

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-551194

(P2023-551194A)

(43)公表日 令和5年12月7日(2023.12.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全82頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-530548(P2023-530548)	(71)出願人	515230154	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和3年11月19日(2021.11.19)		ゾエティス・サービシズ・エルエルシ		
(85)翻訳文提出日	令和5年7月13日(2023.7.13)		ー	最終頁に続く	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/060161		アメリカ合衆国ニュージャージー州07		
(87)国際公開番号	WO2022/109313		054, パーシッパニー, シルバン・ウ	最終頁に続く	
(87)国際公開日	令和4年5月27日(2022.5.27)		エイ 10		
(31)優先権主張番号	63/116,491	(74)代理人	100118902	最終頁に続く	
(32)優先日	令和2年11月20日(2020.11.20)		弁理士 山本 修		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100106208	最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		弁理士 宮前 徹		
		(74)代理人	100196508	最終頁に続く	
			弁理士 松尾 淳一		
		(74)代理人	100135415	最終頁に続く	
			弁理士 中濱 明子		
		(72)発明者	ストリーツェル, キャサリン・ジェイ	最終頁に続く	
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 ウシ科動物抗体バリエント

(57)【要約】

本発明は、概して、ウシ科動物抗体バリエント及びそれらの使用に関する。具体的には、本発明は、様々な特徴を改善するためのウシ科動物抗体の定常領域における変異に関する。

【選択図】図1

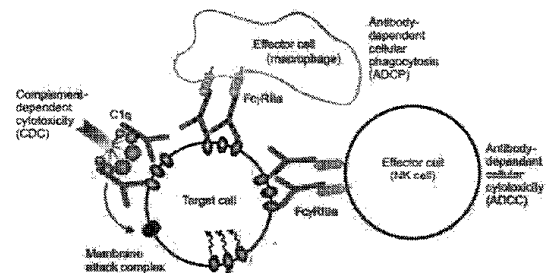


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型ウシ科動物 I g G 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 定常ドメインを含む、修飾された I g G であって、前記置換が、K a b a t における E u インデックスに従って付番されたアミノ酸残基 2 1 6、2 3 4、2 3 5、2 3 7、2 7 0、3 2 9、3 3 0、3 3 1、4 3 2、4 3 4、4 3 7、又は 4 3 3 にある、修飾された I g G。

【請求項 2】

前記修飾された I g G が、ウシ科動物又はウシ化 I g G である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

10

【請求項 3】

前記 I g G が、I g G 1 である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 4】

前記 I g G 1 が、I g G 1 a、I g G 1 b、I g G 1 c、又は I g G 1 d である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5】

前記置換が、アミノ酸残基 3 2 9、3 3 0、3 3 1、又はそれらの組み合わせにある、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6】

前記置換が、前記アミノ酸残基のセリンとの置換である、請求項 5 に記載の修飾された I g G。

20

【請求項 7】

前記置換が、3 2 9 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 3 2 9 S)、3 3 0 位でのアラニンのセリンとの置換 (A 3 3 0 S)、又は 3 3 1 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 3 3 1 S) である、請求項 5 に記載の修飾された I g G。

【請求項 8】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S のうちの 1 つ以上を含む、請求項 5 に記載の修飾された I g G。

【請求項 9】

前記定常ドメインが、P A P から S A P への変異を含み、前記変異が、3 2 9 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 3 2 9 S) である、請求項 5 に記載の修飾された I g G。

30

【請求項 10】

前記定常ドメインが、P A P から S A S への変異を含み、前記変異が、3 3 1 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 3 3 1 S) である、請求項 5 に記載の修飾された I g G。

【請求項 11】

前記定常ドメインが S S 変異を含み、前記変異が、3 3 0 位でのアラニンのセリンとの置換 (A 3 3 0 S) 及び 3 3 1 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 3 3 1 S) である、請求項 5 に記載の修飾された I g G。

【請求項 12】

前記置換が、W i n t e r 部位の 1 つ以上のアミノ酸残基にある、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

40

【請求項 13】

前記置換が、アミノ酸残基 2 3 4、2 3 5、2 3 7、又はそれらの組み合わせにある、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 14】

前記置換が、前記アミノ酸残基のアラニンとの置換である、請求項 13 に記載の修飾された I g G。

【請求項 15】

前記置換が、2 3 4 位でのプロリンのアラニンとの置換 (P 2 3 4 A)、2 3 5 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 2 3 5 A)、又は 2 3 5 位でのグリシンのアラニンとの

50

置換（G 2 3 7 A）である、請求項 1 3 に記載の修飾された I g G。

【請求項 1 6】

前記定常ドメインが、置換 P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 3 に記載の修飾された I g G。

【請求項 1 7】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 1 8】

前記置換が、D P 部位の 1 つ以上のアミノ酸残基にある、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 1 9】

前記置換が、アミノ酸残基 2 1 6、2 7 0、又はそれらの組み合わせにある、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 0】

前記置換が、前記アミノ酸残基のグルタミン酸との置換である、請求項 1 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 1】

前記置換が、2 1 6 位でのアスパラギン酸のグルタミン酸との置換（D 2 1 6 E）又は 2 7 0 位でのアスパラギン酸のグルタミン酸との置換（D 2 7 0 E）である、請求項 1 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 2】

前記定常ドメインが、置換 D 2 1 6 E 及び D 2 7 0 E のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 3】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、D 2 1 6 E、及び D 2 7 0 E のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 4】

前記置換が、アミノ酸残基 4 3 2、4 3 4、4 3 7、又はそれらの組み合わせにある、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 5】

前記置換が、前記アミノ酸残基のアラニンとの置換である、請求項 2 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 6】

前記置換が、4 3 2 位でのロイシンのアラニンとの置換（L 4 3 2 A）、4 3 4 位でのアスパラギンのアラニンとの置換（N 4 3 4 A）、4 3 7 位でのスレオニンのアラニンとの置換（T 4 3 7 A）である、請求項 2 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 7】

前記定常ドメインが、置換 L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び T 4 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 2 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 8】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、D 2 1 6 E、D 2 7 0 E、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び T 4 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 2 9】

前記 I g G が、I g G 2 である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 3 0】

前記 I g G 2 が、I g G 2 a 又は I g G 2 b である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

前記置換が、アミノ酸残基 330 にある、請求項 30 に記載の修飾された I g G。

【請求項 32】

前記置換が、前記アミノ酸残基のセリンとの置換である、請求項 31 に記載の修飾された I g G。

【請求項 33】

前記定常ドメインが、S S 変異を含み、前記変異が、330 位でのアラニンのセリンとの置換 (A 330 S) である、請求項 31 に記載の修飾された I g G。

【請求項 34】

前記置換が、アミノ酸残基 432、434、437、又はそれらの組み合わせにある、請求項 30 に記載の修飾された I g G。

【請求項 35】

前記置換が、前記アミノ酸残基のアラニンとの置換である、請求項 34 に記載の修飾された I g G。

【請求項 36】

前記置換が、432 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 432 A)、434 位でのアスパラギンのアラニンとの置換 (N 434 A)、437 位でのメチオニンのアラニンとの置換 (M 437 A) である、請求項 34 に記載の修飾された I g G。

【請求項 37】

前記定常ドメインが、置換 L 432 A、N 434 A、及び M 437 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 34 に記載の修飾された I g G。

【請求項 38】

前記定常ドメインが、置換 A 330 S、L 432 A、N 434 A、及び M 437 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 30 に記載の修飾された I g G。

【請求項 39】

前記 I g G が、I g G 3 である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 40】

前記 I g G 3 が、I g G 3 a 又は I g G 3 b である、請求項 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 41】

前記置換が、アミノ酸残基 329、330、331、又はそれらの組み合わせにある、請求項 40 に記載の修飾された I g G。

【請求項 42】

前記置換が、前記アミノ酸残基のセリンとの置換である、請求項 41 に記載の修飾された I g G。

【請求項 43】

前記置換が、329 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 329 S)、330 位でのアラニンのセリンとの置換 (A 330 S)、又は 331 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 331 S) である、請求項 41 に記載の修飾された I g G。

【請求項 44】

前記定常ドメインが、置換 P 329 S、A 330 S、及び P 331 S のうちの 1 つ以上を含む、請求項 41 に記載の修飾された I g G。

【請求項 45】

前記定常ドメインが、P A P から S A P への変異を含み、前記変異が、329 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 329 S) である、請求項 41 に記載の修飾された I g G。

【請求項 46】

前記定常ドメインが、P A P から S A S への変異を含み、前記変異が、331 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 331 S) である、請求項 41 に記載の修飾された I g G。

【請求項 47】

前記定常ドメインが S S 変異を含み、前記変異が、330 位でのアラニンのセリンとの置換 (A 330 S) 及び 331 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 331 S) である、

10

20

30

40

50

請求項 4 1 に記載の修飾された I g G。

【請求項 4 8】

前記置換が、W i n t e r 部位の 1 つ以上のアミノ酸残基にある、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 4 9】

前記置換が、アミノ酸残基 2 3 4、2 3 5、2 3 7、又はそれらの組み合わせにある、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 0】

前記置換が、前記アミノ酸残基のアラニンとの置換である、請求項 4 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 1】

前記置換が、2 3 4 位でのプロリンのアラニンとの置換 (P 2 3 4 A)、2 3 5 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 2 3 5 A)、又は 2 3 5 位でのグリシンのアラニンとの置換 (G 2 3 7 A) である、請求項 4 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 2】

前記定常ドメインが、置換 P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 3】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 4】

前記置換が、D P 部位の 1 つ以上のアミノ酸残基にある、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 5】

前記置換が、アミノ酸残基 2 7 0 にある、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 6】

前記置換が、前記アミノ酸残基のグルタミン酸との置換である、請求項 5 5 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 7】

前記置換が、2 7 0 位でのアスパラギン酸のグルタミン酸との置換 (D 2 7 0 E) である、請求項 5 5 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 8】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、及び D 2 7 0 E のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 5 9】

前記置換が、アミノ酸残基 4 3 2、4 3 4、4 3 7、又はそれらの組み合わせにある、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 0】

前記置換が、前記アミノ酸残基のアラニンとの置換である、請求項 5 9 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 1】

前記置換が、4 3 2 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 4 3 2 A)、4 3 4 位でのアスパラギンのアラニンとの置換 (N 4 3 4 A)、4 3 7 位でのリジンのアラニンとの置換 (K 4 3 7 A) である、請求項 6 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 2】

前記定常ドメインが、置換 L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び K 4 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 6 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 3】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3

10

20

30

40

50

5 A、G 2 3 7 A、D 2 7 0 E、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び K 4 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 4】

前記置換が、アミノ酸残基 4 3 3 にある、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 5】

前記置換が、前記アミノ酸残基のヒスチジンとの置換である、請求項 6 4 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 6】

前記置換が、4 3 3 位でのアルギニンのヒスチジンとの置換 (R 4 3 3 H) である、請求項 6 4 に記載の修飾された I g G。

10

【請求項 6 7】

前記定常ドメインが、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、D 2 7 0 E、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、T 4 3 7 A、及び R 4 3 3 H のうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 0 に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 8】

前記修飾された I g G が、前記野生型ウシ科動物 I g G 定常ドメインを有する前記 I g G よりも高い、FcRn に対する親和性を有する、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

【請求項 6 9】

前記修飾された I g G が、前記野生型ウシ科動物 I g G 定常ドメインを有する I g G と比較して、補体依存性細胞傷害性を排除又は低減する、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

20

【請求項 7 0】

前記修飾された I g G が、前記野生型ウシ科動物 I g G 定常ドメインを有する I g G と比較して、抗体依存性細胞食作用を排除又は低減する、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

【請求項 7 1】

前記修飾された I g G が、前記 I g G の唯一の Fcγ 受容体 (b FcγR) への結合を排除又は低減する、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

【請求項 7 2】

前記修飾された I g G が、前記野生型ウシ科動物 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して、増加した半減期を有する、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

30

【請求項 7 3】

前記 I g G 定常ドメインが、CH1 ドメイン又はヒンジ領域を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

【請求項 7 4】

前記 I g G 定常ドメインが、CH2 及び CH3 ドメインを有する Fc 定常領域を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

【請求項 7 5】

前記野生型ウシ科動物 I g G 定常ドメインが、配列番号 1 ～ 9 に記載のアミノ酸配列のうちの 1 つを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G。

40

【請求項 7 6】

先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 7 7】

容器内に、先行請求項のいずれか一項に記載の修飾された I g G と、使用指示書と、を含む、キット。

【請求項 7 8】

請求項 1 ～ 7 5 のいずれか一項に記載の修飾された I g G を含む、ポリペプチド。

50

【請求項 79】

請求項 1～75 のいずれか一項に記載の修飾された I g G を含む、抗体。

【請求項 80】

配列番号 10～12、14～25、及び 27～31 に記載のアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つをコードする核酸配列を含む、ベクター。

【請求項 81】

請求項 80 に記載のベクターを含む、単離された細胞。

【請求項 82】

抗体又は分子を製造する方法であって、前記方法が、請求項 81 に記載の細胞を提供することと、前記細胞を培養することと、を含む、方法。

【請求項 83】

抗体を製造する方法であって、前記方法が、請求項 79 に記載の抗体を提供することを含む、方法。

【請求項 84】

家畜における抗体血清半減期を増加させるための方法であって、前記方法が、治療有効量の請求項 79 に記載の抗体を前記家畜に投与することを含む、方法。

【請求項 85】

薬剤に融合したウシ科動物 I g G 定常ドメインを含む融合分子であって、前記ウシ科動物 I g G 定常ドメインが、請求項 1～75 のいずれか一項に記載の修飾された I g G を含む、融合分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年11月20日出願の米国仮特許出願第63／116491号の優先権及び利益を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、概して、ウシ科動物抗体バリエーション及びそれらの使用に関する。具体的には、本発明は、様々な特徴を改善するためのウシ科動物抗体の F c 定常領域における 1 つ以上の変異に関する。

【背景技術】

【0003】

ウシ科動物 I g G モノクローナル抗体 (m A b) は、獣医学における有効な治療薬であり得る。数年前、3つのウシ科動物 I g G サブクラスが同定された。しかしながら、ウシ科動物 I g G の特徴の改善に関してはあまり研究されていない。

【0004】

新生仔 F c 受容体 (F c R n) は、リサイクル機序を通じて、その断片結晶化可能 (F c) 領域との p H 依存性相互作用において、I g G の半減期を延長する。具体的には、C H 2 及び C H 3 ドメインの界面に広がる F c 領域は、細胞の表面上の F c R n と相互作用して、I g G 恒常性を調節する。この相互作用は、I g G ピノサイトーシス後の酸性相互作用に好ましく、したがって、I g G は分解から保護される。次いで、エンドサイトーシスされた I g G は、細胞表面にリサイクルされ、わずかにアルカリ p H で血流中に放出され、それによって適切な機能にとって十分な血清 I g G が維持される。したがって、I g G の薬物動態プロファイルは、それらの F c 領域の構造的及び機能的特性に依存する。

【0005】

F c 領域は、補体依存性細胞傷害性 (C D C)、抗体依存性細胞傷害性 (A D C C)、及び抗体依存性細胞食作用 (A D C P) などの抗体エフェクター機能にも関与する。これらのエフェクター機能は、F c 領域と F c γ R との相互作用に依存する。したがって、F c γ R との相互作用を調整するように F c 領域を操作することは、治療用抗体の活性を増強するための有望なアプローチとして浮上した。

10

20

30

40

50

【0006】

ヒトの健康において、数十年にわたるFc工学は、薬物動態及びエフェクター機能を改善する多数の変異の同定につながった。これまでのところ、そのようなFc工学研究はウシ科動物において報告されていない。

【0007】

したがって、ウシ科動物IgGの様々な特徴を改善するために、新規のウシ科動物IgG Fc領域変異の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、野生型ウシ科動物IgGと比較して、所望の特徴を示す変異型ウシ科動物IgGに関する。具体的には、本出願の発明者らは、驚くべきことに、そして予想外にも、216位、234位、235位、237位、270位、329位、330位、331位、432位、434位、437位、又は433位（KabattにおけるEuインデックスに従って付番された）のアミノ酸残基を別のアミノ酸で置換することが、所望効果を示したことを見出した。例示的な実施形態では、予想外の所望の効果は、FcRnに対する親和性の向上、補体依存性細胞傷害性の低減（CDC）、抗体依存性細胞傷害性の低減（ADCC）、抗体依存性細胞食作用の低減（ADCP）、Fcγ受容体（bFcγR）への結合の低減、又はそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

10

【0009】

別の態様では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG定常ドメインを含む、修飾されたIgGであって、当該置換が、アミノ酸残基216、234、235、237、270、329、330、331、432、434、437、又は433にある、修飾されたIgGを提供する。

20

【0010】

1つの例示的な実施形態では、ウシ科動物IgG定常ドメインは、P329S、A330S、P331S、P234A、L235A、G237A、D216E、D270E、L432A、N434A、及びT437Aの置換のうちの1つ以上を含むIgG1定常ドメインである。

【0011】

別の例示的な実施形態では、ウシ科動物IgG定常ドメインは、A330S、L432A、N434A、及びM437Aの置換のうちの1つ以上を含むIgG2定常ドメインである。

30

【0012】

更に別の例示的な実施形態では、ウシ科動物IgG定常ドメインは、P329S、A330S、P331S、P234A、L235A、G237A、D270E、L432A、N434A、T437A、及びR433Hの置換のうちの1つ以上を含むIgG3定常ドメインである。

【0013】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の本発明の1つ以上のアミノ酸置換を含むウシ科動物IgG定常ドメインを含む、ポリペプチドを提供する。

40

【0014】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の本発明の1つ以上のアミノ酸置換を含むウシ科動物IgG定常ドメインを含む、抗体又は分子を提供する。

【0015】

更なる態様では、本発明は、抗体又は分子を産生又は製造するための方法であって、方法が、抗体をコードする核酸配列を有するベクター又は宿主細胞を提供することを含み、当該抗体が、本明細書に記載の本発明の1つ以上のアミノ酸置換を含むウシ科動物IgG定常ドメインを含む、方法を提供する。

【0016】

50

本発明の他の特色及び利点は、以下の詳細な説明の例及び図面から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の趣旨及び範囲内の様々な変更及び修正が、この詳細な説明から当業者に明らかになるので、詳細な説明及び特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しながらも、例示としてのみ与えられることが理解されるべきである。

【0017】

図面の簡単な説明

本特許又は出願書類には、カラーで作成された少なくとも1つの図面が含まれている。カラーの図面を含む本特許又は特許出願公開の複写は、要望及び必要な料金の支払いに応じて、庁によって提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】エフェクター細胞の表面上のFcγ受容体へのIgG-Fc結合によって誘発される標的細胞殺傷機能を図示する。

【図2】配列アラインメント、ウシ科動物IgGサブクラスを示す。3つの代表的なアロタイプを示す。CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3ドメインは次のとおりである：CH1：残基1～98、ヒンジ：99から垂直線；CH2：243への垂直線；CH3：244～351。重鎖間ジスルフィド結合に関与するシステインは、太字及び下線で示される。ウシIgG3aにおけるCH1エキソンの3'伸長は、イタリック文字で示される。ヒンジのすぐ下流にある太字のアミノ酸は、「Winter」又は「LALA」部位を表す。bIgG1a及びbIgG3aについて、これらの部位は、それぞれ、LP GG及びPL GGである。この部位は、bIgG2aにはない。ボックスには、bIgG1a及びbIgG3a-CH2における「PAP」領域、並びにbIgG2aにおける「SAS」領域が含まれる。bIgG3aにおける二重下線アルギニン（R）は、ヒスチジン（H）への点変異に関与する残基である。

【図3】ウシ科動物IgG1サブクラスの3つの独自の対立遺伝子の配列アラインメントを示す。太字：アミノ酸「DP」領域は、プロテアーゼクリッピングを軽減するためにbIgG1a上で変異させた。下線：アミノ酸は、エフェクター機能をロックアウトするためにbIgG1a上で変異させた。bIgG1dは、bIgG1bと同義のアミノ酸配列を有するため、bIgG1アロタイプのアラインメントには含まれない。bIgG1に対して行われた全ての変異は、a及びbアロタイプと同一である。

【図4】ウシ科動物IgG2サブクラス、bIgG2a（NCBI X16702.1）及びbIgG2b（NCBI S82407）の2つの報告された対立遺伝子の、ウシから単離されたIgG2抗体の配列との配列アラインメントを示す。太字：アミノ酸は、エフェクター機能をロックアウトするためにbIgG2a上で変異させた。本発明者らは、乳牛からIgG抗体を単離し、配列決定は、図4に「ウシ配列からのbIgG2a」として示されるように、bIgG2aについて報告されたものからの2残基の逸脱を明らかにした。この配列は、bIgG2の新しいアロタイプを表し得るが、本特許出願の目的のために、それは、bIgG2aとほぼ同一のアラインメントのため、「bIgG2a」と称される。bIgG2に対して行われた全ての変異は、a及びbアロタイプと同一である。

【図5】ウシ科動物IgG3サブクラスの2つの対立遺伝子の配列アラインメントを示す。太字：アミノ酸は、エフェクター機能をロックアウトするためにbIgG3a上で変異させた。下線：残基は、bFcRnへの親和性を向上させるためにbIgG3a上に変異させた。bIgG3に対して行われた全ての変異は、a及びbアロタイプと同一である。

【図6】エフェクター機能をロックアウトするためのウシ科動物IgG1a及びbIgG1a-Fc変異体を示す。太字：Winter変異L234A__P235A__G237A*に関与する残基。ボックス：PAPからSASへの変異（P329S__P331S*）、PAPからSAPへの変異（P329S*）、及びWinter変異と組み合わせたPAPからSSSへの変異（SS変異；A330S__P331S*）に関与する残基。垂直線：CTLA4-Fc融合タンパク質におけるFc領域の開始。*変異のアミノ酸残基は、KabataにおけるEuインデックスに従って付番される。

10

20

30

40

50

【図 7 A】ウシ科動物 I g G 1 a、I g G 1 b、及び両方のアロタイプのバリエーションの細胞ベースの補体依存性細胞傷害性活性を示す。

【図 7 B】ウシ科動物 I g G 1 a、I g G 1 b、及び両方のアロタイプのバリエーションの細胞ベースの補体依存性細胞傷害性活性を示す。

【図 8】b I g G 1 a__W I N S A S、b I g G 1 b__W I N S A S、b I g G 1 c__W I N S A S、及びb I g G 1 d__W I N S A Sの抗体相同性モデリングを示す。A) W I N S A S 残基 (矢印) を示す拡大サブパネルを用いたタンパク質モデルのオーバーレイ。B) b I g G 1 a__W I N S A S、b I g G 1 b__W I N S A S、b I g G 1 c__W I N S A S、及びb I g G 1 d__W I N S A SアロタイプのW I N S A S 変異体の平均二乗偏差 (R M S D) 比較 (オングストローム単位)。

10

【図 9】細胞ベースのアッセイにおける抗体依存性細胞食作用の排除のためのウシ科動物 I g G 1 a サブクラス上の F c 変異を示す。

【図 10】野生型ウシ科動物 I g G 1 a 分子の分析 S E C を示す。

【図 11 A】ウシ科動物 I g G 1 a 野生型 (W T) F c の質量分析を示す。

【図 11 B】ウシ科動物 I g G 1 a 二重変異 D P 部位 1 及び 2 の質量分析を示す。

【図 12】切断部位を排除するためのウシ科動物 I g G 1 a 及び b I g G 1 a の D P から E P への F c 変異体を示す。太字: E P への「D P 1」(部位 1) の変異; 下線: E P への「D P 2」(部位 2) の変異。

【図 13】b I g G 1 a__D P 1__D P 2、b I g G 1 b__D P 1__D P 2、b I g G 1 c__D P 1__D P 2、及びb I g G 1 d__D P 1__D P 2の抗体相同性モデリングを示す。A) D P 1 及び D P 2 残基 (矢印) を示す拡大サブパネルを用いたタンパク質モデルのオーバーレイ。B) ウシ科動物 G 1 a、G 1 b、G 1 c、及び G 1 d アロタイプの D P 1__D P 2 変異体の平均二乗偏差 (R M S D) 比較。

20

【図 14】エフェクター機能をロックアウトするためのウシ科動物 I g G 2 a 及び b I g G 2 a F c 変異体を示す。1 行目の太字: 独立した変異又は組み合わせとしてアラニンに変異された 3 つの残基 L 4 3 2 *、N 4 3 4 *、及び M 4 3 7 *。垂直線: C T L A 4 - F c 融合タンパク質における F c 領域の開始。* 変異のアミノ酸残基は、K a b a t における E u インデックスに従って付番される。

【図 15 A】ウシ科動物 I g G 2 a 及び I g G 2 b サブクラス上の F c 変異が、細胞ベースの補体依存性細胞傷害性活性を排除することを示す。

30

【図 15 B】ウシ科動物 I g G 2 a 及び I g G 2 b サブクラス上の F c 変異が、細胞ベースの補体依存性細胞傷害性活性を排除することを示す。

【図 16】b I g G 2 a__L 4 3 2 A__N 4 3 4 A__M 4 3 7 A 及び b I g G 2 b__L 4 3 2 A__N 4 3 4 A__M 4 3 7 A の抗体相同性モデリングを示す。A) L 4 3 2 A__N 4 3 4 A__M 4 3 7 A 残基 (矢印) を示す拡大サブパネルを用いたタンパク質モデルのオーバーレイ。B) ウシ科動物 I g G 2 a 及び I g G 2 b アロタイプの L 4 3 2 A__N 4 3 4 A__M 4 3 7 A 変異体の平均二乗偏差 (R M S D) 比較。

【図 17】ウシ科動物 I g G 2 a サブクラス上の F c 変異が細胞ベースのアッセイにおける抗体依存性細胞食作用を排除することを示す。

【図 18】エフェクター機能をロックアウトするためのウシ科動物 I g G 3 a 及び b I g G 3 a F c 変異体を示す。太字: W i n t e r 変異 (P 2 3 4 A__L 2 3 5 A__G 2 3 7 A *) に関与する残基。ボックス: P A P から S A S への変異 (P 3 2 9 S__P 3 3 1 S *) 及び P A P から S A P への変異 (P 3 2 9 S *) に関与する残基。垂直線: C T L A 4 - F c 融合タンパク質における F c 領域の開始。* 変異のアミノ酸残基は、K a b a t における E u インデックスに従って付番される。

40

【図 19 A】細胞ベースのアッセイにおける補体依存性細胞傷害性の排除のためのウシ科動物 I g G 3 a 及び I g G 3 b サブクラス上の F c 変異を示す。

【図 19 B】細胞ベースのアッセイにおける補体依存性細胞傷害性の排除のためのウシ科動物 I g G 3 a 及び I g G 3 b サブクラス上の F c 変異を示す。

【図 20】b I g G 3 a__W I N S A S 及び b I g G 3 b__W I N S A S の抗体相同性モ

50

デリングを示す。A) W I N S A S 残基 (矢印) を示す拡大サブパネルを用いたタンパク質モデルのオーバーレイ。B) ウシ科動物 I g G 3 a 及び I g G 3 b アロタイプの W I N S A S 変異体の平均二乗偏差 (R M S D) 比較。

【図 2 1】ウシ科動物 I g G 3 a サブクラス上の F c 変異が細胞ベースのアッセイにおける抗体依存性細胞食作用を排除することを示す。

【図 2 2】b F c R n 結合の改善のためのウシ科動物 I g G 3 a 及び F c 変異体を示す。太字アルギニン (R) は、K a b a t における E u インデックスに従って付番された、ヒスチジン (H) への点変異 R 4 3 3 H に関与する残基である。

【図 2 3 - 1】ヒト I g G 1、ウシ科動物 I g G 1 a、ウシ科動物 I g G 2 a、及びウシ科 I g G 3 a のアミノ酸配列のアラインメントを示す。アミノ酸残基は、K a b a t における E u インデックスに従って付番される。図 2 3 に示される I g G 1 (b、c、d)、I g G 2 (b)、及び I g G 3 (b) の他の対立遺伝子のアミノ酸残基も、E u インデックスに従って付番された。

【図 2 3 - 2】図 2 3 続き。

【図 2 3 - 3】図 2 3 続き。

【図 2 3 - 4】図 2 3 続き。

【図 2 3 - 5】図 2 3 続き。

【0 0 1 9】

配列表の簡単な説明

配列番号 1 は、I g G 1 a 野生型 (N C B I I D 番号 1 S 8 2 4 0 9) のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 0】

配列番号 2 は、I g G 1 b 野生型 (N C B I I D 番号 X 1 6 7 0 1) のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 1】

配列番号 3 は、I g G 1 c 野生型 (N C B I I D 番号 D Q 4 5 2 0 1 4 . 1) のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 2】

配列番号 4 は、I g G 1 d 野生型 (N C B I I D 番号 X 6 2 9 1 6 . 1) のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 3】

配列番号 5 は、I g G 2 a 野生型 (N C B I I D 番号 X 1 6 7 0 2 . 1) のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 4】

配列番号 6 は、I g G 2 b 野生型 (N C B I I D 番号 S 8 2 4 0 7) のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 5】

配列番号 7 は、I g G 3 a 野生型のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 6】

配列番号 8 は、I g G 3 b 野生型のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 7】

配列番号 9 は、乳牛由来の I g G 2 a 野生型のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 8】

配列番号 1 0 は、D P 1 変異を有する I g G 1 a のアミノ酸配列を指す。

【0 0 2 9】

配列番号 1 1 は、D P 2 変異を有する I g G 1 a のアミノ酸配列を指す。

【0 0 3 0】

配列番号 1 2 は、D P 1 及び D P 2 変異を有する I g G 1 a のアミノ酸配列を指す。

【0 0 3 1】

配列番号 1 3 は、I g G 1 a 野生型断片の物理的位置 9 9 ~ 3 2 9 のアミノ酸配列を指

10

20

30

40

50

す。

【 0 0 3 2 】

配列番号 1 4 は、S A P 変異を有する I g G 1 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 3 3 】

配列番号 1 5 は、S A S 変異を有する I g G 1 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 3 4 】

配列番号 1 6 は、W i n t e r 変異を有する I g G 1 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 3 5 】

配列番号 1 7 は、W i n t e r 及び S A S 変異を有する I g G 1 a 断片のアミノ酸配列を指す。

10

【 0 0 3 6 】

配列番号 1 8 は、W i n t e r 及び S S 変異を有する I g G 1 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 3 7 】

配列番号 1 9 は、変異 L 4 3 2 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 3 8 】

配列番号 2 0 は、変異 N 4 3 4 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 3 9 】

配列番号 2 1 は、変異 M 4 3 7 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 0 】

配列番号 2 2 は、変異 L 4 3 2 A 及び M 4 3 7 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

20

【 0 0 4 1 】

配列番号 2 3 は、変異 N 4 3 4 A 及び M 4 3 7 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 2 】

配列番号 2 4 は、変異 L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び M 4 3 7 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 3 】

配列番号 2 5 は、変異 L 4 3 2 A 及び N 4 3 4 A を有する I g G 2 a のアミノ酸配列を指す。

30

【 0 0 4 4 】

配列番号 2 6 は、I g G 3 a 野生型断片の物理的位置 9 9 ~ 3 5 2 のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 5 】

配列番号 2 7 は、S A P 変異を有する I g G 3 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 6 】

配列番号 2 8 は、S A S 変異を有する I g G 3 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 7 】

配列番号 2 9 は、W i n t e r 変異を有する I g G 3 a 断片のアミノ酸配列を指す。

40

【 0 0 4 8 】

配列番号 3 0 は、W i n t e r 及び S A S 変異を有する I g G 3 a 断片のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 4 9 】

配列番号 3 1 は、変異 R 4 3 3 H を有する I g G 3 a のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 5 0 】

配列番号 3 2 は、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 5 1 】

配列番号 3 3 は、I g G 1 b 野生型のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 5 2 】

50

配列番号 34 は、I g G 1 b 野生型の核酸配列を指す。

【0053】

配列番号 35 は、W i n t e r 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0054】

配列番号 36 は、W i n t e r 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0055】

配列番号 37 は、W i n S S 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0056】

配列番号 38 は、W i n S S 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0057】

配列番号 39 は、W i n S A S 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0058】

配列番号 40 は、W i n S A S 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0059】

配列番号 41 は、S A S 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0060】

配列番号 42 は、S A S 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0061】

配列番号 43 は、S A P 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0062】

配列番号 44 は、S A P 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0063】

配列番号 45 は、D 2 1 6 E 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0064】

配列番号 46 は、D 2 1 6 E 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0065】

配列番号 47 は、D 2 7 0 E 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0066】

配列番号 48 は、D 2 7 0 E 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0067】

配列番号 49 は、D 2 1 6 E 及び D 2 7 0 E 変異を有する I g G 1 b のアミノ酸配列を指す。

【0068】

配列番号 50 は、D 2 1 6 E 及び D 2 7 0 E 変異を有する I g G 1 b の核酸配列を指す。

【0069】

配列番号 51 は、I g G 2 b 野生型のアミノ酸配列を指す。

【0070】

配列番号 52 は、I g G 2 b 野生型の核酸配列を指す。

【0071】

配列番号 53 は、L 4 3 2 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【0072】

配列番号 54 は、L 4 3 2 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【0073】

配列番号 55 は、N 4 3 4 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【0074】

配列番号 56 は、N 4 3 4 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【0075】

配列番号 57 は、M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【0076】

10

20

30

40

50

配列番号 58 は、M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【 0 0 7 7 】

配列番号 59 は、L 4 3 2 A 及び N 4 3 4 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 7 8 】

配列番号 60 は、L 4 3 2 A 及び N 4 3 4 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【 0 0 7 9 】

配列番号 61 は、L 4 3 2 A 及び M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 8 0 】

配列番号 62 は、L 4 3 2 A 及び M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【 0 0 8 1 】

配列番号 63 は、N 4 3 4 A 及び M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 8 2 】

配列番号 64 は、N 4 3 4 A 及び M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【 0 0 8 3 】

配列番号 65 は、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 8 4 】

配列番号 66 は、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び M 4 3 7 A 変異を有する I g G 2 b の核酸配列を指す。

【 0 0 8 5 】

配列番号 67 は、I g G 3 b 野生型のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 8 6 】

配列番号 68 は、I g G 3 b 野生型の核酸配列を指す。

【 0 0 8 7 】

配列番号 69 は、W i n t e r 変異を有する I g G 3 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 8 8 】

配列番号 70 は、W i n t e r 変異を有する I g G 3 b の核酸配列を指す。

【 0 0 8 9 】

配列番号 71 は、W i n S A S 変異を有する I g G 3 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 9 0 】

配列番号 72 は、W i n S A S 変異を有する I g G 3 b の核酸配列を指す。

【 0 0 9 1 】

配列番号 73 は、S A S 変異を有する I g G 3 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 9 2 】

配列番号 74 は、S A S 変異を有する I g G 3 b の核酸配列を指す。

【 0 0 9 3 】

配列番号 75 は、S A P 変異を有する I g G 3 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 9 4 】

配列番号 76 は、S A P 変異を有する I g G 3 b の核酸配列を指す。

【 0 0 9 5 】

配列番号 77 は、R 4 3 3 H 変異を有する I g G 3 b のアミノ酸配列を指す。

【 0 0 9 6 】

配列番号 78 は、R 4 3 3 H 変異を有する I g G 3 b の核酸配列を指す。

【 0 0 9 7 】

10

20

30

40

50

配列番号 79 は、b I g G 1 b W i n (L 2 3 4 A _ _ P 2 3 5 A _ _ G 2 3 7 A) : L P G G から A A G A の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 0 9 8 】

配列番号 80 は、b I g G 1 b W i n (L 2 3 4 A _ _ P 2 3 5 A _ _ G 2 3 7 A) : L P G G から A A G A の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 0 9 9 】

配列番号 81 は、b I g G 1 b W i n S S (A 3 3 0 S _ _ P 3 3 1 S) : P A P から P S S の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 0 】

配列番号 82 は、b I g G 1 b W i n S S (A 3 3 0 S _ _ P 3 3 1 S) : P A P から P S S の隣接核酸配列を指す。

【 0 1 0 1 】

配列番号 83 は、b I g G 1 b S A S (P 3 2 9 S _ _ P 3 3 1 S) : P A P から S A S の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 2 】

配列番号 84 は、b I g G 1 b S A S (P 3 2 9 S _ _ P 3 3 1 S) : P A P から S A S の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 3 】

配列番号 85 は、b I g G 1 b S A P (P 3 2 9 S) : P A P から S A P の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 4 】

配列番号 86 は、b I g G 1 b S A P (P 3 2 9 S) : P A P から S A P の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 5 】

配列番号 87 は、b I g G 1 b _ _ D P 1 (D 2 1 6 E) : D P 1 から E P 1 の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 6 】

配列番号 88 は、b I g G 1 b _ _ D P 1 (D 2 1 6 E) : D P 1 から E P 1 の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 7 】

配列番号 89 は、b I g G 1 b _ _ D P 2 (D 2 7 0 E) : D P 2 から E P 2 の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 8 】

配列番号 90 は、b I g G 1 b _ _ D P 2 (D 2 7 0 E) : D P 2 から E P 2 の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 0 9 】

配列番号 91 は、b I g G 2 b _ _ L 4 3 2 A : L H N H Y M から A H N H Y M の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 1 0 】

配列番号 92 は、b I g G 2 b _ _ L 4 3 2 A : L H N H Y M から A H N H Y M の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 1 1 】

配列番号 93 は、b I g G 2 b _ _ N 4 3 4 A : L H N H Y M から L H A H Y M の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 1 2 】

配列番号 94 は、b I g G 2 b _ _ N 4 3 4 A : L H N H Y M から L H A H Y M の隣接アミノ酸配列を指す。

【 0 1 1 3 】

配列番号 95 は、b I g G 2 b _ _ M 4 3 7 A : L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

10

20

30

40

50

【0114】

配列番号96は、b I g G 2 b __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0115】

配列番号97は、b I g G 2 b __ L 4 3 2 A __ N 4 3 4 A : L H N H Y M から A H N H Y M、L H N H Y M から L H A H Y M の隣接アミノ酸配列を指す。

【0116】

配列番号98は、b I g G 2 b __ L 4 3 2 A __ N 4 3 4 A : L H N H Y M から A H N H Y M、L H N H Y M から L H A H Y M の隣接アミノ酸配列を指す。

【0117】

配列番号99は、b I g G 2 b __ L 4 3 2 A __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から A H N H Y M、L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0118】

配列番号100は、b I g G 2 b __ L 4 3 2 A __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から A H N H Y M、L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0119】

配列番号101は、b I g G 2 b __ N 4 3 4 A __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から L H A H Y M、L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0120】

配列番号102は、b I g G 2 b __ N 4 3 4 A __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から L H A H Y M、L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0121】

配列番号103は、b I g G 2 b __ L 4 3 2 A __ N 4 3 4 A __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から A H N H Y M、L H N H Y M から L H A H Y M、L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0122】

配列番号104は、b I g G 2 b __ L 4 3 2 A __ N 4 3 4 A __ M 4 3 7 A : L H N H Y M から A H N H Y M、L H N H Y M から L H A H Y M、L H N H Y M から L H N H Y A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0123】

配列番号105は、b I g G 3 b W i n (P 2 3 4 A __ L 2 3 5 A __ G 2 3 7 A) : P L G G から A A G A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0124】

配列番号106は、b I g G 3 b W i n (P 2 3 4 A __ L 2 3 5 A __ G 2 3 7 A) : P L G G から A A G A の隣接アミノ酸配列を指す。

【0125】

配列番号107は、b I g G 3 b S A S (P 3 2 9 S __ P 3 3 1 S) : P A P から S A S の隣接アミノ酸配列を指す。

【0126】

配列番号108は、b I g G 3 b S A S (P 3 2 9 S __ P 3 3 1 S) : P A P から S A S の隣接アミノ酸配列を指す。

【0127】

配列番号109は、b I g G 3 b S A P (P 3 2 9 S) : P A P から S A P の隣接アミノ酸配列を指す。

【0128】

配列番号110は、b I g G 3 b S A P (P 3 2 9 S) : P A P から S A P の隣接アミノ酸配列を指す。

【0129】

配列番号111は、b I g G 3 b __ R 4 3 3 H : A L R N H から A L H N H の隣接アミノ酸配列を指す。

10

20

30

40

50

【0130】

配列番号112は、b I g G 3 b _ R 4 3 3 H : A L R N HからA L H N Hの隣接アミノ酸配列を指す。

【0131】

配列番号113は、ビオチンアクセプターペプチド（BAP）のアミノ酸配列を指す。

【発明を実施するための形態】

【0132】

【000154】本発明の主題は、本開示の一部を形成する以下の詳細な説明を参照することによって、より容易に理解されることができる。本発明は、本明細書で説明及び／又は示される特定の生成物、方法、条件、又はパラメータに限定されず、本明細書で使用する用語は、例としてのみ特定の実施形態を説明する目的のためのものであり、特許請求される発明を限定することを意図するものではないことを理解されたい。

10

【0133】

【000155】本明細書で別段の定義がない限り、本出願に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者に一般的に理解される意味を有するものとする。更に、文脈によって別段の必要がない限り、単数形の使用は複数形を含み、複数形の使用は単数形を含むものとする。

【0134】

【000156】上及び本開示を通じて用いられる場合、以下の用語及び略語は、別段の指示がない限り、以下の意味を有するものと理解されるものとする。

20

【0135】

定義

【000157】本開示において、「a」、「an」、及び「the」という単数形は、複数の指示物を含み、特定の数値への言及は、文脈が別段明らかに示さない限り、少なくともその特定の値を含む。したがって、例えば、「分子」又は「化合物」への言及は、当業者に既知のそのような分子又は化合物及びそれらの等価物などのうちの1つ以上への言及である。「複数の」という用語は、本明細書で使用される場合、1つ超を意味する。値の範囲が表される場合、別の実施形態は、1つの特定の値から、及び／又は他の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表される場合、先行する「約」を使用することによって、特定の値が別の実施形態を形成することが理解される。全ての範囲は、包括的かつ組み合わせ可能である。

30

【0136】

【000158】本明細書及び特許請求の範囲において、免疫グロブリン重鎖におけるアミノ酸残基の付番は、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)におけるEuインデックスのものである。「KabatにおけるEuインデックス」は、IgG抗体の残基付番を指し、本明細書では図23に反映される。

【0137】

40

【000159】「単離された」という用語は、核酸に関して使用される場合、それが通常、その自然源では会合している少なくとも1つの混入物質である核酸から同定及び分離される核酸である。単離された核酸は、それが自然で見出されるものとは異なる形態又は設定のものである。したがって、単離された核酸分子は、自然の細胞に存在する核酸分子と区別される。単離された核酸分子は、コードされるポリペプチドを通常発現する細胞内に含有された核酸分子を含み、例えば、核酸分子は、自然の細胞のものとは異なるプラスミド又は染色体位置にある。単離された核酸は、一本鎖形態又は二本鎖形態で存在し得る。単離された核酸分子を利用してタンパク質を発現させる場合、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは、センス鎖又はコード鎖を最小限度に含有するが、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方を含有する場合がある（すなわち、二本鎖であり得る）。

50

【0138】

〔000160〕核酸分子は、別の核酸分子と機能的関係に配置される場合、「作動可能に連結される」か、又は「作動可能に結合される」。例えば、プロモーター若しくはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合、核酸のコード配列に作動可能に連結されるか、又はリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置される場合、核酸のコード配列に作動可能に連結される。発現する融合タンパク質が、バリエーションFc領域ポリペプチドの上流又は下流のいずれかに隣接する異種タンパク質又はその機能的断片を含むように配置されている場合、バリエーションFc領域をコードする核酸分子は、異種タンパク質（すなわち、自然で存在するようにFc領域を含まないタンパク質又はその機能的断片）をコードする核酸分子に作動可能に連結され、異種タンパク質は、バリエーションFc領域ポリペプチドの直近に隣接し得るか、又は任意の長さ及び組成のリンカー配列によってそれから分離され得る。同様に、ポリペプチド（本明細書で「タンパク質」と同義に使用される）分子は、別のポリペプチドと機能的関係に配置される場合、「作動可能に連結される」か、又は「作動可能に結合される」。

10

【0139】

〔000161〕本明細書で使用される場合、「機能的断片」という用語は、ポリペプチド又はタンパク質（例えば、バリエーションFc領域、又はモノクローナル抗体）に関して言及する場合、完全長ポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持するそのタンパク質の断片を指す。断片は、6つのアミノ酸のサイズ～完全長ポリペプチドのアミノ酸配列全体から1つのアミノ酸を引いたものまでのサイズの範囲であり得る。本発明のバリエーションFc領域ポリペプチドの機能的断片は、本明細書で定義される少なくとも1つの「アミノ酸置換」を保持する。バリエーションFc領域ポリペプチドの機能的断片は、Fc領域と関連することが当該技術分野で既知である少なくとも1つの機能（例えば、ADCC、CDC、Fc受容体結合、C1q結合、細胞表面受容体の下方制御、又は例えば、それが作動可能に結合しているポリペプチドのインビボ若しくはインビトロでの半減期を増加させ得る）を保持する。

20

【0140】

〔000162〕「精製された」又は「精製する」という用語は、試料から少なくとも1つの混入物質を実質的に除去することを指す。例えば、抗原特異的抗体は、少なくとも1つの混入物質である非免疫グロブリンタンパク質の完全な又は実質的な（少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、又はより好ましくは少なくとも96%、97%、98%、又は99%）除去によって精製され得、また同じ抗原に結合しない免疫グロブリンタンパク質の除去によっても精製され得る。非免疫グロブリンタンパク質の除去及び／又は特定の抗原に結合しない免疫グロブリンの除去は、試料中の抗原特異的免疫グロブリンのパーセントの増加を生じる。別の例では、細菌宿主細胞で発現するポリペプチド（例えば、免疫グロブリン）は、宿主細胞タンパク質の完全な又は実質的な除去によって精製され、それによって、試料中のポリペプチドのパーセントが増加する。

30

【0141】

〔000163〕ポリペプチド（例えば、Fc領域）を指す「天然」という用語は、本明細書では、ポリペプチドが、自然で一般的に存在するポリペプチドのアミノ酸配列又は自然で存在するその多型からなるアミノ酸配列を有することを示すために使用する。天然ポリペプチド（例えば、天然Fc領域）は、組換え手段によって生成され得るか、又は自然源から単離され得る。

40

【0142】

〔000164〕本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、特定の宿主生物における作動可能に連結したコード配列の発現に必要な、所望のコード配列及び適切な核酸配列を含有する組換えDNA分子を指す。

【0143】

〔000165〕本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、インビトロ、又はインサイチュ、又はインビボで配置されているかに関わらず、任意の真核細胞又は原

50

核細胞（例えば、*E. coli*などの細菌細胞、CHO細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、及び昆虫細胞）を指す。

【0144】

〔000166〕本明細書で使用される場合、「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を指す。「Fc領域」は、天然配列Fc領域又はバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリン重鎖のFc領域の概して許容される境界は変動し得るが、ウシ科動物IgG重鎖Fc領域は、通常、例えば、図2の垂直線からc末端までの範囲と定義される。いくつかの実施形態では、バリエーションは、Fc領域の部分のみを含み、カルボキシ末端を含んでも含まなくてもよい。免疫グロブリンのFc領域は、概して、2つの定常ドメイン、CH2及びCH3を含む。いくつかの実施形態では、定常ドメインのうちの1つ以上を有するバリエーションが企図される。他の実施形態では、そのような定常ドメインを有しない（又はそのような定常ドメインの部分のみを有する）バリエーションが企図される。

10

【0145】

〔000167〕ウシ科動物IgG Fc領域の「CH2ドメイン」は、例えば、図2の垂直線から始まり、残基243まで延在する残基を指す。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対合しないという点で独特である。2つのN連結した分岐状炭水化物鎖が、そのままの天然IgG分子の2つのCH2ドメインの間に介在する。

【0146】

〔000168〕ウシ科動物IgG Fc領域の「CH3ドメイン」は、概して、Fc領域のC末端からCH2ドメインまでの残基、例えば、図2の244からc末端までの残基の範囲である。

20

【0147】

〔000169〕「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。エフェクター機能の例としては、限定されないが、C1q結合；補体依存性細胞傷害性（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）の下方制御などが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）に作動可能に連結されることを必要とし得、様々なアッセイ（例えば、Fc結合アッセイ、ADCCアッセイ、CDCアッセイ、ADCPアッセイ、全血試料又は分別された血液試料からの標的細胞枯渇など）を使用して評価され得る。

30

【0148】

〔000170〕「天然配列Fc領域」又は「野生型Fc領域」は、自然で一般的に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を指す。例示的な天然配列ウシ科動物Fc領域は、図2の垂直線からc末端までである。

【0149】

〔000171〕「バリエーションFc領域」は、本明細書で定義される少なくとも1つの「アミノ酸置換」が理由で、天然配列Fc領域（又はその断片）のものとは異なるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域において、1、2、3、4、又は5つのアミノ酸置換を有する。代替的な実施形態では、バリエーションFc領域は、本明細書に開示の方法に従って生成され得、このバリエーションFc領域は、抗体可変ドメイン又は非抗体ポリペプチド、例えば、受容体又はリガンドの結合ドメインなどの選択された異種ポリペプチドに融合され得る。

40

【0150】

〔000172〕本明細書で使用される場合、ポリペプチドの文脈における「誘導体」という用語は、アミノ酸残基置換の導入によって改変されているアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。本明細書で使用される場合、「誘導体」という用語はまた、ポリペプチドへの任意の種類の分子の共有結合によって修飾されているポリペプチドを指す。例えば、

50

限定されないが、抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などによって修飾され得る。誘導体ポリペプチドは、限定されないが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む、当業者に既知の技法を使用する化学的修飾によって生成され得る。更に、誘導体ポリペプチドは、それが由来していたポリペプチドと同様又は同一の機能を有する。本発明のバリエーションF c領域を含むポリペプチドは、本明細書で定義される誘導体であり得、好ましくは、誘導体化は、F c領域内で行われることが理解される。

【0151】

〔000173〕ポリペプチド（例えば、F c領域又はモノクローナル抗体）に関して本明細書で使用される場合、「実質的にウシ科動物起源の」は、ポリペプチドが、天然ウシ科動物アミノポリペプチドのものと少なくとも80%、少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、又は更により好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、若しくは99%相同であるアミノ酸配列を有することを示す。

【0152】

〔000174〕「F c受容体」又は「F c R」という用語は、F c領域（例えば、抗体のF c領域）に結合する受容体を説明するために使用される。好ましいF c Rは、天然配列F c Rである。更に、好ましいF c Rは、Ig G抗体F c領域、F c γ受容体又は「F c γ R (F c gamma receptor)」に結合し、これらの受容体の対立遺伝子バリエーション及び代替的にはスプライシングされた形態を含む、F c γ R I (F c γ R 1)、F c γ R I I (F c γ R 2)、F c γ R I I I (F c γ R 3) サブクラスの受容体、並びに新規のウシ科動物F c γ 2 R (b F c γ 2 R又はb F c γ 2 R)を含むものである。別の好ましいF c Rとしては、母体Ig Gの胎児への移行を担う新生仔受容体であるF c R nが挙げられる (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) 及びKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994))。将来同定されるものを含む他のF c Rは、本明細書で「F c R」という用語によって包含される。

【0153】

〔000175〕「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」及び「ADCC」という語句は、F c γ Rを発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、非特異的）（例えば、ナチュラルキラー（「NK」）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を指す。ヒトにおけるADCCを媒介するための一次細胞であるNK細胞は、F c γ R 3のみを発現する一方で、単球は、F c γ R 1、F c γ R 2、及びF c γ R 3を発現する。文献によれば、ウシ科動物単球及びマクロファージは、Ig G 1及びIg G 2アイソタイプについてF c γ Rを発現するが、好中球は、Ig G 2、F c γ 2 Rについて多数の受容体を発現するが、b Ig G 1についてはほとんど又は全く発現しない。

【0154】

〔000176〕「抗体依存性細胞媒介性食作用」及び「ADCP」という語句は、F c γ Rを発現する食細胞（例えば、マクロファージ、単球、樹状細胞）（例えば、F c γ R 1、F c γ R 2 a、及びF c γ R 3）が、標的細胞上に結合したIg G抗体F c領域を認識し、その後、Ig G オプソニン化された粒子（例えば、細菌、死んだ組織細胞）の貪食につながるシグナル伝達カスケードを誘発する、細胞媒介性反応を指す。

【0155】

〔000177〕本明細書で使用される場合、「エフェクター細胞」という語句は、1つ以上のF c Rを発現し、エフェクター機能を実施する（好ましくはウシ科動物の）白血球を指す。好ましくは、細胞は、少なくともF c γ R 3を発現し、ADCCエフェクター機能を実施する。ADCCを媒介する白血球の例としては、PBMC、NK細胞、単球、マクロファージ、細胞傷害性T細胞、及び好中球が挙げられる。エフェクター細胞は、天然

10

20

30

40

50

源（例えば、血液又はP B M C）から単離され得る。一例では、白血球は、F c g R 1、又は他の関連するF c γ受容体を発現し、A D C P機能を誘発する。

【0156】

〔000178〕「改変された」F c受容体結合親和性を有するバリエーションポリペプチドは、バリエーションの親ポリペプチド又は天然F cを含むポリペプチドと比較して、向上した（すなわち、増加した、より大きい、又はより高い）か、又は減少した（すなわち、低減された、減少した、又はより低い）かのいずれかのF c受容体結合親和性を有するものである。F c受容体への増加した結合又は増加した結合親和性を示すバリエーションポリペプチドは、親ポリペプチドよりも大きい親和性でF c受容体に結合する。F c受容体への減少した結合又は減少した結合親和性を示すバリエーションポリペプチドは、その親ポリペプチドよりも低い親和性でF c受容体に結合する。F c受容体への減少した結合を示すそのようなバリエーションは、F c受容体への結合をほとんど又は認識できるほど有しない、例えば、親ポリペプチドと比較して、F c受容体F c受容体への0～20%の結合を有し得る。結合アッセイにおけるバリエーションポリペプチド及び親ポリペプチドの量が本質的に同じであり、他の全ての条件が同一である場合、その親ポリペプチドと比較して「向上した親和性」でF c受容体に結合するバリエーションポリペプチドは、親ポリペプチドよりも高い結合親和性でF c受容体に結合するものである。例えば、E L I S Aアッセイ又は当業者が利用可能な他の方法において、F c受容体結合親和性が決定される場合、例えば、向上したF c受容体結合親和性を有するバリエーションポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して、F c受容体結合親和性における約1.10倍～約100倍（より典型的には、約1.2倍～約50倍）の増加を示し得る。

10

20

【0157】

〔000179〕本明細書で使用される場合、「アミノ酸置換」は、所与のアミノ酸配列における少なくとも1つの既存のアミノ酸残基を、別の異なる「置き換え」アミノ酸残基で置き換えることを指す。置き換え残基又は複数の置き換え残基は、「自然に存在するアミノ酸残基」（すなわち、遺伝子コードによってコードされる）であり得、アラニン（A l a）、アルギニン（A r g）、アスパラギン（A s n）、アスパラギン酸（A s p）、システイン（C y s）、グルタミン（G l n）、グルタミン酸（G l u）、グリシン（G l y）、ヒスチジン（H i s）、イソロイシン（I l e）：ロイシン（L e u）、リジン（L y s）、メチオニン（M e t）、フェニルアラニン（P h e）、プロリン（P r o）、セリン（S e r）、スレオニン（T h r）、トリプトファン（T r p）、チロシン（T y r）、及びバリン（V a l）から選択される。1つ以上の自然に存在しないアミノ酸残基との置換もまた、本明細書のアミノ酸置換の定義に包含される。「自然に存在しないアミノ酸残基」は、上に列挙される自然に存在するアミノ酸残基以外の残基を指し、ポリペプチド鎖内の隣接アミノ酸残基に共有結合することが可能である。自然に存在しないアミノ酸残基の例としては、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、及びE l l m a n e t a l . M e t h . E n z y m . 2 0 2 : 3 0 1 - 3 3 6 (1 9 9 1) に記載のものなどの他のアミノ酸残基類似体が挙げられる。

30

【0158】

〔000180〕「アッセイシグナル」という用語は、限定されないが、比色アッセイ、蛍光強度、又は分当たりの崩壊からの吸光度測定を含む、タンパク質-タンパク質相互作用を検出する任意の方法からの出力を指す。アッセイ形式は、E L I S A、F A C S、又は他の方法を挙げることができる。「アッセイシグナル」における変化は、細胞生存率における変化、並びに／又は動態オフレート、動態オンレート、若しくは両方における変化を反映し得る。「より高いアッセイシグナル」は、測定された出力数が別の数よりも大きいことを指す（例えば、バリエーションは、親ポリペプチドと比較して、E L I S Aアッセイにおいてより高い（より大きい）測定数を有し得る）。「より低い」アッセイシグナルは、測定された出力数が別の数よりも小さいことを指す（例えば、バリエーションは、親ポリペプチドと比較して、E L I S Aアッセイにおいてより低い（より小さい）測定数を有し得る）。

40

50

【0159】

〔000181〕「結合親和性」という用語は、各Fc受容体-Fc結合相互作用と関連する平衡解離定数（濃度の単位で表される）を指す。結合親和性は、動態オフレート（概して、時間の逆数の単位、例えば、秒⁻¹で報告される）を動態オンレート（概して、単位時間当たりの濃度の単位、例えば、モル／秒で報告される）で除算した比に直接関係する。概して、これらのパラメータの各々が（例えば、BIACORE又はSAPIDYNE測定によって）実験的に決定されない限り、平衡解離定数（K_D又はKD）における変化が、オンレート、オフレート、又は両方の差に起因するかどうかを明確に述べることは不可能である。

【0160】

〔000182〕本明細書で使用される場合、「ヒンジ領域」という用語は、Fab抗原結合領域を抗体のFc領域に連結させるアミノ酸の範囲を指す。IgGサブクラスのヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド（S-S）結合を形成する第1及び最後のシステイン残基を同じ位置に配置することによって、整列させることができる。図2に示されるように、例えば、ウシ科動物IgG定常領域におけるヒンジ領域は、残基99から始まり、垂直線まで延在する。

【0161】

〔000183〕「C1q」は、免疫グロブリンのFc領域の結合部位を含むポリペプチドである。C1qは、2つのセリンプロテアーゼであるC1r及びC1sと一緒にあって、CDC経路の第1の構成要素である複合体C1を形成する。

【0162】

〔000184〕本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、「免疫グロブリン」又は「Ig」と同義に使用され、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性又は機能的活性を呈する限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を具体的に網羅する。異なる種に由来する部分を含む、一本鎖抗体、及びキメラ、ウシ科動物、又はウシ化（bovinized）抗体、並びにキメラ又はCDRを移植された一本鎖抗体などもまた、本発明及び「抗体」という用語に包含される。これらの抗体の様々な部分は、従来の技法によって化学的に一緒に合成的に結合され得るか、又は遺伝子工学技術を使用して連続したタンパク質として調製され得る。例えば、キメラ又はウシ化鎖をコードする核酸は、連続したタンパク質を生成するように発現し得る。例えば、米国特許第4,816,567号、米国特許第4,816,397号、WO86/01533、米国特許第5,225,539号、及び米国特許第5,585,089号、及び同第5,698,762号を参照されたい。また、霊長類化抗体に関してはNewman, R. et al. BioTechnology, 10:1455-1460, 1993、並びに一本鎖抗体に関してはLadner et al., 米国特許第4,946,778号及びBird, R. E. et al., Science, 242:423-426, 1988を参照されたい。本明細書では、Fc領域（又はその一部分）を含む抗体の全ての形態が、「抗体」という用語内に包含されることが理解される。更に、抗体は、当該技術分野で既知の方法に従って、検出可能な標識で標識され、固相上に固定化され、及び／又は異種化合物（例えば、酵素又は毒素）とコンジュゲートされ得る。

【0163】

〔000185〕本明細書で使用される場合、「抗体断片」という用語は、そのままの抗体の一部分を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、線状抗体；一本鎖抗体分子；Fc又はFc'ペプチド、Fab及びFab断片、並びに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。抗体断片は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、及び任意選択的に、IgG重鎖のCH1領域を保持する。他の好ましい実施形態では、抗体断片は、CH2領域の少なくとも一部分又はCH2領域全体を含む。

【0164】

〔000186〕本明細書で使用される場合、「機能的断片」という用語は、モノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体に関して使用される場合、依然として機能的活性を保持するモノクローナル抗体の一部分を指すことが意図される。機能的活性は、例えば、抗原結合活性又は特異性、受容体結合活性又は特異性、エフェクター機能活性などであり得る。モノクローナル抗体機能的断片としては、例えば、VL、VH、及びFdなどの個々の重鎖又は軽鎖、及びそれらの断片；Fv、Fab、及びFab'などの一価断片；F(ab')₂などの二価断片；一本鎖Fv(scFv)；並びにFc断片が挙げられる。そのような用語は、例えば、Harlowe and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)、Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.)、Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993)、Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989)、及びDay, E. D., Advanced Immunochimistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. (1990)に記載されている。機能的断片という用語は、例えば、モノクローナル抗体のプロテアーゼ消化又は還元によって、及び当業者に既知の組換えDNA方法によって生成される断片を含むことが意図される。

10

【0165】

〔000187〕本明細書で使用される場合、「断片」という用語は、別のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5、15、20、25、40、50、70、90、100個以上の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。好ましい実施形態では、ポリペプチドの断片は、完全長ポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

20

【0166】

〔000188〕本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」という用語は、一価、二価、又は多価の免疫グロブリンを含む。一価キメラ抗体は、キメラ軽鎖とのジスルフィド架橋を通じて会合しているキメラ重鎖によって形成された二量体である。二価キメラ抗体は、少なくとも1つのジスルフィド架橋を通じて会合している2つの重鎖-軽鎖二量体によって形成された四量体である。ウシ科動物で使用するための抗体のキメラ重鎖は、CH1又はCH2などのウシ科動物重鎖定常領域の少なくとも一部分に連結される、非ウシ科動物抗体の重鎖に由来する抗原結合領域を含む。ウシ科動物で使用するための抗体のキメラ軽鎖は、ウシ科動物軽鎖定常領域(CL)の少なくとも一部分に連結される、非ウシ科動物抗体の軽鎖に由来する抗原結合領域を含む。同じか又は異なる可変領域結合特異性のキメラ重鎖及び軽鎖を有する抗体、断片、又は誘導体はまた、既知の方法ステップに従って、個々のポリペプチド鎖の適切な会合によって調製され得る。このアプローチを用いて、キメラ軽鎖を発現する宿主と、キメラ重鎖を発現する宿主とを別個に培養し、免疫グロブリン鎖を別個に回収し、次いで会合させる。代替的に、宿主を同時培養し、鎖を培養培地中で自発的に会合させ、続いて組み立てられた免疫グロブリン、若しくは断片を回収してもよく、又は重鎖及び軽鎖の両方を同じ宿主細胞内で発現させてもよい。キメラ抗体を生成するための方法は、当該技術分野で周知である（例えば、米国特許第6,284,471号、同第5,807,715号、同第4,816,567号、及び同第4,816,397号を参照されたい）。

30

40

【0167】

〔000189〕本明細書で使用される場合、非ウシ科動物（例えば、マウス）抗体の「ウシ化」形態（すなわち、ウシ化抗体）は、非ウシ科動物免疫グロブリンに由来する配列を最小限に含有するか又は配列を全く含有しない抗体である。ほとんどの場合、ウシ化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、ヒト、又は非ヒト霊長類などの非ウシ科動物種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置き換えられたウシ科動物免疫グロブリン（レシピエ

50

ント抗体)である。いくつかの事例では、ウシ科動物免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ウシ科動物残基によって置き換えられる。更に、ウシ化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体中に見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、概して、抗体性能を更に向上するために行われる。概して、ウシ化抗体は、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み、超可変ループ(CDR)の全て又は実質的に全てが非ウシ科動物免疫グロブリンのものに対応し、FR残基の全て又は実質的に全てがウシ科動物免疫グロブリン配列のものである。ウシ化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の、典型的にはウシ科動物免疫グロブリンのものの少なくとも一部分を含み得る。

【0168】

【000190】本明細書で使用される場合、「イムノアドヘシン」という用語は、異種の「アドヘシン」タンパク質(例えば、受容体、リガンド、又は酵素)の結合ドメインを免疫グロブリン定常ドメインと組み合わせる抗体様分子を示す。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位(抗原結合部位)以外である(すなわち、「異種」である)、所望の結合特異性を有するアドヘシンアミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。

【0169】

【000191】本明細書で使用される場合、「リガンド結合ドメイン」という用語は、対応する天然受容体の少なくとも定性的なリガンド結合能力を保持する任意の天然受容体、又はその任意の領域若しくは誘導体を指す。ある特定の実施形態では、受容体は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーに相同である細胞外ドメインを有する細胞表面ポリペプチドに由来する。免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーではないが、それにも関わらず、この定義によって具体的に網羅される他の受容体は、サイトカインの受容体であり、特に、チロシンキナーゼ活性を有する受容体(受容体チロシンキナーゼ)、ヘマトポエチン及び神経成長因子受容体スーパーファミリーのメンバー、並びに細胞接着分子(例えば、E-、L-、及びP-セ렉チン)である。

【0170】

【000192】本明細書で使用される場合、「受容体結合ドメイン」という用語は、例えば、細胞接着分子、又は対応する天然リガンドの少なくとも定性的な受容体結合能力を保持するそのような天然リガンドの任意の領域若しくは誘導体を含む、受容体の任意の天然リガンドを指す。

【0171】

【000193】本明細書で使用される場合、「単離された」ポリペプチドは、その自然環境の構成要素から同定及び分離、並びに／又は回収されているポリペプチドである。その自然環境の混入構成要素は、ポリペプチドの診断的又は治療的使用を妨げるであろう物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性又は非タンパク質性溶質を挙げることができる。ある特定の実施形態では、単離されたポリペプチドは、(1)ローリー方法によって決定して、ポリペプチドの95重量%超、好ましくは99重量%超まで、(2)回転カップシークエネータの使用によってN末端若しくは内部アミノ酸配列のうちの少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度まで、又は(3)クマシーブルー若しくは銀染色を使用する、還元又は非還元条件下でのSDS-pageによって均質性まで精製される。単離されたポリペプチドは、ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの構成要素が存在しないであろうことから、組換え細胞内のインサイチュでのポリペプチドを含む。しかしながら、通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製ステップによって調製されるであろう。

【0172】

【000194】本明細書で使用される場合、「障害」及び「疾患」という用語は、慢性及び急性障害又は疾患(例えば、患者の特定の障害の素因となる病理学的状態)を含む、バリエーションポリペプチド(本発明のバリエーションFc領域を含むポリペプチド)を用いた治療から利益を得るであろう任意の状態を指すために同義的に使用される。

10

20

30

40

50

【0173】

〔000195〕本明細書で使用される場合、「受容体」という用語は、少なくとも1つのリガンドに結合することが可能なポリペプチドを指す。好ましい受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、及び任意選択的に、他のドメイン（例えば、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン、及び／又は膜アンカー）を有する細胞表面又は可溶性受容体である。本明細書に記載のアッセイで評価される受容体は、そのままの受容体、又はその断片若しくは誘導体（例えば、1つ以上の異種ポリペプチドに融合された受容体の結合ドメインを含む融合タンパク質）であり得る。更に、その結合特性について評価される受容体は、細胞内に存在し得るか、又は単離され得、任意選択的に、アッセイプレート又はいくつかの他の固相上にコーティングされ得るか、又は直接標識され、プローブとして使用され得る。

10

【0174】

〔000196〕本明細書で使用する場合、親抗体と比較してウシ科動物エフェクター細胞の存在下で、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、及び補体依存性細胞傷害性（CDC）をノックアウト又はノックダウンするバリエーションポリペプチドは、アッセイで使用するバリエーションポリペプチド及び親抗体の量が本質的に同じである場合、インビトロ又はインビボでは、ADCC、ADCP、及び／又はCDCの媒介において実質的に活性が低いものである。例えば、そのようなバリエーションは、同一のADCCアッセイにおける親ポリペプチドよりも、所与のADCC、ADCP、又はCDCアッセイにおいて、低い、好ましくは無視できる量の標的細胞溶解又は食作用を引き起こす。そのようなバリエーションは、例えば、ADCC、ADCP、又はCDCアッセイを使用して同定されてもよいが、ADCC、ADCP、又はCDC活性を決定するための他のアッセイ又は方法もまた用いられてもよい（例えば、動物モデル）。好ましい実施形態では、バリエーションポリペプチドは、親ポリペプチドよりもADCC、ADCP、及びCDCの媒介において約100、75、50、又は25パーセント少ない活性である。

20

【0175】

ウシ科動物野生型IgG

〔000197〕ウシ科動物IgGは、当該技術分野で周知であり、例えば、Symons et al., 1989, Mol. Immunol., vol. 26 (9), pages 841-850、Kacs Kovics et al., 1996, Mol. Immunol., vol. 33 (2), pages 189-195、Saini et al., 2007, Scand. J. Immunol., vol. 65 (1), pages 32-38、及びRabbani et al., 1997, Immunogenetics, vol. 46 (4), pages 326-331に完全に記載されている。

30

【0176】

〔000198〕一実施形態では、ウシ科動物IgGは、IgG1である。別の実施形態では、ウシ科動物IgGは、IgG2である。更に別の実施形態では、ウシ科動物IgGは、IgG3である。一例では、IgG1は、IgG1a、IgG1b、IgG1c、又はIgG1dである。別の例では、IgG2は、IgG2a、又はIgG2bである。更に別の例では、IgG3は、IgG3a又はIgG3bである。

40

【0177】

〔000199〕IgG1a、IgG1b、IgG1c、IgG1d、IgG2a、IgG2b、IgG3a、及びIgG3bのアミノ酸配列及び核酸配列もまた、当該技術分野で周知である。

【0178】

〔000200〕一例では、本発明のIgGは、定常ドメイン、例えば、CH1、CH2、若しくはCH3ドメイン、又はそれらの組み合わせを含む。別の例では、本発明の定常ドメインは、例えば、CH2若しくはCH3ドメイン、又はそれらの組み合わせを含む、Fc領域を含む。

【0179】

50

〔000201〕特定の例では、野生型定常ドメインは、配列番号1～8に記載のアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。特定の実施形態では、IgG1a、IgG1b、IgG1c、IgG1d、IgG2a、IgG2b、IgG3a、及びIgG3bの野生型定常ドメインは、それぞれ、配列番号1、2、3、4、5、6、7、及び8に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、野生型IgG定常ドメインは、配列番号1～8のうちのいずれか1つの相同体、バリエーション、異性体、又は機能的断片であるが、本明細書に記載のいかなる変異も有しない。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。例えば、一実施形態では、特定の実施形態では、IgG2aの野生型定常ドメインは、配列番号9に記載のアミノ酸配列を含む。

〔0180〕

〔000202〕IgGコンタクト (contact) ドメインはまた、重鎖及び／又は軽鎖のアミノ酸配列と実質的に同様のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。実質的に同じアミノ酸配列は、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 (1988) に従ってFASTA検索方法によって決定して、比較したアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する配列として本明細書で定義される。

〔0181〕

〔000203〕本発明はまた、本明細書に記載のIgG又はそれらの一部分をコードする核酸分子を含む。一実施形態では、核酸は、例えば、CH1、CH2、CH3領域、又はそれらの組み合わせを含む抗体重鎖をコードし得る。別の実施形態では、核酸は、例えば、それらの任意のバリエーションを含む、VH領域若しくはそれらの一部分のうちのいずれか1つ、又はVH CDRのうちのいずれか1つを含む抗体重鎖をコードし得る。本発明はまた、例えば、それらの任意のバリエーションを含む、CL領域若しくはそれらの一部分のうちのいずれか1つ、VL領域若しくはそれらの一部分のうちのいずれか1つ、又はVL CDRのうちのいずれか1つを含む抗体軽鎖をコードする核酸分子を含む。ある特定の実施形態では、核酸は、重鎖及び軽鎖、又はそれらの部分の両方をコードする。

〔0182〕

〔000204〕配列番号1、2、3、4、5、6、7、8及び9に記載の野生型定常ドメインのアミノ酸配列は、その対応する核酸配列によってコードされる。

〔0183〕

修飾されたウシ科動物IgG

〔000205〕本出願の発明者らは、驚くべきことに、そして予想外にも、216位、234位、235位、237位、270位、329位、330位、331位、432位、434位、437位、又は433位のアミノ酸残基を別のアミノ酸で置換することが、所望効果を示したことを見出した。本明細書で使用される場合、位置という用語は、Kabatt (Kabatt et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) におけるEUインデックスに従って付番された位置を指す。一実施形態では、所望の効果は、野生型ウシ科動物IgG定常ドメインを有するIgGと比較して、補体依存性細胞傷害性を排除又は低減することである。別の実施形態では、所望の効果は、野生型ウシ科動物IgG定常ドメインを有するIgGと比較して、抗体依存性細胞食作用を排除又は低減することである。更に別の実施形態では、所望の効果は、IgGのFcγ受容体 (bFcγR) への結合を排除又は低減することである。

〔0184〕

〔000206〕一実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG定常ドメインを含む、修飾されたIgGであって、置換が、KabattにおけるEUインデックスに従って付番さ

10

20

30

40

50

れたアミノ酸残基 216、234、235、237、270、329、330、331、432、434、437、又は433にある、修飾されたIgGを提供する。これらの位置のアミノ酸は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。置換アミノ酸の例としては、例えば、限定されないが、アスパラギン、ヒスチジン、セリン、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、グルタミン、アルギニン、スレオニン、バリン、トリプトファン、チロシン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、及びプロリンが挙げられる。いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、非天然アミノ酸である。

【0185】

〔000207〕本発明の修飾されたウシ科動物IgGは、当業者に既知の任意の好適なウシ科動物IgGであり得る。修飾されたウシ科動物IgGの例としては、IgG1（例えば、IgG1a、IgG1b、IgG1c、又はIgG1d）、IgG2（例えば、IgG2a又はIgG2b）、又はIgG3（IgG3a又はIgG3b）の修飾されたバリエーションが挙げられる。

【0186】

IgG1

〔000208〕例示的な一実施形態では、修飾されたウシ科動物IgGは、例えば、修飾されたIgG1a、修飾されたIgG1b、修飾されたIgG1c、又は修飾されたIgG1dを含む、修飾されたウシ科動物IgG1である。

【0187】

〔000209〕一実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG1定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG1定常ドメインを含む、修飾されたIgG1であって、置換が、アミノ酸残基329、330、331、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、KababtにおけるEuインデックスに従って付番される、修飾されたIgG1を提供する。329位、330位、又は331位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、セリンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、329位でのプロリンのセリンとの置換（P329S）、330位でのアラニンのセリンとの置換（A330S）、又は331位でのプロリンのセリンとの置換（P331S）である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物IgG1定常ドメインは、置換P329S、A330S、及びP331Sのうちの1つ以上を含む。

【0188】

〔000210〕一態様では、修飾されたウシ科動物IgG1定常ドメインは、PAPからSAPへの変異、PAPからSASへの変異、SS変異、Winter部位変異、又はそれらの組み合わせを含む。PAPからSAPへの変異には、329位でのプロリンのセリンとの置換（P329S）が含まれる。SS変異には、330位でのアラニンのセリンとの置換（A330S）、及び331位でのプロリンのセリンとの置換（P331S）が含まれる。

【0189】

〔000211〕Winter部位は、アミノ酸残基234、235、237、又はそれらの組み合わせでの置換を含んでもよい。したがって、別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG1定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG1定常ドメインを含む、修飾されたIgG1であって、置換が、アミノ酸残基234、235、若しくは237、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、KababtにおけるEuインデックスに従って付番される、修飾されたIgG1を提供する。234位、235位、又は237位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、アラニンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、234位でのプロリンのアラニンとの置換（P234A）、235位でのロイシンのアラニンとの置換（L235A）、又は235位でのグリシンのアラニンとの置換（G237A）である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物IgG

1 定常ドメインは、置換 P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0190】

〔000212〕例示的な実施形態では、ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0191】

〔000213〕一態様では、修飾されたウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、D P 部位のアミノ酸残基において置換を含む。したがって、別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインを含む、修飾された I g G 1 であって、置換が、アミノ酸残基 2 1 6、2 7 0、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 1 を提供する。2 1 6 位又は 2 7 0 位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、グルタミン酸との置換である。具体的には、一例では、置換は、2 1 6 位でのアスパラギン酸のグルタミン酸 (D 2 1 6 E) との置換又は 2 7 0 位でのアスパラギン酸のグルタミン酸との置換 (D 2 7 0 E) である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、置換 D 2 1 6 E 及び D 2 7 0 E のうちの 1 つ以上を含む。

10

【0192】

〔000214〕例示的な実施形態では、ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、D 2 1 6 E、及び D 2 7 0 E のうちの 1 つ以上を含む。

20

【0193】

〔000215〕別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインを含む、修飾された I g G 1 であって、当該置換が、アミノ酸残基 4 3 2、4 3 4、4 3 7、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 1 を提供する。4 3 2 位、4 3 4 位、又は 4 3 7 位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、アラニンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、4 3 2 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 4 3 2 A)、4 3 4 位でのアスパラギンのアラニンとの置換 (N 4 3 4 A)、4 3 7 位でのスレオニンのアラニンとの置換 (T 4 3 7 A) である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、置換 L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び T 4 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む。

30

【0194】

〔000216〕別の例示的な実施形態では、ウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、置換 P 3 2 9 S、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、P 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、D 2 1 6 E、D 2 7 0 E、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及び T 4 3 7 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0195】

I g G 2

40

〔000217〕別の例示的な実施形態では、修飾されたウシ科動物 I g G は、例えば、修飾された I g G 2 a 又は修飾された I g G 2 b を含む、修飾されたウシ科動物 I g G 2 である。修飾されたウシ科動物 I g G 2 は、3 3 0 位でのアラニンのセリンとの置換 (A 3 3 0 S)、及び 3 3 1 位でのプロリンのセリンとの置換 (P 3 3 1 S) を含む、S S 変異を含み得る。一実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物 I g G 2 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 2 定常ドメインを含む、修飾された I g G 2 であって、置換が、アミノ酸残基 3 3 0、3 3 1、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 2 を提供する。3 3 0 位又は 3 3 1 位のアミノ酸残基は、任意

50

の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、セリンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、330位でのアラニンのセリンとの置換（A330S）、又は331位でのプロリンのセリンとの置換（P331S）である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物IgG2定常ドメインは、置換A330S及びP331Sのうちの1つ以上を含む。

【0196】

【000218】別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG2定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG2定常ドメインを含む、修飾されたIgG2であって、置換が、アミノ酸残基432、434、437、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、KababにおけるEuインデックスに従って付番される、修飾されたIgG2を提供する。432位、434位、又は437位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、アラニンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、432位でのロイシンのアラニンとの置換（L432A）、434位でのアスパラギンのアラニンとの置換（N434A）、又は437位でのメチオニンのアラニンとの置換（M437A）である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物IgG2定常ドメインは、置換L432A、N434A、及びM437Aのうちの1つ以上を含む。

10

【0197】

【000219】別の例示的な実施形態では、ウシ科動物IgG2定常ドメインは、置換A330S、L432A、N434A、及びM437Aのうちの1つ以上を含む。

20

【0198】

IgG3

【000220】別の例示的な実施形態では、修飾されたウシ科動物IgGは、例えば、修飾されたIgG3a又は修飾されたIgG3bを含む、修飾されたウシ科動物IgG3である。

【0199】

【000221】一実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG3定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG3定常ドメインを含む、修飾されたIgG3であって、置換が、アミノ酸残基329、330、331、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、KababにおけるEuインデックスに従って付番される、修飾されたIgG3を提供する。329位、330位、又は331位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、セリンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、329位でのプロリンのセリンとの置換（P329S）、330位でのアラニンのセリンとの置換（A330S）、又は331位でのプロリンのセリンとの置換（P331S）である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物IgG3定常ドメインは、置換P329S、A330S、及びP331Sのうちの1つ以上を含む。

30

【0200】

【000222】一態様では、修飾されたウシ科動物IgG3定常ドメインは、PAPからSAPへの変異、PAPからSASへの変異、SS変異、Winter部位変異、又はそれらの組み合わせを含む。上述のように、PAPからSAPへの変異は、329位でのプロリンのセリンとの置換（P329S）を含み、PAPからSASへの変異は、331位でのプロリンのセリンとの置換（P331S）を含み、SS変異は、331位でのプロリンのセリンとの置換（P331S）との組み合わせで、330位でのアラニンのセリンとの置換（A330S）を含む。

40

【0201】

【000223】上記のように、Winter部位は、アミノ酸残基234、235、237、又はそれらの組み合わせでの置換を含み得る。したがって、別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物IgG3定常ドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物IgG3定常ドメインを含む、修飾されたIgG3であって、当該

50

置換が、アミノ酸残基 234、235、若しくは 237、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 3 を提供する。234 位、235 位、又は 237 位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、アラニンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、234 位でのプロリンのアラニンとの置換 (P 234 A)、235 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 235 A)、又は 235 位でのグリシンのアラニンとの置換 (G 237 A) である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物 I g G 3 定常ドメインは、置換 P 234 A、L 235 A、及び G 237 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0202】

【000224】例示的な実施形態では、ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインは、置換 P 329 S、A 330 S、P 331 S、P 234 A、L 235 A、及び G 237 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0203】

【000225】一態様では、修飾されたウシ科動物 I g G 3 定常ドメインは、D P 部位のアミノ酸残基において置換を含む。したがって、別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインを含む、修飾された I g G 3 であって、置換が、アミノ酸残基 270 にあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 3 を提供する。270 位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、グルタミン酸との置換である。具体的には、一例では、置換は、270 位でのアスパラギン酸位のアスパラギン酸のグルタミン酸との置換 (D 270 E) である。

【0204】

【000226】例示的な実施形態では、ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインは、置換 P 329 S、A 330 S、P 331 S、P 234 A、L 235 A、G 237 A、及び D 270 E のうちの 1 つ以上を含む。

【0205】

【000227】別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインを含む、修飾された I g G 3 であって、置換が、アミノ酸残基 432、434、437、又はそれらの組み合わせにあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 3 を提供する。432 位、434 位、又は 437 位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、アラニンとの置換である。具体的には、一例では、置換は、432 位でのロイシンのアラニンとの置換 (L 432 A)、434 位でのアスパラギンのアラニンとの置換 (N 434 A)、又は 437 位でのリジンのアラニンとの置換 (K 437 A) である。いくつかの実施形態では、修飾されたウシ科動物 I g G 1 定常ドメインは、置換 L 432 A、N 434 A、及び K 437 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0206】

【000228】別の例示的な実施形態では、ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインは、置換 P 329 S、A 330 S、P 331 S、P 234 A、L 235 A、G 237 A、D 270 E、L 432 A、N 434 A、及び K 437 A のうちの 1 つ以上を含む。

【0207】

【000229】したがって、更に別の実施形態では、本発明は、野生型ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ウシ科動物 I g G 3 定常ドメインを含む、修飾された I g G 3 であって、当該置換が、アミノ酸残基 433 にあり、アミノ酸残基位置が、K a b a t における E u インデックスに従って付番される、修飾された I g G 3 を提供する。433 位のアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸で置換され得る。特定の実施形態では、置換は、ヒスチジンとの置換である。具体的には、一実

10

20

30

40

50

施形態では、置換は、４３３位でのアスパラギンのヒスチジンとの置換（Ｒ４３３Ｈ）である。

【０２０８】

〔０００２３０〕更に別の例示的な実施形態では、ウシ科動物ＩｇＧ３定常ドメインは、置換Ｐ３２９Ｓ、Ａ３３０Ｓ、Ｐ３３１Ｓ、Ｐ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、Ｄ２７０Ｅ、Ｌ４３２Ａ、Ｎ４３４Ａ、Ｋ４３７Ａ、及びＲ４３３Ｈのうちの１つ以上を含む。

【０２０９】

〔０００２３１〕特定の例では、本発明の変異型ＩｇＧ１定常ドメインは、配列番号１０～１２及び１４～１８に記載のアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、変異型ＩｇＧ１定常ドメインは、配列番号１０～１２及び１４～１８のうちのいずれか１つの相同体、バリエーション、異性体、又は機能的断片であるが、本明細書に記載の本発明の変異を有する。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【０２１０】

〔０００２３２〕別の例では、本発明の変異型ＩｇＧ２定常ドメインは、配列番号１９～２５に記載のアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、変異型ＩｇＧ２定常ドメインは、配列番号１９～２５のうちのいずれか１つの相同体、バリエーション、異性体、又は機能的断片であるが、本明細書に記載の本発明の変異を有する。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【０２１１】

〔０００２３３〕特定の例では、本発明の変異型ＩｇＧ３定常ドメインは、配列番号２７～３１に記載のアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、変異型ＩｇＧ３定常ドメインは、配列番号２７～３１のうちのいずれか１つの相同体、バリエーション、異性体、又は機能的断片であるが、本明細書に記載の本発明の変異を有する。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【０２１２】

〔０００２３４〕配列番号１０～１２、１４～２５、及び２７～３１に記載の変異型定常ドメインのアミノ酸配列は、その対応する変異型核酸配列によってコードされる。

【０２１３】

本発明の抗体分子を作製するための方法

〔０００２３５〕抗体分子を作製するための方法は、当該技術分野で周知であり、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第８，３９４，９２５号、同第８，０８８，３７６号、同第８，５４６，５４３号、同第１０，３３６，８１８号、及び同第９，８０３，０２３号、並びに米国特許出願公開第２００６／００６７９３０号に完全に記載されている。当業者に既知の任意の好適な方法、プロセス、又は技法を使用することができる。本発明のバリエーションＦｃ領域を有する抗体分子は、当該技術分野で周知の方法に従って生成され得る。いくつかの実施形態では、バリエーションＦｃ領域は、受容体又はリガンドの抗体可変ドメイン又は結合ドメインなどの選択された異種ポリペプチドに融合され得る。

【０２１４】

〔０００２３６〕分子生物学の方法及び組換え技術の出現によって、当業者は、組換え手段によって抗体及び抗体様分子を生成し、それによって抗体のポリペプチド構造に見出される特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を生成することができる。そのような抗体は、当該抗体のポリペプチド鎖をコードする遺伝子配列をクローニングするか、又は当該ポリペプチド鎖を直接合成し、合成された鎖を組み立てて、特定のエピトープ及び抗原決定基に対する親和性を有する活性四量体（Ｈ２Ｌ２）構造を形成することのいずれかによって生成され得る。これによって、異なる種及び供給源からの抗体を中和することを特徴とする配列を有する抗体の即時生成が可能になった。

【０２１５】

〔０００２３７〕抗体の供給源、又はインビトロ若しくはインビボで、研究室サイズ若し

10

20

30

40

50

くは市販のサイズの大細胞培養物であるトランスジェニック動物を使用して、トランスジェニック植物を使用して、又はプロセスのいずれの段階でも生体を用いない直接化学的合成によって、それらがどのように組換え構築されたか、又はどのように合成されたかに関わらず、全ての抗体は、全体的に同様の三次元構造を有する。この構造は、多くの場合、H2L2として提供され、抗体が、一般的に、2つの軽鎖（L）アミノ酸及び2つの重鎖（H）アミノ酸を含むという事実を指す。両方の鎖は、構造的に相補的な抗原標的と相互作用することが可能な領域を有する。標的と相互作用する領域は、「可変」又は「V」領域と称され、アミノ酸配列における、異なる抗原特異性の抗体との違いを特徴とする。H又はL鎖のいずれかの可変領域は、抗原標的に特異的に結合することが可能なアミノ酸配列を含有する。

10

【0216】

【000238】本明細書で使用される場合、「抗原結合領域」という用語は、抗原と相互作用し、抗原に対するその特異性及び親和性を抗体に付与するアミノ酸残基を含有する、抗体分子の一部分を指す。抗体結合領域は、抗原結合残基の適切な立体構造を維持するために必要な「フレームワーク」アミノ酸残基を含む。抗原結合領域を提供するH又はL鎖の可変領域内には、異なる特異性の抗体間の極端な可変性の理由である、「超可変」と称されるより小さい配列が存在する。そのような超可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR領域」とも称される。これらのCDR領域は、特定の抗原決定基構造に対する抗体の基本的な特異性を担う。

【0217】

20

【000239】CDRは、可変領域内のアミノ酸の非連続的な範囲を表すが、種に関わらず、可変重鎖及び軽鎖領域内のこれらの重要なアミノ酸配列が配置される位置は、可変鎖のアミノ酸配列内の同様の位置を有することが見出されている。全ての抗体の可変重鎖及び軽鎖は、各々3つのCDR領域を有し、各々が他と非連続である。全ての哺乳類種において、抗体ペプチドは、定常（すなわち、高度に保存された）領域及び可変領域を含有し、後者の中には、CDRと、重鎖又は軽鎖の可変領域内であるが、CDRの外側にある、アミノ酸配列で構成されるいわゆる「フレームワーク領域」とが存在する。

【0218】

【000240】本発明は、上述の核酸のうちの少なくとも1つを含むベクターを更に提供する。遺伝子コードは劣化するので、特定のアミノ酸をコードするために2つ以上のコドンが使用され得る。遺伝コードを使用して、1つ以上の異なるヌクレオチド配列が同定され得、これらの各々が、アミノ酸をコードすることが可能であろう。特定のオリゴヌクレオチドが実際に実際のコード配列を構成するであろう確率は、抗体又は部分を発現する真核細胞又は原核細胞における、異常な塩基対合関係、及び特定のコドンが（特定のアミノ酸をコードするために）実際に使用される頻度を考慮することによって推定することができる。そのような「コドン使用規則」は、L a t h e , e t a l . , 183 J. M o l e c . B i o l . 1-12 (1985) によって開示されている。L a t h e の「コドン使用規則」を使用して、ウシ科動物 I g G 配列をコードすることが可能な理論的な「最も可能性の高い」ヌクレオチド配列を含有する、単一ヌクレオチド配列又はヌクレオチド配列のセットを同定することができる。また、本発明で使用するための抗体コード領域は、本明細書に記載の抗体及びペプチドのバリエーションを生じる標準的な分子生物学的技法を使用して、既存の抗体遺伝子を改変することによっても提供され得ることが意図される。そのようなバリエーションとしては、限定されないが、抗体又はペプチドのアミノ酸配列における欠失、付加、及び置換が挙げられる。

30

40

【0219】

【000241】例えば、置換の1つの部類は、保存的アミノ酸置換である。そのような置換は、ウシ科動物抗体ペプチド中の所与のアミノ酸を、同様の特性を有する別のアミノ酸によって置換するものである。保存的置換として典型的に見られるのは、脂肪族アミノ酸 A l a , V a l , L e u , 及び l i e の間の互いの置き換え；ヒドロキシル残基 S e r 及び T h r の交換、酸性残基 A s p 及び G l u の交換、アミド残基 A s n 及び G i n の間

50

の置換、塩基性残基 L y s 及び A r g の交換、芳香族残基 P h e、T y r の間の置き換えなどである。どのアミノ酸変化が表現型的にサイレントである可能性が高いかに関するガイドランスは、B o w i e e t a l . , 2 4 7 S c i e n c e 1 3 0 6 - 1 0 (1 9 9 0) に見出される。

【0220】

〔000242〕バリエーション動物抗体又はペプチドは、完全に機能し得るか、又は1つ以上の活性において機能を欠き得る。完全に機能的なバリエーションは、典型的には、保存的変異、又は重要ではない残基若しくは重要ではない領域における変異のみを含有する。機能的バリエーションはまた、機能を変化させないか、又はわずかに変化させる同様のアミノ酸の置換も含有し得る。代替的に、そのような置換は、ある程度まで正又は負の影響を及ぼし得る。非機能的バリエーションは、典型的には、1つ以上の非保存的アミノ酸置換、欠失、挿入、逆位、若しくは切断、又は重要な残基又は重要な領域における置換、挿入、逆位、若しくは欠失を含有する。

10

【0221】

〔000243〕機能に不可欠なアミノ酸は、部位指向性変異誘発又はアラニンスキャニング変異誘発などの当該技術分野で既知の方法によって同定することができる。C u n n i n g h a m e t a l . , 2 4 4 S c i e n c e 1 0 8 1 - 8 5 (1 9 8 9) 。後者の手順は、分子中の全ての残基に単一のアラニン変異を導入する。次いで、生じた変異型分子を、エピトープ結合又はインビトロADCC活性などの生物学的活性について試験する。リガンド-受容体結合に重要な部位はまた、エピトープマッピング（例えば、H D X）、結晶学、核磁気共鳴、又は光親和性標識などの構造分析によって決定することができる。S m i t h e t a l . , 2 2 4 J . M o l . B i o l . 8 9 9 - 9 0 4 (1 9 9 2)、d e V o s e t a l . , 2 5 5 S c i e n c e 3 0 6 - 1 2 (1 9 9 2) 。

20

【0222】

〔000244〕更に、ポリペプチドは、多くの場合、20の「天然に存在する」アミノ酸以外のアミノ酸を含有する。更に、末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸は、プロセッシング及び他の翻訳後修飾などの天然プロセスによって、又は当該技術分野で周知の化学修飾技術によって修飾され得る。既知の修飾としては、限定されないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのタンパク質に対するアミノ酸のトランスファー-RNA媒介性付加、及びユビキチン化が挙げられる。かかる修飾は、当業者に周知であり、科学文献に詳細に記載されている。いくつかの特に一般的な修飾、グリコシル化、脂質付着、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマカルボキシル化、ヒドロキシル化、及びADPリボシル化は、例えば、P r o t e i n s - S t r u c t u r e a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s (2 n d e d . , T . E . C r e i g h t o n , W . H . F r e e m a n & C o . , N . Y . , 1 9 9 3) などの最も基本的な教本に記載されている。この主題について、W o l d , P o s t t r a n s l a t i o n a l C o v a l e n t M o d i f i c a t i o n o f p r o t e i n s , 1 - 1 2 (J o h n s o n , e d . , A c a d e m i c P r e s s , N . Y . , 1 9 8 3)、S e i f t e r e t a l . 1 8 2 M e t h . E n z y m o l . 6 2 6 - 4 6 (1 9 9 0)、及びR a t t a n e t a l . 6 6 3 A n n . N Y A c a d . S c i . 4 8 - 6 2 (1 9 9 2) などによる多くの詳細なレビューが入手可能である。

30

40

【0223】

〔000245〕別の態様では、本発明は、抗体誘導体を提供する。抗体の「誘導体」は

50

、通常、タンパク質の一部ではない追加の化学的部分を含有する。タンパク質の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾は、抗体の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖又は末端残基と反応可能である有機誘導体化剤と反応させることによって、分子に導入され得る。例えば、当該技術分野で周知の二官能性薬剤を用いる誘導体化は、抗体又は断片を水不溶性支持体マトリックス又は他の巨大分子担体に架橋するのに有用である。

【0224】

〔000246〕誘導体はまた、標識される放射標識されたモノクローナル抗体を含む。例えば、放射性ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{131}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、インジウム、トリチウム（ ^3H ）など；ビオチン又はアビジンを含むモノクローナル抗体と、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペクターD-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボン酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、又はグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素とのコンジュゲート；及びまたモノクローナル抗体と、生物発光剤（ルシフェラーゼなど）、化学発光剤（アクリジンエステルなど）、又は蛍光剤（フィコビルタンパク質など）とのコンジュゲートが用いられる。

10

【0225】

〔000247〕本発明の別の誘導体二官能性抗体は、2つの異なる抗原基を認識する2つの別個の抗体の部分の組み合わせることによって生成される、二重特異性抗体である。これは、架橋又は組換え技法によって達成され得る。加えて、部分を、抗体又はその一部分に添加して、（例えば、血流からのクリアランスまでの時間を延長することによってインビボでの半減期を増加させることができる。そのような技法としては、例えば、PEG部分を付加すること（ペグ化とも称される）が挙げられ、当該技術分野で周知である。米国特許出願公開第2003/0031671号を参照されたい。

20

【0226】

〔000248〕いくつかの実施形態では、主題の抗体をコードする核酸は、宿主細胞に直接導入され、細胞は、コードされた抗体の発現を誘導するのに十分な条件下でインキュベートされる。主題の核酸が細胞に導入された後、細胞は、典型的には、抗体の発現を可能にするために、通常、 37°C で、時には選択下で、約1～24時間の期間の間インキュベートされる。一実施形態では、抗体は、細胞が成長している培地の上清に分泌される。従来的には、モノクローナル抗体は、マウスハイブリドーマ株において天然分子として生成されている。その技術に加えて、本発明は、抗体の組換えDNA発現を提供する。これによって、選択された宿主種における抗体の生成、並びに抗体誘導体及び融合タンパク質のスペクトルの生成が可能になる。

30

【0227】

〔000249〕本発明の少なくとも1つの抗体、部分、又はポリペプチドをコードする核酸配列は、ライゲーションのための平滑末端又は突出末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、粘着末端の適切な充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、及び適切なライガーゼによるライゲーションを含む従来の技法に従って、ベクターDNAと組換えられ得る。そのような操作のための技法は、例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 and 1989)、及びAusubel et al. 1993（上記）によって開示されており、これらを使用して、抗体分子又はその抗原結合領域をコードする核酸配列を構築することができる。

40

【0228】

〔000250〕DNAなどの核酸分子は、転写及び翻訳調節情報を含むヌクレオチド配列を含有し、そのような配列が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「作動可能に連結されている」場合、ポリペプチドを「発現することが可能である」と言われる。操作可能な連結は、調節DNA配列と、発現させようとするDNA配列とが、回収可

50

能な量でペプチド又は抗体部分としての遺伝子発現を可能にするような方式で接続される連結である。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、類似の技術において周知であるように、生物によって変動し得る。例えば、Sambrook et al., 2001 (上記)、Ausubel et al., 1993 (上記)を参照されたい。

【0229】

【000251】したがって、本発明は、原核細胞又は真核細胞のいずれかにおける抗体又はペプチドの発現を包含する。好適な宿主としては、インビボ若しくはインサイチュでの、又は哺乳類、昆虫、鳥類、若しくは酵母起源の宿主細胞のいずれかにおける細菌、酵母、昆虫、真菌、鳥類、及び哺乳類細胞を含む、細菌又は真核生物宿主が挙げられる。哺乳類細胞又は組織は、ヒト、霊長類、ハムスター、ウサギ、げっ歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌ、又はネコ起源のものであり得る。また、当該技術分野で既知の任意の他の好適な哺乳類細胞を使用してもよい。

10

【0230】

【000252】一実施形態では、本発明のヌクレオチド配列は、レシピエント宿主における自律複製が可能なプラスミド又はウイルスベクターに組み込まれるであろう。多種多様なベクターのうちのいずれかが、この目的のために用いられ得る。例えば、Ausubel et al., 1993 (上記)を参照されたい。特定のプラスミド又はウイルスベクターの選択に重要な要因としては、ベクターを含有するレシピエント細胞が認識され、ベクターを含有しないレシピエント細胞から選択されることができる容易さ；特定の宿主において望ましいベクターのコピーの数；及び異なる種の宿主細胞間でベクターを「シャトル」することが可能であることが望ましいかどうか、が挙げられる。

20

【0231】

【000253】当該技術分野で既知の原核生物ベクターの例としては、E. coli内で複製可能なもの（例えば、pBR322、CoIE1、pSC101、pACYC184、. p. i. v Xなど）などのプラスミドが挙げられる。そのようなプラスミドは、例えば、Maniatis et al., 1989 (上記)、Ausubel et al., 1993 (上記)によって開示されている。Bacillusプラスミドとしては、pC194、pC221、pT127などが挙げられる。そのようなプラスミドは、Gryczanによる、THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329 (Academic Press, NY, 1982)に開示されている。好適なStreptomycesプラスミドとしては、p1J101 (Kendall et al., 1969 J. Bacteriol. 4177-83 (1987)、及びpHLC31 (Chater et al., SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54 (Akademiai Kiado, Budapest, Hungary 1986)などのStreptomycesバクテリオファージが挙げられる。Pseudomonasプラスミドは、John et al., 8 Rev. Infect. Dis. 693-704 (1986)、Izaki, 33 Jpn. J. Bacteriol. 729-42 (1978)、及びAusubel et al., 1993 (上記)でレビューされている。

30

【0232】

【000254】代替的に、cDNAをコードする抗体又はペプチドの発現に有用な遺伝子発現要素としては、限定されないが、(a) SV40初期プロモーター (Okayama et al., 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)、Rous肉腫ウイルスLTR (Gorman et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 6777 (1982)、及びMoloneyマウス白血病ウイルスLTR (Grosschedl et al., 41 Cell 885 (1985)などのウイルス転写プロモーター及びそのエンハンサー要素、(b) SV40後期領域に由来するもの (Okayama et al., 1983)などのスプライス領域及びポリアデニル化部位、並びに(c) SV40 (Okayama et al., 1983)などのポリアデニル化部位が挙げられる。

40

50

【0233】

〔000255〕免疫グロブリンcDNA遺伝子は、SV40初期プロモーター及びそのエンハンサー、マウス免疫グロブリンH鎖プロモーターエンハンサー、SV40後期領域mRNAスプライシング、ウサギS-グロビン介入配列、免疫グロブリン、及びウサギS-グロビンポリアデニル化部位、及びSV40ポリアデニル化要素を発現要素として使用して、Weidle et al., 51 Gene 21 (1987) によって記載されるように発現され得る。cDNA部分、ゲノムDNA部分(Whittle et al., 1 Protein Engin. 499 (1987))で構成されている免疫グロブリン遺伝子では、転写プロモーターは、ヒトサイトメガロウイルスであり得、プロモーターエンハンサーは、サイトメガロウイルス及びマウス/ヒト免疫グロブリンであり得、mRNAスプライシング及びポリアデニル化領域は、天然染色体免疫グロブリン配列であり得る。

10

【0234】

〔000256〕一実施形態では、げっ歯類細胞におけるcDNA遺伝子の発現では、転写プロモーターは、ウイルスLTR配列であり、転写プロモーターエンハンサーは、マウス免疫グロブリン重鎖エンハンサー及びウイルスLTRエンハンサーのいずれか又は両方であり、スプライス領域は、31bp超のイントロンを含有し、ポリアデニル化及び転写終結領域は、合成される免疫グロブリン鎖に対応する天然染色体配列に由来する。他の実施形態では、他のタンパク質をコードするcDNA配列を、上に列挙された発現要素と組み合わせて、哺乳類細胞におけるタンパク質の発現を達成する。

20

【0235】

〔000257〕各融合遺伝子は、発現ベクターに組み立てられるか、又は発現ベクター内に挿入され得る。次いで、免疫グロブリン鎖遺伝子生成物を発現することが可能なレシピエント細胞は、ペプチド若しくはH若しくはL鎖コード遺伝子で単一でトランスフェクトされるか、又はH及びL鎖遺伝子と同時トランスフェクトされる。トランスフェクトされたレシピエント細胞は、組み込まれた遺伝子の発現を可能にする条件下で培養され、発現した免疫グロブリン鎖又はそのままの抗体又は断片が培養物から回収される。

【0236】

〔000258〕一実施形態では、ペプチド若しくはH及びL鎖、又はそれらの部分をコードする融合遺伝子は、次いで、レシピエント細胞を同時トランスフェクションするために使用される別個の発現ベクターに組み立てられる。代替的に、H鎖及びL鎖をコードする融合遺伝子は、同じ発現ベクター上に組み立てられ得る。発現ベクターのトランスフェクション及び抗体の生成のためのレシピエント細胞株は、骨髄腫細胞であり得る。骨髄腫細胞は、トランスフェクトされた免疫グロブリン遺伝子によってコードされる免疫グロブリンを合成、組み立て、分泌することができ、免疫グロブリンのグリコシル化の機序を有する。骨髄腫細胞は、培養物中又は分泌された免疫グロブリンが、腹水から得られ得るマウスの腹腔内で増殖され得る。他の好適なレシピエント細胞としては、ウシ科動物若しくは非ウシ科動物起源のBリンパ球などのリンパ球細胞、ウシ科動物若しくは非ウシ科動物起源のハイブリドーマ細胞、又は種間ヘテロハイブリドーマ細胞が挙げられる。

30

【0237】

〔000259〕本発明の抗体構築物又はポリペプチドを担持する発現ベクターは、形質転換、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、及びジエチルアミノエチル(DEAE)デキストランなどのポリカチオンとの適用としてのそのような生化学的手段、並びに電気穿孔、直接マイクロ注入、及びマイクロプロジェクトール bombardment)としてのそのような機械的手段を含む、多様な好適な手段のうちのいずれかによって、適切な宿主細胞に導入され得る。Johnston et al., 240 Science 1538 (1988)。

40

【0238】

〔000260〕酵母は、免疫グロブリンH及びL鎖の生成では、細菌を上回る実質的な

50

利点を提供し得る。酵母は、グリコシル化を含む翻訳後ペプチド修飾を実行する。酵母における所望のタンパク質の生成に使用することができる強力なプロモーター配列及び高コピー数プラスミドを利用する、いくつかの組換えDNA戦略が現在存在する。酵母は、クローニングされた哺乳類遺伝子生成物のリーダー配列を認識し、リーダー配列を担持するペプチド（すなわち、前ペプチド）を分泌する。Hitzman et al., 11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpellier, France, 1982)。

【0239】

〔000261〕酵母遺伝子発現系は、ペプチド、抗体、断片、及びそれらの領域の生成、分泌、及び安定性のレベルについて、定例通り評価することができる。グルコースを豊富に含む培地で酵母を増殖させる場合に大量に生成される解糖酵素をコードする能動発現遺伝子からのプロモーター及び終結要素を組み込んだ一連の酵母遺伝子発現系のうちのいずれかが、利用され得る。既知の解糖遺伝子はまた、非常に効率的な転写制御シグナルを提供し得る。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）遺伝子のプロモーター及びターミネーターシグナルが、利用され得る。酵母におけるクローニングされた免疫グロブリンcDNAの発現に最適な発現プラスミドを評価するための、いくつかのアプローチが選択され得る。Vol. II DNA Cloning, 45-66, (Glover, ed.,) IRL Press, Oxford, UK 1985)を参照されたい。

【0240】

〔000262〕細菌株はまた、本発明によって記載される抗体分子又はペプチドの生成のための宿主として利用され得る。宿主細胞と適合する種に由来するレプリコン及び対照配列を含有するプラスミドベクターが、これらの細菌宿主に関連して使用される。ベクターは、複製部位、並びに形質転換細胞において表現型選択を提供することが可能である特定の遺伝子を担持する。細菌におけるクローニングされた免疫グロブリンcDNAによってコードされる抗体、断片、及び領域、又は抗体鎖の生成のための発現プラスミドを評価するための、いくつかのアプローチが選択され得る (Glover, 1985 (上記)、Ausubel, 1993 (上記)、Sambrook, 2001 (上記)、Colligan et al., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, NY, N. Y. (1994-2001)、Colligan et al., eds. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N. Y. (1997-2001)を参照されたい。

【0241】

〔000263〕宿主哺乳類細胞は、インビトロ又はインビボで増殖され得る。哺乳類細胞は、リーダーペプチド除去、ハンドL鎖の折り畳み及び組み立て、抗体分子のグリコシル化、並びに機能的抗体タンパク質の分泌を含む、免疫グロブリンタンパク質分子への翻訳後修飾を提供する。抗体タンパク質の生成の宿主として有用であり得る哺乳類細胞としては、上記のリンパ系起源の細胞に加えて、Vero (ATCC CRL 81) 又はCHO-K1 (ATCC CRL 61) 細胞などの線維芽細胞起源の細胞が挙げられる。多くのベクター系は、哺乳類細胞におけるクローニングされたペプチドハンドL鎖遺伝子の発現に利用可能である (Glover, 1985 (上記)を参照されたい)。完全なH2L2抗体を得るために、異なるアプローチに従ってもよい。同じ細胞内でハンドL鎖を同時発現させて、完全な四量体H2L2抗体及び／又はペプチドへのハンドL鎖の細胞内会合及び連結を達成することが可能である。同時発現は、同じ宿主内で同じか又は異なるプラスミドのいずれかを使用することによって行うことができる。ハンドL鎖及び／又はペプチドの両方の遺伝子を同じプラスミドに配置し、次いで、これを細胞にトランスフェクトし、それによって、両方の鎖を発現する細胞を直接選択することができる。代替的に、まず、1つの鎖、例えば、L鎖をコードするプラスミドで細胞をトランスフェクトし、続いて、生じた細胞株を第2の選択可能なマーカーを含有するH鎖プラスミドでトランスフェクトすることができる。組み立てられたH2L2抗体分子のより高い生成又はトランスフ

エクトされた細胞株の安定性の向上などの特性を向上させた細胞株を生成するために、いずれかの経路を介してペプチド及び／又はH2L2分子を生成する細胞株を、追加の選択可能なマーカーと併せて、ペプチド、H、L、又はHプラスL鎖の追加のコピーをコードするプラスミドでトランスフェクトすることができる。

【0242】

〔000264〕組換え抗体の長期的な高収率の生成のために、安定した発現が、使用され得る。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株が、操作され得る。ウイルス起源の複製物を含有する発現ベクターを使用するよりもむしろ、宿主細胞が、免疫グロブリン発現カセット及び選択可能なマーカーで形質転換されてもよい。外来DNAの導入に続いて、操作された細胞を濃縮培地で1～2日間増殖させてもよく、次いで選択培地に切り替える。組換えプラスミド中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドを染色体に安定的に組み込み増殖して、ひいては細胞株にクローニング及び拡大することができるフォーカスを形成することを可能にする。そのような操作された細胞株は、抗体分子と直接又は間接的に相互作用する化合物／構成要素のスクリーニング及び評価において特に有用であり得る。

10

【0243】

〔000265〕本発明の抗体が生成されると、それは、免疫グロブリン分子の精製のための当該技術分野で既知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインA後の特定の抗原に対する親和性、及びサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、吸収率較差溶解度によって、又はタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技法によって精製され得る。多くの実施形態では、抗体は、細胞から培養培地に分泌され、培養培地から採取される。

20

【0244】

薬学的及び獣医学的用途

〔000266〕本発明はまた、本発明の分子及び1つ以上の薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。より具体的には、本発明は、薬学的に許容される担体又は希釈剤と、有効成分として本発明による抗体又はペプチドと、を含む、薬学的組成物を提供する。

【0245】

〔000267〕「薬学的に許容される担体」は、用いられる投薬量及び濃度で曝露される細胞又は動物に対して無毒である、任意の賦形剤を含む。薬学的組成物は、1つ又は追加の治療剤を含み得る。

30

【0246】

〔000268〕「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、又は合理的な利益／リスク比に見合った他の問題の合併症を伴わずに、動物の組織との接触に好適な化合物、材料、組成物、及び／又は剤形を指す。

【0247】

〔000269〕薬学的に許容される担体としては、溶媒、分散媒、緩衝液、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、湿潤剤、保存剤、バガー（bugger）、キレート剤、抗酸化剤、等張剤、並びに吸収遅延剤が挙げられる。

40

【0248】

〔000270〕薬学的に許容される担体としては、水；生理食塩水；リン酸緩衝生理食塩水；デキストロース；グリセロール；エタノール及びイソプロパノールなどのアルコール；リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；アスコルビン酸；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸；並びに単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA；ナトリウムなどの塩形成対イオン；並びに／又はTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）などの非イオン性界面活性剤；糖類などの等

50

張剤、マンニトール及びソルビトールなどの多価アルコール、及び塩化ナトリウム；並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

【0249】

〔000271〕本発明の薬学的組成物は、例えば、液体溶液（例えば、注射可能かつ注入可能な溶液）、分散液、又は懸濁液、リポソーム、坐剤、錠剤、丸剤、又は粉末などの液体、半固体、又は固体剤形を含む、多様な方式で製剤化され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、注射可能な又は注入可能な溶液の形態である。組成物は、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、非経口、経粘膜、経口、局所、又は経皮投与に好適な形態であり得る。組成物は、即時放出、制御放出、徐放、又は遅延放出組成物として製剤化され得る。

【0250】

〔000272〕本発明の組成物は、個々の治療剤として、又は他の治療剤と組み合わせでのいずれかで投与され得る。それらは単独で投与することができるが、概して、選択された投与経路及び標準的な薬学的慣行に基づいて選択された薬学的担体とともに投与される。本明細書に開示の抗体の投与は、非経口注射（腹腔内、皮下、又は筋肉内注射など）を含む任意の好適な手段によって、経口的に、又は抗体の局所投与（典型的には薬学的製剤中で実行される）によって、気道表面に実行され得る。気道表面への局所投与は、鼻腔内投与（例えば、ドロPPER、綿棒、又は吸入器の使用による）によって実行され得る。気道表面への抗体の局所投与はまた、抗体をエアロゾル懸濁液として含有する薬学的製剤（固体及び液体粒子の両方を含む）の呼吸可能な粒子を作製し、次いで呼吸可能な粒子を対象に吸入させることなどによる、吸入投与によって実行され得る。薬学的製剤の呼吸可能な粒子を投与するための方法及び装置は、周知であり、任意の従来技法が用いられ得る。

【0251】

〔000273〕いくつかの望ましい実施形態では、抗体は、非経口注射によって投与される。非経口投与では、抗体又は分子は、薬学的に許容される非経口ビヒクルに関連する、溶液、懸濁液、エマルション、又は凍結乾燥粉末として製剤化され得る。例えば、ビヒクルは、水性担体などの許容される担体に溶解された抗体又はそのカクテルの溶液であり得、そのようなビヒクルは、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、トレハロース若しくはスクロース溶液、又は5%血清アルブミン、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどである。不揮発性油などのリポソーム及び非水性ビヒクルも使用され得る。これらの溶液は、無菌であり、概して、粒子状物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技法によって滅菌され得る。組成物は、pH調整剤、及び緩衝液、毒性調整剤などの生理学的条件に近づけるために必要な薬学的に許容される補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有し得る。これらの製剤中の抗体の濃度は、例えば、約0.5重量%未満、通常、約1重量%以上～最大で15重量%又は20重量%と広範に変動し得、選択される特定の投与モードに従って、主に流体体積、粘度などに基づいて選択されるであろう。ビヒクル又は凍結乾燥粉末は、等張性（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）及び化学的安定性（例えば、緩衝液及び防腐剤）を維持する添加剤を含有し得る。製剤は、一般的に使用される技法によって滅菌される。非経口投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に既知であるか、又は明らかであり、例えば、REMYINGTON'S PHARMACEUTICALS, INC. (15th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980)により詳細に記載されている。

【0252】

〔000274〕本発明の抗体又は分子は、保存のために凍結乾燥され、使用前に好適な担体中で再構築され得る。この技法は、従来の免疫グロブリンに対して有効であることが示されている。任意の好適な凍結乾燥及び再構築技法が用いられ得る。凍結乾燥及び再構築が、多様な程度の抗体活性損失をもたらし得、使用レベルを調整して相殺する必要があることを、当業者は理解するであろう。本抗体又はそれらのカクテルを含有する組成物は、既存の疾患の再発の防止及び／又は治療的処置のために投与され得る。好適な薬学的担

体は、当該技術分野で標準的な参照教本である REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES の最新版に記載されている。治療用途において、組成物は、疾患及びその合併症を治癒するか、又は少なくとも部分的に停止若しくは緩和するのに十分な量で、疾患に既に罹患している対象に投与される。

【0253】

【000275】本明細書に記載の状態又は疾患の治療のための本発明の組成物の有効用量は、例えば、限定されないが、特定の薬剤の薬力学的特徴及びその投与モード及び経路；標的部位；動物の生理学的状態；投与される他の医薬品；治療が予防的であるか又は治療的であるか；レシピエントの年齢、健康、及び体重；症状の種類の性質及び程度並行して行われる治療の種類、治療の頻度、並びに所望の効果を含み、多くの異なる要因に応じて変動する。

10

【0254】

【000276】組成物の単回又は複数回の投与は、治療する獣医師によって選択される用量レベル及びパターンで実行され得る。いずれにせよ、薬学的製剤は、対象を効果的に治療するのに十分な量の本発明の抗体を提供すべきである。

【0255】

【000277】治療投薬量は、安全性及び有効性を最適化するために当業者に既知の定例的な方法を使用して滴定され得る。

【0256】

【000278】本発明の薬学的組成物は、「治療有効量」を含み得る。「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するのに必要な投薬量及び期間での有効な量を指す。治療有効量の分子は、個体における疾患状態、年齢、性別、及び体重、並びに個体における所望の応答を分子が誘発する能力などの要因に応じて変動し得る。治療有効量はまた、治療的に有益な効果が分子の任意の毒性又は有害効果を上回る量である。

20

【0257】

【000279】別の態様では、本発明の組成物は、例えば、ウシ科動物における様々な疾患及び障害の治療に使用され得る。本明細書で使用される場合、「治療する」及び「治療」という用語は、予防又は防止措置を含む治療処置を指し、対象が、疾患又は状態と関連する望ましくない生理学的変化を防止又は減速（軽減）される対象である。有益な又は所望の臨床結果としては、限定されないが、検出可能であるか検出不可能であるかに関わらず、症状の緩和、疾患又は状態の程度の減少、疾患又は状態の安定化（すなわち、疾患又は状態が悪化しない）、疾患又は状態の進行の遅延又は減速、疾患又は状態の改善又は緩和、及び疾患又は状態の寛解（部分的又は完全な）が挙げられる。治療を必要とする対象としては、既に疾患若しくは状態を有する対象、並びに疾患若しくは状態を有する傾向がある対象、又は疾患若しくは状態が防止される対象が挙げられる。

30

【0258】

【000280】本明細書で引用される全ての特許及び参照文献は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0259】

【000281】以下の実施例は、先行開示を補足し、本明細書に記載の主題のより良い理解を提供するために提供される。これらの実施例は、記載の主題を限定するものとみなされるべきではない。本明細書に記載の実施例及び実施形態は、例示のみを目的とし、それらの観点からの様々な修正又は変更が、当業者には明らかであり、本発明の真の範囲内に含まれ、本発明の真の範囲から逸脱することなく行われ得ることが理解される。

40

実施例

【実施例1】

【0260】

ウシ科動物 IgG 変異体

方法

インビトロ Fc 受容体結合アッセイ

50

【000282】組換えウシ科動物FcRn (bFcRn)、FcγR1、FcγR2、FcγR3、及びFcγ2R DNAを、哺乳動物発現のためにコドン最適化し、表1のようにNCBIデータベースからの配列に基づいて合成した。DNAは、C末端6×His+BAPタグ (AGLNDIFEAQKIEWHE；配列番号113)を用いて操作された、pcDNA3.1 (+)ベクターにクローニングされた。全てのFcγRを、HEK293又はExp i-CHO細胞にトランスフェクトし (FcRn-αサブユニット及びβ-マイクログロブリンを同時トランスフェクトした)、FcγR又はFcRn複合体を、c末端Hisタグを介するIMAC親和性精製によって精製した。

【0261】

【000283】精製したFcRを以下のようにビオチン化した。精製したFc受容体タンパク質を、10mMのTris-HCl、pH8.0に透析し、Amicon Ultra、10KMWCO (EMD Millipore、Billerica, MA)を使用して濃縮した。受容体のc末端で発現されたビオチンアクセプターペプチド (BAP) AGLNDIFEAQKIEWHE (配列番号113)は、ビオチンリガーゼBirAを使用して、ビオチンをこの範囲のアミノ酸に移行させることを可能にした。ビオチン化反応を、製造業者のプロトコル (Avidity, LLC、Aurora, CO)に記載されるように実施した。次いで、受容体をPBS中に透析して、残留ビオチンを除去した。

【0262】

【000284】bFcRn、bFcγR1、bFcγR2、bFcγR3、bFcγ2Rに対するウシ科動物IgGサブクラス及び変異体の親和性を試験するために、Biacore SPR結合アッセイを設計した。

【表1】

表1. 組換えウシ科動物Fc受容体の配列参照

ウシ科動物FcR	サブユニット、サブタイプ、別名	NCBI受入番号
bFcRn	bFcRn アルファサブユニット	BC102159.1
	β-マイクログロブリン、ベータサブユニット	NM_173893.3
bFcγR1	bFcγRI	AF162866
bFcγR2	bFcγRII	X75671.1
bFcγR3	bFcγRIII	BC112756.1
bFcγ2R		Z37506.1

【0263】

bFcRnのBiacore方法：

【000285】ウシ科動物FcRnに対するウシ科動物Fcベースの抗体又は融合タンパク質結合親和性を、表面プラズモン共鳴 (SPR)によって決定した。SAセンサーを使用して、全ての報告されたKDをBiacore T200 (Cytiva、Marlborough, MA, USA)で測定した。所望の表面密度のために、ウシ科動物FcRnをセンサーの表面上に捕捉した。20mMのMES、150mMのNaCl、0.005%のTween (登録商標) 20、0.5mg/mLのBSA、pH6及び／又はPBS、0.0005%のTween (登録商標) 20、pH7.4の泳動用緩衝液を使用した。様々な濃度のウシ科動物CTLA4-Fc融合物又はmAbを、適切な泳動用緩衝液において滴定し、受容体表面上に流した。再生は、50mMのTris-HCl、pH8、0.005%のp20、及び0.5%のBSAで実施した。二重参照の方法を用いて、Biacore T200 Evaluationソフトウェア (Cytiva、Marlborough, MA, USA)を使用して、動的結合親和性を分析した。参照フローセルを、固定化されたウシ科動物FcRnを含有するフローセルから減算し、緩衝

液のみを含有するブランク実験を、全ての実験から減算した。生じた曲線を、1 : 1 結合モデルに適合させた。実験は、25℃で実施した。

【0264】

ビオチン化bFc g R1、bFc g R2、及びbFc g R3のための方法：

【000286】bFc g R1、bFc g R2、及びbFc g R3に対するウシ科動物IgGサブクラスの親和性を試験するために、Biacore SPR結合アッセイを設計した。シリーズSAセンサーを使用して、全ての報告されたKDをBiacore (Cytiva, Marlborough, MA, USA) で測定した。所望の表面密度に達するために、修飾されたSA捕捉方法を使用して、ビオチン化ウシ科動物Fc g R1、R2、及びR3をセンサー表面上に捕捉した。10mMのHEPES、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05% v/vの界面活性剤P20、pH7.4緩衝液を泳動用及び滴定の緩衝液として使用した。様々な濃度のウシ科動物CTLA4-Fc融合物又はmAbを滴定し、受容体表面上に流し、1 : 1の結合モデルを有するBiacore T200 Evaluationソフトウェア (Cytiva, Marlborough, MA, USA) を使用して、親和性を決定した。参照フローセルを固定化した受容体を含有するフローセルから減算し、緩衝液のみを含有するブランク実験を全ての実験から減算した、二重参照の方法を適用した。フローセルを、10mMのグリシン、pH1.5を使用して再生した。実験は、15℃で実施した。

10

【0265】

bFc g 2 Rのための方法：

【000287】シリーズSCM5センサーを使用して、全ての報告されたKDをBiacore T200 (Cytiva, Marlborough, MA, USA) で測定した。所望の表面密度のために、アミンカップリング (EDC-NGF混合物によるカルボキシル基活性化及びエタノールアミンによる過剰反応性基の非活性化) によって固定化緩衝液を使用してセンサー表面にウシ科動物Fc g 2 Rを固定した。10mMのHEPESの泳動用緩衝液、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05% v/vの界面活性剤P20、pH7.4緩衝液を使用した。様々な濃度のウシ科動物CTLA4-Fc融合物又はmAbを滴定し、受容体表面上に流し、1 : 1の結合モデルを有するBiacore T200 Evaluationソフトウェア (Cytiva, Marlborough, MA, USA) を使用して、親和性を決定した。参照フローセルを固定化した受容体を含有するフローセルから減算し、緩衝液のみを含有するブランク実験を全ての実験から減算した、二重参照の方法を適用した。フローセルを、10mMのグリシン、pH1.5を使用して再生した。実験は、15℃で実施した。

20

30

【0266】

Fc融合タンパク質及びmAbの再生

【000288】組換えCTLA4-Fc融合物を、それぞれ、図6、図14、及び図18に示されるように、重鎖ヒンジ領域のすぐ上流から始まるbIgG1a (NCBI 1S82409)、bIgG2a (Zoetisで配列決定)、bIgG3a (NCBI BTU63638) Fcを含有するpcDNA3.1 (+) 哺乳類発現ベクターへのイヌ科動物CTLA4遺伝子 (NCBI NM_001003106.1) の挿入を介して構築した。組換えCTLA4-Fc融合物も、図6、図14、及び図18に示されるのと同じFc位置で、bIgG1b (X16701)、bIgG2b (S82407)、及び又はbIgG3b (BTU63639) について構築した。追加のリンカーは必要なかった。

40

【0267】

【000289】bIgG1a、bIgG1b、bIgG2a、bIgG2b、bIgG3a、及びbIgG3b Fc領域を有する組換えmAbを、pcDNA3.1 (+) 哺乳類発現ベクター内の定常ドメインをコードするヌクレオチドの上流かつそれとインフレームでVH配列を挿入することによって構築した。定常領域は、bIgG1a (NCBI 1S82409)、bIgG1b (X16701)、bIgG2a (Zoetisで配列決定)、bIgG2b (S82407)、bIgG3a (NCBI BTU63638)

50

、又はb I g G 3 b (B T U 6 3 6 3 9)のいずれかであった。同様に、軽鎖を、ウシ科動物カップ対立遺伝子1定常領域(N C B I H Q 2 1 3 9 9 4 . 1)の上流かつそれとインフレームでV L 配列を挿入することによって構築した。

【0268】

〔000290〕変異を、C T L A 4 F c 融合及び完全m A b フォーマットの両方において、3つの野生型サブクラスに導入して、F c g Rへの結合をロックアウトするか、C D C 及び／若しくはA D C Pをロックアウトするか、安定性を改善するか、又はb F c R n に対する親和性を増加させた。単一部位指向性変異誘発のために、A g i l e n t の Q u i k C h a n g e I I M u t a g e n e s i s 及び関連するA g i l e n t プライマー設計ツール(<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>)を使用して、各野生型プラスミド上の様々な位置に変異を組み込んだ。

10

【0269】

〔000291〕全てのC T L A 4 融合物及びm A b 遺伝子のD N A を、哺乳類発現のためにコドン最適化し、構築物を、F e c t o P R O (登録商標)トランスフェクション試薬及びプロトコル(P o l y p l u s T r a n s f e c t i o n , N e w Y o r k , N Y , U S A) を使用してH E K 2 9 3 細胞において、又はE x p i C H O 一過性系(T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) キットプロトコルを使用してC H O 細胞内のいずれかで一過性に発現させた。E x p i C H O 発現は、m A b 又はC T L A 4 F c 融合トランスフェクションのいずれかで、T h e r m o F i s h e r によって概説されたプロトコルに従った。m A b では、I g G カップ軽鎖をコードする遺伝子配列を含むプラスミドを、I g G 重鎖をコードするプラスミドで同時トランスフェクトした。H E K 2 9 3 発現では、等重量の重鎖プラスミド及びカップ鎖プラスミドを同時トランスフェクトした。F c 融合物について、単一のプラスミドをトランスフェクトした。細胞を7日間(H E K 2 9 3) 又は12日間(C H O) 成長させ、その後、タンパク質精製のために上清を収集した。O c t e t Q K e 定量化(P a l l F o r t e B i o C o r p , M e n l o P a r k , C A , U S A) を介して、プロテインA又はプロテインGセンサーへの結合について、C T L A 4 F c 融合物及びm A b をスクリーニングした。標準曲線を使用して、プロテインA又はプロテインGセンサーを用いて、O c t e t で発現を定量化し、m A b / 融合タンパク質をプロテインG又はプロテインA / G 親和性クロマトグラフィーで精製した。全てのタンパク質構築物について、酢酸ナトリウムp H 5 . 5 を結合及び洗浄緩衝液として使用し、p H 3 . 4 で溶出を実施した。精製したタンパク質を中和し、更なる分析のために、20mMの酢酸N a 、p H 5 . 5 、140mMのN a C l に透析した。m A b 及び融合タンパク質の濃度を、280nmのN a n o D r o p を介して測定した。タンパク質の質は、分析用S E C 及び標準クマシータンパク質ゲルを介して評価した。

20

30

【0270】

〔000292〕表2は、3つのウシ科動物I g G 野生型サブクラス及び変異に対して生成されたC T L A 4 F c 融合物を列挙する。表2に記載されるように、同一の位置でm A b に対しても変異を行った。

40

【0271】

〔000293〕ウシ科動物I g G に導入されたがF c 融合物に対して行われなかった追加の変異は、b I g G 1 a の「D P 」安定化変異体、b F c R n に対する親和性を増加させる変異、b I g G 3 a 上のR 4 3 3 H である。

【表 2 - 1】

表 2. CTLA4 とのウシ科動物 Fc 融合物。

Fc 融合物名	ウシ科動物 IgG サブク ラス Fc 融合 パートナー	変異に関与する残基*
CTLA4 Fc bIgG1a CTLA4 Fc bIgG1b	bIgG1a 野生 型、bIgG1b 野生型	N/A
CTLA4 Fc bIgG1aWin CTLA4 Fc bIgG1bWin	エフェクタ ー機能ノッ クアウトの ための	L234A_P235A_G237A
CTLA4 Fc bIgG1aWinSS CTLA4 Fc bIgG1bWinSS		L234A_P235A_G237A_A330S_P331S
CTLA4 Fc bIgG1aWinSAS CTLA4 Fc bIgG1bWinSAS	bIgG1a 及び bIgG1b 変異	L234A_P235A_G237A_P329S_P331S
CTLA4 Fc bIgG1aSAS CTLA4 Fc bIgG1bSAS		P329S_P331S
CTLA4 Fc bIgG1aSAP CTLA4 Fc bIgG1bSAP		P329S
CTLA4bG2a CTLA4bG2b	bIgG2a 野生 型、bIgG2b 野生型	N/A
CTLA4bG2a_L432A CTLA4bG2b_L432A	エフェクタ ー機能ノッ クアウトの ための	L432A
CTLA4bG2a_N434A CTLA4bG2b_N434A		N434A
CTLA4bG2a_M437A CTLA4bG2b_M437A	bIgG2a 及び bIgG2b 変異	M437A
CTLA4bG2a_L432A_N434A CTLA4bG2b_L432A_N434A		L432A_N434A
CTLA4bG2a_L432A_M437A CTLA4bG2b_L432A_M437A		L432A_M437A

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

CTLA4bG2a_N434A_M437A CTLA4bG2b_L434A_M437A		N434A_M437A
CTLA4bG2a_L432A_N434A_M437A CTLA4bG2b_L432A_L434A_M437A		L432A_N434A_M437A
CTLA4 Fc bIgG3a CTLA4 Fc bIgG3b	bIgG3a 野生型、bIgG3b 野生型	N/A
CTLA4 Fc bIgG3aWin CTLA4 Fc bIgG3bWin	エフェクター機能ノックアウトのための	P234A_L235A_G237A
CTLA4 Fc bIgG3aWinSAS CTLA4 Fc bIgG3bWinSAS		P234A_L235A_G237A_P329S_P331S
CTLA4 Fc bIgG3aSAS CTLA4 Fc bIgG3bSAS	bIgG3a 及び bIgG3b 変異	P329S_P331S
CTLA4 Fc bIgG1aSAP CTLA4 Fc bIgG3bSAP		P329S

*位置は、Kabat における Eu インデックスに従って付番される(図 23 を参照されたい)。

【0272】

以下の表 3 は、ヌクレオチド変異に起因するアミノ酸への変化を含む、b I g G 1 b、I g G 2 b、及び I g G 3 b に対して行われた変異を説明する。表 3 はまた、変異に対する隣接配列を示す。表 3 の同じ F c の変異を、b I g G 1 a、b I g G 2 a、及び I g G 3 a に対して行い、変異は、a 及び b のアロタイプについて同一のアミノ酸配列をもたらした。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3. ウシ科動物 I g G 1 b、I g G 2 b、及び I g G 3 b に対して行われた F c 変異。

サブクラスのアロタイプ変異名: 野生型から変異したアミノ酸	変異型アミノ酸及びヌクレオチド配列
bIgG1bWin(L234A_P235A_G237A): LPGG から AAGA	CDCCPPPE <u>AAG</u> APSVFIFPP (配列番号 79) TGTGACTGCTGTCCACCTCCAGAG <u>GCCG</u> CGG <u>AG</u> CCCCATCCGTGTTTCATCTTTCCCCCT (配列番号 80)
bIgG1bWinSS(L234A_P235A_G237A 、A330S_P331S):LPGG から AAGA;PAP から PSS	CDCCPPPE <u>AAG</u> APSVFIFPP (配列番号 79)、 KVHNEGLP <u>SS</u> IVRTISRTK (配列番号 81) TGTGACTGCTGTCCACCTCCAGAG <u>GCCG</u> CGG <u>AG</u> CCCCATCCGTGTTTCATCTTTCCCCCT (配列番号 80)、 AAGGTGCATAACGAGGGCCTGCCA <u>TCCTCC</u> AT CGTGAGAACAAATCTCCCGCACCAAG (配列番号 82)
bIgG1bWinSAS(L234A_P235A_G237 A、P329S_P331S):LPGG から AAGA;PAP から SAS	CDCCPPPE <u>AAG</u> APSVFIFPP (配列番号 79)、 KVHNEGL <u>SAS</u> IVRTISRTK (配列番号 83) TGTGACTGCTGTCCACCTCCAGAG <u>GCCG</u> CGG <u>AG</u> CCCCATCCGTGTTTCATCTTTCCCCCT (配列番号 80)、 AAGGTGCATAACGAGGGCCTGT <u>TCCGCT</u> <u>TCC</u> AT CGTGAGAACAAATCTCCCGCACCAAG (配列番号 84)
bIgG1bSAS(P329S_P331S):PAP から SAS	KVHNEGL <u>SAS</u> IVRTISRTK (配列番号 83) AAGGTGCATAACGAGGGCCTGT <u>TCCGCT</u> <u>TCC</u> AT CGTGAGAACAAATCTCCCGCACCAAG (配列番号 84)

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

サブクラスのアロタイプ変異名: 野生型から変異したアミノ酸	変異型アミノ酸及びヌクレオチド配列
bIgG1bSAP(P329S):PAP から SAP	KVHNEGL <u>S</u> APIVRTISRK (配列番号 85) AAGGTGCATAACGAGGGCCTGT <u>TCC</u> GCTCCCAT CGTGAGAACAATCTCCCGCACCAAG (配列番号 86)
bIgG1b_DP1(D216E):DP1 から EP1	TKVDKAVE <u>E</u> PTCKPSPCDCC (配列番号 87) ACAAAGGTGGACAAGGCCGTG <u>GAG</u> CCAACCT GCAAGCCAAGCCCCTGTGACTGCTGT (配列番号 88)
bIgG1b_DP2(D270E):DP2 から EP2	VVVDVGHD <u>E</u> PEVKFSWF (配列番号 89) GTGGTGGTGGATGTGGGCCACGACGAGCCTGA GGTGAAGTTCTCTTGTTT (配列番号 90)
bIgG1b_DP1_DP2(D216E_D270E):D P1 から EP1_DP2 から EP2	TKVDKAVE <u>E</u> PTCKPSPCDCC (配列番号 87)、 VVVDVGHD <u>E</u> PEVKFSWF (配列番号 89) ACAAAGGTGGACAAGGCCGTG <u>GAG</u> CCAACCT GCAAGCCAAGCCCCTGTGACTGCTGT (配列番号 88)、 GTGGTGGTGGATGTGGGCCACGACGAGCCTGA GGTGAAGTTCTCTTGTTT (配列番号 90)
bIgG2b_L432A:LHNHYM から AHNHYM	VMHEA <u>A</u> HNHYMQKSTSK (配列番号 91) GTCATGCATGAGGCTG <u>CCC</u> CACAATCATTATAT GCAGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 92)

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

サブクラスのアロタイプ変異名: 野生型から変異したアミノ酸	変異型アミノ酸及びヌクレオチド配列
bIgG2b_N434A:LHNHYM から LHAHYM	VMHEALH <u>A</u> HYMQKSTSK (配列番号 93) GTCATGCATGAGGCTCTGCAC <u>GCCC</u> ATTATAT GCAGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 94)
bIgG2b_M437A:LHNHYM から LHNHYA	VMHEALHNHY <u>A</u> QKSTSK (配列番号 95) GTCATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTAT <u>GC</u> <u>CC</u> AGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 96)
bIgG2b_L432A_N434A:LHNHYM か ら AHNHYM;LHNHYM から LHAHYM	VMHEA <u>A</u> H <u>A</u> HYMQKSTSK (配列番号 97) GTCATGCATGAGGCT <u>GCCC</u> CAC <u>GCCC</u> ATTATAT GCAGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 98)
bIgG2b_L432A_M437A:LHNHYM から AHNHYM;LHNHYM から LHNHYA	VMHEA <u>A</u> HNHY <u>A</u> QKSTSK (配列番号 99) GTCATGCATGAGGCT <u>GCCC</u> ACAATCATTAT <u>GC</u> <u>CC</u> AGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 100)
bIgG2b_N434A_M437A:LHNHYM から LHAHYM;LHNHYM から LHNHYA	VMHEALH <u>A</u> HY <u>A</u> QKSTSK (配列番号 101) GTCATGCATGAGGCTCTGCAC <u>GCCC</u> ATTAT <u>GC</u> <u>CC</u> AGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 102)
bIgG2b_L432A_N434A_M437A:LHN HYM から AHNHYM;LHNHYM か ら LHAHYM;LHNHYM から LHNHYA	VMHEA <u>A</u> H <u>A</u> HY <u>A</u> QKSTSK (配列番号 103) GTCATGCATGAGGCT <u>GCCC</u> CAC <u>GCCC</u> ATTAT <u>GC</u> <u>CC</u> AGAAGAGCACATCTAAG (配列番号 104)

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

サブクラスのアロタイプ変異名: 野生型から変異したアミノ酸	変異型アミノ酸及びヌクレオチド配列
bIgG3bWin(P234A_L235A_G237A): PLGG から AAGA	QCSKCPE <u>AAG</u> ALSVFIFPP (配列番号 105) CAGTGTTCCAAGTGCCCAGAG <u>GCCGCCGGAG</u> <u>CCCTGAGCGTGTTTCATCTTTCCACCC</u> (配列番号 106)
bIgG3bWinSAS(P234A_L235A_G237A、P329S_P331S):PLGG から AAGA;PAP から SAS	QCSKCPE <u>AAG</u> ALSVFIFPP (配列番号 105)、 KVNNKGL <u>SAS</u> IVRTISRTK (配列番号 107) CAGTGTTCCAAGTGCCCAGAG <u>GCCGCCGGAG</u> <u>CCCTGAGCGTGTTTCATCTTTCCACCC</u> (配列番号 106)、 AAGGTGAACAATAAGGGCCTG <u>TCCGCCTCCAT</u> CGTGAGAACAATCTCTCGCACCAAG (配列番号 108)
bIgG3bSAS(P329S_P331S):PAP から SAS	KVNNKGL <u>SAS</u> IVRTISRTK (配列番号 107) AAGGTGAACAATAAGGGCCTG <u>TCCGCCTCCAT</u> CGTGAGAACAATCTCTCGCACCAAG (配列番号 108)
bIgG3bSAP(P329S):PAP から SAP	KVNNKGL <u>SAS</u> PIVRTISRTK (配列番号 109) AAGGTGAACAATAAGGGCCTG <u>TCCGCCCAAT</u> CGTGAGAACAATCTCTCGCACCAAG (配列番号 110)
bIgG3b_R433H:ALRNH から ALHNNH	AVMHEAL <u>H</u> NHYKEKSISR (配列番号 111) GCCGTGATGCACGAGGCTCTG <u>CACA</u> ATCATT CAAGGAGAAGAGCATCTCTCGC (配列番号 112)

太字及び下線:アミノ酸変化及び対応する変異したコドン。ヌクレオチド配列は、示されるアミノ酸配列に翻訳される。

【実施例 2】

【0273】

b I g G 変異はエフェクター機能をロックアウトする

〔000294〕いくつかの変異を、b I g G 1 a アロタイプの F c 領域に導入して、エフェクター機能をロックアウトした：1) b I g G 1 a の b F c g R 1、b F c g R 2、及び b F c g R 3 への結合、2) 細胞ベースのアッセイにおける補体殺傷活性 (C D C)、及び 3) A D C P 細胞ベースのアッセイにおける食作用を排除するか、又は無視できるまで低減する。

【0274】

10

20

30

40

50

〔000295〕「Winter」（又は「Win」）部位は、ヒトIgG1について以前に報告されたように、ヒンジのすぐ下流にある。ヒトIgG1のこのLLGG「Winter」部位は、種によって異なる。ウシ科動物IgG1については、それは、LPGG（図2）である。ヒトIgG1について、一般的に「LALA」と称される変異は、Leu234Ala及びLeu235Alaにある。ウシ科動物IgG1について、対応するWinter変異は、Leu234Ala、Pro235Alaであるが、追加の残基も変異される。この追加の変異は、Gly237Ala（KabataにおけるEuインデックスに従って付番される）である。

〔0275〕

〔000296〕bIgG1a上の「PAPからSAS」（Pro329Ser__Pro331Ser）及び「PAPからSAP」（Pro329Ser）変異は、bIgG2が細胞ベースのアッセイにおいて補体活性を誘発しないため、bIgG2に基づいて考案された。ウシ科動物IgG2aは、CH2に天然に存在するSAS部位を有し、一方、図2に示すように、bIgG1aは、この領域においてPAPである。したがって、bIgG1aにおけるPAPをSAS又はSAPのいずれかに変異させることは、CDCを排除するであろうと仮定された。

〔0276〕

〔000297〕bIgG1a上の「SS」変異（Ala330Ser、Pro331Ser）は、hIgG4サブクラスがFcγRに対して弱い親和性を有し、したがって無視できるエフェクター機能を有するため、この同じ領域におけるヒトIgG4に類似するヒトIgG1に対する変異、PAPからPSSに基づいている。実際、hIgG1上の「SS」変異は、エフェクター機能をロックアウトする。ウシ科動物IgG1は、この領域においてhIgG1と同じPAP配列を有するため、bIgG1上のPAPからPSSへの変異がADCC、ADCP、CDC、及びFcγR結合をロックアウトするであろうと仮定された。SS変異を、bIgG1上のWinter変異に追加した。

〔0277〕

〔000298〕上述の変異を、bIgG1a Fc上に導入した：Winter変異のみ、L234A__P235A__G237A「Win」（配列番号16）、Winter変異+SS変異、L234A__P235A__G237A__A330S__P331S「WinSS」（配列番号18）、Winter変異+SAS変異、L234A__P235A__G237A__P329S__P331S「WinSAS」（配列番号17）、SAS変異のみ、P329S__P331S「SAS」（配列番号15）、及びSAP変異のみ、P329S「SAP」（配列番号14）。これらの変異を、図6に整列させる。

〔0278〕

〔000299〕Fcγ受容体についての上記変異の結合親和性を、bIgG1a野生型と比較した。変異体はまた、機能的細胞ベースのアッセイにおいて試験され、データは、SAS及びSAP変異の両方が、CDC活性を劇的に低減することを示す。SAS及びSAPの変異もADCPを完全にロックアウトする。予想外に、「Winter」変異は、細胞ベースのCDCアッセイにおいて、補体活性を低減するのではなく増強したようであり、細胞ベースのアッセイにおいて、ADCPに対して無視できる効果を有する。また、予想外に、bIgG1a上の「SS」変異は、bFcγR1及びbFcγR2への結合を完全にロックアウトしない。bIgG1上のSS変異は、CDC上でわずかな低減のみを有し、細胞ベースのアッセイにおけるADCPを部分的にロックダウンするのみである。

〔実施例3〕

〔0279〕

ウシ科動物Fc受容体結合親和性に対するbIgG Fc変異の効果

〔000300〕bIgG1a及びbIgG1b野生型FcのSPR Biacore bFcγR親和性を、上述のbIgG1a及びbIgG1b変異と比較することにより、ウシ科動物Fcγ受容体への結合をロックアウトする能力を評価した。bIgG1a野生型組換えmAbの5つのFc変異体との定常領域のアラインメントを図6に示す。bIgG

10

20

30

40

50

1 a アロタイプの b I g G 1 b アロタイプとのアラインメントを図 3 に示す。b I g G 1 に対して行われた全ての変異は、a 及び b アロタイプと同一である。実施例 1 に記載されるように、b F c g R 1、R 2、及び R 3 のための B i a c o r e 方法を実施した。

【 0 2 8 0 】

〔 0 0 0 3 0 1 〕 表 4 は、F c γ 受容体への b I g G 1 a 及び b I g G 1 b 結合に対するエフェクター機能 F c 変異の結果を示す。b I g G 1 野生型について、2 つのアロタイプは、b F c g R 1、b F c g R 2、及び b F c g R 3 に類似した結合親和性を有する。W i n t e r 変異 (b I g G 1 a W i n) は、b F c g R 3 への結合をロックアウトしたが、b F c g R 1 又は b F c g R 2 親和性に顕著に影響しなかった。S S 変異を W i n t e r (b I g G 1 a W i n S S) に加えると、b F c g R 1 及び b F c g R 2 への結合がいくらか低減し、b F c g R 3 への無視できる結合が維持された。W i n t e r 変異 (b I g G 1 a W i n S A S)、S A S 変異単独 (b I g G 1 a S A S)、又は S A P 変異単独 (b I g G 1 a S A P) に S A S を加えた場合のみ、3 つ全ての F c γ 受容体への結合がロックアウトされる。ウシ科動物 b F c g R 1 は、I g G 1 a S A P への非常に弱い結合を有し、したがって、効果的にロックアウトされる。2 つを除いて、表 4 は、b I g G 1 b 野生型及び b I g G 1 b 変異が、それぞれ、b I g G 1 a 野生型及び b I g G 1 a 変異に類似した結合親和性を有したことを示す。したがって、2 つのアロタイプは、1) b F c g R 2 上の W i n S S、及び 2) b F c g R 1 上の S A P を除いて、かなり比肩するが、これらの変異体の両方の K D は、野生型の K D よりも顕著に低い。

【 表 4 】

表 4. ウシ科動物 F c γ 受容体への結合に対する b I g G 1 a 及び b I g G 1 b エフェクター機能 F c 変異の効果。

CTLA4-bIgG1a Fc 融合物	bFcγR1 KD(M)	bFcγR2 KD(M)	bFcγR3 KD(M)
bIgG1a 野生型	1.20E-09	3.37E-09	1.43E-08
bIgG1b 野生型	4.63E-10	2.48E-09	1.37E-08
bIgG1aWin	7.45E-09	2.79E-09	NBO
bIgG1bWin	3.73E-09	3.24E-09	LS
bIgG1aWinSS	5.48E-08	5.25E-08	LS
bIgG1bWinSS	7.04E-08	LS	LS
bIgG1aWinSAS	NBO	NBO	NBO
bIgG1bWinSAS	NBO	NBO	LS
bIgG1aSAS	NBO	NBO	NBO
bIgG1bSAS	NBO	NBO	LS
bIgG1aSAP	1.48E-07	NBO	NBO
bIgG1bSAP	NBO	NBO	LS

NBO=結合は観察されず。

LS=低シグナル、非常に弱い結合を示す。

【 0 2 8 1 】

C D C アッセイ

〔 0 0 0 3 0 2 〕 C D C 細胞ベースのアッセイは、C D C の媒介において 5 つの C T L A 4 ウシ科動物 I g G 1 a F c 融合タンパク質 (図 6) の有効性を特徴付け、ウシ科動物

I g G サブタイプの C D C 活性を決定する F c 領域における重要な残基を定義するために開発され、用いられた。このアッセイは、F c 融合タンパク質上の C T L A 4 に結合するイヌ科動物 C D 8 0 を発現するように操作された C H O 標的細胞を利用する。これらの標的細胞は、過去のイヌ科動物 A D C C アッセイで使用されており、それらの信頼性に起因して C D C アッセイにおいて利用されている。

【0282】

〔000303〕補体保存された血清との融合タンパク質結合標的細胞のインキュベーションは、融合タンパク質上の F c 結合をもたらして、構成要素 C 1 q が補体カスケードを開始し、最終的に膜攻撃複合体を形成するのを補足することができる。細孔形成複合体は、細胞生存能の喪失によって測定される標的細胞の細胞溶解を媒介する。C 1 q への F c 結合がない場合、結果として生じる細胞溶解／死はない。

10

【0283】

〔000304〕簡潔に述べると、C D 8 0 発現 C H O 細胞（標的細胞）を、丸底 9 6 ウェルプレート中の C D C H O 培地において 4 0 , 0 0 0 細胞／ウェルでプレーティングした。C D C H O 培地中の滴定した融合タンパク質を、標的細胞に添加し、3 7 °C で 6 0 分間結合させた。ウシ科動物補体保存された血清（C D C H O 培地中 3 0 %）を、3 7 °C で 4 5 分間プレートに添加した。次いで、Cell Titer - G lo を使用して細胞生存率を測定し、データを、融合タンパク質なし＋補体保存された血清対照を使用して計算された「対照の細胞生存率 %」として表した。

【0284】

20

〔000305〕図 7 及び表 5 に示されるように、W i n 変異単独では、b I g G 1 a 又は b I g G 1 b F c の C D C 活性をノックアウトしない。それは、C D C の活動を強化するようである。W i n S S 変異は、非常に弱い、C D C を引き起こす。W i n S A S 、S A S 単独、及び S A P 変異は、b I g G 1 a F c 及び b I g G 1 b F c の両方についての C D C 活性を大幅に低減するか、又は完全にノックアウトする。

【0285】

インシリコモデリング

〔000306〕ウシ科動物抗体の F A b 配列を、それぞれのヒンジ領域を使用して、様々なウシ科動物骨格サブクラスの F c ドメインの配列に連結した。Chemical Computing Group が開発した Molecular Operating Environment 2019.0102 プログラム（MOE 2019.0102）の抗体相同性モデリング機能を実装して、各ウシ科動物骨格アロタイプの野生型（WT）及び変異型構築物の各々の 3 D 構造をモデル化した。MOE 2019.0102 は、抗体相同性モデリングのための柔軟で自動化されたグラフィカルユーザーインターフェイスを提供し、モデリング実験のためにデフォルトパラメータが選択された。

30

【0286】

〔000307〕m A b 構造をモデル化するために、MOE 2019.0102 の組み込み P D B データベースを使用して、知識ベースのアプローチを用いた。シーケンスツープロファイルアラインメントアルゴリズムは、スコアリングアルゴリズムを使用して重鎖及び軽鎖配列鑄型をランク付けし、8 5 % を超えるスコアは、物理的に現実的な構造を有する抗体鑄型の選択を確実にする。C D R 及びループの鑄型が結合されたら、次いで、モデルは同じパイプラインを使用して最適化された。モデルの構造安定性は、タンパク質構造の立体化学的品質をチェックするラマチャンドラプロットを使用して検証された。

40

【0287】

〔000308〕変異した構築物全体にわたる構造活性関係を理解するために、上述の方法を、b I g G 1 a _ W I N S A S 、b I g G 1 b _ W I N S A S 、b I g G 1 c _ W I N S A S 、及び b I g G 1 d _ W I N S A S に対して実施した。構造を重ね合わせ、変異した残基を矢印で示す（図 8 A）。互いに対する 4 つの構造の平均二乗偏差を計算するために、R M S D プロットを生成した（図 8 B）。2 . 0 Å 以下の R M S D 値は、2 つの構造が同じであることを考慮するための標準と考えられる。結果は、_ b I g G 1 a _ W I

50

NSAS構築物が、そのRMSDが1.24であったため、その他のアロタイプ対応物であるbIgG1b WINSASと同一であったことを示した。これは、bIgG1a WINSASが、bIgG1b WINSASと同じCDC活性の喪失を示したCDCアッセイ（図7）においても支持された。これは、上述の方法によって生成された抗体モデルが、ウシ科動物骨格構造の正確な表現を提供することを示すためのより多くの支持を提供する。更に、bIgG1a WINSAS及びbIgG1b WINSASの抗体モデルをbIgG1c WINSAS及びbIgG1d WINSASと比較すると、RMSD値は0.94～1.24 Åの範囲であり、したがって、bIgG1c WINSAS及びbIgG1d WINSASが、bIgG1a WINSASと同様の機能的活性の欠如（CDC、ADCP、及びADCC）を示すことを高度に確実に予測することができる。

10

【0288】

ADCPアッセイ

【000309】ADCP細胞ベースのアッセイは、ADCPの媒介において5つのCTLA4ウシ科動物IgG1a Fc融合タンパク質（図6）の有効性を特徴付け、ウシ科動物IgGサブタイプのADCP活性を決定するFc領域における重要な残基を定義するために開発され、用いられた。このアッセイは、Fc融合タンパク質上のイヌ科動物CTLA4に結合するイヌ科動物CD80を発現するように操作されたCHO標的細胞を利用する。これらの標的細胞は、過去のイヌ科動物ADCCアッセイで使用されており、それらの信頼性に起因してCDCアッセイにおいて利用されている。

20

【0289】

【000310】このアッセイのために、ウシ科動物肺胞マクロファージとのFc融合タンパク質／標的細胞複合体のインキュベーションは、マクロファージ上のFcγ受容体へのFc結合、CHO標的細胞とマクロファージエフェクターとの架橋、及びそれによって標的細胞の食作用の開始をもたらすことができる。ADCPは、共培養におけるエフェクターマクロファージの集団内のpH感受性蛍光色素のシグナル強度及び周波数によって測定され、蛍光細胞は、標的細胞を酸性リソソームに良好に内在化したエフェクターを示す。

【0290】

【000311】簡潔に述べると、イヌ科動物CD80発現CHO細胞（CD80標的細胞）又はCD80を発現しない親CHO細胞（親標的細胞）を、37℃で30分間pHrodo赤色染料で事前染色した。次いで、細胞をCTLA4-Fc融合タンパク質とともに20分間インキュベートして、CTLA4:CD80結合を媒介し、その後、細胞マーカー（CellTrace Violet、CTV）で染色した事前にプレーティングされた接着性ウシ科動物肺胞マクロファージと共培養して、後の同定を補助した。60,000の標的細胞を、96ウェルプレートにおいて、30,000のエフェクターマクロファージとともにプレーティングした。次いで、細胞を6時間共培養し、その後プレートから除去し、フローサイトメトリーによって分析して、ADCP（pHrodo+）を良好に実施したエフェクター細胞（CTV+）を同定した。図9及び表5に示されるように、野生型bIgG1aは、ウシ科動物肺胞マクロファージにおけるADCPの強力な活性化剤である。bIgG1aWin変異単独は、bIgG1a FcのADCP活性に顕著に影響を及ぼさず、CDC活性について見られるように、ADCPをわずかに強化し得る。WinSS変異は部分的にADCPをノックダウンし、一方、WinSAS、SAS単独、及びbIgG1a上のSAP変異は、ADCP機能を完全に抑止する。

30

40

【0291】

【000312】イヌ科動物CD80（IgG1親）を発現しない標的細胞との野生型bIgG1aのインキュベーションもまた、ADCPを誘発せず、観察された標的細胞内在化が融合タンパク質の特異的活性を必要とし、代替機序によって媒介されないことを示す。

【0292】

50

〔000313〕食作用（ADCP）は、FcγR1を含む複数のヒトFcγ受容体によって媒介され、DNA配列分析は、ウシ科動物FcγR1のIgG結合ドメインのモチーフが、そのヒト及びマウスの対応物と比較して高度に保存されていることを示す。図9及び表5の細胞ベースのADCPデータは、表4のbFcγR1に対するbIgG1a及び変異体の結合親和性に比肩する。Winter変異（bIgG1aWin）は、bFcγR1親和性に顕著に影響しなかった。SS変異をWinterに加えること（bIgG1aWinSS）は、bFcγR1への結合をいくらかノックダウンしたが、結合を完全にノックアウトしなかった。Winter変異（bIgG1aWinSAS）、SAS変異単独（bIgG1aSAS）、又はSAP変異単独（bIgG1aSAP）にSASを加えた場合のみ、bFcγR1への結合がノックアウトされる。ウシ科動物bFcγR1は、IgG1aSAPへの無視できる結合しか有さず、したがって、効果的にノックアウトされる。

10

【表5】

表5. ウシ科動物IgG1a及びIgG1b Fc野生型及び変異によって誘導されるCDC及びADCP効果。

CTLA4-bIgG1a 融合物	CDC EC50 値	ADCP EC50 値
CTLA4 Fc bIgG1a 野生型	0.013μg/mL	0.003μg/mL
CTLA4 Fc bIgG1aWin	0.006μg/mL	0.002μg/mL
CTLA4 Fc bIgG1aWin-SS	部分 CDC	0.041μg/mL
CTLA4 Fc bIgG1aWin-SAS	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG1aSAS	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG1aSAP	CDC なし	ADCP なし
CTLA4-bIgG1b 融合物	CDC EC50 値	
CTLA4 Fc bIgG1a 野生型(対照)	0.034μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG1b 野生型	0.036μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG1bWin	0.015μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG1bWin-SS	部分 CDC	
CTLA4 Fc bIgG1bWin-SAS	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG1bSAS	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG1bSAP	CDC なし	

20

30

40

【実施例4】

〔0293〕

安定化のためのbIgG DP変異

〔000314〕ウシ科動物IgG1a天然野生型サブクラスの分析調査では、図10に示されるように、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による分析で低分子量種（LMWS）が観察された。考えられる原因を調査するために、試料を質量スペクトル分析に供し、これは、D216とP217との間、及びD270とP271との間のウシ科動物IgG1a定常重鎖に位置する2つのクリップ部位を同定した。これら2つの化学的切断部位は、ウシ科動物IgG1a Fc（NCBI参照1S82409）の天然アミノ酸配列に含まれる。bIgG1aの定常ドメインにおける切断／クリッピング部位の排除は、

50

ウシ科動物 I g G 1 サブクラスの立体構造安定性、そのままの単量体の割合、及び全体的な開発可能性を増加させるのに望ましい。これらの切断／クリッピング部位を排除するために、ウシ科動物 I g G 1 a の定常ドメインに変異を行った（表 6）。これらの同定された切断部位は、I g G タンパク質における A s p (D) と P r o (P) アミノ酸との間の結合の非酵素的破壊を誘発し得るアミノ酸配列に依存する。D P 結合の意図的な切断は、酸及び熱を使用して文献に十分に記述されているが、全ての D P 部位が立体構造的にアクセス可能ではなく、高温であっても、酸への短時間の曝露下で切断されない。したがって、これらの配列部位の傾向が自動的に b I g G 1 a F c のクリッピングにつながるかどうかは明らかではない。

【表 6】

10

表 6. ウシ科動物 I g G 1 a 定常重鎖における D P 部位の変異

同定	行われた変異
単一変異 DP 部位 1	D216E
単一変異 DP 部位 2	D270E
二重変異 DP 部位 1 及び 2	D216E 及び D270E

【0294】

20

〔000315〕上述の D P から E P への変異は、b I g G 1 a を含有する哺乳類発現ベクターの迅速な変化の変異誘発を介して構築した。モノクローナル抗体 (m A b) 変異体を、T h e r m o F i s h e r から得た哺乳類懸濁細胞系 E X P I C H O - S (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞において発現させた。懸濁 E X P I C H O - S 細胞を、E X P I C H O 発現培地 (G i b c o) 中で $0.14 \sim 8.0 \times 10^6$ 細胞 / m l で維持した。細胞を、-1 日目及びトランスフェクション日に E x p i C H O プロトコルユーザーマニュアルに従って希釈する。希釈した細胞を、M a x T i t e r 条件に従って、E x p i F e c t a m i n e C H O トランスフェクションキット (G i b c o) から供給される試薬を使用して、プロトコルに記載されるようにトランスフェクトする。12~14 日間のインキュベーションの後、培養物を採取し、清澄化する。P B S で事前に平衡化されている M a b S e l e c t S u r e L X (G E H e a l t h c a r e) に、条件培地をロードした。試料をロードした後、樹脂を P B S、次いで、20 m M の酢酸ナトリウム、p H 5.5 で洗浄した。試料を 20 m M の酢酸、p H 3.5 でカラムから溶出した。溶出後、プールを作製し、1 M の酢酸ナトリウムを添加して 4 % に中和した。利用可能な量及び使用目的に応じて、時には試料を最終緩衝液（例えば、P B S、他）に交換した。濃度は、280 n m での吸光度で測定した。

30

【0295】

〔000316〕T O S O H B i o S c i e n c e の T S K ゲル S u p e r S W 3000、4.6 m m、10 x 30 c m、4 μ m カラムを使用して、0.25 m l / 分で、200 m M の N a P h o s p h a t e p H 7.2 泳動用緩衝液において分析 S E C を実施した。

40

【0296】

〔000317〕質量分析 (m a s s s p e c) を、野生型天然ウシ科動物 I g G 1 a 及び変異体に対して実施した。試料を P N G a s e F (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を使用して脱グリコシル化し、D T T (T h e r m o) で還元した。試料を、m a x i s + E S I 器具 (B r u k e r) を使用して分析した。図 10 は、同定された D P クリップ部位の質量が、天然 b I g G 1 a 重鎖において明らかであることを確認する。b I g G 1 a 二重変異 D 216 E (部位 1) 及び D 270 E (部位 2) もまた、天然の F c と同じ方法で質量分析により分析した。このデータから、D P クリップはもはや存在しないことが明らかである。

50

【0297】

〔000318〕導入されたD－PからE－Pへの変異（図12）は、質量スペクトル分析によって証明されるように、b I g G 1 a F c から切断／クリップ部位を除去した（図11）。これらの切断部位の除去は、治療用途のためのこのサブクラスの均質性、そのままのI g G純度、及び全体的な開発可能性を改善することができる。

【0298】

インシリコモデリング

〔000319〕b I g G 1 a __W I N S A S、b I g G 1 b __W I N S A S、b I g G 1 c __W I N S A S、及びb I g G 1 d __W I N S A Sについて前述した方法を、b I g G 1 D P 1 __D P 2 アロタイプに対して実施した。図13に示される結果は、b o v __G 1 a __D P 1 __D P 2 構築物が、その他のアロタイプ対応物であるb I g G 1 b __D P 1 __D P 2、b I g G 1 c __D P 1 __D P 2、及びb I g G 1 d __D P 1 __D P 2と同一であり、R M S D値は0.76～1.14 Åの範囲であったことを示した。したがって、実験結果及びモデル結果の両方に基づいて、アロタイプb I g G 1 b、b I g G 1 c、及びb I g G 1 dにおけるD P 1 __D P 2変異体が、b I g G 1 a __D P 1 __D P 2と同様の様式で機能することを高度に確実に予測する。

【実施例5】

【0299】

b I g G変異はエフェクター機能をノックアウトする

〔000320〕いくつかの変異を、b I g G 2 a アロタイプのF c領域に導入して、エフェクター機能をノックアウトした：1）b I g G 2 aの、それが係合する唯一のF c γ受容体b F c g 2 Rへの結合、及び2）A D C P細胞ベースのアッセイにおける食作用を排除するか、又は無視できるまで低減する。

【0300】

〔000321〕ウシ科動物I g G 2 aのb F c g 2 RへのH D Xエピトープマッピングは、b I g G 2 a上の不連続エピトープを示した。b F c g 2 Rへの結合を排除するか、又は無視できるまで低減するためのキャンペーンでは、b I g G 2 aのこの領域にアラニン変異パネルが作製された。新生仔F c受容体親和性を保持しながら、F c γ受容体結合を劇的にノックダウンするのに有効であった変異を、図14に図示する。これらの変異は、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及びM 4 3 7 Aである。加えて、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及びM 4 3 7 Aの以下の組み合わせは、b F c g 2 Rへの結合を良好にノックアウトした：L 4 3 2 A __N 4 3 4 A、L 4 3 2 A __M 4 3 7 A、N 4 3 4 A __M 4 3 7 A、及びL 4 3 2 A __N 4 3 4 A __M 4 3 7 A。

【実施例6】

【0301】

b F c g 2 R及びb F c R n結合親和性に対するb I g Gアラニン変異の効果

〔000322〕b F c R nに対する親和性を保持しながらb F c g 2 Rへの結合をノックアウトする能力は、上述のb I g G 2 a野生型F cとb I g G 2 aアラニン変異との間のS P R B i a c o r e親和性差を比較することによって評価した。b I g G 2 a野生型（w t）組換えm A bの7つのF c変異体との定常領域のアラインメントを図14に示す。b I g G 2 aアロタイプのb I g G 2 bアロタイプとのアラインメントを図4に示す。b I g G 2に対して行われた全ての変異は、a及びbアロタイプと同一である。b I g G 2 a w t及び変異体をm A bとして産生し、ウシ科動物F c γ受容体及びウシ科動物新生仔F c受容体に対する結合親和性についてB i a c o r eで実験した。b F c g 2 R、b F c R n、b F c g R 1、b F c g R 2、及びb F c g R 3のB i a c o r e方法を、上記の実施例のセクションに記載されるように実施した。

【0302】

〔000323〕表7に示されるように、b I g G 2 a、L 4 3 2 A、N 4 3 4 A、及びM 4 3 7 A上の3つの単一点変異は、b F c g 2 Rへの結合を劇的にノックダウンし、結合のほぼ完全なノックアウトをもたらす。二重変異L 4 3 2 A __N 4 3 4 Aは、野生型結

合と比較して、b F c g 2 Rへの結合を4倍低減する。二重変異 L 4 3 2 A _ M 4 3 7 A、N 4 3 4 A _ M 4 3 7 A、及び三重変異 L 4 3 2 A _ N 4 3 4 A _ M 4 3 7 Aは、野生型 F cと比較した場合、F c g 2 Rへの結合を完全にノックアウトする。

【 0 3 0 3 】

〔000324〕ウシ科動物 F c g 2 Rノックアウト変異は、ウシ科動物 F c R nへの結合に対して様々な効果を有した。p H依存性 F c R nによる I g Gのリサイクルは、エンドソーム分解を避けるためにp H 6での強い親和性、及び救出された I g Gを循環に戻すためにp H 7. 4での弱い親和性を必要とする。3つの単一点変異は、p H 6でのb F c R n結合に対する影響が最も小さく、野生型と同様の強い親和性を保持し、一方、二重変異及び三重変異は、p H 7. 4でのb F c R n親和性に対する影響が最も大きく、親和性を検出限界より下に低減した。

10

【表 7】

表 7 : b I g G 2 a w t及びアラニン変異型m A bのb F c g 2 R及びb F c R nに対する結合親和性。

bIgG2a mAbs	bFcγ2R KD(M)	WT からの Fcγ2R KD 低減	bFcRn, pH6 KD(M)	bFcRn, pH7.4 KD(M)
bIgG2a 野生型	1.33E-08	N/A	2.54E-10	1.47E-07
bIgG2a_L432A	LS	ほぼ完全なノックアウト	5.79E-10	LS
bIgG2a_N434A	LS	ほぼ完全なノックアウト	1.04E-09	LS
bIgG2a_M437A	LS	ほぼ完全なノックアウト	5.90E-10	LS
bIgG2a_L432A_N434A	5.93E-08	4 倍の低減	1.70E-09	LS
bIgG2a_L432A_M437A	NBO	完全なノックアウト	3.03E-09	NBO
bIgG2a_N434A_M437A	NBO	完全なノックアウト	2.31E-09	NBO
bIgG2a_L432A_N434A_M437A	NBO	完全なノックアウト	6.96E-09	NBO

20

NBO=結合は観察されず。LS=低シグナル、非常に弱い結合を示す。

30

【 0 3 0 4 】

〔000325〕b I g G 2 a野生型及び全てのb I g G 2 a F c g 2 Rノックアウト変異は、表 8に示されるように、b F c g R 1、b F c g R 2、及びb F c g R 3に結合しなかったか、又は無視できる結合であった。

40

50

【表 8】

表 8. b I g G 2 a w t 及びアラニン変異体の、b F c g R 1、b F c g R 2、及びb F c g R 3 に対する結合親和性。

bIgG2a mAbs	bFcγR1 KD(M)	bFcγR2 KD(M)	bFcγR3 KD(M)
bIgG2a 野生型	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_L432A	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_N434A	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_M437A	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_L432A_N434A	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_L432A_M437A	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_N434A_M437A	NBO	NBO	NBO
bIgG2a_L432A_N434A_M437A	NBO	NBO	NBO

NBO=結合は観察されず。

【 0 3 0 5 】

〔000326〕表 7 及び表 8 に示される b I g G 2 a 野生型及び変異体の m A b 試薬に加えて、b I g G 2 a 及び b アロタイプの両方についての C T L A 4 - F c 融合バージョンを、上述のように調製した。野生型 b I g G 2 b アロタイプ C T L A 4 - F c 融合物と比較した、野生型 b I g G 2 a アロタイプ C T L A 4 - F c 融合物との b F c g 2 R 親和性の調査は、ほぼ同一の K D、 4.17×10^{-8} 対 3.14×10^{-8} を示す（表 9）。全ての F c 変異について 2 つのアロタイプの比較は、非常に類似した b F c g 2 R 結合親和性も示す。

【表 9】

表 9. bFcγ2R に対する bIgG2a wt 及びアラニン変異型 Fc 融合物対 bIgG2b wt 及びアラニン変異型 Fc 融合物の比較。

CTLA4 融合物	bFcγ2R KD(M)
bIgG2a 野生型	4.17E-08
bIgG2b 野生型	3.14E-08
bIgG2a_L432A	NBO
bIgG2b_L432A	LS
bIgG2a_N434A	NBO
bIgG2b_N434A	LS
bIgG2a_M437A	WB
bIgG2b_M437A	LS
bIgG2a_L432A_N434A	NBO
bIgG2b_L432A_N434A	NBO
bIgG2a_L432A_M437A	NBO
bIgG2b_L432A_M437A	NBO
bIgG2a_N434A_M437A	NBO
bIgG2b_N434A_M437A	NBO
bIgG2a_L432A_N434A_M437A	NBO
bIgG2b_L432A_N434A_M437A	NBO

NBO=結合は観察されず。WB=弱い結合

LS=低シグナル、非常に弱い結合を示す。

【0306】

CDC アッセイ

〔000327〕 CDC 細胞ベースのアッセイは、CDC の媒介において 7 つの CTLA4 ウシ科動物 IgG2a Fc 融合タンパク質（図 14）の有効性を特徴付け、ウシ科動物 IgG サブタイプの CDC 活性を決定する Fc 領域における重要な残基を定義するために開発され、用いられた。このアッセイは、Fc 融合タンパク質上の CTLA4 に結合するイヌ科動物 CD80 を発現するように操作された CHO 標的細胞を利用する。これらの標的細胞は、過去のイヌ科動物 ADC アッセイで使用されており、それらの信頼性に起因して CDC アッセイにおいて利用されている。アッセイ方法は、上記の bIgG2a CTLA4 Fc 融合物について記載されるように実施した。

【0307】

〔000328〕 図 15 及び表 10 に示されるように、2 つのウシ科動物 IgG2 野生型アロタイプ、bIgG2a 及び bIgG2b のいずれも、細胞ベースのアッセイにおいて CDC を誘発せず、一方、陽性対照 bIgG1a は、前回の実験と同様の CDC 活性を有する。加えて、7 つのアラニン変異のいずれも、bIgG1a CDC 機能を変化させない。

【0308】

インシリコモデリング：

〔000329〕 bIgG1a_WINSAS、bIgG1b_WINSAS、bIgG

1 c __W I N S A S、及び b I g G 1 d __W I N S A S について前述した方法を、b I g G 2 a 変異体に対して実施した。このサブクラスでは、2 Å を超える R M S D の変化は観察されず、2 つのアロタイプが同様に折り畳まれることを示した (図 1 6 B)。前のサブクラスと同様に、単一構築物 (L 4 3 2、N 4 3 4 A、及び M 4 3 7 A) における全ての可能な変異を有することがタンパク質の折り畳みに顕著な変化をもたらさない場合、個々の変異もタンパク質モデルに影響を及ぼさないはずであることを合理的に説明した。これらのモデルは、C D C アッセイを使用して観察されるエフェクター機能データによっても支持される。表 7 の S P R 結合データ (すなわち、実験データ) と一緒にこれらの抗体モデルは、b I g G 2 a __L 4 3 2 A __N 4 3 4 A __M 4 3 7 A、b I g G 2 b __L 4 3 2 A __N 4 3 4 A __M 4 3 7 A、及びこれらの変異の様々な組み合わせ (表 2 及び表 7 に列挙される) が、同一の方法で折り畳まれて結合し、したがって、同様の A D C P 及び A D C C エフェクター機能の欠如を有するであろうことを示す。

10

【0309】

A D C P アッセイ

〔000330〕A D C P 細胞ベースのアッセイは、A D C P の媒介において 7 つの C T L A 4 ウシ科動物 I g G 2 a F c 融合タンパク質 (図 1 4) の有効性を特徴付け、ウシ科動物 I g G サブタイプの A D C P 活性を決定する F c 領域における重要な残基を定義するために開発され、用いられた。このアッセイは、F c 融合タンパク質上の C T L A 4 に結合するイヌ科動物 C D 8 0 を発現するように操作された C H O 標的細胞を利用する。これらの標的細胞は、過去のイヌ科動物 A D C C アッセイで使用されており、それらの信頼性に起因して C D C アッセイにおいて利用された。

20

【0310】

〔000331〕このアッセイのために、ウシ科動物肺胞マクロファージとの F c 融合タンパク質／標的細胞複合体のインキュベーションは、マクロファージ上の F c γ 受容体への F c 結合、C H O 標的細胞とマクロファージエフェクターとの架橋、及びそれによって標的細胞の食作用の開始をもたらすことができる。A D C P は、共培養におけるエフェクターマクロファージの集団内の p H 感受性蛍光色素のシグナル強度及び周波数によって測定され、蛍光細胞は、標的細胞を酸性リソソームに良好に内在化したエフェクターを示す。

30

【0311】

〔000332〕簡潔に述べると、イヌ科動物 C D 8 0 発現 C H O 細胞 (C D 8 0 標的細胞) 又は C D 8 0 を発現しない親 C H O 細胞 (親標的細胞) を、3 7 °C で 3 0 分間 p H r o d o 赤色染料で事前染色する。次いで、細胞を C T L A 4 - F c 融合タンパク質とともに 2 0 分間インキュベートして、C T L A 4 : C D 8 0 結合を媒介し、その後、細胞マーカー (C e l l T r a c e V i o l e t、C T V) で染色した事前にプレーティングされた接着性ウシ科動物肺胞マクロファージと共培養して、後の同定を補助する。6 0, 0 0 0 の標的細胞を、9 6 ウェルプレートにおいて、3 0, 0 0 0 のエフェクターマクロファージとともにプレーティングする。細胞を 6 時間共培養し、その後プレートから除去し、フローサイトメトリーによって分析して、A D C P (p H r o d o +) を良好に実施したエフェクター細胞 (C T V +) を同定する。

40

【0312】

〔000333〕図 1 7 及び表 1 0 に示されるように、ウシ科動物 I g G 2 サブクラスは、ウシ肺胞マクロファージにおける A D C P の活性化にウシ科動物 I g G 1 サブクラスほど強力ではないが (図 9 及び表 5 を参照)、b I g G 2 は、より高い濃度で A D C P を誘発することができる。全ての b I g G 2 a アラニン変異は、野生型 b I g G 2 a の A D C P 活性を排除する。

50

【表 10】

表 10. ウシ科動物 I g G 2 a 及び I g G 2 b F c 野生型及び変異によって誘導される CDC 及び ADCP 効果。

CTLA4-bIgG2a 融合物	CDC EC50 値	ADCP EC50 値
CTLA4 Fc bIgG1a 野生型(対照)	0.010µg/mL	0.003µg/mL
CTLA4 Fc bIgG2a 野生型	CDC なし	0.014µg/mL
CTLA4 Fc bIgG2a_L432A	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG2a_N434A	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG2a_M437A	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG2a_L432A_N434A	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG2a_L432A_M437A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2a_N434A_M437A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2a_L432A_N434A_M437A	CDC なし	
CTLA4-bIgG2b 融合物	CDC EC50 値	
CTLA4 Fc bIgG1a 野生型(対照)	0.015µg/mL	
CTLA4 Fc bIgG2b 野生型	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_L432A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_N434A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_M437A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_L432A_N434A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_L432A_M437A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_N434A_M437A	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG2b_L432A_N434A_M437A	CDC なし	

【実施例 7】

【0313】

b I g G 変異はエフェクター機能をノックアウトする

〔000334〕いくつかの変異を、b I g G 3 a アロタイプの F c 領域に導入して、エフェクター機能をノックアウトした：1) b I g G 3 a の b F c g R 1、b F c g R 2、及び b F c g R 3 への結合、2) 細胞ベースのアッセイにおける補体殺傷活性 (CDC)、及び 3) ADCP 細胞ベースのアッセイにおける食作用を排除するか、又は無視できるまで低減する。

【0314】

〔000335〕「Winter」(又は「Win」)部位は、ヒト I g G 1 について上述したように、ヒンジのすぐ下流にある。ヒト I g G 1 のこの LLGG「Winter」部位は、種によって異なる。ウシ科動物 I g G 3 については、それは、PLGG (図 2) である。上記で論じたように、ヒト I g G 1 について、一般的に「LALA」と称される変異は、Leu 234 Ala 及び Leu 235 Ala にある。

【0315】

〔000336〕 b I g G 3 について、対応する W i n t e r 変異は、P r o 2 3 4 A l a、L e u 2 3 5 A l a であるが、追加の残基も変異される。この追加の変異は、G l y 2 3 7 A l a (K a b a t における E u インデックスに従って付番される) である。

【0316】

〔000337〕 b I g G 3 a 上の「P A P から S A S」(P r o 3 2 9 S e r、P r o 3 3 1 S e r) 及び「P A P から S A P」(P r o 3 2 9 S e r) 変異を、b I g G 2 に基づいて考案した。ウシ科動物 I g G 2 は、細胞ベースのアッセイにおいて補体活性を誘発しない。ウシ科動物 I g G 2 a は、C H 2 に天然に存在する S A S 部位を有し、一方、図 2 に示すように、b I g G 3 a は、この領域において P A P である。したがって、b I g G 3 a における P A P を S A S 又は S A P のいずれかに変異させることは、C D C を排除するであろうと仮定された。

【0317】

〔000338〕 上述の変異を、b I g G 3 a F c 上に導入した：W i n t e r 変異のみ、P 2 3 4 A _ _ L 2 3 5 A _ _ G 2 3 7 A 「W i n」(配列番号 2 9)、W i n t e r 変異 + S A S 変異、P 2 3 4 A _ _ L 2 3 5 A _ _ G 2 3 7 A _ _ P 3 2 9 S _ _ P 3 3 1 S 「W i n S A S」(配列番号 3 0)、S A S 変異のみ、P 3 2 9 S _ _ P 3 3 1 S 「S A S」(配列番号 2 8)、及び S A P 変異のみ、P 3 2 9 S 「S A P」(配列番号 2 7)。これらの変異は、図 1 8 で整列され、K a b a t における E u インデックスに従って付番される。

【0318】

〔000339〕 F c γ 受容体についての上記変異の結合親和性を、b I g G 3 a 野生型と比較した。変異体はまた、機能的細胞ベースのアッセイで試験され、データは、W i n 変異のみが C D C をわずかに弱めたが、W i n S A S、S A S のみ、及び S A P のみの変異が C D C 活性を完了したノックアウトしたことを示す。W i n、W i n S A S、S A S、及び S A P の 4 つ全ての変異は、A D C P 機能を完全にノックアウトする。

【実施例 8】

【0319】

ウシ科動物 F c 受容体結合親和性に対する b I g G F c 変異の効果

〔000340〕 b I g G 3 a 及び b I g G 3 b 野生型 F c の S P R B i a c o r e b F c g R 親和性を、上述の b I g G 3 a 及び b I g G 3 b 変異と比較することにより、ウシ科動物 F c γ 受容体への結合をノックアウトする能力を評価した。b I g G 3 a 野生型組換え m A b の 4 つの F c 変異体との定常領域のアラインメントを図 1 8 に示す。b I g G 3 a アロタイプの b I g G 3 b アロタイプとのアラインメントを図 5 に示す。b I g G 3 に対して行われた全ての変異は、a 及び b アロタイプと同一である

【0320】

〔000341〕 上記の実施例に記載されるように、b F c g R 1、R 2、及び R 3 のための B i a c o r e 方法を実施した。表 1 1 は、F c γ 受容体への結合に対するエフェクター機能 b I g G 3 a 及び b I g G 3 b F c 変異の結果を示す。b I g G 3 野生型について、2 つのアロタイプは、1 . 2 5 E - 0 8 と比較して、b F c g R 1、9 . 3 6 E - 0 9 に類似した結合親和性を有する。2 つのアロタイプは、b F c g R 2 及び b F c g R 3 について異なる K D を有するが、両方の野生型アロタイプは結合する。a 及び b アロタイプの両方についての b I g G 3 W i n、b I g G 3 W i n S A S、b I g G 3 S A S、及び b I g G 3 S A P の全ての変異は、b F c g R 1、b F c g R 2、及び b F c g R 3 への結合を無視できる親和性にノックダウンした。したがって、受容体結合をノックアウトすることについて、2 つのアロタイプは比肩する。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1. b I g G 3 a 及び b I g G 3 b 野生型及び変異型 C T L A 4 - F c 融合物のウシ科動物 F c γ 受容体への結合親和性。

CTLA4-bIgG3a Fc 融合物	bFcγR1 KD(M)	bFcγR2 KD(M)	bFcγR3 KD(M)
bIgG3a 野生型	9.36E-09	6.89E-08	7.17E-06
bIgG3b 野生型	1.25E-08	7.06E-07	4.96E-08
bIgG3aWin	LS	NBO	NBO
bIgG3bWin	NBO	NBO	LS
bIgG3aWinSAS	NBO	NBO	WB
bIgG3bWinSAS	NBO	NBO	LS
bIgG3aSAS	NBO	NBO	WB
bIgG3bSAS	NBO	NBO	LS
bIgG3aSAP	NBO	NBO	LS
bIgG3bSAP	NBO	NBO	LS

NBO=結合は観察されず。

WB=弱い結合。

LS=低シグナル、非常に弱い結合を示す。

【 0 3 2 1 】

C D C アッセイ

〔000342〕 C D C 細胞ベースのアッセイは、C D C の媒介において 4 つの C T L A 4 ウシ科動物 I g G 3 a F c 融合タンパク質（図 1 8）の有効性を特徴付け、ウシ科動物 I g G サブタイプの C D C 活性を決定する F c 領域における重要な残基を定義するために開発され、用いられた。このアッセイは、F c 融合タンパク質上の C T L A 4 に結合するイヌ科動物 C D 8 0 を発現するように操作された C H O 標的細胞を利用する。これらの標的細胞は、過去のイヌ科動物 A D C C アッセイで使用されており、それらの信頼性に起因して C D C アッセイにおいて利用された。

【 0 3 2 2 】

〔000343〕 b I g G 3 a C T L A 4 F c 融合物については、上記の実施例に記載されるように、アッセイ方法を実施した。

【 0 3 2 3 】

〔000344〕 図 1 9 及び表 1 2 に示されるように、b I g G 3 a 野生型 F c 及び b I g G 3 b 野生型 F c は、b I g G 1 a 野生型 F c よりもわずかに弱い C D C 活性を示した。W i n 変異自体は、b I g G 3 a F c 又は b I g G 3 b F c の C D C 活性をノックアウトしない。W i n - S A S、S A S のみ、又は S A P のみの変異は全て C D C 活性を完全にノックアウトする。

【 0 3 2 4 】

インシリコモデリング

〔000345〕 サブクラス I g G 1 と同様に、ウシ科動物サブクラス 3 における W I N S A S 変異の効果を、上記と同じ方法論を使用して研究し、同じプロトコルを使用して重ね合わせた（図 2 0 A）。図 1 9 に示されるように、b I g G 3 a 及び b I g G 3 b における W I N S A S 変異は、両方ともに、C D C 機能を完全に抑止した。インシリコモデリングデータは、2 つのアロタイプ、b I g G 3 a _ W I N S A S 及び b I g G 3 b _ W I

NSASが1.16 ÅのRMSDを有することを示し、したがって、同様のタンパク質折り畳みを有することが予想される(図20B)。表11に列挙される結合データ及び図20のインシリコモデリングデータは、bIgG3a_WINSAS及びbIgG_3bが同一の方法で折り畳まれて結合することを示しており、したがって、実験結果及びモデル結果の両方に基づいて、CDC機能に加えて、bIgG3b_WINSAS構築物が、bIgG3a_WINSASと同様のADCP及びADCC機能も排除することを高度に確実に予測する。

【0325】

ADCPアッセイ

【000346】ADCP細胞ベースのアッセイは、ADCPの媒介において4つのCTL A4ウシ科動物IgG3a Fc融合タンパク質(図18)の有効性を特徴付け、ウシ科動物IgGサブタイプのADCP活性を決定するFc領域における重要な残基を定義するために開発され、用いられた。このアッセイは、Fc融合タンパク質上のCTL A4に結合するイヌ科動物CD80を発現するように操作されたCHO標的細胞を利用する。

【0326】

【000347】このアッセイのために、ウシ科動物肺泡マクロファージとのFc融合タンパク質／標的細胞複合体のインキュベーションは、マクロファージ上のFcγ受容体へのFc結合、CHO標的細胞とマクロファージエフェクターとの架橋、及びそれによって標的細胞の食作用の開始をもたらすことができる。ADCPは、共培養におけるエフェクターマクロファージの集団内のpH感受性蛍光色素のシグナル強度及び周波数によって測定され、蛍光細胞は、標的細胞を酸性リソソームに良好に内在化したエフェクターを示す。

【0327】

【000348】簡潔に述べると、イヌ科動物CD80発現CHO細胞(CD80標的細胞)又はCD80を発現しない親CHO細胞(親標的細胞)を、37℃で30分間pHrodo赤色染料で事前染色する。次いで、細胞をCTL A4-Fc融合タンパク質とともに20分間インキュベートして、CTL A4:CD80結合を媒介し、その後、細胞マーカー(CellTrace Violet、CTV)で染色した事前にプレーティングされた接着性ウシ科動物肺泡マクロファージと共培養して、後の同定を補助する。60,000の標的細胞を、96ウェルプレートにおいて、30,000のエフェクターマクロファージとともにプレーティングする。細胞を6時間共培養し、その後プレートから除去し、フローサイトメトリーによって分析して、ADCP(pHrodo+)を良好に実施したエフェクター細胞(CTV+)を同定する。

【0328】

【000349】図21及び表12に示されるように、野生型bIgG3aは、ウシ科動物肺泡マクロファージにおけるADCPの強力な活性化剤である。bIgG3aWin単独、WinSAS、SAS単独、及びSAP単独の変異は全て、ADCP機能を排除する。

【0329】

【000350】注目すべきことに、bIgG3aのWin変異は、最高濃度でいくつかの微量活性を示すが、この変異は、bIgG1a ADCP及びbIgG3a CDCの両方における活性とは対照的に、ADCPを駆動する際にほとんど効果がない。これは、bIgG3a ADCP活性は、Winter部位変異が結合することを必要とする肺泡マクロファージにおけるbFcγRのサブセットを介してのみ媒介されるが、bIgG1aは、Winter部位がこれらの細胞において結合することを必要としない別個のbFcγRを介してADCPを媒介することを示し得る。FcγRの可変利用はまた、bIgG3aと比較して野生型bIgG1aの異なる観察されたEC50を説明することができる。逆に、bIgG1aとbIgG3aとの間の異なる二次構造は、ADCPを駆動する適切な受容体に結合する際のWinter部位の差別的な利用をもたらし得る。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 2. ウシ科動物 I g G 3 a F c 野生型、I g G 3 b F c 野生型、及び変異によって誘導される CDC 及び ADCP 効果。

CTLA4-bIgG3a 融合物	CDC EC50 値	ADCP EC50 値
CTLA4 Fc bIgG1a 野生型(対照)	0.013μg/mL	0.003μg/mL
CTLA4 Fc bIgG3a 野生型	0.021μg/mL	0.029μg/mL
CTLA4 Fc bIgG3aWin	0.030μg/mL	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG3aWin-SAS	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG3aSAS	CDC なし	ADCP なし
CTLA4 Fc bIgG3aSAP	CDC なし	
CTLA4-bIgG3b 融合物	CDC EC50 値	
CTLA4 Fc bIgG1a 野生型(対照)	0.011μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG3a 野生型(対照)	0.022μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG3b 野生型	0.028μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG3bWin	0.062μg/mL	
CTLA4 Fc bIgG3bWin-SAS	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG3bSAS	CDC なし	
CTLA4 Fc bIgG3bSAP	CDC なし	

10

20

【実施例 9】

【0330】

30

b I g G 変異は、F c R n 親和性を改善する

〔000351〕表 1 3 に示すように、ウシ科動物 I g G 3 a は、b I g G 2 a と比較して、p H 6 で b F c R n に対する弱い結合親和性を有する。予想外に、b I g G 2 a は、b I g G 1 a 及び b I g G 3 a よりも 1 0 倍高い親和性を有するが、ウシ科動物 F c R n への p H 7 . 4 での b I g G 2 a 結合は、他の 2 つのサブクラスと比較した場合、より強い。しかしながら、b I g G 2 a ベースの m A b の実証された長い血清半減期のため、抗体を循環 (p H 7 . 4) に戻すために必要な p H での b I g G 2 a のより堅固な結合は、懸念されない。

【0331】

〔000352〕b I g G 2 ベースの m A b は、仔ウシにおいて、ほとんどのヒト治療用 m A b よりも非常に長く、最大 2 1 日間の血清半減期を有する。ウシ科動物 I g G 2 a は、b I g G 1 a よりも p H 6 で b F c R n に強い親和性を有する。したがって、b I g G 3 a サブクラスは、b I g G 2 a よりも短い血清半減期を有し得る。したがって、b I g G 3 a の b F c R n に対する親和性を増加させて、b I g G 2 a に匹敵するインビボ半減期を延長することが望ましい。

40

50

【表 1 3】

表 1 3. b I g G 3 a 野生型及び b I g G 3 a __R 4 3 3 H 変異体の b F c R n に対する結合親和性。

ウシ科動物 IgG mAb	bFcRn、pH6 KD(M)	bFcRn、pH7.4 KD(M)
bIgG1a	3.14E-08	NBO
bIgG2a	3.06E-09	1.31E-07
bIgG3a	3.02E-08	NBO
bIgG3_R433H	9.14E-09	NBO

NBO=結合は観察されず。

10

【0 3 3 2】

〔000353〕 b F c R n に対する親和性を改善するために、b I g G 3 a (A r g 4 3 3 H i s) に点変異を導入した。この変異は、図 2 に示すように、b I g G 1 a 及び b I g G 2 a とのアラインメントに基づいた。加えて、H i s 4 3 5 を有するヒト I g G 3 アロタイプは、A r g 4 3 5 を有するアロタイプよりも劇的に長い血清半減期を有し、この残基位置は、b I g G 3 におけるアルギニンと同じ領域にあり、ヒトアルギニンからたった 2 残基上流である：h I g G 3 については H E A L H N R Y 及び b I g G 3 については H E A L R N H Y (図 2) 。

20

【0 3 3 3】

〔000354〕 b F c R n に対する親和性を改善するために、上述のように、R 4 3 3 H 変異型 b I g G 3 a m A b を生成した。b I g G 3 a 野生型組換え m A b の R 4 3 3 H 変異との定常領域のアラインメントを図 2 2 に示す。

【0 3 3 4】

〔000355〕上記の実施例に記載されるように、ウシ科動物 I g G サブクラスのウシ科動物 F c R n に対する親和性を試験するために、B i a c o r e S P R 結合アッセイを設計した。

30

【0 3 3 5】

〔000356〕 b I g G 3 a __R 4 3 3 H 変異体は、p H 6 で b F c R n に、b I g G 3 a 野生型よりも 5 倍高い親和性で結合し、変異体は、p H 7 . 4 で b F c R n への無視できる結合を保持する (表 1 3) 。したがって、R 4 3 3 H 変異体は、血清半減期を改善し得る。

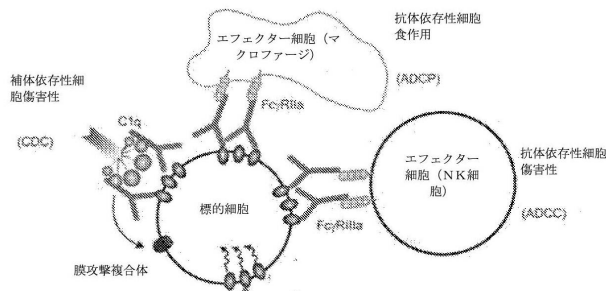
【0 3 3 6】

〔000357〕本発明の好ましい実施形態を説明してきたが、本発明は正確な実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲又は趣旨から逸脱することなく、当業者によって様々な変更及び修正が行われ得ることを理解されたい。

40

【図面】

【図 1】



【図 2】

ウシ IgG1a (1)	1	50
ウシ IgG2a (1)	1	50
ウシ IgG3a (1)	1	50
ウシ IgG1a (51)	51	100
ウシ IgG2a (51)	51	100
ウシ IgG3a (51)	51	100
ウシ IgG1a (101)	101	150
ウシ IgG2a (101)	101	150
ウシ IgG3a (101)	101	150
ウシ IgG1a (126)	126	200
ウシ IgG2a (126)	126	200
ウシ IgG3a (151)	151	200
ウシ IgG1a (176)	176	250
ウシ IgG2a (176)	176	250
ウシ IgG3a (201)	201	250
ウシ IgG1a (228)	228	300
ウシ IgG2a (228)	228	300
ウシ IgG3a (251)	251	300
ウシ IgG1a (276)	276	350
ウシ IgG2a (276)	276	350
ウシ IgG3a (301)	301	350
ウシ IgG1a (328)	328	351
ウシ IgG2a (328)	328	351
ウシ IgG3a (351)	351	351

【図 3】

ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(1)	ASPTAKVYPLSGGCTSSSTFTYGVNSSLRPRRPVTVNLSALAGSP
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(1)	ASPTAKVYPLSGGCTSSSTFTYGVNSSLRPRRPVTVNLSALAGSP
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(1)	ASPTAKVYPLSGGCTSSSTFTYGVNSSLRPRRPVTVNLSALAGSP
ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(51)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(51)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(51)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(101)	RCSTTCDKQDPRPQSGGTPVPAAPATITVSGTPVTVLVVVDQD
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(101)	RCSTTCDKQDPRPQSGGTPVPAAPATITVSGTPVTVLVVVDQD
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(101)	RCSTTCDKQDPRPQSGGTPVPAAPATITVSGTPVTVLVVVDQD
ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(150)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(150)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(150)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(200)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(200)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(200)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(250)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(250)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(250)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1a HCの翻訳 (1S824C9)	(300)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1bの翻訳 (X167C1)	(300)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG1cの翻訳 (Q452014.1)	(300)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP

【図 4】

ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(1)	ASPTAKVYPLSGGCTSSSTFTYGVNSSLRPRRPVTVNLSALAGSP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(1)	ASPTAKVYPLSGGCTSSSTFTYGVNSSLRPRRPVTVNLSALAGSP
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(51)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(51)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(101)	RCSTTCDKQDPRPQSGGTPVPAAPATITVSGTPVTVLVVVDQD
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(101)	RCSTTCDKQDPRPQSGGTPVPAAPATITVSGTPVTVLVVVDQD
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(150)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(150)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(200)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(200)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(250)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(250)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(300)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(300)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2aの翻訳 (X167C2.1)	(350)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP
ウシ IgG2b HCの翻訳 (S824C7)	(350)	DEEFAVQSGDLYGLAGLVTFVSGVQSGTFTGVVPAASSTNVDKAVDP

10

20

30

40

50

【図 5】

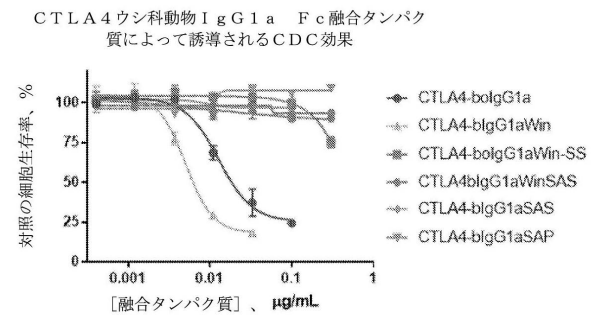
		1		50
ウシIgG3a	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
ウシIgG3b	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
		51		100
ウシIgG3a	(51)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
ウシIgG3b	(51)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
		101		150
ウシIgG3a	(101)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
ウシIgG3b	(101)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
		151		200
ウシIgG3a	(151)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
ウシIgG3b	(151)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
		201		250
ウシIgG3a	(201)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
ウシIgG3b	(201)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
		251		300
ウシIgG3a	(251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
ウシIgG3b	(251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
		301		350
ウシIgG3a	(301)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		
ウシIgG3b	(301)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		
		351		400
ウシIgG3a	(351)	CK		
ウシIgG3b	(351)	CK		

【図 6】

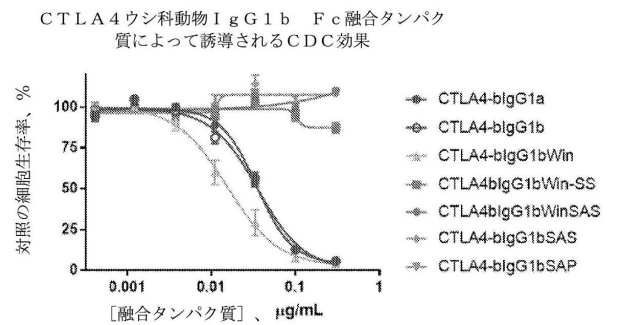
		1		250
ウシIgG1a	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
ウシIgG1aWin	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
ウシIgG1aWinSS	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
ウシIgG1aWinSAS	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
ウシIgG1aWinSAP	(1)	ASCTAPKVVPLASGGLTSSSTVLLGLVSSYMPEPVTWNSDALEGOV		
		251		500
ウシIgG1a	(251)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
ウシIgG1aWin	(251)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
ウシIgG1aWinSS	(251)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
ウシIgG1aWinSAS	(251)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
ウシIgG1aWinSAP	(251)	RIIPAVRQSSGLYSLSMVTVFASSETQFTQNVAFASSTKVDKATA		
		501		750
ウシIgG1a	(501)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
ウシIgG1aWin	(501)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
ウシIgG1aWinSS	(501)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
ウシIgG1aWinSAS	(501)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
ウシIgG1aWinSAP	(501)	PEFVETIKTILVQNPITPKSEVEKTPQQTCKKSLDGLSVLPFPKP		
		751		1000
ウシIgG1a	(751)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
ウシIgG1aWin	(751)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
ウシIgG1aWinSS	(751)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
ウシIgG1aWinSAS	(751)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
ウシIgG1aWinSAP	(751)	KVLTTSQPEVTCVWVWQDDREVQSWFVGVVETATIKPRLEQFN		
		1001		1250
ウシIgG1a	(1001)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
ウシIgG1aWin	(1001)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
ウシIgG1aWinSS	(1001)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
ウシIgG1aWinSAS	(1001)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
ウシIgG1aWinSAP	(1001)	STTVVSAIRIQHQLQKKEKCKVINKCLPAPIVFTLSKQDQAREPQ		
		1251		1500
ウシIgG1a	(1251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
ウシIgG1aWin	(1251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
ウシIgG1aWinSS	(1251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
ウシIgG1aWinSAS	(1251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
ウシIgG1aWinSAP	(1251)	VVLAAPPREELSKSLSLTGLITQFPEELQVWQNGQPESEKYNITA		
		1501		1750
ウシIgG1a	(1501)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		
ウシIgG1aWin	(1501)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		
ウシIgG1aWinSS	(1501)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		
ウシIgG1aWinSAS	(1501)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		
ウシIgG1aWinSAP	(1501)	PGLDAGSGYFLYCKLPYNKSSKQEGDHYTCVWHEALRHNYEKSI9SPF		

10

【図 7 A】



【図 7 B】



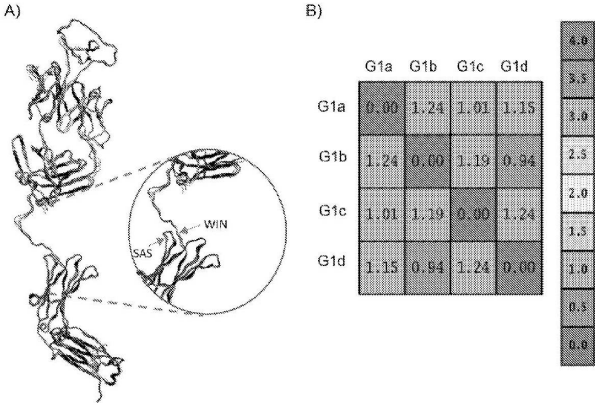
20

30

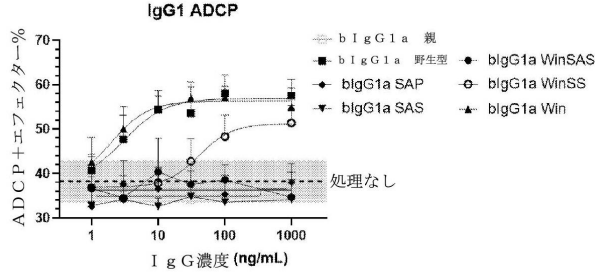
40

50

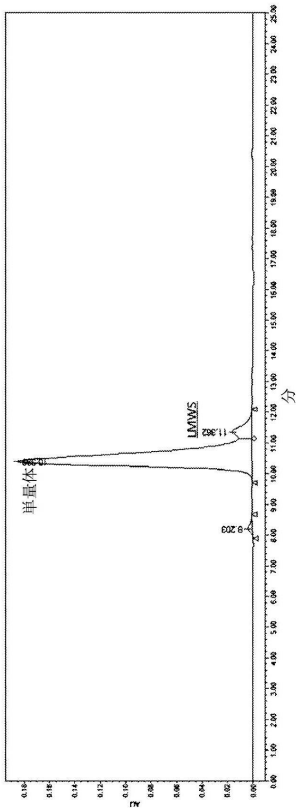
【図 8】



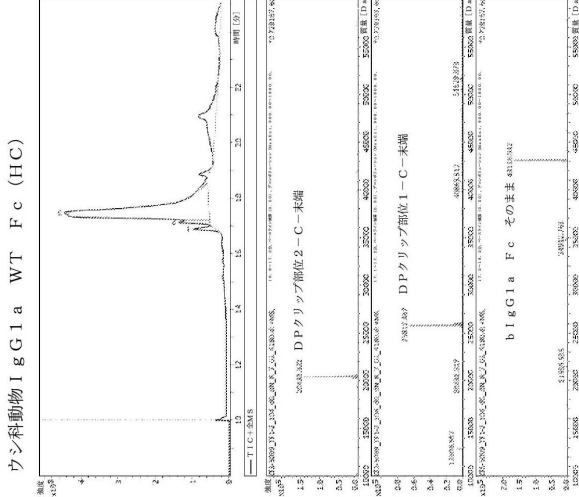
【図 9】



【図 10】



【図 11 A】



10

20

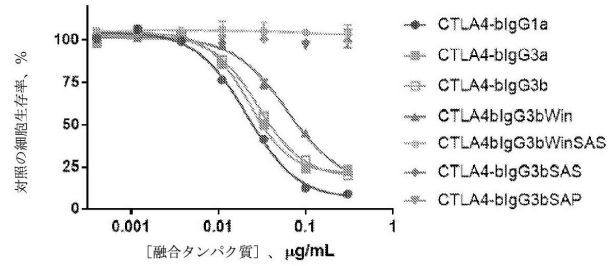
30

40

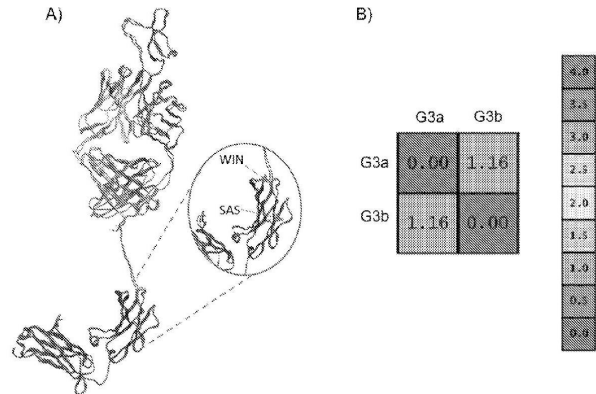
50

【図 19 B】

CTLA4 ウシ科動物 IgG1 a 又は IgG3 b Fc 融合
タンパク質によって誘導される CDC 効果

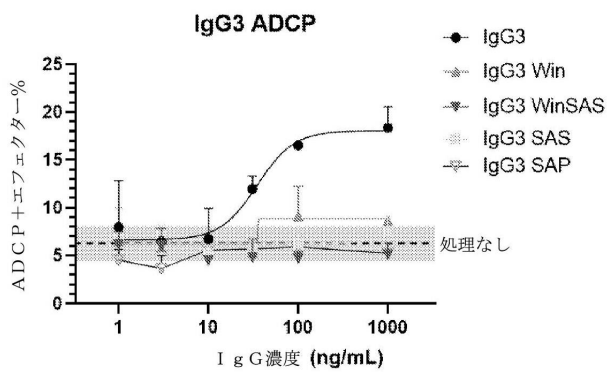


【図 20】



10

【図 21】



【図 22】

```

bGg03_R625H (11) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
クシ IgG3 a (11) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
bGg03_R625H (101) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
クシ IgG3 a (101) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
bGg03_R625H (201) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
クシ IgG3 a (201) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
bGg03_R625H (301) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
クシ IgG3 a (301) 1 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250

```

20

30

40

50

【圖 23-1】

[illegible]

【図 23-2】

2>ト101_EIユインダクサ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5																																																																																																																																																																																																																																																																												

【図 23-3】

2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423	2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432	2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441	2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450	2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468	2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495	2496	2497	2498	2499	2500	2501	2502	2503	2504	2505	2506	2507	2508	2509	2510	2511	2512	2513	2514	2515	2516	2517	2518	2519	2520	2521	2522	2523	2524	2525	2526	2527	2528	2529	2530	2531	2532	2533	2534	2535	2536	2537	2538	2539	2540	2541	2542	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	2567	2568	2569	2570	2571	2572	2573	2574	2575	2576	2577	2578	2579	2580	2581	2582	2583	2584	2585	2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594	2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603	2604	2605	2606	2607	2608	2609	2610	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628	2629	2630	2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637	2638	2639	2640	2641	2642	2643	2644	2645	2646	2647	2648	2649	2650	2651	2652	2653	2654	2655	2656	2657	2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666	2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675	2676	2677	2678	2679	2680	2681	2682	2683	2684	2685	2686	2687	2688	2689	2690	2691	2692	2693	2694	2695	2696	2697	2698	2699	2700	2701	2702	2703	2704	2705	2706	2707	2708	2709	2710	2711	2712	2713	2714	2715	2716	2717	2718	2719	2720	2721	2722	2723	2724	2725	2726	2727	2728	2729	2730	2731	2732	2733	2734	2735	2736	2737	2738	2739	2740	2741	2742	2743	2744	2745	2746	2747	2748	2749	2750	2751	2752	2753	2754	2755	2756	2757	2758	2759	2760	2761	2762	2763	2764	2765	2766	2767	2768	2769	2770	2771	2772	2773	2774	2775	2776	2777	2778	2779	2780	2781	2782	2783	2784	2785	2786	2787	2788	2789	2790	2791	2792	2793	2794	2795	2796	2797	2798	2799	2800	2801	2802	2803	2804	2805	2806	2807	2808	2809	2810	2811	2812	2813	2814	2815	2816	2817	2818	2819	2820	2821	2822	2823	2824	2825	2826	2827	2828	2829	2830	2831	2832	2833	2834	2835	2836	2837	2838	2839	2840	2841	2842	2843	2844	2845	2846	2847	2848	2849	2850	2851	2852	2853	2854	2855	2856	2857	2858	2859	2860	2861	2862	2863	2864	2865	2866	2867	2868	2869	2870	2871	2872	2873	2874	2875	2876	2877	2878	2879	2880	2881	2882	2883	2884	2885	2886	2887	2888	2889	2890	2891	2892	2893	2894	2895	2896	2897	2898	2899	2900	2901	2902	2903	2904	2905	2906	2907	2908	2909	2910	2911	2912	2913	2914	2915	2916	2917	2918	2919	2920	2921	2922	2923	2924	2925	2926	2927	2928	2929	2930	2931	2932	2933	2934	2935	2936	2937	2938	2939	2940	2941	2942	2943	2944	2945	2946	2947	2948	2949	2950	2951	2952	2953	2954	2955	2956	2957	2958	2959	2960	2961	2962	2963	2964	2965	2966	2967	2968	2969	2970	2971	2972	2973	2974	2975	2976	2977	2978	2979	2980	2981	2982	2983	2984	2985	2986	2987	2988	2989	2990	2991	2992	2993	2994	2995	2996	2997	2998	2999	3000																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
2062																														2063																														2064																														2065																														2066																														2067																														2068																														2069																														2070																														2071																														2072																														2073																														2074																														2075																														2076																														2077																														2078																														2079																														2080																														2081																														2082																														2083																														2084																														2085																														2086																														2087																														2088																														2089																														2090																														2091																														2092																														2093																														2094																														2095																														2096																														2097																														2098																														2099																														2100																														2101																														2102																														2103																														2104																														2105																														2106																														2107																														2108																														2109																														2110																														2111																														2112																														2113																														2114																														2115																														2116																														2117																														2118																														2119																														2120																														2121																														2122																														2123																														2124																														2125																														2126																														2127																														2128																														2129																														2130																														2131																														2132																														2133																														2134																														2135																														2136																														2137																														2138																														2139																														2140																														2141																														2142																														2143																														2144																														2145																														2146																														2147																														2148																														2149																														2150																														2151																														2152																														2153																														2154																														2155																														2156																														2157																														2158																														2159																														2160																														2161																														2162																														2163																														2164																														2165																														2166																														2167																														2168																														2169																														2170																														2171																														2172																														2173																														2174																														2175																														2176																														2177																														2178																														2179																														2180																														2181																														2182																														2183																														2184																														2185																														2186																														2187																														2188																														2189																														2190																														2191																														2192																														2193																														2194																														2195																														2196																														2197																														2198																														2199																														2200																														2201																														2202																														2203																														2204																														2205																														2206																														2207																														2208																														2209																														2210																														2211																														2212																														2213																														2214																														2215																														2216																														2217																														2218																														2219																														2220																														2221																														2222																														2223																														2224																														2225																														2226																														2227																														2228																														2229																														2230																														2231																														2232																														2233																														2234																														2235																														2236																														2237																														2238																														2239																														2240																														2241																														2242																														2243																														2244																														2245																														2246																														2247																														2248																														2249																														2250																														2251																														2252																														2253																														2254																														2255																														2256																														2257																														2258																														2259																														2260																														2261																														2262																														2263																														2264																														2265																														2266																														2267																														2268																														2269																														2270																														2271																														2272																														2273																														2274																														2275																														2276																														2277																														2278																														2279																														2280																														2281																														2282																														2283																														2284																														2285																														2286																														2287																														2288																														2289																														2290																														2291																														2292																														2293																														2294																														2295																														2296																														2297																														2298																														2299																														2300																														2301																														2302																														2303																														2304																														2305																														2306																														2307																														2308																														2309																														2310																														2311																														2312																														2313																														2314																														2315																														2316																														2317																														2318																														2319																														2320																														2321																														2322																														2323																														2324																														2325																														2326																														2327																														2328																														2329																														2330																														2331																														2332																														2333																														2334																														2335																														2336																														2337																														2338																														2339																														2340																														2341																														2342																														2343																														2344																														2345																														2346																														2347																														2348																														2349																														2350																														2351																														2352																														2353																														2354																														2355																														2356																														2357																														2358																														2359																														2360																														2361																														2362																														2363																													

【圖 23-4】

12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									
12									

【圖 23-5】

[illegible]

【配列表】

2023551194000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/060161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOMOHIRO OKAGAWA ET AL: FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 8, 7 June 2017 (2017-06-07), XP055644858, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00650 Materials and Methods, first two sections; figure 1 Results, second section, especially indication in penultimate sentence that mutations introduced into bovine CH2 diminished interactions with bovine FcGammaRI and RII ----- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2022

Date of mailing of the international search report

04/05/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, David

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/060161

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Okagawa Tomohiro ET AL: "Supplementary Material Anti-Bovine Programmed Death-1 Rat-Bovine Chimeric Antibody for Immunotherapy of Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle", , 1 January 2017 (2017-01-01), XP055889621, Retrieved from the Internet: URL:https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00650/full#supplementary-material [retrieved on 2022-02-09] Figure S3A -----	1
X	WO 2017/062253 A2 (CIRCLE33 LLC [US]) 13 April 2017 (2017-04-13) page 91; sequences 85, 86, 77 -----	1-4, 18-23, 28-30, 39, 40, 54, 68-85
A	Sandrine Béranger ET AL: "IMGT Scientific chart: Correspondence between the IM GT unique numbering for C-DOM AIN, the IM GT exon numbering, the Eu and Kabat numberings: Human IGHG", , 17 May 2001 (2001-05-17), XP055297333, Retrieved from the Internet: URL:http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html [retrieved on 2016-08-24] -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/060161

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☒ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/060161**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
18, 54(completely); 1-4, 19-23, 28-30, 39, 40, 68-85(partially)

30

40

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2021/060161

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 18, 54 (completely); 1-4, 19-23, 28-30, 39, 40, 68-85 (partially)

A modified IgG comprising: a bovine IgG constant domain comprising at least one amino acid substitution relative to a wild-type bovine IgG constant domain, wherein said substitution is at amino acid residue 216; matter related thereto

2. claims: 1-4, 12-17, 23, 28-30, 39, 40, 48-53, 58, 63, 67-85 (all partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at position 234

3. claims: 1-4, 12-17, 23, 28-30, 39, 40, 48-53, 58, 63, 67-85 (all partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at position 235

4. claims: 1-4, 12-17, 23, 28-30, 39, 40, 48-53, 58, 63, 67-85 (all partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at position 237

5. claims: 55-57 (completely); 1-4, 19-23, 28-30, 39, 40, 58, 63, 67-79, 81-85 (partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at position 270

6. claims: 9, 45 (completely); 1-8, 17, 23, 28-30, 39-44, 53, 58, 63, 67-85 (partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at position 329

7. claims: 11, 31-33, 47 (completely); 1-8, 17, 23, 28-30, 38-44, 53, 58, 63, 67-79, 81-85 (partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at position 330

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2021/060161

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. claims: 10, 46(completely); 1-8, 17, 23, 28-30, 39-44, 53, 58,
63, 67-79, 81-85(partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at
position 331

9. claims: 1-4, 24-30, 34-40, 59-63, 67-85(all partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at
position 432

10. claims: 1-4, 24-30, 34-40, 59-63, 67-85(all partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at
position 434

11. claims: 1-4, 24-30, 34-40, 59-63, 67-85(all partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at
position 437

12. claims: 64-66(completely); 1-4, 29, 30, 39, 40,
67-85(partially)

As invention 1, except wherein the substitution is at
position 433

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No PCT/US2021/060161	
Information on patent family members					
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2017062253 A2		13-04-2017	AU 2016335912 A1	24-05-2018	
			BR 112018006953 A2	23-10-2018	
			CA 3039177 A1	13-04-2017	
			EP 3359190 A2	15-08-2018	
			JP 2018537117 A	20-12-2018	
			US 2022073602 A1	10-03-2022	
			WO 2017062253 A2	13-04-2017	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 0 7 K 16/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 P 21/08
 C 0 7 K 16/00
 A 6 1 K 39/395 Y
 A 6 1 P 43/00 1 7 1
 C 1 2 N 15/13 Z N A

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

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7, カラマズー, ポーテージ・ストリート 3 3 3, ケア・オ
 ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

(72)発明者

ライトル, サンドラ・アン・マリー

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7, カラマズー, ポーテージ・ストリート 3 3 3, ケア・オ
 ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

(72)発明者

カンボス, ヘンリー・ルイス

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7, カラマズー, ポーテージ・ストリート 3 3 3, ケア・オ
 ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

(72)発明者

チュウ, ヤキ

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7, カラマズー, ポーテージ・ストリート 3 3 3, ケア・オ
 ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

(72)発明者

フィシ, グレゴリー・ジョン

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7, カラマズー, ポーテージ・ストリート 3 3 3, ケア・オ
 ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

(72)発明者

バリー, アレキサンダー・ポガサス・ラーランド

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7, カラマズー, ポーテージ・ストリート 3 3 3, ケア・オ
 ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

(72)発明者

シャンボグエ, プラジナ

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 5 2 1, フォート・コリンズ, ランパート・ロード 3 1 8 5, ケ
 ア・オブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
 AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA14 BB36 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 BA72 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74