

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6448368号
(P6448368)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/00 (2006.01)

C O 7 K 16/00 Z N A

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

請求項の数 15 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2014-550023 (P2014-550023)
 (86) (22) 出願日 平成24年12月28日(2012.12.28)
 (65) 公表番号 特表2015-507628 (P2015-507628A)
 (43) 公表日 平成27年3月12日(2015.3.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/011739
 (87) 国際公開番号 W02013/100702
 (87) 国際公開日 平成25年7月4日(2013.7.4)
 審査請求日 平成27年12月10日(2015.12.10)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0147683
 (32) 優先日 平成23年12月30日(2011.12.30)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

前置審査

(73) 特許権者 512188720
 ハンミ サイエンス カンパニー リミテ
 ッド
 HANMI SCIENCE CO., L
 TD.
 大韓民国, 445-813 キョンギード
 , ファソンーシ, ドンタンーミョン, ドン
 タンキヒョンーロ, 550
 550, Dongtangiheung-
 ro, Dongtan-myeon, Hw
 aseong-si, Gyeonggi-
 do 445-813, Republic
 of Korea

(74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンFc変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

FcRnに対する結合親和性が増加した免疫グロブリンFc変異体であって、前記免疫グロブリンFc変異体が、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、433位のヒスチジンがリジンに置換され、434位のアスパラギンがセリンに置換されたアミノ酸修飾を含み、

前記天然免疫グロブリンFcフラグメントが、IgG4 Fcフラグメントであることを特徴とする、免疫グロブリンFc変異体。

【請求項2】

前記免疫グロブリンFc変異体が、配列番号80で表されるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の免疫グロブリンFc変異体。

【請求項3】

FcRnに対する結合親和性が増加した免疫グロブリンFc変異体であって、前記免疫グロブリンFc変異体が、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、428位のメチオニンがロイシンに置換され、433位のヒスチジンがリジンに置換されたアミノ酸修飾を含み、

前記天然免疫グロブリンFcフラグメントが、IgG4 Fcフラグメントであることを特徴とする、免疫グロブリンFc変異体。

【請求項4】

前記免疫グロブリンFc変異体が、配列番号92で表されるアミノ酸配列を有する、請

10

20

求項 3 に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

【請求項 5】

前記天然免疫グロブリン F c フラグメントが、ヒト非グリコシル化 I g G 4 F c フラグメントである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

【請求項 6】

前記天然免疫グロブリン F c フラグメントが、配列番号 73 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

【請求項 7】

前記免疫グロブリン F c 変異体が、免疫グロブリンの可変領域と軽鎖を含まない、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

10

【請求項 8】

前記免疫グロブリン F c 変異体が、動物細胞又は大腸菌で生産される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

【請求項 9】

前記免疫グロブリン F c 変異体が、大腸菌で生産される、請求項 8 に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

【請求項 10】

前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントに比べて、pH 7.4 では低い F c R n 結合親和性を示すが、pH 6.0 では高い F c R n 結合親和性を示す、請求項 1 に記載の免疫グロブリン F c 変異体。

20

【請求項 11】

生体内半減期が延長されたタンパク質結合体であって、生理活性ポリペプチドが、非ペプチド性重合体を介して請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の免疫グロブリン F c 変異体に共有的に連結されることを特徴とする、タンパク質結合体。

【請求項 12】

前記非ペプチド性重合体が、ポリ(エチレングリコール)モノポリマー、ポリ(プロピレングリコール)モノポリマー、エチレングリコール-プロピレングリコール共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン、ヒアルロン酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 11 に記載のタンパク質結合体。

30

【請求項 13】

前記非ペプチド性重合体が、ポリ(エチレングリコール)である、請求項 12 に記載のタンパク質結合体。

【請求項 14】

前記生理活性ポリペプチドが、ヒト成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、インターフェロン、コロニー刺激因子、インターロイキン、可溶性インターロイキン受容体、可溶性 T N F 受容体、グルコセレブロシダーゼ、マクロファージ活性化因子、マクロファージペプチド、B 細胞因子、T 細胞因子、タンパク質 A、アレルギー抑制因子、細胞壊死糖タンパク質、免疫毒素、リンホトキシン、腫瘍壊死因子、腫瘍抑制因子、転移成長因子、1 アンチトリプシン、アルブミン、アポリポタンパク質 E、エリスロポエチン、高グリコシル化エリスロポエチン、血液凝固第 VII 因子、血液凝固第 VIII 因子、血液凝固第 IX 因子、プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、タンパク質 C、C 反応性タンパク質、レニンインヒビター、コラゲナーゼインヒビター、スーパーオキシドジスムターゼ、レプチン、血小板由来成長因子、表皮細胞成長因子、骨成長因子、骨促進タンパク質、カルシトニン、インスリン、インスリン変異体、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1、アトリオペプチン、軟骨誘導因子、結合組織活性化因子、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、神経成長因子、副甲状腺ホルモン、リラキシン、セクレチン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、副腎皮質ホルモン、コレシストキニン、膵臓ポリペプチド、ガストリン放出

40

50

ペプチド、コルチコトロピン放出因子、甲状腺刺激ホルモン、受容体、受容体拮抗物質、細胞表面抗原、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント、及びウイルス由来ワクチン抗原からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載のタンパク質結合体。

【請求項 1 5】

生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させる方法であって、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の免疫グロブリン F c 変異体を、非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結させる工程を含むことを特徴とする、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

本発明は、F c R n (新生児 (neonatal) F c 受容体) に対する結合親和性が増加した免疫グロブリン F c 変異体、及びそれを用いて生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させる方法に関する。本発明の免疫グロブリン F c 変異体は、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域内における 3 0 7 S、3 0 8 F、3 8 0 S、3 8 0 A、4 2 8 L、4 2 9 K、4 3 0 S、4 3 3 K 及び 4 3 4 S (上記ナンバリングは E U インデックスによる) からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含むことを特徴とする。

【背景技術】

【0 0 0 2】

20

抗体とは、特定の抗原に結合する免疫タンパク質である。抗体は、2 つの軽鎖ポリペプチドと 2 つの重鎖ポリペプチドとから構成される。各鎖は免疫グロブリンドメインで構成されており、それらは全て可変領域及び定常領域を含むものである。可変領域は、抗体間において高い配列多様性を示し、標的抗原への結合を担う。相対的に配列多様性が低い定常領域は、複数の天然タンパク質との結合を担い、重要な生化学的反応を誘発する。

【0 0 0 3】

抗体の構造、機能及びサブクラスについての詳細な説明は、公知の文献に詳細に記述されている (非特許文献 1)。I g G における F c ドメイン間の部位は、新生児 F c 受容体 (F c R n) との相互作用を媒介する。F c R n は、エンドサイトーシス (endocytosis) により細胞内に輸送された I g G を取り込み、それをエンドソーム (endosome) から血流に再利用させる (非特許文献 2)。抗体自体のサイズが大きいことによる腎臓濾過の除外と共に、この過程は 1 ~ 3 週間の範囲に延長された抗体の血清半減期をもたらす。

30

【0 0 0 4】

ラット及びヒト F c ドメインに関する研究において、F c R n 結合に対する一部の F c 残基の重要性が証明された。マウス (murine) F c ドメインにおいて、T 2 5 2、T 2 5 4 及び T 2 5 6 位におけるランダム突然変異 (random mutation) 及びファージディスプレイ選択により F c R n 結合親和性が増加し、かつ血清半減期が延長された三重突然変異体 T 2 5 2 L / T 2 5 4 S / T 2 5 6 F が報告されている (非特許文献 3)。I 2 5 3、H 3 1 0 及び H 4 3 5 位における突然変異による F c / F c R n 相互作用の破壊が生体内半減期を減少させることが報告されている (非特許文献 4)。

40

【0 0 0 5】

ヒト F c ドメインにおいては、F c R n の結合に重要な一部の残基の突然変異が血清半減期を延長させることが証明されている。特に、ヒト F c 1 の場合、3 個の残基をそれぞれ 1 9 個の通常の他のアミノ酸に置換すると、一部の点突然変異体は F c R n 結合親和性が増加した (非特許文献 5)。F c のアミノ酸のうち、H 3 1 0 と H 4 3 5、及び L 3 0 9 と I 2 5 3 が、塩橋 (salt bridge) 及び疎水性結合により F c R n との結合に主に関与することが知られている。また、T 2 5 0、M 2 5 2、S 2 5 4、T 2 5 6、V 3 0 8、E 3 8 0、M 4 2 8 及び N 4 3 4 における突然変異が F c R n 結合親和性を増加又は減少させることが報告されている (非特許文献 6)。

【0 0 0 6】

50

特許文献 1 は F c R n 結合親和性が増加したトラスツズマブ (Trastuzumab) (Herceptin, Genentech) 変異体を開示しており、これらの変異体は 2 5 7 C、2 5 7 M、2 5 7 L、2 5 7 N、2 5 7 Y、2 7 9 Q、2 7 9 Y、3 0 8 F 及び 3 0 8 Y からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む。特許文献 2 はベパシズマブ (bevacizumab) (Avastin, Genentech) 変異体を提供しているが、前記変異体は N 4 3 4 S、M 2 5 2 Y / M 4 2 8 L、M 2 5 2 Y / N 4 3 4 S 及び M 4 2 8 L / N 4 3 4 S にアミノ酸修飾を含むことにより生体内半減期が延長される。

【 0 0 0 7 】

治療剤として抗体タンパク質を投与する場合は、タンパク質の除去及び生体内半減期の特性を考慮して、規定された頻度の注射が求められる。より長い生体内半減期はより低い頻度の注射又はより少ない投与量を可能にするが、これは明らかに有利なことである。以前に報告された F c ドメイン内の突然変異は、F c R n 結合親和性が増加し、かつ生体内半減期が延長された一部の抗体変異体を産生したが、これらの突然変異は最適でないことが確認されており、一部の変異体は生体内半減期を満足できるレベルに延長させることができなかった。

【 0 0 0 8 】

一方、生体内半減期を延長させる要求は、抗体タンパク質に限られた問題ではない。低分子量ポリペプチド、サイトカイン及びホルモンをはじめとする治療用タンパク質は、安定性が低いので容易に変性し、血液内のタンパク質分解酵素により分解され、最終的には腎臓又は肝臓の作用により除去される。よって、薬理学的活性成分としてポリペプチドを含むタンパク質薬物は、それらの至適血中濃度及び力価を維持するために、患者に頻繁に投与しなければならない。しかし、ほとんどのタンパク質薬物は注射製剤で患者に投与されるので、活性ポリペプチドの至適血中濃度を維持するための頻繁な注射は多大な苦痛を伴う。

【 0 0 0 9 】

上記問題を解決するために、P E G などの重合体の付着や、ポリペプチド薬物の生体内半減期を延長させるためにアルブミンなどのタンパク質の融合が試みられた。しかし、P E G を付着したり、アルブミンを融合したにもかかわらず、ポリペプチド薬物は依然として相対的に低い生物学的活性を示し、その生体内半減期も満足すべきレベルには延長されなかった。特許文献 3 は、試験管内で免疫グロブリンフラグメントを非ペプチド性重合体と連結して作製した結合体を開示している。この方法では、免疫グロブリンフラグメントのみを大腸菌で生産し、その後非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに連結するが、これは活性減少を最小限に抑えることによりポリペプチドの半減期を延長させる結果をもたらす。この方法は、天然ペプチド及びタンパク質だけでなく、自然界に存在しない非天然又は合成生理活性物質にも適用できる汎用的な技術であることが認められている。しかし、ペプチド及びタンパク質をはじめとする治療用生理活性物質の生体内半減期の最大化は依然として求められている。

【 0 0 1 0 】

よって、本発明者らは、天然免疫グロブリン F c フラグメントと比較して、F c R n 結合親和性が増加した免疫グロブリン F c 変異体を開発した。また、本発明者らは、本発明の免疫グロブリン F c 変異体が非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結されたタンパク質結合体は、F c R n に対する結合親和性が増加することにより生体内半減期がさらに延長されることを確認した。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 韓国登録特許第 1 0 - 1 0 2 7 4 2 7 号公報

【 特許文献 2 】 韓国公開特許第 2 0 1 0 - 0 0 9 9 1 7 9 号公報

【 特許文献 3 】 韓国登録特許第 1 0 - 0 5 6 7 9 0 2 号公報

【 特許文献 4 】 韓国登録特許第 1 0 - 0 8 2 4 5 0 5 号公報

10

20

30

40

50

【特許文献5】韓国登録特許第10-1058290号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Burton DR: Immunoglobulin G: functional sites, Mol. Immunol. 22: 161-206, 1985

【非特許文献2】Raghavan et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 181-220, 1996

【非特許文献3】Ghetie et al., Nat. Biotech. 157: 637-640, 1997

【非特許文献4】Medesan et al., J. Immunol. 1585: 2211-2217, 1997

【非特許文献5】Hinton et al., J. Biol. Chem. 2798: 6213-6216, 2004

【非特許文献6】Roopenian et al., Nat. Review Immunology 7: 715-725, 2007

【非特許文献7】Ghetie and Ward, Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766, 2000

【非特許文献8】Kabat et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991

【非特許文献9】Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 3rd Ed., Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、FcRnに対する結合親和性が増加した免疫グロブリンFc変異体を提供することである。

【0014】

また、本発明のもう一つの目的は、本発明の免疫グロブリンFc変異体を含むタンパク質結合体を提供することである。

【0015】

さらに、本発明のもう一つの目的は、本発明の免疫グロブリンFc変異体を用いて生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させる方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の一態様では、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、307S、308F、380S、380A、428L、429K、430S、433K及び434S（上記ナンバリングはEUIンデックスによる）からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、FcRnに対する結合親和性が増加した免疫グロブリンFc変異体を提供する。

【0017】

本発明の他の態様では、生理活性ポリペプチドが非ペプチド性重合体を介して本発明による免疫グロブリンFc変異体に共有的に連結され、生体内半減期が延長されたタンパク質結合体を提供する。

【0018】

本発明のさらに他の態様では、本発明による免疫グロブリンFc誘導体を非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結する工程を含む、生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させる方法を提供する。

【発明の効果】

【0019】

本発明による免疫グロブリンFc変異体は、FcRnに対する結合親和性が高いので、これらは生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させることができる。よって、本発明の免疫グロブリンFc変異体が非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結され、生体内半減期が延長されたタンパク質結合体は、投与頻度が著しく低いタンパク質薬物の持続性製剤の製造に効果的に用いることができる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明による免疫グロブリンFc変異体のFcRn結合親和性を分析したELISA結果であり、左のグラフはpH6.0での結合親和性を示し、右のグラフはpH7.4での結合親和性を示す。

【図2】本発明による免疫グロブリンFc変異体のFcRn結合親和性を分析したELISA結果であり、左のグラフはpH6.0での結合親和性を示し、右のグラフはpH7.4での結合親和性を示す。

【図3】本発明による免疫グロブリンFc変異体のFcRn結合親和性を分析したELISA結果であり、左のグラフはpH6.0での結合親和性を示し、右のグラフはpH7.4での結合親和性を示す。

10

【図4】免疫グロブリンFc変異体と生理活性ポリペプチドが非ペプチド性重合体を介して連結された、本発明によるタンパク質結合体のFcRn結合親和性を分析したELISA結果であり、左のグラフはpH6.0での結合親和性を示し、右のグラフはpH7.4での結合親和性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の一態様では、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、307S、308F、380S、380A、428L、429K、430S、433K及び434S（上記ナンバリングはEUIンデックスによる）からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、FcRnに対する結合親和性が増加した免疫グロブリンFc変異体に関する。

20

【0022】

本発明における「FcRn」又は「新生児Fc受容体」とは、IgG抗体Fc領域に結合するタンパク質を意味し、少なくとも部分的にはFcRn遺伝子によりコードされる。FcRnは、これらに限定されるものではないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びサルを含む任意の有機体由来のものであってもよい。当該分野で公知のように、機能的FcRnタンパク質は、しばしば軽鎖や重鎖と呼ばれる2つのポリペプチドを含む。軽鎖は2マイクログロブリン（ γ -2-microglobulin）であり、重鎖はFcRn遺伝子によりコードされる。本発明において、特に断らない限り、FcRn又はFcRnタンパク質とは、FcRn重鎖と2マイクログロブリンの複合体を示すものである。

30

【0023】

本発明における「天然（野生型）ポリペプチド」とは、変異体を生産するように修飾された非修飾ポリペプチドを意味する。天然ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチド又はその誘導体もしくは操作されたものである。天然ポリペプチドは、ポリペプチドそれ自体、それを含む組成物、又はそれをコード化するアミノ酸配列を示すものであってもよい。よって、本発明における「天然免疫グロブリン」とは、アミノ酸修飾により変異体を生成する非修飾免疫グロブリンポリペプチドを意味する。アミノ酸修飾により変異体を生成する非修飾免疫グロブリンポリペプチドを意味する「親（parent）免疫グロブリン」という用語を互換的に用いることもできる。

40

【0024】

本発明における「アミノ酸修飾」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、挿入及び／又は欠失、好ましくは置換を意味する。本発明における「アミノ酸置換」又は「置換」とは、天然ポリペプチド配列の特定の位置においてアミノ酸が他のアミノ酸に置換されることを意味する。例えば、T307S置換を含む免疫グロブリンFc変異体とは、天然免疫グロブリンFcフラグメントのアミノ酸配列において307位のスレオニンがセリンに置換されたものを意味する。

【0025】

本発明における「免疫グロブリンFc変異体」とは、天然免疫グロブリンFcフラグメントと比較して、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むことを意味する。本発明の好まし

50

い実施態様において、免疫グロブリンFc変異体とは、天然免疫グロブリンFcフラグメントと比較して、FcRnに対する結合親和性を増加させるために、307S、308F、380S、380A、428L、429K、430S、433K及び434S（上記ナンバリングはEUIンデックスによる）からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む変異体を意味する。

【0026】

本発明は、FcRnに対する結合親和性が改善された、免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域における複数の突然変異に対する同定に基づくものである。本発明は、対応する天然免疫グロブリンFcフラグメントと比較して、FcRnに対する結合親和性が増加し、及び/又は生体内半減期が延長された免疫グロブリンFc変異体を提供する。抗体及び他の生理活性物質の生体内半減期（すなわち、被験者の血清又は他の組織における持続性）は、その投与用量及び頻度を決定する重要な臨床的指標である。よって、生体内半減期が延長された抗体をはじめとする生理活性分子は、薬学的に重要かつ有利である。

【0027】

これに関して、免疫グロブリンの生体内半減期がFcRnに対するFcの結合と関連することが報告されている。免疫グロブリンFcフラグメントは、非特異的な飲作用（pinocytosis）により内皮細胞に取り込まれ、その後酸性エンドソームに取り込まれる。FcRnは、エンドソームの酸性pH（ < 6.5 ）では免疫グロブリンに結合し、血流の塩基性pH（ > 7.4 ）では免疫グロブリンを放出する。よって、FcRnは、免疫グロブリンをリソソーム分解からサルベージする。血清免疫グロブリンレベルが低下すると、増大した量の免疫グロブリンがサルベージされるように、より多くのFcRn分子が免疫グロブリン結合のために利用されうる。逆に、血清免疫グロブリンレベルが上昇すると、FcRnが飽和することにより、取り込まれて分解される免疫グロブリンの比率が増加する（非特許文献7）。

【0028】

FcRnに対する免疫グロブリンFcフラグメントの結合と免疫グロブリンの生体内半減期の密接な関係に基づいて、低pH環境ではFcRnに対する結合親和性が増加するが、高pH環境では実質的に変化を呈さない免疫グロブリンFc変異体を開発するために、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域に複数の突然変異を導入した。その結果として、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、アミノ酸残基307、308、380、428、429、430、433及び434（上記ナンバリングはEUIンデックスによる）からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾がFcRnに対する結合親和性を増加させることが確認された。

【0029】

よって、本発明は、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、307S、308F、380S、380A、428L、429K、430S、433K及び434S（上記ナンバリングはEUIンデックスによる）からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む免疫グロブリンFc変異体を提供する。

【0030】

本発明の好ましい一実施態様では、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、428L/434S、433K/434S、429K/433K、428L/433K、308F/380A、307S/380S及び380S/434Sからなる群から選択されるアミノ酸修飾を含む免疫グロブリンFc変異体を提供する。

【0031】

本発明の具体的な一実施態様では、天然免疫グロブリンFcフラグメントの定常領域において、428位のメチオニンがロイシンに置換され、434位のアスパラギンがセリンに置換された免疫グロブリンFc変異体を提供する。428L/434Sのアミノ酸修飾を含む免疫グロブリンFc変異体は配列番号74で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号113で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリンFc変異体をHMC002と命名する。

【 0 0 3 2 】

本発明の他の具体的な実施態様では、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、433 位のヒスチジンがリジンに置換され、434 位のアスパラギンがセリンに置換された免疫グロブリン F c 変異体を提供する。433 K / 434 S のアミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c 変異体は配列番号 80 で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号 114 で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリン F c 変異体を H M C 0 0 8 と命名する。

【 0 0 3 3 】

本発明のさらに他の具体的な実施態様では、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、429 位のヒスチジンがリジンに置換され、433 位のヒスチジンがリジンに置換された免疫グロブリン F c 変異体を提供する。429 K / 433 K のアミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c 変異体は配列番号 91 で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号 115 で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリン F c 変異体を H M C 0 1 9 と命名する。

【 0 0 3 4 】

本発明のさらに他の具体的な実施態様では、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、428 位のメチオニンがロイシンに置換され、433 位のヒスチジンがリジンに置換された免疫グロブリン F c 変異体を提供する。428 L / 433 K のアミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c 変異体は配列番号 92 で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号 116 で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリン F c 変異体を H M C 0 2 0 と命名する。

【 0 0 3 5 】

本発明のさらに他の具体的な実施態様では、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、308 位のバリンがフェニルアラニンに置換され、380 位のグルタミン酸がアラニンに置換された免疫グロブリン F c 変異体を提供する。308 F / 380 A のアミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c 変異体は配列番号 100 で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号 117 で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリン F c 変異体を H M C 0 2 8 と命名する。

【 0 0 3 6 】

本発明のさらに他の具体的な実施態様では、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、307 位のスレオニンがセリンに置換され、380 位のグルタミン酸がセリンに置換された免疫グロブリン F c 変異体を提供する。307 S / 380 S のアミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c 変異体は配列番号 101 で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号 118 で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリン F c 変異体を H M C 0 2 9 と命名する。

【 0 0 3 7 】

本発明のさらに他の具体的な実施態様では、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、380 位のグルタミン酸がセリンに置換され、434 位のアスパラギンがセリンに置換された免疫グロブリン F c 変異体を提供する。380 S / 434 S のアミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c 変異体は配列番号 103 で表されるアミノ酸配列を有し、これは配列番号 119 で表される塩基配列を有するヌクレオチドによりコードされる。本発明においては、上記免疫グロブリン F c 変異体を H M C 0 3 1 と命名する。

【 0 0 3 8 】

前述した免疫グロブリン F c 変異体の作製に用いられる親 (parent) 免疫グロブリン F c フラグメントは、特許文献 4 に記載された大腸菌形質転換体 H M 1 1 2 0 1 (K C C M - 1 0 6 6 0 P) から生産された H M C 0 0 1 であることが好ましい。H M C 0 0 1 は、配列番号 73 で表されるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン F c フラグメントである。

【 0 0 3 9 】

本発明において、免疫グロブリン F c 変異体は親免疫グロブリン F c フラグメントに導入されたアミノ酸修飾により規定され、そのアミノ酸残基のナンバリングはカバットの E

10

20

30

40

50

Uインデックスによる（非特許文献8）。ここで、本発明において親免疫グロブリンFcフラグメントとして用いられたHMC001は、大腸菌形質転換体から生産する際に一部のN末端が除去されて開始メチオニンが欠失した免疫グロブリンFcフラグメントであるので、カバットのナンバリングによるものではないことがある。本発明に親免疫グロブリンFcフラグメントとして用いられたHMC001は1位のアミノ酸としてプロリンを有し、本発明による免疫グロブリンFc変異体のアミノ酸ナンバリングはそれによるものである。しかし、本発明による免疫グロブリンFc変異体の突然変異部位はHMC001に限定されるものではなく、カバットのナンバリングにより規定されてもよい。例えば、HCM001の「81T」はカバットのナンバリングによる「307T」と同一である。

【0040】

10

本発明による免疫グロブリンFc変異体は、低いpH、例えばエンドソームのpH6.0では結合親和性が増加するが、高いpH、例えばpH7.4では結合親和性が増加しない。また、エンドソームへの取り込みは増加するが、本発明の免疫グロブリンFc変異体は正常速度で放出されることにより生体内半減期が延長される。

【0041】

本発明において、天然免疫グロブリンFcフラグメントは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4由来のFcフラグメントであってもよい。本発明において、天然免疫グロブリンFcフラグメントは、好ましくは、ヒトIgG4由来のFcフラグメントであって、可変領域と重鎖を含まず、非グリコシル化されたものであってもよい。

【0042】

20

本発明による免疫グロブリンFc変異体は、天然免疫グロブリンFcフラグメントと比較して、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、それにより異なるアミノ酸配列を有する。本発明による免疫グロブリンFc変異体のアミノ酸配列は、天然免疫グロブリンFcフラグメントのアミノ酸配列と実質的に相同である。例えば、本発明による免疫グロブリンFc変異体のアミノ酸配列は、天然免疫グロブリンFcフラグメントのアミノ酸配列と約80%以上の相同性、好ましくは約90%以上の相同性、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する。アミノ酸修飾は、分子生物学的方法を用いて遺伝的に行ってもよく、酵素的又は化学的方法を用いて行ってもよい。

【0043】

本発明による免疫グロブリンFc変異体は、当該分野で公知の任意の方法で作製することができる。一実施態様において、本発明による免疫グロブリンFc変異体は、特定のアミノ酸修飾を含むポリペプチド配列をコードし、必要に応じて、次に宿主細胞にクローニングされ、発現及び検定される核酸の形成に用いられる。様々な方法が関連文献に記載されている（非特許文献9）。

30

【0044】

本発明による免疫グロブリンFc変異体をコードする核酸は、タンパク質の発現のために発現ベクターに導入することができる。発現ベクターは、一般に制御もしくは調節（regulatory）配列、選択可能マーカー、任意の融合パートナー、及び/又は追加的要素と作動可能に連結された、すなわち、機能的関係にあるタンパク質を含む。本発明による免疫グロブリンFc変異体は、核酸、好ましくは免疫グロブリンFc変異体をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、その発現を誘導するか又は引き起こすための適切な条件下で培養することにより生産される。多種多様な適切な宿主細胞には、これらに限定されるものではないが、哺乳動物細胞、バクテリア細胞、昆虫細胞及び酵母細胞が含まれる。外因性核酸を宿主細胞に導入する方法は、当該分野で公知であり、用いられる宿主細胞により異なる。本発明による免疫グロブリンFc変異体を生産するための宿主細胞として、生産費が安価であることから産業的に有用な大腸菌を用いることが好ましい。

40

【0045】

よって、本発明の範囲には、1)免疫グロブリンFc変異体をコードする核酸が導入された宿主細胞をタンパク質の発現に適した条件下で培養する工程と、2)宿主細胞から発

50

現した免疫グロブリンFc変異体を精製又は分離する工程とを含む免疫グロブリンFc変異体を作製する方法が含まれる。

【0046】

抗体は、当該分野で公知の様々な方法で分離又は精製することができる。標準精製方法には、クロマトグラフィー技術、電気泳動、免疫沈殿、透析、濾過、濃縮及びクロマト分画(chromatofocusing)技術が含まれる。当該分野で公知のように、例えば細菌性タンパク質A、G、Lなどの様々な天然タンパク質を抗体に結合することができるので、これらのタンパク質を抗体の精製に用いることができる。時には、特定の融合パートナーを用いて精製することもできる。例えば、GST融合の場合はグルタチオンレジンを用い、His-tagの場合はNi²⁺アフィニティークロマトグラフィーを用い、flag-tagの場合は固定化抗フラグ(flag)抗体を用いることにより、タンパク質を精製することができる。

10

【0047】

本発明の他の態様では、生理活性ポリペプチドが非ペプチド性重合体を介して本発明の免疫グロブリンFc変異体に共有的に連結された、生体内半減期が延長されたタンパク質結合体に関する。

【0048】

本発明による免疫グロブリンFc変異体は、エンドソームの低いpH、例えばpH6.0では結合親和性が増加するのに対して、高いpH、例えばpH7.4では結合親和性がそれほど増加しない。よって、エンドソームへのこれらの取り込みは増加するが、これらが正常速度で放出されるので、生体内半減期は延長される(図1参照)。よって、本発明による免疫グロブリンFc変異体は、タンパク質薬物をはじめとする生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させるためのキャリア(carrier)として用いることができる。よって、本発明のタンパク質結合体は、FcRnに対する高い結合親和性により大幅に生体内半減期が延長された持続性製剤の製造に効果的に用いることができる。

20

【0049】

また、本発明は、本発明の免疫グロブリンFc変異体を非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結して持続性製剤を製造する方法を提供する。

【0050】

本発明による製造方法は、1)末端反応基を有する非ペプチド性重合体を介して免疫グロブリンFc変異体を生理活性ポリペプチドに共有的に連結する工程と、2)生理活性ポリペプチド、非ペプチド性重合体及び免疫グロブリンFc変異体が共有的に連結された結合体を分離する工程とを含んでもよい。

30

【0051】

本発明に有用な非ペプチド性重合体は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール-プロピレングリコール共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、PLA(ポリ乳酸, polylactic acid)及びPLGA(ポリ乳酸-グリコール酸, polylactic-glycolic acid)などの生分解性高分子、脂質重合体、キチン、ヒアルロン酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、好ましくはポリエチレングリコールである。また、当該分野に知られたこれらの誘導体や、通常の技術を用いて容易に作製できるこれらの誘導体も本発明の範囲に含まれる。

40

【0052】

本発明による免疫グロブリンFc変異体に結合される生理活性ポリペプチドは、生体内半減期の延長を必要とするものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、ヒトの疾病を治療又は予防する目的で用いられるサイトカイン、インターロイキン、インターロイキン結合タンパク質、酵素、抗体、成長因子、転写因子、血液凝固因子、ワクチン、構造タンパク質、リガンドタンパク質又は受容体、細胞表面抗原、受容体拮抗物質などの様々な生理活性ポリペプチド、及びそれらの誘導体もしくは類似体を用いることができる。

50

【 0 0 5 3 】

本発明に有用な生理活性ポリペプチドの例としては、ヒト成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、インターフェロン及びインターフェロン受容体（例えば、インターフェロン α 、 β 及び γ 、可溶性I型インターフェロン受容体）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、グルカゴン様ペプチド（glucagon-like peptide）（GLP-1）、Gタンパク質共役受容体（G-protein-coupled receptor）、インターロイキン（例えば、IL-1受容体、IL-4受容体）、酵素（例えば、グルコセレブロシダーゼ（glucocerebrosidase）、イズロン酸-2-スルファターゼ（iduronate-2-sulfatase）、ガラクトシダーゼA、アガルシダーゼ α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 κ 、 λ 、 μ 、 ν 、 ξ 、 \omicron 、 π 、 ρ 、 σ 、 τ 、 υ 、 ϕ 、 χ 、 ψ 、 ω 、 α -L-イズロニダーゼ（alpha-L-iduronidase）、ブチリルコリンエステラーゼ（butyrylcholinesterase）、キチナーゼ（chitinase）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（glutamate decarboxylase）、イミグルセラーゼ（imiglucerase）、リパーゼ（lipase）、ウリカーゼ（uricase）、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（platelet-activating factor acetylhydrolase）、中性エンドペプチダーゼ（neutral endopeptidase）、ミエロペルオキシダーゼ（myeloperoxidase）、インターロイキン及びサイトカイン結合タンパク質（例えば、IL-18bp、TNF結合タンパク質）、マクロファージ活性化因子、マクロファージペプチド、B細胞因子、T細胞因子、タンパク質A、アレルギー抑制因子、細胞壊死糖タンパク質、免疫毒素、リンホトキシン、腫瘍壊死因子、腫瘍抑制因子、転移成長因子、1アンチトリプシン、アルブミン、 α -ラクトアルブミン（alpha-lactalbumin）、アポリポタンパク質E、エリスロポエチン、高グリコシル化エリスロポエチン、アンジオポエチン（angiopoietin）、ヘモグロビン、トロンビン（thrombin）、トロンビン受容体活性化ペプチド、トロンボモジュリン（thrombomodulin）、血液凝固第VII因子、血液凝固第VIIa因子、血液凝固第VIII因子、血液凝固第IX因子、血液凝固第XIII因子、プラスミノーゲン活性化因子、フィブリン結合ペプチド、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、ヒルジン（hirudin）、タンパク質C、C反応性タンパク質、レニンインヒビター、コラゲナーゼインヒビター、スーパーオキシドジスムターゼ、レプチン、血小板由来成長因子、上皮細胞成長因子、表皮細胞成長因子、アンジオスタチン（angiostatin）、エンドスタチン（endostatin）アンジオテンシン（angiotensin）、骨成長因子（bone growth factor）、骨促進タンパク質（bone stimulating protein）、カルシトニン、インスリン、アトリオペプチン、軟骨誘導因子、エルカトニン（elcatonin）、結合組織活性化因子、組織因子経路インヒビター（tissue factor pathway inhibitor）、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、神経成長因子（例えば、神経成長因子、毛様体神経栄養因子（ciliary neurotrophic factor）、アキシジェネシス因子-1（axogenesis factor-1）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（brain-natriuretic peptide）、グリア細胞由来神経栄養因子（glial derived neurotrophic factor）、ネトリン（netrin）、好中球抑制因子（neutrophil inhibitor factor）、神経栄養因子、ニューロツリン（neurturin）、副甲状腺ホルモン、リラキシン、セクレチン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、副腎皮質ホルモン、グルカゴン、コレシストキニン、膵臓ポリペプチド、ガストリン放出ペプチド、コルチコトロピン放出因子、甲状腺刺激ホルモン、オートタキシン（autotaxin）、ラクトフェリン（lactoferrin）、ミオスタチン（myostatin）、受容体（例えば、TNFR（P75）、TNFR（P55）、IL-1受容体、VEGF受容体、B細胞活性化因子受容体）、受容体拮抗物質（例えば、IL1-Ra）、細胞表面抗原（例えば、CD2、3、4、5、7、11a、11b、18、19、20、23、25、33、38、40、45、69）、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント（例えば、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFd）、及びウイルス由来ワクチン抗原が挙げられるが、これらに限定されるものではない。抗体フラグメントは、特定の抗原に結合する能力を有するFab、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFvからなる群から選択される。

【 0 0 5 4 】

生理活性ポリペプチドが非ペプチド性重合体を介して本発明の免疫グロブリンFc変異

10

20

30

40

50

体に共有的に連結されたタンパク質結合体は、FcRnに対する高い結合親和性により生体内半減期が著しく延長される（図4参照）。よって、本発明による免疫グロブリンFcフラグメントをキャリアとして用いて作製されたタンパク質結合体は、血中持続性が増加するので、投与頻度を著しく減少させることができる。

【実施例】

【0055】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。しかし、これらの実施例は単に本発明を具体的に開示するために用いられるものと理解すべきであり、これらが本発明を特定の形態に限定するものと理解すべきではない。

【0056】

実施例1：免疫グロブリンFcフラグメントを発現するベクターの作製

ヒトFcRnに対する結合親和性に関与する部位を大腸菌形質転換体HM11201（KCCM-10660P，特許文献4）から生産されたHMC001のアミノ酸配列（配列番号73）から選択し、FcRnに対する結合親和性を増加させるために、当該部位のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する突然変異（mutagenesis）を誘導した。このために、ヌクレオチド置換用プライマーとクイックチェンジ部位特異的突然変異誘発キット（QuikChange™ Site-directed Mutagenesis kit, Stratagene）を用いた。これに関して、部位特異的突然変異に用いられたプライマーを表1～3に示す。

【0057】

重合酵素連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）による部位特異的突然変異のために、PCRチューブに50ngのHMC001発現ベクター、各プライマー対、dNTP及びPfuTurbo™重合酵素（Stratagene）を添加し、95℃で30秒間の変性、95℃で30秒間、55℃で1分間、68℃で14分間の16サイクル、68℃で5分間の最終伸長の条件で反応を行った。前述したように増幅された約1.2kbのPCR産物に対してDNAシーケンシングにより塩基配列を分析し、その結果を表4に示す。表4に示すアミノ酸ナンバリングはEUIンデックスによるものであり、括弧内の数字はHMC001のアミノ酸配列（配列番号73）に基づくアミノ酸ナンバリングである。

【0058】

増幅された各PCR産物をNdeIとBamHIで切断し、同じ制限酵素で処理しておいたプラスミドpET22b（Novagen）に挿入することにより、各免疫グロブリンFc変異体を含む発現ベクターを得た。

【0059】

10

20

30

【表 1】

変異体	プライマー	塩基配列	配列 番号
HMC002 HMC023	FcM202Lss	CTTCTCATGCTCCGTGCTGCATGAGGCTCTGCAC	1
HMC002 HMC023	FcM202Las	GTGCAGAGCCTCATGCAGCACGGAGCATGAGAAG	2
HMC002 HMC006 HMC026 HMC031 HMC036 HMC037 HMC038 HMC040	FcN208Sss	CATGAGGCTCTGCACAGCCACTACACACAGAAG	3
HMC002 HMC006 HMC026 HMC031 HMC036 HMC037 HMC038 HMC040	FcN208Sas	CTTCTGTGTGTAGTGGCTGTGCAGAGCCTCATG	4
HMC003	FcI27Fss	CAAGGACACCCTCATGTTCTCCCGGACCCCTGAG	5
HMC003	FcI27Fas	CTCAGGGGTCCGGGAGAACATGAGGGTGTCCCTG	6
HMC004	FcH207Tss	GATGCATGAGGCTCTGACCAACCACTACACACAG	7
HMC004	FcH207Tas	CTGTGTGTAGTGGTTGGTCAGAGCCTCATGCATC	8
HMC005	FcH207Kss	GATGCATGAGGCTCTGAAGAACCACTACACACAG	9
HMC005	FcH207Kas	CTGTGTGTAGTGGTTCTTCAGAGCCTCATGCATC	10
HMC006 HMC011	FcL83Fss	CAGCGTCCTCACCGTCTTCCACCAGGACTGGCTG	11
HMC006 HMC011	FcL83Fas	CAGCCAGTCCTGGTGAAGACGGTGAGGACGCTG	12
HMC007	FcI27Lss	CAAGGACACCCTCATGCTCTCCCGGACCCCTGAG	13
HMC007	FcI27Las	CTCAGGGGTCCGGGAGAGCATGAGGGTGTCCCTG	14
HMC008	FcH207K/N208Sss	GATGCATGAGGCTCTGAAGAGCCACTACACACAG	15
HMC008	FcH207K/N208Sas	CTGTGTGTAGTGGCTCTTCAGAGCCTCATGCATC	16
HMC009	FcN208Tss	CATGAGGCTCTGCACACCCACTACACACAGAAG	17
HMC009	FcN208Tas	CTTCTGTGTGTAGTGGGTGTGCAGAGCCTCATG	18
HMC010	FcH207T/N208Sss	GATGCATGAGGCTCTGACCAGCCACTACACACAG	19
HMC010	FcH207T/N208Sas	CTGTGTGTAGTGGCTGGTCAGAGCCTCATGCATC	20
HMC012	FcE204Rss	ATGCTCCGTGATGCATCGGGCTCTGCACAACCAC	21
HMC012	FcE204Ras	GTGGTTGTGCAGAGCCCGATGCATCACGGAGCAT	22
HMC013	FcE204Kss	ATGCTCCGTGATGCATAAGGCTCTGCACAACCAC	23
HMC013	FcE204Kas	GTGGTTGTGCAGAGCCTTATGCATCACGGAGCAT	24

【 0 0 6 0 】

【表 2】

変異体	プライマー	塩基配列	配列番号
HMC014	FcE204R/H207K _{ss}	TGCTCCGTGATGCATCGGGCTCTGAAGAACCACTACACACAG	25
HMC014	FcE204R/H207K _{as}	CTGTGTGTAGTGGTTCTTCAGAGCCCGATGCATCACGGAGCA	26
HMC015	FcE204K/H207K _{ss}	TGCTCCGTGATGCATAAGGCTCTGAAGAACCACTACACACAG	27
HMC015	FcE204K/H207K _{as}	CTGTGTGTAGTGGTTCTTCAGAGCCTTATGCATCACGGAGCA	28
HMC016	FcH203R _{ss}	CTCATGCTCCGTGATGCGTGAGGCTCTGCACAAC	29
HMC016	FcH203R _{as}	GTTGTGCAGAGCCTCACGCATCACGGAGCATGAG	30
HMC017	FcH203K _{ss}	CTCATGCTCCGTGATGAAGGAGGCTCTGCACAAC	31
HMC017	FcH203K _{as}	GTTGTGCAGAGCCTCCTTCATCACGGAGCATGAG	32
HMC018	FcH203R/H207K _{ss}	CATGCTCCGTGATGCGTGAGGCTCTGAAGAACCACTACACACAG	33
HMC018	FcH203R/H207K _{as}	CTGTGTGTAGTGGTTCTTCAGAGCCTCACGCATCACGGAGCATG	34
HMC019	FcH203K/H207K _{ss}	CATGCTCCGTGATGAAGGAGGCTCTGAAGAACCACTACACACAG	35
HMC019	FcH203K/H207K _{as}	CTGTGTGTAGTGGTTCTTCAGAGCCTCCTTCATCACGGAGCATG	36
HMC020	FcM202L/H207K _{ss}	CTTCTCATGCTCCGTGCTGCATGAGGCTCTGAAGAACCACTACA CACAG	37
HMC020	FcM202L/H207K _{as}	CTGTGTGTAGTGGTTCTTCAGAGCCTCATGCAGCACGGAGCATG AGAAG	38
HMC021	FcH203K/N208T _{ss}	CTCATGCTCCGTGATGAAGGAGGCTCTGCACACCCACTACACAC AGAAG	39
HMC021	FcH203K/N208T _{as}	CTTCTGTGTGTAGTGGGTGTGCAGAGCCTCCTTCATCACGGAGC ATGAG	40
HMC022 HMC023	FcT81E _{ss}	GTGGTCAGCGTCCTCGAAGTCCTGCACCAGGAC	41
HMC022 HMC023	FcT81E _{as}	GTCCTGGTGCAGGACTTCGAGGACGCTGACCAC	42
HMC024 HMC026 HMC028	FcE154A _{ss}	AGCGACATCGCCGTGGCGTGGGAGAGCAATGGG	43
HMC024 HMC026 HMC028	FcE154A _{as}	CCCATTGCTCTCCCACGCCACGGCGATGTCGCT	44

10

20

30

【 0 0 6 1 】

【表 3】

変異体	プライマー	塩基配列	配列 番号
HMC025 HMC029 HMC031	FcE154Sss	AGCGACATCGCCGTGTCGTGGGAGAGCAATGGG	45
HMC025 HMC029 HMC031	FcE154Sas	CCCATTGCTCTCCCACGACACGGCGATGTCGCT	46
HMC027 HMC028	FcV82Pss	GTCAGCGTCCTCACCCCCCTGCACCAGGACTGG	47
HMC027 HMC028	FcV82Pas	CCAGTCCTGGTGCAGGGGGGTGAGGACGCTGAC	48
HMC027	FcE204Sss	TGCTCCGTGATGCATTCCGGCTCTGCACAACCAC	49
HMC027	FcE204Sas	GTGGTTGTGCAGAGCCGAATGCATCACGGAGCA	50
HMC029	FcT81Sss	GTGGTCAGCGTCCTCTCCGTCCTGCACCAGGAC	51
HMC029	FcT81Sas	GTCCTGGTGCAGGACGGAGAGGACGCTGACCAC	52
HMC030	FcH203A/E204Sss	TCATGCTCCGTGATGGCTTCGGCTCTGCACAACC	53
HMC030	FcH203A/E204Sas	GGTTGTGCAGAGCCGAAGCCATCACGGAGCATGA	54
HMC032	FcH207A/N208Sss	GATGCATGAGGCTCTGGCCAGCCACTACACACAG	55
HMC032	FcH207A/N208Sas	CTGTGTGTAGTGGCTGGCCAGAGCCTCATGCATC	56
HMC033	FcE204A/N208Sss	GCTCCGTGATGCATGCGGCTCTGCACAGCCAC	57
HMC033	FcE204A/N208Sas	GTGGCTGTGCAGAGCCGCATGCATCACGGAGC	58
HMC034	FcH203A/N208Sss	CTCATGCTCCGTGATGGCTGAGGCTCTGCACAGC	59
HMC034	FcH203A/N208Sas	GCTGTGCAGAGCCTCAGCCATCACGGAGCATGAG	60
HMC035	FcM202A/N208Sss	CTTCTCATGCTCCGTGGCGCATGAGGCTCTGCAC	61
HMC035	FcM202A/N208Sas	GTGCAGAGCCTCATGCGCCACGGAGCATGAGAAG	62
HMC036	FcY93Lss	GCTGAATGGCAAGGAGCTCAAGTGCAAGGTCTCC	63
HMC036	FcY93Las	GGAGACCTTGCACTTGAGCTCCTTGCCATTGAGC	64
HMC037	FcV82Lss	GGTCAGCGTCCTCACCCCTCCTGCACCAGGACTG	65
HMC037	FcV82Las	CAGTCCTGGTGCAGGAGGTGAGGACGCTGACC	66
HMC038	FcT81Ass	GTGTGGTCAGCGTCCTCGCCGTCCTGCACCAGGA	67
HMC038	FcT81Aas	TCCTGGTGCAGGACGGCGAGGACGCTGACCACAC	68
HMC039	FcH207L/N208Sss	GATGCATGAGGCTCTGCTCAGCCACTACACACAG	69
HMC039	FcH207L/N208Sas	CTGTGTGTAGTGGCTGAGCAGAGCCTCATGCATC	70
HMC040	FcY93A/N208Sss	GCTGAATGGCAAGGAGGCCAAGTGCAAGGTCTCC	71
HMC040	FcY93A/N208Sas	GGAGACCTTGCACTTGGCCTCCTTGCCATTGAGC	72

【表 4】

変異位置*	253 (27)	307 (81)	308 (82)	309 (83)	319 (93)	380 (154)	428 (202)	429 (203)	430 (204)	433 (207)	434 (208)	配列 番号
変異 AA	Ile	Thr	Val	Leu	Tyr	Glu	Met	His	Glu	His	Asn	
HMC002							Leu				Ser	74
HMC003	Phe											75
HMC004										Thr		76
HMC005										Lys		77
HMC006				Phe							Ser	78
HMC007	Leu											79
HMC008										Lys	Ser	80
HMC009											Thr	81
HMC010										Thr	Ser	82
HMC011				Phe								83
HMC012									Arg			84
HMC013									Lys			85
HMC014									Arg	Lys		86
HMC015									Lys	Lys		87
HMC016								Arg				88
HMC017								Lys				89
HMC018								Arg		Lys		90
HMC019								Lys		Lys		91
HMC020							Leu			Lys		92
HMC021								Lys			Thr	93
HMC022		Glu										94
HMC023		Glu					Leu					95
HMC024						Ala						96
HMC025						Ser						97
HMC026						Ala					Ser	98
HMC027			Phe						Ser			99
HMC028			Phe			Ala						100
HMC029		Ser				Ser						101
HMC030								Ala	Ser			102
HMC031						Ser					Ser	103
HMC032										Ala	Ser	104
HMC033									Ala		Ser	105
HMC034								Ala			Ser	106
HMC035							Ala				Ser	107
HMC036					Leu						Ser	108
HMC037			Leu								Ser	109
HMC038		Ala									Ser	110
HMC039										Leu	Ser	111
HMC040					Ala						Ser	112

【 0 0 6 3 】

実施例 2 : E . c o l i における免疫グロブリン F c 変異体の生産

実施例 1 で作製された免疫グロブリン F c 変異体の発現ベクターをそれぞれ 4 2 で 1 分間の熱ショックにより E . c o l i B L 2 1 (D E 3) コンピテント細胞 (competent

10

20

30

40

50

cell) (Invitrogen) に形質転換し、その後アンピシリンを含む LB 固体培地で培養してアンピシリン抵抗性コロニーを選択した。

【0064】

選択したコロニーを 500 ml の 2 × LB (アンピシリン含有) 培地に接種し、振盪培養器にて 37 °C、120 rpm で 15 時間培養した。100 ml の培養液を 500 ml の新鮮な 2 × LB (アンピシリン含有) 培地に移し、結果として得られた溶液を 600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) が 4 ~ 5 となるまで培養した。200 ml の培養液を 10 % (v/v) の比率で 5 L 発酵槽に移し、2 × LB 培地 (アンピシリン含有) を注入し、37 °C、500 ~ 700 rpm、1 vvm の通気速度、45 時間の条件で semi-pH スタット (semi-pH stat) 流加培養 (fed-batch) を行った。発酵中に OD₆₀₀ が 9.0 以上になった場合は、タンパク質合成を誘導するために、誘導物質 (inducer) として 0.1 mM の最終濃度で IPTG (イソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド) を添加した。

10

【0065】

実施例 3：免疫グロブリン Fc 変異体の分離及び精製

実施例 2 で発酵させた培養液を 12,000 g で 30 分間遠心分離することにより、細胞ペレットを回収した。こうして回収した細胞ペレットを 10 × 体積の溶解緩衝液 (20 mM Tris (pH 9.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.2 M NaCl, 0.5 % トリトン X-100) に懸濁させ、その後マイクロフルイダイザー (Microfluidizer, Microfluidics) を用いて 15,000 psi の圧力で 3 回破碎した。こうして得られた細胞溶解液を 6,000 g で 30 分間遠心分離することにより、大腸菌形質転換体から発現したタンパク質の封入体のみを得た。

20

【0066】

前記封入体を 0.5 % トリトン X-100 と蒸留水を用いて洗浄し、10 × 体積の 20 mM Tris (pH 9.0) を含む 8 M ウレア溶液に 2 時間懸濁させ、これらを溶解した。不溶性固体不純物を分離するために、封入体が溶解した溶液を 12,000 g で 30 分間遠心分離することにより、上清を回収した。その後、L-システインを 1 mM の最終濃度で上清に添加して室温で 1 時間培養することにより、タンパク質還元を誘導した。

【0067】

還元されたタンパク質のリフォールディングのために、4 °C で 24 時間溶解した封入体を 100 × 体積のリフォールディング溶液 (2 M ウレア, 0.25 M アルギニン, 50 mM Tris (pH 8.5), 0.5 mM Cys) で希釈した。

30

【0068】

こうしてリフォールディングしたタンパク質をアクタ精製機 (Akta purifier, Amersham Pharmacia Biotech) でイオン交換カラム (IEX columns, GE Healthcare) を用いて精製することにより、98 % 以上の純度で免疫グロブリン Fc 変異体を得た。

【0069】

実施例 4：免疫グロブリン Fc 変異体のヒト FcRn 結合親和性の評価

実施例 3 で分離及び精製した免疫グロブリン Fc 変異体の FcRn 結合親和性を評価するために ELISA 分析を行った。下記実験において、ヒト FcRn (hFcRn, human neonatal Fc receptor) は 293T 細胞で発現させて精製したものであり、GST 抗体はメルクミリポア社 (Merk Milipore) から購入したものである。対照群として HMC001 と天然 IgG を用いて、それぞれの免疫グロブリン Fc 変異体において測定された FcRn 結合親和性を比較した。

40

【0070】

96 ウェルプレートに 30 µg/ml の天然 IgG と、10 µg/ml の HMC001 及び免疫グロブリン Fc 変異体とでコーティングし、その後 100 µl の 5 µg/ml FcRn を各ウェルに添加した。結合と解離を評価するために、pH 6.0 及び 7.4 で実験を行った。この実験に用いた分析緩衝液と洗浄緩衝液は表 5 に示す組成からなり、その結果を図 1 ~ 3 に示す。

50

【 0 0 7 1 】

【 表 5 】

	組成
分析緩衝液	リン酸ナトリウム(pH6.0/7.4), 0.5% BSA, 0.05%トウイーン20
洗浄緩衝液	リン酸ナトリウム(pH6.0/7.4), 0.05%トウイーン20

【 0 0 7 2 】

図 1 ~ 3 に示すように、本発明により作製された免疫グロブリン F c 変異体は、H M C 0 0 1 及び天然 I g G に比べて、p H 7 . 4 では低い F c R n 結合親和性を示し、p H 6 . 0 では高い F c R n 結合親和性を示すことが確認された。

10

【 0 0 7 3 】

実施例 5 : 免疫グロブリン F c 変異体とエキセンディン - 4 とを含む結合体のヒト F c R n 結合親和性の評価

本発明による免疫グロブリン F c 変異体において、タンパク質薬物と結合した形態でもヒト F c R n に対する結合親和性が増加するか否かを調査するために、実施例 4 で高い F c R n 結合親和性を示すことが確認された H M C 0 0 2 及び H M C 0 0 8 を、両末端にアルデヒド反応基を有する P E G を用いて、エキセンディン (exendin) - 4 に共有的に連結することにより、タンパク質結合体を作製した。タンパク質結合体の作製は、特許文献 5 に記載の方法により行った。こうして作製されたタンパク質結合体のヒト F c R n に対する結合親和性を評価するために、実施例 4 に記載の方法により E L I S A を行った。

20

【 0 0 7 4 】

図 4 に示すように、本発明による免疫グロブリン F c 変異体は、これらが非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに連結された場合も、高い F c R n 結合親和性を維持することが確認された。

【 0 0 7 5 】

よって、本発明による免疫グロブリン F c 変異体をキャリアとして用いて作製された薬物結合体は、F c R n に対する結合親和性が増加することにより、生体内半減期が非常に延長されるので、投与頻度を著しく減少させることのできる持続性製剤として用いることができる。

30

【 0 0 7 6 】

本発明に用いられた特定の用語は、単に特定の実施態様を示すために用いられたものであり、本発明を限定するものではない。本発明に用いられた単数形態は、これらが明らかに反対の意味を示さない限り、複数形態を含むものである。本発明における「含む」又は「有する」とは、特定の特性、領域、整数、工程、操作、要素及び / 又は成分を具体化するためのものであり、他の特性、領域、整数、工程、操作、要素、成分及び / 又は群を排除するためのものではない。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 7 7 】

本発明の免疫グロブリン F c 変異体は、F c R n に対する結合親和性が高いので、生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させることができる。よって、本発明の免疫グロブリン F c 変異体が非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結された、生体内半減期が延長されたタンパク質結合体は、投与頻度が非常に低いタンパク質薬物の持続性製剤の製造に効果的に用いることができる。

40

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔 1 〕 F c R n に対する結合親和性が増加した免疫グロブリン F c 変異体であって、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、3 0 7 S、3 0 8 F、3 8 0 S、3 8 0 A、4 2 8 L、4 2 9 K、4 3 0 S、4 3 3 K 及び 4 3 4 S (上記ナンバリングは E U インデックスによる) からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含むことを特徴とする、免疫グロブリン F c 変異体。

50

- 〔 2 〕前記アミノ酸修飾が、4 2 8 L / 4 3 4 S、4 3 3 K / 4 3 4 S、4 2 9 K / 4 3 3 K、4 2 8 L / 4 3 3 K、3 0 8 F / 3 8 0 A、3 0 7 S / 3 8 0 S 及び 3 8 0 S / 4 3 4 S からなる群から選択される、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 3 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、4 2 8 位のメチオニンがロイシンに置換され、4 3 4 位のアスパラギンがセリンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 4 〕前記前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 7 4 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 3 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 5 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、4 3 3 位のヒスチジンがリジンに置換され、4 3 4 位のアスパラギンがセリンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 6 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 8 0 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 5 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 7 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、4 2 9 位のヒスチジンがリジンに置換され、4 3 3 位のヒスチジンがリジンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 8 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 9 1 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 7 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 9 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、4 2 8 位のメチオニンがロイシンに置換され、4 3 3 位のヒスチジンがリジンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 0 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 9 2 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 9 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 1 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、3 0 8 位のバリンがフェニルアラニンに置換され、3 8 0 位のグルタミン酸がアラニンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 2 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 1 0 0 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 1 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 3 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、3 0 7 位のスレオニンがセリンに置換され、3 8 0 位のグルタミン酸がセリンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 4 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 1 0 1 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 1 3 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 5 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、天然免疫グロブリン F c フラグメントの定常領域において、3 8 0 位のグルタミン酸がセリンに置換され、4 3 4 位のアスパラギンがセリンに置換されたアミノ酸修飾を含む、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 。〔 1 6 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、配列番号 1 0 3 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 1 5 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 7 〕前記天然免疫グロブリン F c フラグメントが、I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 の F c フラグメントからなる群から選択される、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 8 〕前記天然免疫グロブリン F c フラグメントが、I g G 4 F c フラグメントである、前記〔 1 7 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 1 9 〕前記天然免疫グロブリン F c フラグメントが、ヒト非グリコシル化 I g G 4 F c フラグメントである、前記〔 1 8 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 2 0 〕前記天然免疫グロブリン F c フラグメントが、配列番号 7 5 で表されるアミノ酸配列を有する、前記〔 1 〕に記載の免疫グロブリン F c 変異体。
- 〔 2 1 〕前記免疫グロブリン F c 変異体が、免疫グロブリンの可変領域と軽鎖を含まない

10

20

30

40

50

、前記〔１〕に記載の免疫グロブリンFc変異体。

〔２２〕前記免疫グロブリンFc変異体が、動物細胞又は大腸菌で生産される、前記〔１〕に記載の免疫グロブリンFc変異体。

〔２３〕前記免疫グロブリンFc変異体が、大腸菌で生産される、前記〔２２〕に記載の免疫グロブリンFc変異体。

〔２４〕前記免疫グロブリンFc変異体が、天然免疫グロブリンFcフラグメントに比べて、pH 7.4では低いFcRn結合親和性を示すが、pH 6.0では高いFcRn結合親和性を示す、前記〔１〕に記載の免疫グロブリンFc変異体。

〔２５〕生体内半減期が延長されたタンパク質結合体であって、生理活性ポリペプチドが、非ペプチド性重合体を介して前記〔１〕～〔２４〕のいずれかに記載の免疫グロブリンFc変異体に共有的に連結されることを特徴とする、タンパク質結合体。

10

〔２６〕前記非ペプチド性重合体が、ポリ(エチレングリコール)モノポリマー、ポリ(プロピレングリコール)モノポリマー、エチレングリコール-プロピレングリコール共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン、ヒアルロン酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、前記〔２５〕に記載のタンパク質結合体。

〔２７〕前記非ペプチド性重合体が、ポリ(エチレングリコール)である、前記〔２６〕に記載のタンパク質結合体。

20

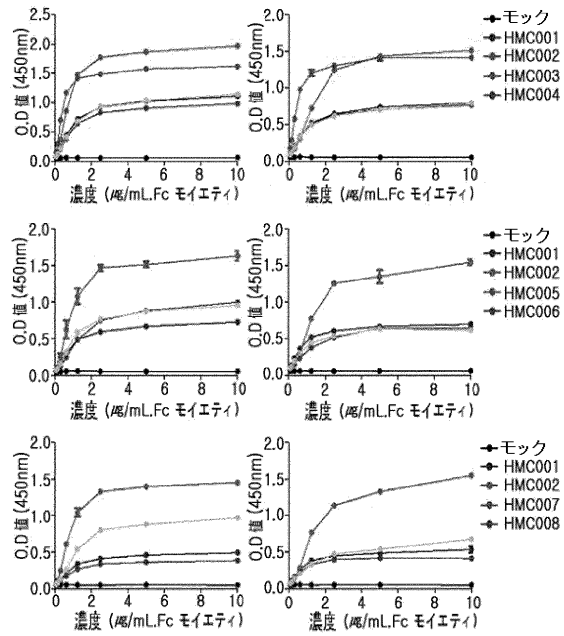
〔２８〕前記生理活性ポリペプチドが、ヒト成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、インターフェロン、コロニー刺激因子、インターロイキン、可溶性インターロイキン受容体、可溶性TNF受容体、グルコセレブロシダーゼ、マクロファージ活性化因子、マクロファージペプチド、B細胞因子、T細胞因子、タンパク質A、アレルギー抑制因子、細胞壊死糖タンパク質、免疫毒素、リンホトキシン、腫瘍壊死因子、腫瘍抑制因子、転移成長因子、 α 1アンチトリプシン、アルブミン、アポリポタンパク質E、エリスロポエチン、高グリコシル化エリスロポエチン、血液凝固第VII因子、血液凝固第VIII因子、血液凝固第IX因子、プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、タンパク質C、C反応性タンパク質、レニンインヒビター、コラゲナーゼインヒビター、スーパーオキシドジスムターゼ、レプチン、血小板由来成長因子、表皮細胞成長因子、骨成長因子、骨促進タンパク質、カルシトニン、インスリン、インスリン変異体、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1、アトリオペプチン、軟骨誘導因子、結合組織活性化因子、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、神経成長因子、副甲状腺ホルモン、リラキシン、セクレチン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、副腎皮質ホルモン、コレシストキニン、膵臓ポリペプチド、ガストリン放出ペプチド、コルチコトロピン放出因子、甲状腺刺激ホルモン、受容体、受容体拮抗物質、細胞表面抗原、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント、及びウイルス由来ワクチン抗原からなる群から選択される、前記〔２５〕に記載のタンパク質結合体。

30

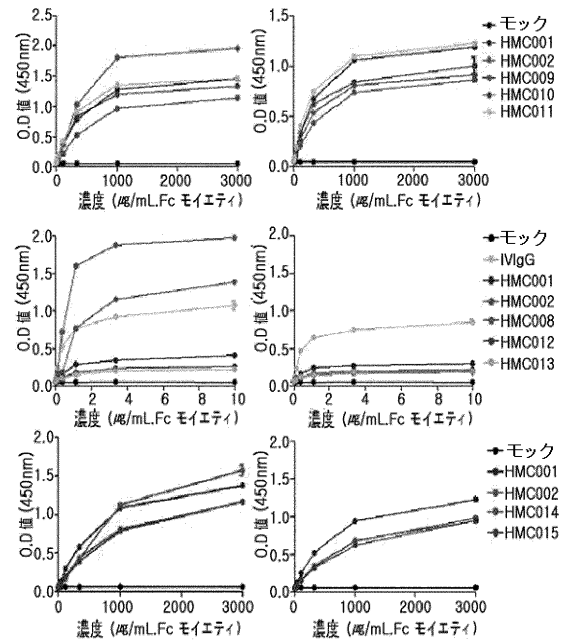
〔２９〕生理活性ポリペプチドの生体内半減期を延長させる方法であって、前記〔１〕～〔２４〕のいずれかに記載の免疫グロブリンFc変異体を、非ペプチド性重合体を介して生理活性ポリペプチドに共有的に連結させる工程を含むことを特徴とする、方法。

40

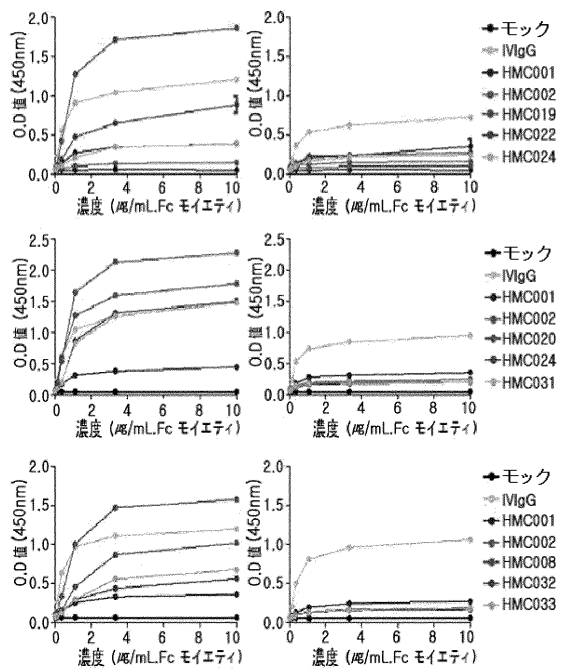
【図 1】



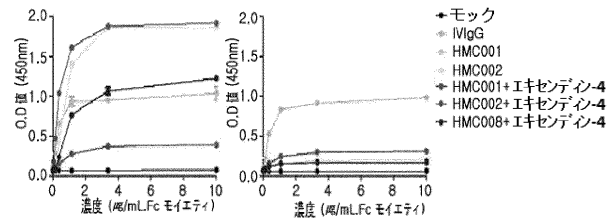
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0006448368000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100088694
弁理士 弟子丸 健
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (72)発明者 オ ユ リム
大韓民国 134-734 ソウル カンドン-グ カンイル-ドン カンイル リバーパーク
4 ダンジ アpartment 403-902
- (72)発明者 ホ ヨン ホ
大韓民国 152-772 ソウル クロ-グ シンドリム-ドン ウースン アpartment
101-1403
- (72)発明者 ファン サン ヨン
大韓民国 445-769 ギョンギ-ド ファソン-シ チナン-ドン チナンゴル ジュゴン
アpartment 1004-701
- (72)発明者 チェ イン ヨン
大韓民国 448-755 ギョンギ-ド ヨンイン-シ スジ-グ チュクチョン 2-ドン
ピョクサン 1 チャ アpartment 105-1801
- (72)発明者 ジュン サン ヨブ
大韓民国 442-190 ギョンギ-ド スウォン-シ パルダル-グ ウマン-ドン ワール
ド メリディアン アpartment 109-105
- (72)発明者 クォン セ チャン
大韓民国 135-506 ソウル カンナム-グ トゴク 2-ドン トゴク レクスル アパ
artment 408-1804

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 特表2005-501514(JP,A)
特表2007-531707(JP,A)
国際公開第2010/045193(WO,A1)
特表2007-536211(JP,A)
特表2011-502126(JP,A)
特表2008-511292(JP,A)
特表2008-519860(JP,A)
国際公開第2006/130834(WO,A2)
Nat. Biotechnol., 2005年, Vol. 23, No. 10, p. 1283-1288

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq
WPIDS/WPIX(STN)