

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-534636

(P2023-534636A)

(43)公表日 令和5年8月10日(2023.8.10)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	2 0 0 Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全94頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-501003(P2023-501003)	(71)出願人	522439847
(86)(22)出願日	令和3年6月23日(2021.6.23)		インベテックス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年2月27日(2023.2.27)		I N V E T X , I N C .
(86)国際出願番号	PCT/US2021/038714		アメリカ合衆国 0 2 1 0 8 マサチュー
(87)国際公開番号	WO2022/010652		セッツ州 ボストン ワシントン ストリ
(87)国際公開日	令和4年1月13日(2022.1.13)		ート 2 0 1 ワン ボストン プレイス
(31)優先権主張番号	63/050,535		スイート 3 9 3 0
(32)優先日	令和2年7月10日(2020.7.10)	(74)代理人	100105957
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 恩田 誠
(31)優先権主張番号	63/143,720	(74)代理人	100068755
(32)優先日	令和3年1月29日(2021.1.29)		弁理士 恩田 博宣
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142907
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 本田 淳
	最終頁に続く	(74)代理人	100152489
			弁理士 中村 美樹
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 治療薬のネコにおける半減期を増加させるための組成物及びその使用方法

(57)【要約】

1つまたは複数のポリペプチドのネコにおける半減期を増加させるための組成物及びその使用方法が提供される。組成物は、バリエーションネコ I g G F c 領域を含む。

【選択図】 図 1

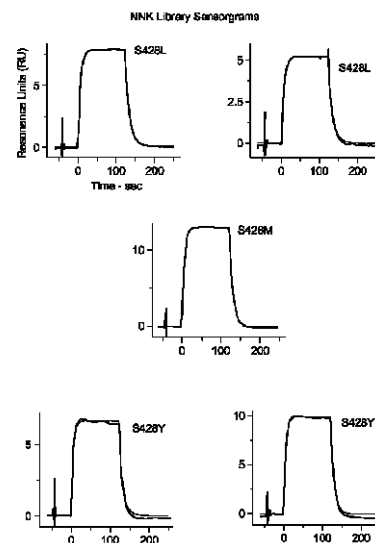


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネコ I g G の F c 領域バリエーションまたはそのネコ F c R n 結合領域を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドは、アミノ酸置換を、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置：

(i) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 2 に対応する位置であって、前記アミノ酸置換は S 2 5 2 W である、前記位置；

(i i) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 4 に対応する位置であって、前記アミノ酸置換は S 2 5 4 R 及び S 2 5 4 K からなる群から選択される、前記位置；

(i i i) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 0 9 に対応する位置であって、前記アミノ酸置換は L 3 0 9 V または L 3 0 9 Y である、前記位置；

(i v) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 1 1 に対応する位置であって、前記アミノ酸置換は Q 3 1 1 R、Q 3 1 1 V、Q 3 1 1 L 及び Q 3 1 1 K からなる群から選択される、前記位置；

(v) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 4 2 8 に対応する位置であって、前記アミノ酸置換は S 4 2 8 M、S 4 2 8 Y、S 4 2 8 H 及び S 4 2 8 R からなる群から選択される、前記位置；ならびに

(v i) 野生型ネコ I g G の 2 6 2、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 3、3 0 1、3 1 2、3 2 6、3 3 4、3 4 7、3 5 5、3 7 7、3 8 0、3 8 3、3 8 9 c、3 9 2、4 2 6 及び 4 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置

に含み、
ここで、前記アミノ酸位置は、E U ナンバリングに基づき、前記ポリペプチドは、前記野生型ネコ I g G の F c ドメインと比較した場合、ネコ F c R n に対する結合親和性が増加している、前記ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、前記アミノ酸置換を、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 2 に対応する位置に含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドがアミノ酸置換 S 2 5 2 W を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、前記アミノ酸置換を、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 4 に対応する位置に含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記野生型ネコ I g G の位置 2 5 4 における前記アミノ酸置換が S 2 5 4 R である、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記野生型ネコ I g G の位置 2 5 4 における前記アミノ酸置換が S 2 5 4 K である、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、前記アミノ酸置換を、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 0 9 に対応する位置に含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記野生型ネコ I g G の位置 3 0 9 における前記アミノ酸置換が L 3 0 9 V である、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記野生型ネコ I g G の位置 3 0 9 における前記アミノ酸置換が L 3 0 9 Y である、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、前記アミノ酸置換を、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 1 1 に対応する位置に含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 における前記アミノ酸置換が Q 3 1 1 R である、請求項 1 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2】

前記野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 における前記アミノ酸置換が Q 3 1 1 V である、請求項 1 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 における前記アミノ酸置換が Q 3 1 1 K である、請求項 1 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 における前記アミノ酸置換が Q 3 1 1 L である、請求項 1 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

前記ポリペプチドが、前記アミノ酸置換を、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 4 2 8 に対応する位置に含む、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

前記野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 における前記アミノ酸置換が S 4 2 8 M である、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

前記野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 における前記アミノ酸置換が S 4 2 8 Y である、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8】

前記野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 における前記アミノ酸置換が S 4 2 8 R である、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

前記野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 における前記アミノ酸置換が S 4 2 8 H である、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

前記ポリペプチドが、野生型ネコ I g G の 2 6 2、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 3、3 0 1、3 1 2、3 2 6、3 3 4、3 4 7、3 5 5、3 7 7、3 8 0、3 8 3、3 8 9 c、3 9 2、4 2 6 及び 4 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置にアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

前記アミノ酸置換が、L 2 6 2 Q、L 2 6 2 E、T 2 8 6 E、T 2 8 6 D、T 2 8 9 K、S 2 9 0 V、S 2 9 0 Y、E 2 9 3 D、E 2 9 3 K、E 2 9 3 H、R 3 0 1 L、D 3 1 2 T、K 3 2 6 D、R 3 3 4 D、Q 3 4 7 L、Q 3 5 5 L、I 3 7 7 V、I 3 7 7 Y、E 3 8 0 D、E 3 8 0 V、E 3 8 0 T、I 3 8 3 L、N 3 8 9 c - R、R 3 9 2 E、S 4 2 6 L、S 4 2 6 H 及び T 4 3 7 L、ならびに前述のいずれかの保存的アミノ酸置換からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

前記アミノ酸置換が、L 2 6 2 Q、L 2 6 2 E、T 2 8 6 E、T 2 8 6 D、T 2 8 9 K、S 2 9 0 V、S 2 9 0 Y、E 2 9 3 D、E 2 9 3 K、E 2 9 3 H、R 3 0 1 L、D 3 1 2 T、K 3 2 6 D、R 3 3 4 D、Q 3 4 7 L、Q 3 5 5 L、I 3 7 7 V、I 3 7 7 Y、E 3 8 0 D、E 3 8 0 V、E 3 8 0 T、I 3 8 3 L、N 3 8 9 c - R、R 3 9 2 E、S 4 2 6 L、S 4 2 6 H 及び T 4 3 7 L からなる群から選択される、請求項 2 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

ネコ I g G の F c 領域バリエーションまたはそのネコ F c R n 結合領域を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドは、2 つ以上のアミノ酸置換を含み、前記 2 つ以上のアミノ酸置換は、以下からなる群：

10

20

30

40

50

(i) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置252に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S252W、S252Y、S252F及びS252Rからなる群から選択される、前記アミノ酸置換；

(ii) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置254に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S254R及びS254Kからなる群から選択される、前記アミノ酸置換；

(iii) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置309に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、L309V、L309Y及びL309Eからなる群から選択される、前記アミノ酸置換；

(iv) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置311に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、Q311R、Q311V、Q311L及びQ311Kからなる群から選択される、前記アミノ酸置換；

(v) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置428に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S428L、S428M、S428Y、S428H及びS428Rからなる群から選択される、前記アミノ酸置換；

(vi) 野生型ネコIgGの262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426及び437からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する1つ以上の位置におけるアミノ酸置換；ならびに

(vii) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置434に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S434F、S434W、S434H、S434R、及びS434Yからなる群から選択される、前記アミノ酸置換から選択され、

ここで、前記アミノ酸位置は、EUナンバリングに基づき、前記2つ以上のアミノ酸置換は、異なる位置にあり、前記ポリペプチドは、(a)前記野生型ネコIgGのFcドメイン、及び(b)前記2つ以上のアミノ酸置換のうちの1つのみを含むポリペプチドと比較した場合、ネコFcRnに対する結合親和性が増加している、前記ポリペプチド。

【請求項24】

前記2つ以上のアミノ酸置換が、野生型ネコIgGのアミノ酸位置286に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、T286E及びT286Dからなる群から選択される、請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項25】

前記2つ以上のアミノ酸置換が、野生型ネコIgGのアミノ酸位置289に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、T289K及びT289Hからなる群から選択される、請求項23または請求項24に記載のポリペプチド。

【請求項26】

前記2つ以上のアミノ酸置換が、野生型ネコIgGのアミノ酸位置301に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、R301Lである、請求項23～25のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項27】

前記2つ以上のアミノ酸置換が、野生型ネコIgGのアミノ酸位置334に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、R334Dである、請求項23～26のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項28】

前記2つ以上のアミノ酸置換が、野生型ネコIgGのアミノ酸位置426に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、S426L及びS426Hからなる群から選択される、請求項23～27のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項29】

前記2つ以上のアミノ酸置換が、野生型ネコIgGのアミノ酸位置437に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、T437Lである、請求項23～28のいずれか1項に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

前記 2 つ以上のアミノ酸置換が、以下からなる群：

- (i) S 2 5 2 Y と、Q 3 1 1 R 及び／または Q 3 1 1 L との組み合わせ；
 - (i i) S 4 3 4 Y と、S 2 5 4 R、S 2 5 4 K、L 2 6 2 E、T 2 8 6 D、T 2 8 6 E、T 2 8 9 K、E 2 9 3 D、E 2 9 3 K、L 3 0 9 V、L 3 0 9 E、K 3 2 6 D 及び Q 3 4 7 L のうちの 1 つ以上との組み合わせ；
 - (i i i) S 4 3 4 F と、E 3 8 0 D との組み合わせ；
 - (i v) S 4 2 8 L と、S 2 5 2 R、T 2 8 6 E、Q 3 1 1 V、Q 3 1 1 K、D 3 1 2 T、I 3 7 7 V、I 3 8 3 L、及び N 3 8 9 c R のうちの 1 つ以上との組み合わせ；
 - (v) S 4 2 8 L、E 3 8 0 D 及び S 4 3 4 R；
 - (v i) S 4 2 8 L、E 3 8 0 T 及び S 4 3 4 R；
 - (v i i) S 2 5 2 R と、L 2 6 2 Q との組み合わせ；
 - (v i i i) T 2 6 0 E、L 3 0 9 E 及び Q 3 5 5 L；
 - (i x) S 2 9 0 V と、R 3 4 4 D との組み合わせ；
 - (x) R 3 0 1 L、E 3 8 0 V 及び T 4 3 7 L；
 - (x i) T 2 8 6 E と、S 4 2 8 H との組み合わせ；
 - (x i i) R 3 3 4 D と、S 4 2 8 R、T 4 3 7 L 及び R 3 0 1 L のうちの 1 つ以上との組み合わせ；
 - (x i i i) S 4 2 6 L と、T 2 8 9 H 及び／または S 4 2 8 H との組み合わせ；
 - (x i v) S 4 2 8 Y と、Q 3 1 1 V、S 2 5 4 R、L 3 0 9 V、T 2 8 6 E、及び E 3 8 0 T のうちの 1 つ以上との組み合わせ；ならびに
 - (x v) S 4 2 8 H と、T 2 8 9 H との組み合わせ
- から選択される、請求項 23 に記載のポリペプチド。

10

20

【請求項 31】

前記ポリペプチドが、配列番号 1～3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

前記野生型ネコ Ig G が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する Fc ドメインを含むネコ Ig G 1 a である、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 33】

前記野生型ネコ Ig G が、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する Fc ドメインを含むネコ Ig G 1 b である、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 34】

前記野生型ネコ Ig G が、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する Fc ドメインを含むネコ Ig G 2 である、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 35】

結合ドメインを更に含む、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 36】

前記結合ドメインが、(i) 免疫グロブリン分子の 6 つの相補性決定領域 (CDR)；(i i) ネコ受容体タンパク質のリガンド結合ドメイン、(i i i) ナノボディ、または (i v) ネコ受容体タンパク質の細胞外ドメインを含む、請求項 35 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 37】

前記結合ドメインが、NGF、TrkA、ADAMTS、IL-1、IL-2、IL-4、IL-4R、アンジオテンシン 1 型 (AT1) 受容体、アンジオテンシン 2 型 (AT2) 受容体、IL-5、IL-12、IL-13、IL-31、IL-33、CD3、CD20、CD47、CD52、及び補体系複合体からなる群から選択される抗原に特異的に結合する、請求項 35 または請求項 36 に記載のポリペプチド。

【請求項 38】

50

EPO、CTLA4、LFA3、VEGFR1／VEGFR3、IL-1R、IL-4R、GLP-1受容体アゴニスト、及びトロンボポエチン結合ペプチドからなる群から選択されるタンパク質を更に含む、請求項1～37のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項39】

前記ポリペプチドが、中性pHよりも酸性pHでより高いレベルでネコFcRnに結合する、請求項1～38のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項40】

前記ポリペプチドが、pH7.4よりもpH5.5でより高いレベルでネコFcRnに結合する、請求項39に記載のポリペプチド。

【請求項41】

前記ポリペプチドが、pH7.4よりもpH6.0でより高いレベルでネコFcRnに結合する、請求項39に記載のポリペプチド。

【請求項42】

(i) 請求項1～41のいずれか1項に記載のポリペプチドと、(ii) 薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項43】

請求項1～41のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸。

【請求項44】

請求項43に記載の1つまたは複数の核酸を含む、1つまたは複数の発現ベクター。

【請求項45】

請求項43に記載の1つもしくは複数の核酸または請求項44に記載の1つもしくは複数の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項46】

ポリペプチドを作製する方法であって、

(a) 請求項43に記載の1つまたは複数の核酸を提供すること；

(b) 宿主細胞培養物中で前記1つまたは複数の核酸を発現させ、それにより、前記ポリペプチドを産生すること；及び

(c) (b)で産生された前記ポリペプチドを前記宿主細胞培養物から回収することを含む、前記方法。

【請求項47】

前記ポリペプチドを医薬製剤として製剤化することを更に含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

ネコの疾患または障害を治療することを、それを必要とするネコに行う方法であって、請求項42に記載の医薬組成物を含む組成物の有効量を前記ネコに投与することを含む、前記方法。

【請求項49】

ネコの疾患または障害を予防することを、それを必要とするネコに行う方法であって、請求項42に記載の医薬組成物を含む組成物の有効量を前記ネコに投与することを含む、前記方法。

【請求項50】

前記ネコの疾患または障害が、アレルギー、慢性疼痛、急性疼痛、炎症性疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患、胃腸疾患、心血管疾患、腎臓疾患、生殖機能関連障害、感染症またはがんである、請求項48または請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記ネコの疾患または障害が、アトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、骨関節炎痛、関節炎、貧血、または肥満である、請求項48または請求項49に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年7月10日に出願された米国特許仮出願第63／050,535号、及び2021年1月29日に出願された米国特許仮出願第63／143,720号の優先権を主張するものであり、そのそれぞれの内容は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表

本出願は、電子的に提出されたASCII形式の配列表を含み、その全体は、参照により本明細書に援用される。当該ASCIIコピーは、2021年6月23日に作成され、名称は、「47406-0016WO1__SL.txt」であり、サイズは、25KBである。

【0003】

本開示は、概して、ネコにおける半減期が野生型同等物と比較して増加したポリペプチド（例えば、ポリペプチド-Fc領域融合体などの融合ポリペプチド；または抗体もしくは受容体-Fc融合体のリガンド結合部分などの結合分子）に関する。

【背景技術】

【0004】

抗体のFc領域は、多くの機能的役割を担っており、限定するものではないが、リソソーム経路を介した分解から抗体を保護すること、抗体のエフェクター機能を媒介することなどが挙げられる。ネコ抗体の治療薬としての使用が増えるにつれ、最適なFabを選択することだけでなく、望ましい半減期及びエフェクター機能を得るのに適切なFcと組み合わせることに重点が置かれてきている。

【0005】

当該技術分野において、ネコに使用するポリペプチド治療薬（例えば、抗体）の半減期を増加させることに関する指針はほとんどない。本開示は、ネコにおけるポリペプチド（例えば、抗体）の血清中持続性を改善するFc領域バリエーションを提供することによってその欠落を解消するものである。

【発明の概要】

【0006】

本明細書で提供されるのは、治療用ポリペプチドに有用なネコFc（例えば、ネコIgGのFc領域バリエーション）またはそのネコFcRn結合断片である。本開示は、対照ポリペプチド（例えば、野生型同等物であるIgGのネコFc領域）よりもネコFcRnに対する結合が増加したポリペプチドを特徴とする。いくつかの場合において、これらのポリペプチドは、pH5.5、pH6.0及び／またはpH6.5において、対照ポリペプチドよりもネコFcRnに対する結合が増加する。いくつかの場合において、これらのポリペプチドは、例えば、中性pH（例えば、pH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、または7.5）よりも酸性pH（例えば、pH5.5、pH6.0またはpH6.5）で、より高いレベルでネコFcRnに結合することができる。いくつかの場合において、これらのポリペプチドは、pH7.4よりもpH5.5及び／または6.0でより高いレベルでネコFcRnに結合する。本開示は、部分的には、ネコにおける半減期が野生型同等物よりも増加したポリペプチドに関する。例えば、本明細書で開示されるFc領域またはそのネコFcRn結合領域に結合していない結合分子のバージョンと比べて半減期が増加した結合分子（例えば、抗体または受容体のリガンド結合部分）が提供される。また、酵素-Fc領域融合体、リガンド-Fc領域融合体、ナノボディー-Fc融合体、及びペプチド-Fc領域融合体も提供され、融合体は、野生型同等物と比較して半減期が増加している。Fc領域は、半減期を増加させる1つまたは複数の置換（野生型ネコFc領域と比べて）を有することに加えて、例えば、エフェクター機能の増加、エフェクター機能の減少、プロテインAに対する結合の増加及び／またはポリペプチドの不均一性の減少（例えば、Fc領域における1つ以上の翻訳後修飾を取り除くことによる）をもたらす他の置換

10

20

30

40

50

も含み得る。ネコ F c 領域配列は、任意のネコ抗体に由来し得る。いくつかの場合において、ネコ F c 領域配列は、ネコ I g G（例えば、I g G 1 a、I g G 1 b、I g G 2）に由来する。

【0007】

本開示は、（１）リガンドまたはタンパク質のエピトープに特異的に結合する結合ドメインまたはその断片を含み、ここで、結合ドメインは、（２）本明細書で開示される F c 領域（C H 2 + C H 3 領域）またはそのネコ F c R n 結合領域を含むドメインに結合している、組み換えタンパク質を特徴とする。いくつかの場合において、結合ドメインは、（i）6つの相補性決定領域（C D R）、例えば、ネコまたはヒト／ヒト化抗体のもの；（i i）ナノボディ；（i i i）リガンドに結合する可溶性受容体結合ドメインまたはそのリガンド結合断片、及び（i v）ネコ受容体タンパク質の細胞外ドメインを含む。

10

【0008】

本開示はまた、（１）本明細書に記載されるネコ I g G の F c 領域バリエントを含む第 1 の F c 領域（例えば、C H 2 領域、C H 3 領域、C H 2 + C H 3 領域）を含む第 1 のポリペプチドと、（２）本明細書に記載されるネコ I g G の F c 領域バリエントを含む第 2 の F c 領域を含む第 2 のポリペプチドとを含む、組成物を提供する。第 1 及び第 2 のポリペプチドは、第 1 及び第 2 の F c 領域を介して会合することができる。いくつかの場合において、第 1 及び第 2 の F c 領域のアミノ酸配列は、同じである。他の場合において、第 1 及び第 2 の F c 領域のアミノ酸配列は、異なる（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 アミノ酸）。いくつかの場合において、F c 領域バリエントは、ネコ I g G 1 a 抗体の F c 領域のバリエントである。いくつかの場合において、F c 領域バリエントは、ネコ I g G 1 b 抗体の F c 領域のバリエントである。いくつかの場合において、F c 領域バリエントは、ネコ I g G 2 抗体の F c 領域のバリエントである。

20

【0009】

本明細書で開示されるネコ I g G の F c 領域バリエント及びポリペプチドを含む、融合分子も開示される。いくつかの場合において、ネコ I g G の F c 領域バリエントは、ポリペプチドに共有結合的に結合される（例えば、ヒンジ領域またはリンカーを介して）。いくつかの場合において、ポリペプチドは、ネコ受容体タンパク質のリガンド結合ドメイン、ネコ受容体タンパク質の細胞外ドメイン、または抗原結合ドメインである。いくつかの場合において、ポリペプチドは、ネコ I L - 1 3 R α 1 または I L - 1 3 R α 2 のリガンド結合ドメインまたは細胞外ドメイン、ネコ E P O、ネコ C T L A 4、ネコ L F A 3、ネコ V E G F R 1 / V E G F R 3、ネコ I L - 1 R、ネコ G L P - 1 受容体アゴニスト、及びネコトロンボポエチン結合ペプチドから選択される。いくつかの場合において、ポリペプチドは、s c F v、ナノボディ、または単一ドメイン抗体である。いくつかの場合において、I g G の F c 領域バリエントは、バリエントは、ネコ I g G 1 a 抗体の F c 領域のバリエントである。いくつかの場合において、I g G の F c 領域バリエントは、ネコ I g G 1 b 抗体の F c 領域のバリエントである。いくつかの場合において、I g G の F c 領域バリエントは、ネコ I g G 2 抗体の F c 領域のバリエントである。

30

40

【0010】

いくつかの態様において、本開示は、ネコ I g G の F c 領域バリエントまたはそのネコ F c R n 結合領域を含むポリペプチドであって、ポリペプチドは、アミノ酸置換を、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置：

（i）野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 2 に対応する位置であって、アミノ酸置換は S 2 5 2 W である、位置；

（i i）野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 4 に対応する位置であって、アミノ酸置換は S 2 5 4 R 及び S 2 5 4 K からなる群から選択される、位置；

（i i i）野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 0 9 に対応する位置であって、アミノ酸置換は L 3 0 9 V または L 3 0 9 Y である、位置；

50

(i v) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 1 1 に対応する位置であって、アミノ酸置換は Q 3 1 1 R、Q 3 1 1 V、Q 3 1 1 L 及び Q 3 1 1 K からなる群から選択される、位置 ;

(v) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 4 2 8 に対応する位置であって、アミノ酸置換は S 4 2 8 M、S 4 2 8 Y、S 4 2 8 H 及び S 4 2 8 R からなる群から選択される、位置 ;

(v i) 野生型ネコ I g G の 2 6 2、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 3、3 0 1、3 1 2、3 2 6、3 3 4、3 4 7、3 5 5、3 7 7、3 8 0、3 8 3、3 8 9 c、3 9 2、4 2 6 及び 4 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置に含み、ここで、アミノ酸位置は、E U ナンバリングに基づき、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G の F c ドメインと比較した場合、ネコ F c R n に対する結合親和性が増加している、ポリペプチドを提供する。

10

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 2 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 2 5 2 におけるアミノ酸置換は、S 2 5 2 W である。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 4 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 2 5 4 におけるアミノ酸置換は、S 2 5 4 R である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 2 5 4 におけるアミノ酸置換は、S 2 5 4 K である。

20

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 0 9 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 0 9 におけるアミノ酸置換は、L 3 0 9 V である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 0 9 におけるアミノ酸置換は、L 3 0 9 Y である。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 1 1 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 R である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 V である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 K である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 L である。

30

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 4 2 8 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 M である。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、少なくとも、アミノ酸置換 S 4 2 8 Y を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 Y である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 R である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 H である。

40

【 0 0 1 7 】

別の実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G の 2 6 2、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 3、3 0 1、3 1 2、3 2 6、3 3 4、3 4 7、3 5 5、3 7 7、3 8 0、3 8 3、3 8 9 c、3 9 2、4 2 6 及び 4 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、L 2 6 2 Q、L 2 6 2 E、T 2 8 6 E、T 2 8 6 D、T 2 8 9 K、S 2 9 0 V

50

、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H及びT437L、ならびに前述のいずれかの保存的アミノ酸置換からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H及びT437Lからなる群から選択される。

10

【0018】

別の態様において、本開示は、ネコIgGのFc領域バリエーションまたはそのネコFcRn結合領域を含むポリペプチドであって、ポリペプチドは、2つ以上のアミノ酸置換を含み、2つ以上のアミノ酸置換は、以下からなる群：

(i) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置252に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S252W、S252Y、S252F及びS252Rからなる群から選択される、アミノ酸置換；

(ii) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置254に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S254R及びS254Kからなる群から選択される、アミノ酸置換；

(iii) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置309に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、L309V、L309Y及びL309Eからなる群から選択される、アミノ酸置換；

20

(iv) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置311に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、Q311R、Q311V、Q311L及びQ311Kからなる群から選択される、アミノ酸置換；

(v) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置428に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S428L、S428M、S428Y、S428H及びS428Rからなる群から選択される、アミノ酸置換；

(vi) 野生型ネコIgGの262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426及び437からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する1つ以上の位置におけるアミノ酸置換；ならびに

30

(vii) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置434に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S434F、S434W、S434H、S434R、及びS434Yからなる群から選択される、アミノ酸置換から選択され、

ここで、アミノ酸位置は、EUN numberingに基づき、2つ以上のアミノ酸置換は、異なる位置にあり、ポリペプチドは、(a) 野生型ネコIgGのFcドメイン、及び(b) 2つ以上のアミノ酸置換のうちの1つのみを含むポリペプチドと比較した場合、ネコFcRnに対する結合親和性が増加している、ポリペプチドを提供する。

【0019】

40

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置286に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、T286E及びT286Dからなる群から選択される。

【0020】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置289に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、T289K及びT289Hからなる群から選択される。

【0021】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置301に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミ

50

ノ酸置換は、R 3 0 1 Lである。

【0 0 2 2】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置334に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、R 3 3 4 Dである。

【0 0 2 3】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置426に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、S 4 2 6 L及びS 4 2 6 Hからなる群から選択される。

【0 0 2 4】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置437に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、T 4 3 7 Lである。

【0 0 2 5】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、以下からなる群：

(i) S 2 5 2 Yと、Q 3 1 1 R及び／またはQ 3 1 1 Lとの組み合わせ；

(i i) S 4 3 4 Yと、S 2 5 4 R、S 2 5 4 K、L 2 6 2 E、T 2 8 6 D、T 2 8 6 E、T 2 8 9 K、E 2 9 3 D、E 2 9 3 K、L 3 0 9 V、L 3 0 9 E、K 3 2 6 D及びQ 3 4 7 Lのうちの1つ以上との組み合わせ；

(i i i) S 4 3 4 Fと、E 3 8 0 Dとの組み合わせ；

(i v) S 4 2 8 Lと、S 2 5 2 R、T 2 8 6 E、Q 3 1 1 V、Q 3 1 1 K、D 3 1 2 T、I 3 7 7 V、I 3 8 3 L、及びN 3 8 9 c Rのうちの1つ以上との組み合わせ；

(v) S 4 2 8 L、E 3 8 0 D及びS 4 3 4 R；

(v i) S 4 2 8 L、E 3 8 0 T及びS 4 3 4 R；

(v i i) S 2 5 2 Rと、L 2 6 2 Qとの組み合わせ；

(v i i i) T 2 6 0 E、L 3 0 9 E及びQ 3 5 5 L；

(i x) S 2 9 0 Vと、R 3 4 4 Dとの組み合わせ；

(x) R 3 0 1 L、E 3 8 0 V及びT 4 3 7 L；

(x i) T 2 8 6 Eと、S 4 2 8 Hとの組み合わせ；

(x i i) R 3 3 4 Dと、S 4 2 8 R、T 4 3 7 L及びR 3 0 1 Lのうちの1つ以上との組み合わせ；

(x i i i) S 4 2 6 Lと、T 2 8 9 H及び／またはS 4 2 8 Hとの組み合わせ；

(x i v) S 4 2 8 Yと、Q 3 1 1 V、S 2 5 4 R、L 3 0 9 V、T 2 8 6 E、及びE 3 8 0 Tのうちの1つ以上との組み合わせ；ならびに

(x v) S 4 2 8 Hと、T 2 8 9 Hとの組み合わせから選択される。

【0 0 2 6】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、配列番号1～3からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0 0 2 7】

いくつかの実施形態において、野生型ネコIgGは、配列番号1に対して、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一であるアミノ酸配列を有するFcドメインを含むネコIgG 1 a、配列番号2に対して、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一であるアミノ酸配列を有するFcドメインを含むネコIgG 1 b、または配列番号3に対して、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一であるアミノ酸配列を有するFcドメインを含むネコIgG 2である。

【0 0 2 8】

他の実施形態において、野生型ネコIgGは、配列番号1のアミノ酸配列を有するFc

10

20

30

40

50

ドメインを含むネコIgG1aである。他の実施形態において、野生型ネコIgGは、配列番号2のアミノ酸配列を有するFcドメインを含むネコIgG1bである。他の実施形態において、野生型ネコIgGは、配列番号3のアミノ酸配列を有するFcドメインを含むネコIgG2である。

【0029】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、結合ドメインを更に含む。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、(i)免疫グロブリン分子の6つの相補性決定領域(CDR)；(ii)ネコ受容体タンパク質のリガンド結合ドメイン、(iii)ナノボディ、または(iv)ネコ受容体タンパク質の細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、NGF、TrKA、ADAMTS、IL-1、IL-2、IL-4、IL-4R、アンジオテンシン1型(AT1)受容体、アンジオテンシン2型(AT2)受容体、IL-5、IL-12、IL-13、IL-31、IL-33、CD3、CD20、CD47、CD52、及び補体系複合体からなる群から選択される抗原に特異的に結合する。

10

【0030】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、EPO、CTLA4、LFA3、VEGFR1/VEGFR3、IL-1R、IL-4R、GLP-1受容体アゴニスト、及びトロポポエチン結合ペプチドからなる群から選択されるタンパク質を更に含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、中性pHよりも酸性pHでより高いレベルでネコFcRnに結合する。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、pH7.4よりもpH5.5でより高いレベルでネコFcRnに結合する。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、pH7.4よりもpH6.0でより高いレベルでネコFcRnに結合する。

20

【0032】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、(1)1つもしくは複数の対照ポリペプチドよりもネコにおける半減期が増加しており、ここで、1つもしくは複数の対照ポリペプチドは、IgGのFc領域バリエーションの代わりに、対応する野生型ネコIgGのFc領域を有する以外は1つもしくは複数のポリペプチドと同一であり、及び/または(2)対照ポリペプチドよりもネコFcRnに対する結合が増加しており、ここで、アミノ酸位置は、EUナンバリングに基づくものである。

30

【0033】

いくつかの態様において、本開示は、(i)本明細書に記載されるポリペプチド、及び(ii)薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物を提供する。

【0034】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を提供する。

【0035】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載される1つまたは複数の核酸を含む、1つまたは複数の発現ベクターを提供する。

40

【0036】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載される1つもしくは複数の核酸または本明細書に記載される1つもしくは複数の発現ベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0037】

いくつかの態様において、本開示は、1つまたは複数のポリペプチドを作製する方法を提供し、方法は、以下を含む：

(a) 本明細書に記載される1つまたは複数の核酸を提供すること；

(b) 宿主細胞培養物中で1つまたは複数の核酸を発現させ、それにより、ポリペプチドを産生すること；

50

(c) (b) で産生されたポリペプチドを宿主細胞培養物から回収すること。

【0038】

いくつかの実施形態において、方法は、ポリペプチドを医薬製剤として製剤化することを更に含む。

【0039】

いくつかの態様において、本開示は、ネコの疾患または障害を治療することを、それを必要とするネコに行う方法であって、本明細書に記載される医薬組成物を含む組成物の有効量をネコに投与することを含む、方法を提供する。

【0040】

いくつかの態様において、本開示は、ネコの疾患または障害を予防することを、それを必要とするネコに行う方法であって、本明細書に記載される医薬組成物を含む組成物の有効量をネコに投与することを含む、方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施形態において、疾患または障害は、アレルギー性疾患、慢性疼痛、急性疼痛、炎症性疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患、胃腸疾患、心血管疾患、腎臓疾患、生殖機能関連障害、感染症またはがんである。

【0042】

いくつかの実施形態において、疾患または障害は、アトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、骨関節炎、関節炎、貧血、または肥満である。

【0043】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。本発明の実施または検証には、本明細書に記載されるものと同様または同等の方法及び材料を使用することができるが、例示的な方法及び材料について以下に記載する。本明細書で言及される全ての公開物、特許出願、特許及び他の参考文献は、その全体が参照により援用される。矛盾が生じる場合には、定義を含め、本出願が優先される。材料、方法及び例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。

【0044】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の発明を実施するための形態及び特許請求の範囲から明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】 NNKライブラリーのS428L、S428M、S428Y、S434F、S434W及びS434HのネコIgG1a FcバリエーションのBiacoreセンサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線を表す。Y軸：レゾナンスユニット(RU)；X軸：時間(秒)。

【図2】 NNKライブラリーのS252W、S252Y及びS252FのネコIgG1a FcバリエーションのBiacoreセンサーグラムを示す。野生型(WT)のBiacoreセンサーグラムも示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線を表す。Y軸：レゾナンスユニット(RU)；X軸：時間(秒)。

【図3】 野生型ネコIgG1a Fc領域(配列番号1)及び野生型ネコIgG1b Fc領域(配列番号2)と、推定の野生型ネコIgG2 Fc領域(配列番号3)のアミノ酸配列アライメントを示す。三角形の間にあるのがヒンジ領域である。矢印は、2つの重鎖間のジスルフィド架橋に関与すると思われるヒンジ領域内のシステイン残基を示す(Strietzel et al., 2014, Vet. Immunol. Immunopathol., 158:214-223)。

【図4】 野生型ネコIgG1a Fc領域(配列番号1)及びヒトIgG1 Fc領域のアミノ酸配列アライメントをEUNANBARINGに基づいて示す。実施例2に記載されるファージライブラリーの生成に使用した55のアミノ酸位置に強調及び下線を施した。

10

20

30

40

50

【図 5 A】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 5 B】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 6 A】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 R ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

10

【図 6 B】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 R ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 7 A】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 K ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

20

【図 7 B】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 K ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 8 A】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 V ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

30

【図 8 B】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 V ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 9 A】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

40

【図 9 B】ファージディスプレイライブラリーの S 2 5 2 Y + Q 3 1 1 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 1 0 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A セン

50

サーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図10B】ファージディスプレイライブラリーのS434YネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図11A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+S254RネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

10

【図11B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+S254RネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図12A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+S254KネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

20

【図12B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+S254KネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図13A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+L262EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

30

【図13B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+L262EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図14A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+T286DネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

40

【図14B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+T286DネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図15A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+T286EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

50

(秒)。

【図15B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+T286EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図16A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+T289KネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

10

【図16B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+T289KネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図17A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+E293DネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

20

【図17B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+E293DネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図18A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+E293KネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

30

【図18B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+E293KネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図19A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+L309VネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

40

【図19B】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+L309VネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図20A】ファージディスプレイライブラリーのS434Y+L309EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

50

(秒)。

【図 2 0 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + L 3 0 9 E ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

【図 2 1 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + K 3 2 6 D ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

10

【図 2 1 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + K 3 2 6 D ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

【図 2 2 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + Q 3 4 7 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

20

【図 2 2 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + Q 3 4 7 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

【図 2 3 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + S 4 2 6 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

30

【図 2 3 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 Y + S 4 2 6 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

【図 2 4 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 F ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

40

【図 2 4 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 F ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

【図 2 5 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 F + E 3 8 0 D ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒)。

【図 2 5 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 3 4 F + E 3 8 0 D ネコ I g G 1

50

a Fc バリエントとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図26A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+T286EネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図26B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+T286EネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図27A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+Q311VネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図27B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+Q311VネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図28A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+Q311KネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図28B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+Q311KネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図29A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+D312TネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図29B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+D312TネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図30A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+I377VネコIgG1a Fc バリエントとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図30B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+I377VネコIgG1

10

20

30

40

50

a FcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図31A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+I383LネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図31B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+I383LネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図32A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+N389cRネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図32B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+N389cRネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図33A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+E380D+S434RネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図33B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+E380D+S434RネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図34A】ファージディスプレイライブラリーのS428L+E380T+S434RネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図34B】ファージディスプレイライブラリーのS428L+E380T+S434RネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図35A】ファージディスプレイライブラリーのQ311RネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterra LSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1:1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸:レゾナンスユニット(RU);X軸:時間(秒)。

【図35B】ファージディスプレイライブラリーのQ311RネコIgG1a FcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterra LSAセン

10

20

30

40

50

サーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図36A】ファージディスプレイライブラリーのR392EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図36B】ファージディスプレイライブラリーのR392EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図37A】ファージディスプレイライブラリーのS252R+L262QネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図37B】ファージディスプレイライブラリーのS252R+L262QネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図38A】ファージディスプレイライブラリーのS252R+A378EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図38B】ファージディスプレイライブラリーのS252R+A378EネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図39A】ファージディスプレイライブラリーのT260E+L309E+Q355LネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図39B】ファージディスプレイライブラリーのT260E+L309E+Q355LネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図40A】ファージディスプレイライブラリーのT286E+S428RネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH6.0における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図40B】ファージディスプレイライブラリーのT286E+S428RネコIgG1aFcバリエーションとネコFcRNとのpH7.4における相互作用のCarterraLSAセンサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は1：1相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y軸：レゾナンスユニット（RU）；X軸：時間（秒）。

【図 4 1 A】ファージディスプレイライブラリーの S 2 9 0 V + R 3 3 4 D ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 4 1 B】ファージディスプレイライブラリーの S 2 9 0 V + R 3 3 4 D ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

10

【図 4 2 A】ファージディスプレイライブラリーの R 3 0 1 L + E 3 8 0 V + T 4 3 7 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 4 2 B】ファージディスプレイライブラリーの R 3 0 1 L + E 3 8 0 V + T 4 3 7 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

20

【図 4 3 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 2 8 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 4 3 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 2 8 L ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 4 4 A】ファージディスプレイライブラリーの S 4 2 8 L + S 2 5 2 R ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

30

【図 4 4 B】ファージディスプレイライブラリーの S 4 2 8 L + S 2 5 2 R ネコ I g G 1 a F c バリエーションとネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 4 5 A】野生型ネコ I g G 1 a F c バリエーション (配列番号 1) とネコ F c R N との p H 6 . 0 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

40

【図 4 5 B】野生型ネコ I g G 1 a F c バリエーション (配列番号 1) とネコ F c R N との p H 7 . 4 における相互作用の C a r t e r r a L S A センサーグラムを示す。不規則な線は測定データを表し、滑らかな線は 1 : 1 相互作用モデルを使用した近似曲線である。Y 軸：レゾナンスユニット (R U) ; X 軸：時間 (秒) 。

【図 4 6】抗 N G F モノクローナル抗体 (m A b) バリエーションの血清中濃度を記述するために使用された非線形混合効果 (N L M E) モデルを用いた線形クリアランスを有する 2 コンパートメント薬物動態 (P K) モデルのフロー図を示す。

【図 4 7】野生型 (W T) 抗体ならびに抗体バリエーション S 2 5 2 W 、 S 4 2 8 Y 、 S 4 2

50

8 Y + L 3 0 9 V、S 4 2 8 Y + Q 3 1 1 V、及び S 4 2 8 Y + S 2 5 4 R の個々に観察された血清中濃度を示す（抗体／バリエーションにつき 2 匹の動物からの結果）。

【図 4 8】2 m g / k g の抗体／バリエーションの単回 I V 投与を受ける典型的な 2 k g のネコにおける、野生型（W T）抗体ならびに抗体バリエーション S 2 5 2 W、S 4 2 8 Y、S 4 2 8 Y + L 3 0 9 V、S 4 2 8 Y + Q 3 1 1 V、及び S 4 2 8 Y + S 2 5 4 R の予測血清中濃度プロファイルを示す。

【図 4 9 A】野生型ネコ I g G 1 a の結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 B】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 C】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 D】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 E】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 F】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 G】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 H】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 I】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 J】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 K】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 4 9 L】ネコ I g G 1 a バリエーションの結合を示す B i a c o r e センサーグラムを示す。各図において、薄い線は測定データを表し、濃い線は近似曲線を表す。Y 軸：レゾナンスユニット（R U）；X 軸：時間（秒）。

【図 5 0】バリエーションにつき 2 匹の動物を用いて個々に観察された野生型及び F c バリエーションの血清中濃度を示す。

【図 5 1】野生型（W T）I g G 1 a F c または I g G 1 a F c バリエーションを保持するモノクローナル抗体の予測血清中濃度プロファイルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 6】

多種多様なネコ疾患の予防及び治療のための治療薬としてポリペプチド（例えば、抗体、受容体のリガンド結合ドメイン、酵素、リガンド、ペプチド）の使用が増えているが、

特に、ポリペプチドを繰り返し投与しなければならない慢性疾患の予防または治療には、半減期の長いポリペプチドを開発することが重要である。

【0047】

したがって、本開示は、ネコ免疫グロブリンFc領域またはそのネコFcRn結合領域であって、これらの配列を含む1つまたは複数のポリペプチドの半減期を向上させる変異を含むものを特徴とする。また、これらのドメインを含むポリペプチド及びその使用方法も開示される。これらのペプチドは、様々な治療用途及び診断用途に使用することができる。

【0048】

値が範囲で記載されている場合、その記載は、特定の数値または特定の低位範囲が明示されているかどうかにかかわらず、かかる範囲内の全ての可能な低位範囲及びかかる範囲内に入る特定の数値の開示を含むことが理解されるべきである。全ての数の表記、例えば、pH、温度、時間、濃度、及び分子量は、範囲を含め、近似値であり、1.0または0.1の増分で適宜(+)または(-)に変動し、あるいは+/-15%、あるいは10%、あるいは5%、あるいは2%の変動がある。必ずしも常に明示されているわけではないが、全ての数の表記は、「約」という語が先行することが理解される。また、必ずしも常に明示されているわけではないが、本明細書に記載される試薬は単なる例示であり、その等価物は当該技術分野において知られていることも理解される。

【0049】

「約」という用語は、量または濃度などの測定可能な値に言及する際に本明細書で 사용되는場合、明記される量の20%、10%、5%、1%、0.5%、または0.1%の変動を包含することを意味している。

【0050】

ネコ抗体

ネコは、典型的に、IgG1a、IgG1b及びIgG2と呼ばれる3つのIgG重鎖を有する。これらの重鎖は、3つの異なるネコIgGのサブクラスを表している。これらの重鎖アミノ酸及びDNA配列は、Strietzel et al., 2014, Vet. Immunol. Immunopathol., 158:214-223及びGENBANKデータベースから入手可能である。例えば、ネコIgG1a重鎖のアミノ酸配列は、GENBANKアクセッション番号BAA32229.1であり、ネコIgG1b重鎖は、GENBANKアクセッション番号BAA32230.1であり、ネコIgG2重鎖は、GENBANKアクセッション番号KF811175.1である。ネコ抗体はまた、カッパ及びラムダの2つの種類の軽鎖を含む。これらの軽鎖のDNA及びアミノ酸配列もまた、GENBANKデータベースから得ることができる。例えば、ネコカッパ軽鎖アミノ酸配列は、アクセッション番号AF198257.1であり、ネコラムダ軽鎖は、アクセッション番号E07339.1である。

【0051】

ネコFc領域のCH2領域：

ネコ抗体のCH2領域は、ネコIgG抗体のアミノ酸231~340（EUNANバリングに従う）を含むか、またはそれらからなる。CH2領域は、そのN末端及び／またはC末端に、1~6個（例えば、1、2、3、4、5、6個）の追加のアミノ酸または欠失を含み得ることが理解される。

【0052】

ネコIgG1aのCH2領域のアミノ酸配列は、以下に提供される：PPEMLGGP
SIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCCLVVDLGPDDSDVQITWF
VDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKE
FKCKVNSKSLPSPIERTISKAK（配列番号4）

【0053】

ネコIgG1bのCH2ドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCCLVVDLGPDD

SDVQITWFDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILH
QDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKDK (配列番号5)

【0054】

ネコIgG2のCH2ドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

VPEIPGAPSVFIFFPKPKDTLSISRTP EVTCLVVDLGPDD
SNVQITWFDNTEMHTAKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILH
QDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMERTISKAK (配列番号6)

【0055】

ネコFc領域のCH3領域：

ネコ抗体のCH3領域は、ネコIgG抗体のアミノ酸341～447 (EUNanバリン
グに従う) を含むか、またはそれらからなる。CH3領域は、そのN末端及び／またはC
末端に、1～6個 (例えば、1、2、3、4、5、6個) の追加のアミノ酸または欠失を
含む得ることが理解される。

【0056】

ネコIgG1aのCH3ドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

GQPHEPQVYVLPAPAQEELSRNKVS VTC LIKSFHPPDIAVE
WEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQ
RGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK (配列番号7)

【0057】

ネコIgG1bのCH3ドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

GQPHEPQVYVLPAPAQEELSRNKVS VTC LIEGFYPSDIAVE
WEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSRWQ
RGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK (配列番号8)

【0058】

ネコIgG2のCH3ドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

GQPHEPQVYVLPPTQEELESENKVS VTC LIKGFHPPDIAVE
WEITGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQ
RGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK (配列番号9)

【0059】

ネコFc領域のFc領域：

ネコIgG抗体のFc領域は、ネコIgG抗体のアミノ酸231～447 (EUNanバ
リングに従う) を含むか、またはそれらからなる。

【0060】

ネコIgG1aのFcドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

PPEMLGGPSIFIFFPKPKDTLSISRTP EVTCLVVDLGPDD
SDVQITWFDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILH
QDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYV
LPPAQEELSRNKVS VTC LIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPE
NNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVS
HEALHSHHTQKSLTQSPGK

(配列番号1)

【0061】

ネコIgG1bのFcドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

PPEMLGGPSIFIFFPKPKDTLSISRTP EVTCLVVDLGPDD
SDVQITWFDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILH
QDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKDKGQPHEPQVYV
LPPAQEELSRNKVS VTC LIEGFYPSDIAVEWEITGQPEPE
NNYRTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSRWQRGNTYTCSVS
HEALHSHHTQKSLTQSPGK

(配列番号2)

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

ネコIgG2のFcドメインのアミノ酸配列は、以下に提供される：

V P E I P G A P S V F I F P P K P K D T L S I S R T P E V T C L V V D L G P D D
S N V Q I T W F V D N T E M H T A K T R P R E E Q F N S T Y R V V S V L P I L H
Q D W L K G K E F K C K V N S K S L P S A M E R T I S K A K G Q P H E P Q V Y V
L P P T Q E E L S E N K V S V T C L I K G F H P P D I A V E W E I T G Q P E P E
N N Y Q T T P P Q L D S D G T Y F L Y S R L S V D R S H W Q R G N T Y T C S V S
H E A L H S H H T Q K S L T Q S P G K （配列番号3）

【 0 0 6 3 】

以下の表1は、ヒトIgG1、ネコIgG1a、ネコIgG1b、及びネコIgG2のCH2及びCH3ドメインのアミノ酸配列をEUNANBARINGに基づき比較するものである。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 :

EU ナンバリング	CH2 ドメイン			
	ヒト IgG1	ネコ IgG1a	ネコ IgG1b	ネコ IgG2
231	A	P	P	V
232	P	P	P	P
233	E	E	E	E
234	L	M	M	I
235	L	L	L	P
236	G	G	G	G
237	G	G	G	A
238	P	P	P	P
239	S	S	S	S
240	V	I	I	V
241	F	F	F	F
242	L	I	I	I
243	F	F	F	F
244	P	P	P	P
245	P	P	P	P
246	K	K	K	K
247	P	P	P	P
248	K	K	K	K
249	D	D	D	D
250	T	T	T	T
251	L	L	L	L
252	M	S	S	S
253	I	I	I	I
254	S	S	S	S
255	R	R	R	R
256	T	T	T	T
257	P	P	P	P
258	E	E	E	E
259	V	V	V	V
260	T	T	T	T
261	C	C	C	C
262	V	L	L	L
263	V	V	V	V
264	V	V	V	V
265	D	D	D	D
266	V	L	L	L
267	S	G	G	G

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

268	H	P	P	P
269	E	D	D	D
270	D	D	D	D
271	P	S	S	S
272	E	D	D	N
273	V	V	V	V
274	K	Q	Q	Q
275	F	I	I	I
276	N	T	T	T
277	W	W	W	W
278	Y	F	F	F
279	V	V	V	V
280	D	D	D	D
281	G	N	N	N
282	V	T	T	T
283	E	Q	Q	E
284	V	V	V	M
285	H	Y	Y	H
286	N	T	T	T
287	A	A	A	A
288	K	K	K	K
289	T	T	T	T
290	K	S	S	R
291	P	P	P	P
292	R	R	R	R
293	E	E	E	E
294	E	E	E	E
295	Q	Q	Q	Q
296	Y	F	F	F
297	N	N	N	N
298	S	S	S	S
299	T	T	T	T
300	Y	Y	Y	Y
301	R	R	R	R
302	V	V	V	V
303	V	V	V	V
304	S	S	S	S
305	V	V	V	V

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

306	L	L	L	L
307	T	P	P	P
308	V	I	I	I
309	L	L	L	L
310	H	H	H	H
311	Q	Q	Q	Q
312	D	D	D	D
313	W	W	W	W
314	L	L	L	L
315	N	K	K	K
316	G	G	G	G
317	K	K	K	K
318	E	E	E	E
319	Y	F	F	F
320	K	K	K	K
321	C	C	C	C
322	K	K	K	K
323	V	V	V	V
324	S	N	N	N
325	N	S	S	S
326	K	K	K	K
327	A	S	S	S
328	L	L	L	L
329	P	P	P	P
330	A	S	S	S
331	P	P	P	A
332	I	I	I	M
333	E	E	E	E
334	K	R	R	R
335	T	T	T	T
336	I	I	I	I
337	S	S	S	S
338	K	K	K	K
339	A	A	D	A
340	K	K	K	K

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

EUナンバリング	CH3 ドメイン			
	ヒト IgG1	ネコ IgG1a	ネコ IgG1b	ネコ IgG2
341	G	G	G	G
342	Q	Q	Q	Q
343	P	P	P	P
344	R	H	H	H
345	E	E	E	E
346	P	P	P	P
347	Q	Q	Q	Q
348	V	V	V	V
349	Y	Y	Y	Y
350	T	V	V	V
351	L	L	L	L
352	P	P	P	P
353	P	P	P	P
354	S	A	A	T
355	R	Q	Q	Q
356	D	E	E	E
357	E	E	E	E
358	L	L	L	L
359	T	S	S	S
360	K	R	R	E
361	N	N	N	N
362	Q	K	K	K
363	V	V	V	V
364	S	S	S	S
365	L	V	V	V
366	T	T	T	T
367	C	C	C	C
368	L	L	L	L
369	V	I	I	I
370	K	K	E	K
371	G	S	G	G
372	F	F	F	F
373	Y	H	Y	H
374	P	P	P	P
375	S	P	S	P
376	D	D	D	D
377	I	I	I	I
378	A	A	A	A

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

379	V	V	V	V
380	E	E	E	E
381	W	W	W	W
382	E	E	E	E
383	S	I	I	I
384	N	T	T	T
385	G	G	G	G
386	Q	Q	Q	Q
387	P	P	P	P
388	E	E	E	E
389a	N	P	P	P
389b		E	E	E
389c		N	N	N
390	N	N	N	N
391	Y	Y	Y	Y
392	K	R	R	Q
393	T	T	T	T
394	T	T	T	T
395	P	P	P	P
396	P	P	P	P
397	V	Q	Q	Q
398	L	L	L	L
399	D	D	D	D
400	S	S	S	S
401	D	D	D	D
402	G	G	G	G
403	S	T	T	T
404	F	Y	Y	Y
405	F	F	F	F
406	L	V	L	L
407	Y	Y	Y	Y
408	S	S	S	S
409	K	K	R	R
410	L	L	L	L
411	T	S	S	S
412	V	V	V	V
413	D	D	D	D
414	K	R	R	R

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

415	S	S	S	S
416	R	H	R	H
417	W	W	W	W
418	Q	Q	Q	Q
419	Q	R	R	R
420	G	G	G	G
421	N	N	N	N
422	V	T	T	T
423	F	Y	Y	Y
424	S	T	T	T
425	C	C	C	C
426	S	S	S	S
427	V	V	V	V
428	M	S	S	S
429	H	H	H	H
430	E	E	E	E
431	A	A	A	A
432	L	L	L	L
433	H	H	H	H
434	N	S	S	S
435	H	H	H	H
436	Y	H	H	H
437	T	T	T	T
438	Q	Q	Q	Q
439	K	K	K	K
440	S	S	S	S
441	L	L	L	L
442	S	T	T	T
443	L	Q	Q	Q
444	S	S	S	S
445	P	P	P	P
446	G	G	G	G
447	K	K	K	K

10

20

30

【0064】

半減期を改善するネコIgG Fcの置換

血清中持続性の増加は、治療用ポリペプチドにとって有益な特性である。本開示は、野生型ネコIgG1a、IgG1b及びIgG2のFc領域の置換を特徴とし、置換は、1つまたは複数の対照ポリペプチドと比べて、これらのFc領域を含む1つまたは複数のポリペプチドのネコにおける半減期を向上させるものであり、ここで、1つまたは複数の対照ポリペプチドは、IgGのFc領域バリエーションの代わりに、対応する野生型ネコIgGのFc領域を有する以外は1つまたは複数のポリペプチドと同一であるものである。半減期を増加させる置換は、ネコCH2領域、ネコCH3領域のうちの1つ以上において、またはネコFc（例えば、CH2+CH3）領域との関連でなされ得る。

40

【0065】

本開示は、ネコIgGのFc領域バリエーションまたはそのネコFcRn結合領域を含むポリペプチドであって、ポリペプチドは、アミノ酸置換を、以下からなる群から選択される少なくとも1つの位置：

(i) 野生型ネコIgGのアミノ酸位置252に対応する位置であって、アミノ酸置換は

50

S 2 5 2 Wである、位置；

(i i) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 4 に対応する位置であって、アミノ酸置換は S 2 5 4 R 及び S 2 5 4 K からなる群から選択される、位置；

(i i i) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 0 9 に対応する位置であって、前記アミノ酸置換は L 3 0 9 V または L 3 0 9 Y である、位置；

(i v) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 1 1 に対応する位置であって、アミノ酸置換は Q 3 1 1 R、Q 3 1 1 V、Q 3 1 1 L 及び Q 3 1 1 K からなる群から選択される、位置；

(v) 野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 4 2 8 に対応する位置であって、アミノ酸置換は S 4 2 8 M、S 4 2 8 Y、S 4 2 8 H 及び S 4 2 8 R からなる群から選択される、位置；
ならびに

(v i) 野生型ネコ I g G の 2 6 2、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 3、3 0 1、3 1 2、3 2 6、3 3 4、3 4 7、3 5 5、3 7 7、3 8 0、3 8 3、3 8 9 c、3 9 2、4 2 6 及び 4 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置に含み、ここで、アミノ酸位置は、E U ナンバリングに基づき、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G の F c ドメインと比較した場合、ネコ F c R n に対する結合親和性が増加している、ポリペプチドを提供する。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G の F c ドメインと比較した場合、約 5 . 0 ~ 約 6 . 5 (例えば、約 5 . 5 または約 6 . 0) の p H において、ネコ F c R n に対する結合親和性が増加している。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 2 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 2 5 2 におけるアミノ酸置換は、S 2 5 2 W である。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 2 5 4 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 2 5 4 におけるアミノ酸置換は、S 2 5 4 R である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 2 5 4 におけるアミノ酸置換は、S 2 5 4 K である。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、アミノ酸置換 L 3 0 9 V または L 3 0 9 Y を含む。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 3 1 1 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 R である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 V である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 K である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 3 1 1 におけるアミノ酸置換は、Q 3 1 1 L である。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ I g G のアミノ酸位置 4 2 8 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 M である。

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、少なくとも、アミノ酸置換 S 4 2 8 Y を含む。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 Y である。いくつかの実施形態において、野生型ネコ I g G の位置 4 2 8 におけるアミノ酸置換は、S 4 2 8 R である。いくつかの実施形態において、野生型ネ

10

20

30

40

50

コ Ig G の位置 428 におけるアミノ酸置換は、S428H である。

【0073】

別の実施形態において、ポリペプチドは、野生型ネコ Ig G の 262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426 及び 437 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H 及び T437L、ならびに前述のいずれかの保存的アミノ酸置換からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H 及び T437L からなる群から選択される。

10

【0074】

別の態様において、本開示は、ネコ Ig G の Fc 領域バリエーションまたはそのネコ Fc Rn 結合領域を含むポリペプチドであって、ポリペプチドは、2 つ以上のアミノ酸置換を含み、2 つ以上のアミノ酸置換は、以下からなる群：

20

(i) 野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 252 に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S252W、S252Y、S252F 及び S252R からなる群から選択される、アミノ酸置換；

(ii) 野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 254 に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S254R 及び S254K からなる群から選択される、アミノ酸置換；

(iii) 野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 309 に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、L309V、L309Y 及び L309E からなる群から選択される、アミノ酸置換；

(iv) 野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 311 に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、Q311R、Q311V、Q311L 及び Q311K からなる群から選択される、アミノ酸置換；

30

(v) 野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 428 に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S428L、S428M、S428Y、S428H 及び S428R からなる群から選択される、アミノ酸置換；

(vi) 野生型ネコ Ig G の 262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426 及び 437 からなる群から選択されるアミノ酸位置に対応する 1 つ以上の位置におけるアミノ酸置換；ならびに

(vii) 野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 434 に対応する位置におけるアミノ酸置換であって、S434F、S434W、S434H、S434R、及び S434Y からなる群から選択される、アミノ酸置換から選択され、

40

ここで、アミノ酸位置は、EU ナンバリングに基づき、2 つ以上のアミノ酸置換は、異なる位置にあり、ポリペプチドは、(a) 野生型ネコ Ig G の Fc ドメイン、及び (b) 2 つ以上のアミノ酸置換のうちの 1 つのみを含むポリペプチドと比較した場合、ネコ Fc Rn に対する結合親和性が増加している、ポリペプチドを提供する。

【0075】

いくつかの実施形態において、2 つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 286 に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、T286E 及び T286D からなる群から選択される。

50

【0076】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置289に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、T289K及びT289Hからなる群から選択される。

【0077】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置301に対応する位置にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、R301Lである。

【0078】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置334に対応する位置にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、R334Dである。

【0079】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置426に対応する位置におけるアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、S426L及びS426Hからなる群から選択される。

【0080】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、野生型ネコIgGのアミノ酸位置437に対応する位置にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、T437Lである。

【0081】

いくつかの実施形態において、2つ以上のアミノ酸置換は、以下からなる群：

- (i) S252Yと、Q311R及び／またはQ311Lとの組み合わせ；
- (ii) S434Yと、S254R、S254K、L262E、T286D、T286E、T289K、E293D、E293K、L309V、L309E、K326D及びQ347Lのうちの1つ以上との組み合わせ；
- (iii) S434F及びE380D；
- (iv) S428Lと、S252R、T286E、Q311V、Q311K、D312T、I377V、I383L、N389cRのうちの1つ以上との組み合わせ；
- (v) S428L、E380D及びS434R；
- (vi) S428L、E380T及びS434R；
- (vii) S252Rと、L262Qとの組み合わせ；
- (viii) T260E、L309E及びQ355L；
- (ix) S290V及びR344D；ならびに
- (x) R301L、E380V及びT437Lから選択される。

【0082】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、配列番号1～3からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一であるアミノ酸配列を含む。

【0083】

いくつかの場合において、本開示は、配列番号4～6のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む、ネコIgGのCH2領域バリエーションを提供する。また、配列番号4～6のいずれか1つとは1～15個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個）のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含む、ネコIgGのCH2領域バリエーションも提供される。

【0084】

他の場合において、本開示は、配列番号7～9のいずれか1つに記載されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 % または少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む、ネコ Ig G の CH3 領域バリエーションを特徴とする。また、配列番号 7～9 のいずれか 1 つとは 1～15 個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 個）のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含む、ネコ Ig G の CH3 領域バリエーションも特徴とする。

【0085】

ある特定の場合において、本開示は、配列番号 1～3 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む、ネコ Ig G の Fc 領域バリエーションを特徴とする。また、配列番号 1～3 のいずれか 1 つとは 1～20 個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個）のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含む、ネコ Ig G の Fc 領域バリエーションが開示される。

【0086】

いくつかの実施形態において、ネコ Ig G の Fc CH2 領域バリエーションを含む 1 つまたは複数のポリペプチドが提供され、CH2 領域バリエーションは、配列番号 4～6 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、ネコ Ig G の Fc CH3 領域バリエーションを含む 1 つまたは複数のポリペプチドを特徴とし、CH3 領域バリエーションは、配列番号 7～9 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

【0088】

いくつかの実施形態において、ネコ Ig G の Fc 領域バリエーションを含む 1 つまたは複数のポリペプチドを特徴とし、Fc 領域バリエーションは、配列番号 1～3 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

【0089】

別途指摘されるように、ポリペプチドは、いくつかの実施形態において、野生型ネコ Ig G のアミノ酸位置 250～256、アミノ酸位置 285～288；アミノ酸位置 307～315；アミノ酸位置 376～380；アミノ酸位置 383～392；またはアミノ酸位置 428～437 に対応する領域中に少なくとも 1 つの追加のアミノ酸置換を更に含み、ここで、アミノ酸位置は、EU ナンバリングに基づき、ポリペプチドは、野生型ネコ Ig G の Fc ドメインと比較して、ネコ Fc Rn に対する結合が増加している。

【0090】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、以下の表 2 に開示されるものから選択される少なくとも 1 つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個）の追加のアミノ酸置換を含む。

10

20

30

40

【表 2】

表 2：ネコ IgG1a Fc バリエーションのネコ Fc RN に対する結合を増加させるアミノ酸置換（グループ 1 及び 2）の一覧。

EU ナンバリングによる位置	野生型ネコ IgG1a Fc	ネコ IgG1a Fc バリエーションのアミノ酸置換（グループ 1）	代替的ネコ IgG1a Fc バリエーションのアミノ酸置換（グループ 2）
252	S	W	FYMRV
254	S	RK	WYHLFVM
262	L	QE	
286	T	ED	
289	T	K	
290	S	VY	
293	E	DKH	
301	R	L	
309	L	VY	E
311	Q	RVKL	AYF
312	D	T	
326	K	D	
334	R	D	
347	Q	L	
355	Q	L	
377	I	VY	
380	E	DVT	
383	I	L	
389c	N	R	
392	R	E	
426	S	LH	
428	S	RMVH	WL
434	S	RYFWH	A
437	T	L	

【0091】

置換は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはFcドメインの片方または両方の鎖になされてもよい。いくつかの場合において、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはFcドメインの両方の鎖上の置換は、同一である。いくつかの場合において、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはFcドメインの両方の鎖上の置換は、同一ではない。いくつかの場合において、Fc領域は、エフェクター機能の増加もしくは減少及び／または産物の不均一性の改善をもたらす1つ以上の追加の置換を含む。

【0092】

半減期を向上させる置換と組み合わせることができる他の置換

治療用ポリペプチド／タンパク質（例えば、モノクローナル抗体）の開発は、所望のポリペプチド／タンパク質を生成するために、一連の複雑な作業の調整を必要とする複雑なプロセスである。これらには、特異性、親和性、機能活性、人工細胞株における発現レベルの最適化、長期安定性、エフェクター機能の除去または向上、ならびに商業的に利用可

能な製造法及び精製法の開発が含まれる。本開示は、上記の目標のいずれか1つ以上を促進する任意の追加の置換を包含する。

【0093】

いくつかの実施形態において、置換は、ネコFc領域のエフェクター機能を減少させるために導入される。そのような置換は、当業者に知られており、ネコIgGの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、または7個）の位置にあり得る。例示的な例としては、WO2019/035010A1が挙げられる。

【0094】

いくつかの実施形態において、プロテインAクロマトグラフィーによる精製を容易にするために、置換を野生型ネコIgGFc領域に導入して、プロテインAへの結合を高める。そのような置換は、当業者に知られており、ネコIgGの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、または7個）の位置にあり得る。例示的な例としては、WO2019/035010A1が挙げられる。

【0095】

いくつかの実施形態において、追加のアミノ酸置換は、親ポリペプチドまたは野生型ポリペプチドと比較して、FcRnに対する結合親和性を変更するためになされる（例えば、FcRnとの結合親和性を増加または減少させる）。

【0096】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、ネコ抗体のヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態において、修飾は、半減期を増加させるために、ネコ抗体のヒンジ領域に行うことができる。

【0097】

ネコIgGFcバリエーションを含むポリペプチド

本開示は、ネコにおける半減期を増加させることから利益を得ることができる任意のポリペプチドを包含する。半減期を増加させるために、これらのポリペプチドは、上に開示されるFc領域バリエーション（例えば、CH2領域、CH3領域、CH2+CH3領域）を含むように設計される。

【0098】

例示的なポリペプチドとしては、限定するものではないが、全抗体、scFv、ナノボディ、受容体のリガンド結合部分、サイトカイン、成長因子、酵素、及びペプチドが挙げられる。例えば、上で開示されるCH3ドメインバリエーションは、scFvナノボディ、受容体のリガンド結合部分（例えば、ネコIL-13Rα1またはIL-13Rα2のリガンド結合部分）、サイトカイン、成長因子、酵素、またはペプチドに結合されてもよい。本明細書で使用される場合、「ナノボディ」、「VHH」、「VHH抗体断片」及び「単ドメイン抗体」という用語は、ラクダ科動物で見られる種類の抗体の単一重鎖の可変ドメインを示すために、本明細書中で区別なく使用され、典型的に天然で軽鎖を欠いている。好適なナノボディは、当業者によく知られているが、その実例としては、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ及びアルパカのナノボディが挙げられる。あるいは、上に開示されるFc領域バリエーションは、これらのポリペプチドに結合され得る。別の実施形態において、ネコまたはネコ化抗体は、本明細書で開示されるFc領域バリエーションを含むように改変される。

【0099】

いくつかの実施形態において、本開示のポリペプチドは、抗体ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、抗原またはポリペプチドのリガンド結合ドメインとFc領域バリエーションとの間に配置され得る。いくつかの場合において、ヒンジ領域は、サイトカイン、成長因子、酵素、またはペプチドのC末端に結合され、ヒンジ領域は、Fc領域バリエーションのN末端に結合される。例示的なヒンジ領域配列は、以下に提供される。

IgG1a: KTDHPPGPKPCDCPKCP（配列番号10）；

IgG1b: KTDHPPGPKPCDCPKCP（配列番号11）；

IgG2: KTA STIESKTGEGPKCP（配列番号12）；

10

20

30

40

50

【0100】

本開示の組み換えタンパク質におけるヒンジ領域は、使用される場合、配列番号10～12のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列と比べて、0～6個（すなわち、0、1、2、3、4、5、または6個）のアミノ酸置換を含み得る。いくつかの場合において、本開示の組み換えタンパク質に使用されるヒンジ領域は、配列番号10～12のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

【0101】

本開示の1つまたは複数のポリペプチドは、結合ドメインを含み得る。結合ドメインは、本明細書に記載される選択標的のタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフ、及び／またはエピトープに特異的に結合することができる。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）は、タンパク質を含み得、ここで、タンパク質は、本明細書に記載される治療用タンパク質である。いくつかの実施形態において、標的（例えば、結合ドメインの標的）または治療用タンパク質（例えば、融合ポリペプチド）は、以下からなる群から選択される：17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケート-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIALK-2、アクチビンRIBALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMS、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-抗トリプシン、アルファ-V/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、IgE、アンジオテンシン1型(AT1)受容体、アンジオテンシン2型(AT2)受容体、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、Bリンパ球刺激因子(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2、BMP-2a、BMP-3オステオゲニン、BMP-4、BMP-2b、BMP-5、BMP-6、Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPr、BMPr-IA(ALK-3)、BMPr-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPr-II(BRK-3)、BMPs、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原(CEA)、癌腫関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPi、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CC1、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、C

10

20

30

40

50

D47、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、
 CD66e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD
 137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152
 、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウ
 エルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-
 1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4
 、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CX
 CL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10
 、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL
 16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CX
 CR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩
 壊促進因子、des (1-3)-IGF-I (脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、D
 NAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、
 EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、
 EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot
 、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セ
 レクチン、ET-1、第IIa因子、第VII因子、第VIIIIc因子、第IX因子、線
 維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、F
 GF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フ
 イブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカ
 イン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZ
 D8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、G
 D3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、C
 DMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12
 、CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (MIC-
 1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-ア
 ルファ2、GFR-アルファ3、GITR、GLP1、GLP2、グルカゴン、Glut
 4、糖タンパク質IIb/IIIIa (GP IIb/IIIIa)、GM-CSF、gp1
 30、gp72、GRO、GnRH、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-capま
 たはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク
 質、HCMV) gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF
)、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-
 2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (H
 SV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子メラノーマ関
 連抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3
 ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、心
 臓ミオシン、サイトメガロウイルス (CMV)、成長ホルモン (GH)、HVEM、1-
 309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg
 、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGF
 BP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R
 、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、I
 L-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、
 IL-18R、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IL-31、IL-
 33、インターロイキン受容体 (例えば、IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-
 5R、IL-6R、IL-8R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13
 R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-21R、IL-22R、IL-
 23R、IL-25R、IL-31R、IL-33R)、インターフェロン (INF)-
 アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、
 インスリンB鎖、インスリン様成長因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアル
 ファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンA

10

20

30

40

50

ルファ4／ベータ7、インテグリンアルファ5（アルファV）、インテグリンアルファ5／ベータ1、インテグリンアルファ5／ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロングamma、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト成長因子（KGF）、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP（TGF-1）、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、ルイスY抗原、ルイスY関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺サーファクタント、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、メタロプロテアーゼ、MGDF受容体、MGMT、MHC（HLA-DR）、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン（Muc1）、MUC18、ミュー管阻害因子、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NAV1.7、NCAD、N-カドヘリン、NCA90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニューロツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PD1、PDL1、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PLGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レキシンA鎖、レキシンB鎖、レニン、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマトイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-1、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質-72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ／ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、精巣PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータPan

10

20

30

40

50

特異的、TGF-ベータR1（ALK-5）、TGF-ベータR11、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpos、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A（TRAIL R1Apo-2、DR4）、TNFRSF10B（TRAIL R2DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B）、TNFRSF10C（TRAIL R3DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF12（TWEAK R FN14）、TNFRSF13B（TACI）、TNFRSF13C（BAFF R）、TNFRSF14（HVEM

ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75 NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF R1CD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DCTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23 (DCTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANKリガンドODF、OPGリガンド)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITRリガンドAITRリガンド、TL6)、TNFSF1A (TNF-a Connectin、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40リガンドgp34、TXGP1)、TNFSF5 (CD40リガンドCD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6 (FasリガンドApo-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンドCD70)、TNFSF8 (CD30リガンドCD153)、TNFSF9 (4-1BBリガンドCD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリング受容体、TRF、Trk (例えば、TrkA)、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、ルイスY関連炭水化物を発現する腫瘍関連抗原、TWEAK、TXB2、Ung、UPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-カドヘリン、VE-カドヘリン-2、VEFGFR-1 (fit-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、ならびにホルモン及び成長因子の受容体。

【0102】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、ネコにおいて、1つ以上の治療標的または抗原に特異的に結合し、例えば、限定するものではないが、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMS、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、ANG、Ang、アンジオテンシン1型(AT1)受容体、アンジオテンシン2型(AT2)受容体、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、b-ECGF、CD19、CD20、CD30、CD34、CD40、CD40L、CD47、COX、CTLA-4、EGFR (ErbB-1)、EPO、卵胞刺激ホルモン、GDF-8 (ミオスタチン)、GLP1、GLP2、GnRH、成長ホルモン放出因子、IgE、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-

5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IL-31、IL-33、インターロイキン受容体（例えば、IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-8R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-21R、IL-22R、IL-23R、IL-25R、IL-31R、IL-33R）、LAP（TGF-1）、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LFA-1、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF-ベータ、OX40L、OX40R、PD1、PDL1、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータPan特異的、TGF-ベータR1（ALK-5）、TGF-ベータR11、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-R1、TNF-RII、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF9（4-1BB CD137、ILA）、VEGFR-1（flt-1）、VEGF、VEGFR、及びVEGFR-3（flt-4）などが挙げられる。

10

【0103】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のポリペプチドは、タンパク質を含むことができ、ここで、タンパク質は、治療用タンパク質、例えば、EPO、CTLA4、LFA3、VEGFR1／VEGFR3、IL-1R、IL-4R、GLP-1受容体アゴニスト、またはトロンボポエチン結合ペプチドである。いくつかの実施形態において、治療用タンパク質は、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIAAALK-2、アクチビンRI BALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17／TACE、ADAMS、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、ANG、Ang、アンジオテンシン1型（AT1）受容体、アンジオテンシン2型（AT2）受容体、心房性ナトリウム利尿因子、av／b3インテグリン、b-ECGF、CD19、CD20、CD30、CD34、CD40、CD40L、CD47、COX、CTLA-4、EGFR（Erbb-1）、EPO、卵胞刺激ホルモン、GDF-8（ミオスタチン）、GLP1、GLP2、GnRH、成長ホルモン放出因子、IgE、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IL-31、IL-33、インターロイキン受容体（例えば、IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-8R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-21R、IL-22R、IL-23R、IL-25R、IL-31R、IL-33R）、LAP（TGF-1）、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LFA-1、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF-ベータ、OX40L、OX40R、PD1、PDL1、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータPan特異的、TGF-ベータR1（ALK-5）、TGF-ベータR11、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-R1、TNF-RII、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF9（4-1BB CD137、ILA）、VEGFR-1（flt-1）、VEGF、VEGFR、またはVEGFR-3（flt-4）である。

20

30

40

【0104】

医薬組成物

本明細書に記載される1つまたは複数のポリペプチドの医薬組成物または無菌組成物を

50

調製するために、1つまたは複数のポリペプチドは、薬学的に許容される担体または賦形剤とともに混合され得る。(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984) 参照)。

【0105】

治療薬及び診断薬の製剤は、許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液または懸濁液の形態に調製され得る(例えば、Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 参照)。一実施形態において、本発明の1つまたは複数のポリペプチドは、pH5~6の酢酸ナトリウム溶液で適切な濃度に希釈され、張性のためにNaClまたはスクロースが添加される。安定性を高めるために、ポリソルベート20またはポリソルベート80などの追加の剤が添加されてもよい。

【0106】

単独または別の薬剤と組み合わせて投与されるポリペプチド組成物の毒性及び治療有効性は、細胞培養または実験動物における標準的な製薬手順、例えば、LD₅₀(集団の50%にとって致死的な用量)及びED₅₀(集団の50%において治療上有効な用量)を決定するための手順によって決定することができる。毒性と治療効果との間の用量の比が治療指数である(LD₅₀/ED₅₀)。特定の態様において、高い治療指数を呈する1つまたは複数のポリペプチドが望ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ネコに使用するための投与量の範囲を導き出すのに使用することができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、毒性がほとんどまたは全くないED₅₀に入る循環濃度の範囲内である。投与量は、採用される剤形及び投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。

【0107】

投与の様式は、様々であり得る。好適な投与経路には、経口、直腸、経粘膜、腸、非経口；筋肉内、皮下、皮内、髄内、髄腔内、直接脳(心)室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、眼内、吸入、吹送、局所、皮膚、経皮、または動脈内が含まれる。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のポリペプチドは、注射などの侵襲性経路によって投与することができる。更なる実施形態において、1つまたは複数のポリペプチドは、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腫瘍内、または吸入、エアロゾル送達によって投与される。

【0108】

本明細書で開示される医薬組成物は、注入によって投与されてもよい。医薬組成物を投与するよく知られているインプラント及びモジュールの形態の例としては、制御された速度で薬剤を分注するための埋め込み可能な微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号；正確な注入速度で薬物を送達するための薬剤注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号；連続的な薬物送達のための埋め込み可能な可変流量の注入装

置を開示する米国特許第4,447,224号;マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透性薬物送達系を開示する米国特許第4,439,196号が挙げられる。他の多くのそのようなインプラント、送達系、及びモジュールは、当業者によく知られている。

【0109】

あるいは、1つまたは複数のポリペプチドは、全身的ではなく局所的に投与されてもよく、例えば、免疫病理学によって特徴付けられる関節炎の関節または病原体誘発病変に、多くの場合、デポーまたは持続放出性製剤で、抗体を直接注射することによりなされてもよい。更に、1つまたは複数のポリペプチドは、標的化された薬物送達系で投与されてもよく、例えば、免疫病理学によって特徴付けられる関節炎の関節または病原体誘発病変を標的とする、例えば、組織特異的抗体でコーティングされたリポソームで投与されてもよい。リポソームは、患部組織に対して標的化され、患部組織によって選択的に取り込まれる。

10

【0110】

投与レジメンは、限定するものではないが、治療されるネコの年齢、体重、及び体調、治療用抗体の血清または組織回転率、症状のレベル、1つまたは複数の治療用ポリペプチドの免疫原性、ならびに生物学的マトリックスにおける標的細胞のアクセス容易性を含む、いくつかの因子に依存する。いくつかの実施において投与レジメンは、標的とする疾患状態の改善をもたらすのに十分な1つまたは複数の治療用ポリペプチドを送達し、同時に望ましくない副作用を最小化するものである。したがって、送達される生物学的製剤の量は、1つまたは複数の特定の治療用ポリペプチド及び治療される状態の重症度に部分的に依存する。治療用抗体の適切な用量を選択する際のガイダンスは、入手可能である（例えば、Wawrzynczak Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK (1996); Milgrom et al. New Engl. J. Med. 341:1966-1973 (1999); Slamon et al. New Engl. J. Med. 344:783-792 (2001); Beniaminovitz et al. New Engl. J. Med. 342:613-619 (2000); Ghosh et al. New Engl. J. Med. 348:24-32 (2003); Lipsky et al. New Engl. J. Med. 343:1594-1602 (2000) 参照）。

20

【0111】

1つまたは複数のポリペプチドの適切な用量の決定は、例えば、当該技術分野において治療に影響することが知られているまたは推定されているパラメーターまたは因子を使用して、当業者によってなされる。一般に、投与は、至適用量よりもいくらか少ない量から開始され、その後、あらゆる負の副作用に対して望ましいまたは最適な効果が達成されるまで、少量ずつ増量される。重要な診断指標には、例えば、炎症の症状または産生される炎症性サイトカインのレベルが含まれる。

30

【0112】

核酸、ベクター、宿主細胞、及び作製方法

本開示はまた、本明細書に記載される1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、1つまたは複数の核酸を含む1つまたは複数のベクター、及び1つもしくは複数の核酸または1つもしくは複数のベクターを含む宿主細胞を包含する。

40

【0113】

本明細書に記載される1つまたは複数のポリペプチドは、細菌細胞または真核細胞で産生され得る。いくつかのポリペプチド、例えば、Fab'は、細菌細胞、例えば、E. coli細胞で産生することができる。ポリペプチドはまた、形質転換細胞株（例えば、CHO、293E、COS、293T、Hela）などの真核細胞で産生することもできる。加えて、ポリペプチド（例えば、scFv）は、Pichia（例えば、Powers et al., J Immunol Methods, 251:123-35 (2001) 参照）、Hanseula、またはSaccharomycesなどの酵母菌細胞で発現させることができる。目的の抗体を産生させるために、1つまたは複数のポリペプチド

50

をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを構築し、1つまたは複数の発現ベクターに導入し、次いで、好適な宿主細胞で発現させる。発現を改善するために、遺伝子のヌクレオチド配列は、アミノ酸配列を変えず（または最小限の変更、例えば、重鎖または軽鎖のC末端残基の除去）、再コード化することができる。再コード化の対象となり得る領域には、翻訳開始、コドン使用頻度、及び意図されないmRNAスプライシング候補に関連するものが含まれる。本明細書に記載されるFc領域バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、当業者には容易に想定されるであろう。

【0114】

標準的な分子生物学技術を使用して、組み換え発現ベクター（複数可）を調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、ポリペプチド（例えば、抗体）を回収することができる。

10

【0115】

1つまたは複数のポリペプチドが細菌細胞（例えば、*E. coli*）で発現される場合、発現ベクターは、細菌細胞におけるベクターの増幅を可能にする特徴を有していなければならない。更に、JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1-Blueなどの*E. coli*が宿主として使用される場合、ベクターは、*E. coli*での十分な発現を可能にし得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Ward et al., 341:544-546 (1989)、araBプロモーター（Better et al., Science, 240:1041-1043 (1988)）、またはT7プロモーターを有している必要がある。そのようなベクターの例としては、例えば、M13ベクター、pUCシリーズベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script、pGEX-5X-1（Pharmacia）、「QIAexpress system」（QIAGEN）、pEGFP、及びpET（この発現ベクターが使用される場合は、宿主は、好ましくは、T7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である）が挙げられる。発現ベクターは、抗体分泌のためのシグナル配列を含有し得る。*E. coli*のペリプラズムへの産生の場合、pelBシグナル配列（Lei et al., J. Bacteriol., 169:4379 (1987)）が抗体分泌のためのシグナル配列として使用され得る。細菌発現の場合、塩化カルシウム法またはエレクトロポレーション法を使用して、細菌細胞に発現ベクターを導入することができる。

20

【0116】

1つまたは複数のポリペプチドがCHO、COS、及びNIH3T3細胞などの動物細胞で発現される場合、発現ベクターは、これらの細胞での発現に必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター（Mulligan et al., Nature, 277:108 (1979)）（例えば、初期シミアンウイルス40プロモーター）、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター（Mizushima et al., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)）、またはCMVプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーター）を含む。Fc領域バリエーションをコードする核酸配列に加えて、組み換え発現ベクターは、宿主細胞でベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）及び選択マーカー遺伝子などの追加の配列を保有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号及び同第5,179,017号）。例えば、典型的に、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。選択マーカーを含むベクターの例としては、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、及びpOP13が挙げられる。

30

40

【0117】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のポリペプチドは、哺乳動物細胞で産生される。1つまたは複数のポリペプチドを発現させるための例示的な哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4

50

220に記載されているdhfr-CHO細胞を含み、例えば、Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601621に記載されているようにDHFR選択マーカーとともに使用される)、ヒト胎児腎臓293細胞(例えば、293、293E、293T)、COS細胞、NIH3T3細胞、リンパ球細胞株、例えば、NS0骨髓腫細胞及びSP2細胞、及びトランスジェニック動物、例えば、トランスジェニック哺乳動物に由来する細胞が挙げられる。例えば、細胞は、乳腺上皮細胞である。

【0118】

抗体発現のための例示的な系において、抗体の抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組み換え発現ベクターがリン酸カルシウムを介したトランスフェクションによってdhfr-CHO細胞に導入される。組み換え発現ベクター内において、抗体の重鎖及び軽鎖遺伝子は、高い遺伝子転写レベルを駆動するために、エンハンサー／プロモーター調節エレメント(例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来するもの、例えば、CMVエンハンサー／AdMLPプロモーター調節エレメントまたはSV40エンハンサー／AdMLPプロモーター調節エレメント)に作動可能にそれぞれ連結される。また、組み換え発現ベクターは、DHFR遺伝子を保有しており、これにより、ベクターをトランスフェクトしたCHO細胞を、メトトレキサート選択／増幅を使用して選択することが可能となる。選択された形質転換宿主細胞は、抗体の重鎖及び軽鎖が発現するように培養され、培養培地から抗体が回収される。

10

【0119】

治療方法

20

本明細書で開示される1つまたは複数のポリペプチドは、任意の疾患または障害の治療または予防を、それを必要とするネコにおいて行うために使用することができる。本発明は、繰り返し投与が必要な慢性状態の治療に特に有用である。タンパク質治療薬の半減期が増加するため、投与頻度の減少及び／または用量レベルの減少が可能となり得る。

【0120】

いくつかの実施形態において、治療または予防される疾患、障害、状態または症状は、アレルギー性疾患、慢性疼痛、急性疼痛、炎症性疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患、胃腸疾患、骨格／筋骨格疾患、心血管疾患、神経系疾患、腎臓疾患、代謝疾患、免疫疾患、遺伝／遺伝性疾患、生殖機能関連障害、感染症またはがんである。ある特定の実施形態において、治療または予防される疾患または障害は、アトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、食物アレルギー、骨関節炎痛、周術期の疼痛、歯痛、がん疼痛、関節炎、貧血、肥満、または糖尿病である。

30

【0121】

抗体は、疾患の治療または予防だけでなく、正常な生物学的機能を調節するため、例えば、生殖能力または行動を管理するためにも使用され得る。

【0122】

診断

本明細書で開示される1つまたは複数のポリペプチドはまた、様々な診断用途、例えば、ネコが任意の特定の疾患または障害を有するかどうかを決定するために使用することができる。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のポリペプチドは、結合ドメインを含み得る。結合ドメインは、本明細書に記載されるタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフ、及び／またはエピトープ(例えば、がん細胞のマーカー)に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のポリペプチドは、標識基を更に含む。一般に、標識基は、それらが検出されるアッセイに応じて、様々な種類に分けられる：a)放射性同位体または重元素同位体であり得る同位体標識；b)磁気標識(例えば、磁気粒子)；c)酸素還元活性部分；d)光学色素；酵素基(例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)；e)ビオチン化基；及びf)二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体用の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグなど)。いくつかの実施形態において、標識基は、潜在的

40

50

な立体障害を減少させるために、様々な長さのスペーサーアームを介して抗体に結合される。タンパク質を標識するための様々な方法が当該技術分野において知られており、本発明を実施する際に使用され得る。

【0123】

いくつかの実施形態において、標識基は、プローブ、色素（例えば、蛍光色素）、または放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{36}Cl 、 ^{35}S 、 ^{33}P 、または ^{125}I ）である。

【0124】

特定の標識にはまた、光学色素も含まれ、限定するものではないが、発色団、蛍光体及びフルオロフォアが含まれ、後者は、多くの場合、特異的である。フルオロフォアは、「小分子」の蛍光体、またはタンパク質性の蛍光体のいずれかであり得る。

【0125】

蛍光標識は、その固有の蛍光特性を介して検出され得る任意の分子であり得る。好適な蛍光標識には、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルークマリン、ピレン、Malacite green、スチルベン、Lucifer Yellow、Cascade Blue J、Texas Red、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、Oregon green、Alexa-Fluor 色素 (Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade Blue、Cascade Yellow 及び R-フィコエリトリン (PE) (Molecular Probes, Eugene, Oreg.)、FITC、ローダミン、及び Texas Red (Pierce, Rockford, Ill.)、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, Pa.) が含まれるが、これらに限定されない。好適な光学色素は、フルオロフォアを含め、Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0126】

好適なタンパク質性蛍光標識にはまた、緑色蛍光タンパク質 (Renilla、Ptilosarcus、または Aequorea 種の GFP を含む) (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805)、EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank アクセッション番号 U55762)、青色蛍光タンパク質 (BFP、Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24: 462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6: 178-182)、改良型黄色蛍光タンパク質 (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.)、ルシフェラーゼ (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150: 5408-5417)、 β ガラクトシダーゼ (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 2603-2607) 及び Renilla (WO92/15673、WO95/07463、WO98/14605、WO98/26277、WO99/49019、米国特許第 5,292,658 号、同第 5,418,155 号、同第 5,683,888 号、同第 5,741,668 号、同第 5,777,079 号、同第 5,804,387 号、同第 5,874,304 号、同第 5,876,995 号、同第 5,925,558 号) が含まれるが、これらに限定されない。本段落中において上で引用される参考文献は全て、その全体が参照により本明細書に明示的に援用される。

10

20

30

40

50

【0127】

アッセイ

Fc γ R I 及び Fc γ R I I I 結合：

Fc γ R I 及び Fc γ R I I I への結合は、ADCC を媒介する抗体の能力の指標である。抗体のこの特性を評価するために、Fc γ R I 及び Fc γ R I I I に対する抗体の結合を測定するアッセイが当該技術分野において知られている方法を使用して実施され得る。

【0128】

C1q 結合：

補体の第1成分であるC1qへの結合は、補体依存性細胞傷害(CDC)を媒介する抗体の能力の指標である。抗体のこの特性を評価するために、C1qに対する抗体の結合を測定するアッセイが当該技術分野において知られている方法を使用して実施され得る。

【0129】

半減期：

抗体の半減期を測定する方法は、当該技術分野においてよく知られている。例えば、Booth et al., MAb s, 10 (7) : 1098-1110 (2018) を参照されたい。一例として、抗体(例えば、ネコ抗体)の半減期は、動物モデル(例えば、ネコモデル)に抗体を注射し、ある一定期間にわたって血清中の抗体レベルを測定することによって測定することができる。例示的な動物モデルとしては、非ヒト霊長類モデル及びトランスジェニックマウスモデルが挙げられる。トランスジェニックマウスモデル(例えば、Tg32またはTg276トランスジェニックマウス)は、マウスFcRnアルファ鎖が欠損しており、ヒトFcRnアルファ導入遺伝子を発現することができる(例えば、構成性プロモーターの制御下で)。ヒトFcRnアルファ鎖は、マウス β 2-ミクログロブリンタンパク質とin vivoで対合し、機能的なキメラFcRnヘテロ二量体を形成することができる。

【実施例】

【0130】

実施例1：選択された位置でのNNK飽和変異導入ライブラリーの生成及び個々のバリエーションの解析

ネコIgG1a(配列番号1)のCH2及びCH3ドメインの野生型(wt)配列を合成し、NNK変異導入の鋳型として使用した。NNK飽和変異導入法は、所望の位置に20個の可能な全てのアミノ酸を生成するのに効果的な戦略である(Hogrefe et al., Biotechniques, 33:1158-1165 [2002])。位置252、428及び434(EUナンバリング)の個々のNNKライブラリーを生成した。特定位置のNNK(N=A/C/G/T、K=G/T)プライマーをQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent)で使用した。PCR産物をGenScript FASEBAプラスミドにサブクローニングし、E.coliに形質転換し、バリエーションの存在について配列を確認した。CH3ドメインの下流は、アルブミンに対してpMの親和性を有するSASA(血清アルブミンに対する単ドメイン抗体)タグである(Zhang, J.; Wu, S.; Liu, J. Methods and systems for increasing protein stability. 特許出願番号US2013/0129727A1)。SASA抗体は、以下に記載されるセンサーチップ表面へのFcの捕捉を可能にするものである。PelB(ペクチン酸リアーゼB)シグナルペプチドは、N末端にあり、Fcの培地への分泌を促進する。CH2-CH3タンパク質の発現は、Lacプロモーターによって制御した。馴化培地からの上清を、pH6.0におけるネコFcRn(GenBank KF773786 [IgG受容体FcRn大型サブユニットp51]及びEuropean Nucleotide Archive AY829266.1 [ネコベーター2-ミクログロブリン])へのバリエーションの結合について、表面プラズモン共鳴(SPR)を使用して解析した。

10

20

30

40

50

【0131】

各ライブラリーから得た90個の個々の形質転換体の上清を、以下に記載されるようにBiacore法を使用して、pH6.0でネコFcRnへの結合についてアッセイした。

【0132】

Biacore 8Kを使用したSPR解析では、ウシ血清アルブミン(BSA)をCM5センサーチップに固定した。フローセル1及び2のセンサーチップ表面を、新たに混合した50mmol/LのN-ヒドロキシスクシンイミド及び200mmol/Lの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩によって、420秒(10μL/分)かけて活性化させた。その後、10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)で希釈したBSAをフローセル2に注入してコンジュゲーションを達成し、フローセル1をブランクとした。アミンカップリング反応後、チップ表面上に残存する活性カップリング部位を、1mM エタノールアミン塩酸塩を420秒注入してブロックした。結合実験のためのランニング緩衝液は、HBS-EP(10mM HEPES、500mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Tween 20、pH5.5)であり、25℃で実施した。バリエーションの上清をチップ表面に注入し、固定したBSAにSASAタグを介して60秒かけて捕捉させた。200nMのネコFcRnを120秒間注入し、解離をランニング緩衝液で120秒間行った。BSAの固定化フェーズの流量は、10μL/分であり、会合及び解離フェーズの流量は、30μL/分であった。データは全て、Biacore 8K評価ソフトウェアバージョン1.1を使用して処理した。Biacoreセンサーグラムについては、図1及び図2を参照されたい。

【0133】

試験したバリエーションは、野生型ネコIgG1aのFc(配列番号1)と比較した場合、pH6.0において、ネコFcRnに対して増加した結合親和性を示した。

【0134】

アミノ酸位置252、428及び434におけるNNK変異導入は、pH6.0でFcRnへの結合が増加する変異体をもたらすことがわかった。この3つの位置で生成された全90個のクローンのシーケンシングを行うと、次の6個のクローン、すなわち、S252H、S428E、S428C、S428F、S428W及びS434Yは生成されていないことが示された。これらの位置における他の全てのアミノ酸置換は、試験上の利益をもたらさなかった。結果を以下の表3にまとめる。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3：I g G バリエント及びF c R n 結合カイネティクス

バリエント	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
S252W	2.28E+05	5.38E-03	2.35E-08
S252W	2.34E+05	5.45E-03	2.33E-08
S252Y	2.58E+05	2.63E-02	1.02E-07
S252Y	2.57E+05	2.65E-02	1.03E-07
S252F	2.03E+05	9.57E-02	4.70E-07
S252F	2.05E+05	1.01E-01	4.92E-07
S428L	1.62E+05	7.88E-02	4.85E-07
S428L	1.05E+05	8.03E-02	7.63E-07
S428M	1.66E+05	1.00E-01	6.03E-07
S428Y	1.95E+05	1.03E-01	5.28E-07
S428Y	1.87E+05	1.05E-01	5.65E-07
S434F	3.78E+05	1.58E-02	4.17E-08
S434F	3.71E+05	1.61E-02	4.33E-08
S434W	3.14E+05	1.75E-02	5.56E-08
S434W	4.02E+05	2.02E-02	5.02E-08
S434H	2.41E+05	7.61E-02	3.16E-07
S434H	2.00E+05	8.88E-02	4.44E-07
野生型	3.14E+05	3.74E-01	1.19E-06
野生型	1.19E+05	1.95E-01	1.64E-06

10

20

30

【0135】

実施例 2：ネコI g G 1 a F c のスキャンニング変異導入

ファージディスプレイライブラリーアプローチを使用して、pH 6.0において、ネコF c R nに対する親和性が増加するネコI g G 1 a F c バリエントを同定した。55個の異なる位置にバリエントを有するように、ネコI g G 1 a F c (Kanaie et al., 2000. Vet. Immunol. Immunopathol. 73:53)をTwist Bioscienceによって合成した(図4)。変異させた位置のそれぞれに、8つの可能なアミノ酸の置換を行った。これらのアミノ酸は、アルギニン及びリシン(正電荷側鎖)、アスパラギン酸及びグルタミン酸(負電荷側鎖)、トレオニン及びグルタミン(極性非電荷側鎖)、ならびにロイシン及びバリン(疎水性側鎖)であった。F c分子ごとに平均2つのバリエントを有するようにF c DNAライブラリーを設計した。このライブラリーの複雑さは、式： $nCr = n! / r! * (n-r)!$ (式中、nは、部位数を表し、rは、分子あたりのバリエント数を表す)を使用すると、95,040とおりの組み合わせであった。所望の部位特異的変異を含むF c バリエントを、変異原性オリゴヌクレオチドとしてTwistのシリコンベースプラットフォームでプリントした。

40

50

【0136】

次いで、アセンブリPCRを使用して、オリゴヌクレオチドを連結し、全長Fc遺伝子断片プールを生成した。次いで、連結したFc遺伝子断片プールを、Antibody Design Labs社のpADL-22cファージミドベクターのSfi切断部位にクローニングした。クローニングしたDNAライブラリーをTG1 E.coliエレクトロコンピテントセルに形質転換し、 8×10^{10} のバリエーションの実験的多様性を創出した。次いで、ファージミドで形質転換したE.coli細胞をM13K07ヘルパーファージとコトランスフェクトして、タンパク質に基づくパニングに使用するファージプールを作製した。ライブラリーを20mM MES緩衝液(pH6.0)、0.05%Tween 20及び3%ミルク中に再懸濁した。

10

【0137】

ライブラリーの品質は、96個のランダムファージクローンを選択することによって決定し、サンガー法によって配列決定を行った。ファージあたりの変異体の数を以下の表4に示す。

【表4】

表4：ファージあたりの変異体の数

変異数	クローン数
0	5
1	19
2	44
3	19
4	5
5	1
6	2

20

30

【0138】

最初のファージ選択では、プロテインA結合を失ったあらゆるFcバリエーションを除去するために、プロテインA捕捉ステップを使用した。この選択のために、ファージライブラリーをプロテインAビーズ上に捕捉し、PBS(pH7.4)で洗浄した。ファージを0.1M グリシン(pH2.7)で溶出し、pHを1M Tris-HCl(pH7.5)で直ちに中和した。中和したファージをポリエチレングリコール／NaClで沈殿させ、遠心分離にかけた。ペレット化したファージを20mM MES(pH6.0)、0.05%Tween 20、3%ミルク中に再懸濁した。

【0139】

次のファージ選択は、Borrok et al., 2015, J Biol. Chem., 290:4282に記載されているプロトコルに基づいた。簡潔に述べると、Nunc 96マルチウェルプレートにニュートロアビジンでコーティングし、次いで、5%ウシ血清アルブミンPBS(pH7.4)でブロッキングした。ビオチン化したネコFcRn(FCN-F82W3、Acrobiosystems)をPBS(pH6.0)中、 $0.31 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でウェルに固定化した。PBS(pH6.0)中のファージライブラリーを、固定化したネコFcRnとインキュベートし、次いで、PBS(pH6.0)、0.05%Tween 20、0.3M NaClで洗浄した。PBS(pH7.4)を用いてファージを37℃で30分間インキュベートすることによって溶出した。溶出したファージを、pH7.4で、 $0.31 \mu\text{g}/\text{ml}$ のネコFcRnで枯渇させた。結

40

50

合していないファージを T G 1 細胞中で増殖させた。各ラウンドの正確な条件及び結果を以下の表 5 に示す。

【表 5】

表 5：ファージ選択のための洗浄条件及び枯渇回数。

ラウンド	1	2	3	4
FcRn(0.3125ug/mL)でコーティングしたウェルの数	8	6	4	4
洗浄回数	10	15	15	10+2×30 分
pH7.4 で FcRn(0.3125ug/mL)を用いた枯渇回数	1	2	3	3
インプット力価(ファージ/mL)	5.0×10^{11}	7.0×10^{12}	1.8×10^{12}	6.4×10^{12}
アウトプット力価(cfu/総量)	8.4×10^6	6.6×10^5	1.87×10^9	1.54×10^9

10

20

【0140】

第3選択ラウンドの結果として合計768個のファージクローンが単離され、第4選択ラウンドでは768個のファージクローンが単離された。Illumina MiSeqを使用する次世代シーケンシングによって、クローンの配列決定を行った。

【0141】

配列決定の結果、位置252に置換チロシン、位置434に置換チロシンまたはフェニルアラニンを含むクローンが多数存在することが明らかになり（以下の表参照）、置換のいくつかは、意図した8個のアミノ酸置換以外の残基を含むことが示された。Gearring et al. (2016, J Vet Intern Med, 30:1129)によって先に記載された可変ドメインを使用して、ユニークなバリエーションをIgGに再フォーマットした。ミニプレッププラスミドDNAを、Expifectamine 293トランスフェクション試薬を用いて、Exp293細胞にトランスフェクトした。馴化培地からIgGバリエーションをプロテインAクロマトグラフィーで精製し、43mM クエン酸ナトリウム、130mM 炭酸水素ナトリウム、pH6.0に調整した。

30

【0142】

IgGバリエーションのネコFcRnに対する親和性を決定するために、Carterra機器を使用して結合カインेटクスを決定した。抗体（約5μg/ml）を、EDC/NHS活性化、続くエタノールアミンHClでのクエンチによって、HC30Mセンサーチップにアミンカップリングさせた。

40

【0143】

ある濃度（333nM、111nM、37nM、12.3nM、4.1nM、1.37nM、0.45nM）のネコFcRn（FCN-F82W3、Acrobiosystems）を、HBSTE（10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Tween-20）、0.5%ウシ血清アルブミン、pH6.0中でセンサーチップ上に流して、pH6.0におけるカインेटクスを決定した。HBSTE緩衝液のpHを7.4に調整した以外はこれと同じ戦略を使用して、pH7.4におけるネコFcRnへの結合カインेटクスを決定した。

【0144】

50

I g G バリアントのネコ F c R n 結合カイネティクスを以下の表 6 に示す。
【表 6】

表 6 : I g G F c バリアント及び F c R n 結合カイネティクス

バリアント	pH 6.0			pH 7.4		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
野生型	4.72E+05	1.10E-01	232.8	結合なし		
S252Y	9.74E+05	9.50E-03	9.8	弱い結合		
S252Y, Q311R	9.26E+05	6.40E-03	6.9	弱い結合		
S252Y, Q311K	1.39E+06	7.79E-03	5.6	2.39E+06	1.12E-01	46.9
S252Y, Q311V	1.06E+06	4.05E-03	3.8	1.73E+05	5.28E-02	306.0
S252Y, Q311L	7.40E+05	5.16E-03	7.0	弱い結合		
S434Y	1.22E+06	6.29E-03	5.2	結合なし		
S434Y, S254R	2.75E+06	5.68E-03	2.1	結合なし		
S434Y, S254K	1.61E+06	5.04E-03	3.1	弱い結合		
S434Y, L262E	1.51E+06	4.98E-03	3.3	弱い結合		
S434Y, T286D	1.28E+06	3.71E-03	2.9	結合なし		
S434Y, T286E	9.65E+05	3.45E-03	3.6	結合なし		
S434Y, T289K	1.53E+06	5.59E-03	3.6	弱い結合		
S434Y, E293D	1.57E+06	5.34E-03	3.4	結合なし		
S434Y, E293K	1.22E+06	5.01E-03	4.1	弱い結合		
S434Y, L309V	2.21E+06	4.00E-03	1.8	弱い結合		
S434Y, L309E	1.13E+06	4.58E-03	4.1	弱い結合		
S434Y, K326D	1.38E+06	5.49E-03	4.0	結合なし		
S434Y, Q347L	1.98E+06	6.67E-03	3.4	結合なし		
S434Y, S426L	1.48E+06	4.40E-03	3.0	6.36E+05	1.18E-01	184.9
S434F	1.73E+06	7.18E-03	4.2	弱い結合		
S434F, E380D	1.77E+06	5.83E-03	3.3	結合なし		
S428L	1.45E+06	2.41E-02	16.7	結合なし		
S428L, S252R	9.74E+05	8.73E-03	9.0	結合なし		
S428L, T286E	1.15E+06	9.87E-03	8.6	結合なし		
S428L, Q311V	9.16E+05	1.07E-02	11.7	結合なし		
S428L, Q311K	9.58E+05	1.01E-02	10.5	結合なし		
S428L, D312T	1.01E+06	1.13E-02	11.2	弱い結合		
S428L, I377V	1.69E+06	1.83E-02	10.8	結合なし		
S428L, I383L	1.63E+06	1.62E-02	9.9	結合なし		
S428L, N389c-R	1.14E+06	1.09E-02	9.6	結合なし		
S428L, E380D, S434R	1.22E+06	9.73E-03	8.0	結合なし		
S428L, E380T, S434R	3.17E+06	1.20E-02	3.8	結合なし		
Q311R	1.96E+05	1.16E-02	59.2	結合なし		
R392E	1.33E+06	3.24E-02	24.5	結合なし		
S252R, L262Q	1.63E+06	7.95E-03	4.9	結合なし		
S252R, A378E	2.62E+05	9.27E-03	35.3	弱い結合		
T260E, L309E, Q355L	9.83E+05	9.77E-03	9.9	結合なし		
T286E, S428R	9.39E+05	6.48E-03	6.9	9.17E+06	1.13E-01	12.3
S290V, R334D	9.31E+05	9.97E-03	10.7	結合なし		
R301L, E380V, T437L	1.15E+06	1.23E-02	10.7	結合なし		

【 0 1 4 5 】

実施例 3 : ネコ I g G 1 a F c のスクランニング変異導入

Gearing et al. (2016, J Vet Intern Med, 30 : 1129) によって先に記載された可変ドメインを使用して、更なる抗神経成長因子 (NGF) ネコ I g G 1 a 抗体バリアントセットを Twist Bioscience によって合成した。これらの抗体の F c 領域に対する修飾は、Kanai et al. (2000, Vet. Immunol. Immunopathol. 73 : 53) によって記載されている野生型ネコ I g G 1 a の F c ドメインのリファレンス配列と比較して、以下

の表 8 及び表 9 に記載される。ネコ IgG1a コンストラクトを哺乳動物発現ベクターにサブクローニングし、Expifectamine 293 トランスフェクション試薬を用いて、Exp i 293 細胞にトランスフェクトした。馴化培地から IgG1a Fc バリエーションをプロテイン A クロマトグラフィーで精製し、43 mM クエン酸ナトリウム、130 mM 炭酸水素ナトリウム、pH 6.0 で調整した。次いで、Carterra 機器を使用して、IgG Fc バリエーションのネコ FcRn に対する結合親和性を決定した。抗体バリエーション (約 5 µg/ml) を、EDC/NHS 活性化、続くエタノールアミン HCl でのクエンチによって、HC30M センサーチップにアミンカップリングさせた。333 nM、111 nM、37 nM、12.3 nM、4.1 nM、1.37 nM または 0.45 nM のネコ FcRn (FCN-F82W3、Acrobiosystems) を、HBSTE (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05 % Tween-20)、0.5 % ウシ血清アルブミン中、pH 6.0 でセンサーチップ上に流して、pH 6.0 におけるカインेटクスを決定した。これと同じ戦略を採用して、pH 7.4 における Fc バリエーションのネコ FcRn に対する結合親和性を決定した。ただし、HBSTE 緩衝液の pH を 7.4 に調整した。

10

【0146】

IgG バリエーションのネコ FcRn 結合カインेटクスを以下の表 7 に示す。

【0147】

20

30

40

50

【表 7】

表 7 : I g G F c バリアント及びF c R n結合カイネティクスー I I

	pH 6.0			pH 7.4		
バリアント	k_a (M-1 s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)	k_a (M-1 s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)
野生型	4.72E+05	1.10E-01	232.8	結合なし		
S254K	5.21E+05	5.57E-02	107.1	結合なし		
T286D	4.00E+05	3.89E-02	97.4	弱い結合		
T286E	4.89E+05	4.57E-02	93.4	結合なし		
S290Y	6.61E+05	8.49E-02	128.4	結合なし		
E293H	4.55E+05	6.65E-02	146.0	結合なし		
R301L	4.57E+05	4.35E-02	95.2	弱い結合		
L309V	3.53E+05	4.50E-02	127.4	結合なし		
L309E	4.06E+05	4.15E-02	102.1	結合なし		
L309Y	6.00E+05	1.18E-01	196.4	結合なし		
Q311V	6.29E+05	5.05E-02	80.4	結合なし		
Q311L	5.65E+05	4.99E-02	88.2	結合なし		
K326D	4.28E+05	5.84E-02	136.4	弱い結合		
R334D	4.23E+05	5.61E-02	132.7	弱い結合		
Q347L	5.44E+05	8.53E-02	156.8	結合なし		
I377Y	8.37E+05	5.14E-02	61.4	結合なし		
E380T	5.33E+05	6.20E-02	116.2	弱い結合		
N389c-R	5.02E+05	9.44E-02	188.1	結合なし		
S426H	3.52E+05	6.02E-02	171.2	結合なし		
S428H	3.89E+05	6.18E-02	159.0	弱い結合		
S428Y	7.18E+05	1.84E-02	25.6	弱い結合		
T286E, S428H	5.98E+05	2.83E-02	47.3	結合なし		
R334D, S428R	6.03E+05	4.93E-02	81.7	結合なし		
R334D, T437L	4.57E+05	4.37E-02	95.7	弱い結合		
R334D, R301L	4.60E+05	4.17E-02	90.7	結合なし		
S426L, T289H	5.42E+05	6.22E-02	114.8	結合なし		
S426L, S428H	4.45E+05	4.45E-02	100.0	結合なし		
S428Y, Q311V	8.93E+05	9.77E-03	10.9	弱い結合		
S428Y, S254R	5.52E+05	2.65E-02	48.1	結合なし		
S428Y, L309V	8.47E+05	1.12E-02	13.2	弱い結合		
S428H, T289H	3.52E+05	5.26E-02	149.3	結合なし		

【 0 1 4 8 】

ネコF c R Nに対するネコI g G 1 a F c バリアントの結合を増加させることが特定されたアミノ酸置換の一覧を以下の表 8 に提供する：

【表 8】

表 8：ネコ FcRn への結合親和性の増加を示したネコ IgG1a Fc バリエントのアミノ酸置換のまとめ

EU ナンバリングによる位置	野生型ネコ IgG1a Fc	ネコ IgG1a Fc バリエントのネコ FcRn に対する結合を高めるバリエントのアミノ酸置換（野生型との比較）
252	S	FYWR
254	S	RK
262	L	QE
286	T	ED
289	T	KH
290	S	VY
293	E	DKH
301	R	L
309	L	VEY
311	Q	RVKL
312	D	T
326	K	D
334	R	D
347	Q	L
355	Q	L
377	I	VY
380	E	DVT
383	I	L
389c	N	R
392	R	E
426	S	LH
428	S	RLMYH
434	S	RYFWH
437	T	L

【0149】

実施例 4：FcRn 結合が増加したネコ IgG1a Fc バリエント及び野生型ネコ IgG1a の薬物動態試験。

12 匹のオス及びメスのネコを用いて、薬物動態（PK）試験を行った。Gearinget al.（2016, J Vet Intern Med, 30:1129）によって先に記載された抗 NGF 可変ドメインを使用して、野生型ネコ IgG1a の Fc ドメインを保持する抗体を含め、ネコ IgG1a Fc バリエントを調製した。

【0150】

動物を 6 つの群に無作為に分け、各群にオスとメスを配置した。各動物に 2 mg / kg の抗体を単回静脈投与で投与した。およそ 0.5 ml の全血を次の時点：0（投与前）、注射後 4 時間、及び 1、2、4、6、10、14、18、22、30、34、38、42 日に採取した。全血から血清を分離し、抗 NGF 抗体に特異的な ELISA によって抗体の存在をアッセイした。非線形混合効果（NLME）モデルを使用して、線形クリアラン

スを有する2コンパートメント薬物動態(PK)モデルで6つの抗NGFモノクローナル抗体(mAb)バリエーションの血清中濃度を記述した(図46)。母集団パラメーターを、Monolix Suite 2019R1 (Monolix version 2019R1, Antony, France: Lixoft SAS, 2019) に実装されている確率的期待値最大化法(SAEM)アルゴリズムを使用して、推定した。個々のパラメーターを対数正規分布の確率変数としてモデル化した。PKパラメーターは体重(BW)に依存し、mAb特有の係数(β_{BW} , $cl = 0.75$ 、 β_{BW} , $v1 = \beta_{BW}$, $v2 = 1$ 、 β_{BW} , $Q = 2/3$)を使用した。個々のパラメーター ϕ_i についての式は、以下のとおりである(Dong et al., 2011, Clin Pharmacokinet, 50:131)。

10

【数1】

$$\phi_i = \phi_{pop} \left(\frac{BW_i}{BW_{ref}} \right)^{\beta} e^{\eta}$$

ϕ_{pop} は母集団の典型的なパラメーターであり、 η は平均0及び標準偏差 ω を含む確率変数、 BW_i は動物*i*の体重であり、 BW_{ref} はリファレンス体重2kgであった。

【0151】

抗体バリエーションは、次式に従って、クリアランス、コンパートメント間移動係数、及び末梢容積に関するカテゴリ型共変量を使用して識別した。

20

【数2】

$$\phi_i = \phi_{pop} e^{(\beta\Omega_i)} e^{\eta}$$

式中、個々のバリエーションの共変量がそのカテゴリに該当する場合は $\Omega_i = 1$ であり、そうでない場合は $\Omega_i = 0$ である。野生型(WT) mAbバリエーションをリファレンスとして使用した。

【0152】

バリエーションにつき2匹の動物を用いて個々に観察されたバリエーションWT、S252W、S428Y、S428Y+L309V、S428Y+Q311V、及びS428Y+S254Rの血清中濃度を図47に示す。

30

【0153】

推定PKパラメーターを以下の表9に示す。2mg/kgの単回IV投与を受ける典型的な2kgのネコにおける、野生型(WT) IgG1a FcまたはIgG1a FcバリエーションS252W、S428Y、S428Y+L309V、S428Y+Q311V、及びS428Y+S254Rを保持するモノクローナル抗体の予測血清中濃度プロファイルを図48に示す。これらの薬物動態学試験は、2つ以上のアミノ酸位置における置換の利点を確認するだけでなく、より重要なのは、*in vitro*でFcRn結合向上を付与するネコIgG Fcドメインへのアミノ酸修飾が、これらのIgG Fcバリエーションの*in vivo*半減期を延長することにも十分であったことを示している。

40

【表 9】

表 9：体重 2 kg のネコの PK パラメーター推定値

バリエーション	Cl (mL/日)	V1 (mL)	Q (mL/日)	V2 (mL)	α -T _{1/2} (時)	β -T _{1/2} (日)
WT	24.61	77.88	35.49	63.79	14.11	4.648
S428Y+L309V	9.423	77.88	23.32	72.65	24.30	12.22
S428Y+Q311V	11.86	77.88	18.16	71.21	29.05	10.22
S428Y+S254R	15.38	77.88	90.85	89.62	7.263	7.929
S252W	13.37	77.88	25.01	52.75	19.04	7.440
S428Y	13.37	77.88	32.44	48.70	14.40	7.002

10

【0154】

実施例 5：C1 バイオセンサーを使用したネコ IgG1a バリエーションのネコ FcRn に対する結合カインेटクス

いくつかのネコ IgG1a バリエーション (S252W、L309V、Q311V、S428Y、S428Y+Q311V、S428Y+254R、S428Y+L309V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V+T286E、及び S428Y+L309V+E380T) について、pH 5.9 におけるネコ FcRn (GenBank KF773786 [ネコ FcRn 大型サブユニット p51] 及び European Nucleotide Archive AY829266.1 [ネコベーター 2-ミクログリン]) に対する結合カインेटクスを評価した。位置の特定には、EU ナンバリングを使用した (図 4)。この試験において、単一のアミノ酸置換またはアミノ酸置換の組み合わせを保有するネコ Fc バリエーションを、Gearing DP et al. (2016, J Vet Intern Med, 30:1129) によって記載される可変ドメインを使用して、ネコ IgG1a (Kanai et al., 2000, Vet. Immunol. Immunopathol. 73:53) に合成した。合成したネコ IgG1a のバリエーション DNA を哺乳動物発現ベクターにサブクローニングし、CHO 細胞に一過性にトランスフェクトした。プロテイン A クロマトグラフィーを使用して馴化培地を精製した。

20

30

【0155】

ネコ FcRn 結合実験について、全てのアッセイを Biacore 8K+ システムで 25℃ で実施した。この実験セットにおいて、抗体を標準的なアミンカップリング試薬を使用して Series S C1 センサーチップに固定した。200 mmol/L の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び 50 mmol/L の N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の混合物を 420 秒間注入して表面を活性化させた。次いで、抗体を、10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) 中 0.5 ~ 2 µg/mL の濃度で、120 秒間注入した。最後に、1 M のエタノールアミンを 420 秒間注入した。ランニング緩衝液は、pH 5.9 に調節した 1X PBS-P+ (Cytiva, Cat # 28995084) であった。

40

【0156】

pH 5.9 におけるネコ IgG1a バリエーションのネコ FcRn に対する結合親和性を評価するために、1.56 ~ 2000 nM の濃度範囲のネコ FcRn を選択し、シングルサイクルモードで注入した。各バリエーションについて試験したネコ FcRn の濃度を以下の表 10 に示す。

50

【表 10】

表 10：各ネコ IgG1a バリエントに使用したネコ FcRn の濃度

バリエント	FcRn の濃度 [nM]
野生型	31.25, 125, 500, 2000
ネコ IgG1a-S252W	1.56, 6.25, 25, 100
ネコ IgG1a-L309V	31.25, 125, 500, 2000
ネコ IgG1a-Q311V	31.25, 125, 500, 2000
ネコ IgG1a-S428Y	7.81, 31.25, 125, 500
ネコ IgG1a-S428Y-Q311V	7.81, 31.25, 125, 500
ネコ IgG1a-S428Y-S254R	7.81, 31.25, 125, 500
ネコ IgG1a-S428Y-L309V	7.81, 31.25, 125, 500
ネコ IgG1a-S428Y-Q311V-T286E	1.56, 6.25, 25, 100
ネコ IgG1a-S428Y-Q311V-E380T	1.56, 6.25, 25, 100
ネコ IgG1a-S428Y-L309V-T286E	1.56, 6.25, 25, 100
ネコ IgG1a-S428Y-L309V-E380T	1.56, 6.25, 25, 100

10

【0157】

抗体につき 4 つの濃度を $5 \mu\text{l}$ / 分で 90 秒間注入し、続いて、180 秒間解離させた。各濃度系列をこのフォーマットで 3 回注入し、適切なリファレンスの差し引きのために少なくとも 3 回の緩衝液のみのサイクルを行った。1X PBS-P+ (pH 7.4) を 30 秒間 2 回注入し、続いて、60 秒間の待機コマンドで、表面を再生した。解析前に表面を安定化させるため、3 回のスタートアップサイクルを含めた。

20

【0158】

Insight Evaluation Software を使用し、1:1 カイネティクス相互作用モデルへのフィッティングまたは定常状態の親和性へのフィッティングによって、データを評価した。U 値及び T 値を含む品質指標を使用して、許容されるパラメーターを選択した。15 未満の U 値を反応速度定数として許容できるものとみなし、100 より大きい T 値を反応速度定数として許容できるものとみなした。これらの値がその範囲外である場合、定常状態の親和性パラメーターを許容できるものとみなした。

30

【0159】

ネコ IgG1a バリエントのカイネティクスデータを以下の表 11 に示し、センサグラムを図 49A ~ 49L に示す。

40

50

【表 1 1】

表 1 1 : ネコ I g G 1 a バリエーション及びネコ F c R n 結合カイネティクス

バリエーション	ka	kd	KD	データのフィッティング方法
野生型			1.06E-06	定常状態の親和性
ネコIgG1a-S252W	1.06E+06	4.24E-03	4.01E-09	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-L309V			4.27E-07	定常状態の親和性
ネコIgG1a-Q311V			3.34E-07	定常状態の親和性
ネコIgG1a-S428Y	9.02E+05	6.42E-02	7.18E-08	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-Q311V	8.27E+05	2.66E-02	3.22E-08	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-S254R	1.15E+06	9.31E-02	8.12E-08	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-L309V	8.80E+05	3.10E-02	3.53E-08	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-Q311V-T286E	1.27E+06	7.78E-03	6.11E-09	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-Q311V-E380T	1.60E+06	3.22E-02	2.01E-08	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-L309V-T286E	1.34E+06	7.02E-03	5.26E-09	1:1カイネティクス相互作用モデル
ネコIgG1a-S428Y-L309V-E380T	1.63E+06	3.34E-02	2.06E-08	1:1カイネティクス相互作用モデル

10

【0 1 6 0】

実施例 6 : 2 つまたは 3 つの F c 置換を含むネコ I g G 1 a F c バリエーション及び野生型ネコ I g G 1 a の薬物動態試験。

20

1 4 匹のオス及びメスのネコを用いて、薬物動態 (PK) 試験を行った。Gearin g e t a l . (2 0 1 6 , J V e t I n t e r n M e d , 3 0 : 1 1 2 9) に よって先に記載された抗 NGF 可変ドメインを使用して、野生型ネコ I g G 1 a の F c ドメインを保持する抗体を含め、ネコ I g G 1 a F c バリエーションを調製した。この試験で試験したネコ I g G 1 a バリエーションには、S 4 2 8 Y + L 3 0 9 V、S 4 2 8 Y + Q 3 1 1 V、S 4 2 8 Y + Q 3 1 1 V + T 2 8 6 E、S 4 2 8 Y + L 3 0 9 V + E 3 8 0 T、S 4 2 8 Y + Q 3 1 1 V + E 3 8 0 T、S 4 2 8 Y + L 3 0 9 V + T 2 8 6 E、野生型が含まれた。

【0 1 6 1】

動物を 7 つの群に無作為に分け、各群にオスとメスを配置した。各動物に 2 m g / k g の抗体を単回静脈投与で投与した。およそ 0 . 5 m l の全血を次の時点 : 0 (投与前)、注射後 4 時間、及び 1、2、4、6、10、14、18、22、30、34、38、42 日に採取した。全血から血清を分離し、ネコ抗 NGF 抗体に特異的な E L I S A によって抗体の存在をアッセイした。非線形混合効果 (NLME) モデルを使用して、線形クリアランスを有する 2 コンパートメント薬物動態 (PK) モデルで 7 つの抗 NGF モノクローナル抗体 (mAb) バリエーションの血清中濃度を記述した (母集団パラメーターを、M o n o l i x S u i t e 2 0 1 9 R 1 (M o n o l i x v e r s i o n 2 0 1 9 R 1 . A n t o n y , F r a n c e : L i x o f t S A S , 2 0 1 9) に実装されている確率的期待値最大化法 (SAEM) アルゴリズムを使用して、推定した)。実施例 4 に記載される PK 試験の S 4 2 8 Y + Q 3 1 1 V、S 4 2 8 Y + L 3 0 9 V 及び野生型の血清中濃度を上記のとおりモデル化し、これらの算出に含めた。個々のパラメーターを対数正規分布の確率変数としてモデル化した。PK パラメーターは体重 (BW) に依存し、mAb 特有の係数 (β_{BW} , $cl = 0.75$ 、 $\beta_{BW, v1} = \beta_{BW}$, $v2 = 1$ 、 $\beta_{BW, Q} = 2 / 3$) を使用した。個々のパラメーター ϕ_i についての式は、以下のとおりである (D o n g e t a l . 2 0 1 1 . C l i n P h a r m a c o k i n e t , 5 0 : 1 3 1) 。

30

40

【数 3】

$$\varphi_i = \varphi_{pop} \left(\frac{BW_i}{BW_{ref}} \right)^\beta e^\eta$$

50

【0162】

ϕ_{pop} は母集団の典型的なパラメーターであり、 η は平均 0 及び標準偏差 ω を含む確率変数、 BW_i は動物 i の体重であり、 BW_{ref} はリファレンス体重 2 kg であった。

【0163】

抗体バリエントは、次式に従って、クリアランス、コンパートメント間移動係数、及び末梢容積に関するカテゴリ型共変量を使用して識別した。

【数4】

$$\varphi_i = \varphi_{pop} e^{(\beta \Omega_i)} e^{\eta}$$

10

【0164】

式中、個々のバリエントの共変量がそのカテゴリに該当する場合は $\Omega_i = 1$ であり、そうでない場合は $\Omega_i = 0$ である。野生型 (WT) mAb をリファレンスとして使用した。

【0165】

推定 PK パラメーターを以下の表 12 に示す。

【表12】

表 12：体重 2 kg のネコの PK パラメーター推定値

バリエント	Cl (mL/日)	V1 (mL)	Q (mL/日)	V2 (mL)	α $T_{1/2}$ (時)	β $T_{1/2}$ (日)
野生型	22.85	76.46	31.85	55.4	14.6	4.597
S428Y+Q311V+T286E	9.383	76.46	31.85	55.4	15.89	10.28
S428Y+L309V+E380T	10.69	76.46	31.85	55.4	15.77	9.102
S428Y+L309V	10.79	76.46	31.85	55.4	15.76	9.017
S428Y+Q311V	11.46	76.46	31.85	55.4	15.69	8.527
S428Y+Q311V+E380T	11.58	76.46	31.85	55.4	15.68	8.448
S428Y+L309V+T286E	13.32	76.46	31.85	55.4	15.51	7.423

20

30

【0166】

バリエントにつき 2 匹の動物を用いて個々に観察された野生型及び Fc バリエント S428Y+Q311V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V、S428Y+L309V+T286E、及び S428Y+L309V+E380T の血清中濃度を図 50 に示す。

【0167】

2 mg / kg の単回 IV 投与を受ける典型的な 2 kg のネコにおける、野生型 (WT) IgG1a Fc または the IgG1a Fc バリエント S428Y+Q311V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V、S428Y+L309V+T286E、及び S428Y+L309V+E380T を保持するモノクローナル抗体の予測血清中濃度プロファイルを図 51 に示す。これらの薬物動態学試験は、2 つ以上のアミノ酸位置における置換の利点を確認するだけでなく、より重要なのは、in vitro で FcRn 結合向上を付与するネコ IgG Fc ドメインへのアミノ酸修飾が、これらの IgG Fc バリエントの in vivo 半減期を延長することにも十分であったことを示している。

40

【0168】

他の実施形態

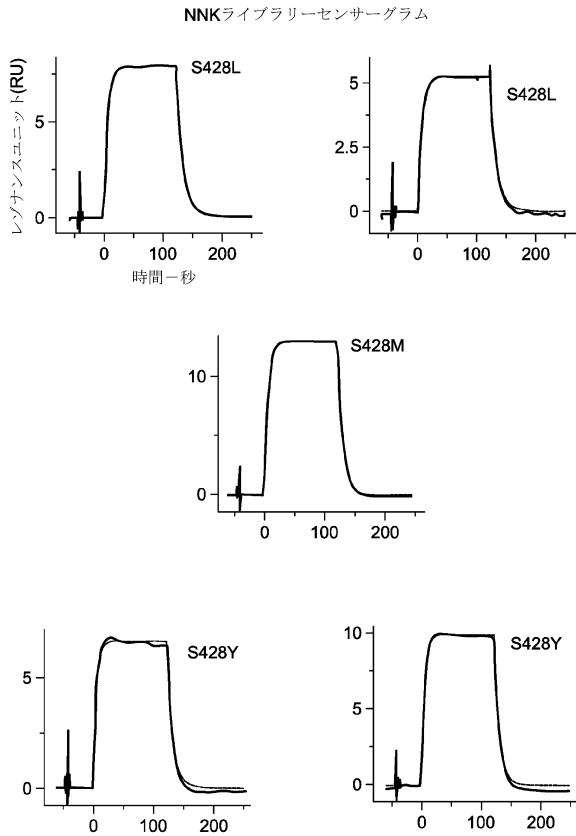
本発明について、その詳細な説明とともに記載してきたが、前述の説明は、本発明の範

50

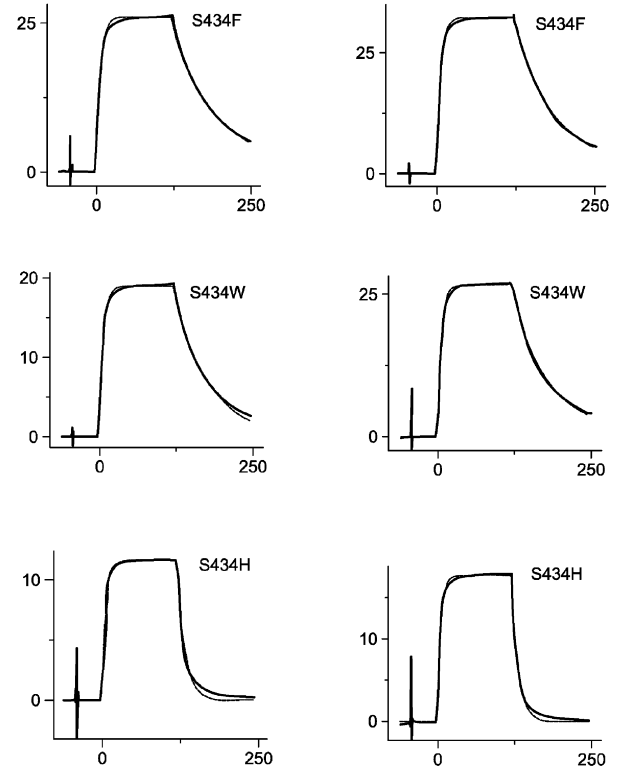
図を例示するものであり、これを限定する意図はなく、本発明は、添付する特許請求の範囲によって定義される。他の態様、利点、及び変更は、以下の特許請求の範囲内である。

【図面】

【図 1 - 1】



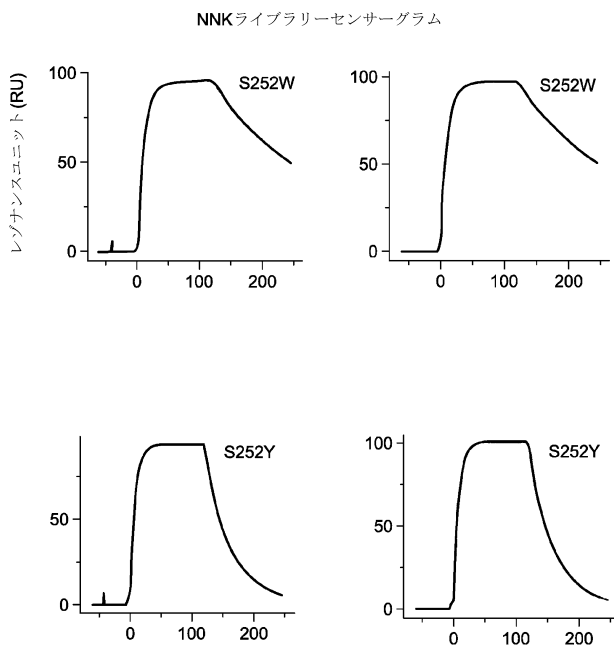
【図 1 - 2】



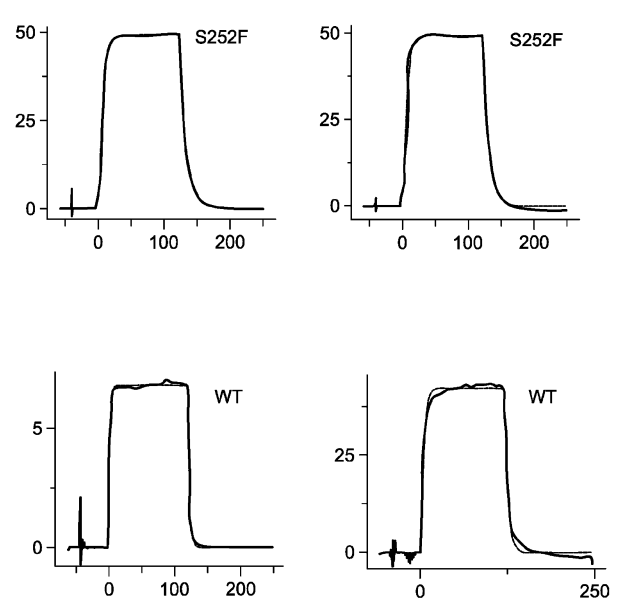
10

20

【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



30

40

50

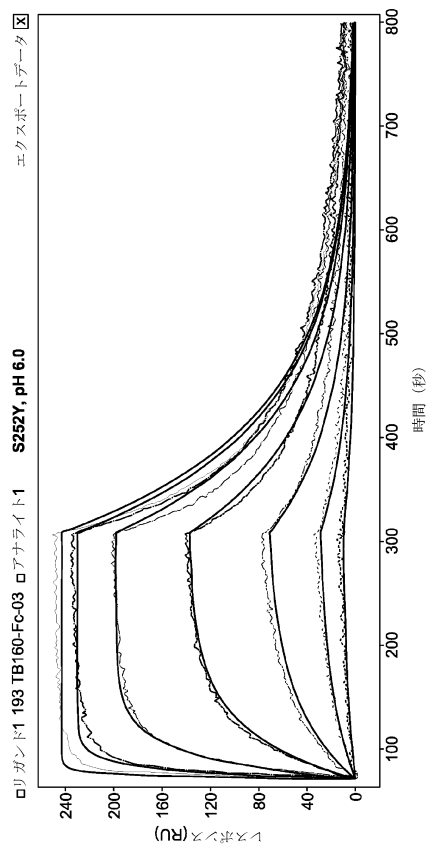
【図 3】

[illegible]

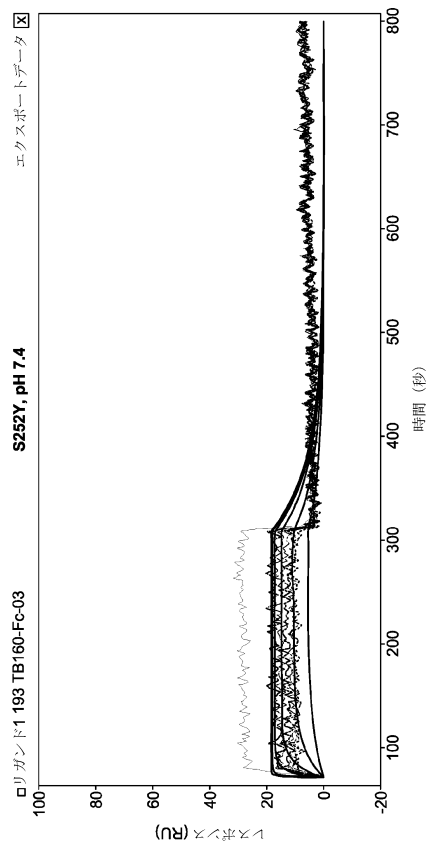
【図 4】

二	240	IFIFPPKPKO	TLISRTPEV	ICLVLDLQPD	DSDDVLTWEV	DNTQVYIAKI	SPREEQFNST	YRVWSVLPIL	300
ヒト	IgdA Fc								
二	310	HQDWLKLGEF	KCKVNSKSLP	SPIEBTISKA	KQGPHEPQVY	VLPPAQEELS	RNKVSVITCI	KSFHPDIAIAY	370
ヒト	IgdA Fc								
二	380	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APTEKTISKA	KQGPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSD	430
ヒト	IgdA Fc								
二	450	EWESITGQPEP	ENYVITTPPQLD	SDGTGVYSYK	LSVDKSHHQK	GNITYCSYSH	EALSHHYT		
ヒト	IgdA Fc								
二	520	EWESNGQPEP	ENYKITPPQLD	SDGSFFELYSK	LTVDKSRWQQ	GNWFSCYVNH	EALHNHYT		
ヒト	IgdI Fc								

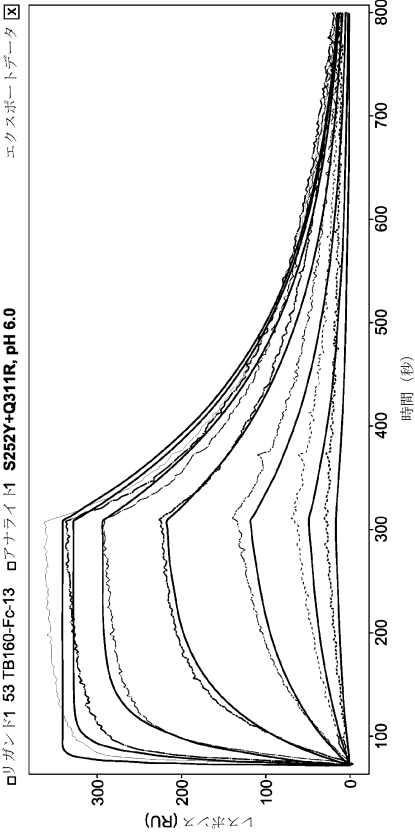
【図 5 A】



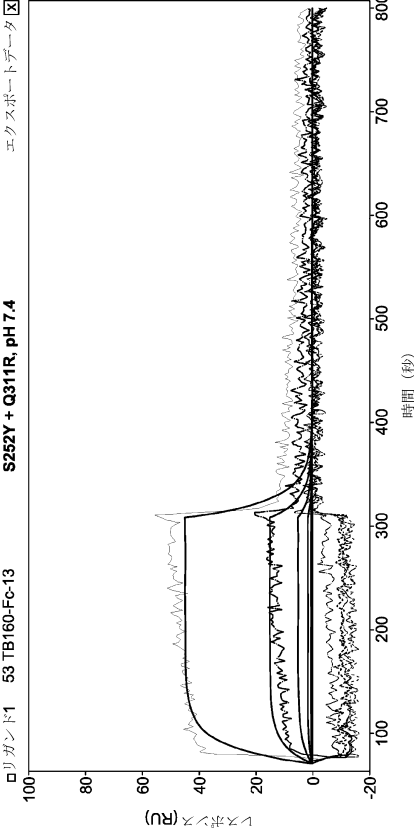
【図 5 B】



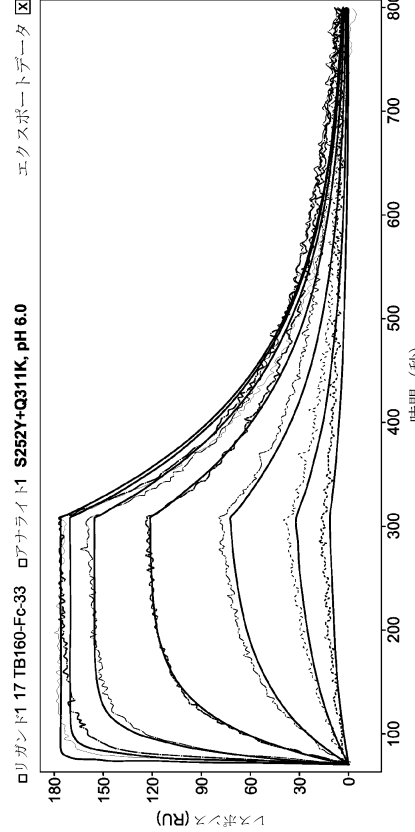
【図 6 A】



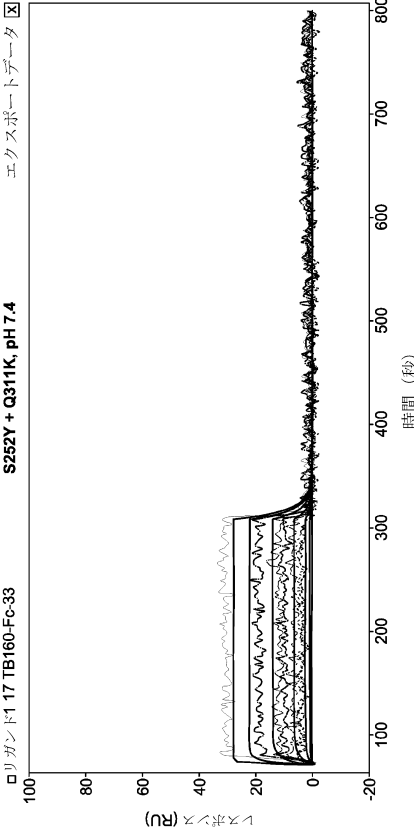
【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

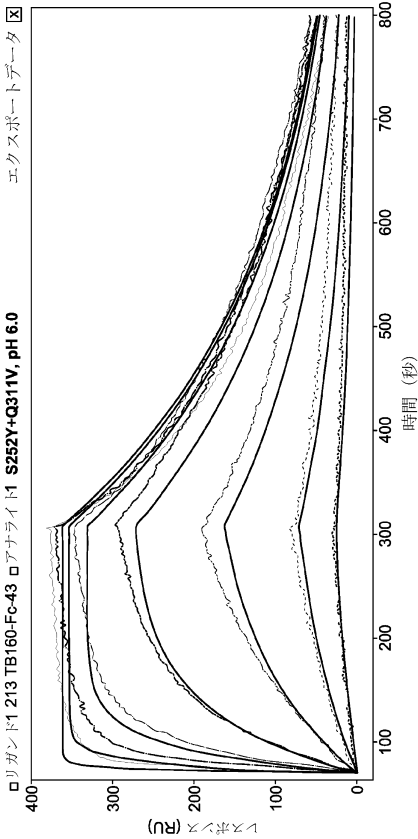
20

30

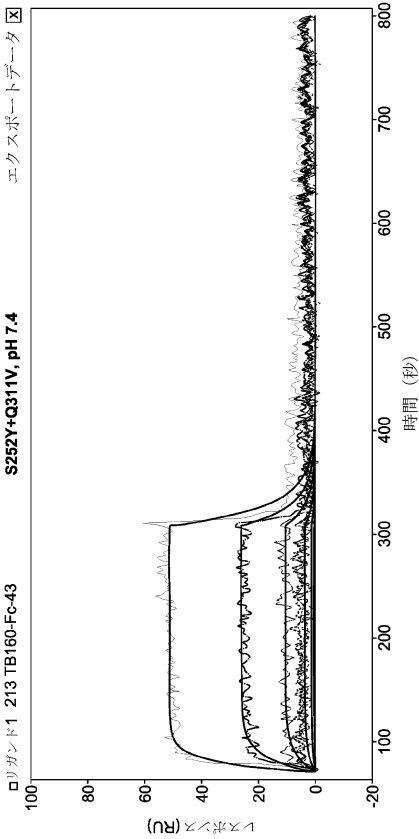
40

50

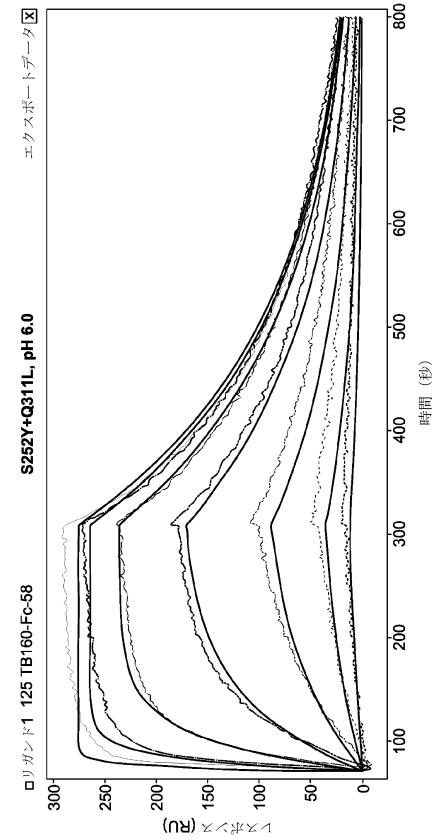
【図 8 A】



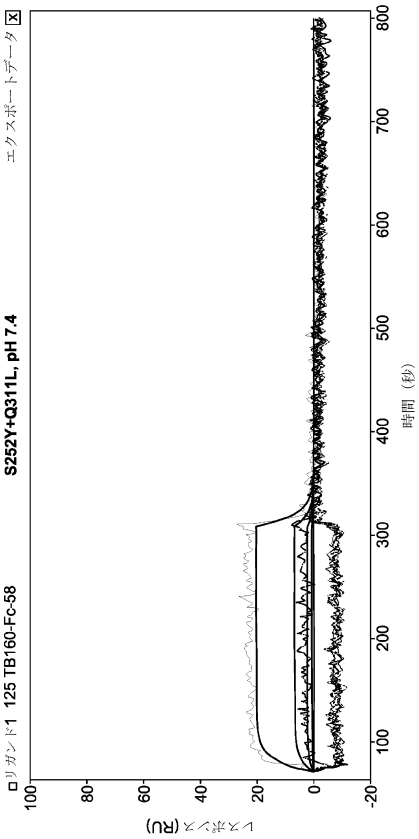
【図 8 B】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

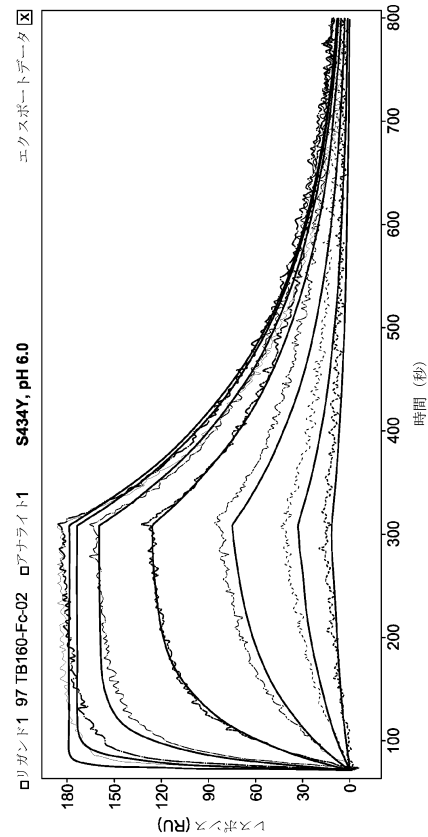
20

30

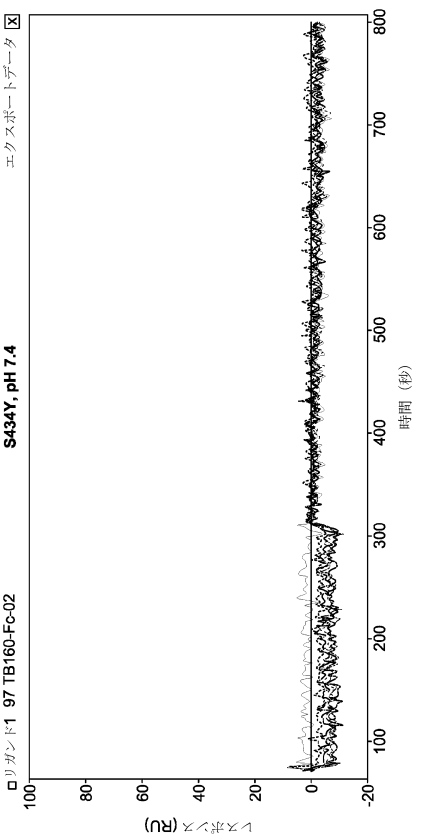
40

50

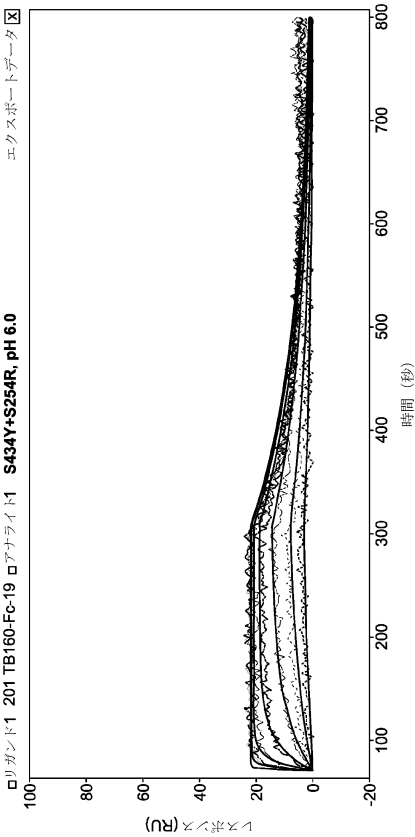
【図 10 A】



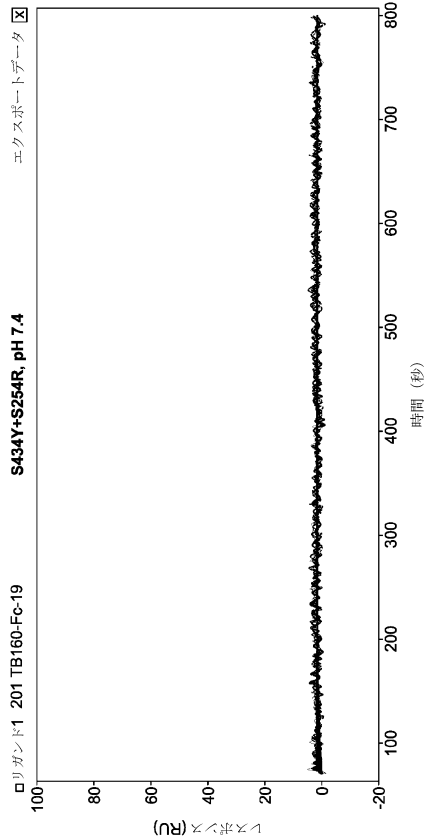
【図 10 B】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

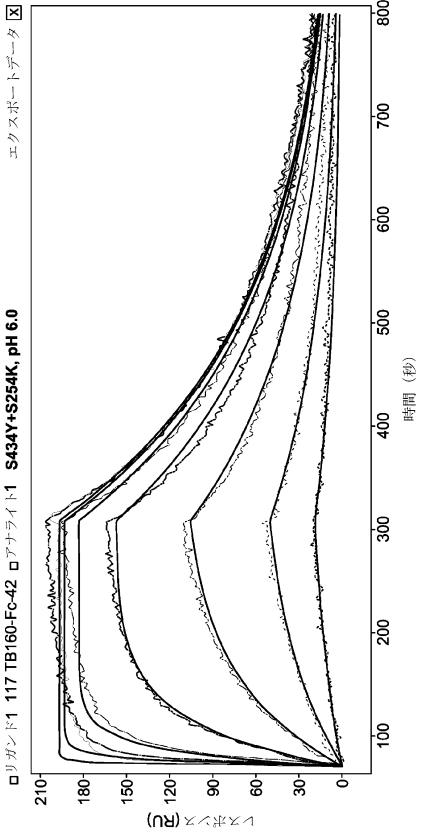
20

30

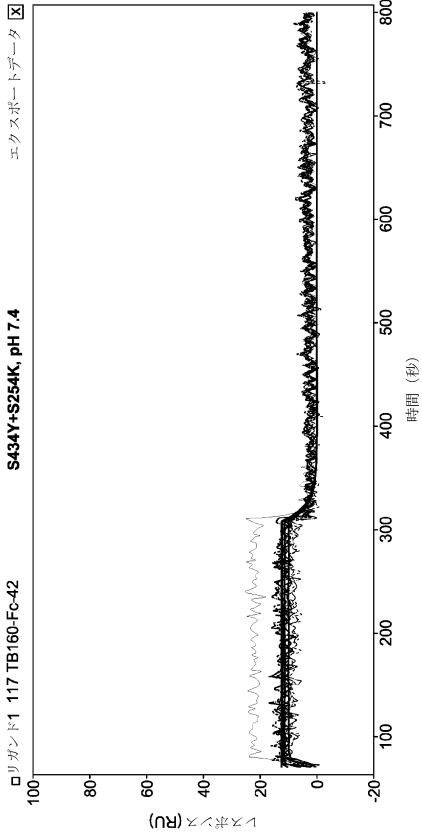
40

50

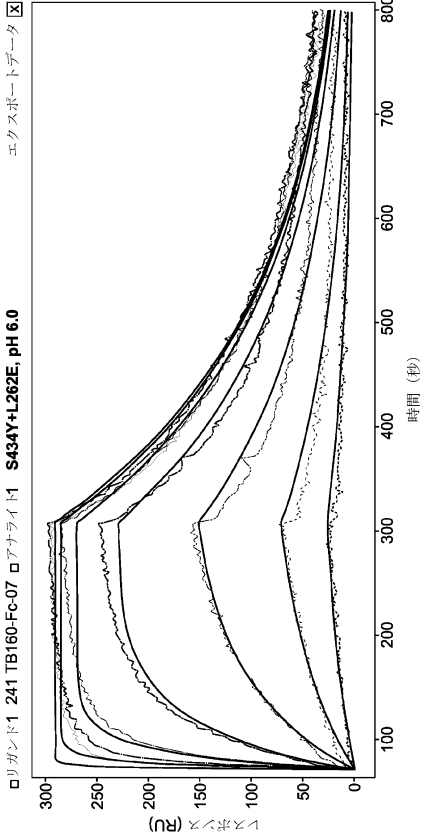
【図 1 2 A】



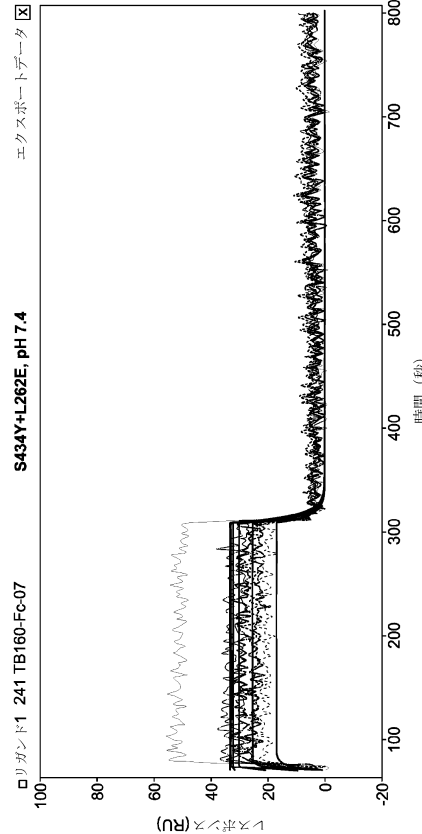
【図 1 2 B】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



10

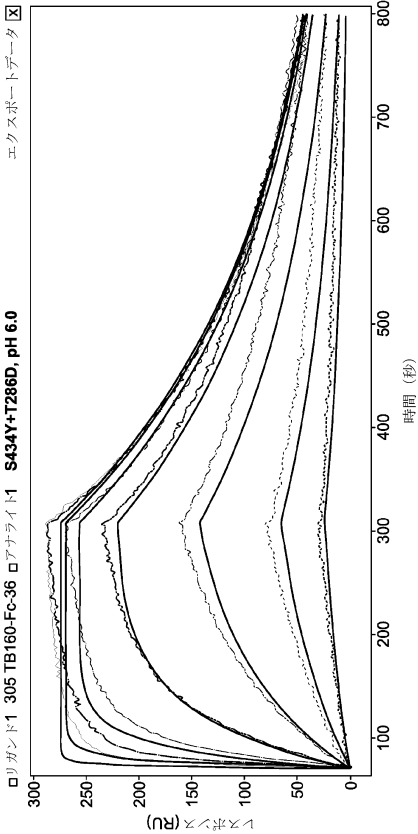
20

30

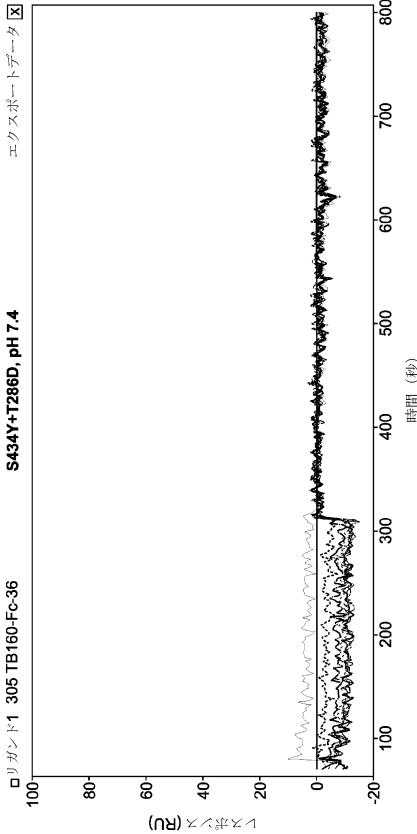
40

50

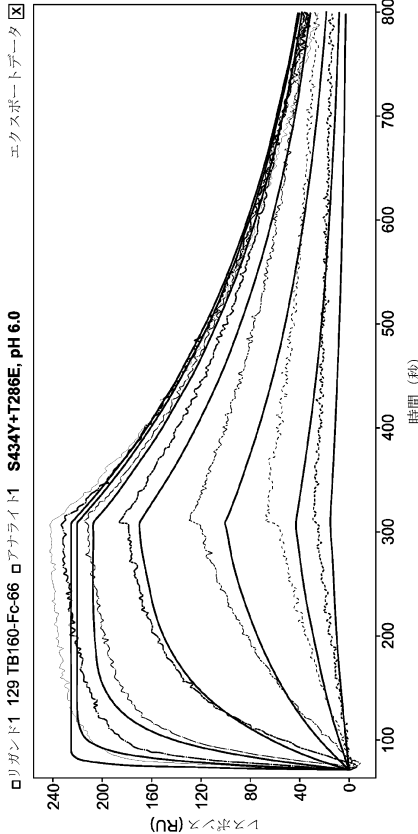
【図 1 4 A】



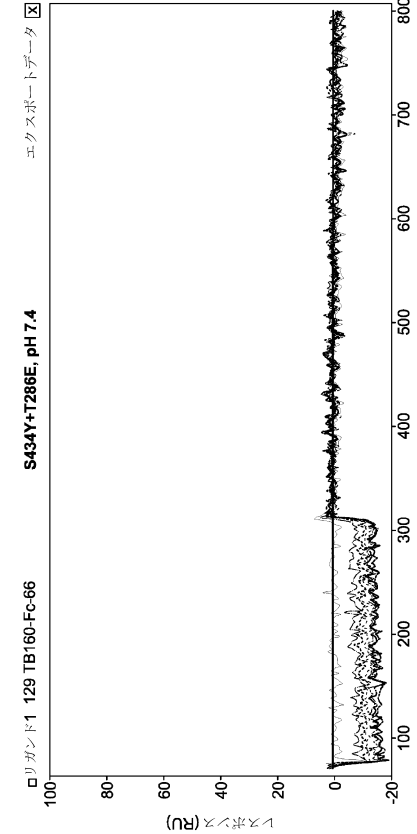
【図 1 4 B】



【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



10

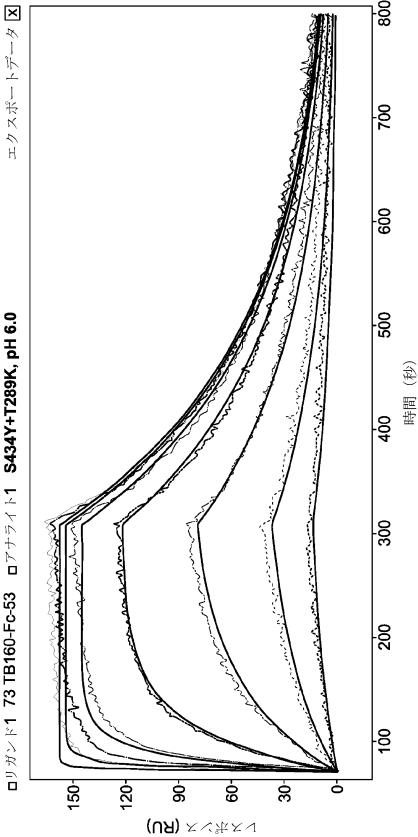
20

30

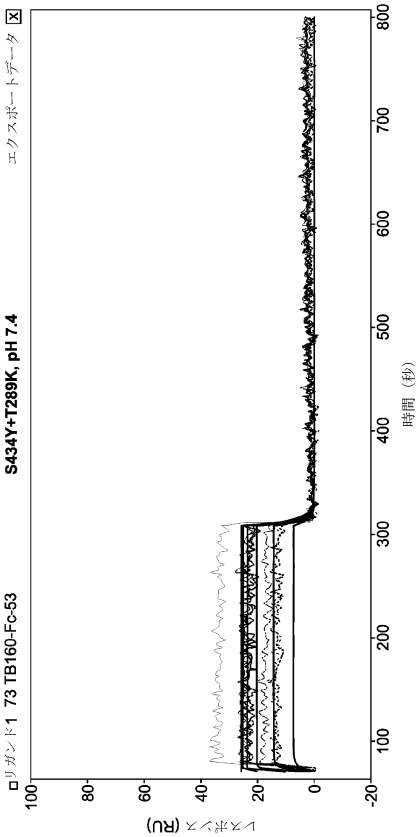
40

50

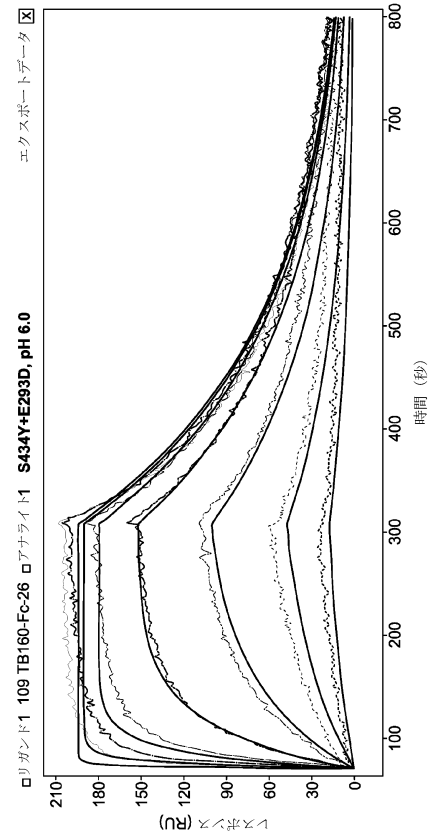
【図 16 A】



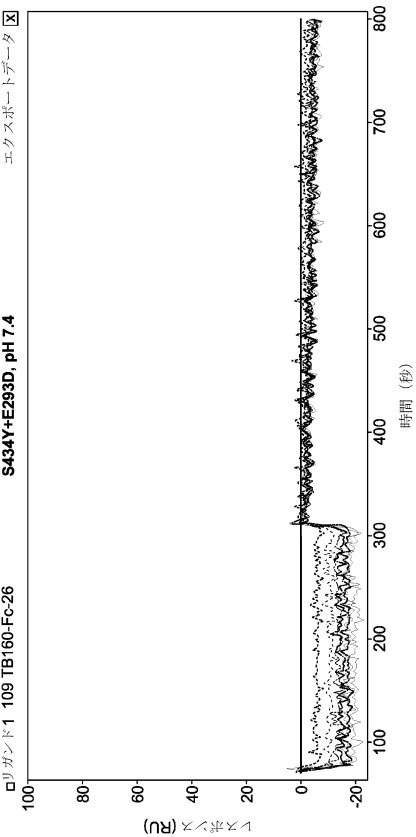
【図 16 B】



【図 17 A】



【図 17 B】



10

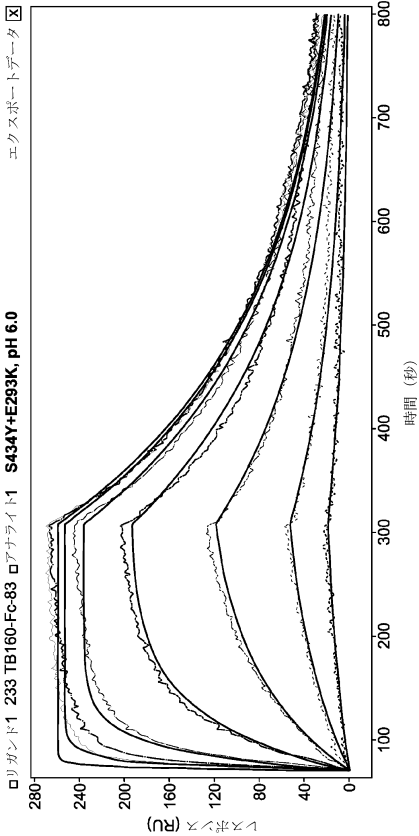
20

30

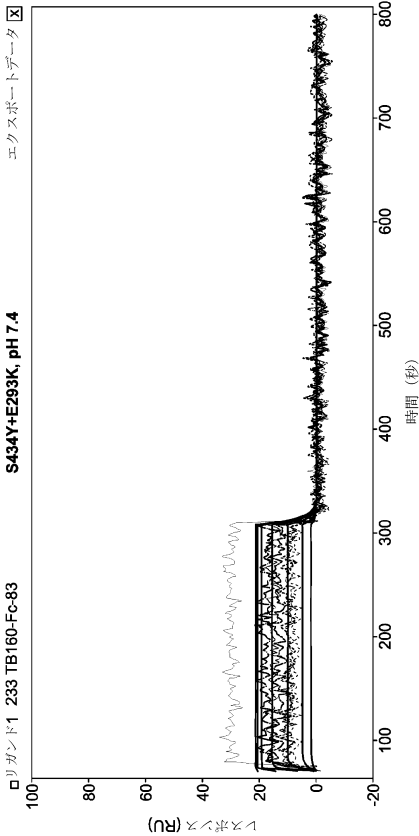
40

50

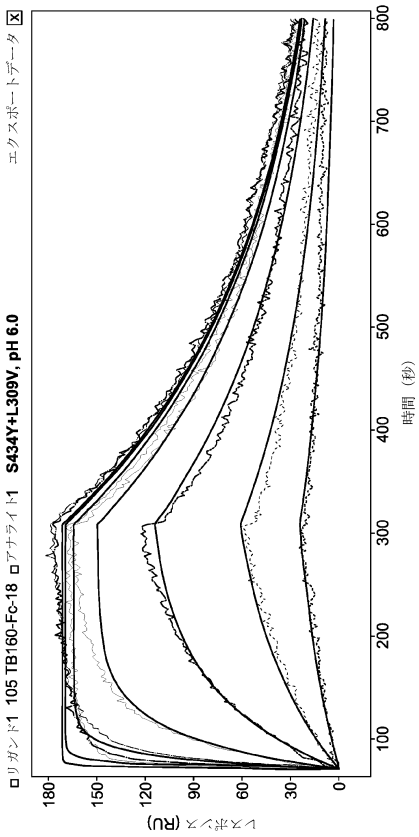
【図 18 A】



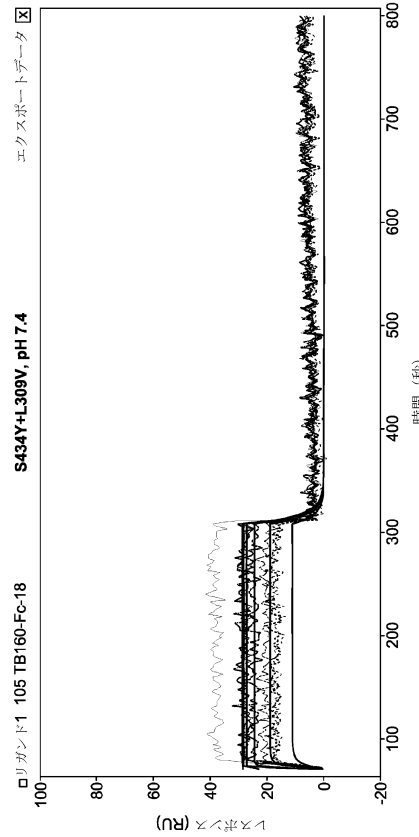
【図 18 B】



【図 19 A】



【図 19 B】



10

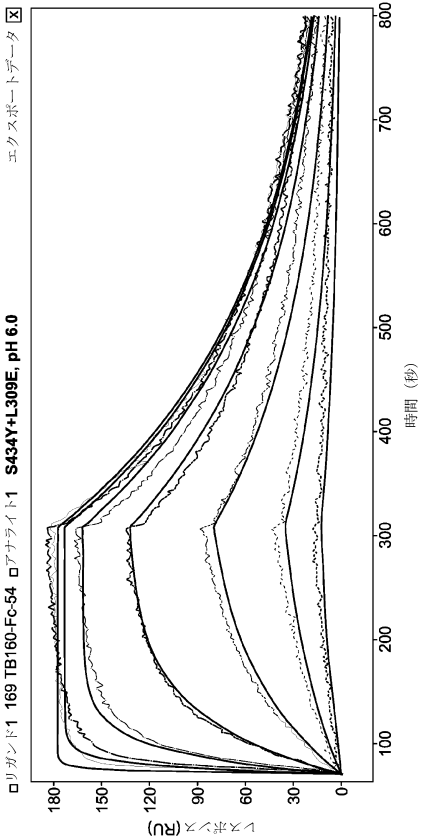
20

30

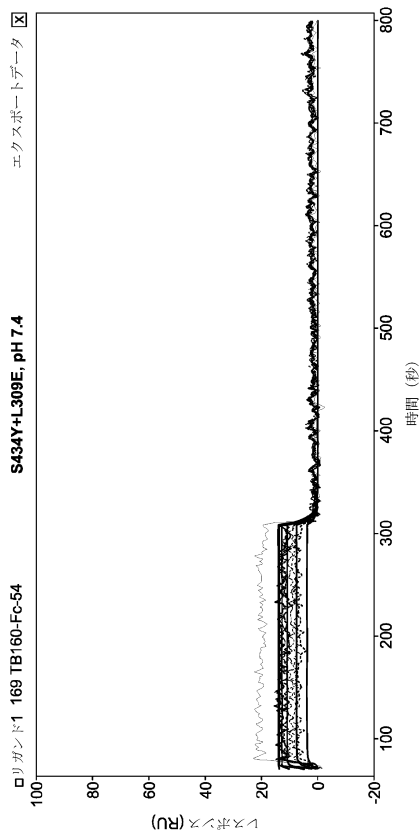
40

50

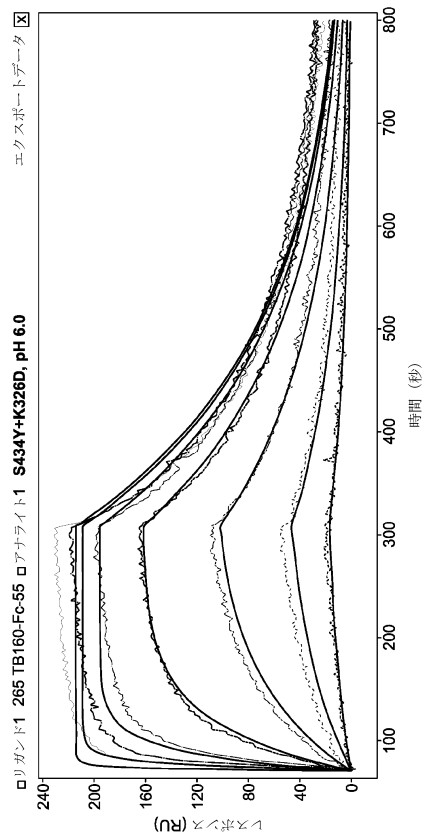
【図 20 A】



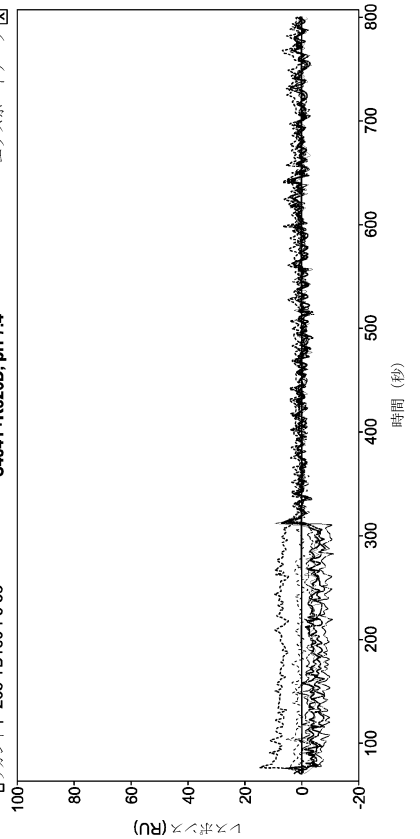
【図 20 B】



【図 21 A】



【図 21 B】



10

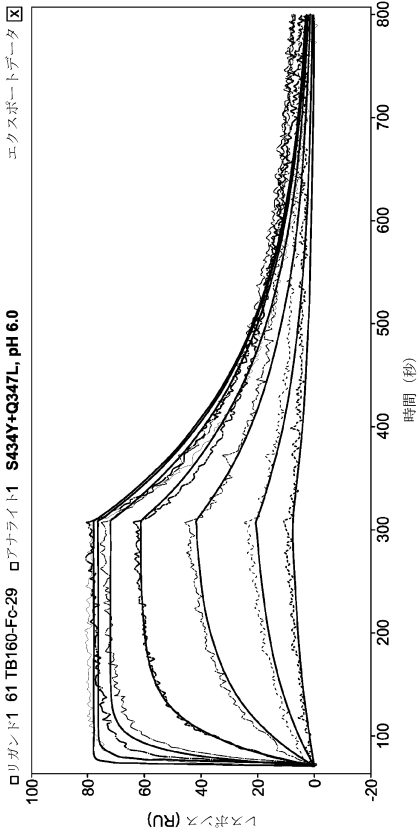
20

30

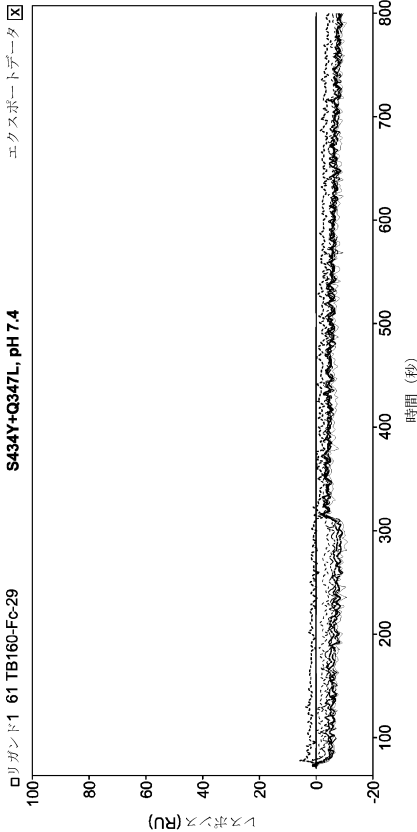
40

50

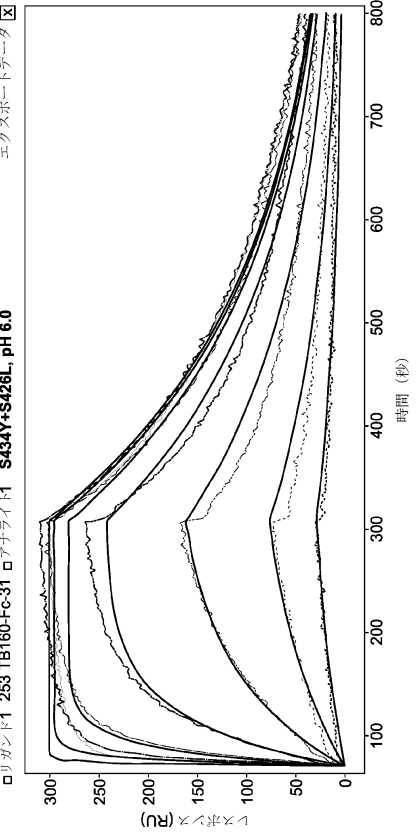
【図 2 2 A】



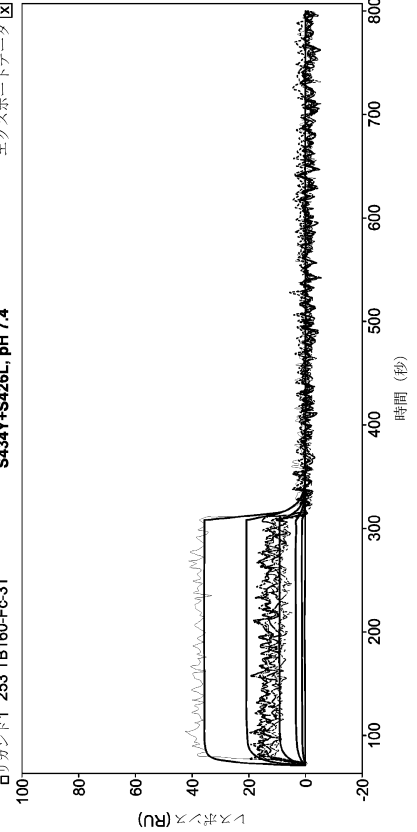
【図 2 2 B】



【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



10

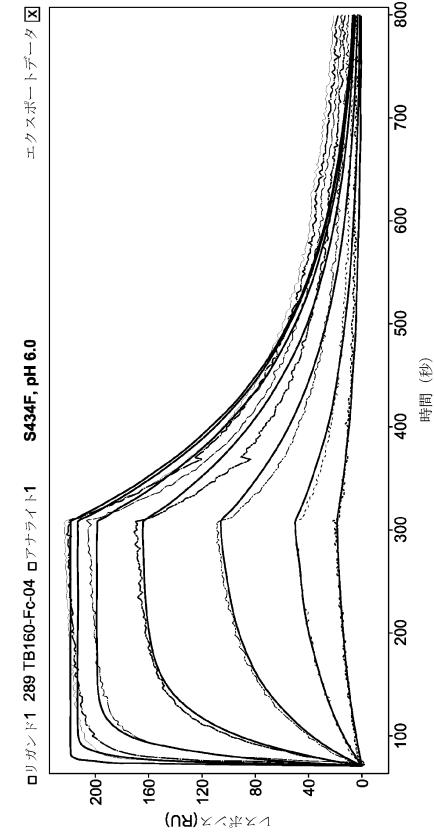
20

30

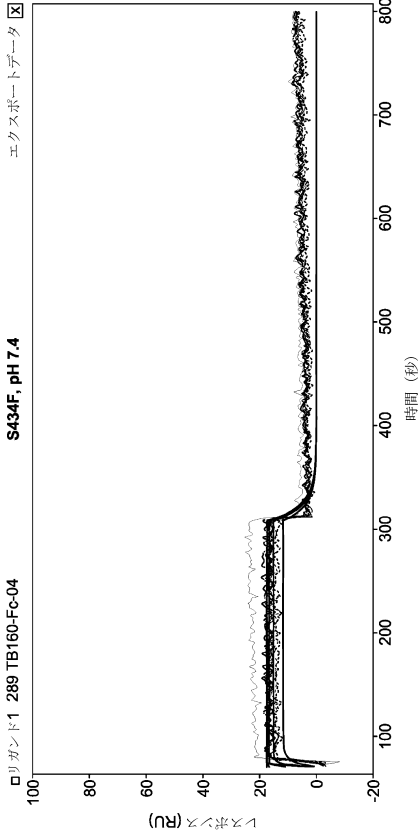
40

50

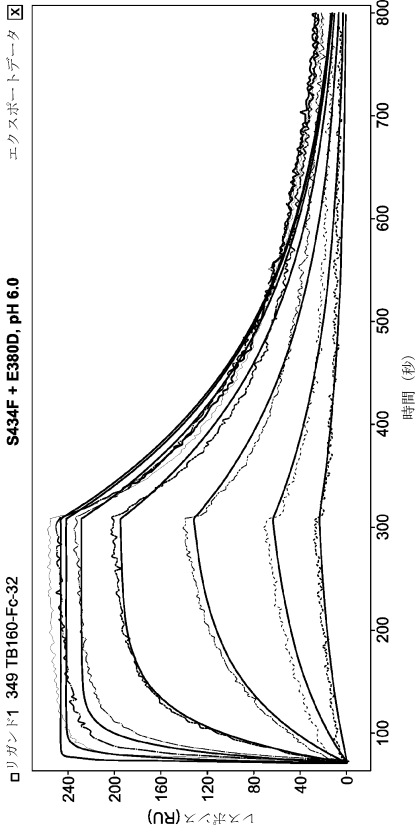
【図 2 4 A】



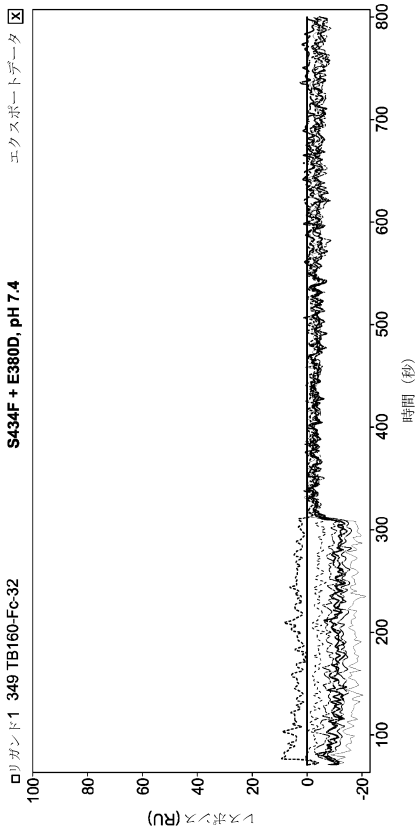
【図 2 4 B】



【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



10

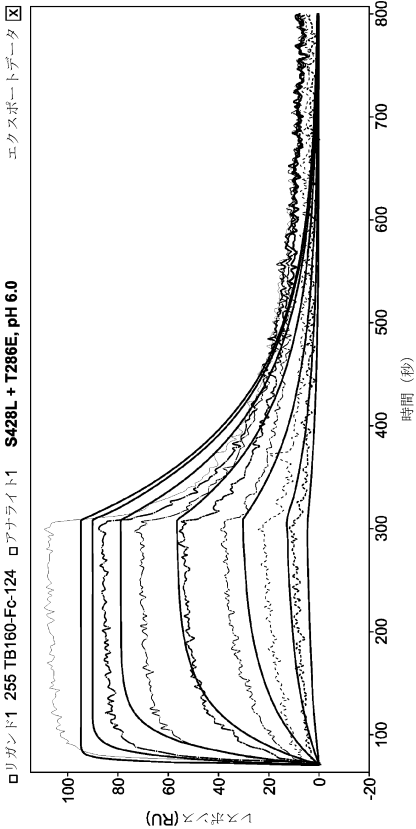
20

30

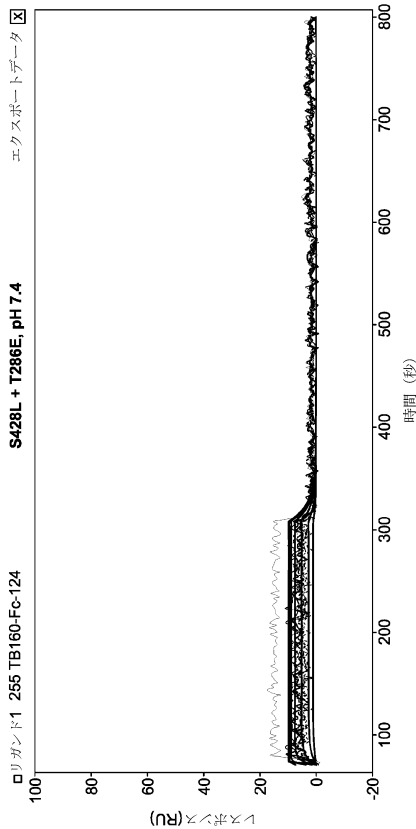
40

50

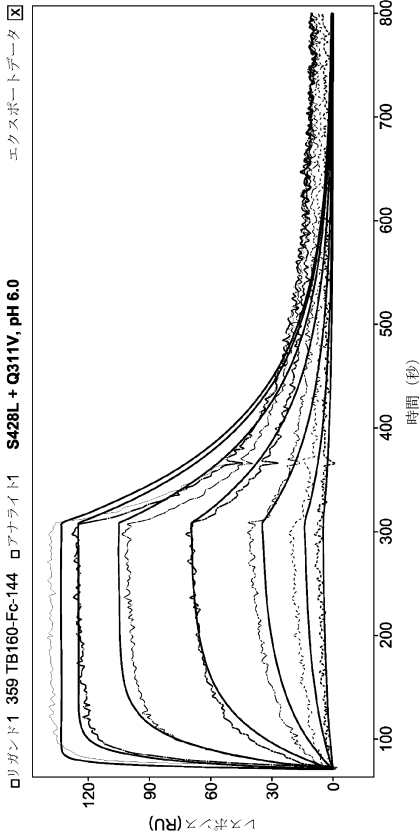
【図 2 6 A】



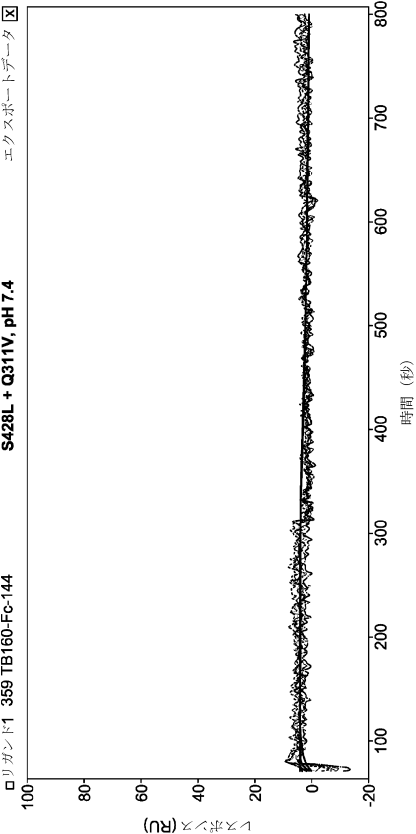
【図 2 6 B】



【図 2 7 A】



【図 2 7 B】



10

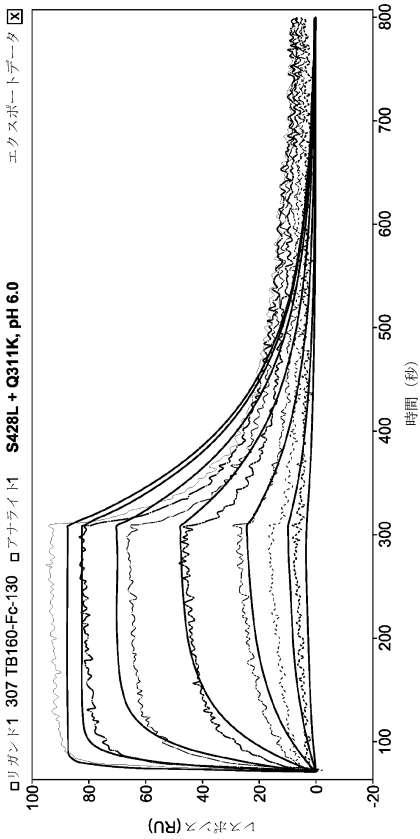
20

30

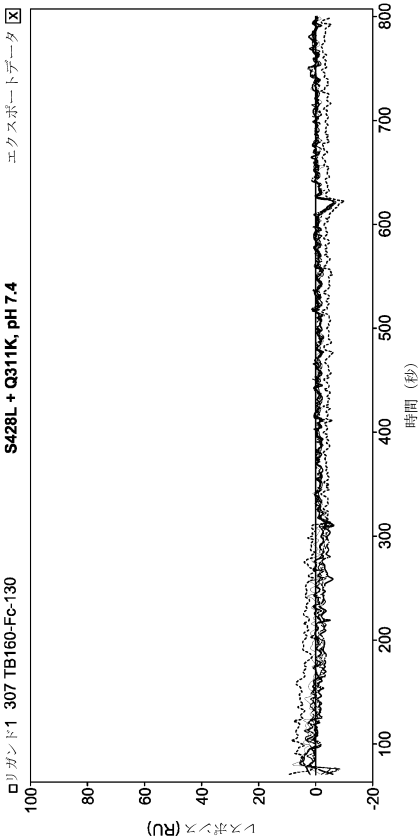
40

50

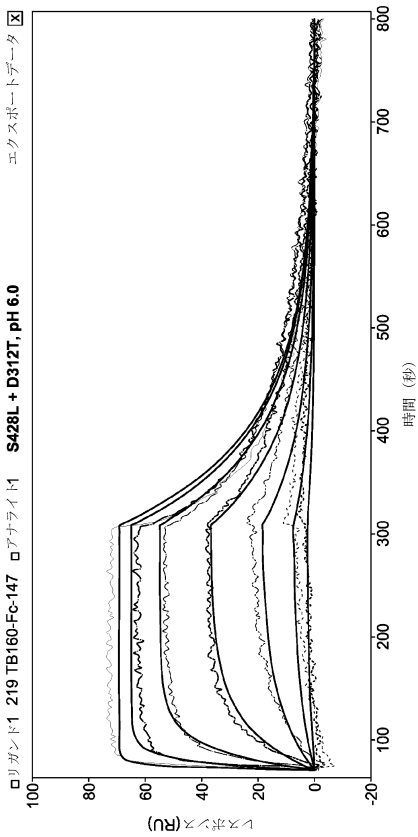
【図 2 8 A】



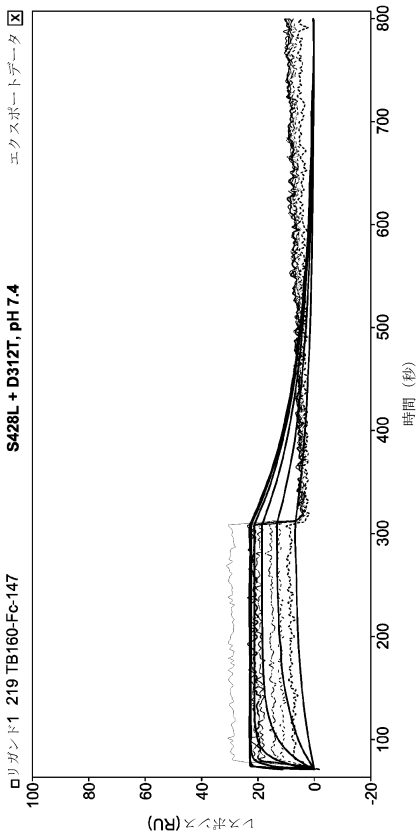
【図 2 8 B】



【図 2 9 A】



【図 2 9 B】



10

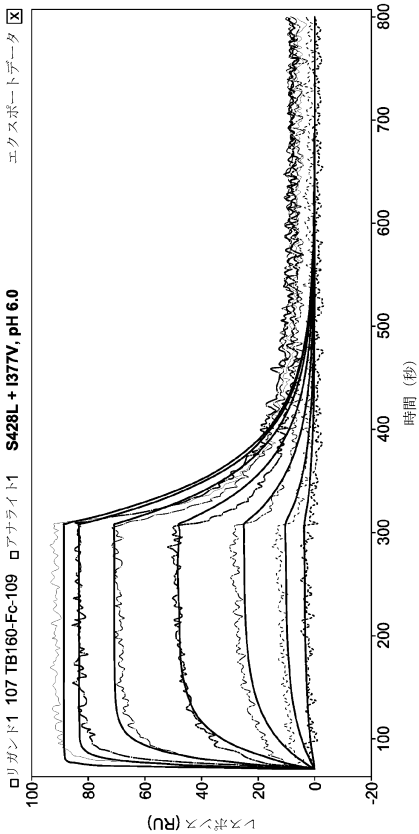
20

30

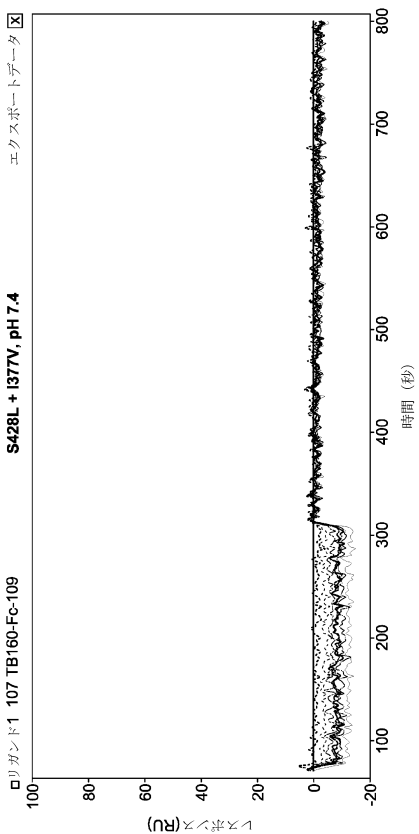
40

50

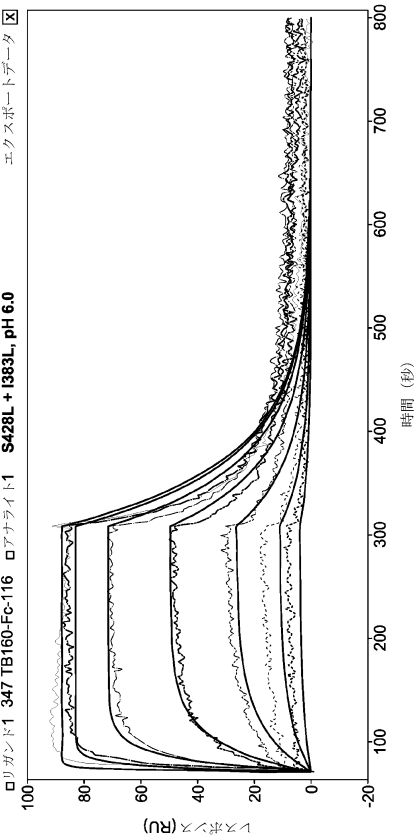
【図 3 0 A】



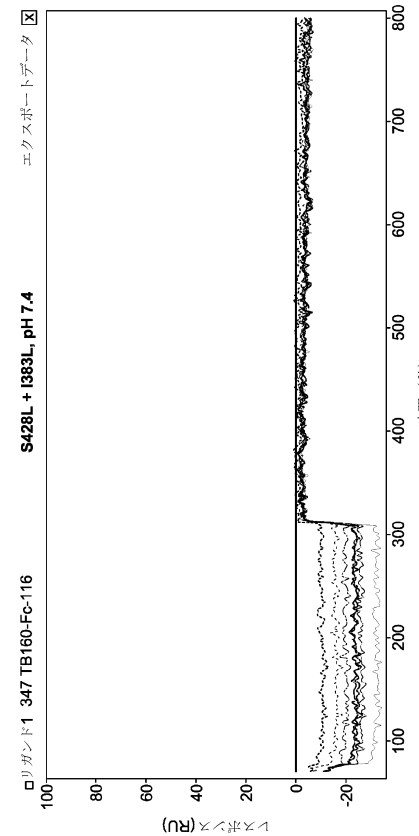
【図 3 0 B】



【図 3 1 A】



【図 3 1 B】



10

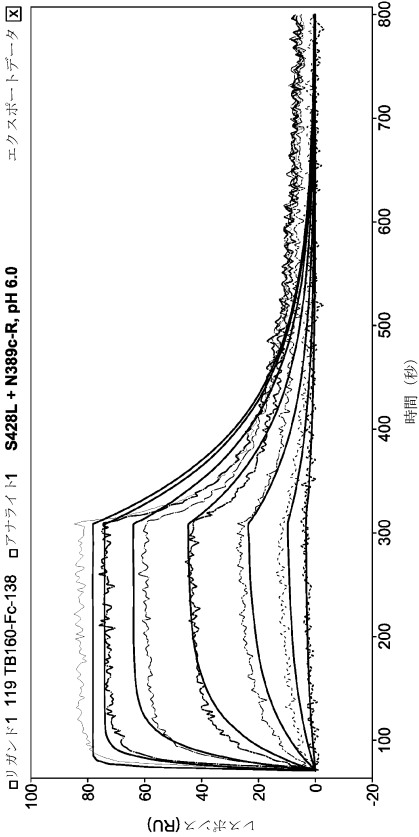
20

30

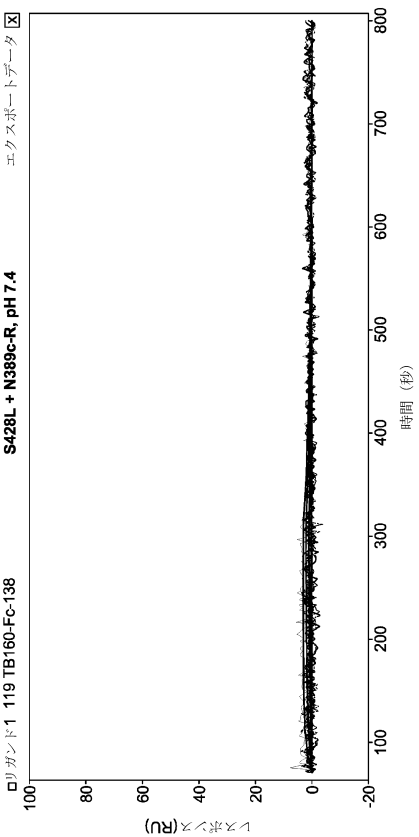
40

50

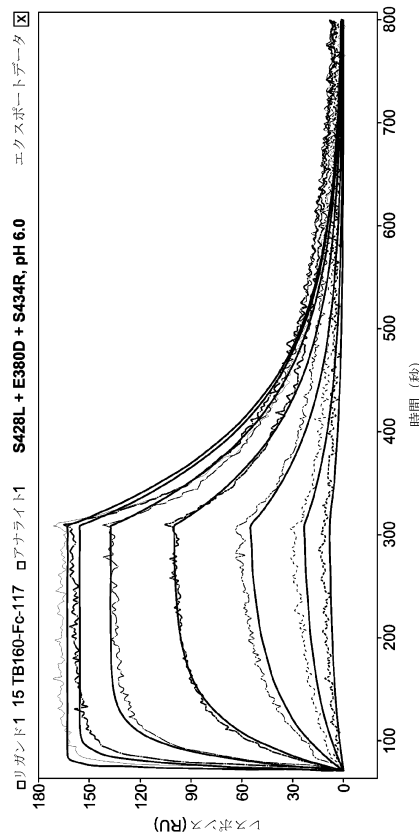
【図 3 2 A】



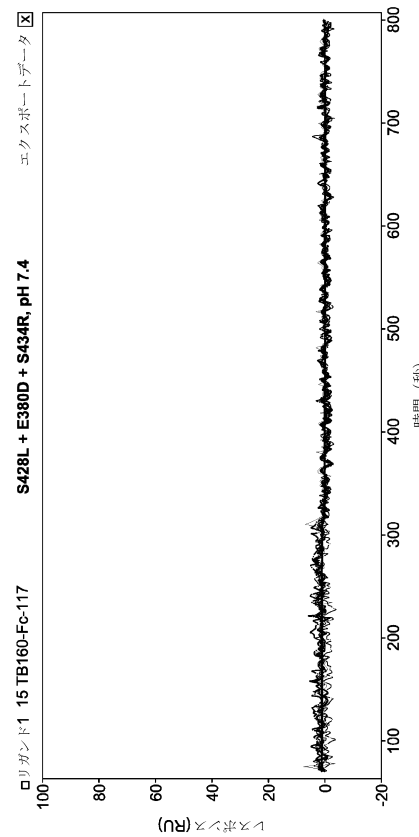
【図 3 2 B】



【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



10

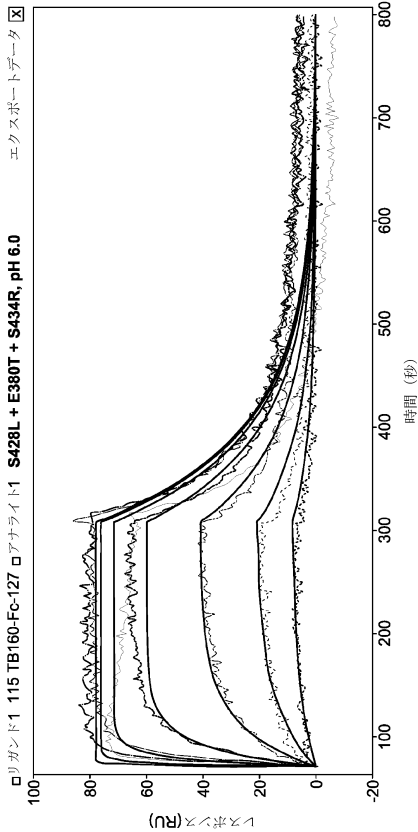
20

30

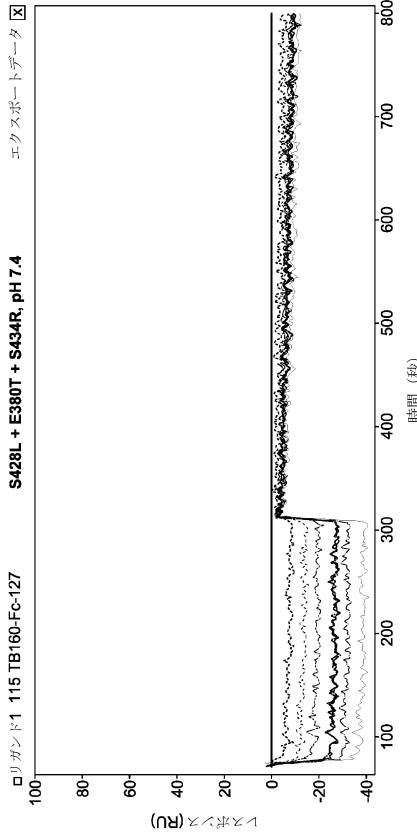
40

50

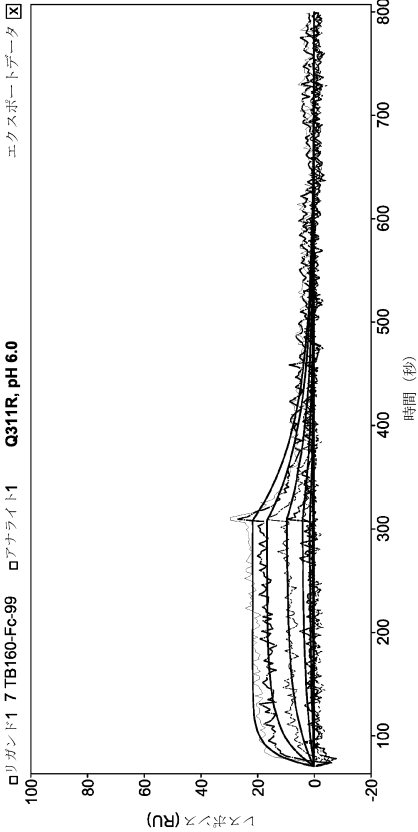
【図 3 4 A】



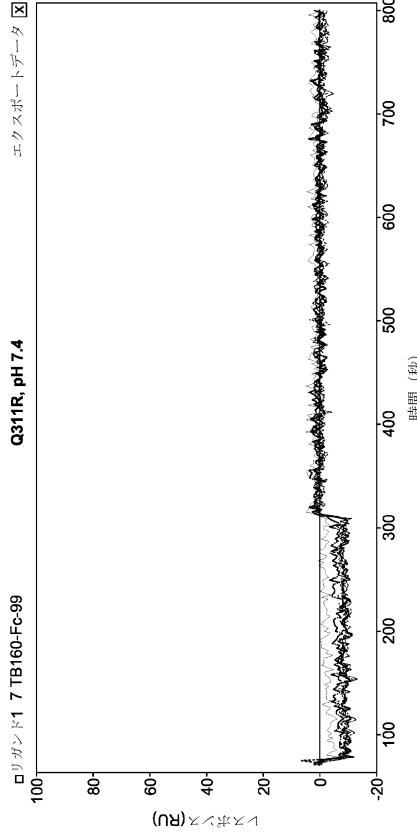
【図 3 4 B】



【図 3 5 A】



【図 3 5 B】



10

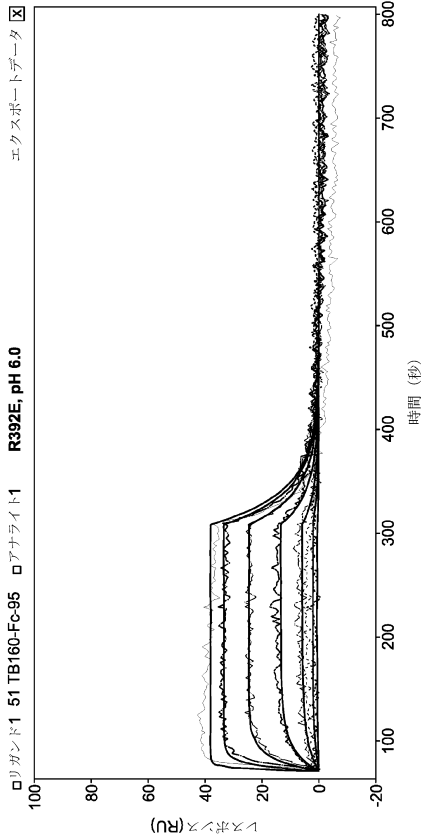
20

30

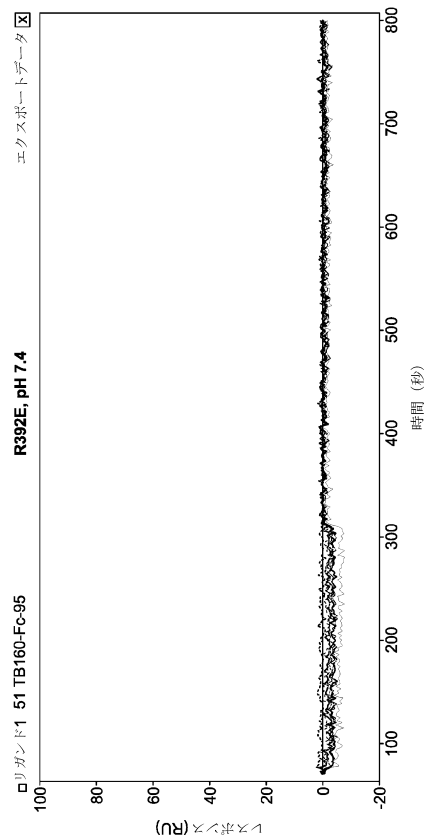
40

50

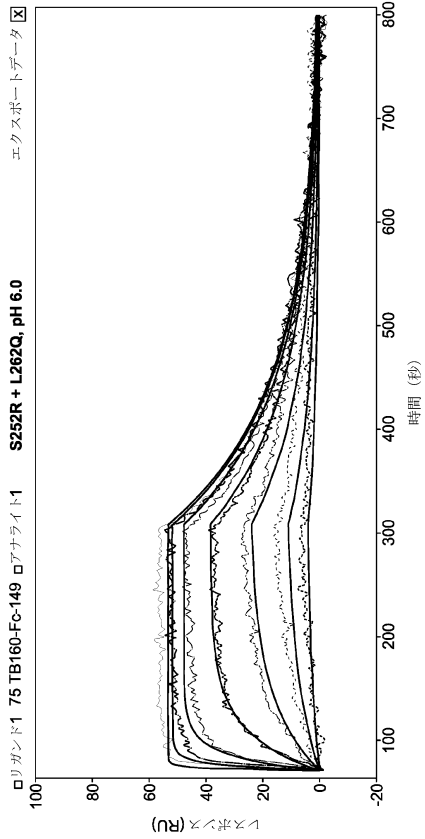
【図 3 6 A】



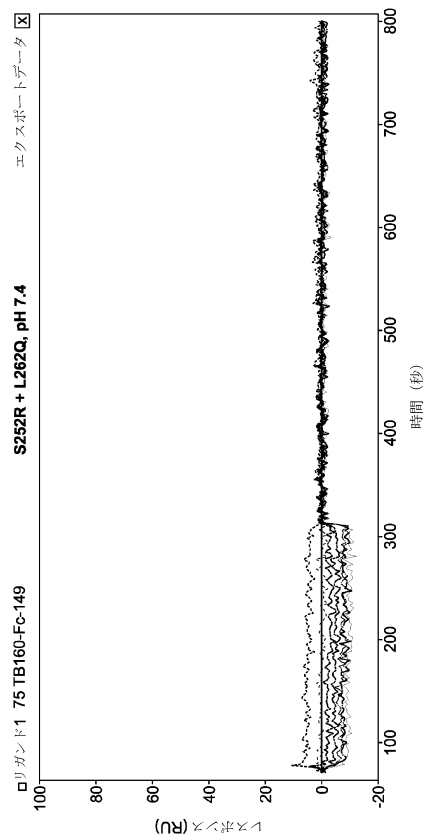
【図 3 6 B】



【図 3 7 A】



【図 3 7 B】



10

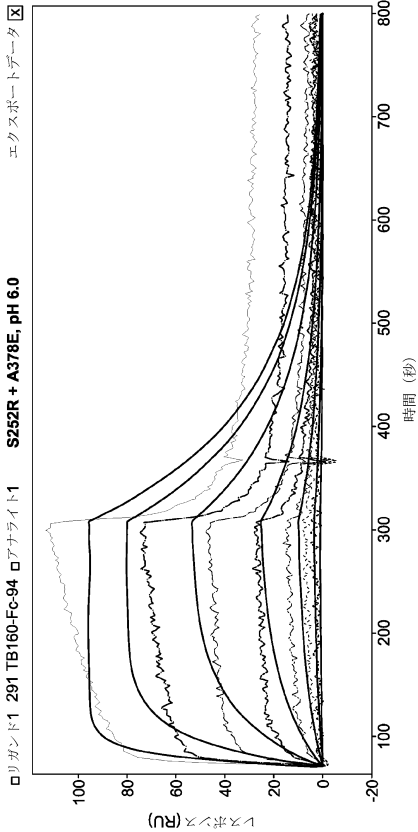
20

30

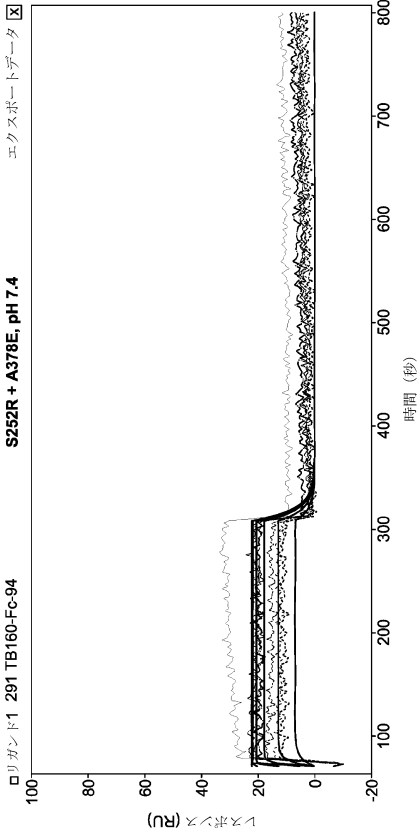
40

50

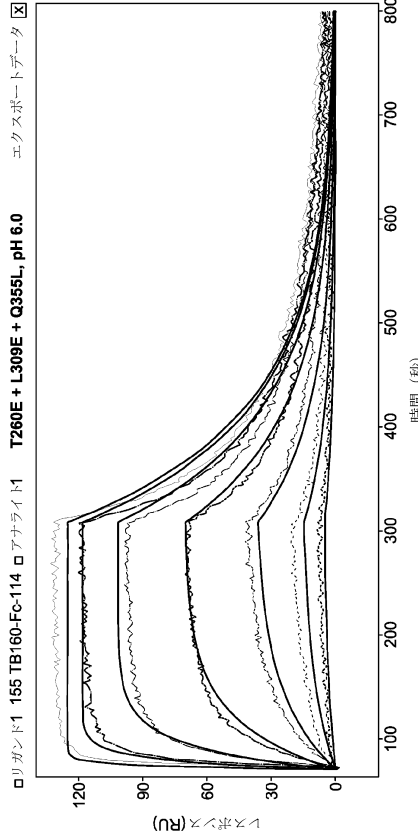
【図 3 8 A】



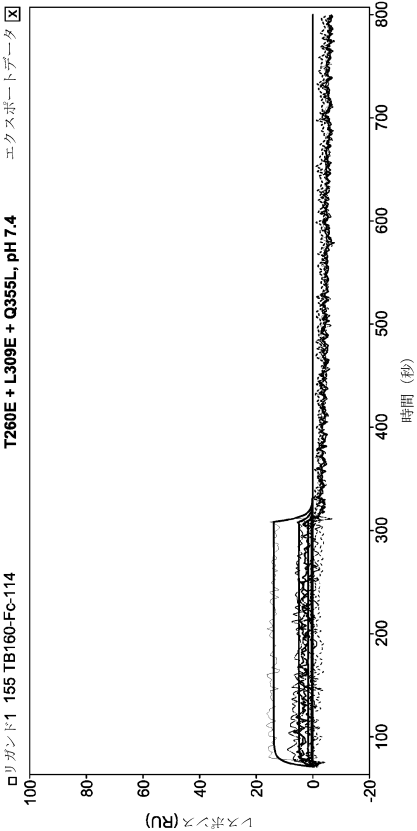
【図 3 8 B】



【図 3 9 A】



【図 3 9 B】



10

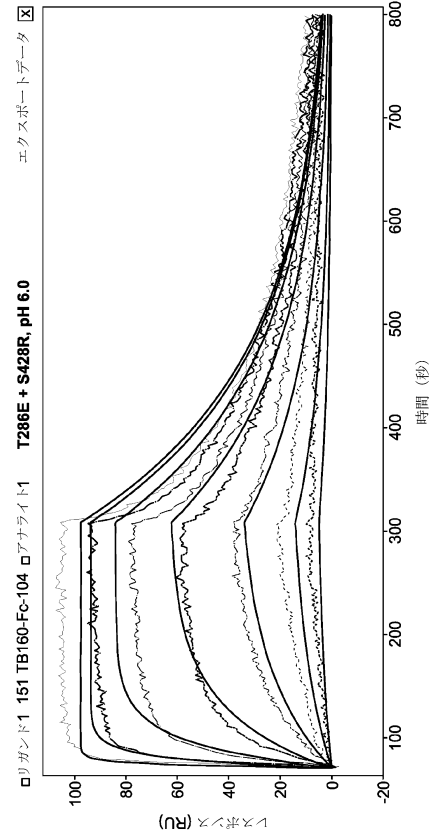
20

30

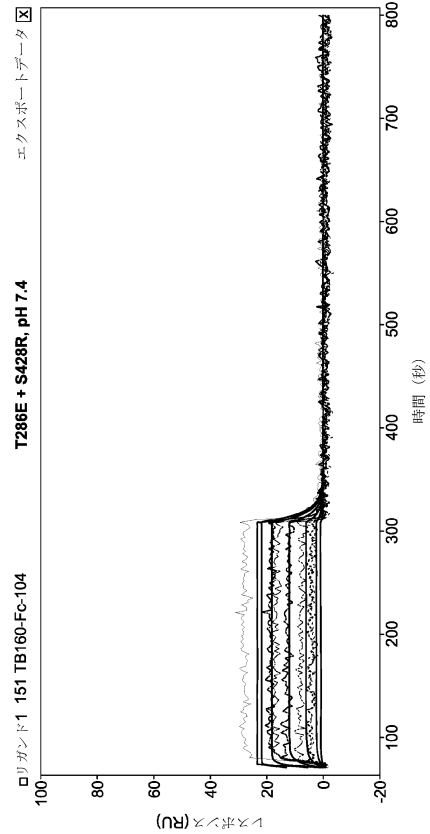
40

50

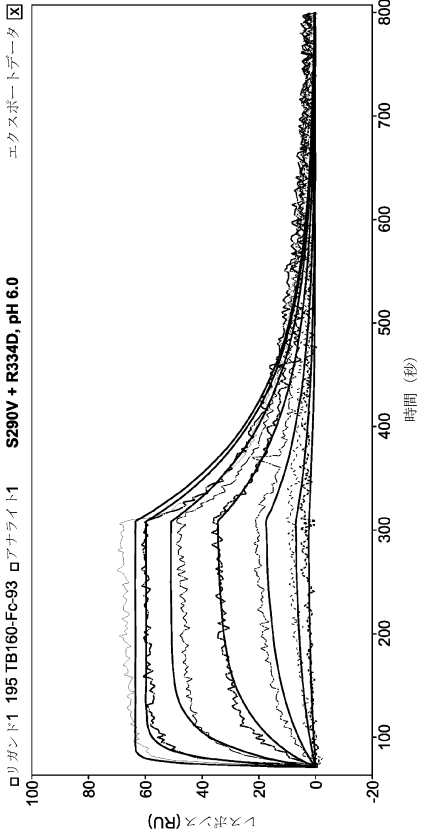
【図 4 0 A】



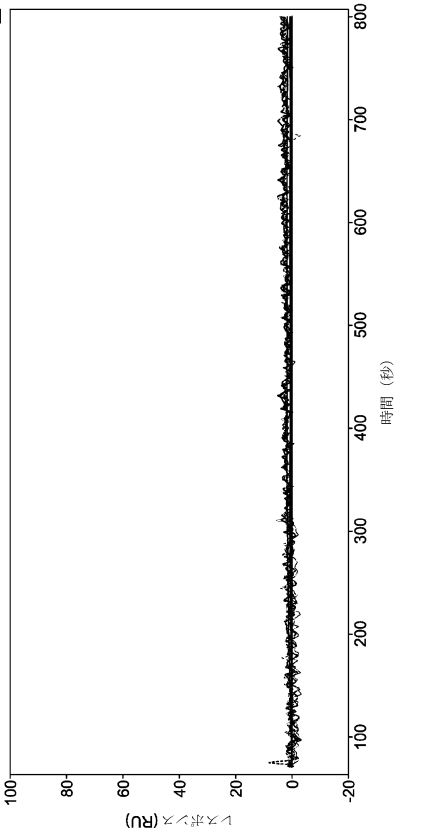
【図 4 0 B】



【図 4 1 A】



【図 4 1 B】



10

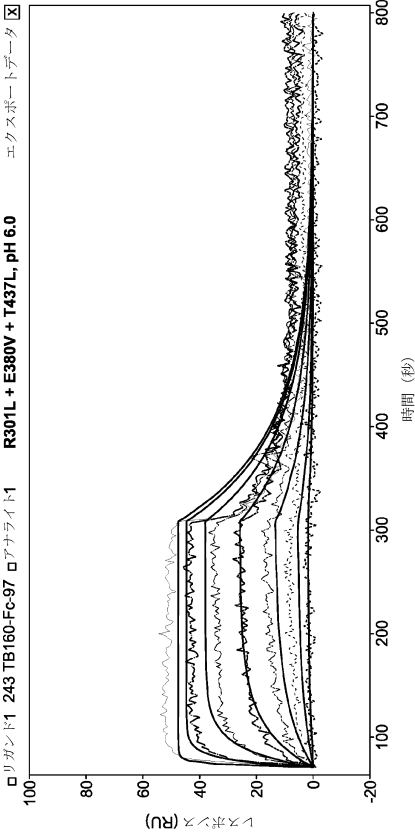
20

30

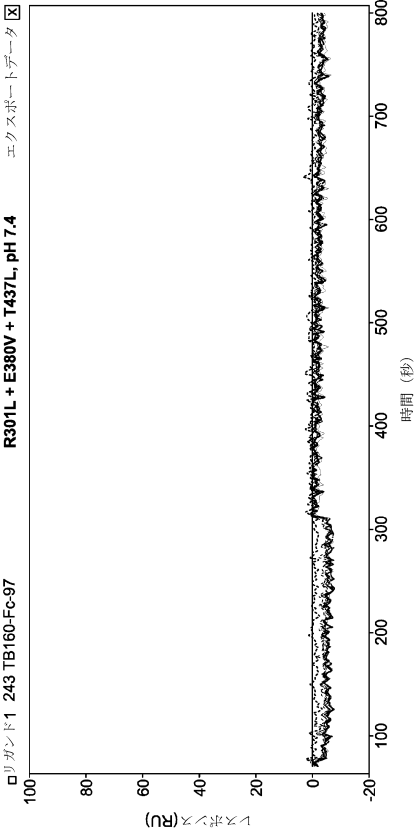
40

50

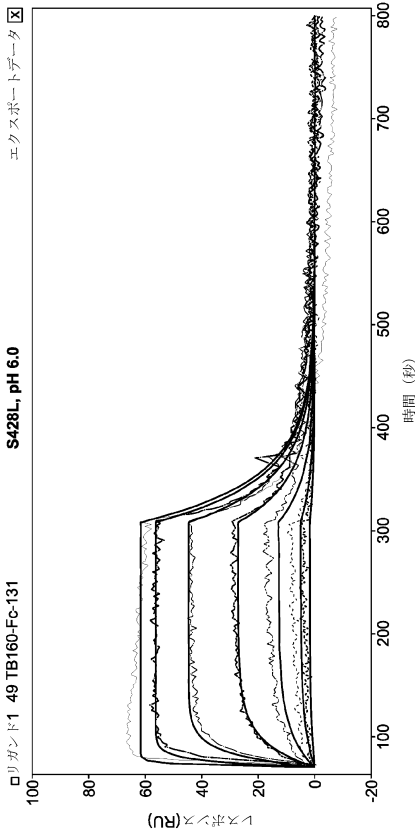
【図 4 2 A】



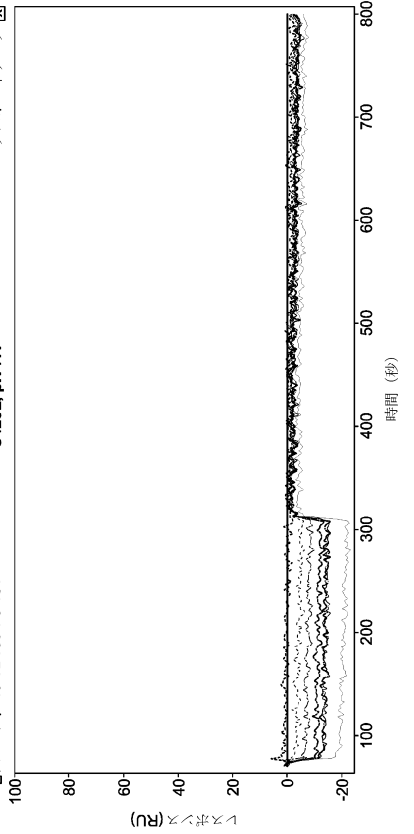
【図 4 2 B】



【図 4 3 A】



【図 4 3 B】



10

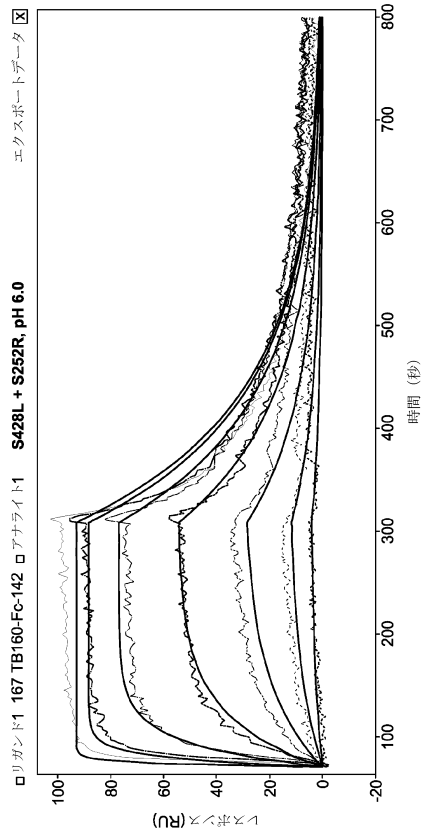
20

30

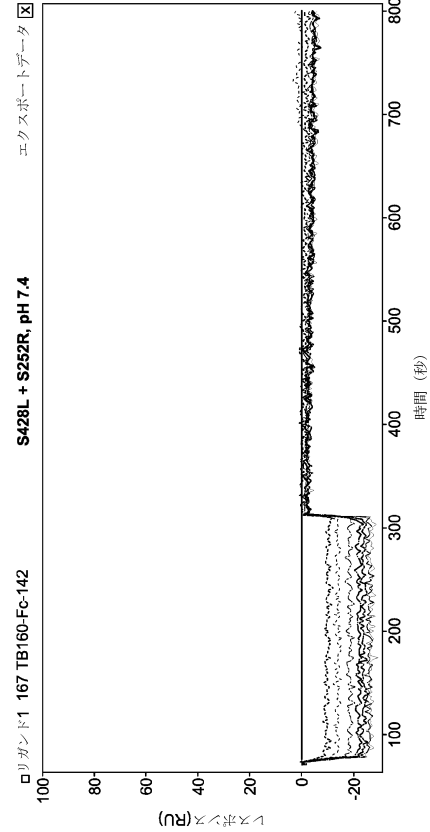
40

50

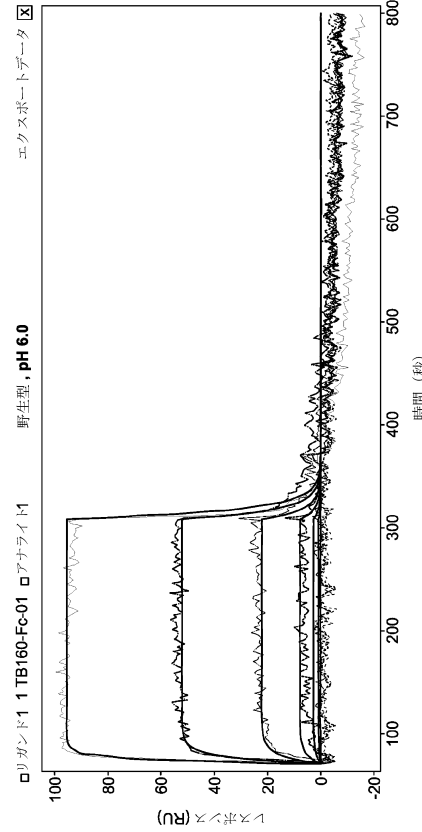
【図 4 4 A】



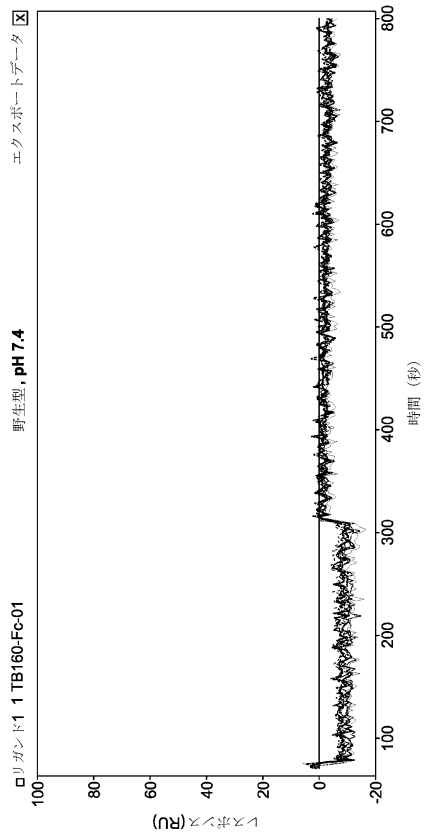
【図 4 4 B】



【図 4 5 A】



【図 4 5 B】



10

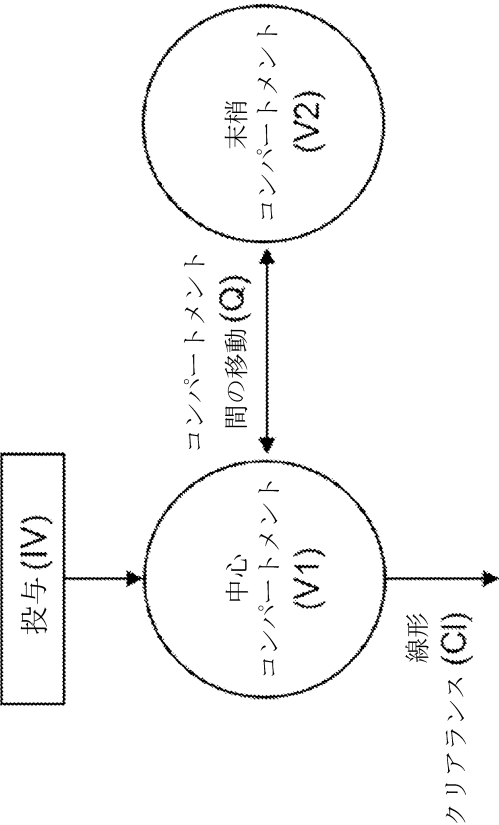
20

30

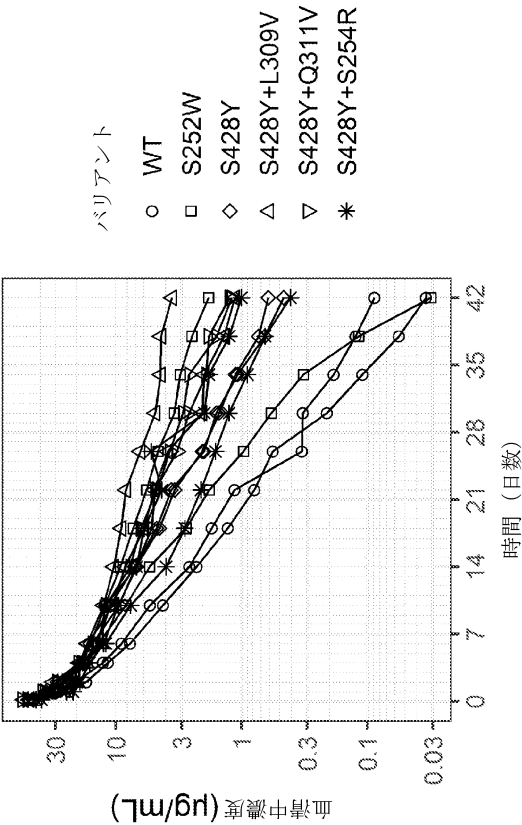
40

50

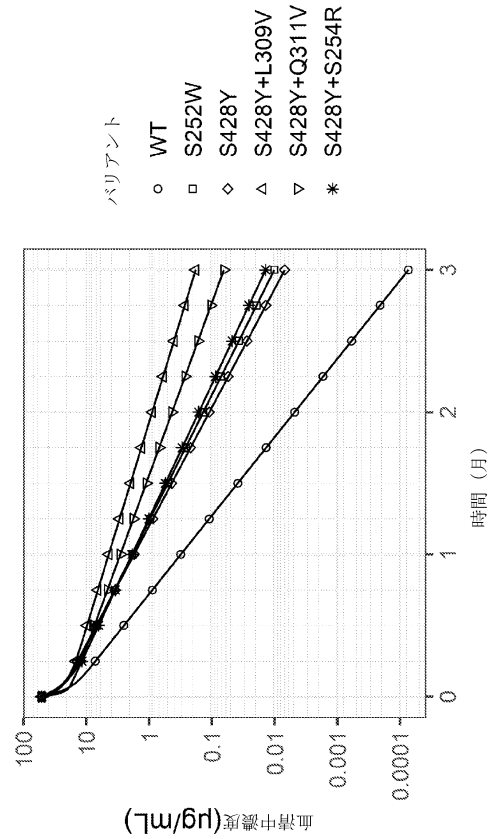
【図 4 6】



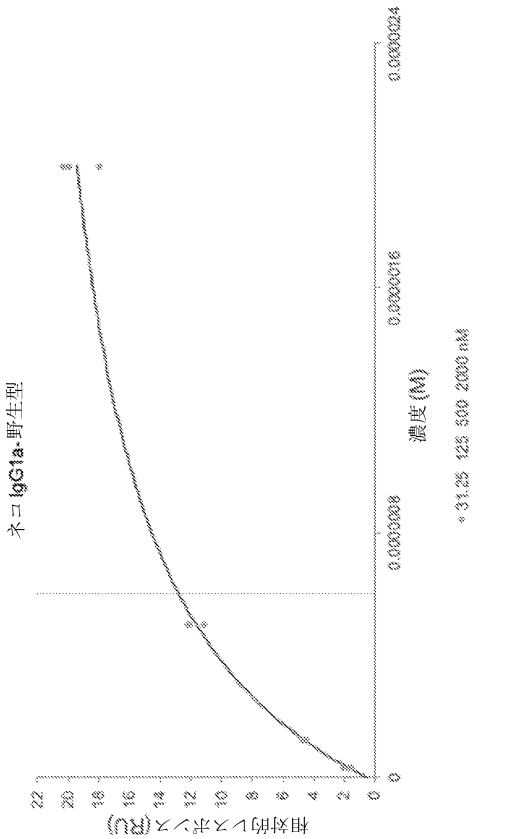
【図 4 7】



【図 4 8】



【図 4 9 A】



10

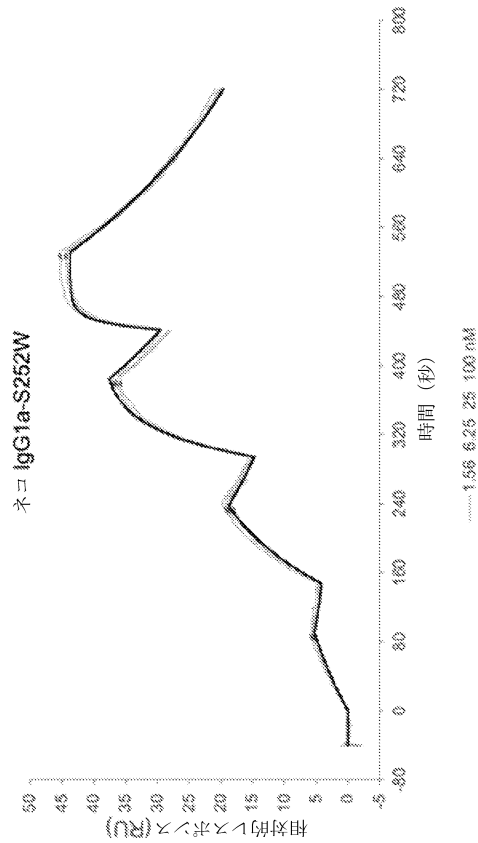
20

30

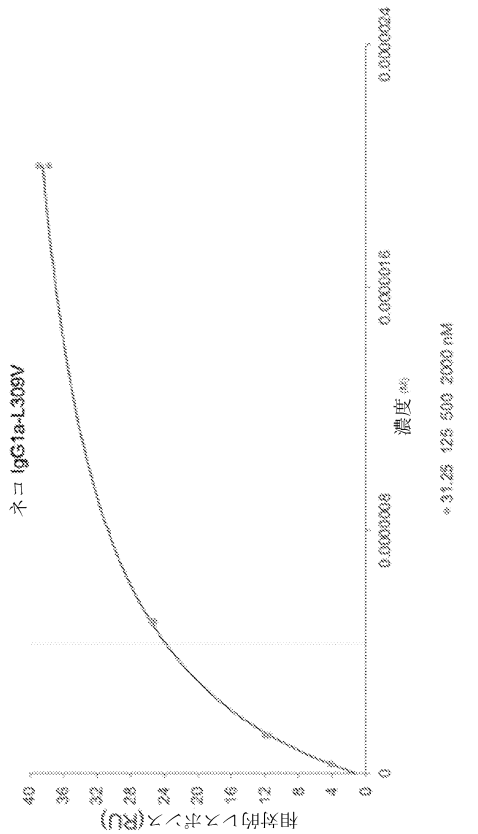
40

50

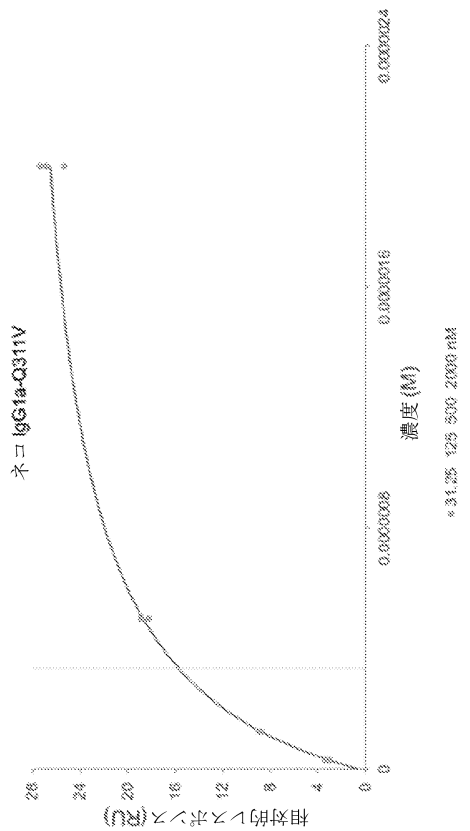
【図 4 9 B】



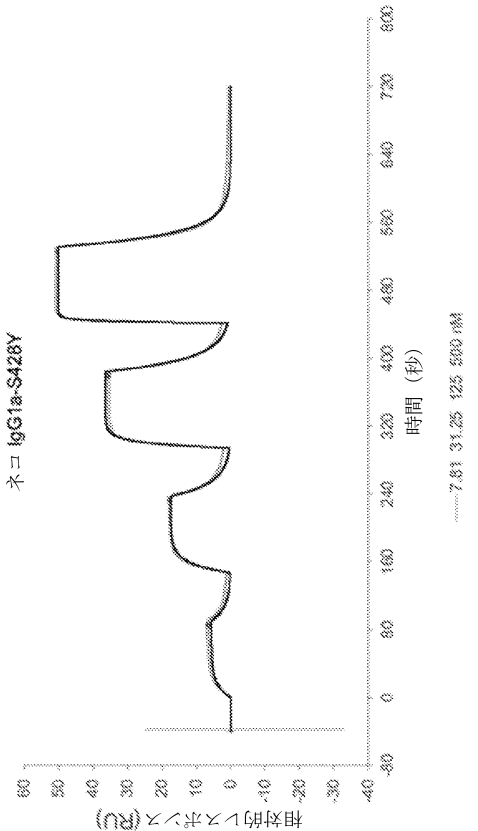
【図 4 9 C】



【図 4 9 D】



【図 4 9 E】



10

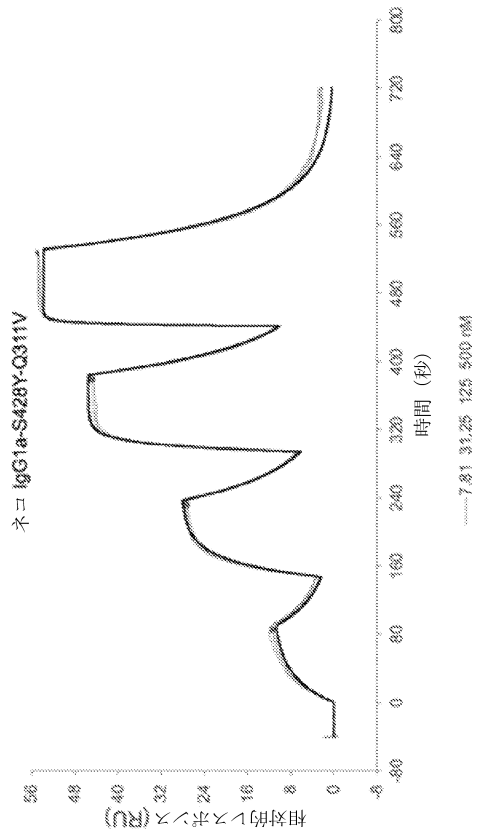
20

30

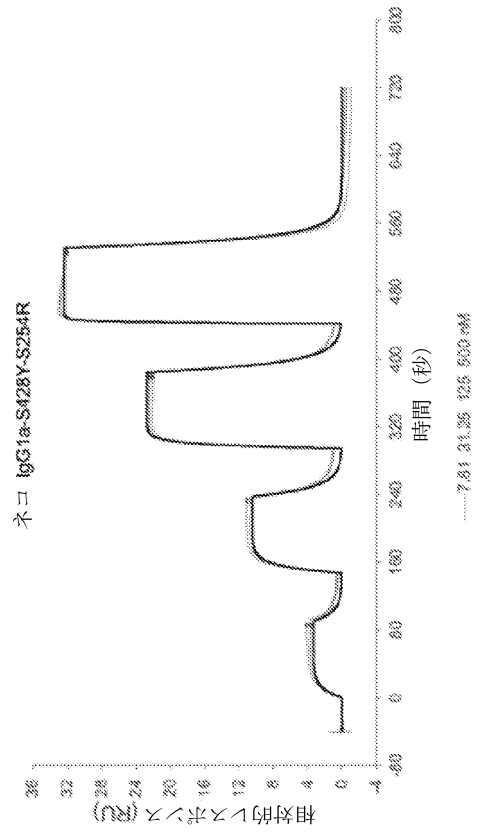
40

50

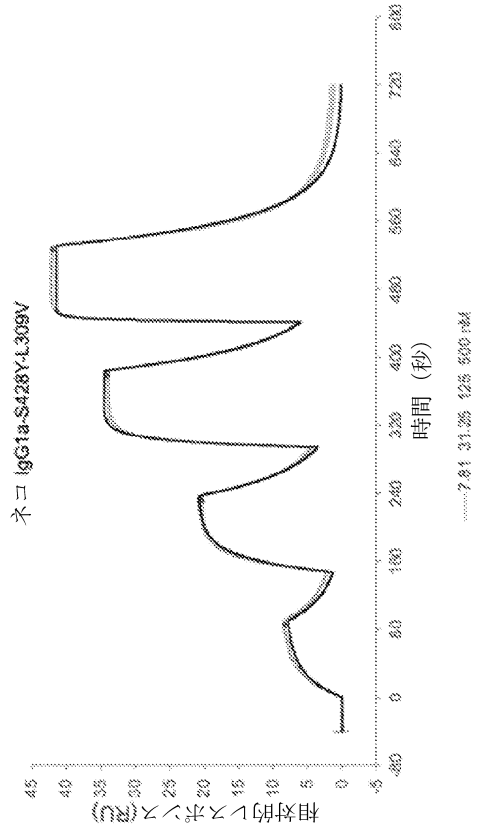
【図 4 9 F】



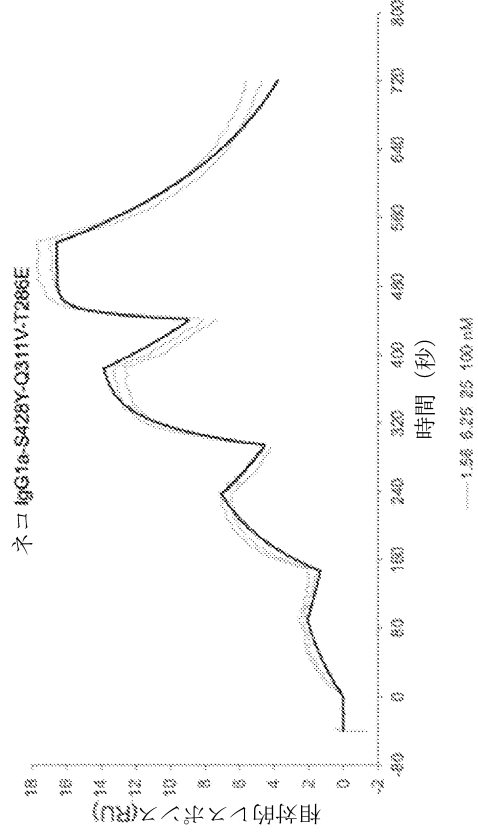
【図 4 9 G】



【図 4 9 H】



【図 4 9 I】



10

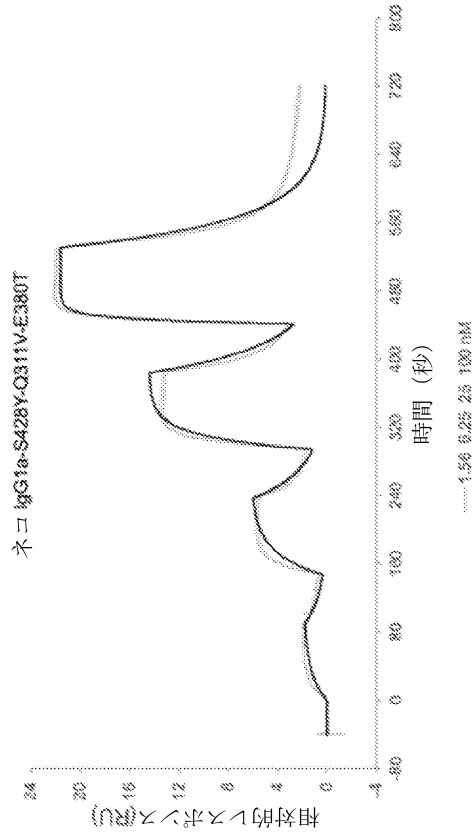
20

30

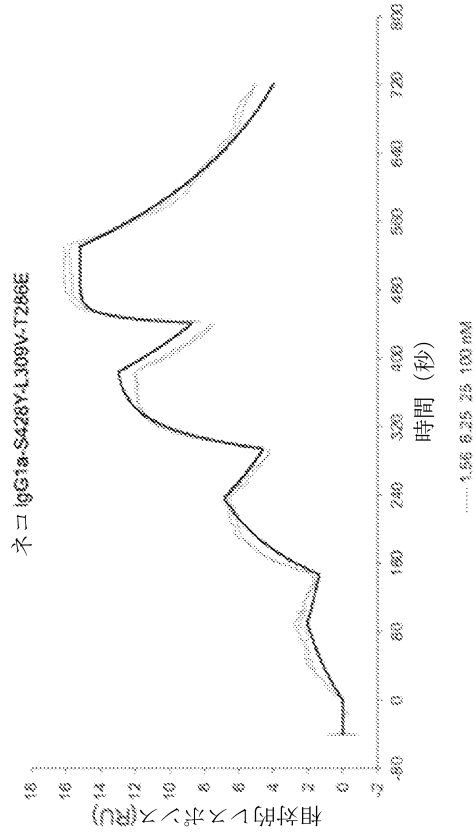
40

50

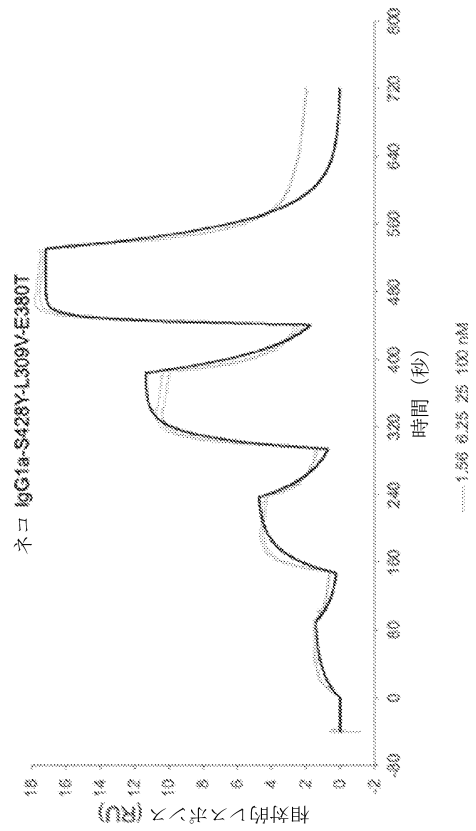
【図 4 9 J】



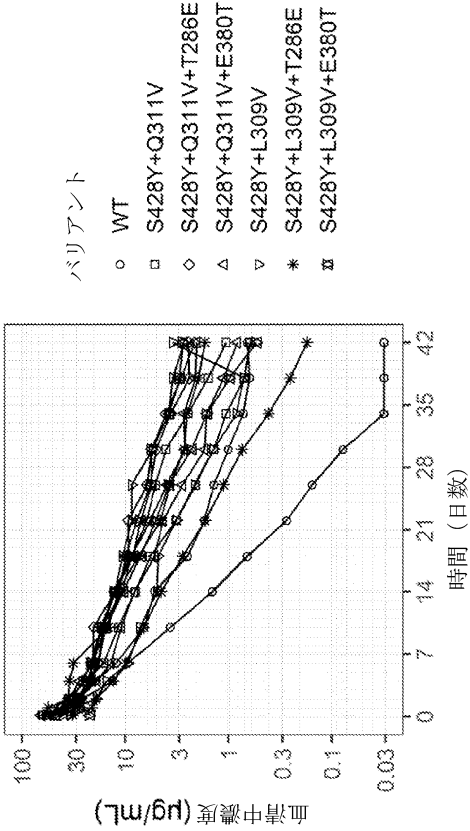
【図 4 9 K】



【図 4 9 L】



【図 5 0】



10

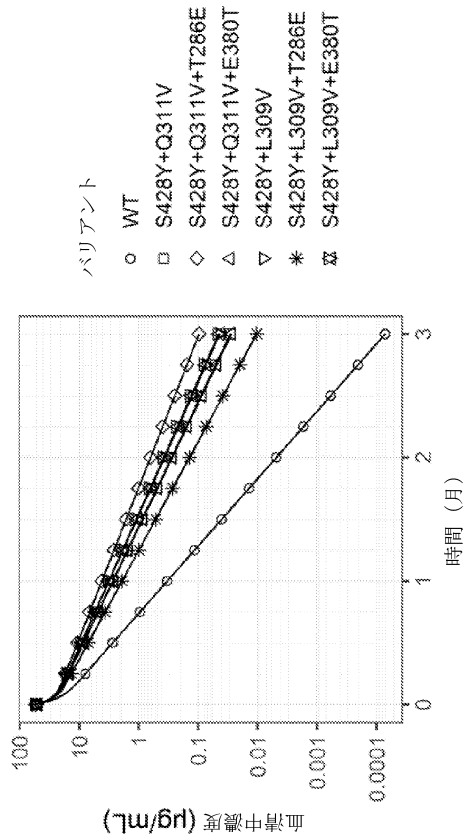
20

30

40

50

【図 5 1】



【配列表】

202353463600001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/038714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/00
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/082048 A1 (KINDRED BIOSCIENCES INC [US]) 23 April 2020 (2020-04-23) paragraph [0002] - paragraph [0005] examples 13-15 tables 14-16 sequences 75-77	1-51
X	WO 2020/116560 A1 (BICA THERAPEUTICS INC [JP]) 11 June 2020 (2020-06-11) paragraph [0006] items "[4]" and "[5]", paragraph [0013] paragraph [0005] paragraph [0013] paragraph [0006] items "[14]"-"[20]" example 2 table 1 Experimental Example 1, Table 3 -/--	1-51

☒ 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

13 October 2021

Date of mailing of the international search report

29/10/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5518 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/038714

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	& EP 3 892 632 A1 (BICA THERAPEUTICS INC [JP]) 13 October 2021 (2021-10-13) the whole document -----	1-51
A	WO 2019/035010 A1 (KINDRED BIOSCIENCES INC [US]) 21 February 2019 (2019-02-21) cited in the application the whole document -----	1-51
A	WO 2018/073185 A1 (VETOQUINOL SA [FR]) 26 April 2018 (2018-04-26) the whole document -----	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/038714**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: 10
- 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. 20
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/038714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020082048 A1	23-04-2020	AU 2019360271 A1 BR 112021006977 A2 CA 3114796 A1 CN 113194984 A EP 3866842 A1 KR 20210110563 A WO 2020082048 A1	29-04-2021 27-07-2021 23-04-2020 30-07-2021 25-08-2021 08-09-2021 23-04-2020
WO 2020116560 A1	11-06-2020	CN 113227134 A EP 3892632 A1 WO 2020116560 A1	06-08-2021 13-10-2021 11-06-2020
WO 2019035010 A1	21-02-2019	AU 2018318440 A1 BR 112020002871 A2 CA 3071337 A1 CN 111182915 A EP 3668536 A1 JP 2020531002 A KR 20200057701 A US 2020362034 A1 WO 2019035010 A1	13-02-2020 28-07-2020 21-02-2019 19-05-2020 24-06-2020 05-11-2020 26-05-2020 19-11-2020 21-02-2019
WO 2018073185 A1	26-04-2018	CA 3040823 A1 CN 110114369 A EP 3526246 A1 US 2020181258 A1 WO 2018073185 A1	26-04-2018 09-08-2019 21-08-2019 11-06-2020 26-04-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2006)

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 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24	
C 0 7 K	16/22 (2006.01)	C 0 7 K	16/22	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	1 7 1
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	1 7 1
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	5/00 (2006.01)	A 6 1 P	5/00	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	1 7 1
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	1 7 1
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	1 0 0
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
		A 6 1 K	39/395	N
		A 6 1 K	39/395	W

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,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,KE,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,NG,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,Z
W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 ブロンディク、ウィリアム

アメリカ合衆国 0 2 1 0 8 マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート 2 0 1 ワン
ボストン プレイス スイート 3 9 3 0

(72)発明者 シュヴァリエ、ブレット

アメリカ合衆国 0 2 1 0 8 マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート 2 0 1 ワン
ボストン プレイス スイート 3 9 3 0

(72)発明者 ホーン、ユルゲン

アメリカ合衆国 0 2 1 0 8 マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート 2 0 1 ワン
ボストン プレイス スイート 3 9 3 0

(72)発明者 ナタラジャン、マドゥズーダン

アメリカ合衆国 0 2 1 0 8 マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート 2 0 1 ワン
ボストン プレイス スイート 3 9 3 0

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X CA43

4C084 AA02 AA03 BA44 DA39 MA66 NA03 ZA081 ZA082 ZA361 ZA362

F ターム (参考)

ZA551 ZA552 ZA661 ZA662 ZA701 ZA702 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892
ZA961 ZA962 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZB261 ZB262 ZB321
ZB322 ZC611 ZC612
4C085 AA13 BB11 BB36 BB42 EE01 GG02 GG03 GG04
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA20 FA74