含む 10 mM MES、pH 7.8 に調整 40

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、10 mM 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 30 µg mAb を含んだ。抗体を、0 nM から 250 nM に向かう塩化ナトリウムの線形塩濃度により、10 mM 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 10 mM 2 - (N - モルホリン) - エタンスルホン酸 (MES) ナトリウム塩、250 mM 塩化ナトリウム (pH 7.8) を溶出液として使用し、0.5 mL/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、280 nm での吸光度の連続的 50

な測定により得た。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。

【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) 1 mL に充填し、ついで、FcRn カラムを、150 mM NaCl を含有する 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。

【0394】

条件

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： 150 mM NaCl を含む 20 mM MES、pH 5.5 に調整

溶出バッファー： 150 mM NaCl を含む 20 mM 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、20 mM MES、150 mM 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、20 mM Tris / HCl、150 mM NaCl (pH 8.8) への pH 勾配により、30 カラム量で溶出した。改変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。

【0396】

実施例 6

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.

抗体	保持時間 [分]	<i>in vivo</i> での半減期 [時間]
抗-Aβ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

ヘキサヒスタ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

10

20

30

40

50

グラフィー樹脂 (Qiagen, Hanbrechtikon, 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ぞ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 バッファー中での NuPAGE 4 ~ 12 % Bis - Tris 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 1 mL 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

40

【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。

【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 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、100mM Tris (pH 8.0) で1:1希釈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')₂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 (huFcRn (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17~25gであった。各抗体を、尾静脈を介して、単回静脈内ボ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3回のサンプリング時点の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100µL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40µLを、9,300×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、400rpm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に、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、490nmでの参照波長と共に405nm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、繰返して分析し、参照標準に対して校正した。

【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 AUC (0 - 672) 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 $T_{1/2} = 1.44 / \lambda_z$ から導いた。全身クリアランス (CL) を、用量 / AUC 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、ANOVA 分析により決定した。

【0412】

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 (huFcRn (276) - / tg) C57BL/6J マウスにおける薬物動態研究から、YTE 突然変異が、抗体の薬物動態を向上させることが示された。統計学的有意性のレベルにおいて、YTE 突然変異は、野生型抗体との比較において、1.74 倍高い AUC (0 - 672)、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 14)。

【0413】

表 18 : 野生型抗体及びその三重突然変異体 YTE についての薬物動態パラメータを、ヒト FcRn 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、ELISA 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 SD、1 群当たり n = 8。野生型抗体との比較における有意性の ANOVA 分析 (+ + +、 $p < 0.001$)。AUC (0 - 672) は、0 ~ 672 時間の血清濃度 - 時間曲線下面積である。

【表 48】

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
YTE - 突然変異体	27.359 \pm 2.731	0.0055 \pm 0.0006	211.4 \pm 40.6

【0414】

実施例 11

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。

【0415】

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 (huFcRn (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。

【0416】

4 つの抗体 : プリアキヌマブ、ウステキヌマブ、mAb 8、及び mAb 9 を、i.v. 研究に使用した。

【0417】

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。

【0418】

結果を、図 3 に示す。

【0419】

【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*µg/mL]	C 1 [mL/分/kg]	Vss [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】

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 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]	Vss [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

30

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

【 0 4 2 6 】

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

【 0 4 2 7 】

表 21 : F c R n ノックアウトマウスにおけるプリアキヌマブ投与後の A D A - 陽性サンプル

F c R n ノックアウトマウスにおける 10 mg/kg プリアキヌマブの i . v . 投与後の各サンプリング時点の血清濃度。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 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 1】

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]
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

【 0 4 2 8 】

m A b 9 の投与後に、薬剤 / A D A 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 / A D A 複合体は、F c R n ノックアウトマウスにおいて検出されなかった (表 27)。プリアキヌマブ及び m A b 9 の濃度 - 時間曲線は、A D A 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 m A b 9 は、非常に類似する濃度 - 時間曲線を有する。このことは、m A b 9 投与後の A D A 形成が P K に影響を及ぼさないことを示している。

【 0 4 2 9 】

表 22 : ヒト F c R n トランスジェニックマウスにおけるプリアキヌマブの血清濃度
血清濃度を、1 群当たり 6 匹の動物に対する、10 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の投与後に決定する。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 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 2】

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	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. **	b.l.q. **	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.	-

【 0 4 3 0 】

10

20

30

40

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エキヌマブの血清濃度
血清濃度を、1 群あたりに 6 匹の動物に対する、1 0 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の
投与後に決定する。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 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

10

【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 m A b 8 の血清濃度
血清濃度を、1 群あたりに 6 匹の動物に対する、1 0 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の
投与後に決定する。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 免疫複合体
の形成について、それぞれ * 及び * * として示す。

20

【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.	-

30

【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 m A b 9 の血清濃度
血清濃度を、1 群あたりに 6 匹の動物に対する、1 0 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の
投与後に決定する。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 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

40

50

【 0 4 3 3 】

表 2 6 : F c R n 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 群あたりに 6 匹の動物に対する、1 0 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の投与後に決定する。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 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 6】

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	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

【 0 4 3 4 】

表 2 7 : F c R n 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

血清濃度を、1 群あたりに 6 匹の動物に対する、1 0 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の投与後に決定する。

【表 5 7】

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	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.	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.	-

30

【 0 4 3 5 】

表 2 8 : F c R n ノックアウトマウスにおける m A b 9 の血清濃度

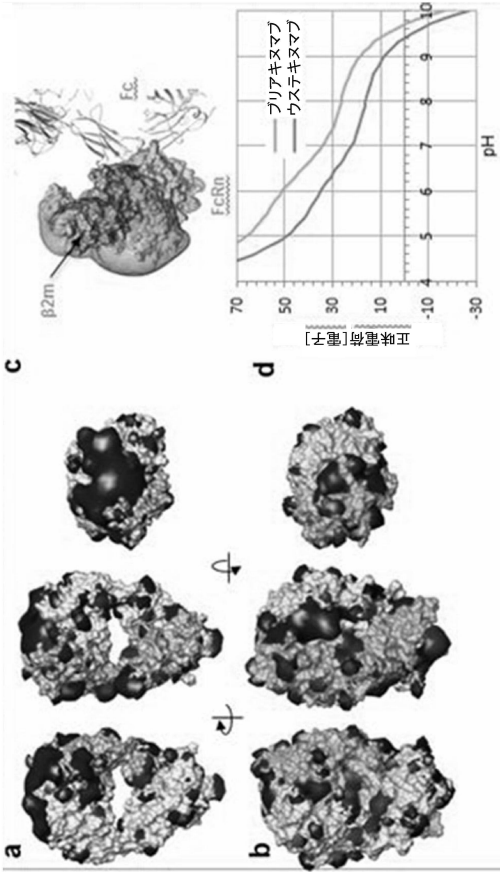
血清濃度を、1 群あたりに 6 匹の動物に対する、1 0 mg/kg の単回用量 i . v . 注射の投与後に決定する。A D A - 陽性サンプルを、中程度及び高度な薬剤 / A D A 免疫複合体の形成について、それぞれ * 及び * * として示す。

【表 5 8】

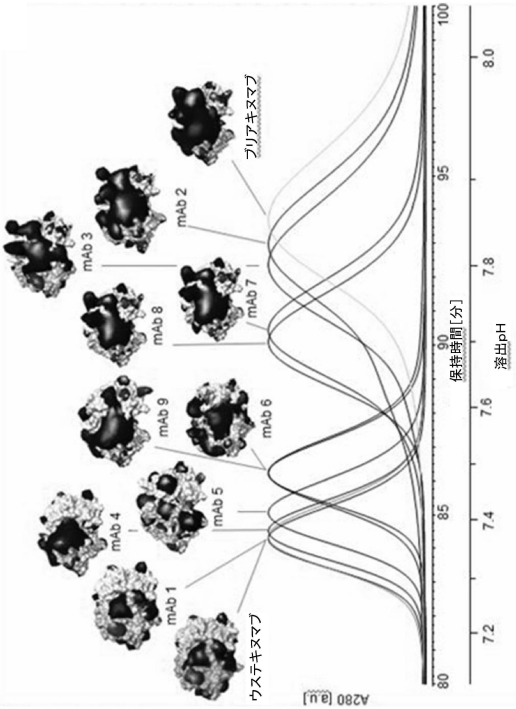
時間 [h / d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	平均 [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	249	292	232	214	242	226	242	27
2	119	130	139	136	123	129	129	7.3
8	62	65	74	80	83	87	75	10
24/ 1	31	37	37	32	35	36	35	2.6
48/ 2	16	15	17	12	13	16	15	1.9
168/ 7	0.2 *	0.4 **	0.5	0.5	0.5	0.3	0.4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

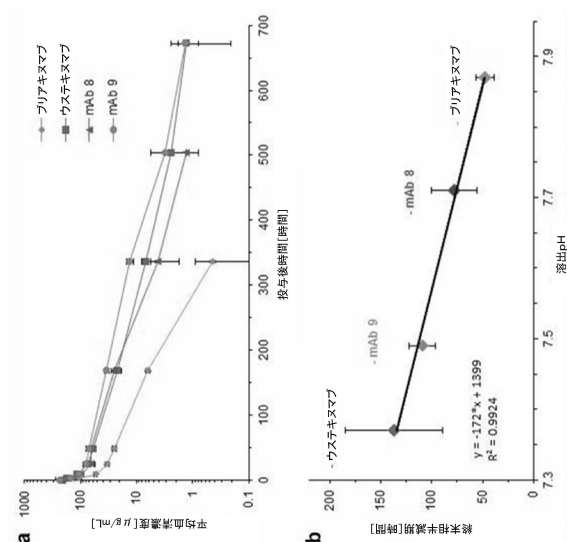
【図 1】



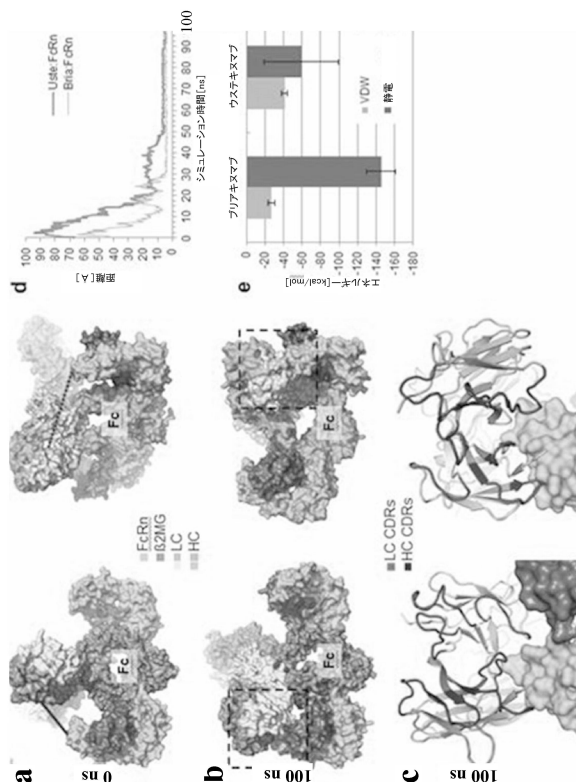
【図 2】



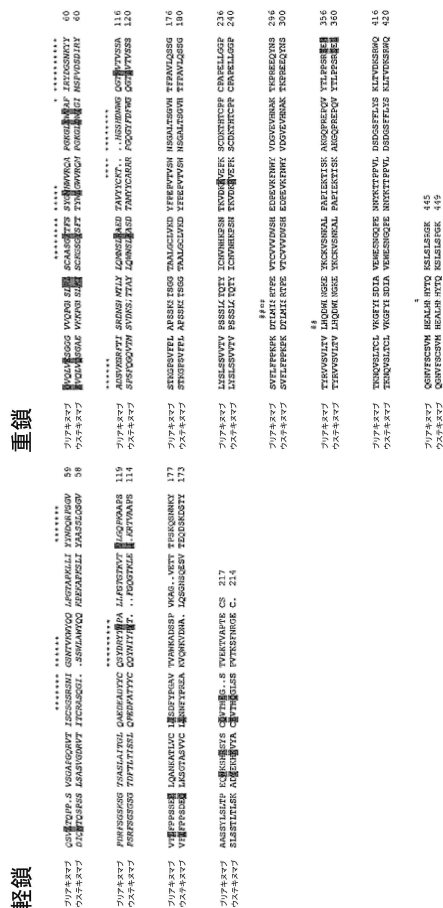
【図 3】



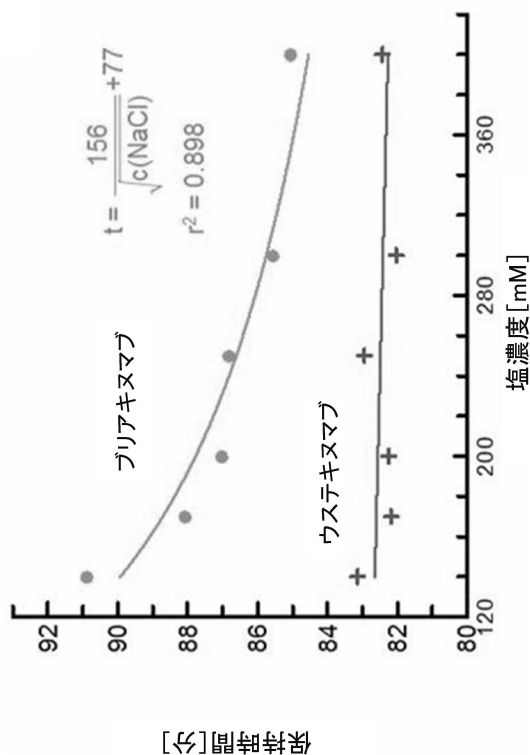
【図 4】



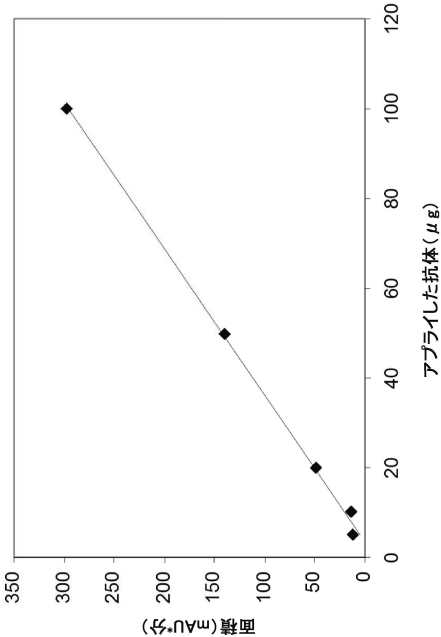
【図 5】



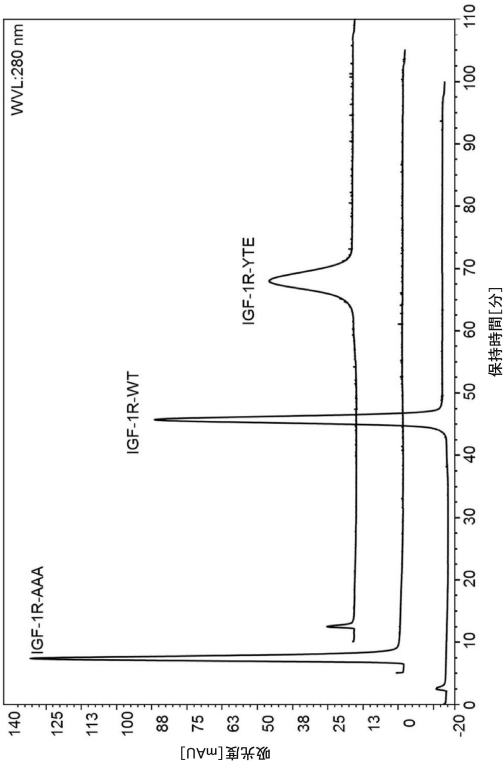
【図 6】



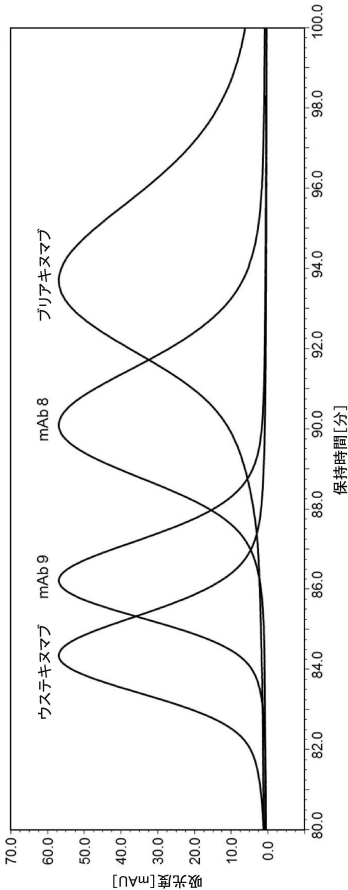
【 図 7 】



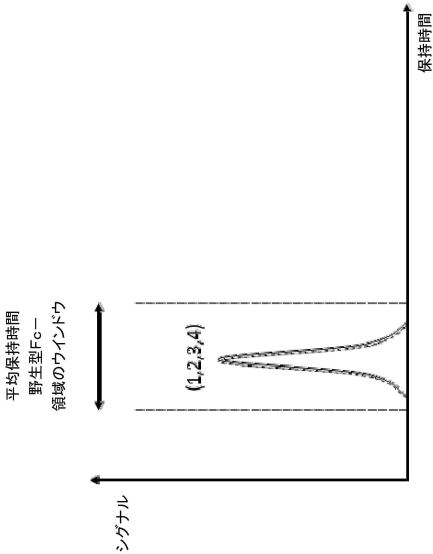
【 図 8 】



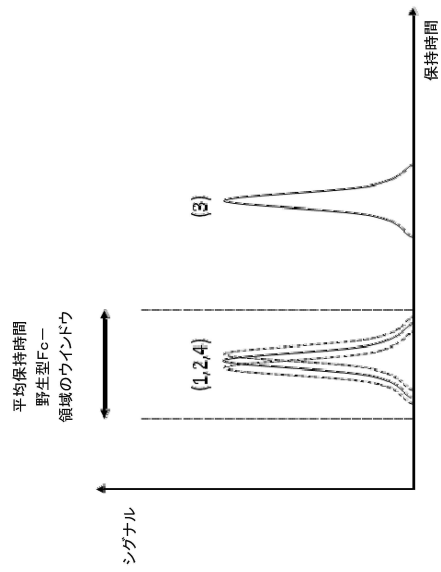
【 図 9 】



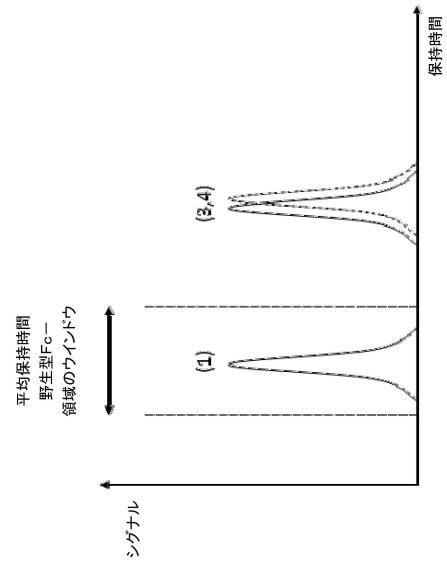
【 図 10 A 】



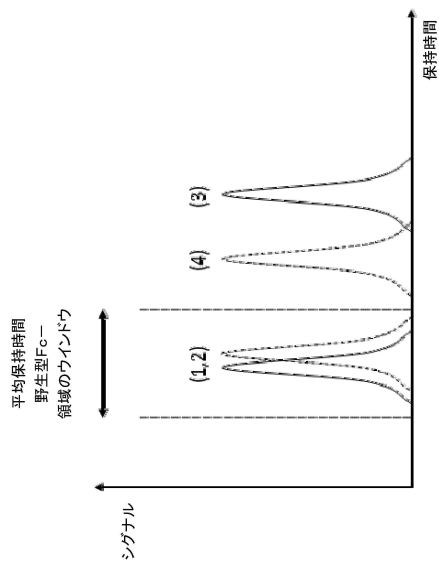
【図 10 B】



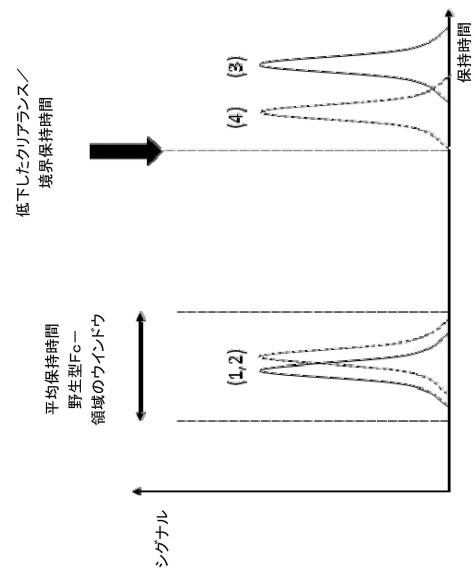
【図 10 C】



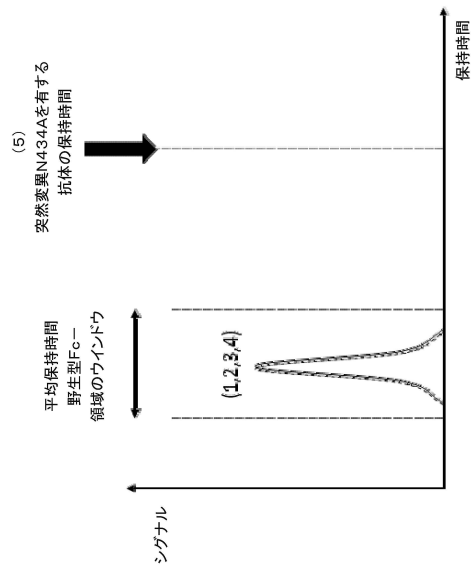
【図 10 D】



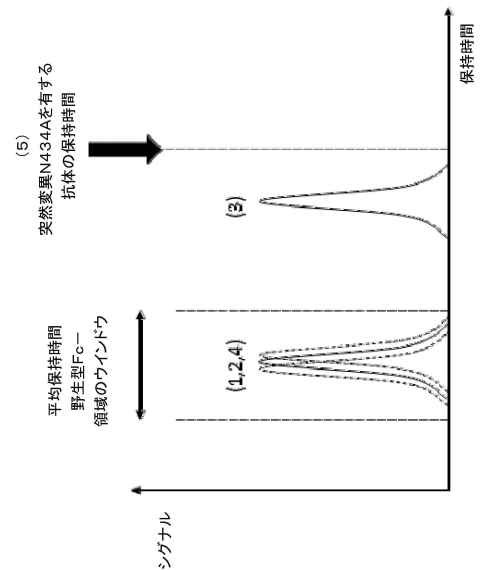
【図 11】



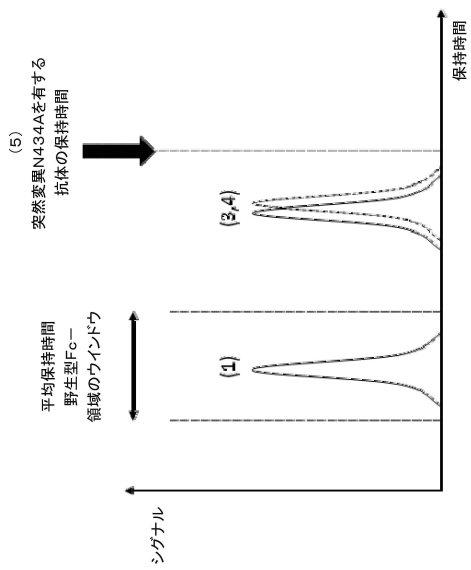
【図 1 2 A】



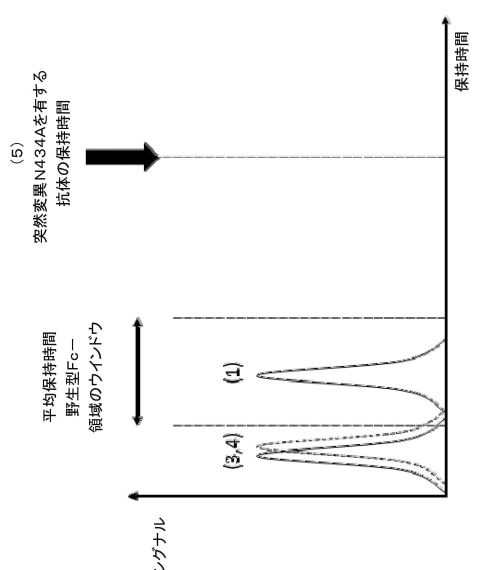
【図 1 2 B】



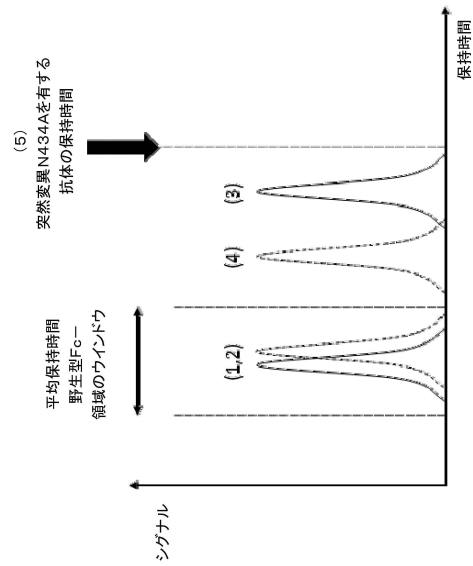
【図 1 2 C】



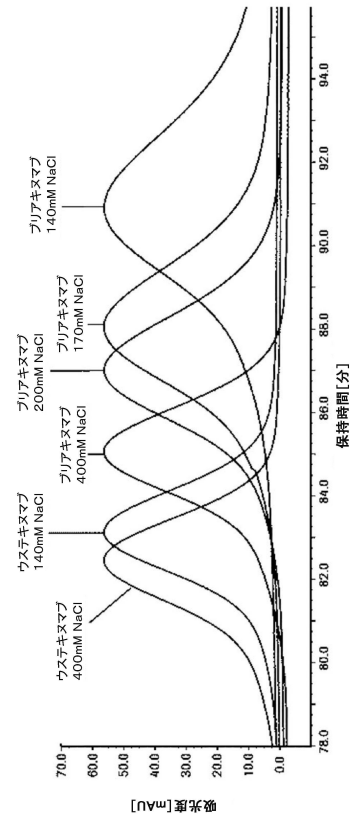
【図 1 2 D】



【図 1 2 E】



【図 1 3】

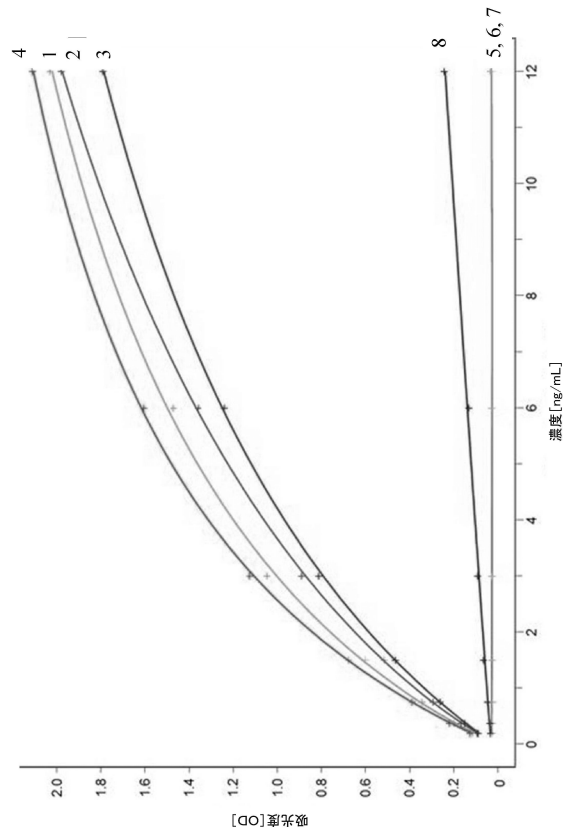


【図 1 4】

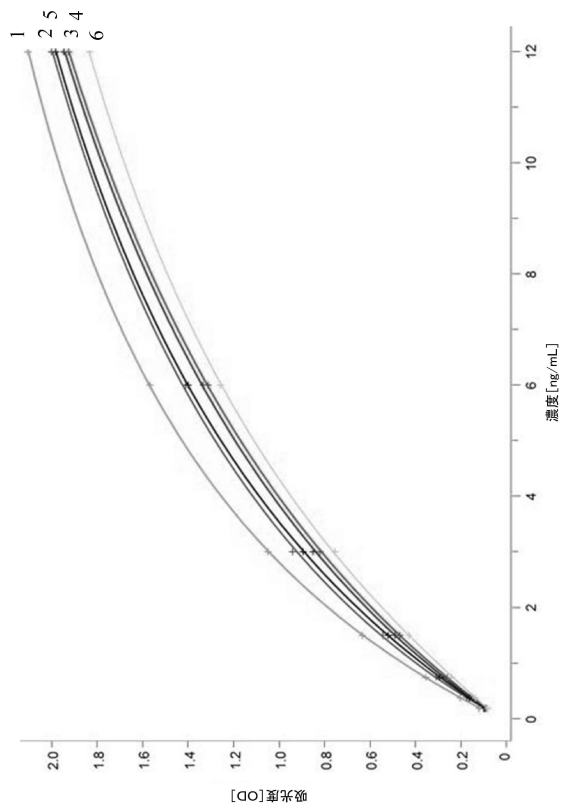
ペバシズマブ
ペバシズマブ-変異体
ペバシズマブ
ペバシズマブ-変異体

DIOMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNM YQOKP GKAKVLIYF TSSLHSGVPS
DIOMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNM YQOKP GKAKVLIYF TSSLHSGVPS
RFGSGSGTD FTLTISLIQF EDEATVCOQ KSTVWPTFGQ GKVEIKRTV
RFGSGSGTD FTLTISLIQF EDEATVCOQ KSTVWPTFGQ GKVEIKRTV

【図 1 5】



【図 16】



【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、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ゾンマーシュトラッセ 3 アー
(72)発明者 ショック, アンゲラ
ドイツ国、8 1 5 4 7 ミュンヘン、ザレックシュトラッセ 6

審査官 高田 亜希

- (56)参考文献 カナダ国特許出願公開第0 2 8 6 0 6 0 0 (C A , A 1)
国際公開第2 0 1 3 / 1 2 0 9 2 9 (W O , A 1)
TILMAN SCHLOTHAUER; PETRA RUEGER; JAN OLAF STRACKE; ET AL, ANALYTICAL FCN AFFINITY CH
ROMATOGRAPHY FOR FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES, MABS, 2 0 1 3
年 7 月 1 日, VOL:5, NR:4, PAGE(S):576 - 586, U R L, [http://dx.doi.org/10.4161/mabs](http://dx.doi.org/10.4161/mabs.24981)
.24981

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
G 0 1 N 3 0 / 0 0 - 3 0 / 9 6
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
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)