

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6724023号
(P6724023)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月26日(2020.6.26)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/44 (2006.01)

C O 7 K 16/44 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

請求項の数 14 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-541808 (P2017-541808)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月9日(2016.2.9)
 (65) 公表番号 特表2018-505893 (P2018-505893A)
 (43) 公表日 平成30年3月1日(2018.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/017100
 (87) 国際公開番号 W02016/130516
 (87) 国際公開日 平成28年8月18日(2016.8.18)
 審査請求日 平成30年11月16日(2018.11.16)
 (31) 優先権主張番号 62/113,717
 (32) 優先日 平成27年2月9日(2015.2.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 505098937
 リサーチ ディベロップメント ファウン
 デーション
 アメリカ合衆国 ネバダ州 カーソン シ
 ティー ノース ディビジョン ストリー
 ト 402
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ジョルジオ, ジョージ
 アメリカ合衆国 テキサス 78731,
 オースティン, ウィリアムズ リッジ
 ウェイ 6405

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された補体活性化を示す操作された免疫グロブリンFCポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

非グリコシル化野生型ヒトIgG Fcドメインの結合と比較してヒトC1qに改善された結合をすることができる非グリコシル化バリエーションヒトIgG Fcドメインを含むポリペプチドであって、前記Fcドメインが、配列番号1に対し少なくとも90%の配列同一性を含み、前記Fcドメインが、L235K、G236M、G237RおよびL351Qのアミノ酸置換を含み、前記Fcドメインにおける前記残基のナンバリングが、KabatatにおけるEU指標のナンバリングであるポリペプチド。

【請求項2】

ヒトC1qの結合に特異的な親和性を有する、または
 Fc受容体に検出可能に結合しない、または
 ヒトC1qおよび活性化Fc受容体の結合に特異的な親和性を有する、
 好ましくは、FcRIIbに検出可能に結合しない、請求項1に記載のポリペプチド。

10

【請求項3】

前記非グリコシル化バリエーションヒトIgG Fcドメインが、Fc802(配列番号10)である、請求項1または2に記載のポリペプチド。

【請求項4】

アミノ酸299におけるロイシン置換(T299L)をさらに含む、請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

【請求項 5】

非 F c 受容体（非 F c R）結合ドメインをさらに含み、
好ましくは、前記非 F c R 結合ドメインが、I g 可変ドメインであり、
より好ましくは、前記ポリペプチドが全長抗体として規定されている、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記非 F c R 結合領域が、抗体の抗原結合部位ではない、または
前記非 F c R 結合領域が、細胞表面タンパク質に結合する、または
前記非 F c R 結合領域が、可溶性タンパク質に結合する、請求項 5 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸であって、
好ましくは、DNA セグメントである、または
好ましくは、発現ベクターである、核酸。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を含む宿主細胞であって、
好ましくは、前記核酸を発現する、宿主細胞。

【請求項 9】

非グリコシル化ポリペプチドを調製するための方法であって、
a) 請求項 8 に記載の宿主細胞を得るステップと、
b) 前記非グリコシル化ポリペプチドの発現を促進するための条件下で、培養において前記宿主細胞をインキュベートするステップと、
c) 前記宿主細胞から、発現された前記ポリペプチドを精製するステップとを含み、
好ましくは、前記宿主細胞が、真核細胞であり、前記ポリペプチドが、アミノ酸 299 にロイシン置換（T299L）を含む、または
好ましくは、前記宿主細胞が、原核細胞である、方法。

20

【請求項 10】

薬学的に許容される担体中に、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは請求項 7 に記載の核酸を含む医薬品製剤。

30

【請求項 11】

抗体を含む、対象における免疫応答を誘導するための組成物であって、前記抗体が、非グリコシル化されており、かつ請求項 1～4 のいずれか一項に記載の F c ドメインを含む、組成物。

【請求項 12】

前記非グリコシル化抗体が、ヒト C1q に特異的に結合することができる、または
前記非グリコシル化抗体が、ヒト C1q およびヒト活性化 F c 受容体に特異的に結合することができる、

好ましくは、前記非グリコシル化抗体が、グリコシル化された野生型バージョンの抗体の少なくとも 50 分の 1 のレベルで、F c R I I b ポリペプチドに特異的に結合することができる、または

40

前記抗体が、非グリコシル化バージョンの治療抗体である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは請求項 7 に記載の核酸を含む組成物であって、該組成物は、標的細胞に対する補体依存性細胞傷害を誘導することによって対象を処置するための、好ましくは腫瘍を有する対象を処置するための組成物であり、

より好ましくは、前記腫瘍が、固形腫瘍である、または
より好ましくは、前記腫瘍が、血液学的腫瘍である、

50

好ましくは、前記対象が、ヒト患者である、または

好ましくは、前記組成物が、腫瘍内に、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、眼球内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、筋肉内に、皮下に、結膜下、小胞内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、経口によって、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在化灌流によって、カテーテルにより、または洗浄により投与されることを特徴とする、または

好ましくは、前記組成物が、少なくとも第2の抗がん療法と組み合わせて前記対象に投与されることを特徴とし、

さらに好ましくは、前記第2の抗がん療法が、外科療法、化学療法、放射線療法、寒冷療法、ホルモン療法、免疫療法またはサイトカイン療法である、組成物。

10

【請求項14】

前記組成物が、補体依存性細胞傷害を誘導し、

好ましくは、抗体依存性細胞傷害を誘導する、または

好ましくは、抗体依存性細胞傷害を誘導しない、請求項13に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年2月9日に出願された米国仮出願番号第62/113,717号に基づく優先権の利益を主張しており、その全体の内容は参考として本明細書中に援用される。

20

【0002】

(発明の背景)

(1. 発明の分野)

本発明は、全般的には、タンパク質工学の分野に関する。より詳細には、本発明は、野生型Fc抗体ドメインと比べてC1qへの結合増加を付与するFc抗体ドメインを含む組成物に係る。

【背景技術】

【0003】

(2. 関連する技術の説明)

30

現在、上位25種の市販の組換え治療抗体は、\$435億/年をはるかに上回る売上高を有し、これは、2010年から2015年にかけて9.2%の予想年間成長率であり、2015年までに\$627億/年まで増加する見通しである(Elvinら、2013年)。モノクローナル抗体(mAb)は、現在診療所にある組換えタンパク質の大部分を構成し、1064種の製品が、米国またはEUにおいて会社出資の臨床試験を受けており、そのうち164種が第III相にある(Elvinら、2013年)。治療上の焦点の観点から、mAb市場は、腫瘍学、関節炎ならびに免疫および炎症性障害に大きな焦点が置かれており、これらの治療分野内の製品は、予想期間にわたって重要な成長推進力であり続けることになる。遺伝子操作されたmAbはグループとしてみると一般に、小分子薬物よりも高い、FDA承認成功の確率を有する。少なくとも50社のバイオテクノロジー会社およびあらゆる主要な製薬会社で、抗体発見プログラムを積極的に実施している。mAbの単離および産生のための本来の方法は、最初にMilsteinおよびKohlerによって1975年に報告され(KohlerおよびMilstein、1975年)、これは、マウスハイブリドーマを生じるマウスリンパ球および骨髓腫細胞の融合が関与した。治療用マウスmAbは、1980年代初期に臨床研究に入った；しかし、患者がヒト抗マウス抗体(HAMA)を産生することによる、有効性の欠如および急速なクリアランスに伴う問題が明らかとなった。これらの課題と共に、本技術に関して時間と費用がかかることが、mAb産生技術の進化の推進力となった。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、免疫化した動物のリンパ球から直接のモノクローナル抗体遺伝子のクローニングおよび細菌における抗体断片のコンビナトリアルライブラリーの発現を容易にした(Orlandiら、1989年)。より最

40

50

近のライブラリーは、再編成された相補性決定領域3 (CDR3) を有するナイーブ遺伝子を使用して、完全に *in vitro* クローニング技法によって作製された (Griffiths および Duncan、1998 年; Hoogenboom ら、1998 年)。結果として、所望の特異性を有する抗体断片の単離はもはや、対応する抗原の免疫原性に依存しない。さらに、合成コンビナトリアルライブラリーにおける抗原特異性の範囲は、免疫化されたマウスから作製されるハイブリドーマのパネルに見出されるものよりも大きかった。これらの利点は、小分子化合物 (ハプテン) (Hoogenboom および Winter、1992 年)、分子複合体 (Chames ら、2000 年)、不安定な化合物 (Kjaer ら、1998 年) および細胞表面タンパク質 (Desai ら、1998 年) を含む多数の特有の抗原に対する抗体断片の開発を容易にした。微生物細胞において、ディスプレイスクリーニングをフローサイトメトリーによって行うことができる。特に、繫留型ペリプラスム発現 (APEX) は、*E. coli* の内膜の周辺面 (periplasmic face) における抗体断片の繫留に続く、外膜の破壊、蛍光標識された標的とのインキュベーションおよびスフェロプラストの選別に基づく (米国特許第 7,094,571 号)。APEX は、抗体断片の親和性成熟のために使用された (Harvey ら、2004 年; Harvey ら、2006 年)。一研究において、僅か 2 ラウンドのスクリーニングの後に、200 倍を超える親和性改善が得られた。

【0004】

抗体治療薬の効力の根底にある重要な一機構は、2 種のプロセスによる標的抗原 (または細胞) のクリアランスのための Fc 媒介性エフェクター機能である。Fc ドメインは、血清中の可溶性タンパク質および細胞表面における受容体を含む多数のタンパク質に結合する。補体タンパク質 C1q への、病原性標的細胞と免疫複合体を形成した抗体の Fc 領域の結合は、古典的補体活性化カスケードの活性化をもたらす (Walport、2001 年; Janeway ら、2005 年)。これとは別に、Fc ドメインは、白血球の表面において発現された異なる受容体に結合して、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) および抗体依存性細胞ファゴサイトーシス (ADCP) を誘発する。

【0005】

特に、C1q と病原体に結合した抗体との間で複合体を形成した後の古典的経路の活性化は、いくつかの機構を経て病原体排除をもたらす生化学的反応のカスケードを誘発する。第 1 に、細胞膜の完全性を損なう (comprising) ことにより細胞を死滅させる、細胞の表面における膜侵襲複合体 (MAC) の形成。第 2 に、病原体の表面における補体タンパク質の沈着によるオプソニン化と、白血球における補体受容体による補体オプソニンの認識が、補体依存性細胞傷害 (CDC) を誘発する。C1q に対する IgG の低親和性のため、および、いわゆる「古典的」補体経路の活性化に必要な立体構造的変化を惹起するために、C1q が、適切な空間的配向性で (すなわち、免疫複合体として) 複数の IgG 分子に結合するという要件のために、IgG の単一分子は、補体経路を活性化することができない (Walport、2001 年; Janeway ら、2005 年)。

【0006】

ヒトにおいて、IgG サブクラス抗体の Fc ドメインに結合する Fc γR の以下の 2 種の一般クラスが存在する: 細胞質免疫受容体のチロシンベースの活性化モチーフ (ITAM) 配列の存在によって特徴付けられる活性化受容体、および免疫受容体のチロシンベースの阻害性モチーフ (ITIM) 配列の存在によって特徴付けられる阻害性受容体 (Daeron、1997 年; Bolland ら、1999 年)。注目すべきことに、活性化 Fc γR (すなわち、Fc γRI、Fc γRIIA、Fc γRIIIA および Fc γRIIIB) は、活性化または炎症促進性応答を誘導する一方、阻害性受容体 (すなわち、Fc γRIIB) は、抗炎症性応答を誘導する。活性化 ADCC を誘導する抗体の能力は、活性化 Fc γR に対する結合親和性と対阻害性 Fc γRIIIB に対する結合親和性の比に依存する (A/I 比) (Boruchov ら、2005 年; Kalergis ら、2002 年)。Fc γR の多数のアロタイプが公知である。例えば、Fc γRIIA_{H131} アロタイプは、IgG に対して、Fc γRIIA_{R131} アロタイプよりも高い結合親和性を示す一方、Fc γRIIIA_{V158} アロタイプは、活性化および阻害性 Fc γR の両方ならびに C1q に結合する Fc

10

20

30

40

50

R I I I A_{F158} I g G 1 F c ドメインよりも高い結合親和性を示す。対照的に、ヒト I g G 2 アイソタイプ抗体は、C 1 q に弱く結合する（よって、補体活性化の媒介が非常に不良であり、F c R への結合をほとんどまたは全く示さない）。ヒト I g G 3 および I g G 4 アイソタイプ抗体はそれぞれ、I g G 1 に対してより高い C 1 q 結合および C 1 q 結合全く呈さず、概して F c R に対してより弱い親和性を呈する。

【 0 0 0 7 】

I g G 1 における C 1 q および F c R 結合部位は、C 1 q との I g G 1 のドッキングモデルおよび F c R の細胞外ドメインとの F c ドメインの結晶構造に基づき識別された。C 1 q および F c R の両方が、I g G 1 抗体の F c C H 2 ドメインおよび場合によ

ってはヒンジに位置するアミノ酸と主に相互作用する。C 1 q に関して、F a b 腕の配向性がそうであるように、A s p 2 7 0、L y s 3 2 2 および P r o 3 2 9 ~ P r o 3 3 1 が、結合に特に重要である（Gaboriaudら、2 0 0 3 年；Guddatら、1 9 9 3 年）。F c R 結合の観点から、I g G 下部（lower）ヒンジ領域における L e u 2 3 4 ~ S e r 2 3 9 および C H 2 ドメインにおける A s p 2 6 5 ~ S e r 2 6 7 が、特に重要である（Gaboriaudら、2 0 0 3 年；Woofら、2 0 0 4 年）。C H 2 ドメインは、A p n 2 9 7 に 1 個の N - グリコシル化部位を有し、A s n 2 9 7 における N 連結型グリカンは、2 個の C H 2 ドメインの間のギャップを架橋する。この架橋は、C 1 q および F c R への結合のための C H 2 ドメインの適切な立体構造を維持する。他方では、A s n 2 9 7 におけるグリカンの除去は、C H 2 ドメインの立体構造上の柔軟性を増加させ、結果として、非グリコシル化（aglycosylated）F c は、C 1 q および F c R への結合を基本的に示さず、

よって、A D C C および C D C を消失する（Borrokら、2 0 1 2 年）。抗体媒介性補体活性化および C D C は、多数の治療抗体の機能において特に重要である（Rogersら、2 0 1 4 年）。したがって、補体活性化を増加させるための戦略は、多大な注目を集めてきた。例えば、I g G 1 および I g G 3 を含むキメラ I g G 分子（Natsumeら、2 0 0 8 年）は、F c R 結合能に影響を与えることなく、増強された C 1 q 結合を呈し、C D 2 0 + リンパ腫細胞株に向かう増強された C D C 活性をもたらすことが報告された。Dall'Acquaら（2 0 0 6 年）は、ヒト I g G 1 のヒンジ領域におけるアミノ酸置換が、野生型 I g G と比較して、僅かに減少した C D C 活性およびより低い A D C C 活性をもたらしたことを報告した。別の研究では、I g G 1 F c ドメインにおける K 3 2 6 W / E 3 3 3 S 二重変異は、C 1 q への結合の 5 倍増加および C D C の 2 倍増加をもたらした（Idusogieら、2 0 0 1 年）。より最近では、Mooreら（2 0 1 0 年）が、I g G 1

F c ドメインにおける S 2 6 7 E / H 2 6 8 F / S 3 2 4 T 三重変異体が、C 1 q に対する 4 7 倍増強された親和性および C D C における 6 . 9 倍増強された E C₅₀ 値を示したことを報告した。S 2 6 7 E / H 2 6 8 F / S 3 2 4 T 三重変異体はまた、全てではないがいくつかのヒト F c R に対しても親和性増加を示した（Mooreら、2 0 1 0 年）。最後に、Dieboldら（2 0 1 4 年）は、I g G 六量体の形成に好都合な F c ドメインにおける変異、最も注目すべきものとしては E 3 4 5 R 置換が、C D 2 0 + 陽性 D a u d i 細胞に向かう 1 2 倍増強された C D C 有効性を示したことを報告した。しかし、F c R 結合または A D C C における六量体形成の効果は、報告されていない。

E . c o l i は、ジスルフィド結合によるタンパク質のフォールディングに不適な還元性細胞質を保有し、タンパク質は、アンフォールドまたは不正確にフォールドされた状態で蓄積する（BaneyxおよびMujacic、2 0 0 4 年）。細胞質とは対照的に、E . c o l i のペリプラズム（p e r i p l a s m）は、タンパク質ジスルフィド結合の形成を可能にする酸化状態で維持される。注目すべきことに、ペリプラズム発現は、F v、s c F v、F a b または F（a b'）₂ 等、抗体断片の発現に首尾よく用いられてきた（KipriyanovおよびLittle、1 9 9 9 年）。これらの断片は、抗原結合活性を保持しつつ、相対的に迅速に多量に作製することができる。しかし、抗体断片は、F c ドメインを欠くため、F c R n 受容体に結合せず、迅速に除去される；よって、抗体断片は、治療タンパク質としてごく稀にしか適さない（Knightら、1 9 9 5 年）。最近まで、全長抗体は、不溶性凝集塊として E . c o l i 中で発現され、次いで i n v i t r o でリフォールドさせることし

10

20

30

40

50

ができなかった (Bossら、1984年; Cabillyら、1984年)。現在の技術では、数百万または数千万種の抗体を個々にリフォールドすることは不可能なため、明らかにこのアプローチは、抗体ライブラリーのハイスループットスクリーニングには受け入れられない。さらなる問題は、E. coli 発現抗体は、グリコシル化されていないため、新生児Fc受容体 (FcRn) を除いて、補体因子1q (C1q) またはFcおよび他のFc受容体に結合することができないことであり、この結合は、循環におけるIgG抗体の長期持続に決定的である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

10

【特許文献1】米国特許第7,094,571号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Elvinら, Int. J. Pharm., 440:83-98, 2013.

【非特許文献2】KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495-497, 1975.

【非特許文献3】Orlandiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833-3837, 1989.

【非特許文献4】GriffithsおよびDuncan, Curr. Opin. Biotechnol., 9:102-108, 1998.

【非特許文献5】Hoogenboomら, Immunotechnology, 4:1-20, 1998.

20

【非特許文献6】HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381-388, 1992.

【非特許文献7】Chamesら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:7969-7974, 2000.

【非特許文献8】Kjaerら, FEBS Lett., 431:448-452, 1998.

【非特許文献9】Desaiら, Cancer Res., 58:2417-2425, 1998.

【非特許文献10】Harveyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:9193-9198, 2004.

【非特許文献11】Harveyら, J. Immunol. Methods, 308:43-52, 2006.

【非特許文献12】Walport, Complement. First of two parts. N. Engl. J. Med., 344:1058-1066, 2001.

【非特許文献13】Janewayら, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 6th Edition. New York: Garland Publishing, 2005.

30

【非特許文献14】Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234, 1997.

【非特許文献15】BollandおよびRavetch, Adv. Immunol., 72:149-177, 1999.

【非特許文献16】Boruchovら, J. Clin. Invest., 115:2914-2923, 2005.

【非特許文献17】KalergisおよびRavetch, J. Exp. Med., 195:1653-1659, 2002.

【非特許文献18】Gaboriaudら, J. Biol. Chem., 278:46974-46982, 2003.

【非特許文献19】Guddatら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:4271-4275, 1993.

【非特許文献20】Borrokら, ACS Chem. Biol., 7:1596-1602, 2012.

【非特許文献21】Natsumeら, Cancer Res., 68:3863-3872, 2008.

40

【非特許文献22】Dall'Acquaら, J. Immunol., 177:1129-1138, 2006.

【非特許文献23】Idusogieら, J. Immunol., 166:2571-2575, 2001.

【非特許文献24】Mooreら, mAbs, 2:181-189, 2010.

【非特許文献25】Diebolderら, Science, 343:1260-1263, 2014.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本開示は、C1qに対する親和性増加および/またはC1qのみに対する選択性もしくはC1qと活性化Fc受容体への結合に対する選択性を呈するが、FcRIIBには結

50

合しない非グリコシル化 (a g l y c o s y l a t e d) 抗体 F c ドメインが関与する化合物および方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、ヒト I g G 1 抗体由来のバリエーション非グリコシル化 F c ドメイン (「抗体 F c ドメイン」) を有するポリペプチドを含む組成物が提供される。追加的な実施形態では、非グリコシル化 F c ドメインは、C 1 q のみへの高度に選択的な結合を可能にし、エフェクター F c 受容体、すなわち、F c R I 、 F c R I I A 、 F c R I I I A および F c R I I I B のいずれにも結合しない、ヒト I g G 1 F c ドメイン (配列番号 1 ; 配列番号 1 のポジション 1 は、K a b a t における E U 指標のポジション 2 3 1 に対応する) のバリエーションである。他の実施形態では、操作されたバリエーション F c ドメインは、非グリコシル化型で発現された場合およびグリコシル化型で発現された場合の両方で、C 1 q に高度に選択的に結合することができ、エフェクター F c 受容体への結合をほとんどまたは全く呈さない。またさらなる実施形態では、配列番号 1 (野生型ヒト F c ドメイン) と比べて、C 1 q に対し、および活性化型炎症促進性 F c 受容体に対しても親和性増加を呈するが、阻害性受容体 F c R I I B に対しては親和性増加を呈さないバリエーション F c ドメインを含む抗体が提供される。変異し、かつ非グリコシル化された F c ドメインを有するポリペプチドと、グリコシル化された野生型 F c ドメインを有するポリペプチドとの間の相対的結合能は、倍数的な差 (増加または減少) を単位として表現することができる。追加的な実施形態では、操作されたバリエーション F c ドメインは、グリコシル化された野生型 F c ドメインを有するポリペプチドの 1 0 倍以内 ~ 2 5 0 倍の間の、より好ましくは、1 5 0 倍以内 ~ 2 5 0 倍の間の C 1 q に対する親和性増加を呈する。

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、特定のアミノ酸置換を含む非グリコシル化バリエーションヒト F c ドメインを含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、複数のアミノ酸置換が存在する。一部の態様では、C 1 q のみに結合することができ、いかなる F c 受容体にも結合しないバリエーションヒト I g G F c ドメインは、アミノ酸 3 2 0 および 3 8 6 に置換を含むことができる。一部の態様では、C 1 q のみに結合することができ、いかなる F c 受容体にも結合しないバリエーションヒト I g G F c ドメインは、アミノ酸 2 3 5 、 2 3 6 、 2 3 7 および 3 5 1 に置換を含むことができる。一部の態様では、C 1 q および活性化 F c 受容体に結合することができるが、F c R I I B には結合しないバリエーションヒト I g G F c ドメインは、アミノ酸 3 0 8 、 3 3 7 、 3 3 8 、 3 4 0 、 3 4 2 、 3 4 4 、 3 4 5 および 3 7 2 に置換を含むことができる。F c ドメインにおける残基の番号は、K a b a t における E U 指標の番号である。

【 0 0 1 3 】

一部の態様では、バリエーション F c ドメインが、アミノ酸 3 2 0 および 3 8 6 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 3 2 0 における置換は、グルタミン酸 (K 3 2 0 E) であり、アミノ酸 3 8 6 における置換は、アルギニン (Q 3 8 6 R) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインは、F c 8 0 1 (配列番号 7) であり得る。

【 0 0 1 4 】

一部の態様では、バリエーション F c ドメインが、アミノ酸 2 3 5 、 2 3 6 、 2 3 7 および 3 5 1 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 3 5 における置換は、リシン (L 2 3 5 K) であり、アミノ酸 2 3 6 における置換は、メチオニン (G 2 3 6 M) であり、アミノ酸 2 3 7 における置換は、アルギニン (G 2 3 7 R) であり、アミノ酸 3 5 1 における置換は、グルタミン (L 3 5 1 Q) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインは、F c 8 0 2 (配列番号 1 0) であり得る。

【 0 0 1 5 】

一部の態様では、バリエーション F c ドメインが、アミノ酸 3 0 8 、 3 3 7 、 3 3 8 、 3 4 0 、 3 4 2 、 3 4 4 、 3 4 5 および 3 7 2 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 3 0 8 における置換は、アラニン (V 3 0 8 A) であり、アミノ酸 3 3 7 における置換は、プロリ

ン (S 3 3 7 P) であり、アミノ酸 3 3 8 における置換は、グルタミン (K 3 3 8 Q) であり、アミノ酸 3 4 0 における置換は、アルギニン (K 3 4 0 R) であり、アミノ酸 3 4 2 における置換は、プロリン (Q 3 4 2 P) であり、アミノ酸 3 4 4 における置換は、グリシン (R 3 4 4 G) であり、アミノ酸 3 4 5 における置換は、チロシン (E 3 4 5 Y) であり、アミノ酸 3 7 2 における置換は、ロイシン (F 3 7 2 L) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc 8 0 5 (配列番号 2 2) であり得る。

【 0 0 1 6 】

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 2 5 2 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 5 2 における置換は、バリン (M 2 5 2 V) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc - V 1 (配列番号 3 6) であり得る。

10

【 0 0 1 7 】

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 2 4 6、3 2 2 および 4 0 2 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 4 6 における置換は、アスパラギン (K 2 4 6 N) であり、アミノ酸 3 2 2 における置換は、グルタミン酸 (K 3 2 2 E) であり、アミノ酸 4 0 2 における置換は、アスパラギン酸 (G 4 0 2 D) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc - V 1 1 (配列番号 3 7) であり得る。

【 0 0 1 8 】

20

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 3 2 0 および 3 8 6 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 3 2 0 における置換は、グルタミン酸 (K 3 2 0 E) であり、アミノ酸 3 8 6 における置換は、アルギニン (Q 3 8 6 R) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc 8 0 1 (配列番号 7) であり得る。

【 0 0 1 9 】

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 2 4 2、3 1 5、3 3 6、3 4 0、3 4 2、3 7 8 および 3 8 6 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 4 2 における置換は、ロイシン (F 2 4 2 L) であり、アミノ酸 3 1 5 における置換は、セリン (N 3 1 5 S) であり、アミノ酸 3 3 6 における置換は、メチオニン (I 3 3 6 M) であり、アミノ酸 3 4 0 における置換は、アルギニン (K 3 4 0 R) であり、アミノ酸 3 4 2 における置換は、アスパラギン酸 (Q 3 4 2 D) であり、アミノ酸 3 7 8 における置換は、スレオニン (A 3 7 8 T) であり、アミノ酸 3 8 6 における置換は、アルギニン (Q 3 8 6 R) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc - V 1 2 (配列番号 3 8) であり得る。

30

【 0 0 2 0 】

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 3 3 4、3 5 1 および 4 2 1 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 3 3 4 における置換は、グルタミン酸 (K 3 3 4 E) であり、アミノ酸 3 5 1 における置換は、グルタミン (L 3 5 1 Q) であり、アミノ酸 4 2 1 における置換は、アスパラギン酸 (N 4 2 1 D) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc - V 1 5 (配列番号 3 9) であり得る。

40

【 0 0 2 1 】

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 3 4 1 および 3 5 1 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 3 4 1 における置換は、アラニン (G 3 4 1 A) であり、アミノ酸 3 5 1 における置換は、グルタミン (L 3 5 1 Q) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fc ドメインは、Fc - V 1 7 (配列番号 4 0) であり得る。

【 0 0 2 2 】

一部の態様では、バリエーション Fc ドメインが、アミノ酸 2 5 2、3 4 1 および 3 5 1 に

50

アミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 5 2 における置換は、バリン (M 2 5 2 V) であり、アミノ酸 3 4 1 における置換は、アラニン (G 3 4 1 A) であり、アミノ酸 3 5 1 における置換は、グルタミン (L 3 5 1 Q) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリアントヒト Ig G Fc ドメインは、Fc - V 1 8 (配列番号 4 1) であり得る。

【0023】

一部の態様では、バリアント Fc ドメインが、アミノ酸 2 4 6、2 6 0、3 1 5 および 3 8 6 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 4 6 における置換は、グルタミン (K 2 4 6 Q) であり、アミノ酸 2 6 0 における置換は、アラニン (T 2 6 0 A) であり、アミノ酸 3 1 5 における置換は、セリン (N 3 1 5 S) であり、アミノ酸 3 8 6 における置換は、アルギニン (Q 3 8 6 R) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリアントヒト Ig G Fc ドメインは、Fc - V 1 9 (配列番号 4 2) であり得る。

10

【0024】

一部の態様では、バリアント Fc ドメインが、アミノ酸 2 4 6、2 5 2、3 2 2、3 4 4、3 4 5 および 3 7 2 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 4 6 における置換は、アスパラギン (K 2 4 6 N) であり、アミノ酸 2 5 2 における置換は、バリン (M 2 5 2 V) であり、アミノ酸 3 2 2 における置換は、グルタミン酸 (K 3 2 2 E) であり、アミノ酸 3 4 4 における置換は、グリシン (R 3 4 4 G) であり、アミノ酸 3 4 5 における置換は、チロシン (E 3 4 5 Y) であり、アミノ酸 3 7 2 における置換は、ロイシン (F 3 7 2 L) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリアントヒト Ig G Fc ドメインは、Fc - V 2 3 (配列番号 4 3) であり得る。

20

【0025】

一部の態様では、バリアント Fc ドメインが、アミノ酸 2 4 2、2 5 2、3 3 8、3 4 1 および 3 4 5 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 2 4 2 における置換は、ロイシン (F 2 4 2 L) であり、アミノ酸 2 5 2 における置換は、バリン (M 2 5 2 V) であり、アミノ酸 3 3 8 における置換は、グルタミン (K 3 3 8 Q) であり、アミノ酸 3 4 1 における置換は、アラニン (G 3 4 1 A) であり、アミノ酸 3 4 5 における置換は、チロシン (E 3 4 5 Y) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリアントヒト Ig G Fc ドメインは、Fc - V 2 4 (配列番号 4 4) であり得る。

【0026】

一部の態様では、バリアント Fc ドメインが、アミノ酸 3 3 4、4 0 2、3 3 8、3 4 2、3 4 4、3 4 5 および 3 7 2 にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸 3 3 4 における置換は、グルタミン酸 (K 3 3 4 E) であり、アミノ酸 4 0 2 における置換は、アスパラギン酸 (G 4 0 2 D) であり、アミノ酸 3 3 8 における置換は、グルタミン (K 3 3 8 Q) であり、アミノ酸 3 4 2 における置換は、プロリン (Q 3 4 2 P) であり、アミノ酸 3 4 4 における置換は、グリシン (R 3 4 4 G) であり、アミノ酸 3 4 5 における置換は、チロシン (E 3 4 5 Y) であり、アミノ酸 3 7 2 における置換は、ロイシン (F 3 7 2 L) である。ある特定の態様では、非グリコシル化バリアントヒト Ig G Fc ドメインは、Fc - V 2 6 (配列番号 4 5) であり得る。

30

【0027】

一部の態様では、非グリコシル化バリアントヒト Fc ドメインは、アミノ酸 2 9 9 に置換 (例えば、T 2 9 9 L) を含むことができる。

40

【0028】

バリアント Fc ドメインポリペプチドは、無改変ポリペプチド (例えば、野生型 Fc ドメインポリペプチド) または本明細書に開示されているいずれかのポリペプチド配列と比較して、ある特定のパーセンテージの同一性を有すると特徴付けることができる。パーセンテージ同一性は、改変されたポリペプチドの無改変部分 (すなわち、いかなる指定された置換も除外する、改変されたポリペプチドの配列) および対応する野生型ポリペプチドの間で、約少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% (またはそこから導くことができるいずれかの範囲) であり得る。上に記す同一性のパーセンテージが、ポリペプチドの無改

50

変領域と比較した、ポリペプチドの特定の改変された領域に関する場合があることも企図される。例えば、野生型 F c ドメインに対し少なくとも 90 % 同一性を有すると特徴付けられるバリエーション F c ドメインポリペプチドは、そのバリエーションポリペプチドにおけるアミノ酸の少なくとも 90 % が、野生型ポリペプチドにおけるアミノ酸と同一であることを意味する。

【0029】

抗体 F c ドメインは、ヒト I g G 抗体またはそのバリエーションの F c ドメインであり得る。ある特定の態様では、F c ドメインは、抗 H E R 2 抗体（例えば、トラスツズマブ）の F c ドメインまたは抗 C D 20 抗体（例えば、リツキシマブ）の F c ドメイン等、I g G 1 F c ドメインであり得る。ポリペプチドが、抗体分子に由来しないポリペプチドに融合された、本明細書に開示されている操作されたバリエーション F c ドメインの融合体を含むことができることも企図される。

10

【0030】

本明細書に記載されているポリペプチドは、一部の実施形態では、リンカーを含むことができる。さらなる実施形態では、リンカーは、コンジュゲート可能なリンカーである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、抗体に由来する F c ドメインを含有する。これは、別の結合ドメイン等、抗体由来の他の領域を含有することができる。追加的な結合ドメインは、ある特定の実施形態では、F c R 結合ドメインでなくてもよい。一部の実施形態では、これは、抗体由来の抗原結合部位またはドメインを含有することができる。これは、抗体由来の変領域の全体または部分を含むであろう。他の実施形態では、ポリペプチドは、非 F c R 結合ドメインである別の結合ドメインではなく、抗体由来の F c ドメインを含有する。一部の実施形態では、非 F c 結合領域は、抗体の抗原結合部位ではなく、細胞表面タンパク質または可溶性タンパク質に特異的に結合する。場合によっては、非 F c 結合領域が認識する細胞表面タンパク質は、受容体である。

20

【0031】

他のポリペプチドは、C 1 q ポリペプチドに結合することができる非グリコシル化 F c ドメインと、非 F c 受容体結合ドメインである第 2 の結合ドメインとを有するようなポリペプチドを含み、第 2 の結合ドメインは、細胞表面分子または可溶性タンパク質に特異的に結合することができる。一部の実施形態では、第 2 の結合ドメインは、抗体の抗原結合ドメイン（「I g 可変ドメイン」）である。一部の態様では、ポリペプチドは、全長抗体であり得る。場合によっては、第 2 の結合ドメインは、抗体抗原結合ドメインではない。一部の実施形態では、第 2 の結合ドメインは、タンパク質性分子である細胞表面分子に特異的に結合することができる。一部の態様では、第 2 の結合ドメインは、可溶性タンパク質に特異的に結合することができる。

30

【0032】

実施形態は、本明細書に記すポリペプチドのいずれかをコードする核酸にも関係する。核酸は、単離することができ、そして / または組換体であり得る。これは、単離され、そして / または組換体である核酸セグメントであり得る。一部の実施形態では、核酸は、DNA であるが、他方では、RNA である。ある特定の実施形態では、核酸は、DNA セグメントである。他の実施形態では、核酸は、ヒト C 1 q に特異的に結合する 1 個または複数の置換を有する F c 結合ドメインを有するポリペプチドのいずれかを発現することができる発現ベクターである。核酸は、ポリペプチドが産生される仕方に応じてグリコシル化されていていなくてもよい、上に記す 1 種または複数のポリペプチドをコードすることができる。

40

【0033】

一部の実施形態では、ヒト C 1 q に特異的に結合することができる F c ドメインを有するポリペプチドをコードする核酸が存在する。核酸は、ポリペプチド、特に、非グリコシル化バージョンのポリペプチドを発現することができる宿主細胞に入れることができる。宿主細胞は、細菌細胞等、原核細胞であり得る。あるいは、宿主細胞は、哺乳動物細胞等、真核細胞であり得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、第 1 の発現ベクターを含有す

50

るが、同様に第2の発現ベクターを含むこともできる。一部の抗体は、複数のポリペプチドで構成されているため、一部の実施形態では、これらの複数のポリペプチドを発現する宿主細胞が企図される。例えば、一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードする第2の発現ベクターを含む宿主細胞が存在する。

【0034】

一部の実施形態では、宿主細胞の集団が存在し、この集団は、異なるFcドメインを有するポリペプチドを発現する複数の宿主細胞を含有する。任意の2種の異なるFcドメインのアミノ酸配列が、同一性において20%未満、15%、10%、5%またはそれ未満異なることが企図される。

【0035】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド（非グリコシル化Fc領域を有するポリペプチド）を作製する方法、ならびにこれらのポリペプチドを使用する方法が存在する。本明細書に記載されているポリペプチドのいずれかに関して、これらの方法のいずれを実行することもできる。

【0036】

一部の実施形態では、非グリコシル化ポリペプチドを調製するための方法であって、a) C1qに結合することができるFcドメインを含む非グリコシル化ポリペプチドを発現することができる宿主細胞を得るステップと、b) 非グリコシル化ポリペプチドの発現を促進するための条件下で、培養において宿主細胞をインキュベートするステップと、c) 宿主細胞から、発現されたポリペプチドを精製するステップとを含む方法が存在する。一部の実施形態では、宿主細胞は、細菌細胞等、原核細胞である。他の実施形態では、宿主細胞は、真核細胞であり、ポリペプチドは、T299L置換を含む。さらなる実施形態では、方法は、上清からの発現されたポリペプチドの収集が関与し、これは、精製に先立ち行うことができる。

【0037】

一部の実施形態では、方法は、上清からのポリペプチドの精製が関与する。これは、上清由来のポリペプチドを、濾過、HPLC、アニオンもしくはカチオン交換、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、親和性クロマトグラフィーまたはこれらの組合せに付することが関与し得る。一部の実施形態では、方法は、IgG Fc領域に結合するブドウ球菌プロテインAを使用した親和性クロマトグラフィーが関与する。他の精製方法は、当業者

【0038】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体中に本実施形態のポリペプチドまたは核酸を含む医薬品製剤が提供される。

【0039】

一部の実施形態では、対象に抗体を与えるステップを含む、対象における免疫応答を誘導する方法であって、抗体が、非グリコシル化されており、本実施形態のFcドメインを含む、方法が提供される。一部の態様では、非グリコシル化抗体は、ヒトC1qに特異的に結合することができる場合がある。一部の態様では、非グリコシル化抗体は、ヒトC1qおよびヒト活性化Fc受容体に特異的に結合することができる場合がある。ある特定の態様では、非グリコシル化抗体は、グリコシル化された野生型バージョンの抗体の少なくとも50分の1のレベルで、FcRIIBポリペプチドに特異的に結合することができる場合がある。一部の態様では、抗体は、非グリコシル化バージョンの治療抗体であり得る。

【0040】

さらなる実施形態では、Fcバリエーションを含むポリペプチドによって誘導することができる白血病細胞死は、野生型ヒトIgG Fc領域を含むポリペプチドによって誘導される白血病細胞死と比較して増強される。さらにさらなる実施形態では、本発明に係るポリペプチドは、野生型ヒトIgG Fc領域を含むポリペプチドによって誘導されるCDCと比較して、強く増強されたCDCを示す。さらにさらなる実施形態では、本発明に係る

10

20

30

40

50

ポリペプチドは、野生型ヒト IgG 抗体と比較して、ADCC または ADCCP を示さないかも知れない。

【0041】

さらなる実施形態では、本明細書で企図されるバリエーション Fc ポリペプチドを含む抗体によって標的にされる細胞の死滅は、野生型ヒト IgG Fc 領域を含むポリペプチドによって誘導される白血病細胞死と比較して増強される。さらにさらなる実施形態では、本発明に係るポリペプチドは、野生型ヒト IgG Fc 領域を含むポリペプチドによって誘導される CDC と比較して、強く増強された CDC を示す。

【0042】

一実施形態では、腫瘍を有する対象を処置するための方法であって、有効量の本実施形態の医薬品製剤を対象に投与するステップを含む方法が提供される。一部の態様では、本方法は、補体依存性細胞傷害を誘導することができる。一部の態様では、本方法は、抗体依存性細胞傷害を誘導することができる。他の態様では、本方法は、抗体依存性細胞傷害を誘導しないかも知れない。一部の態様では、腫瘍は、固形腫瘍または血液学的腫瘍であり得る。ある特定の態様では、対象は、ヒト患者であり得る。一部の態様では、医薬品製剤は、腫瘍内に、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、眼球内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、筋肉内に、皮下に、結膜下、小胞内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、経口によって、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在化灌流によって、カテーテルにより、または洗浄により投与することができる。一部の態様では、本方法は、例えば、外科療法、化学療法、放射線療法、寒冷療法、ホルモン療法、免疫療法またはサイトカイン療法等、少なくとも第2の抗がん療法を対象に投与するステップをさらに含むことができる。

【0043】

一実施形態では、疾患の処置における使用のための、本実施形態のバリエーション Fc ドメインまたは本実施形態のバリエーション Fc ドメインをコードする核酸を含む組成物が提供される。前記疾患は、標的細胞に対する補体依存性細胞傷害を誘導することによって処置される疾患であり得る。一部の態様では、疾患は、がんであり得る。別の実施形態では、がん等の疾患の処置のための医薬品の製造における本実施形態に係るポリペプチドまたは本実施形態に係るポリペプチドをコードする核酸の使用が提供される。

【0044】

本明細書において使用する場合、「を基本的に含まない」は、指定された構成成分に関して、指定された構成成分のいずれも、組成物において意図的に製剤化されていない、および/またはそれが単なる夾雑物としてもしくは微量で存在することを意味するように本明細書で使用されている。組成物のいずれかの意図されない混入に起因する指定された構成成分の総量は、したがって、0.05%をはるかに下回り、好ましくは0.01%を下回る。指定された構成成分の量を標準分析方法により検出することができない組成物が最も好ましい。

【0045】

本明細書において使用する場合、用語「親和性」は、2種の作用物質の可逆的結合の平衡定数を指し、 K_D として表現される。その標的に対する結合ドメインの親和性は、例えば、約100ナノモル濃度(nM)~約0.1nM、約100nM~約1ピコモル濃度(pM)または約100nM~約1フェムトモル濃度(fM)であり得；あるいは、これは、100nM~1nMの間または0.1nM~10nMの間であり得る。さらに、2種の作用物質の間に上に記す親和性範囲内の親和性が存在する場合、作用物質同士が特異的に結合することが企図される。

【0046】

本明細書において使用する場合、核酸に関連する用語「コードする」または「コード化すること」は、当業者が本発明を容易に理解できるようにするために使用され；しかし、これらの用語は、それぞれ「を含む」または「を含むこと」と互換的に使用することがで

10

20

30

40

50

きる。

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用する場合、「を基本的に含まない」は、指定された構成成分の観点から、指定された構成成分のいずれも、組成物において意図的に製剤化されていない、および／またはそれが単なる夾雑物としてもしくは微量で存在することを意味するように本明細書で使用されている。組成物のいずれかが意図されない混入に起因する指定された構成成分の総量は、したがって、0.05%をはるかに下回り、好ましくは、0.01%を下回る。指定された構成成分の量を標準分析方法により検出することができない組成物が最も好ましい。

【 0 0 4 8 】

本明細書において、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1または複数を意味することができる。本明細書の請求項(単数または複数)において使用する場合、単語「を含む(comprising)」と併せて使用される場合、単語「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1または2以上を意味することができる。

【 0 0 4 9 】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、選択肢のみを指すことまたは選択肢が相互排他的であることを明確に示さない限り、「および／または」を意味するように使用されているが、本開示は、選択肢のみおよび「および／または」を指す規定を支持する。本明細書において使用する場合、「別の」は、少なくとも第2のまたはそれを超える数のものを意味することができる。

【 0 0 5 0 】

本願を通して、用語「約」は、値が、この値の決定に用いられている装置、方法に固有の誤差変動、または研究対象の間に存在する変動を含むことを示すように使用されている。

【 0 0 5 1 】

本発明の他の目的、特色および利点は、次の詳細な説明から明らかである。しかし、本発明の精神および範囲内の様々な変更および修正が、この詳細な説明から当業者に明らかであり得るため、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、単なる例示として提示されていることを理解されたい。

【 0 0 5 2 】

以下の図は本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、これらの図の1つまたは複数を本明細書で提示されている特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することによって、よりよく理解することができる。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

ヒトC1qに結合することができる非グリコシル化バリエーションヒトIgG Fcドメインを含むポリペプチドであって、前記Fcドメインが、(a)308、337、338、340、342、344、345および372；(b)320および386；(c)235、236、237および351；(d)246、322および402；(e)242、315、336、340、342、378および386；(f)334、351および421；(g)341および351；(h)252、341および351；(i)246、260、315および386；(j)246、252、322、344、345および372；(k)242、252、338、341および345；ならびに(l)334、402、338、342、344、345および372からなる群から選択されるアミノ酸置換を含み、前記Fcドメインにおける前記残基のナンバリングが、KabatatにおけるEU指標のナンバリングであるポリペプチド。

(項目2)

ヒトC1qの結合に特異的な親和性を有する、項目1に記載のポリペプチド。

(項目3)

10

20

30

40

50

F c 受容体に検出可能に結合しない、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 4)

ヒト C 1 q および活性化 F c 受容体の結合に特異的な親和性を有する、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 5)

F c R I I b に検出可能に結合しない、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 6)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 K 3 2 0 E および Q 3 8 6 R を含む、項目 2 に記載のポリペプチド。

(項目 7)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c 8 0 1 (配列番号 7) である、項目 6 に記載のポリペプチド。

(項目 8)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 L 2 3 5 K、G 2 3 6 M、G 2 3 7 R および L 3 5 1 Q を含む、項目 2 に記載のポリペプチド。

(項目 9)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c 8 0 2 (配列番号 1 0) である、項目 8 に記載のポリペプチド。

(項目 1 0)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 V 3 0 8 A、S 3 3 7 P、K 3 3 8 Q、K 3 4 0 R、Q 3 4 2 P、R 3 4 4 G、E 3 4 5 Y および F 3 7 2 L を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 1 1)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c 8 0 5 (配列番号 2 2) である、項目 1 0 に記載のポリペプチド。

(項目 1 2)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 M 2 5 2 V を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 1 3)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c - V 1 (配列番号 3 6) である、項目 1 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 4)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 G 4 3 1 A および L 3 5 1 Q をさらに含む、項目 1 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 5)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c - V 1 8 (配列番号 4 1) である、項目 1 4 に記載のポリペプチド。

(項目 1 6)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 K 2 4 6 N、K 3 2 2 E、R 3 4 4 G、E 3 4 5 Y および F 3 7 2 L をさらに含む、項目 1 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 7)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c - V 2 3 (配列番号 4 3) である、項目 1 6 に記載のポリペプチド。

(項目 1 8)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、置換 F 2 4 2 L、K 3 3 8 Q、G 3 4 1 A および E 3 4 5 Y をさらに含む、項目 1 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 9)

前記非グリコシル化バリエーションヒト I g G F c ドメインが、F c - V 2 4 (配列番号 4 4) である、項目 1 8 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

(項目 2 0)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、置換 K 2 4 6 N、K 3 2 2 E および G 4 0 2 D を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 2 1)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、Fc - V 1 1 (配列番号 3 7) である、項目 2 0 に記載のポリペプチド。

(項目 2 2)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、置換 F 2 4 2 L、N 3 1 5 S、I 3 3 6 M、K 3 4 0 R、Q 3 4 2 D、A 3 7 8 T および Q 3 8 6 R を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

10

(項目 2 3)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、Fc - V 1 2 (配列番号 3 8) である、項目 2 2 に記載のポリペプチド。

(項目 2 4)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、置換 K 3 3 4 E、L 3 5 1 Q および N 4 2 1 D を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 2 5)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、Fc - V 1 5 (配列番号 3 9) である、項目 2 4 に記載のポリペプチド。

(項目 2 6)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、置換 G 3 4 1 A および L 3 5 1 Q を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

20

(項目 2 7)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、Fc - V 1 7 (配列番号 4 0) である、項目 2 6 に記載のポリペプチド。

(項目 2 8)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、置換 K 2 4 6 Q、T 2 6 0 A、N 3 1 5 S および Q 3 8 6 R を含む、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 2 9)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、Fc - V 1 9 (配列番号 4 2) である、項目 2 8 に記載のポリペプチド。

30

(項目 3 0)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、置換 K 3 3 4 E、G 4 0 2 D、K 3 3 8 Q、Q 3 4 2 P、R 3 3 4 G、E 3 4 5 Y および F 3 7 2 L を含む、請求項 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 1)

前記非グリコシル化バリエーションヒト IgG Fcドメインが、Fc - V 2 6 (配列番号 4 5) である、項目 3 0 に記載のポリペプチド。

(項目 3 2)

アミノ酸 2 9 9 におけるロイシン置換 (T 2 9 9 L) をさらに含む、項目 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

(項目 3 3)

非 Fc 受容体 (非 FcR) 結合ドメインをさらに含む、項目 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 3 4)

前記非 FcR 結合ドメインが、Ig 可変ドメインである、項目 3 3 に記載のポリペプチド。

(項目 3 5)

全長抗体としてさらに規定されている、項目 3 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 6)

50

前記非 F c R 結合領域が、抗体の抗原結合部位ではない、項目 3 3 に記載のポリペプチド。

(項目 3 7)

前記非 F c R 結合領域が、細胞表面タンパク質に結合する、項目 3 3 に記載のポリペプチド。

(項目 3 8)

前記非 F c R 結合領域が、可溶性タンパク質に結合する、項目 3 3 に記載のポリペプチド。

(項目 3 9)

項目 1 ~ 3 8 に記載のポリペプチドのいずれかをコードする核酸。

10

(項目 4 0)

DNA セグメントである、項目 3 9 に記載の核酸。

(項目 4 1)

発現ベクターである、項目 3 9 に記載の核酸。

(項目 4 2)

項目 3 9 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の核酸を含む宿主細胞。

(項目 4 3)

前記核酸を発現する、項目 4 2 に記載の宿主細胞。

(項目 4 4)

非グリコシル化ポリペプチドを調製するための方法であって、

20

a) 項目 4 3 に記載の宿主細胞を得るステップと、

b) 前記非グリコシル化ポリペプチドの発現を促進するための条件下で、培養において前記宿主細胞をインキュベートするステップと、

c) 前記宿主細胞から、発現された前記ポリペプチドを精製するステップとを含む方法。

(項目 4 5)

前記宿主細胞が、真核細胞であり、前記ポリペプチドが、アミノ酸 2 9 9 にロイシン置換 (T 2 9 9 L) を含む、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記宿主細胞が、原核細胞である、項目 4 4 に記載の方法。

30

(項目 4 7)

薬学的に許容される担体中に、項目 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは項目 3 9 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の核酸を含む医薬品製剤。

(項目 4 8)

対象に抗体を与えるステップを含む、対象における免疫応答を誘導する方法であって、前記抗体が、非グリコシル化されており、かつ項目 1 に記載の F c ドメインを含む、方法。

(項目 4 9)

前記非グリコシル化抗体が、ヒト C 1 q に特異的に結合することができる、項目 4 8 に記載の方法。

40

(項目 5 0)

前記非グリコシル化抗体が、ヒト C 1 q およびヒト活性化 F c 受容体に特異的に結合することができる、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記非グリコシル化抗体が、グリコシル化された野生型バージョンの抗体の少なくとも 5 0 分の 1 のレベルで、F c R I I b ポリペプチドに特異的に結合することができる、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記抗体が、非グリコシル化バージョンの治療抗体である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 3)

50

腫瘍を有する対象を処置する方法であって、有効量の項目 4 7 に記載の製剤を前記対象に投与するステップを含む方法。

(項目 5 4)

補体依存性細胞傷害を誘導する、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

抗体依存性細胞傷害を誘導する、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

抗体依存性細胞傷害を誘導しない、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記腫瘍が、固形腫瘍である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記腫瘍が、血液学的腫瘍である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記対象が、ヒト患者である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記製剤が、腫瘍内に、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、眼球内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、筋肉内に、皮下に、結膜下、小胞内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、経口によって、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在化灌流によって、カテーテルにより、または洗浄により投与される、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 6 1)

少なくとも第 2 の抗がん療法を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記第 2 の抗がん療法が、外科療法、化学療法、放射線療法、寒冷療法、ホルモン療法、免疫療法またはサイトカイン療法である、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

疾患の処置における使用のための、項目 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 6 4)

前記疾患が、標的細胞に対する補体依存性細胞傷害を誘導することによって処置される疾患である、項目 6 3 に記載のポリペプチド。

(項目 6 5)

前記疾患が、がんである、項目 6 4 に記載のポリペプチド。

(項目 6 6)

がん等の疾患の処置のための医薬の調製における、項目 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図 1】 図 1 A ~ B。トラスツズマブ軽鎖 (図 1 A) およびトラスツズマブ重鎖 (図 1 B) の細菌ペリプラズムディスプレイのための 2 つのプラスミド系の簡単なスキーム。

【0054】

【図 2】 変異 F c ポリペプチドのライブラリーを構築するための特定の戦略の簡単なスキーム。

【0055】

【図 3 A】 図 3 A ~ D。C 1 q または F c R I I I a を用いた標識条件を確認するための F A C S 解析。図 3 A は、C 1 q - P E を P B S 中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化 E . c o l i 細胞それぞれの F A C S スキャン結果を示す。図 3 B は、抗 L P S 抗体 - P E を P B S 中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化 E . c o l i

10

20

30

40

50

細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Cは、高塩緩衝液中のC1q-PEを用いたFACSスキャン結果を示す。図3Dは、FcRIIIa-SA-PEを用いたスフェロプラスト化E.coli細胞のFACSスキャン結果を示す。各パネルの平均蛍光強度を表3に提示する。

【図3B】図3A～D。C1qまたはFcRIIIaを用いた標識条件を確認するためのFACS解析。図3Aは、C1q-PEをPBS中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化E.coli細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Bは、抗LPS抗体-PEをPBS中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化E.coli細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Cは、高塩緩衝液中のC1q-PEを用いたFACSスキャン結果を示す。図3Dは、FcRIIIa-SA-PEを用いたスフェロプラスト化E.coli細胞のFACSスキャン結果を示す。各パネルの平均蛍光強度を表3に提示する。

10

【図3C】図3A～D。C1qまたはFcRIIIaを用いた標識条件を確認するためのFACS解析。図3Aは、C1q-PEをPBS中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化E.coli細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Bは、抗LPS抗体-PEをPBS中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化E.coli細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Cは、高塩緩衝液中のC1q-PEを用いたFACSスキャン結果を示す。図3Dは、FcRIIIa-SA-PEを用いたスフェロプラスト化E.coli細胞のFACSスキャン結果を示す。各パネルの平均蛍光強度を表3に提示する。

20

【図3D】図3A～D。C1qまたはFcRIIIaを用いた標識条件を確認するためのFACS解析。図3Aは、C1q-PEをPBS中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化E.coli細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Bは、抗LPS抗体-PEをPBS中で標識した場合の、示されたスフェロプラスト化E.coli細胞それぞれのFACSスキャン結果を示す。図3Cは、高塩緩衝液中のC1q-PEを用いたFACSスキャン結果を示す。図3Dは、FcRIIIa-SA-PEを用いたスフェロプラスト化E.coli細胞のFACSスキャン結果を示す。各パネルの平均蛍光強度を表3に提示する。

【0056】

【図4】図4A～B。Fcライブラリー選別および再選別後の、C1qに結合する高親和性クローンの富化を示すFACS解析ヒストグラム。図4Aは、7ラウンドのライブラリー選別および再選別のそれぞれの後の、細胞のC1q-PE結合強度を示す。第1ラウンドを例外として、各ヒストグラムにおいて、一番右のピークは「選別後」条件を表す。図4Bは、7ラウンドのライブラリー選別および再選別の間のライブラリーのC1q-PEまたはFcRIIIa-SA-PE結合強度を示す。各ヒストグラムの一番右のピークは「選別後」条件を表す。

30

【0057】

【図5】FACSを使用した、22種の単離されたIgGバリエーションのC1q-PEまたはFcRIIIa-SA-PEに対する結合解析。左側のヒストグラムは、単離されたIgGバリエーションのC1qに対するC1q結合強度を示す。右側のヒストグラムは、単離されたIgGバリエーションのFcRIIIa-SA-PEに対するFcRIIIa-SA-PE結合強度を示す。平均蛍光強度を表4に列挙する。

40

【0058】

【図6】図6A～B。野生型IgG、リツキシマブ、および選択されたIgGバリエーションRAI（抗CD20リツキシマブFabおよび非グリコシル化Fc802）、RAII（抗CD20リツキシマブFabおよび非グリコシル化Fc801）、およびRAIII（抗CD20リツキシマブFabおよび非グリコシル化Fc805）の精製後の、還元条件下（図6A）または非還元条件下（図6B）でのSDS-PAGE解析。M：タンパク質サイズマーカー；1：リツキシマブ；2：RAI；3：RAII；3：RAIII。

【0059】

50

【図 7】溶液中に単量体として存在する精製された I g G バリエントを確認するためのサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 解析。

【 0 0 6 0 】

【図 8 A】図 8 A ~ F。非グリコシル化リツキシマブ (A g l y c o I g G 1)、グリコシル化リツキシマブ (G l y c o I g G 1)、および選択された I g G バリエント R A I、R A I I、および R A I I I の、F c R；単量体 F c R I (図 8 A)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 8 B)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 8 C)、二量体 F c R I I b (図 8 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 8 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 8 F) に対する E L I S A 結果。

【図 8 B】図 8 A ~ F。非グリコシル化リツキシマブ (A g l y c o I g G 1)、グリコシル化リツキシマブ (G l y c o I g G 1)、および選択された I g G バリエント R A I、R A I I、および R A I I I の、F c R；単量体 F c R I (図 8 A)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 8 B)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 8 C)、二量体 F c R I I b (図 8 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 8 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 8 F) に対する E L I S A 結果。

【図 8 C】図 8 A ~ F。非グリコシル化リツキシマブ (A g l y c o I g G 1)、グリコシル化リツキシマブ (G l y c o I g G 1)、および選択された I g G バリエント R A I、R A I I、および R A I I I の、F c R；単量体 F c R I (図 8 A)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 8 B)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 8 C)、二量体 F c R I I b (図 8 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 8 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 8 F) に対する E L I S A 結果。

【図 8 D】図 8 A ~ F。非グリコシル化リツキシマブ (A g l y c o I g G 1)、グリコシル化リツキシマブ (G l y c o I g G 1)、および選択された I g G バリエント R A I、R A I I、および R A I I I の、F c R；単量体 F c R I (図 8 A)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 8 B)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 8 C)、二量体 F c R I I b (図 8 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 8 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 8 F) に対する E L I S A 結果。

【図 8 E】図 8 A ~ F。非グリコシル化リツキシマブ (A g l y c o I g G 1)、グリコシル化リツキシマブ (G l y c o I g G 1)、および選択された I g G バリエント R A I、R A I I、および R A I I I の、F c R；単量体 F c R I (図 8 A)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 8 B)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 8 C)、二量体 F c R I I b (図 8 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 8 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 8 F) に対する E L I S A 結果。

【図 8 F】図 8 A ~ F。非グリコシル化リツキシマブ (A g l y c o I g G 1)、グリコシル化リツキシマブ (G l y c o I g G 1)、および選択された I g G バリエント R A I、R A I I、および R A I I I の、F c R；単量体 F c R I (図 8 A)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 8 B)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 8 C)、二量体 F c R I I b (図 8 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 8 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 8 F) に対する E L I S A 結果。

【 0 0 6 1 】

【図 9 A】図 9 A ~ D。リツキシマブ、R A I、R A I I、R G I、および R G I I の C 1 q に対する動態学的性質および表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラム。図 9 A ~ D は、リツキシマブ (図 9 A)、R A I (図 9 B)、R A I I (図 9 C)、および R G I I (図 9 D) の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 5 に提示する。

【図 9 B】図 9 A ~ D。リツキシマブ、R A I、R A I I、R G I、および R G I I の C 1 q に対する動態学的性質および表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラム。図 9 A ~ D は、リツキシマブ (図 9 A)、R A I (図 9 B)、R A I I (図 9 C)、および R G I I (図 9 D) の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 5 に提示する。

【図 9 C】図 9 A ~ D。リツキシマブ、RAI、RAII、RGI、および R G I I の C 1 q に対する動態学的性質および表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラム。図 9 A ~ D は、リツキシマブ (図 9 A)、RAI (図 9 B)、RAII (図 9 C)、および R G I I (図 9 D) の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 5 に提示する。

【図 9 D】図 9 A ~ D。リツキシマブ、RAI、RAII、RGI、および R G I I の C 1 q に対する動態学的性質および表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラム。図 9 A ~ D は、リツキシマブ (図 9 A)、RAI (図 9 B)、RAII (図 9 C)、および R G I I (図 9 D) の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 5 に提示する。

10

【 0 0 6 2 】

【図 1 0】R G I I の F c R I との結合動態学的性質および表面プラズモン共鳴 (S P R) センサーグラム。R G I I の単量体 F c R I に対する動態学的値を表 6 に要約する。

【 0 0 6 3 】

【図 1 1 A】図 1 1 A ~ F。RAIIII の C 1 q および F c R に対する S P R 結果。図 1 1 A ~ F は、RAIIII の S P R センサーグラムを示す；C 1 q (図 1 1 A)、単量体 F c R I (図 1 1 B)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 1 1 C)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 1 1 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 1 1 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 1 1 F)。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 8 に提示する。

20

【図 1 1 B】図 1 1 A ~ F。RAIIII の C 1 q および F c R に対する S P R 結果。図 1 1 A ~ F は、RAIIII の S P R センサーグラムを示す；C 1 q (図 1 1 A)、単量体 F c R I (図 1 1 B)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 1 1 C)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 1 1 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 1 1 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 1 1 F)。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 8 に提示する。

【図 1 1 C】図 1 1 A ~ F。RAIIII の C 1 q および F c R に対する S P R 結果。図 1 1 A ~ F は、RAIIII の S P R センサーグラムを示す；C 1 q (図 1 1 A)、単量体 F c R I (図 1 1 B)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 1 1 C)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 1 1 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 1 1 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 1 1 F)。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 8 に提示する。

30

【図 1 1 D】図 1 1 A ~ F。RAIIII の C 1 q および F c R に対する S P R 結果。図 1 1 A ~ F は、RAIIII の S P R センサーグラムを示す；C 1 q (図 1 1 A)、単量体 F c R I (図 1 1 B)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 1 1 C)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 1 1 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 1 1 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 1 1 F)。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 8 に提示する。

【図 1 1 E】図 1 1 A ~ F。RAIIII の C 1 q および F c R に対する S P R 結果。図 1 1 A ~ F は、RAIIII の S P R センサーグラムを示す；C 1 q (図 1 1 A)、単量体 F c R I (図 1 1 B)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 1 1 C)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 1 1 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 1 1 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 1 1 F)。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 8 に提示する。

40

【図 1 1 F】図 1 1 A ~ F。RAIIII の C 1 q および F c R に対する S P R 結果。図 1 1 A ~ F は、RAIIII の S P R センサーグラムを示す；C 1 q (図 1 1 A)、単量体 F c R I (図 1 1 B)、二量体 F c R I I a_{H 1 3 1} (図 1 1 C)、二量体 F c R I I a_{R 1 3 1} (図 1 1 D)、二量体 F c R I I I a_{V 1 5 7} (図 1 1 E)、および二量体 F c R I I I a_{F 1 5 7} (図 1 1 F)。S P R センサーグラム解析からの詳細な動態学的値を表 8 に提示する。

50

態学的値を表 8 に提示する。

【 0 0 6 4 】

【図 1 2】正常ヒト血清および C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として使用した、I g G バリエーションの補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 1 に示す。

【 0 0 6 5 】

【図 1 3】正常ヒト血清および A L L 患者由来の初代細胞を使用した、I g G バリエーションの C D C アッセイ。各バリエーションについてのカラムは、左から右に、1 0 0 n M の I g G ; 1 0 n M の I g G ; および 1 n M の I g G を表す。

【 0 0 6 6 】

【図 1 4】正常ヒト血清および C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として使用した、プレインキュベートした I g G バリエーションの C 1 q との C D C アッセイ。各 I g G バリエーションについてのカラムは、左から右に、1 0 0 n M の I g G 、1 0 0 n M の I g G + 1 0 0 n M の C 1 q ; 1 0 n M の I g G ; 1 0 n M の I g G + 1 0 n M の C 1 q ; 1 n M の I g G ; および 1 n M の I g G + 1 n M の C 1 q である。

【 0 0 6 7 】

【図 1 5 A】図 1 5 A ~ B。C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および P B M C (図 1 5 A) または P M N (図 1 5 B) を使用した、I g G バリエーションの A D C C アッセイ。三角形：アイソタイプ対照；薄い灰色の四角：リツキシマブ；ひし形：R A I ; 丸；R A I I ; 濃い灰色の四角：R A I I I 。

【図 1 5 B】図 1 5 A ~ B。C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および P B M C (図 1 5 A) または P M N (図 1 5 B) を使用した、I g G バリエーションの A D C C アッセイ。三角形：アイソタイプ対照；薄い灰色の四角：リツキシマブ；ひし形：R A I ; 丸；R A I I ; 濃い灰色の四角：R A I I I 。

【 0 0 6 8 】

【図 1 6】正常なヒト血液、および C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として使用した、I g G バリエーションの全血アッセイ。各 I g G の濃度についてのカラムは、左から右に、アイソタイプ対照、リツキシマブ、R A I 、R A I I 、および R A I I I を表す。

【 0 0 6 9 】

【図 1 7】N O D - S C I D - I L 2 R ^{-/-} マウスにおける、R a j i 細胞を用いた、リツキシマブおよび R A I I の *i n v i v o* 有効性の評価。

【 0 0 7 0 】

【図 1 8 A】図 1 8 A ~ D。p H 6 . 0 または p H 7 . 4 における R A I および R A I I の F c R n に対する S P R 結果。図 1 8 A ~ C は、p H 6 . 0 におけるリツキシマブ (図 1 8 A) 、R A I (図 1 8 B) 、および R A I I (図 1 8 C) の S P R センサーグラムを示す。図 1 8 D は、p H 7 . 4 におけるリツキシマブ、R A I 、および R A I I の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析の詳細な動態学的値を表 7 に提示する。

【図 1 8 B】図 1 8 A ~ D。p H 6 . 0 または p H 7 . 4 における R A I および R A I I の F c R n に対する S P R 結果。図 1 8 A ~ C は、p H 6 . 0 におけるリツキシマブ (図 1 8 A) 、R A I (図 1 8 B) 、および R A I I (図 1 8 C) の S P R センサーグラムを示す。図 1 8 D は、p H 7 . 4 におけるリツキシマブ、R A I 、および R A I I の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析の詳細な動態学的値を表 7 に提示する。

【図 1 8 C】図 1 8 A ~ D。p H 6 . 0 または p H 7 . 4 における R A I および R A I I の F c R n に対する S P R 結果。図 1 8 A ~ C は、p H 6 . 0 におけるリツキシマブ (図 1 8 A) 、R A I (図 1 8 B) 、および R A I I (図 1 8 C) の S P R センサーグラムを示す。図 1 8 D は、p H 7 . 4 におけるリツキシマブ、R A I 、および R A I I の S P R センサーグラムを示す。S P R センサーグラム解析の詳細な動態学的値を表 7 に提示する。

10

20

30

40

50

【図18D】図18A～D。pH6.0またはpH7.4におけるRAIおよびRAIIのFcRnに対するSPR結果。図18A～Cは、pH6.0におけるリツキシマブ(図18A)、RAI(図18B)、およびRAII(図18C)のSPRセンサーグラムを示す。図18Dは、pH7.4におけるリツキシマブ、RAI、およびRAIIのSPRセンサーグラムを示す。SPRセンサーグラム解析の詳細な動態学的値を表7に提示する。

【0071】

【図19】RAIIIライブラリーの富化を示すFACS解析ヒストグラム。1ラウンド目および4ラウンド目に、ライブラリーを発現レベルによってスクリーニングした。2ラウンド目、3ラウンド目、および5ラウンド目に、ライブラリーをFcRIIIaによってスクリーニングした。

10

【0072】

【図20】FACSを使用した、RAIII-Fcライブラリーから単離された10種のIgGバリエーションの結合解析。左側のヒストグラムは、FITCでの抗c-myc IgGによる発現レベルを示す。第2のヒストグラムは、C1q結合強度を示す。第3のヒストグラムは、FcRIIIa-GST-PE結合強度を示す。第4のヒストグラムは、FcRIIb-GST-PE結合強度を示す。平均蛍光強度を表10に列挙する。

【0073】

【図21】各抗体オプソニン化CD20陽性Raji細胞におけるC1q結合解析。C1qを各抗体オプソニン化CD20陽性Raji細胞と一緒にインキュベートした後、C1q結合強度を抗C1q-FITC抗体によって検出した。

20

【0074】

【図22】RAIIによるCD20陽性DAUDIおよびDB細胞におけるC3b沈着アッセイ。寄託されたC3bをFITC-mAb-7C12(抗C3bマウスIgG)によって検出した。

【0075】

【図23】液相補体活性化アッセイ。腫瘍細胞の非存在下での補体活性化を、C4d濃度を測定することによって決定した。C4d濃度をELISA(MicroVue C4d EIA kit, Quidel Corporation, San Diego, US)において製造者の説明書に従って測定した。

30

【0076】

【図24】正常ヒト血清、およびCD20陽性Ramos細胞を標的として使用した、IgGバリエーションの補体依存性細胞傷害(CDC)アッセイ。EC₅₀値および変化倍率を表11に示す。

【0077】

【図25A】図25A～D。CD20陽性Raji細胞を標的として、およびPBMC(図25A)もしくはPMN(図25B)を使用した、または、CD20陽性Ramos細胞を標的として、およびPBMC(図25C)もしくはPMN(図25D)を使用した、IgGバリエーションのCDCアッセイ。EC₅₀値および変化倍率を表12に示す。

【図25B】図25A～D。CD20陽性Raji細胞を標的として、およびPBMC(図25A)もしくはPMN(図25B)を使用した、または、CD20陽性Ramos細胞を標的として、およびPBMC(図25C)もしくはPMN(図25D)を使用した、IgGバリエーションのCDCアッセイ。EC₅₀値および変化倍率を表12に示す。

40

【図25C】図25A～D。CD20陽性Raji細胞を標的として、およびPBMC(図25A)もしくはPMN(図25B)を使用した、または、CD20陽性Ramos細胞を標的として、およびPBMC(図25C)もしくはPMN(図25D)を使用した、IgGバリエーションのCDCアッセイ。EC₅₀値および変化倍率を表12に示す。

【図25D】図25A～D。CD20陽性Raji細胞を標的として、およびPBMC(図25A)もしくはPMN(図25B)を使用した、または、CD20陽性Ramos細胞を標的として、およびPBMC(図25C)もしくはPMN(図25D)を使用した、

50

I g G バリエントの C D C C アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 2 に示す。

【 0 0 7 8 】

【図 2 6】C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および M 1 - マクロファージを使用した、I g G バリエントの C D C P アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 3 に示す。

【 0 0 7 9 】

【図 2 7 A】図 2 7 A ~ D。C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 A) もしくは P M N (図 2 7 B) を使用した、または、C D 2 0 陽性 R a m o s 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 C) もしくは P M N (図 2 7 D) を使用した、I g G バリエントの C M C アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 4 に示す。

10

【図 2 7 B】図 2 7 A ~ D。C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 A) もしくは P M N (図 2 7 B) を使用した、または、C D 2 0 陽性 R a m o s 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 C) もしくは P M N (図 2 7 D) を使用した、I g G バリエントの C M C アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 4 に示す。

【図 2 7 C】図 2 7 A ~ D。C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 A) もしくは P M N (図 2 7 B) を使用した、または、C D 2 0 陽性 R a m o s 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 C) もしくは P M N (図 2 7 D) を使用した、I g G バリエントの C M C アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 4 に示す。

【図 2 7 D】図 2 7 A ~ D。C D 2 0 陽性 R a j i 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 A) もしくは P M N (図 2 7 B) を使用した、または、C D 2 0 陽性 R a m o s 細胞を標的として、および P B M C (図 2 7 C) もしくは P M N (図 2 7 D) を使用した、I g G バリエントの C M C アッセイ。E C ₅₀ 値および変化倍率を表 1 4 に示す。

20

【 0 0 8 0 】

【図 2 8 A】図 2 8 A ~ B。T M D 8 (図 2 8 A) またはおよび H B L - 1 (図 2 8 B) における F c R I I b 媒介性内部移行アッセイ。腫瘍細胞と一緒に 0 時間、2 時間、4 時間、および 6 時間インキュベートした後、腫瘍細胞表面に結合した抗体を抗ヒト F c - F I T C によって検出した。

【図 2 8 B】図 2 8 A ~ B。T M D 8 (図 2 8 A) またはおよび H B L - 1 (図 2 8 B) における F c R I I b 媒介性内部移行アッセイ。腫瘍細胞と一緒に 0 時間、2 時間、4 時間、および 6 時間インキュベートした後、腫瘍細胞表面に結合した抗体を抗ヒト F c - F I T C によって検出した。

30

【 0 0 8 1 】

【図 2 9】C 5 7 B L / 6 J マウスにおけるアナフィラキシーアッセイ。熱凝集した抗体をマウス (n = 3) に注射し、5 分毎に深部体温を検出した。

【 0 0 8 2 】

【図 3 0】ヌードマウスにおける、R a m o s 細胞を用いた、R A I I の i n v i v o 有効性の評価。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 3 】

(例示的な実施形態の説明)

40

C 1 q への改善された結合を呈する操作された抗体 F c ドメインを有するポリペプチドが関与する方法および組成物が、本明細書に提供されている。かかるポリペプチドは、ネイティブ F c ドメイン (配列番号 1) と比較して 1 個または複数の置換を含む、非グリコシル化 F c ドメインを含むことができる。その上、一部の F c ドメインは、C 1 q に、または C 1 q およびある特定の F c 受容体に選択的に結合することができるが、他の F c 受容体には結合しない。例えば、ポリペプチドは、C 1 q に選択的に結合するが、いかなる F c R にも検出可能に結合しない非グリコシル化 F c ドメインを含むことができる。C 1 q および活性化 F c R に選択的に結合するが、阻害性 F c R I I b には検出可能に結合しない非グリコシル化 F c ドメインを含む、別のポリペプチドを提供することができる。C 1 q および活性化 F c R の一部または全てに選択的に結合するが、阻害性 F c

50

R I I Bには検出可能に結合しないグリコシル化されたF cドメインを含む、さらに別のポリペプチドを提供することができる。さらに、改変された非グリコシル化抗体を使用して、補体依存性細胞傷害(C D C)および抗体依存性細胞傷害(A D C C)を促進するための方法および組成物が提供される。

【0084】

I . 補体依存性細胞傷害

抗体が、認識した標的細胞を死滅させる重要な機構の1つは、補体系のタンパク質の動員および活性化によるものである。病原性細胞に対する免疫複合体は、抗体分子のF cドメインに結合する補体タンパク質C 1 qによって認識される。病原性細胞に結合された抗体のF cドメインおよびC 1 qの間の複合体は、補体膜侵襲複合体(M A C)により直接、または細胞表面に補体分子C 3 bを沈着させ、次いでこれが、病原性細胞に破壊の「合図を出す(flag)」ことにより細胞を死滅させる、生化学的反応のカスケードを活性化する。抗体が、補体活性化により病原性細胞を死滅させるプロセスは、補体依存性細胞傷害(C D C)と呼ばれる。

【0085】

C D Cの効力は、C 1 qに結合する抗体の能力に依存する。続いてこの能力は、抗体のF cドメインおよびC 1 qの間の相互作用に依存する。この相互作用は通常、F cポリペプチドに付加された単一の糖鎖が除去された場合、すなわち、非グリコシル化(a g l y c o s y l a t e d)抗体において、完全に消失される。

【0086】

しかし、タンパク質工学を使用して、C 1 qに結合するだけではなく、ヒトグリコシル化F c対応物よりもはるかに高い親和性でC 1 qに結合するF cドメインを作製した。さらにより注目すべきことには、このF cドメインは、C 1 qに特異的である。通常、I g G F cドメインは、白血球の表面における種々のF c受容体タンパク質に結合する。F cドメインとのF c受容体の結合は、病原性細胞のクリアランスに一般に役立つ、免疫学的効果をもたらす一連のシグナル伝達事象を誘発する。しかし、例えば、隣接する細胞におけるF c受容体への、がん細胞の表面における抗体分子の結合が、がん細胞表面分子のクラスター形成と、続いて増殖するようにがん細胞へとシグナル伝達を媒介する場合など、F c受容体の会合が有害であることがある。よって、F c受容体に結合することなく、C D Cによりがん細胞死滅のみを誘導することができるF cドメインは、ある特定の抗体薬物の治療効力を大幅に増強することができる。

【0087】

I I . 抗体F cドメイン

ある特定の実施形態では、ネイティブまたは野生型タンパク質と比べて改変されたタンパク質性分子を含む組成物が存在する。一部の実施形態では、このタンパク質性化合物は、アミノ酸残基が欠失されている；他の実施形態では、タンパク質性化合物のアミノ酸残基は、置き換えられている；一方、なおさらなる実施形態では、タンパク質性化合物におけるアミノ酸残基の欠失および置き換えの両方がなされている。さらに、タンパク質性化合物は、2個以上のポリペプチド実体を含むアミノ酸分子を含むことができる。本明細書において使用する場合、「タンパク質性分子」、「タンパク質性組成物」、「タンパク質性化合物」、「タンパク質性鎖」または「タンパク質性材料」は、約200アミノ酸を超えるタンパク質もしくは遺伝子から翻訳された全長内在性配列；100アミノ酸もしくはそれを超えるポリペプチド；および/または3~100アミノ酸のペプチドを一般に指すが、これらに限定されない。上述のあらゆる「タンパク質性」用語は、本明細書において互換的に使用することができる；しかし、実施形態が、ポリペプチド等、特定の種類のタンパク質性化合物に限定され得ることが特に企図される。さらに、これらの用語は、融合タンパク質またはタンパク質コンジュゲートにも同様に適用することができる。タンパク質は、2個以上のポリペプチドを含むことができる。例えば、I g G抗体は、ジスルフィド結合により互いに繋がれた2本の重鎖ポリペプチドおよび2本の軽鎖ポリペプチドを有する。

【0088】

本明細書において使用する場合、タンパク質またはペプチドは、約200アミノ酸を超えるタンパク質から、遺伝子から翻訳された全長配列まで；約100アミノ酸を超えるポリペプチド；および/または約3～約100アミノ酸のペプチドを一般に指すが、これらに限定されない。便宜上、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において互換的に使用される。

【0089】

本明細書において使用する場合、「アミノ酸残基」は、当業者に公知であろういずれかのアミノ酸、アミノ酸誘導体またはアミノ酸模倣物を指す。ある特定の実施形態では、タンパク質性分子の残基は、アミノ酸残基の配列を中断するいかなる非アミノ酸残基も含まず連続的である。他の実施形態では、配列は、1個または複数の非アミノ酸部分を含むことができる。特定の実施形態では、タンパク質性分子の残基の配列は、1個または複数の非アミノ酸部分で中断されていてよい。

【0090】

本明細書において使用する場合、「別個のFcドメイン」は、別のFcと僅か1個のアミノ酸が異なるドメインとして規定することができる。別個の抗体Fcドメインまたは抗体をコードする核酸のライブラリーを作製するための方法は、本技術分野で周知である。例えば、場合によっては、Fcドメインは、エラープローンPCRによって増幅することができる。さらに、ある特定の事例において、複数の抗体Fcドメインは、ランダム化されたひと続き(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれを超える)のアミノ酸を含むことができる。ある特定の事例において、特異的な変異が、Fcドメインに操作され得る。例えば、一部の態様では、抗体Fcドメインにおける正常にグリコシル化された残基が変異されていてよい。さらに、ある特定の態様では、正常にグリコシル化された残基(または隣接する残基)は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれを超えるアミノ酸の挿入のための部位として使用することができる。

【0091】

ポリペプチドは、FcRポリペプチドに結合することができる非グリコシル化抗体Fcドメインを含むことができる。一部の態様では、非グリコシル化Fcドメインは、生理的条件下でFcRポリペプチドに特異的な親和性を有するとさらに規定することができる。例えば、Fcドメインは、生理的条件下で約 10^{-6} M～約 10^{-9} Mの間の平衡解離定数を有することができる。さらに、一部の態様では、非グリコシル化Fcドメインは、ヒト野生型配列等の野生型配列と比べて、1個または複数のアミノ酸置換または挿入を含むと規定することができる。

【0092】

かかるポリペプチドを調製する手段は、参照により本明細書に組み込むPCT公開WO 2008/137475に記される手段を含む。あるいは、例えば、公知のFcバックグラウンドに選択されたアミノ酸置換または挿入を導入することによる等、遺伝子工学技法によって直接的にかかるポリペプチドを調製することができ、挿入または置換は、上に記す通り、非グリコシル化Fc領域に改善されたFcR結合能をもたらす。一部の実施形態では、Fcドメインは、1種または複数の特異的なFc受容体に結合するように操作されている。その上またはそれに代えて、Fcドメインは、1種または複数の特異的なFc受容体に特異的に結合しないように、操作され得る。

【0093】

一部の実施形態では、非グリコシル化Fcドメインは、ヒトFcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、FcRI等FcRにまたはC1qに特異的な結合親和性を含む。よって、一部の態様では、本発明の非グリコシル化Fcドメインは、C1qに特異的な親和性を有するFcドメインとして規定される。他の態様では、本発明の非グリコシル化Fcドメインは、C1qおよび活性化Fc受容体に特異的な親和性を有するが、阻害性FcRIIbに対する親和性がないFcドメインとして規定される。抗体Fcまたは他の結合タンパク質の結合親和性

は、例えば、MunsonおよびPollard(1980年)のスキャッチャード(Scatchard)解析によって決定することができる。あるいは、結合親和性は、表面プラズモン共鳴またはタンパク質：タンパク質相互作用の動態および平衡定数を決定するための他のいずれかの周知の方法によって決定することができる。

【0094】

野生型Fc(配列番号1)と比べて示す変化と共に、C1qに特異的な親和性を有する単離されたIgGバリエーションのFcドメインのアミノ酸配列を次に示す：Fc701(配列番号2；D270H；E382V；M428I；L443P；S444V)、Fc702(配列番号3；L351Q)、Fc703(配列番号4；E233L；G236E；V240A；F275Y；V303A；L351Q)、Fc704(配列番号5；E233L；G236E；V240A；F275Y；V303A)、Fc705(配列番号6；G237V；E318G；L328P；I336F；S337L；K338S；A339V；K340L；G341R；Q342L；R344L；R355Q；D356G)、Fc801(配列番号7；K320E；Q386R)、Fc707(配列番号8；L251F；V262M；S267G；P291S；I336L；S337A；K338H；K340R；Q342P；L368P；F372L；W381R；N421S)、Fc708(配列番号9；L309Q；L328P；L368P；H429L；E430G)、Fc802(配列番号10；L235K；G236M；G237R；L351Q)、Fc710(配列番号11；L234I；L235V；S267G；K338I；K340R；Q342P；F404S；K439R)、Fc711(配列番号12；D270G；I336R；K340R；Q342P；R344L；E345D；R416G)、およびFc712(配列番号13；E382V；M428I)。

【0095】

野生型Fc(配列番号1)と比べて示す変化と共に、C1qおよび活性化Fc受容体に特異的な親和性を有するが、阻害性FcRIIbに対する親和性がない単離されたIgGバリエーションのFcドメインのアミノ酸配列を次に示す：Fc713(配列番号14；E233D；L234Y；L235Q；G236K；G237R；T250A；I253V；D265G；H285L；N297S；K338P；A339Y；G341R；Q342K；E345A；K360R；Q418R；T437A)、Fc714(配列番号15；E233D；L234Y；L235Q；G236K；G237R；I253V；N297S；K338P；A339Y；G341R；Q342K；E345A；K360R)、Fc715(配列番号16；E233D；L234Y；L235Q；G236K；G237R；P238L；I253V；D270N；T307P；N315I；L328P；Q342H；T350P；V379A；E388G；Q419R)、Fc716(配列番号17；E233D；L234Y；L235Q；G236K；G237R；I253V；K326R；F372C；D401G；F404L；L406F；K414R；Y436C)、Fc717(配列番号18；E233G；L234P；L235P；G236R)、Fc719(配列番号19；L235M；G236W；G237R；V240I；V263M；K290E；S324P；T350A；C425Y)、Fc803(配列番号20；T299K；S354P；P445S)、Fc720(配列番号21；M252V；N315S；I336M；K340R；Q342D)、Fc805(配列番号22；V308A；S337P；K338Q；K340R；Q342P；R344G；E345Y；F372L)、Fc722(配列番号23；G236W；G237L；V284E；I332V；I336A；K340E；P343L；R344S；T394P)、Fc-V1(配列番号36；M252V)、Fc-V11(配列番号37；K246N；K322E；G402D)、Fc-V12(配列番号38；F242L；N315S；I336M；K340R；Q342D；A378T；Q386R)、Fc-V15(配列番号39；K334E；L351Q；N421D)、Fc-V17(配列番号40；G341A；L351Q)、Fc-V18(配列番号41；M252V；G341A；L351Q)、Fc-V19(配列番号42；K246Q；T260A；N315S；Q386R)；Fc-V

2 3 (配列番号 4 3 ; K 2 4 6 N ; M 2 5 2 V ; K 3 2 2 E ; R 3 4 4 G ; E 3 4 5 Y ; F 3 7 2 L) ; F c - V 2 4 (配列番号 4 4 ; F 2 4 2 L ; M 2 5 2 V ; K 3 3 8 Q ; G 3 4 1 A ; E 3 4 5 Y) ; および F c - V 2 6 (配列番号 4 5 ; K 3 3 4 E ; G 4 0 2 D ; K 3 3 8 Q ; Q 3 4 2 P ; R 3 4 4 G ; E 3 4 5 Y ; F 3 7 2 L) 。

【 0 0 9 6 】

本明細書において使用される「ポジション」とは、タンパク質の配列中の位置を意味する。ポジションは、連続的に、または確立されたフォーマット、例えば、抗体ナンバリングのための E U 指標に従ってナンバリングすることができる。

【 0 0 9 7 】

本発明に記す全ポジションに関して、ナンバリングは、E U 指標に従う。「E U 指標」または「K a b a t における E U 指標」または「E U ナンバリングスキーム」は、E U 抗体のナンバリングを指す (Edelman ら、1969 年 ; Kabat ら、1991 年 ; どちらもその全体を参照により本明細書に組み込む)。よって、配列番号 1 に提示する配列のポジション 1 は、K a b a t における E U 指標のポジション 2 3 1 に対応する。

【 0 0 9 8 】

ある特定の実施形態では、少なくとも 1 種の F c ポリペプチドタンパク質性分子のサイズは、約または少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000 またはそれを超えるアミノ分子残基、およびそこから導くことができるいずれかの範囲を含むことができるがこれらに限定されない。化合物は、配列番号 1 (ヒト I g G F c ポリペプチド) または配列番号 2 ~ 23 由来の上述の数の連続アミノ酸を含むことができ、これらは、配列番号 1 (下に記す) に対しパーセント同一性または相同性を有するとさらに認定することができる。

【 0 0 9 9 】

A . 改変されたタンパク質およびポリペプチド

一部の実施形態は、改変されたタンパク質およびポリペプチド、特に、無改変バージョンに匹敵する少なくとも 1 種の機能活性を示す改変されたタンパク質またはポリペプチドに関係し、さらに、改変されたタンパク質またはポリペプチドは、C D C を誘発すること、産生がより容易もしくはより安価であること、より少ない副作用を誘発すること、および / またはより優れたもしくはより長い有効性もしくはバイオアベイラビリティを有すること等、無改変バージョンを上回る追加的な利点を保有する。よって、本願が、「改変されたタンパク質」または「改変されたポリペプチド」の機能または活性について言う場合、当業者であれば、これが、例えば、1) 無改変タンパク質またはポリペプチドと同じ活性のうち少なくとも 1 種を実行する、または同じ特異性のうち少なくとも 1 種を有するが、別の活性または特異性の異なるレベルを有することができ ; 2) 無改変タンパク質またはポリペプチドを上回る追加的な利点を保有する、タンパク質またはポリペプチドを含むことを理解するであろう。活性の決定は、特に、タンパク質の活性に関する、当業者によく知られたアッセイを使用して達成することができ、比較目的で、例えば、改変または無改変タンパク質またはポリペプチドのいずれかのネイティブおよび / または組換えバージョンの使用を含むことができる。「改変されたタンパク質」に関係する実施形態を、「改変されたポリペプチド」に関して実行することができ、逆もまた同じであることが特に企図される。本明細書に記す改変されたタンパク質およびポリペプチドに加えて、実施形態は、特に参照により本明細書に組み込む P C T 公開 W O 2 0 0 8 / 1 3 7 4 7 5 に記載されているドメイン、ポリペプチドおよびタンパク質が関与することができる。

【 0 1 0 0 】

改変されたタンパク質は、アミノ酸の欠失および / または置換を保有することができ ;

10

20

30

40

50

よって、欠失を有するタンパク質、置換を有するタンパク質ならびに欠失および置換を有するタンパク質は、改変されたタンパク質である。一部の実施形態では、これらの改変されたタンパク質は、例えば、融合タンパク質またはリンカーを有するタンパク質による等、挿入または付加されたアミノ酸をさらに含むことができる。これは、標的化ペプチドもしくはポリペプチドまたは単に単一残基の挿入を含むことができる。融合タンパク質と呼ばれる末端付加については、下に記す。

【0101】

「改変された欠失されたタンパク質」は、ネイティブタンパク質の1個または複数の残基を欠くが、ネイティブタンパク質の特異性および/または活性を保有する。「改変された欠失されたタンパク質」は、低下した免疫原性または抗原性を有することもできる。改変された欠失されたタンパク質の例は、少なくとも1種の抗原性領域（すなわち、改変されたタンパク質を投与され得る生物の種類等、特定の生物において抗原性であると決定されたタンパク質の領域）からアミノ酸残基を欠失したタンパク質である。

10

【0102】

置換または置き換えバリエーションは典型的には、タンパク質内の1個または複数の部位においてあるアミノ酸から別のアミノ酸への交換を含有し、ポリペプチドの1種または複数の特性、特に、そのエフェクター機能および/またはバイオアベイラビリティをモジュレートするように設計することができる。置換は、保存的であってもそうでなくてもよい、つまり、あるアミノ酸が、同様の形状および電荷のアミノ酸に置き換えられる。保存的置換は、本技術分野で周知であり、例えば、次の変化を含む：アラニンからセリン；アルギニンからリシン；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジン；アスパラギン酸からグルタミン酸；システインからセリン；グルタミンからアスパラギン；グルタミン酸からアスパラギン酸；グリシンからプロリン；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミン；イソロイシンからロイシンまたはバリン；ロイシンからバリンまたはイソロイシン；リシンからアルギニン；メチオニンからロイシンまたはイソロイシン；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニン；セリンからスレオニン；スレオニンからセリン；トリプトファンからチロシン；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニン；およびバリンからイソロイシンまたはロイシン。

20

【0103】

用語「生物学的に機能的等価」は、本技術分野で十分に理解されており、本明細書で詳細にさらに規定されている。したがって、タンパク質の生物学的活性が維持されるのであれば、ネイティブポリペプチドのアミノ酸と同一または機能的に等価なアミノ酸の約70%～約80%の間または約81%～約90%の間またはさらには約91%～約99%の間を有する配列が含まれる。改変されたタンパク質は、そのネイティブ対応物と生物学的に機能的に等価であり得る。

30

【0104】

配列が、タンパク質発現が関係する生物学的タンパク質活性の維持を含む、上に表記されている基準を満たす限りにおいて、アミノ酸および核酸配列が、追加的なNもしくはC末端アミノ酸または5'もしくは3'配列等、追加的な残基を含み、依然として基本的に、本明細書に開示されている配列の1種に表記される通りのものであることも理解されるであろう。末端配列の付加は、特に、例えば、コード領域の5'もしくは3'部分のいずれかに隣接する様々な非コード配列を含むことができる、または様々な内部配列、すなわち、遺伝子内で生じることが公知のイントロンを含むことができる、核酸配列に適用される。

40

【0105】

次に、等価なまたはさらには改善された第二世代分子を作製するためのタンパク質のアミノ酸の変化に基づく記述を示す。例えば、ある特定のアミノ酸は、例えば、基質分子への結合部位等の構造との相互作用的結合能の認識できる損失を伴いまたは伴うことなく、タンパク質構造における他のアミノ酸に代えて置換することができる。タンパク質の生物学的機能活性を規定するのは、そのタンパク質の相互作用的能力および性質であるため、

50

タンパク質配列およびその根底にあるDNAコード配列においてある特定のアミノ酸置換をなすことができ、そうであるにもかかわらず、同様の特性を有するタンパク質を産生することができる。よって、下に記す通り、その生物学的有用性または活性の認識できる損失を伴うことなく、遺伝子のDNA配列において様々な変化をなすことができることが企図される。次の「相同性基準」のうち1つが満たされる場合、タンパク質性分子は、第2のタンパク質性分子と「相同性」を有する、またはそれと「相同」であると考慮される：1) タンパク質性分子の少なくとも30%が、第2のタンパク質性分子と同じポジションにおいて配列同一性を有する；2) 第2のタンパク質性分子と同じポジションにおいてある程度の配列同一性があり、非同一残基において、その少なくとも30%が、第2のタンパク質性分子に対して、本明細書に記載されている保存的な差である；または3) タンパク質性分子の少なくとも30%が、第2のタンパク質性分子と配列同一性を有するが、非同一残基の間に非同一残基のギャップがあり得る。本明細書において使用する場合、用語「相同」は、分子全体の代わりに、タンパク質性分子の領域に等しく適用することができる。用語「相同性」または「相同」が、数、例えば、「50%相同性」または「50%相同」によって認定される場合、1)、2) および3) に関する相同性基準は、「少なくとも30%」から「少なくとも50%」に調整される。よって、2種のタンパク質性分子またはタンパク質性分子の部分の間に、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれを超える相同性が存在し得ることが企図される。

【0106】

あるいは、改変されたポリペプチドは、配列番号1～23のいずれかを含む、無改変ポリペプチドまたは本明細書に開示されているいずれかのポリペプチド配列に対し、ある特定のパーセンテージの同一性を有すると特徴付けることができる。パーセンテージ同一性は、2種のタンパク質性分子またはタンパク質性分子の部分の間で、多くてもまたは少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%（またはそこから導くことができるいずれかの範囲）であり得る。上に記す同一性のパーセンテージが、ポリペプチドの無改変領域と比較して、ポリペプチドの特定の領域に関係し得ることが企図される。例えば、ポリペプチドは、同じ種由来の無改変または変異体Fcドメインに対する改変されたまたは変異体Fcドメインのアミノ酸配列の同一性に基づき特徴付けされ得る改変されたまたは変異体Fcドメインを含有することができる。例えば、無改変Fcドメインに対し90%同一性を有すると特徴付けされた改変されたまたは変異体ヒトFcドメインは、そのドメインにおけるアミノ酸の90%が、無改変ヒトFcドメイン（配列番号1）におけるアミノ酸と同一であることを意味する。

【0107】

かかる変化を生じる際に、アミノ酸の疎水性親水性指標(hydrophobic index)を考慮することができる。タンパク質における相互作用の生物学的機能の付与における疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、本技術分野で一般に理解される(KyteおよびDoolittle、1982年)。アミノ酸の相対的疎水性親水性特徴が、その結果得られるタンパク質の二次構造に寄与し、続いてこれが、他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原等とのタンパク質の相互作用を規定することが受け入れられる。

【0108】

本技術分野において、同様のアミノ酸の置換を親水性に基づいて有効になすことができることも理解される。参照により本明細書に組み込む米国特許第4,554,101号は、その隣接アミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所的平均親水性が、タンパク質の生物学的特性と相関することを記述する。米国特許第4,554,101号に詳述される通り、次の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン(+3.0)；リシン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；スレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.

5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; バリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; トリプトファン (- 3 . 4) 。 あるアミノ酸を、同様の親水性値を有する別のアミノ酸に代えて置換し、生物学的に等価かつ免疫学的に等価なタンパク質を依然として産生することができることが理解される。かかる変化において、その親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、 ± 0.5 以内であるものがさらにより特に好ましい。

【0109】

上に概要を述べる通り、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基、例えば、その疎水性、親水性、電荷、サイズ等の相対的類似性に基づく。様々な前述の特徴を考慮に入れる例示的な置換は、当業者に周知であり、次のものを含む：アルギニンおよびリシン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン。

【0110】

B. 異種領域により改変された抗体およびタンパク質性化合物

Fcドメインが単離されると、分子を少なくとも1種の作用物質に連結して、この分子の有用性を増強するためのコンジュゲートを形成することが望ましいことがある。例えば、診断または治療作用物質としてのFcドメインまたは抗体分子の有効性を増加させるために、従来、少なくとも1種の所望の分子または部分を連結または共有結合または複合体形成させる。かかる分子または部分は、少なくとも1種のエフェクターまたはレポーター分子であってよいがこれらに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば、細胞傷害活性を有する分子を含む。抗体に取り付けられたエフェクター分子の非限定例として、毒素、抗腫瘍剤、治療用酵素、放射標識ヌクレオチド、抗ウイルス剤、キレート剤、サイトカイン、増殖因子およびオリゴまたはポリヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出され得るいずれかの部分として規定される。抗体にコンジュゲートされたレポーター分子の非限定例として、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子またはビオチン等のリガンドが挙げられる。別のかかる例は、細胞傷害性または抗細胞剤に連結された抗体を含むコンジュゲートの形成であり、「免疫毒素」と命名することができる。かかる分子を標識するための技法は、当業者に公知であり、本明細書に上述されている。

【0111】

次いで、本発明に従って調製されたFcドメイン等、標識されたタンパク質を、例えば、タンパク質（単数または複数）、ポリペプチド（単数または複数）またはペプチド（単数または複数）等、生物学的構成成分を結合、精製、除去、定量化および/または他の仕方一般に検出するための免疫検出方法において用いることもできる。一部の免疫検出方法は、いくつか挙げると、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫放射線アッセイ、フルオロイムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイおよびウエスタンブロットを含む。様々な有用な免疫検出方法のステップは、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込むDoolittleおよびBen-Zeev、1999年；GulbisおよびGaland、1993年；ならびにDe Jagerら、1993年等、科学文献に記載されている。

【0112】

抗体を含むFcドメイン分子は、例えば、免疫組織化学検査（IHC）による研究のために調製された新鮮凍結したおよび/またはホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織ブロックの両方と併せて使用することができる。このような粒子状検体から組織ブロックを調製する方法は、様々な予後因子の以前のIHC研究において首尾よく使用された、および/または当業者に周知である（Abbondanzoら、1990年）。

【0113】

一部の実施形態は、2種以上の天然起源またはネイティブポリペプチドまたはタンパク

10

20

30

40

50

質由来のアミノ酸配列を含むことができるFcポリペプチドタンパク質性化合物に係る。上に記す実施形態は、本セクションへの適用が企図され、逆もまた同じである。例えば、改変された抗体は、抗原結合ドメインを有する改変されたFcドメインを含有する抗体である。さらに、抗体は、2本の重鎖のそれぞれにおける異なる領域等、2個の異なる抗原結合領域を有することができる。それに代えてまたはその上、一部の実施形態では、複数の異種ペプチドおよび/またはポリペプチドを含むポリペプチドが存在する（「異種」は、これらが同じポリペプチドに由来しないことを意味する）。タンパク質性化合物または分子は、例えば、抗体に由来しないタンパク質結合領域を有する改変されたFcドメインを含むことができる。一部の実施形態では、細胞表面受容体に結合するタンパク質結合領域を有する改変されたFcドメインを含むポリペプチドが存在する。複数の機能ドメインを含むこれらのタンパク質性分子は、互いに化学的にコンジュゲートされた2個もしくはそれを超えるドメインであり得る、または同じ核酸分子によってコードされた2個もしくはそれを超えるポリペプチドの融合タンパク質であり得る。タンパク質またはポリペプチドが、2個またはそれを超える異種ポリペプチドの全体または部分を含むことができることが企図される。

10

【0114】

よって、マルチポリペプチドタンパク質性化合物は、第1のポリペプチドの全体または部分と、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、第4のポリペプチド、第5のポリペプチド、第6のポリペプチド、第7のポリペプチド、第8の(eight)ポリペプチド、第9のポリペプチド、第10のポリペプチドまたはさらに高次のポリペプチドの全体または部分とで構成され得る。

20

【0115】

選択的に切断可能なリンカー、合成リンカーまたは他のアミノ酸配列等、アミノ酸を使用して、タンパク質性部分を分離することができる。

【0116】

抗体の抗原結合ドメインまたは領域および非グリコシル化Fcドメインを有するポリペプチドまたはタンパク質（抗体を含む）は、次の標的リストに属するタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフおよび/またはエピトープが挙げられるがこれらに限定されない、いずれかの抗原またはエピトープに対して使用することができる：17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-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、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、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、ARC、ART、アルテミン(Artemin)、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Ax1、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(Osteogenin)、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)、BMP、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)、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カ

30

40

50

テブシンC / DPP I、カテブシンD、カテブシンE、カテブシンH、カテブシンL、カ
 テブシンO、カテブシンS、カテブシンV、カテブシンX / ZIP、CBL、CCI、C
 CK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL
 15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CC
 L21、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、CD3
 E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、C
 D11c、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、CD4
 0、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、C
 D55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80 (B7 - 1)
 、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD14
 6、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、c
 GMP、CINC、Clostridium botulinum毒素、Clostridi
 um perfringens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、CXCL
 2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、C
 XCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、
 CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR
 4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR
 3、DC - SIGN、崩壊促進因子、デス (1 - 3) - IGF - I (脳IGF - 1)、D
 hh、ジゴキシン、DNAM - 1、Dnase、Dpp、DPP IV / CD26、Dtk
 、ECAD、EDA、EDA - A1、EDA - A2、EDAR、EGF、EGFR (Er
 bB - 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、EP
 O、ERCC、E - セレクチン、ET - 1、第IIa因子、第VII因子、第VIIIC
 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、FGF、FGF - 19、FGF - 2、FGF3、FGF - 8、FGF
 R、FGFR - 3、フィブリン、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、FZ
 D6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP - 2
 、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF - 1、GDF - 3 (Vgr - 2)、GDF
 - 5 (BMP - 14、CDMP - 1)、GDF - 6 (BMP - 13、CDMP - 2)、G
 DF - 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、グルカゴン、Glu
 t4、糖タンパク質IIb / IIIa (GP IIb / IIIa)、GM - CSF、gp
 130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP - capまたはNI
 P - cap)、HB - EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HC
 MV) gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血性増殖因子 (HGF)、H
 epB 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 (HSV
) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFa、高分子量メラノーマ関連抗
 原 (HMW - MM)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3ループ
 、HLA、HLA - DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心筋
 ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HV

10

20

30

40

50

EM、I - 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 - 1
 R、IGFBP、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、I
 L - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 15、IL - 18、I
 L - 18R、IL - 23、インターフェロン (INF) - アルファ、INF - ベータ、I
 NF - ガンマ、インヒピン、iNOS、インスリンA - 鎖、インスリンB - 鎖、インスリ
 ン様増殖因子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、インテグリンアルファ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、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ラミニン5、LA
 MP、LAP、LAP (TGF - 1)、潜在型TGF - 1、潜在型TGF - 1 bp1、
 LBP、LDGF、LECT2、レフティー、ルイス - Y抗原、ルイス - Y関連抗原、L
 FA - 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
 アクタント、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac - 1、MAdCA
 M、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK - 2、MCP、M - CS
 F、MDC、Mer、メタロプロテアーゼ、MGDF受容体、MGMT、MHC (HLA
 - DR)、MIF、MIG、MIP、MIP - 1 - 、MK、MMAC1、MMP、MM
 P - 1、MMP - 10、MMP - 11、MMP - 12、MMP - 13、MMP - 14、M
 MP - 15、MMP - 2、MMP - 24、MMP - 3、MMP - 7、MMP - 8、MMP
 - 9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン (Muc1)、MUC18、ミューラ
 ー管阻害 (Muellerian-inhibitin) 物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD
 、N - カドヘリン、NCA90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフ
 イン - 3、 - 4または - 6、ニューロツリン、神経細胞増殖因子 (NGF)、NGFR、
 NGF - ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG - 3、NT、NTN、OB、
 OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PA
 DPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P - カ
 ドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK - 1、PECAM、PEM、PF4、
 PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤アルカリホスファターゼ
 (PLAP)、PIGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロリラキシン (Prorel
 axin)、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、P
 TEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、
 RANTES、リラキシンA - 鎖、リラキシンB - 鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス (R
 SV) F、RSV Fgp、Ret、リウマトイド因子、RLIP76、RPA2、R
 SK、S100、SCF/KL、SDF - 1、SERINE、血清アルブミン、sFRP
 - 3、Shh、SIGIRR、SK - 1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、S
 MOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP - II、TACE、T
 ACI、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、TE
 M5、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特異的、TGF -
 ベータRI (ALK - 5)、TGF - ベータRII、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、トロニン、胸腺Ck - 1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、
 TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpos、TMPRSS2、TNF、TN

10

20

30

40

50

F - アルファ、TNF - アルファベータ、TNF - ベータ2、TNFc、TNF - RI、TNF - RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo - 2、DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK - 2A、TRICK - B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A (RANK ODF R、TRANCER)、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55 - 60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75 - 80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo - 1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4 - 1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3 Apo - 3、LARD、TR3、TRAMP、WSL - 1)、TNFSF10 (TRAIL Apo - 2リガンド、TL2)、TNFSF11 (TRANCER/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コネクチン (Conectin)、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、TRANCER、トランスフェリン (transferring) 受容体、TRF、Trk、TROP - 2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、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、VEFGR - 1 (flt - 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・ヴィルブランド因子、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、ならびにホルモンおよび増殖因子の受容体。一部の実施形態では、ポリペプチドまたはタンパク質は、1種または複数の細胞表面腫瘍抗原に特異的な抗原結合ドメインを有する。方法および組成物は、CDCのための腫瘍細胞を標的にするために用いることができる。

【0117】

抗体コンジュゲートの基盤として、十分な選択性、特異性または親和性のいかなる抗体

を用いてもよい。かかる特性は、当業者に公知の従来の免疫学的スクリーニング方法論を使用して評価することができる。抗体分子における生物学的活性分子への結合のための部位は、標準的な抗原結合部位に加えて、病原体、B細胞スーパー抗原、T細胞共受容体CD4およびHIV-1エンベロープに結合することができる可変ドメインに存在する部位を含む（Sassoら、1989年；Shorkiら、1991年；Silvermannら、1995年；Clearyら、1994年；Lenertら、1990年；Berberianら、1993年；Kreierら、1991年）。加えて、可変ドメインは、抗体自己結合に関与し（Kangら、1988年）、抗体によって認識されるエピトープ（イディオトープ）を含有する（Kohlerら、1989年）。

【0118】

Fcドメインは、C1qおよびFcRに結合することができるが、CDCが、Fcドメインを含有するポリペプチドにおける抗原結合ドメインによってだけではなく、他のいくつかのタンパク質結合ドメインによって方向づけられ得ることが企図される。結果的に、実施形態は、Fcドメインおよび異種非抗原結合ドメインに関係する。ある特定の実施形態では、非抗原結合ドメインは、細胞表面に結合する。したがって、これらの作用物質は、特異的標的細胞へと結合することができる作用物質／タンパク質への化学的コンジュゲートまたはそれとの融合のいずれかを必要とする。実施形態は、非グリコシル化Fcドメインの全体または部分を、表1に収載されているタンパク質のいずれかの全体または部分に接続することをさらに含む。実施形態として、表1および本明細書の記載に提示されている例が挙げられるがこれらに限定されないことが企図される。

【0119】

受容体のリガンドを用いて、リガンドの受容体をその表面において発現する細胞を標的とすることができる。リガンドは、例えば、CD95リガンド、TRAIL、TNF（TNF-またはTNF-等）、VEGF等の上に記すものを含む増殖因子、およびインターフェロンまたはインターロイキン等のサイトカイン、ならびにこれらのバリエーションも含む。VEGF受容体1（Flt-1）の第2の細胞外ドメインとVEGF受容体2（KDR/FIK-1）の第3のドメインおよびIgGFc領域を含むVEGF Trap融合タンパク質等、複数のドメインを有する実施形態も企図される。

10

20

【表 1】

表 1. 特異的標的細胞に結合することができる作用物質/タンパク質

タンパク質属	亜属	種	亜種
抗体	ポリクローナル		
	モノクローナル	非組換え	
		組換え	
			キメラ
			単鎖
			ダイアボディ(Diabody)
			多量体
細胞表面受容体のリガンド			IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19
	サイトカイン/増殖因子		
		受容体チロシンキナーゼのサイトカイン/増殖因子	
			GM-CSF、G-CSF、M-CSF、EGF、VEGF、FGF、PDGF、HGF、GDNF、Trk、AXL、LTK、TIE、ROR、DDR、KLG、RYK、MuSK リガンド
細胞表面分子の非 Ab 結合タンパク質			
	細胞表面タンパク質の結合剤		
		表面抗原分類(CD)分子	

【0120】

C. 抗体Fcライブラリー

多様な抗体Fcドメインおよび/またはかかるドメインを含む抗体の作製のための実施形態と併せて用いることができる技法の例は、米国特許第5,824,520号に記載されている免疫グロブリン重鎖ライブラリーの発現のための技法と同様の技法を用いることができる。以前に用いられたFcライブラリーは、特に参照により本明細書に組み込むPCT公開WO2008/137475に記載されている。

【0121】

III. 抗体結合ポリペプチド

種々の抗体結合ドメイン(例えば、FcRポリペプチド)は、本技術分野で公知であり、本発明の方法および組成物において使用することができる。例えば、一部の態様では、FcRは、IgA、IgM、IgEまたはIgG(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3またはIgG4)等、Igの特定の型または亜型に特異性を有すること

ができる。よって、一部の実施形態では、抗体結合ドメインは、I g G 結合ドメインとして規定することができる。F c R ポリペプチドは、真核生物、原核生物または合成 F c R ドメインを含むことができる。例えば、抗体 F c 結合ドメインは、哺乳動物、細菌または合成結合ドメインとして規定することができる。本発明における使用のための一部の F c 結合ドメインとして、表 2 のポリペプチドのうち 1 種由来の結合ドメインが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、F c 結合ポリペプチドは、F C G R 2 A、F C G R 2 B、F C G R 2 C、F C G R 3 A、F C G R 3 B、F C G R 1 A、F c g r 1、F C G R 2、F c g r 2、F c g r 2、F C G R 3、F C G R 3、F c g r 3、F C G R 3、F c g r 3、F C G R T、m r p 4、s p a または s p g 遺伝子によってコードされ得る。好ましくは、本発明に係る使用のための F c R ポリペプチドは、ヒト F c R I a、F c R I I a、F c R I I b、F c R I I c、F c R I I I a、F c R I I I b、F c R I または C 1 q 由来の F c 結合領域であり得る。F c ドメインが結合する種々の F c 受容体は、本技術分野で周知であり、受容体の一部の例を下表 2 に収載する。

【表 2 - 1】

表 2. 選択された FcR ポリペプチド

タンパク質名	遺伝子名	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc-ガンマ RII-a (CD32)	FCGR2A	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II-a 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	317	(Stuart ら、1987 年)
Fc-ガンマ RII-a	FCGR2A	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II-a 前駆体	<i>Pan troglodytes</i> (チンパンジー)	316	
Fc-ガンマ RII-b	FCGR2B	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II-b 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	310	(Stuart ら、1989 年)
Fc-ガンマ RII-c	FCGR2C	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II-c 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	323	(Stuart ら、1989 年)
Fc-ガンマ RIIIa	FCGR3A	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III-A 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	254	(Ravetch および Perussia、1989 年)
Fc-ガンマ RIIIb	FCGR3B	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III-B 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	233	(Ravetch および Perussia、1989 年)
Fc-ガンマ RI (CD64)	FCGR1A	高親和性免疫グロブリンガンマ Fc 受容体 I 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	374	(Allen および Seed、1988 年)
Fc-ガンマ RI	Fcgr1	高親和性免疫グロブリンガンマ Fc 受容体 I 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	404	(Sears ら、1990 年)
Fc-ガンマ RII	FCGR2	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Bos taurus</i> (ウシ)	296	(Zhang ら、1994 年)
Fc-ガンマ RII	FCGR2	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Cavia porcellus</i> (モルモット)	341	(Tominaga ら、1990 年)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

タンパク質名	遺伝子名	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc-ガンマ RII	Fcgr2	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	330	(Ravetch ら、1986 年)
Fc-ガンマ RII	Fcgr2	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	285	(Bocek および Pecht、1993 年)
Fc-ガンマ RIII	FCGR3	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Bos taurus</i> (ウシ)	250	(Collins ら、1997 年)
Fc-ガンマ RIII	FCGR3	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Macaca fascicularis</i> (蟹喰猿)(カニクイザル)	254	
Fc-ガンマ RIII	Fcgr3	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	261	(Ravetch ら、1986 年)
Fc-ガンマ RIII	FCGR3	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Sus scrofa</i> (ブタ)	257	(Halloran ら、1994 年)
Fc-ガンマ RIII	Fcgr3	低親和性免疫グロブリンガンマ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	267	(Zeger ら、1990 年)
FcRn	FCGRT	IgG 受容体トランスポーター FcRn 大サブユニット p51 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	365	
FcRn	FCGRT	IgG 受容体トランスポーター FcRn 大サブユニット p51 前駆体	<i>Macaca fascicularis</i> (蟹喰猿)(カニクイザル)	365	
FcRn	Fcgrt	IgG 受容体トランスポーター FcRn 大サブユニット p51 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	365	(Ahouse ら、1993 年)
FcRn	Fcgrt	IgG 受容体トランスポーター FcRn 大サブユニット p51 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	366	(Simister および Mostov、1989 年)
MRP タンパク質	mrp4	フィブリノーゲンおよび Ig 結合タンパク質前駆体	<i>Streptococcus pyogenes</i>	388	(Stenberg ら、1992 年)
プロテイン B		cAMP 因子	<i>Streptococcus agalactiae</i>	226	(Ruhlman ら、1988 年)

10

20

30

40

【表 2 - 3】

タンパク質名	遺伝子名	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
プロテイン A	spa	免疫グロブリン G 結合プロテイン A 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (株 NCTC 8325)	516	(Uhlen ら、1984 年)
プロテイン A	spa	免疫グロブリン G 結合プロテイン A 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i>	508	(Shuttleworth ら、1987 年)
プロテイン A	spa	免疫グロブリン G 結合プロテイン A 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (株 Mu50/ATCC 700699)	450	(Kuroda ら、2001 年)
プロテイン A	spa	免疫グロブリン G 結合プロテイン A 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (株 N315)	450	(Kuroda ら、2001 年)
プロテイン G	spg	免疫グロブリン G 結合プロテイン G 前駆体	<i>Streptococcus</i> sp. グループ G	448	(Fahnestock ら、1986 年)
プロテイン G	spg	免疫グロブリン G 結合プロテイン G 前駆体	<i>Streptococcus</i> sp. グループ G	593	(Olsson ら、1987 年)
プロテイン H		免疫グロブリン G 結合プロテイン H 前駆体	<i>Streptococcus pyogenes</i> 血清型 M1	376	(Gomi ら、1990 年)
プロテイン sbi	sbi	免疫グロブリン G 結合プロテイン sbi 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (株 NCTC 8325-4)	436	(Zhang ら、1998 年)
アレルゲン Asp fl 1		アレルゲン Asp fl1 は、ヒトにおけるアレルギー反応を引き起こす。IgE および IgG に結合。	<i>Aspergillus flavus</i>	32	
アレルゲン Asp fl 2		アレルゲン Asp fl2 は、ヒトにおけるアレルギー反応を引き起こす。IgE および IgG に結合。	<i>Aspergillus flavus</i>	20	
アレルゲン Asp fl 3		アレルゲン Asp fl3 は、ヒトにおけるアレルギー反応を引き起こす。IgE および IgG に結合。	<i>Aspergillus flavus</i>	32	
Fc-イプシロン RI		マスト細胞、好酸球および好塩基球に表示される IgE 受容体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		
Fc-アルファ RI (CD86)		マクロファージに表示される IgA(IgA1、IgA2)受容体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		

10

20

30

40

【表 2 - 4】

タンパク質名	遺伝子名	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
C1q	C1QA NP_05707 5.1, C1QB NP_00048 2.3, C1QC NP_75895 7.1	C1qは、6本のA鎖、6本のB鎖および6本のC鎖で構成された、抗体Fcに結合する多量体の複合体である。	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		

10

【0122】

IV. 抗体Fcドメインをスクリーニングするための方法

ある特定の態様では、標的リガンド（例えば、Fc受容体等、抗体結合ポリペプチド）に特異的な親和性を有する抗体Fcドメインを識別するための方法が存在する。かかる方法は、本明細書、ならびにその全体を特に参照により本明細書に組み込むPCT公開WO 2008/137475に記載されている。

【0123】

スクリーニングされたポリペプチドは、多様な候補Fcドメインの大型のライブラリーを含むことができる、あるいは、標的リガンドに結合する可能性を高くすると考えられる構造的性状に目を向けて選択されたFcドメイン（例えば、操作された点変異またはアミノ酸挿入）の特定のクラスを含むことができる。一実施形態では、候補ポリペプチドは、インタクト抗体またはFcドメインを含むその断片もしくは部分であり得る。

20

【0124】

標的リガンドに結合することができる候補Fcドメインを識別するために、それぞれ別の抗体Fcドメインを発現するグラム陰性細菌細胞の集団を用意するステップと、細菌と、抗体Fcドメインに接触することができる少なくとも第1の標識または固定化された標的リガンド（FcRポリペプチド）とを混合するステップと、標的リガンドに結合することができる分子を発現する少なくとも第1の細菌を識別するステップとを行うことができる。

30

【0125】

上述の方法の一部の態様では、抗体Fcドメインおよび標識されたFcRポリペプチドの間の結合は、細菌細胞からの拡散を防止する。このようにして、標識されたリガンドの分子は、透過処理された外膜を含む細菌のペリプラズムに保持され得る。あるいは、Fcドメインは、内膜に会合することが示されるため、ペリプラズムを除去し、それにより、Fcドメインが、結合した候補分子の保持を引き起こすことができるであろう。次いで、標識を使用して、FcRポリペプチドに結合することができる結合ポリペプチドを発現する細胞を単離することができ、Fcドメインポリペプチドをコードする遺伝子を単離することができる。続いて、*in vivo*または*ex vivo*発現方法を使用して、標的リガンドに結合することができる分子を多量に産生し、次いで、いずれかの所望の適用、例えば、診断または治療適用に使用することができる。さらに、識別された単離された抗体Fcドメインを使用して、抗原結合ドメインを含む抗体断片または全長抗体を構築することができることが理解され得る。

40

【0126】

さらなる実施形態では、スクリーニング方法は、少なくとも2ラウンドの選択を含むことができ、第1ラウンドの選択で得られた細菌細胞の亜集団は、FcRへの候補抗体Fcドメインの結合に基づく少なくとも第2ラウンドの選択に付す。さらに、一部の態様では、第1ラウンドの選択で得られた細菌細胞の亜集団は、第2の選択に先立ち許容的条件下で育成（して、細胞総数を増やすことが）できる。よって、一部の態様では、方法は、2

50

、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれを超えるラウンドの選択を含むことができる。さらに、一部の態様では、各ラウンドの選択から得られた細菌細胞の亜集団は、その後のラウンドの選択の前に、許容的条件下で育成される。1または複数のかかるラウンドの選択の後に単離された細胞は、追加的なラウンドの変異誘発に付すことができる。場合によっては、選択は、抗体に結合していないFcRポリペプチドを除去した後に行われる。さらに、場合によっては、選択のストリンジェンシーは、抗体を提示する細菌を含む溶液のpH、塩濃度または温度を調整することにより変えることができる。よって、一部の態様では、本発明の細菌細胞が、約25等、生理的条件に満たない(sub-physiological)温度で育成されることが好ましい場合がある。

【0127】

さらにさらなる態様では、本発明に係る細菌細胞を産生する方法は、少なくとも第1のFcRに結合するFcドメインをコードする核酸配列を産生する方法としてさらに規定することができる。よって、本明細書における方法によって産生される細菌細胞を使用して、FcRポリペプチドに特異的な親和性を有するFcドメインをコードする核酸配列をクローニングすることができる。例えば、PCRによって細胞からかかる核酸を単離および増幅するための方法は、本技術分野で周知であり、さらに後述する。よって、前述の方法によって産生された核酸配列は、本発明の一部として含まれる。さらに、かかる配列は、細胞において発現されて、FcRに特異的な親和性を有するFcドメインを産生することができる。よって、一部の態様では、本発明は、FcRに特異的な親和性を有するFcドメインを産生するための方法を提供する。さらに、本発明は、本発明の方法によって産生された抗体Fcドメインを含む。しかし、かかるスクリーニングによって産生された抗体Fcドメインを、特定の標的リガンドに対し親和性を有する抗体可変領域と組み合わせることができ、これらの抗体も本発明の一部として含まれることが理解できよう。

【0128】

A. 抗体Fcドメインのペリプラズム発現

一部の実施形態では、抗体Fcドメインを含むポリペプチドは、グラム陰性細菌の細胞膜周辺腔において発現させることができる。さらに、一部の態様では、抗体Fcドメインは、内膜の周辺面に繫留することができる。グラム陰性細菌の内膜にポリペプチドを繫留するための方法および組成物は、以前に記載されている(米国特許第7,094,571号、同第7,419,783号、同第7,611,866号および米国特許出願公開第2003/0219870号)。例えば、Fcドメインは、膜貫通もしくは膜結合ポリペプチドに直接融合することができる、または膜貫通もしくは膜結合ポリペプチドと相互作用することができる(例えば、タンパク質-タンパク質相互作用により)。かかる技法は、「繫留型ペリプラズム発現」または「APEX」と命名されてよい。場合によっては、グラム陰性細菌細胞は、E.coli細胞として規定することができる。さらに、一部の態様では、グラム陰性細菌細胞は、E.coliのJude-1株等、遺伝子操作された細菌細胞として規定することができる。

【0129】

融合タンパク質は、FcドメインとのN末端またはC末端融合を含むことができ、場合により、膜繫留ポリペプチドおよびFcドメインの間に追加的なリンカーアミノ酸を含むことができる。ある特定の具体的な事例において、膜繫留ポリペプチドは、E.coli

NlpA遺伝子によってコードされる最初の6アミノ酸、E.coli内膜タンパク質由来の1種もしくは複数の膜貫通 - ヘリックス、繊維状ファージの遺伝子IIIタンパク質もしくはその断片、または内膜リポタンパク質もしくはその断片であり得る。よって、一例として、膜繫留ポリペプチドは、AraH、MglC、MalF、MalG、MalC、MalD、RbsC、RbsC、ArtM、ArtQ、GlnP、ProW、HisM、HisQ、LivH、LivM、LivA、LivE、DppB、DppC、OppB、AmiC、AmiD、BtuC、ThuD、FecC、FecD、FecR、FecD、NikB、NikC、CysT、CysW、UgpA、UgpE、PstA、PstC、PotB、PotC、PotH、Pod、ModB、NosY、PhnM、Lac

10

20

30

40

50

Y、Sec Y、TolC、DsbB、DsbD、TouB、TatC、CheY、TraB、ExbD、ExbBまたはAas由来等、内膜リポタンパク質またはその断片であり得る。

【0130】

さらにさらなる事例において、本発明に係るグラム陰性細菌の集団は、少なくとも約 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 10×10^9 種またはそれを超える別個の抗体Fcドメインを含むものとして規定することができる。一部の具体的な事例において、グラム陰性細菌細胞の集団は、(a)複数の別個の抗体Fcドメインをコードする複数の核酸配列を調製するステップと、(b)前記核酸によりグラム陰性細菌の集団を形質転換するステップであって、グラム陰性細菌が、ペリプラズムにおいて発現された複数の抗体Fcドメインを含むステップとを含む方法によって産生することができる。

10

【0131】

B．外膜の透過処理

細菌の外膜を破壊、透過処理または除去するための方法は、本技術分野で周知であり、例えば、米国特許第7,094,571号を参照されたい。例えば、細菌細胞をFcRポリペプチドと接触させる前に、細菌細胞の外膜は、高浸透圧条件、物理的ストレス、リゾチーム、EDTA、消化酵素、外膜を破壊する化学物質、細菌をファージに感染させることにより、または前述の方法の組合せにより処理することができる。よって、場合によっては、外膜は、リゾチームおよびEDTA処理によって破壊することができる。さらに、ある特定の実施形態では、細菌外膜は、完全に除去することができる。

20

【0132】

1種または複数の標識されたりガンドに対する外膜の透過性を増加させるための方法を用いることができる。これは、こうしなければ外膜を通過することができない標識されたりガンドのアクセスのスクリーニングを可能にすることができる。しかし、ある特定のクラスの分子、例えば、650Daの排除限界よりも大きい疎水性抗生物質は、膜ポリリンに依存せず、細菌外膜それ自体を通して拡散することができる(Farmerら、1999年)。プロセスは、そのようにして膜を実際に透過処理することができる(JouenneおよびJunter、1990年)。また、ある特定の長鎖リン酸塩ポリマー(100Pi)は、外膜の正常な分子ふるい活性をまとめて迂回するようである(RaoおよびTorriani、1988年)。

30

【0133】

生存率を損なうことなくまたは細胞からの発現されたタンパク質を放出することなく、ペリプラズムへのリガンドの透過をもたらし条件が識別されたが、本発明は、外膜を維持することなく実施することができる。細胞膜周辺腔において発現または繫留されたFcドメインのため、結合した標識されたりガンドを検出するための、外膜の維持の必要性(細胞からの結合タンパク質の漏出を防止するための障壁としての)は除かれる。結果として、細胞膜の外(ペリプラズム)面に繫留された結合タンパク質を発現する細胞は、部分的に透過処理された膜またはほぼ完全に除去された外膜のいずれかを有する細胞において、標識されたりガンドの溶液と単にインキュベートすることにより標識することができる。

40

【0134】

高浸透圧ショック等の処理は、標識を有意に改善することができる。カルシウムイオン(Bukauら、1985年)およびさらにはトリス緩衝液(Irvinら、1981年)を含む多くの作用物質が、外膜の透過性を変更することが公知である。さらに、ファージ感染は、標識プロセスを刺激する。繊維状ファージ内膜タンパク質pIIIおよび大型の多量体外膜タンパク質pIVの両方が、膜透過性を変更することができ(Boekeら、1982年)、pIVにおける変異体は、正常であれば除外されるマルトデキストリンに対するアクセスを改善することが公知である(Marcianoら、1999年)。株、塩およびファージの賢明な組合せを含む本発明の技法を使用して、高度な透過性を達成することができる(Daghertyら、1999年)。次いで、フローサイトメトリーまたは他の関連技法を使用して

50

、標識されたりガンドに結合した、繫留またはペリプラズム会合されたポリペプチドを含む細胞を、標識されたりガンドに対する親和性がない結合タンパク質を発現する細胞から容易に単離することができる。しかし、場合によっては、細胞の生存率を維持するために、破壊性の低い技法を使用することが望まれ得る。この点において、E D T A およびリゾチーム処理も有用であり得る。

【 0 1 3 5 】

C . 標識された標的リガンド

上に示す通り、典型的には、1 種または複数の検出可能な作用物質（単数または複数）で標識された F c R ポリペプチドを提供することが望まれ。これは、例えば、リガンドを少なくとも 1 種の検出可能な作用物質に連結して、コンジュゲートを形成することにより行うことができる。例えば、従来、少なくとも 1 種の検出可能な分子または部分を連結または共有結合または複合体形成させる。「標識」または「検出可能な標識」は、特異的な機能特性および / または化学的特徴により検出することができる化合物および / またはエレメントであり、その使用は、それが取り付けられるリガンドの検出および / または所望であればさらなる定量化を可能にする。使用することができる標識の例として、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子またはビオチン等のリガンドが挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 1 3 6 】

本発明の一実施形態では、標識に関する細胞の自動スクリーニングを行うことができるように、視覚的に検出可能なマーカーが使用される。適切な機器による可視化によって検出することができる作用物質の例は、本技術分野で公知であり、これは、所望のリガンドへの作用物質の取り付けのための方法も同様である（例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込む米国特許第 5 , 0 2 1 , 2 3 6 号；同第 4 , 9 3 8 , 9 4 8 号；および同第 4 , 4 7 2 , 5 0 9 号を参照）。かかる作用物質は、常磁性イオン；放射性同位元素；蛍光色素；N M R 検出可能物質；および X 線イメージングのための物質を含むことができる。特に、所望の結合タンパク質または抗体を発現する細胞の単離のためにフローサイトメトリの使用を可能にするという点において、蛍光標識が有益である。

【 0 1 3 7 】

別の種類の F c R コンジュゲートは、リガンドが、発色基質との接触後に着色産物を生成するであろう二次結合分子および / または酵素（酵素タグ）に連結されたコンジュゲートである。かかる酵素の例として、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋わさび）水素ペルオキシダーゼまたはグルコースオキシダーゼが挙げられる。このような場合、選択された細胞が生存可能なままであることが望まれ得る。好ましい二次結合リガンドは、ビオチン、および / またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。かかる標識の使用は、当業者に周知であり、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込む米国特許第 3 , 8 1 7 , 8 3 7 号；同第 3 , 8 5 0 , 7 5 2 号；同第 3 , 9 3 9 , 3 5 0 号；同第 3 , 9 9 6 , 3 4 5 号；同第 4 , 2 7 7 , 4 3 7 号；同第 4 , 2 7 5 , 1 4 9 号；および同第 4 , 3 6 6 , 2 4 1 号に記載されている。

【 0 1 3 8 】

アジド基を含有する分子を使用して、低強度紫外光によって生成される反応性ニトレン中間体を介したタンパク質への共有結合を形成することができる（Potter および Haley、1 9 8 3 年）。特に、プリンヌクレオチドの 2 - および 8 - アジドアナログは、粗細胞抽出物におけるヌクレオチド結合タンパク質を識別するための部位特異的フォトプローブ（photoprobe）として使用されてきた（Owens および Haley、1 9 8 7 年；Atherton ら、1 9 8 5 年）。2 - および 8 - アジドヌクレオチドは、精製されたタンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも使用されており（Khatoon ら、1 9 8 9 年；King ら、1 9 8 9 年；Dholakia ら、1 9 8 9 年）、リガンド結合剤として使用することができる。

【 0 1 3 9 】

標識は、当業者に周知の技法のいずれかによって行うことができる。例えば、F c R ポ

10

20

30

40

50

リペプチドは、リガンドを所望の標識および化学的酸化剤、例えば、次亜塩素酸ナトリウムまたは酵素的酸化剤、例えば、ラクトペルオキシダーゼと接触させることにより標識することができる。同様に、リガンド交換プロセスを使用することができる。あるいは、例えば、標識、 SNCl_2 等の還元剤、フタル酸ナトリウム・カリウム (sodium-potassium phthalate) 溶液等の緩衝溶液およびリガンドをインキュベートすることにより、直接標識技法を使用することができる。リガンドにおける中間官能基を使用して、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetracetic acid) (EDTA) の存在下で標識をリガンドに結合することもできる。

【0140】

そのコンジュゲート部分へのリガンドの取り付けまたはコンジュゲートのための他の方法も本技術分野で公知である。一部の取り付け方法は、リガンドに取り付けられたジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA) ; エチレントリアミン四酢酸 (ethylenetriaminetetraacetic acid) ; N - クロロ - p - トルエンスルホンアミド ; および / または テトラクロロ - 3 - 6 - ジフェニルグリコウリル (glycouril) - 3 等、有機キレート剤の使用が関与する (それぞれ参照により本明細書に組み込む米国特許第 4, 472, 509 号および同第 4, 938, 948 号)。FcR ポリペプチドは、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩等のカップリング剤の存在下で酵素と反応させることもできる。フルオレセインマーカースとのコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応により調製することができる。米国特許第 4, 938, 948 号では、モノクローナル抗体を使用して、乳腺腫瘍のイメージングが達成され、検出可能イメージング部分が、メチル - p - ヒドロキシベンズイミド酸塩 (benzimidate) または N - スクシンイミジル - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸塩等のリンカーを使用して抗体に結合される。さらにさらなる態様では、上記参照の酵素または蛍光タンパク質等のレポータータンパク質に FcR ポリペプチドを融合させることができる。

【0141】

D . 標識された標的リガンドに結合された細菌細胞の単離

1 . カラムまたはビーズに基づく固定化

当業者であれば、その FcR との相互作用 (結合) に基づき細胞を選択するための方法が、本技術分野で周知であることを理解するであろう。例えば、FcR を、カラムまたはビーズ (例えば、磁気ビーズ) に固定化し、FcR に結合する細菌細胞を、ビーズ (例えば、磁気分離) またはカラムの反復した洗浄によって分離することができる。さらに、一部の態様では、標的リガンドは、フルオロフォア、放射性同位元素または酵素等により標識することができる。よって、細菌細胞は、場合によっては、結合した FcR における標識を検出することにより選択することができる。さらに、一部の態様では、細菌細胞は、2 種またはそれを超える FcR ポリペプチドへの結合または結合の欠如に基づき選択することができる。例えば、2 種の FcR ポリペプチドに結合する抗体を提示する細菌を選択することができ、この場合、各 FcR は、細菌の選択に逐次使用される。逆に、ある特定の態様では、第 2 の FcR (例えば、第 2 の標識を含む) にではなく、1 種の FcR (第 1 の標識を含む FcR 等) に結合する抗体 Fcドメインを表示する細菌を選択することができる。前述の方法を使用して、例えば、第 2 の特異的 FcR ではなく特異的 FcR に結合する抗体 Fcドメインを識別することができる。

【0142】

2 . フローサイトメトリー

本発明の一実施形態では、Fcドメインに結合された標識されたりガンドを含む細菌細胞の効率的な単離のために、蛍光標識細胞分取 (FACS) スクリーニングまたは他の自動フローサイトメトリー技法を使用することができる。フローサイトメトリーを行うための機器は、当業者に公知であり、一般向けに市販されている。かかる機器の例として、Becton Dickinson (Foster City, CA) 製の FACS Star Plus、FACS can および FACS sort 機器、Coulter Epic

s Division (Hialeah, FL) 製の Epics C、ならびに Cytomation (Colorado Springs, CO) 製の MOFLO (商標) が挙げられる。

【0143】

フローサイトメトリー技法は一般に、液体試料中の細胞または他の粒子の分離が関与する。典型的には、フローサイトメトリーの目的は、その1種または複数の特徴、例えば、標識されたりガンドまたは他の分子の存在に関して分離された粒子を解析することである。フローサイトメトリーの基本ステップは、液体流がセンシング領域を通過するような、装置による流体試料の誘導が関与する。粒子は、1つずつセンサーを通過する必要がある、サイズ、屈折、光散乱、乳白度、粗さ、形状、蛍光等に基づきカテゴリー化される。

10

【0144】

フローサイトメトリーによって行われるのは、細胞解析だけではなく、細胞の選別も行われる。米国特許第3,826,364号では、機能的に異なる細胞型等、粒子を物理的に分離する装置が開示されている。この機械では、レーザーが、その中の粒子由来の高度に局在化された散乱が存在するように、適したレンズまたはレンズシステムによって粒子の流れに焦点を合わせた照射を与える。加えて、流れの中の蛍光粒子の励起のために、高強度照射源が、粒子の流れに方向づけられる。流れの中のある特定の粒子を選択的に帯電し、次いでこれを指定されたレセプタクルに偏向させることにより分離することができる。この分離の古典的な形態は、分離のための1種または複数の細胞型のマークに使用される蛍光タグ付けされた抗体による。

20

【0145】

フローサイトメトリーのための方法の他の例として、それぞれ特に参照により本明細書に組み込む、米国特許第4,284,412号；同第4,989,977号；同第4,498,766号；同第5,478,722号；同第4,857,451号；同第4,774,189号；同第4,767,206号；同第4,714,682号；同第5,160,974号；および同第4,661,913号に記載されている方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【0146】

本発明のため、フローサイトメトリーの重要な態様は、複数ラウンドのスクリーニングを逐次に行うことができることである。細胞は、選別の初期ラウンドから単離し、フローサイトメーターに直ちに再導入し、再度スクリーニングして、スクリーニングのストリンジエンシーを改善することができる。当業者に公知の別の利点は、フローサイトメトリーを使用して、非生存細胞を回収することができることである。フローサイトメトリーは、基本的に粒子選別技術であるため、成長または繁殖する細胞の能力は必要ない。かかる非生存細胞から核酸を回収するための技法は、本技術分野で周知であり、例えば、PCRを含む鋳型依存性増幅技法の使用を含むことができる。

30

【0147】

E. Fcドメインコード配列のクローニング

所望の特異性、親和性および/または活性の分子を産生する細菌細胞が識別された後に、対応するコード配列をクローニングすることができる。この様式では、従来手順（例えば、抗体または結合タンパク質をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）を使用して、分子をコードするDNAを単離し、配列決定することができる。当業者であれば、生存細胞または生存不能細胞から核酸をクローニングすることができることを理解できる。生存不能細胞の場合、例えば、PCRを使用して、例えば、クローニングされたDNAの増幅を使用することが望まれ得る。これは、さらなる細胞育成ありまたはなしのいずれかで、生存細胞を使用して行うこともできる。

40

【0148】

単離されると、抗体FcドメインDNAを発現ベクターに加え、次いでこれを細菌等の宿主細胞にトランスフェクトすることができる。DNAは、例えば、ヒト重および軽鎖可

50

変ドメインの配列の付加により、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全体もしくは部分を免疫グロブリンコード配列に共有結合により繋ぐことにより改変されていてもよい。この様式では、「キメラ」または「ハイブリッド」結合タンパク質は、所望の結合特異性を有するように調製される。例えば、識別された抗体Fcドメインは、治療用ポリペプチドまたは毒素に融合し、特定のFcRを発現する細胞を標的にするため(in vitroまたはin vivo)に使用することができる。

【0149】

キメラまたはハイブリッドFcドメインは、架橋剤が関与する方法を含む、合成タンパク質化学における公知の方法を使用してin vitroで調製することもできる。例えば、標的化毒素は、ジスルフィド交換反応を使用してまたはチオエーテル結合を形成することにより構築することができる。この目的に適した試薬の例として、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート(butylrimidate)が挙げられる。

【0150】

V. 核酸に基づく発現系

核酸に基づく発現系は、本発明のある特定の実施形態では、組換えタンパク質の発現に見出すことができる。例えば、本発明の一実施形態は、抗体Fcドメインまたは好ましくは、複数の別個のFcドメインのコード配列によるグラム陰性細菌の形質転換が関与する。

【0151】

A. 核酸送達方法

本発明のある特定の態様は、標的細胞(例えば、グラム陰性細菌)への核酸の送達を含むことができる。例えば、細菌宿主細胞は、FcRに結合する可能性がある候補Fcドメインをコードする核酸により形質転換することができる。本発明の特定の実施形態では、細菌のペリプラズムへの発現を標的化することが望まれ得る。真核生物宿主細胞の形質転換は、同様に、標的リガンドに結合することができると識別される様々な候補分子の発現における使用を見出すことができる。

【0152】

細胞の形質転換のための核酸送達に適した方法は、細胞またはさらにはそのオルガネラに核酸(例えば、DNA)を導入することができる実質的にいかなる方法も含むと考えられる。かかる方法として、次のものが挙げられるがこれらに限定されない; マイクロインジェクション(HarlandおよびWeintraub、1985年; 参照により本明細書に組み込む米国特許第5,789,215号)を含めた注射等によるDNAの直接送達(それぞれ参照により本明細書に組み込む米国特許第5,994,624号; 第5,981,274号; 第5,945,100号; 第5,780,448号; 第5,736,524号; 第5,702,932号; 第5,656,610号; 第5,589,466号; および第5,580,859号); エレクトロポレーション(参照により本明細書に組み込む米国特許第5,384,253号); リン酸カルシウム沈殿(GrahamおよびVan Der Eb、1973年; ChenおよびOkayama、1987年; Rippeら、1990年); DEAE-デキストランに続くポリエチレングリコールの使用(Gopal、1985年); 直接音波負荷(Fechheimerら、1987年); リポソーム媒介性トランスフェクション(NicolauおよびSene、1982年; Fraleyら、1979年; Nicolauら、1987年; Wongら、1980年; Kanedaら、1989年; Katoら、1991年); 微粒子銃(それぞれ参照により本明細書に組み込むPCT公開番号WO94/09699および95/06128; 米国特許第5,610,042号; 同第5,322,783号; 同第5,563,055号; 同第5,550,318号; 同第5,538,877号; および同第5,538,880号); またはシリコンカーバイド繊維による揺動(Kaeppelerら、1990年; それぞれ参照により本明細書に組み込む米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号); 乾燥/阻害媒介性DNA取込み(Potrykusら、1985年)によるもの。これらのもの等の技法の適用により、細胞を安定にまたは一過的に形質転換することができる。

【0153】

B. ベクター

ベクターは、本発明による、例えば、候補 F c ドメインをコードする核酸配列による細胞の形質転換における使用を見出すことができる。本発明の一実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸配列の不均一「ライブラリー」全体を細胞の集団に導入し、これにより、ライブラリー全体のスクリーニングを可能にすることができる。用語「ベクター」は、それが複製され得る細胞への導入のために核酸配列を挿入することができる担体核酸分子を指すように使用される。核酸配列は、ベクターが導入されている細胞に対し外来性であること、または配列が、細胞における配列に対し相同であるが、宿主細胞核酸内の配列が通常は存在しないポジションに存在することを意味する「外因性」または「異種」であり得る。ベクターは、プラスミド、コスミドおよびウイルス（例えば、バクテリオファージ）を含む。当業者は、いずれも参照により本明細書に組み込む Maniatis ら、1988 年および Ausubel ら、1994 年に記載されている標準組換え技法によりベクターを構築することができる。

10

【0154】

用語「発現ベクター」は、転写され得る遺伝子産物の少なくとも部分をコードする核酸配列を含有するベクターを指す。場合によっては、次いで RNA 分子が、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。発現ベクターは、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の転写および場合により翻訳に必要な核酸配列を指す種々の「制御配列」を含有することができる。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、同様に他の機能を果たす核酸配列を含有することができる。

20

【0155】

1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。これは、RNA ポリメラーゼおよび他の転写因子等、調節タンパク質および分子が結合することができる遺伝的エレメントを含有することができる。語句「作動可能に配置される」、「作動可能に連結される」、「制御下にある」および「転写制御下にある」は、プロモーターが、核酸配列との関連において、この配列の転写開始および/または発現を制御するために、正確で機能的な位置および/または配向にあることを意味する。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性調節配列を指す「エンハンサー」と併せて使用されても使用されなくてもよい。分子生物学分野の当業者は一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサーおよび細胞型組合せの使用についてよく知っており、例えば、参照により本明細書に組み込む Sambrook ら（1989 年）を参照されたい。

30

【0156】

2. 開始シグナル

特異的な開始シグナルが、コード配列の効率的な翻訳に必要とされる場合もある。これらのシグナルは、ATG 開始コドンまたは隣接配列を含む。ATG 開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが配備される必要がある場合もある。当業者であれば、容易にこれを決定し、必要なシグナルを配備することができるであろう。挿入配列全体の翻訳を確実にするために、開始コドンが、所望のコード配列の読み枠と「インフレーム」でなければならないことが周知である。外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然または合成のいずれであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントの包接によって増強され得る。

40

【0157】

3. 多重クローニング部位

ベクターは、そのいずれもベクターを消化するための標準組換え技術と併せて使用することができる、複数の制限酵素部位を含有する核酸領域である多重クローニング部位（MCS）を含むことができる（参照により本明細書に組み込む Carbone elli ら、1999 年、Levenson ら、1998 年および Cocea、1997 年を参照）。「制限酵素消化」は、核酸

50

分子中の特異的な位置のみに機能する酵素による核酸分子の触媒による切断を指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。頻繁に、外因性配列がベクターにライゲーションされることを可能にするために、ベクターは、MCS内をカットする制限酵素を使用して直鎖化または断片化される。「ライゲーション」は、互いに近接していても近接していなくてもよい2本の核酸断片の間にホスホジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応が関与する技法は、組換え技術分野の当業者に周知である。

【0158】

4. 終結シグナル

本発明に従って調製されるベクターまたは構築物は一般に、少なくとも1種の終結シグナルを含み得る。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的な終結に関与するDNA配列で構成される。よって、ある特定の実施形態では、RNA転写物の産生を終了する終結シグナルが企図される。ターミネーターは、所望のメッセージレベルの達成のためにin vivoで必要となる場合がある。本発明における使用に企図されるターミネーターは、当業者に公知のいずれか公知の転写ターミネーターを含み、rho依存性またはrho非依存性ターミネーターが挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、終結シグナルは、配列トランケーションによる等、転写可能または翻訳可能配列を欠いていてよい。

【0159】

5. 複製起点

宿主細胞においてベクターを繁殖させるために、複製が開始される特異的な核酸配列である、1個または複数の複製起点部位(「ori」と命名されることが多い)を含有することができる。

【0160】

6. 選択可能およびスクリーニング可能マーカー

本発明のある特定の実施形態では、本発明の核酸構築物を含有する細胞は、発現ベクター中にマーカーを含むことにより、in vitroまたはin vivoで識別することができる。かかるマーカーは、細胞に識別可能な変化を付与し、発現ベクターを含有する細胞の容易な識別を可能にすることができる。一般に、選択可能マーカーは、選択を可能にする特性を付与するマーカーである。正の選択可能マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするマーカーである一方、負の選択可能マーカーは、その存在がその選択を防止するマーカーである。正の選択可能マーカーの例は、薬物抵抗性マーカーである。

【0161】

通常、薬物選択マーカーを含めることは、形質転換体のクローニングおよび識別に役立つ。例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン(zeocin)およびヒスチジノールに対する抵抗性を付与する遺伝子が、有用な選択可能マーカーである。条件の実行に基づく形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その基盤が比色解析であるGFP等のスクリーニング可能マーカーを含む他の種類のマーカーも企図される。あるいは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)等、スクリーニング可能酵素を利用することができる。当業者であれば、場合によりFACS解析と併せて、免疫性マーカーを用いる仕方も知っているであろう。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることが可能である限り、使用されるマーカーは、重要であるとは考えられない。選択可能およびスクリーニング可能マーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0162】

C. 宿主細胞

異種核酸配列の発現の文脈において、「宿主細胞」は、原核細胞を指し、ベクターを複製することができるおよび/またはベクターによってコードされた異種遺伝子を発現することができるいずれかの形質転換可能な生物を含む。宿主細胞は、ベクターのレシピエントとして使用することができ、そのように使用されてきた。宿主細胞は、「トランスフェ

10

20

30

40

50

クト」または「形質転換」することができ、これは、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。形質転換された細胞は、初代対象細胞およびその後代を含む。

【0163】

本発明の特定の実施形態では、宿主細胞は、グラム陰性細菌細胞である。これらの細菌は、内膜および外膜の間に細胞膜周辺腔を保有するという点において、本発明による使用に適しており、特に、上述の内膜は、ペリプラズムと細胞質との間にあり、これは、細胞膜としても公知である。したがって、かかる細胞膜周辺腔を有する他のいずれかの細胞を本発明に従って使用することができる。本発明による使用を見出すことができるグラム陰性細菌の例として、*E. coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Vibrio cholera*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella flexneri*、*Haemophilus influenza*、*Bordetella pertussis*、*Erwinia amylovora*、*Rhizobium sp.* を挙げることができるがこれらに限定されない。

10

【0164】

適切な宿主は、ベクター骨格および所望の結果に基づき、当業者によって決定することができる。プラスミドまたはコスミドは、例えば、多くのベクターの複製のために原核生物宿主細胞に導入することができる。ベクター複製および/または発現のための宿主細胞として使用される細菌細胞は、DH5⁺、JM109およびKC8、ならびにSURE（登録商標）コンピテント細胞およびSOLOPACK（商標）Gold細胞（Stratagene（登録商標）、La Jolla）等の多数の市販の細菌宿主を含む。あるいは、*E. coli* LE392等の細菌細胞は、バクテリオファージの宿主細胞として使用することができる。

20

【0165】

哺乳動物宿主細胞の例として、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-K1；ATCC CCL61）、ラット下垂体細胞（GH1；ATCC CCL82）、HeLa S3細胞（ATCC CCL2.2）、ラットヘパトーマ細胞（H-4-II-E；ATCC CRL 1548）、SV40形質転換サル腎臓細胞（COS-1；ATCC CRL 1650）およびマウス胚細胞（NIH-3T3；ATCC CRL 1658）が挙げられる。前述は、本技術分野で公知の多くの可能な宿主生物の限定ではなく例示を目的とする。

30

【0166】

ポリペプチドを発現する哺乳動物宿主細胞は、親細胞株の培養に典型的に用いられる条件下で培養される。一般に、細胞は、典型的には、5%～10%のウシ胎仔血清等の血清を補充した、標準RPMI、MEM、IMEMまたはDMEM等、生理的な塩および栄養素を含有する標準培地において培養される。培養条件も標準であり、例えば、培養物は、所望のレベルのタンパク質が達成されるまで、静置または回転培養において37℃でインキュベートされる。

【0167】

様々な細胞型および生物由来の多くの宿主細胞を利用することができ、当業者に公知であろう。同様に、特に、ベクターの複製または発現に許容的なウイルスベクターを原核生物宿主細胞と併せて使用することができる。一部のベクターは、原核および真核細胞の両方におけるその複製および/または発現を可能にする制御配列を用いることができる。当業者であれば、上述の宿主細胞の全てをインキュベートして、これらを維持し、ベクターの複製を可能にするための条件をさらに理解するであろう。ベクターの大規模産生、ならびにベクターによってコードされる核酸およびその同族ポリペプチド、タンパク質またはペプチドの産生を可能にするであろう技法および条件も理解され公知である。

40

【0168】

D．発現系

上に記す組成物の少なくとも部分または全部を含む、多数の発現系が存在する。かかる

50

系は、例えば、特定のリガンドに結合することができると本発明に従って識別されたポリペプチド産物の産生に使用することができる。原核生物に基づく系は、本発明による使用に用いて、核酸配列またはその同族ポリペプチド、タンパク質およびペプチドを産生することができる。多くのかかる系は、市販されており、広く入手できる。発現系の他の例は、T7、Tac、Trc、BAD、ラムダpL、テトラサイクリンまたはLacプロモーター等、強い原核生物プロモーターを含有するベクター、pET発現系およびE. coli発現系を含む。

【0169】

本発明のある特定の態様では、ポリペプチドをコードする核酸配列が開示される。いずれの発現系が使用されるかに応じて、従来方法に基づき核酸配列を選択することができる。例えば、ポリペプチドが、ヒトポリペプチドに由来し、E. coliではめったに利用されない複数のコドンを含む場合、これは、E. coliにおける発現に干渉し得る。したがって、それぞれの遺伝子またはそのバリエーションは、E. coli発現のためにコドン最適化することができる。様々なベクターを使用して、目的のタンパク質を発現させることもできる。例示的なベクターとして、プラスミドベクター、ウイルスベクター、トランスポゾンまたはリポソームに基づくベクターが挙げられるがこれらに限定されない。

【0170】

VI. タンパク質精製

タンパク質精製技法は、当業者に周知である。これらの技法は、あるレベルにおいて、細胞、組織または器官のポリペプチドおよび非ポリペプチド画分へのホモジナイゼーションおよび粗分画が関与する。他に指定がなければ、目的のタンパク質またはポリペプチドは、クロマトグラフィーおよび電気泳動技法を使用してさらに精製して、部分的または完全な精製（または均一になるまで精製）を達成することができる。純粋ペプチドの調製に特に適する分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、親和性クロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィーおよび等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に効率的な方法は、高速性能（fast-performance）液体クロマトグラフィー（FPLC）またはさらには高速液体クロマトグラフィー（HPLC）である。本技術分野で一般に公知の通り、様々な精製ステップの実施順序を変化させても、またはある特定のステップを省略しても、依然として、実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に適した方法をもたらすことができることが考えられる。

【0171】

精製されたタンパク質またはペプチドは、他の構成成分から単離することができる組成物を指すことが意図され、タンパク質またはペプチドは、その天然に得ることができる状態と比べたいずれかの程度まで精製される。単離または精製されたタンパク質またはペプチドは、したがって、それが天然に生じ得る環境を含まないタンパク質またはペプチドも指す。一般に、「精製された」は、分画に付されて様々な他の構成成分が除去されたタンパク質またはペプチド組成物を指し、この組成物は、その発現された生物学的活性を実質的に保持するであろう。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この命名は、タンパク質またはペプチドが、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれ超を構成する等、組成物の主要な構成成分を形成する組成物を指し得る。

【0172】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量化するための様々な方法は、本開示を踏まえることにより当業者に公知である。これらの方法は、例えば、活性画分の比活性の決定、またはSDS/PAGE解析による画分内のポリペプチドの量の評価を含む。画分の純度を評価するための好ましい方法は、画分の比活性を計算し、初期抽出物の比活性とこれを比較し、これにより、「精製倍率数」によって評価される、その中の純度の程度を計算することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、当然ながら、精製を

追跡するために選択された特定のアッセイ技法、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存し得る。

【0173】

タンパク質またはペプチドがその最も精製された状態で常に提供されることの一般要件はない。実際には、ある特定の実施形態では、実質的に精製度が低い産物が、有用性を有する場合があることが企図される。部分的な精製は、より少ない精製ステップを組み合わせる使用することにより、または同じ一般精製スキームの異なる形態を利用することにより達成することができる。例えば、HPLC装置を利用して行われたカチオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般に、低圧クロマトグラフィー系を利用した同じ技法よりも大きい「倍数」の精製をもたらすことが認められる。より低い程度の相対的精製を示す方法は、タンパク質産物の総回収量または発現されたタンパク質の活性の維持において利点を有することができる。

10

【0174】

親和性クロマトグラフィーは、単離しようとする物質と、それが特異的に結合することができる分子との間の特異的な親和性に頼るクロマトグラフィー手順である。これは、受容体-リガンド型の相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの一方を不溶性マトリックスに共有結合によりカップリングすることにより合成される。すると、カラム材料は、溶液から物質を特異的に吸着することができる。溶出は、結合が起こらないように条件を変化させることにより起こる（例えば、pH、イオン強度、温度等の変更）。マトリックスは、いかなる有意な程度にも分子を吸着しない、広範囲の化学的、物理的および熱安定性を有する物質となるべきである。リガンドは、その結合特性に影響を与えないような仕方でカップリングされるべきである。リガンドはまた、相対的に緊密な結合をもたらすべきである。試料またはリガンドを破壊することなく物質を溶出することが可能となるべきである。

20

【0175】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、溶液中の分子が、そのサイズまたはより専門的な用語では、その流体力学的容積に基づき分離されるクロマトグラフィー方法である。これは通常、タンパク質および工業用ポリマー等、大分子または高分子複合体に適用される。典型的には、水溶液が、カラムを通した試料の輸送に使用される場合、この技法は、ゲル濾過クロマトグラフィーとして公知であるのに対し、名称、ゲル浸透クロマトグラフィーは、移動相として有機溶媒が使用される場合に使用される。SECの根底にある原理は、異なる速度で固定相を通して異なるサイズの粒子が溶出（濾過）することである。これは、サイズに基づく粒子の溶液の分離をもたらす。全粒子が、同時にまたはほぼ同時にロードされるのであれば、同じサイズの粒子は、一緒に溶出するはずである。

30

【0176】

高速液体クロマトグラフィー（または高圧液体クロマトグラフィー、HPLC）は、化合物を分離、識別および定量化するために、生化学および分析化学において頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの一形態である。HPLCは、クロマトグラフィーパッキング材料（固定相）を保持するカラム、カラムを通して移動相（単数または複数）を動かすポンプ、および分子の保持時間を示す検出器を利用する。保持時間は、固定相、解析されている分子および使用されている溶媒（単数または複数）の間の相互作用に応じて変動する。

40

【0177】

VII. 医薬組成物

ポリペプチドまたは抗体を含有する医薬組成物の臨床適用が行われる場合、意図される適用に適切な医薬または治療組成物を調製することが一般に有益であり得る。一般に、医薬組成物は、薬学的に許容される担体に溶解または分散された、有効量の1種または複数のポリペプチドまたは追加的な作用物質を含むことができる。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、少なくとも約0.1%のポリペプチドまたは抗体を含むことができる。他の実施形態では、ポリペプチドまたは抗体は、例えば約2%～約75%の間の重

50

量の単位または約 25% ~ 約 60% の間、およびそこから導くことができるいずれかの範囲を含むことができる。各治療的に有用な組成物における活性化合物（単数または複数）の量は、いずれかの所定の単位用量の化合物の適した投与量が得られるような仕方で調製することができる。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品有効期間、ならびに他の薬理学的考察等の因子は、かかる医薬品製剤を調製する分野の当業者によって企図され、したがって、種々の投与量および処置レジメンが所望され得る。

【0178】

語句「薬学的または薬理学的に許容される」は、必要に応じてヒト等の動物に投与されたときに、有害、アレルギーまたは他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。参照により本明細書に組み込む Remington's Pharmaceutical Sciences、第 18 版、1990 年によって例示される通り、抗体または追加的な活性成分を含む医薬組成物の調製は、本開示を踏まえることにより当業者に公知であろう。さらに、動物（例えば、ヒト）投与のため、調製物が、FDA Office of Biological Standards によって要求される無菌性、発熱性、一般的安全性および純度標準を満たすべきであることが理解される。

【0179】

さらに、本発明のある特定の態様に従って、投与に適した組成物は、不活性希釈剤ありまたはなしの薬学的に許容される担体中に提供することができる。担体は、同化可能となるべきであり、液体、半固体、すなわち、ペーストまたは固体担体を含む。担体または希釈剤の例として、脂肪、油、水、生理食塩水溶液、脂質、リポソーム、樹脂、結合剤、フィラー等またはこれらの組合せが挙げられる。本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体」は、当業者に公知の通り、ありとあらゆる水性溶媒（例えば、水、アルコール/水溶液、エタノール、生理食塩水溶液、非経口的ビヒクル、例えば、塩化ナトリウム、リンゲルのデキストロース等）、非水性溶媒（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油および注射用有機エステル、例えば、エチルオレート）、分散媒、コーティング（例えば、レシチン）、界面活性剤、抗酸化剤、保存料（例えば、抗細菌剤または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル）、等張剤（例えば、糖、塩化ナトリウム）、吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン）、塩、薬物、薬物安定剤（例えば、緩衝液、アミノ酸、例えば、グリシンおよびリシン、炭水化物、例えば、デキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マンニトール等）、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、香料剤、色素、流体および栄養素補充薬、そのような材料およびこれらの組合せを含む。任意の従来の培地、作用物質、希釈剤または担体が、レシipientまたはそれが含有される組成物の治療有効性にとって有害である場合を除いて、本方法の実施における使用のための投与可能な組成物におけるその使用は適切である。医薬組成物における pH および様々な構成成分の正確な濃度は、周知のパラメータに従って調整される。本発明のある特定の態様に従って、組成物は、いずれかの簡便かつ実用的な様式で、すなわち、溶解、懸濁、乳化、混合、カプセル被包、吸収、粉碎等により、担体と組み合わせられる。かかる手順は、当業者にとってルーチンである。

【0180】

本発明のある特定の実施形態は、固体、液体またはエアロゾル形態で投与されるべきか、および注射等の投与経路のために無菌である必要があるかに応じて異なる種類の担体を含むことができる。組成物は、当業者に公知の通り、静脈内、皮内、経皮、くも膜下腔内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、腔内、直腸内、筋肉内、皮下、粘膜、経口、外用、局所的、吸入による（例えば、エアロゾル吸入）、注射による、注入による、持続注入による、標的細胞を直接浸す局在化灌流による、カテーテルによる、洗浄による、脂質組成物（例えば、リポソーム）における、または他の方法もしくは前述のいずれかの組合せによる投与のために製剤化することができる（例えば、参照により本明細書に組み込む Remington's

Pharmaceutical Sciences、第18版、1990年を参照)。典型的には、かかる組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして調製することができ；注射に先立つ液体の添加により溶液または懸濁液を調製するための使用に適した固体形態を調製することもでき；調製物は、乳化することができる。

【0181】

ポリペプチドは、遊離塩基、中性または塩形態で組成物中に製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基により生成される塩、あるいは例えば、塩酸もしくはリン酸等の無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸等の有機酸により生成される塩を含む。遊離カルボキシル基により生成された塩は、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムもしくは第二鉄等、無機塩基；またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンもしくはプロカイン等、有機塩基に由来することができる。

10

【0182】

さらなる実施形態では、本発明は、ポリペプチド、1種または複数の脂質および水性溶媒を含む医薬脂質媒体組成物の使用に関係することができる。本明細書において使用する場合、用語「脂質」は、水に特徴的に不溶性であり、有機溶媒で抽出することができる広範囲の物質のいずれかを含むと規定され得る。この広範なクラスの化合物は、当業者に周知であり、本明細書で用語「脂質」が使用される場合、いずれかの特定の構造に限定されない。例として、長鎖脂肪族炭化水素およびその誘導体を含む化合物が挙げられる。脂質は、天然起源または合成（すなわち、人の手により設計または産生）であり得る。しかし、脂質は通常、生物学的物質である。生物学的脂質は、本技術分野で周知であり、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質（lyso lipid）、スフィンゴ糖脂質、糖脂質、スルファチド（sulphatide）、エーテルおよびエステル連結した脂肪酸を有する脂質、重合可能脂質ならびにこれらの組合せを含む。当然ながら、当業者によって脂質として理解されている、特に本明細書に記載されている以外の化合物も、本組成物および方法によって包含される。

20

【0183】

当業者であれば、脂質ビヒクルにおける組成物の分散に用いることができる技法の範囲についてよく知っているであろう。例えば、ポリペプチドまたはその融合タンパク質は、脂質を含む溶液中に分散させ、脂質により溶解し、脂質により乳化し、脂質と混合し、脂質と組み合わせ、脂質に共有結合し、脂質における懸濁液として含有し、ミセルもしくはリポソームと共に含有もしくは複合体形成させ、または当業者に公知のいずれかの手段により他の仕方でも脂質もしくは脂質構造と会合させることができる。分散は、リポソームの形成をもたらしてももたらさなくてもよい。

30

【0184】

用語「単位用量」または「投与量」は、対象における使用に適した物理的に別々の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち、適切な経路および処置レジメンに関連して上に記す所望の応答を生じると計算された治療組成物の既定の量を含む。処置回数および単位用量の両方に従って投与すべき量は、所望の効果に依存する。患者または対象に投与される本実施形態の組成物の実際の投与量は、対象の体重、年齢、健康および性別、処置されている疾患の種類、疾患浸透の程度、以前のまたは同時発生的な治療介入、患者の特異性、投与経路、ならびに特定の治療用物質の効力、安定性および毒性等、身体的および生理的因子によって決定することができる。他の非限定例において、用量は、投与当たり約1マイクログラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重、約10マイクログラム/kg/体重、約50マイクログラム/kg/体重、約100マイクログラム/kg/体重、約200マイクログラム/kg/体重、約350マイクログラム/kg/体重、約500マイクログラム/kg/体重、約1ミリグラム/kg/体重、約5ミリグラム/kg/体重、約10ミリグラム/kg/体重、約50ミリグラム/kg/体重、約100ミリグラム/kg/体重、約200ミリグラム/kg/体重、約350ミリグラム/kg/体重、約500ミリグラム/kg/体重から約1000ミリグラム/kg/体重また

40

50

はそれ超およびそこから導くことができるいずれかの範囲を含むこともできる。ここに収載されている数から導くことができる範囲の非限定例において、約5ミリグラム/kg/体重～約100ミリグラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重～約500ミリグラム/kg/体重等の範囲を上述の数に基づき投与することができる。投与に責任がある医師は、いかなる場合でも、組成物における活性成分（単数または複数）の濃度および個々の対象に適切な用量（単数または複数）を決定し得る。

【0185】

本発明は、治療用調製物の特定の性質によって限定されることは意図されない。例えば、かかる組成物は、生理的に許容できる液体、ゲルまたは固体担体、希釈剤および賦形剤と一緒に製剤中に提供することができる。これらの治療用調製物は、飼育動物による等の獣医学的使用および他の治療剤と同様の様式でのヒトにおける臨床使用のために哺乳動物に投与することができる。一般に、治療有効性に必要とされる投与量は、使用の種類および投与機序、ならびに個々の対象の特定化された要件に応じて変動し得る。動物患者に投与される組成物の実際の投与量は、体重、状態の重症度、処置されている疾患の種類、以前のまたは同時発生的な治療介入、患者の特異性、および投与経路等、身体的および生理的因子によって決定することができる。投与量および投与経路に依存して、好まれる投薬量および/または有効量の投与の回数は、対象の応答に応じて変動し得る。投与に責任がある医師は、いかなる場合でも、組成物における活性成分（単数または複数）の濃度および個々の対象に適切な用量（単数または複数）を決定し得る。

【0186】

VIII. 処置方法

本発明のある特定の態様は、腫瘍等、疾患を処置するためのポリペプチドを提供する。特に、ポリペプチドは、ヒトポリペプチド配列を有することができ、よって、ヒト患者におけるアレルギー反応を防止し、反復投与を可能にし、治療有効性を増加させることができる。

【0187】

「処置」および「処置する」は、疾患または健康関連の状態の治療利益を得る目的で、対象への治療剤の投与もしくは適用、または対象における手順もしくはモダリティの実行を指す。例えば、処置は、がん細胞増殖を誘発することなくがん細胞にCDCを標的化する、薬学的有効量の抗体の投与を含むことができる。

【0188】

「対象」および「患者」は、霊長類、哺乳動物および脊椎動物等、ヒトまたは非ヒトのいずれかを指す。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0189】

用語「治療利益」または「治療上有効」は、本願を通して使用される場合、この状態の医学的処置に関して対象の福祉を促進または増強する任意のものを指す。したがってこうしたものとしては、疾患の徴候または症状の頻度または重症度の低下が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、がんの処置は、例えば、腫瘍サイズの低下、腫瘍侵襲性の低下、がん成長速度の低下、または転移の防止が関与し得る。がんの処置は、がんを有する対象の生存延長を指すこともできる。

【0190】

本処置方法が有用な腫瘍は、固形腫瘍または血液学的腫瘍に見出されるもの等、任意の悪性細胞型を含む。例示的な固形腫瘍として、脾臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭部、頸部、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、メラノーマ、前立腺および乳房からなる群から選択される臓器の腫瘍を挙げることができるがこれらに限定されない。例示的な血液学的腫瘍は、骨髄の腫瘍、TまたはB細胞悪性病変、白血病、リンパ腫、芽腫、骨髄腫等を含む。本明細書に提供されている方法を使用して処置することができるがんのさらなる例として、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、白血病、扁平上皮がん、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜のがん、肝細胞がん、胃（gastric）または胃（stomach）がん（胃腸管がんおよび胃腸管間質がんを含む）、脾がん、神

経膠芽腫、子宮頸部がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓または腎がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、様々な種類の頭頸部がん、メラノーマ、表在拡大型メラノーマ、悪性黒子メラノーマ、末端黒子型メラノーマ、結節性メラノーマおよびB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大腫瘤病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、ヘアリー細胞白血病、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）ならびに慢性骨髄芽球性白血病が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0191】

がんは、特に、次の組織学的な型のものであり得るが、これらに限定されない：新生物、悪性；癌腫；癌腫、未分化；巨細胞および紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；石灰化上皮（pilomatrix）癌；移行細胞癌；乳頭移行細胞癌；腺癌；ガストリノーマ、悪性；胆管細胞癌；肝細胞癌；肝細胞癌および胆管細胞癌の組合せ；線維柱帯腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫性ポリープにおける腺癌；腺癌、家族性大腸ポリポーシス；固形癌；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺胞（branchiolo-alveolar）腺癌；乳頭腺癌；嫌色素性癌；好酸球癌；好酸性腺癌；好塩基球癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞性腺癌；乳頭および濾胞性腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質癌；類内膜（endometroid）癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳道腺癌；粘膜表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭嚢胞腺癌；乳頭漿液性嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；粘液性腺癌；印環細胞癌；浸潤性乳管癌；髄様癌；小葉癌；炎症性癌；パジェット病、乳腺；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；腺癌w／扁平上皮異形成；胸腺腫、悪性；卵巣間質腫瘍、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫瘍、悪性；アンドロblastoma、悪性；セルトリ細胞癌；ライディッヒ細胞腫瘍、悪性；脂質細胞腫瘍、悪性；パラガングリオーマ、悪性；乳房外パラガングリオーマ、悪性；褐色細胞腫；血管球血管肉腫（glomangiosarcoma）；悪性メラノーマ；無色素性メラノーマ；表在拡大型メラノーマ；巨大色素性母斑における悪性メラノーマ；類上皮細胞メラノーマ；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胚性横紋筋肉腫；肺胞横紋筋肉腫；間質肉腫；混合腫瘍、悪性；ミューラー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；間葉腫、悪性；ブレunner腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚細胞腫；胚性癌；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛癌；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カボジ肉腫；血管外皮腫、悪性；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；歯源性腫瘍、悪性；エナメル上皮肉腫；アメロblastoma、悪性；エナメル芽細胞線維肉腫；松果体腫、悪性；脊索腫；神経膠腫、悪性；上衣腫；星状細胞腫；原形質星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠細胞芽腫（oligodendroblastoma）；原始神経外胚葉性；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；ニューロblastoma；網膜芽細胞腫；嗅覚神経原性腫瘍；髄膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫瘍、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン型；側肉芽腫；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞型、びまん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉腫；他の指定された非ホジキンリンパ腫；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；マスト細胞肉腫；免疫増生性小腸性疾患；白血病；リンパ系白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；マスト細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髄性肉腫；およびヘアリー細胞白血病。

20

30

40

【0192】

ポリペプチドは、本明細書において、腫瘍組織における補体活性化を誘発するためまたはそれが望ましいと考慮される場合に補体活性化を誘発するための、種々のモダリティにおける抗腫瘍剤として使用することができる。特定の実施形態では、本発明は、抗腫瘍剤

50

としてポリペプチドを使用する方法を企図し、したがって、腫瘍細胞成長の阻害に十分な期間、腫瘍細胞の集団を治療有効量のポリペプチドと接触することを含む。

【0193】

一実施形態では、*in vivo*での接触は、患者に本発明のポリペプチドを含む治療有効量の生理的に許容できる組成物を静脈内、腹腔内または腫瘍内注射により投与することにより達成される。ポリペプチドは、注射または時間をかけた漸進的注入により非経口的に投与することができる。ポリペプチドは、静脈内、腹腔内、経口、筋肉内、皮下、腔内、経皮、真皮投与することができ、蠕動手段によって送達することができる、または腫瘍細胞を含有する組織に直接注射することができる。

【0194】

ポリペプチドを含む治療組成物は従来、例えば単位用量の注射による等、静脈内投与される。用語「単位用量」は、治療組成物を参照して使用される場合、対象に対する単位投与量として適した物理的に別々の単位を指し、各単位は、要求される希釈剤、すなわち、担体またはビヒクルに関連して所望の治療効果を生じるように計算される既定の量の活性材料を含有する。

【0195】

組成物は、剤形と適合性の様式でかつ治療有効量で投与される。投与されるべき量は、処置されるべき対象、活性成分を利用する対象の系の能力、および所望の治療効果の程度に依存する。投与が必要とされる活性成分の正確な量は、医師の判断に依存し、各個体に特有である。しかし、全身性適用に適した投与量範囲は、本明細書に開示されており、投与経路に依存する。初回およびブースター投与に適したレジメンも企図され、初回投与に続く、その後の注射または他の投与による1または複数の時間間隔 (*hour interval*) での反復用量によって典型的に表される。例示的な複数の投与は、本明細書に記載されており、ポリペプチドの連続的に高い血清および組織レベルの維持に特に好ましい。あるいは、*in vivo*治療法に指定された範囲内の血中濃度の維持に十分な連続的静脈内注入が企図される。

【0196】

局所的に進行したまたは転移性がんを有するがん患者において、本発明のポリペプチドを全身または局所的に投与して、腫瘍細胞成長の阻害またはがん細胞の死滅等、疾患を処置することができることが企図される。これは、静脈内、くも膜下腔内および/または腹腔内投与することができる。これは、単独でまたは抗増殖薬と組み合わせて投与することができる。一実施形態では、これは、外科手術または他の手順に先立ち患者におけるがん負荷を低下するために投与することができる。あるいは、これは、いかなる残存するがん（例えば、外科手術が排除できなかったがん）も生存しないことを確実にするために、外科手術後に投与することができる。

【0197】

治療有効量のポリペプチドは、所望の効果を達成するように、すなわち、腫瘍組織においてCDCを誘発し、これにより、腫瘍切除炎症促進性応答を媒介するように計算された既定の量である。よって、本発明のポリペプチドの投与の投与量範囲は、腫瘍細胞分裂および細胞周期進行の症状が低下する所望の効果を生じるのに十分な多さの投与量範囲である。投与量は、過粘稠度症候群、肺水腫、うっ血性心不全、神経学的効果等、有害副作用を引き起こすほどに多くなるべきではない。一般に、投与量は、患者の年齢、状態、性別および患者における疾患の程度と共に変動し、当業者によって決定することができる。何らかの合併症の場合には、投与量は、個々の医師によって調整することができる。

【0198】

IX. 併用療法

ある特定の実施形態では、本実施形態の組成物および方法は、第2のまたは追加的な治療法と組み合わせたポリペプチドまたは抗体の投与が関与する。かかる治療法は、CDCに応答性のいずれかの疾患の処置において適用することができる。例えば、疾患は、がんであり得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 9 】

併用療法を含む方法および組成物は、治療もしくは保護効果を増強する、および／または別の抗がんもしくは抗過剰増殖療法の治療効果を増加する。治療および予防的な方法および組成物は、がん細胞の死滅および／または細胞過剰増殖の阻害等、所望の効果の達成に有効な組み合わせた量で提供することができる。このプロセスは、ポリペプチドまたは抗体および第2の治療法の投与が関与し得る。第2の治療法は、直接の細胞傷害性効果を有しても有さなくてもよい。例えば、第2の治療法は、直接の細胞傷害性効果がない、免疫系を上方調節する作用物質であり得る。組織、腫瘍または細胞は、作用物質（例えば、ポリペプチドまたは抗がん剤）のうち1種または複数を含む1種または複数の組成物または薬理学的製剤（単数または複数）に曝露することができ、あるいは組織、腫瘍および／または細胞を2種またはそれを超える別個の組成物または製剤に曝露することができ、1種の組成物が、1）ポリペプチドもしくは抗体、2）抗がん剤、または3）ポリペプチドもしくは抗体および抗がん剤の両方を提供する。また、かかる併用療法を、化学療法、放射線療法、外科療法または免疫療法と併せて使用することができることが企図される。

10

【 0 2 0 0 】

用語「接触される」および「曝露される」は、細胞に適用される場合、治療用ポリペプチドもしくは抗体および化学療法もしくは放射線療法剤が標的細胞に送達される、または標的細胞と直接並立して設置されるプロセスを説明するように本明細書において使用される。細胞死滅を達成するために、例えば、両方の作用物質が、細胞の死滅またはその分裂の防止に有効な組み合わせた量で細胞に送達される。

20

【 0 2 0 1 】

ポリペプチドまたは抗体は、抗がん処置と比べてその前に、その最中に、その後に、または様々な組合せで投与することができる。投与は、同時発生的から数分間から数日間から数週間に及び間隔であり得る。ポリペプチドまたは抗体が、抗がん剤とは別々に患者に与えられる実施形態では、一般に、2種の化合物が依然として、患者に対して、有利に組み合わせられた効果を発揮することができるように、各送達時の間でかなりの期間が経ち有効期限を越えてしまわなかったことを確実にするであろう。かかる場合、互いに約12～24または72時間以内に、より詳細には、互いに約6～12時間以内に、ポリペプチドおよび抗がん療法を患者に与えることができることが企図される。ある状況では、有意に処置の期間を延長することが望ましいことがあり、その場合、それぞれの投与間で数日間（2、3、4、5、6または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が経過する。

30

【 0 2 0 2 】

ある特定の実施形態では、処置の経過は、1～90日間またはそれを超えて（このかかる範囲は、介在する日数を含む）持続し得る。1種の作用物質は、1日目から90日目（このかかる範囲は、介在する日数を含む）のいずれかの日またはそのいずれかの組合せに与えることができ、別の作用物質は、1日目から90日目（このかかる範囲は、介在する日数を含む）のいずれかの日またはそのいずれかの組合せに与えられることが企図される。1日間以内（24時間期間）に、患者に、作用物質（単数または複数）の1回または複数回の投与を与えることができる。さらに、処置の経過後に、抗がん処置が投与されない期間を設けることが企図される。この期間は、その予後、強さ、健康等、患者の状態に依存して、1～7日間および／または1～5週間および／または1～12カ月間またはそれを超えて（このかかる範囲は、介在する日数を含む）持続することができる。必要に応じて処置サイクルが反復されることが予想される。

40

【 0 2 0 3 】

様々な組合せを用いることができる。下の例に関して、ポリペプチドまたは抗体は「A」であり、抗がん療法は「B」である：

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A		
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A		

50

【 0 2 0 4 】

患者への本実施形態のいずれかのポリペプチドまたは治療法の投与は、作用物質の毒性があるとすればそれを考慮に入れつつ、かかる化合物の投与の一般プロトコールに従い得る。したがって、一部の実施形態では、併用療法に起因し得る毒性をモニタリングするステップが存在する。

【 0 2 0 5 】

A . 化学療法

多種多様な化学療法剤を、本実施形態に従って使用することができる。用語「化学療法」は、がんを処置するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、がんの処置において投与される化合物または組成物を暗示するように使用される。これらの作用物質または薬物は、細胞内におけるその活性機序によって、例えば、これが細胞周期に影響を与えるか否かおよびいずれのステージでそれが為されるかによってカテゴリー化される。あるいは、作用物質は、DNAを直接架橋する、DNA内にインターカレートする、または核酸合成に影響を与えることにより染色体および有糸分裂異常を誘導するその能力に基づき特徴付けることができる。

【 0 2 0 6 】

化学療法剤の例として、チオテパおよびシクロホスファミド (cyclophosphamide) 等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン (piposulfan) 等のスルホン酸アルキル；ベンゾドパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドパ (meturedopa) およびウレドパ (uredopa) 等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド (triethylenephosphoramidate)、トリエチレン (triethylene) チオホスホラミドおよびトリメチロールメラミン (trimethylolomelamine) を含むエチレンイミンおよびメチロールメラミン (methylamelamine)；アセトゲニン (特に、プラタシンおよびプラタシノン (bullatacinone))；カンプトテシン (合成アナログトポテカンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン (callystatin)；CC - 1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン (carzelesin) およびピセレシン合成アナログを含む)；クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン (合成アナログ、KW - 2189 および CB 1 - TM 1 を含む)；エリテロピン；パンクラチスタチン (pancratistatin)；サルコジクチン (sarcodictyin)；スポンジスタチン (spongistatin)；クロラムブシル、クロルナファジン (chlornaphazine)、チオロホスファミド (thiolophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキサライド塩酸塩、メルファラン、ノベンビキン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミドおよびウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン (ranimustine) 等のニトロソウレア (nitrosourea)；エンジイン抗生物質 (例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシンガンマ 1 I およびカリチアマイシンオメガ 1 I) 等の抗生物質；ジネマイシン A を含むジネマイシン (dynemicin)；クロドロネート等のビスホスホネート；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質 (antibiotic) 発色団、アクラシノマイシン (aclacinomycin)、アクチノマイシン、アントラマイシン (anthracycline)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン (cactinomycin)、カルピシン (carubicin)、カルミノマイシン (carminomycin)、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン (chromomycin)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルビシン (モルフォリノ - ドキソルビシン、シアノモルフォリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ (pyrrolino) - ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン (esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシン C 等のマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロドル

10

20

30

40

50

ビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベ
 ニメクス、ジノスタチンおよびゾルピシン；メトトレキセートおよび5 - フルオロウラシ
 ル (5 - FU) 等の代謝拮抗薬；デノプテリン、プテロプテリンおよびトリメトトレキセー
 ト等の葉酸アナログ；フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprin
 e) およびチオグアニン等のプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウ
 リジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタ
 ビンおよびフロクスウリジン等のピリミジンアナログ；カルステロン (calusterone)、
 ドロモスタノロンプロピオン酸塩、エピチオスタノール、メピチオスタンおよびテストラ
 クトン等のアンドロゲン；ミトタンおよびトリロスタン等の抗副腎 (anti-adrenals)；
 フロリン酸 (frolinic acid) 等の葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミド (al
 dophosphamide) グリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベス
 トラブシル (bestrabucil)；ピサントレン (bisantrene)；エダトレキセート (edatrax
 ate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジコン (diaziquone)；エ
 ルフォルミシン (elformithine)；エリプチニウム (elliptinium) 酢酸塩；エポチロン
 ；エトグルシド；ガリウム硝酸塩；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン (loni
 dainine)；マイタンシンおよびアンサマイトシン (ansamitocin) 等のマイタンシノイド
 ；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール (mopidanmol)；ニトラエリン (ni
 traerine)；ペントスタチン；フェナメット (phenamet)；ピラルピシン；ロソキサント
 ロン (losoxantrone)；ポドフィリン酸 (podophyllinic acid)；2 - エチルヒドラジ
 ド；プロカルバジン；P S K 多糖複合体；ラゾキサン；リゾキシン (rhizoxin)；シゾフ
 ィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロ
 ロトリエチルアミン；トリコテシン (特に、T - 2 毒素、ベラキュリン (verracurin) A
 、ロリジン (roridin) A およびアングイジン (anguidine))；ウレタン；ビンデシン；
 ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガ
 シトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ar a - C」)；シクロホスファミド；タキ
 ソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタビン；6 - チオグアニン；
 メルカプトプリン；シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン等の白金配位
 複合体；ピンブラスチン；白金；エトポシド (VP - 16)；イホスファミド；ミトキサ
 ントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン (novantrone)；テニポシド；
 エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イ
 リノテカン (例えば、CPT - 11)；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフル
 オロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO)；レチノイン酸等のレ
 チノイド；カペシタビン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリカマイシン (plicomyc
 in)、ゲムシタビン (gemcitabien)、ナベルピン、ファルネシル - タンパク質トランス
 フェラーゼ (transferase) 阻害剤、トランス白金 (transplatinum)、ならびに上述のい
 ずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。

【0207】

B．放射線療法

DNA 損傷を生じる、広範に使用されてきた他の因子は、線、X 線および/または腫
 瘍細胞への放射性同位元素の定方向送達として一般的に公知のものを含む。マイクロ波、
 陽子線照射 (米国特許第 5, 760, 395 号および同第 4, 870, 287 号) および
 UV 照射等、他の形態の DNA 損傷因子も企図される。これらの因子の全てが、DNA、
 DNA の前駆体、DNA の複製および修復、ならびに染色体のアセンブリおよび維持にお
 ける広範囲の損傷に影響を与える可能性が最も高い。X 線の線量範囲は、延長された期間
 にわたる (3 ~ 4 週間) 50 ~ 200 レントゲンの一日線量から、2000 ~ 6000 レ
 ントゲンの単一線量に及ぶ。放射性同位元素の線量範囲は、広く変動し、同位元素の半減
 期、放射する放射線の強度および種類、ならびに新生物細胞による取込みに依存する。

【0208】

C．免疫療法

当業者であれば、本実施形態の方法と組み合わせてまたは併せて、免疫療法を使用する

ことができることを理解し得る。がん処置の文脈において、免疫療法は、一般に、がん細胞を標的および破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に頼る。リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))は、かかる一例である。例えば、イピリムマブ(ipilimumab)等、チェックポイント阻害剤は、別のかかる例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面におけるあるマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体は単独で、治療法のエフェクターとして機能することができる、または他の細胞を動員して、細胞死滅に実際に影響させることができる。抗体は、薬物または毒素(化学療法薬、放射性核種、リシン(ricin)A鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等)にコンジュゲートし、単に標的化作用物質として機能することもできる。あるいは、エフェクターは、直接的または間接的のいずれかで、腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞は、細胞傷害性T細胞およびNK細胞を含む。

10

【0209】

免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、標的することに受け入れられる、すなわち、他の細胞の大部分には存在しない、特定のマーカーを有する必要がある。多くの腫瘍マーカーが存在し、そのうちのいずれかが、本実施形態の文脈における標的化に適することができる。共通腫瘍マーカーは、CD20、癌胎児性抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbBおよびp155を含む。免疫療法の代替的な態様は、抗がん効果を免疫刺激効果と組み合わせることである。免疫刺激分子も存在し、次のものを含む：サイトカイン、例えば、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマ-IFN

20

【0210】

現在研究中または使用されている免疫療法の例は、免疫アジュバント、例えば、Mycobacterium bovis、Plasmodium falciparum、ジニトロクロロベンゼンおよび芳香族化合物(米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号;HuiおよびHashimoto、1998年;Christodoulidesら、1998年);サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、および、IL-1、GM-CSFならびにTNF(Bukowskiら、1998年;Davidsonら、1998年;Hellstrandら、1998年);遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2およびp53(Qinら、1998年;Austin-WardおよびVillaseca、1998年;米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号);ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗CD20、抗ガングリオシドGM2および抗p185(Hollander、2012年;Hanibuchiら、1998年;米国特許第5,824,311号)である。1種または複数の抗がん療法を、本明細書に記載されている抗体療法と共に用いることができることが企図される。

30

【0211】

D. 外科手術

がんを有する人のおよそ60%は、予防的、診断的または進行度診断的、根治的および姑息的外科手術を含むある種の外科手術を受ける。根治的外科手術は、がん性組織の全体または部分が物理的に除去される、切り取られるおよび/または破壊される切除を含み、本実施形態の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法および/または代替的治療法等、他の治療法と併せて使用することができる。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも部分の物理的除去を指す。腫瘍切除に加えて、外科手術による処置は、レーザー外科手術、凍結外科手術、電気外科手術および顕微鏡により制御された外科手術(モース外科手術)を含む。

40

【0212】

がん性細胞、組織または腫瘍の部分または全体を切り取ると、身体に腔が形成され得る。処置は、追加的な抗がん療法によるこの区域の灌流、直接注射または局所的適用により達成することができる。かかる処置は、例えば、1、2、3、4、5、6もしくは7日毎

50

に、または 1、2、3、4 および 5 週毎に、または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 もしくは 12 カ月毎に反復することができる。これらの処置はまた、変動する投与量のものとなることもできる。

【0213】

E．他の作用物質

本実施形態のある特定の態様と組み合わせて他の作用物質を使用して、処置の治療有効性を改善することができることが企図される。これらの追加的な作用物質は、細胞表面受容体および G A P 結合の上方調節に影響を与える作用物質、細胞分裂阻害および分化剤、細胞接着の阻害剤、アポトーシス誘導物質に対する過剰増殖細胞の感受性を増加させる作用物質、または他の生物学的作用物質を含む。G A P 結合の数を上昇させることによる細胞間シグナル伝達の増加は、隣接する過剰増殖細胞集団における抗過剰増殖効果を増加させるであろう。他の実施形態では、細胞分裂阻害または分化剤は、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用して、処置の抗過剰増殖有効性を改善することができる。細胞接着の阻害剤は、本実施形態の有効性を改善することが企図される。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ (F A K) 阻害剤およびロバスタチンである。抗体 c 2 2 5 等、アポトーシスに対する過剰増殖細胞の感受性を増加させる他の作用物質は、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用して、処置有効性を改善することができることがさらに企図される。

【0214】

X．キット

本発明のある特定の態様は、治療用キット等、キットを提供することができる。例えば、キットは、本明細書に記載されている 1 種または複数の医薬組成物と、任意選択で、その使用のための説明書とを含むことができる。キットは、かかる組成物の投与を達成するための 1 種または複数のデバイスを含むこともできる。例えば、対象キットは、医薬組成物と、がん性腫瘍への組成物の直接静脈内注射を達成するためのカテーテルとを含むことができる。他の実施形態では、対象キットは、送達装置による使用のための、任意選択で医薬品として製剤化されたまたは凍結乾燥されたポリペプチドの予め充填されたアンプルを含むことができる。

【0215】

キットは、ラベルを付けた容器を含むことができる。適した容器は、例えば、ボトル、バイアルおよび試験管を含む。容器は、ガラスまたはプラスチック等、種々の材料でできていてよい。容器は、上述のもの等、治療または非治療適用に有効なポリペプチドを含む組成物を保持することができる。容器のラベルは、組成物が、特異的な治療または非治療適用に使用されることを示すことができ、また、上述のもの等、*in vivo* または *in vitro* 使用のいずれかのための指示を示すこともできる。本発明のキットは、典型的には、上述の容器と、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、注射器および使用説明書を有する添付文書を含む、商業的および使用者の観点から望ましい材料を含む 1 種または複数の他の容器とを含み得る。

【実施例】

【0216】

X I．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示されている技法は、本発明者により、本発明の実施においてよく機能することが発見された技法であり、したがって、それを実施するための好ましいモードを構成するとみなすことができることが当業者には理解されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示されている特定の実施形態に多くの変更を行うことができ、それでもなお、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを理解するべきである。

【0217】

(実施例 1)

F c ドメインを操作するためのライブラリーの戦略

E . c o l i は、タンパク質グリコシル化機構をコードせず、したがって、E . c o l i のペリプラズムにおいて発現される I g G の F c ドメインはグリコシル化されておらず、通常は F c ドメインの N 2 9 7 に付加されているグリカンが欠く。非グリコシル化 F c ドメインは、立体構造上の柔軟性の程度が高く、その結果、エフェクター F c R (F c R I A 、 F c R I I A 、 F c R I I B 、 F c R I I c 、 F c R I I I A 、 F c R I I I B) および C 1 q への検出可能な結合が減弱するか、または検出可能な結合が存在しない (Jefferis ら、2 0 0 5 年 ; Borrok ら、2 0 1 2 年) 。 N 2 9 7 グリカンが存在しないにもかかわらず C 1 q への結合を可能にする変異を含有する非グリコシル化 F c ドメインバリエーションを単離するために、3 つの異なるライブラリーを構築した。第 1 のライブラリー (S - ライブラリー) では、約 5 0 % の野生型アミノ酸配列を保存するためのコドンを使用するスパイクしたオリゴヌクレオチドを使用して、G l u 2 3 1 、 L e u 2 3 2 、 L e u 2 3 3 、 G l y 2 3 4 、 G l y 2 3 5 、 I l e 3 3 4 、 S e r 3 3 5 、 L y s 3 3 6 、 A l a 3 3 7 、 L y s 3 3 8 、 G l y 3 3 9 、 G l n 3 4 0 、 P r o 3 4 1 、 A r g 3 4 2 、および G l u 3 4 3 にランダムなアミノ酸を導入した (Lanio ら、1 9 9 8 年) 。これらのランダムな 1 5 アミノ酸を導入するために、8 種のプライマー (配列番号 2 4 ~ 3 1) を設計した (表 1 5) 。第 2 のライブラリー (S E - ライブラリー) は、エラープロードン P C R を使用して、S - ライブラリーに基づいて追加的なランダム変異体を有する (Fromant ら、1 9 9 5 年) 。S - ライブラリーの C H 2 ドメインに追加的なランダム変異を導入するために、2 種のプライマー P C H 0 1 8 (配列番号 2 6) および P C H 0 2 3 (配列番号 3 1) を設計した。第 3 のライブラリー (E - ライブラリー) を構築するために、野生型 F c 鋳型および 2 種のプライマー P C H 0 1 8 (配列番号 2 6) および P C H 0 2 1 (配列番号 2 9) を使用した標準のエラープロードン P C R を用いた。

【 0 2 1 8 】

(実施例 2)

F c ドメインを操作するためのライブラリーの構築

全てのプラスミドおよびプライマーを表 1 0 および 1 1 に記載する。プライマーは全て、I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s により合成されたものである。I g G ポリペプチドを、2 種のベクター : p B A D 3 0 - P e l B - V L - C k - N l p A - V L - C k - H i s - c M y c および p M o p a c 1 2 - p e l B - I g G - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 - F L A G (Jung ら、2 0 1 2 年) を使用して E . c o l i の内膜上にディスプレイさせた (図 1) 。S - ライブラリーを構築するために、8 種のプライマー (配列番号 2 4 ~ 3 1) を使用した (表 1 5 および図 2) 。8 種のプライマーの中で 2 種の特異的なプライマー (P C H 0 1 7 および P C H 0 2 0 ; それぞれ配列番号 2 5 および 2 8) は、野生型アミノ酸配列をおよそ 5 0 % の可能性で保存するため、スパイクしたオリゴヌクレオチドを使用することで縮重コドンを含む。I g G 1 の重鎖遺伝子の 3 つの断片を、P C H 0 1 6 (配列番号 2 4) および P C H 0 2 1 (配列番号 2 9) と重複する 8 種のプライマーを用いて増幅した (S - ライブラリー、表 1 5 および図 2) 。別のサブライブラリーのために、S - ライブラリーからの F c ライブラリー遺伝子を有する C H 2 ドメインに対して、P C H 0 1 8 (配列番号 2 6) および P C H 0 2 3 (配列番号 3 1) を用いて標準のエラープロードン P C R を用いた (S E - ライブラリー) 。結果として、S E - ライブラリーは、S - ライブラリー構築の間に生成した 1 5 個のランダムなアミノ酸、および C H 2 ドメインに追加的な 1 % ランダム変異を含む。E - ライブラリーに関しては、野生型 F c 遺伝子を有する F c ドメインに対して、P C H 0 1 8 (配列番号 2 6) および P C H 0 2 1 (配列番号 2 9) を用いて標準のエラープロードン P C R を用いた。3 つの増幅された重鎖ライブラリー遺伝子を、S f i I 消化した細菌ディスプレイベクター、p M o p a c 1 2 - p e l B - I g G - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 - F L A G にインフレームでライゲーションした。得られたプラスミドを E . c o l i J U D E - 1 - p B A D 3 0 - P e l B - V L - C k - N l p A - V L - C k - H i s - c M y c 中に形質転換した (Jung ら、2 0 1 0 年 ; Jung ら、2 0 1 2 年) 。サブライブラリ

ーのサイズは、 2×10^8 (S - ライブラリー)、 3×10^8 (SE - ライブラリー)、および 1×10^9 (E - ライブラリー) であった。

【0219】

(実施例3)

C1q、二量体FcR、四量体FcR、および二量体FcRnの調製

ヒト血清由来のC1qタンパク質をAbcamから購入した。Fc受容体の哺乳動物での発現のためのプラスミドを以前に記載されている通り構築した(Jungら、2012年)。FcRI-His、FcRIIa-H₁₃₁-GST、FcRIIa-R₁₃₁-GST、FcRIIb-GST、FcRIIa-V₁₅₈-GST、FcRIIa-F₁₅₈-GST、およびFcRIIa-V₁₅₈-ストレプトアビジン(FcRIIa-V₁₅₈-SA)、ならびにFcRn-GSTを、表16に記載されているpMAZ-IgH(米国特許第8,043,621号)に由来する発現ベクターを使用したHEK293F細胞(Invitrogen)の一過性トランスフェクションによって作製した。トランスフェクトしたHEK293F細胞を、5%CO₂インキュベーター中、37℃で5日間培養した。4,000×gで10分間遠心分離することによって上清を採取し、0.22μmのポリエーテルスルホン(PES)メンブランフィルター(PALL)によって濾過した。FcRI-Hisを、Ni-NTA(GE Healthcare)アフィニティークラムを用い、製造者の説明書に従って精製した。Fc受容体-GST融合タンパク質を、グルタチオンセファロース(GE Healthcare)アフィニティークラムを用い、製造者の説明書に従って精製した。FcRIIa-V₁₅₈-SAを、Strep-Tactin(IBA-Life Science、Germany)アフィニティークラムを用い、製造者の説明書に従って精製した。リボ多糖(LPS)および非特異的に結合したタンパク質を除去するために、FcR結合樹脂を、0.1%Triton(登録商標)X-114(Sigma-Aldrich)を含有するPBS、50mLおよびPBS、50mLを用いて洗浄した。FcRI-Hisを、250mMのイミダゾールを含有するPBSを用いて溶出し、Fc受容体-GSTを、10mMの還元型L-グルタチオンを含有するPBSを用いて溶出し、FcRIIa-V₁₅₈-SAを、溶出緩衝液(pH8.0、100mMのトリス-HCl、150mMのNaCl、2.5mMのデスチオピオチン、および1mMのEDTA)を用いて溶出した。全ての溶出したFc受容体の緩衝液をAmicon Ultra-4(Millipore)によってPBSと交換した。ヒトC1q(Abcam)または精製FcRIIa-V₁₅₈-SAをEasy Link R-PE Conjugation Kit(Abcam)を製造者の説明書に従って使用して、R-フィコエリトリン(R-PE)で標識した。

【0220】

(実施例4)

C1q結合についてのFcライブラリーのスクリーニング

E.coli JUDE-1を、クロラムフェニコール(40μg/mL)およびカナマイシン(50μg/mL)を伴うTerrific Broth(TB)中、37℃、250rpmで一晩培養した。一晩育成させた後、細胞を、2種の抗生物質を伴う新鮮なTB培地100mL中、1:50に希釈した。E.coli JUDE-1細胞を37℃、250rpmでOD₆₀₀がおよそ0.4の値に達するまで培養した。次いで、タンパク質の発現を容易にするために、1mMのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG、Sigma Aldrich)および2%L-アラビノース(Sigma Aldrich)をE.coli JUDE-1細胞に添加し、次いで、E.coli JUDE-1細胞を25℃で20時間さらにインキュベートした。E.coli JUDE-1細胞(8mL)を遠心分離によって収集し、氷で冷却した10mMのトリス-HCl(pH8.0)、1mLで2回洗浄した。洗浄した細胞を氷で冷却したSTE溶液(0.5Mのスクロース、10mMのトリス-HCl、10mMのEDTA、pH8.0)、1mLに再懸濁させ、37℃で30分間インキュベートした。細胞を13,000rpm

mで1分間遠心分離し、溶液A(0.5Mのスクロース、20mMのMgCl₂、10mMのMOPS、pH6.8)、1mLで洗浄した。洗浄した細胞を、溶液A、1mL中、1mg/mLのニワトリ卵白リゾチーム(Sigma-Aldrich)と一緒に37で15分間インキュベートした。13,000rpmで1分間遠心分離した後、ペレット化したスフェロプラストを冷たいPBS、1mLに再懸濁させた(Jungら、2010年; Jungら、2012年)。

【0221】

スクリーニングのための標的タンパク質の最適な濃度を決定するために、スフェロプラストを、10nMのヒトC1q-PEまたは10nMのFcγRIIIa_{v158}-SA-PEで標識した。対照として、PADメイン4を発現するスフェロプラスト(Leysathら、2009年)を高親和性のグリコシル化抗PA抗体M18と一緒にインキュベートした。対照グリコシル化M18 IgGに結合したスフェロプラストは、C1qでの標識後に、非標識対照スフェロプラストと比較して、非常に高いシグナルを示した(図3A; 表3)。

【0222】

C1qは、E. coliの外膜上に発現するリポ多糖(LPS)に結合する能力を有する(Zohairら、1989年)。予測通り、全てのスフェロプラストにおいて、抗LPS IgG-PE(Abcam)によりLPSが検出された(図3B; 表3)。LPSへのC1qのバックグラウンド結合を排除するために、いくつかの異なる緩衝液を試験し、高塩濃度(50mMのリン酸、330mMのNaCl、pH7.4)により、C1q-PEとLPSの相互作用が阻害されることが見出された。IgGは、この高塩濃度の緩衝液条件下でC1qに対して正常な結合を示す(図3C; 表3)。次に、3つのFcライブラリーからの非グリコシル化IgGまたはグリコシル化M18 IgGをディスプレイするスフェロプラストのFcγRIIIa_{v158}-SA-PE結合能を調査した。10nMのFcγRIIIa_{v158}-SA-PEを用いた標識条件下では、グリコシル化M18 IgGをディスプレイするスフェロプラストでは結合シグナルが示されたが、非グリコシル化IgGまたは3つのFcライブラリーをディスプレイするスフェロプラストでは結合シグナルは示されなかった(図3D; 表3)。

【表3】

表 3. C1q または FcγRIIIa を用いた標識条件を確認するための FACS 解析(データは、図 3A ~D に対応する)

	平均蛍光強度(MFI)			
	図 3A	図 3B	図 3C	図 3D
非標識スフェロプラスト	1.03	1.88	3.35	5.40
非グリコシル化 IgG	1084	114	14.9	6.44
グリコシル化 M18 IgG	817	144	105	25.1
S-ライブラリー	1172	134	14.3	5.93
SE-ライブラリー	2417	134	12.7	4.63
E-ライブラリー	1184	217	16.0	5.62

【0223】

C1qに特異的な非グリコシル化IgGバリエーションを単離するために、実施例1および2に記載の3つのサブライブラリーを発現する細胞を、競合剤として1μMのFcγRの存在下、10nMのC1q-PEで標識し、FACS Aria(商標)(BD Biosciences)でスクリーニングした。各ラウンドにおいて、最も高い蛍光を示す集団の上位1%を回収し、これらのスフェロプラストを再選別して偽陽性をすぐに除去した。選別されたスフェロプラスト中の重鎖遺伝子を、5分間煮沸した後、2種のプライマー(PC16およびPC21)を使用してPCRによってレスキューし、SfiIにより切断したpMopac12ベクターにライゲーションした。ライゲーションしたプラスミ

ドをE . c o l i J U D E - 1細胞中に形質転換した。クロラムフェニコール含有培地およびカナマイシン含有培地において形質転換体を選択し、次のラウンドのスクリーニングのためにスフェロプラストを調製した。10 nMのC1q - P Eを用いて7ラウンドのスクリーニングを行った(図4A)。C1q結合I g GバリエーションおよびF c R I I I a結合I g Gバリエーションを単離するために、3つのサブライブラリーを、10 nMのC1q - P Eまたは10 nMのF c R I I I a_{v158} - S A - P Eを用い、同じ方法で逐次的にスクリーニングした。スクリーニングの第1ラウンド、第3ラウンド、第5ラウンド、および第7ラウンドは10 nMのC1q - P Eを用いて行い、スクリーニングの第2ラウンド、第4ラウンド、および第6ラウンドは10 nMのF c R I I I a_{v158} - S A - P Eを用いて行った(図4B)。

10

【0224】

(実施例5)

I g GバリエーションのFACS解析

C1q - P Eを用いてスクリーニングしたライブラリーからの選別の最後のラウンドからランダムに選択した12種のI g Gバリエーションについて配列決定した(配列番号2 ~ 13)。同様に、C1q - P EおよびF c R I I I a_{v158} - S A - P Eを用いてスクリーニングしたライブラリーからランダムに選択した10種のI g Gバリエーションについて配列決定した(配列番号14 ~ 23)。それぞれの遺伝子をE . c o l i J U D E - 1細胞中に形質転換し、それを、スフェロプラスト化し、10 nMのC1q - P Eおよび10 nMのF c R I I I a_{v158} - S A - P Eを用いてFACSによって解析した。図5および表4に示されている通り、22種のI g Gバリエーション全てで、C1qに関して、野生型非グリコシル化I g Gと比較して2.4 ~ 11.3倍の平均蛍光強度(MFI)値の増大が示された。特に、F c 801、F c 802、およびF c 803では、C1qに関して、野生型非グリコシル化I g Gと比較してそれぞれ11.3 . 1倍、56 . 5倍、および92 . 8倍のMFI値の増大が示された。さらに、これらの3種のI g Gクローンは、10 nMのF c R I I I a_{v158} - S A - P Eに対して、F c R I I I aに対する親和性を有さない非グリコシル化I g Gと比較的類似したMFI値が示された。さらに、F c 702、F c 713、F c 720、およびF c 805では、10 nMのF c R I I I a_{v158} - S A - P Eを用いて標識した場合には、野生型非グリコシル化I g Gと比較して、それぞれ3 . 4倍、3 . 2倍、4倍、および4 . 8倍のMFI値の増強が示され、C1q - P Eに関しては野生型非グリコシル化I g Gと比較して24 . 6 ~ 48 . 6倍のMFI値の増強が示された(図5)。F c 801およびF c 802をさらなる試験のために選択した。F c 801は2つの変異、K320EおよびQ386Rを有し、F c 802は4つの変異、L235K、G236M、G237R、およびL351Qを有する。C1qおよびF c R I I I aに対する結合物質としてF c 805が選択され、これは8つの変異、V308A、S337P、K338Q、K340R、Q342P、R344G、E345Y、およびF372Lを有することが見出された。

20

30

【表 4】

表 4. 単離された 22 種の IgG バリエントと C1q-PE または Fc γ RIIIa-SA-PE の FACS を使用した結合解析(データは、図 5 に対応する)

	C1q-PE		Fc γ RIIIa 158V-SA-PE	
	MFI	増大倍率	MFI	増大倍率
Aglyco IgG	54.7	1	36.6	1
Fc701	2011	36.76	81.8	2.23
Fc702	1545	28.24	123	3.36
Fc703	2629	48.06	51	1.39
Fc704	2362	43.18	99.5	2.72
Fc705	1456	26.62	72.4	1.98
Fc801	6186	113.09	57.7	1.58
Fc707	2447	44.73	73.5	2.01
Fc708	1478	27.02	77.2	2.11
Fc802	3091	56.51	57.5	1.57
Fc710	2680	48.99	65.5	1.79
Fc711	2251	41.15	90.3	2.47
Fc712	2521	46.09	86.7	2.37
Fc713	1345	24.59	116	3.17
Fc714	1396	25.52	89.2	2.44
Fc715	1699	31.06	107	2.92
Fc716	1444	26.4	111	3.03
Fc717	2153	39.36	90.7	2.48
Fc719	1430	26.14	107	2.92
Fc803	5078	92.83	54.5	1.49
Fc720	2657	48.57	145	3.96
Fc805	2170	39.67	175	4.78
Fc722	1308	23.91	64.8	1.77

【 0 2 2 5 】

(実施例 6)

選択された I g G バリエントの発現および精製

I g G を哺乳動物発現ベクター p c D N A 3 . 4 (L i f e t e c h n o l o g i e s 、 U S A) に G i b s o n A s s e m b l y (登録商標) クローニングキット (N E B) を使用してインフレームでクローニングした (Jung ら、 2 0 1 2 年) 。 F c が F c 8 0 1 、 F c 8 0 2 、 および F c 8 0 5 で置き換わったリツキシマブを構築するために、 3 種の F c 遺伝子を、 p M o p a c 1 2 - p e l B - I g G - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 - F L A G からプライマー P C H 0 0 1 (配列番号 3 2) および T H 0 8 4 (配列番号 3 3) を使用して増幅した。 3 種の F c 遺伝子を、 p c D N A 3 . 4 へのクローニングのためにプラスミド p c D N A 3 . 4 - リツキシマブ重鎖を D N A 鋳型として使用して P C R によって増幅した。 D p n I (N E B 、 U K) を用いて処理した後、 P C R 産物を E . c o l i J U D E - 1 細胞中に形質転換し、それらの配列を確認した。新しく構築されたリツキシマブ - F c バリエントを R G I (F c 8 0 2) 、 R G I I (F c 8 0 1) 、 および R G I I I (F c 8 0 5) と名付けた。これらの 3 種の F c バリエントは、なお C H 2 ドメインに N - グリコシル化部位を有する。それらの非グリコシル化形式を構築するために、以前に記載されている通り (Jung ら、 2 0 1 2 年) 、 2 つの特異的なプライマー (W K 6 8 (配列番号 3 4) および W K 6 9 (配列番号 3 5)) を使用して、 F c ドメインの F c R または C 1 q との結合能に影響を及ぼさない T 2 9 9 L 変異を導入した。これらの新しく構築されたリツキシマブ - F c バリエントを、新しく R A I (F c 8 0 2) 、 R A I I (F c 8 0 1) 、 および R A I I I (F c 8 0 5) と名付けた。 R A I 、 R A I I 、 および R A I I I の重鎖遺伝子を、等質量の軽鎖プラスミドを用いて H E K 2 9 3 F 細胞 (I n v i t r o g e n) に一過性にトランスフェクトした。 5 % C O ₂ インキュベ

ーター中、37℃で6日間インキュベートした後、4,000×gで10分間遠心分離することによって上清を採取し、0.22 μmのPESメンブランフィルター(PALL)を使用して濾過した。濾過した上清を、プロテインA大容量アガロース樹脂(Thermo Scientific)を3回通過させた。LPSおよび非特異的に結合したタンパク質を除去するために、IgG結合樹脂を0.1% Triton(登録商標)X-114(Sigma-Aldrich)を含有するPBS、50 mLおよびPBS、50 mLで洗浄した。全てのIgGバリエーションを、100 mMのグリシン緩衝液(pH 3.0)を用いて溶出し、1 Mのトリス-HCl緩衝液(pH 8.0)を用いてすぐに中和した。溶出したリツキシマブ-Fcバリエーションの全ての緩衝液をAmicon(登録商標)Ultra-4(Millipore)によってPBSと交換した。RAI、RAII、およびRAIIIおよびリツキシマブの還元タンパク質または非還元タンパク質の純度を、還元条件下(図6A)および非還元条件下(図6B)で4%~20%勾配SDS-PAGEゲル(NuSep)によって査定した。リツキシマブと同様に、RAI、RAII、およびRAIIIは適正にアセンブルされ、純度は95%を超えた。RAI、RAII、およびRAIIIが溶液中で単量体として存在するか多量体として存在するかを決定するために、RAI、RAII、RAIII、およびリツキシマブをサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex(商標)200 10/300 GC、GE Healthcare)によって解析した。サイログロブリン(670 kDa)、ウシガンマグロブリン(158 kDa)、およびニワトリオボアルブミン(44 kDa)をタンパク質サイズマーカーとして使用した。RAI、RAII、およびRAIIIの溶出プロファイルはリツキシマブと同様であり、凝集体のピークはなかった。全てのIgGバリエーションの溶出時間は158 kDaタンパク質サイズマーカーと近く、したがって、単量体IgGの存在が示される(図7)。結果から、RAI、RAII、およびRAIIIが溶液中で多量体IgGを構成せず、アセンブルされた単量体として存在することが示唆される。

【0226】

(実施例7)

選択されたIgGバリエーションのC1q、Fc R、およびFc Rnに対する結合性質RAI、RAII、およびRAIIIのC1qおよびFc Rに対する親和性を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)および表面プラズモン共鳴(SPR)を使用して評価した。

【0227】

RAI、RAII、およびRAIIIのFc Rを用いたELISA測定: 1 μgのRAI、RAII、RAIII、非グリコシル化リツキシマブ、およびグリコシル化リツキシマブを96ウェルEIA/RIAプレート(Qiagen)上に4℃で一晩にわたってコーティングし、プレートを、0.05% Tween(登録商標)20(PBST)を含有するPBSで3回洗浄した。プレートを、PBS中3%脱脂乳を用いて室温で1時間ブロッキングし、PBSTで3回洗浄した。次いで、50 nMおよび500 nMの単量体Fc RI、二量体Fc RIIaR131、二量体Fc RIIaH131、二量体Fc RIIb、二量体Fc RIIIIaV131、および二量体Fc RIIIIaF131をプレートに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをPBSTで洗浄し、1:5000のヤギ抗Hisまたは抗GST HRP(GE Healthcare)を含有するPBS、50 μLと一緒に1時間インキュベートした。PBSTで3回洗浄した後、TMB基質50 μLをウェル(Thermo Scientific)ごとに添加し、1 MのH₂SO₄、50 μLを添加して中和し、450 nmにおける吸光度を記録した。RAIおよびRAIIでは、いずれのFc Rとの結合シグナルも示されなかったが、RAIIIでは、Fc RIIb以外の全てのFc Rと同様またはわずかに低下した結合強度が示された(図8A~F)。

【0228】

SPR測定: SPR測定をBiacore(登録商標)3000(GE Healthcare)計器で実施した。ウシ血清アルブミン(BSA)をCM5センサーチップの参

10

20

30

40

50

照チャンネル内に固定化して緩衝液の影響および非特異的結合シグナルを差し引いた。リツキシマブ、RAI、RAII、RGI、およびRGUIをpH5.0においてアミンカップリングによってCM5センサーチップ上に固定化した。段階的に希釈したC1q (1 nM ~ 40 nM)、単量体Fc RI (1 nM ~ 40 nM)、二量体Fc RIIa_{R131} (50 nM ~ 400 nM)、二量体Fc RIIa_{H131} (50 nM ~ 400 nM)、二量体Fc RIIb (100 nM ~ 1000 nM)、二量体Fc RIIIIa_{V131} (50 nM ~ 400 nM)、および二量体Fc RIIIIa_{F131} (50 nM ~ 400 nM)をCM5チップに30 µL / 分で2分間注入した。各結合事象後に10 mMのグリシン (pH3.0)を接触時間1分で用いてチップを再生させた。得られたセンサーグラムを、Biaevaluation 3.0ソフトウェアを使用し、C1qについてはグローバル2状態結合モデルを用い、単量体Fc RIについては1:1ラングミュア等温線モデルを用い、二量体Fc Rについては二価モデルを用いてフィッティングした (図9A~Dおよび10;表5~6)。興味深いことに、RAIでは、SPR解析からC1q特異的結合プロファイルが示されたが、RAIのグリコシル化バージョンであるRGIではC1q結合能が失われた。RAIの全体的なK_Dは145 ± 1 pMであり、野生型リツキシマブの159倍の増大である (図9A~B;表5)。RAIIでも同様にSPR解析からC1q特異的結合プロファイルが示されたが、RAIIとは異なり、RAIIのグリコシル化バージョンであるRGUIは、C1q結合能を維持し、Fc RIに対する親和性を有した。RAIIの全体的なK_Dは108 ± 1 pMであり、野生型リツキシマブの213倍である (図9AおよびC;表5)。RGUIのK_DはC1qに対して385 ± 4 pMであり、野生型リツキシマブの60倍である (図9AおよびD;表5)。RGUIはまた、Fc RIに対して648 ± 16 nMのK_Dも有した (図10;表6)。他のFc Rについては、応答はなかった (表6)。

10

20

表 5. リツキシマブ、RAI、RAII、RGI、および RGII の C1q との動態学的性質および表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーグラム (データは、図 9A~D に対応する)

	k_{on1} (1/Ms)	k_{off1} (1/s)	k_{on2} (1/RU)	k_{off2} (1/s)	K_{D1}	K_{D2}	K_D^a (nM)	倍率 ^b	χ^2
リツキシマブ	1.80×10^5	4.75×10^{-2}	1.03×10^{-2}	9.84×10^{-4}	2.64×10^{-4}	9.55×10^{-2}	23.0 ± 0.8	1	3.44
RAI	5.36×10^6	2.33×10^{-2}	1.15×10^{-3}	3.96×10^{-4}	4.35×10^{-9}	3.44×10^{-2}	0.145 ± 0.001	159	0.925
RGI	検出可能な応答なし								
RAII	2.98×10^6	1.49×10^{-2}	9.11×10^{-3}	2.01×10^{-4}	5.00×10^{-9}	2.21×10^{-2}	0.108 ± 0.001	213	1.05
RGII	7.54×10^5	2.34×10^{-3}	1.62×10^{-3}	2.29×10^{-4}	3.10×10^{-9}	1.41×10^{-1}	0.385 ± 0.004	60	1.21

K_D^a = SPR データのグローバル 2 状態結合フィッティングからの $K_{D1}/(1+1/K_{D2})$
倍率^b = K_D (ネイティブ IgG1)/ K_D (IgG バリアント)

【表 6】

表 6. 単量体 FcγRI に対する RGII の動態学的値(データは、図 10 に対応する)	単量体 FcγRI			二量体 FcγRIIa、FcγRIIb、および FcγRIIIa
	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	K _D (nM)	
RAI				検出可能な応答なし
RGI				検出可能な応答なし
RAII				検出可能な応答なし
RGII	2.27 × 10 ³	1.47 × 10 ⁻³	648 ± 16	2.45 検出可能な応答なし

【 0 2 2 9 】

RA801 および RA802 の pH 依存性結合を解析するために、FcRn - GST 融合タンパク質 (730 nM) を CM5 チップに 30 μl / 分の pH 7.4 の HBS - EP (GE - Healthcare) で 90 秒間注入した。各結合事象後に 10 mM のグリシン pH 3.0 を接触時間 1 分で用いてチップを再生させた。単量体 FcRn (50 ~ 40

10

20

30

40

50

0 nM)を用いたSPR測定はCM5チップにpH6.0のPBSを30 μ l/分で90秒間注射し、各結合事象後に10 mMのグリシン、pH3.0を1分間用いてチップを再生させた。RAIおよびRAIIではpH依存性結合性質が示された。pH6.0におけるRAIの K_D はFcRnとで 110 ± 8 nMであり、野生型リツキシマブの5.66倍の増大である(図18B;表7)。pH6.0におけるRAIIのFcRnとの K_D は 959 ± 69 nM、または野生型リツキシマブの0.65倍である(図18C;表7)。pH7.4では結合は観察されなかった(図18D;表7)。

【表7】

表7. RAIおよびRAIIのFcRnに対する動態学的値(データは、図18に対応する)

	pH6.0における単量体 FcRn				pH7.4における二量体 FcRn			
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)	χ^2	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)	χ^2
リツキシマブ	8.32×10^5	4.91×10^{-1}	623 ± 35	1.59	検出可能な応答なし			
RAI	3.92×10^5	4.23×10^{-2}	110 ± 8	1.77	検出可能な応答なし			
RAII	5.81×10^5	5.39×10^{-1}	959 ± 69	2.49	検出可能な応答なし			

【0230】

RAIIIのSPR測定：同じ方法を使用して、RAIIIを固定化した後、段階的に希釈したC1qおよびFcRをCM5センサーチップに注入した。上記と同じ方法を使用してSPRセンサーグラムをフィッティングした。RAIIIは、C1qおよびFcRIIb以外のFcRに対して以下の通り親和性を有した：C1qに対して 1.60 ± 0.03 nM(図11A;表8)、単量体FcRIに対して 13.4 ± 0.4 nM(図11B;表8)、二量体FcRIIa_{R131}に対して 127 ± 1 nM(図11C;表8)、二量体FcRIIa_{H131}に対して 102 ± 2 nM(図11D;表8)、二量体FcRIIIa_{V131}に対して 79.8 ± 0.9 nM(図11E;表8)、および二量体FcRIIIa_{F131}に対して 390 ± 8 nM(図11F;表8)。表9は、ネイティブIgG1と比較したIgGバリエーションの結合プロファイルの要約を示す。

10

20

【表 8】

表 8. RAIII の C1q および FeγR に対する SPR 結果(データは、図 11A～F に対応する)

	k _{on} 1 (1/Ms)	k _{off} 1 (1/s)	k _{on} 2 (1/RU)	k _{off} 2 (1/s)	K _{D1}	K _{D2}	K _D ^a (nM)	χ ²
C1q	3.83 × 10 ⁵	4.33 × 10 ⁻³	1.35 × 10 ⁻²	2.22 × 10 ⁻³	1.13 × 10 ⁻⁸	1.64 × 10 ⁻¹	1.60 ± 0.03	1.78
単量体 FeγIa	6.85 × 10 ⁴	9.15 × 10 ⁻⁴					13.4 ± 0.35	2.62
二量体 FeγIIa _{RI31}	4.05 × 10 ⁴	5.73 × 10 ⁻³	2.08 × 10 ⁻⁵	1.89 × 10 ⁻⁴	1.41 × 10 ⁻⁷	9.09	127 ± 1	0.685
二量体 FeγIIa _{HI31}	7.40 × 10 ³	1.72 × 10 ⁻³	1.55 × 10 ⁻⁵	1.22 × 10 ⁻⁵	2.32 × 10 ⁻⁷	7.87 × 10 ⁻¹	102 ± 2	1.62
二量体 FeγIIb	検出可能な応答なし							
二量体 FeγIIIa _{VI57}	2.85 × 10 ⁴	2.52 × 10 ⁻³	0.047	0.436	8.84 × 10 ⁻⁸	9.28	79.8 ± 0.9	1.09
二量体 FeγIIIa _{FI57}	1.37 × 10 ³	1.34 × 10 ⁻²	6.96 × 10 ⁻³	2.89 × 10 ⁻⁴	9.78 × 10 ⁻⁶	4.15 × 10 ⁻²	390 ± 8	2.10

K_D^a = SPR データのグローバル 2 状態結合フィッティングまたは二価モデルフィッティングからの K_{D1}/(1+1/K_{D2})

【表 9】

表 9. C1q および FcγR に対する IgG バリエアントの結合プロファイルの要約(KD(nM)/親和性の差異の倍率(リツキシマブと比較)

	N-グリコシル化	C1q	単量体 FcγRIa	二量体 FcγRIIa _{HI31}	二量体 FcγRIIa _{RI31}	二量体 FcγRIIb	二量体 FcγRIIa _{V158}	二量体 FcγRIIa _{F158}
ネイティブ IgG1	している	23.0	1.5	120	310	1300	195	390
RAI	していない	0.145 (158 倍)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RGI	している	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RAII	していない	0.108 (213 倍)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RGI	している	0.385 (60 倍)	648 (0.002 倍)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RAIII	していない	1.60 (14.3 倍)	13.4 (0.11 倍)	102 (0.81 倍)	127 (2.4 倍)	n.b.	79.8 (3.25 倍)	390 (1 倍)

n.b.: 結合せず
C1q に対する K_D 値は C1q に対する相対的な親和性である。
Jung ら(2013 年)からの IgG データ。

【 0 2 3 1 】

(実施例 8)

RAIII のさらなる操作

RAIII の収率および安定性を増強するために、RAIII のランダム変異のライブラリーを、実施例 2 におけるものと同じ方法を使用して、変異率が 1 % になる条件下でエ

10

20

30

40

50

ラープローンPCRによって構築した。ライブラリーを2つの異なるやり方でスクリーニングした。第1に、ライブラリーを、抗体の発現レベルを検出することが可能な抗myc A b - F I T Cを用いて標識し、1ラウンド目および4ラウンド目にF A C S A r i a (商標)(B D B i o s c i e n c e s)によってスクリーニングして、発現レベルの増強について選択した。第2に、ライブラリーを、100 nMのF c R I I I a - G S T - P Eを用いて標識し、2ラウンド後、3ラウンド後および5ラウンド後に、競合剤として1 μMのF c R I I bの存在下でF A C S A r i a (商標)(B D B i o s c i e n c e s)によってスクリーニングして、R A I I Iと同じ結合特性を維持するが、R A I I Iよりも高レベルで発現させることができるR A I I Iバリエーションを単離した。スクリーニング中の蛍光プロファイルを図19に示す。

10

【0232】

(実施例9)

I g GバリエーションのF A C S解析

ライブラリー選別の最後(第5)のラウンドからランダムに選択したI g Gバリエーション50種について配列決定し(配列番号36~45)、10種の異なるF cバリエーションのみがコードされることが見出された(50種の選択されたクローンのプール中の多数のコピーを代表する)。F c - V 1は、単一の変異、M 2 5 2 Vを有する(配列番号36)。F c - V 1 1は、3つの変異、K 2 4 6 N、K 3 2 2 E、およびG 4 0 2 Dを有する(配列番号37)。F c - V 1 2は、7つの変異、F 2 4 2 L、N 3 1 5 S、I 3 3 6 M、K 3 4 0 R、Q 3 4 2 D、A 3 7 8 T、およびQ 3 8 6 Rを有する(配列番号38)。F c - V 1 5は、3つの変異、K 3 3 4 E、L 3 5 1 Q、およびN 4 2 1 Dを有する(配列番号39)。F c - V 1 7は、2つの変異、G 3 4 1 AおよびL 3 5 1 Qを有する(配列番号40)。F c - V 1 8は、3つの変異、M 2 5 2 V、G 3 4 1 A、およびL 3 5 1 Qを有する(配列番号41)。F c - V 1 9は、4つの変異、K 2 4 6 Q、T 2 6 0 A、N 3 1 5 S、およびQ 3 8 6 Rを有する(配列番号42)。F c - V 2 3は、6つの変異、K 2 4 6 N、M 2 5 2 V、K 3 2 2 E、R 3 4 4 G、E 3 4 5 Y、およびF 3 7 2 Lを有する(配列番号43)。F c - V 2 4は、5つの変異、F 2 4 2 L、M 2 5 2 V、K 3 3 8 Q、G 3 4 1 A、およびE 3 4 5 Yを有する(配列番号44)。F c - V 2 6は、7つの変異、K 3 3 4 E、G 4 0 2 D、K 3 3 8 Q、Q 3 4 2 P、R 3 4 4 G、E 3 4 5 Y、およびF 3 7 2 Lを有する(配列番号45)。F cバリエーション発現細胞を、10 nMのC 1 q、100 nMのF c R I I I a_{v158} - G S T - P EまたはF c R I I b - G S T - P Eを用いて標識し、解析した(図20および表10)。単離された10種のI g Gバリエーションでは、R A I I Iと比較して発現レベルの1.5~3.9倍の増強、同様のC 1 q結合活性(1.3~1.6倍)、およびF c R I I I a_{v158} - G S T結合活性の3.5~5.1倍の増強が示された。10種のI g Gバリエーション全てで、二量体F c R I I b - G S T融合物に対する検出可能な結合活性は示されなかった。

20

30

【表 10】

表 10. FACS を使用した、抗 myc Ab-FITC、C1q-PE、Fc γ RIIIa-GST-PE または Fc γ RIIb-GST-PE との単離された 10 種の IgG バリエーションの結合解析(データは、図 20 に対応する)

	発現		C1q-PE		Fc γ RIIIa _{158V} -GST-PE		Fc γ RIIb-GST-PE	
	MFI	増大倍率	MFI	増大倍率	MFI	増大倍率	MFI	増大倍率
Aglyco IgG	60.5	1	23.5	1	3.8	1	4.5	1
RAIII	39.05	0.65	806.8	34.33	34.8	9.16	7.5	1.67
Fc-V1	98.2	1.62	1053.5	44.82	122.6	32.26	6.8	1.51
Fc-V11	118	1.95	1122.5	47.76	158.6	41.74	8.1	1.80
Fc-V12	86.5	1.43	1035.5	44.06	176.5	46.45	7.9	1.76
Fc-V15	95.1	1.57	1305.5	55.55	129.3	34.03	11.8	2.62
Fc-V17	69.7	1.15	1125.8	47.90	184.5	48.55	6.8	1.51
Fc-V18	88.5	1.46	1046.5	44.53	176.5	46.45	9.8	2.18
Fc-V19	153.5	2.54	1333.8	56.75	166.7	43.87	6.9	1.53
Fc-V23	62.7	1.04	1209.1	51.45	136.5	35.92	10.5	2.33
Fc-V24	79.8	1.32	1143.7	48.66	129.8	34.16	9.4	2.09
Fc-V26	58.5	0.97	1210.9	51.52	135.9	35.76	7.5	1.67

【0233】

(実施例 10)

選択された IgG バリエーションを用いてオプソニン化した Raji 細胞における C1q 結合および C3b 沈着活性

C1q 結合アッセイを完全 RPMI 1640 培地 (10% FBS) において行った。CD20 陽性 Raji 細胞 (ヒトバークットリンパ腫、ATCC CCL-86; Golay, 2000 年) を氷上、細胞 1×10^7 個/ml に懸濁した。C1q を添加して最終濃度を $10 \mu\text{g/ml}$ にし、次いで、ハーセプチン、リツキシマブ、または RAII を添加し、反応混合物をすぐに 37 の水浴に移した。種々の時点 (0 ~ 60 分) で一定分量を取り出し、20 体積の氷冷 BSA-PBS を用いてクエンチした。次いで、細胞を PBS 中 1% BSA で 3 回洗浄し、FITC 抗 C1q を用いて室温で 30 分間ブローブし、次いで、PBS 中 1% BSA で洗浄し、2% パラホルムアルデヒドを含有する PBS 中で固定した。FACSCalibur フローサイトメーター (BD Biosciences) でフローサイトメトリーを実施し、平均蛍光強度を、校正したビーズ (Spherotech) を使用して可溶性蛍光色素分子等量 (molecules of equivalent soluble fluorochrome) (MESF) に変換した。RAII により、RAII オプソニン化 Raji 細胞表面上のリツキシマブよりも強力な C1q に対する結合活性が示された (図 21)。

【0234】

CD20 陽性 DAUDI (ヒトバークットリンパ腫、ATCC CCL-213) および DB がん細胞 (ヒト大細胞型リンパ腫、ATCC CRL 2289) におけるリツキシマブおよび RAII による C3b 沈着のレベルを決定した。完全 RPMI 1640 培地中の細胞を等体積の NHS (正常ヒト血清) と混合し、次いで、mAb を最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ まで添加した。37 で 30 分間インキュベートした後、細胞を 1% (BSA-PBS) で 2 回洗浄し、FITC mAb 7C12 (抗 C3b マウス IgG) を用いて展開した。FACSCalibur フローサイトメーター (BD Biosciences) でフローサイトメトリーを実施した。結果を図 22 に示す。C3b 沈着のレベルは、血清のみの対照と比較した差異の倍率として表される。RAII により、リツキシマブと比較して、DAUDI がん細胞では同様の C3b 沈着のレベルが示され、DB 細胞ではより高レベルの C3b 沈着が示された。

【0235】

(実施例 11)

液相補体活性化

がん細胞の非存在下での補体活性化を、抗体 100 μ g を 90 % 正常ヒト血清 1 mL、37 で 1 時間インキュベートした後に、補体活性化の古典経路についてのマーカーである C4d 濃度を測定することによって決定した。C4d 濃度を ELISA (MicroVue C4d EIA kit、Quidel Corporation、San Diego、US) において製造者の説明書に従って測定した。熱凝集した IgG (HAG) では、正常ヒト血清対照と比較して 2.8 倍の C4d 濃度の増大が示された。リツキシマブ、RAI、および RAII では、正常ヒト血清対照と同じ C4d 形成が示された (図 23)。この結果は、RAI および RAII は、溶液中、標的細胞の非存在下で (免疫複合体が形成されない) 古典的な補体活性化経路を活性化することができないことを明らかにするものである。

10

【0236】

(実施例 12)

選択された IgG バリエーションによるがん細胞死滅についての補体依存性細胞傷害アッセイ

CDC アッセイ: RAI、RAII、または RAIII 媒介性補体依存性細胞傷害 (CDC) の有効性を評価するために、Raji 細胞および Ramos 細胞 (ヒトバークリンリンパ腫、ATCC CCL-86) を、標的細胞として使用した。Raji 細胞および Ramos 細胞を、10 % FBS (Invitrogen、USA) を補充した RPMI 1640 培地 (Invitrogen、USA) で培養し、300 \times g で 5 分にわたって遠心分離することによって採取した。収集した細胞を PBS で洗浄し、PBS 中 4 μ M のカルセイン AM (Life Technologies、USA) を用いて、37、5 % CO₂ で 30 分にわたって標識した。標識した Raji 細胞を PBS で 2 回洗浄し、10 % FBS を含有する RPMI 1640 培地に再懸濁し、96 ウェルプレートに細胞 5,000 個 / ウェルで播種した。健康なドナー由来の正常なヒト血液を、ゲルを伴う赤色 / 灰色血餅活性化因子チューブ中に採取し、30 分静置し、1500 \times g で 15 分にわたって遠心分離した。次いで、正常ヒト血清 25 μ L を各ウェルに添加した。IgG バリエーションを様々な濃度で各ウェルに添加し、混合し、37、5 % CO₂ で 1 時間インキュベートした。プレートを 2000 rpm で 10 分にわたって遠心分離し、次いで、上清を採取した。放出されたカルセイン AM を励起波長および放出波長それぞれ 485 nm および 535 nm において検出した。腫瘍細胞溶解のパーセントを次式に従って算出した: $100 \times (E - S) / (M - S)$ (式中、E は実験ウェルの蛍光であり、S は抗体の非存在下での蛍光であり (腫瘍細胞を培地および補体単独と一緒にインキュベートした)、M は、溶解緩衝液 (2 % v/v の Triton (登録商標) X-100、1 % w/v の SDS、100 mM の NaCl、および 1 mM の EDTA) を用いた腫瘍細胞の蛍光である)。RAI の EC₅₀ は 9.05 \pm 0.90 nM であり、これは、Raji 細胞における野生型リツキシマブに対して 3.77 倍の増大であった。RAII の EC₅₀ は 4.48 \pm 0.26 nM であり、これは、Raji 細胞における野生型リツキシマブに対して 7.62 倍の増大であった。RAIII の EC₅₀ は 7.35 \pm 0.22 nM であり、これは、Raji 細胞における野生型リツキシマブに対して 4.64 倍の増大であった (図 12; 表 11)。RAI の EC₅₀ は 0.46 \pm 0.02 nM であり、これは、Ramos 細胞における野生型リツキシマブに対して 2.0 倍の増大であった。RAII の EC₅₀ は 0.16 \pm 0.01 nM であり、これは、Ramos 細胞における野生型リツキシマブに対して 5.7 倍の増大であった (図 24; 表 11)。アイソタイプ対照抗体であるハーセプチンでは、Raji 細胞および Ramos 細胞においていかなる有意な応答も示されなかった (図 12; 表 11)。同様にヒト急性リンパ性白血病 (ALL) 患者ドナー由来の ALL 初代細胞 (MD Anderson より) を用いて同じ CDC アッセイを実施した。補体による IgG バリエーション媒介性細胞溶解により、前の CDC アッセイの結果と同様のプロファイルが示された (図 13)。RAI、RAII、および RAIII により、濃度依存性

20

30

40

50

CDC 媒介性腫瘍細胞溶解がリツキシマブよりも良好に誘導された。

【表 11】

表 11. IgG バリエントの CDC アッセイ(データは、図 12 および 24 に対応する)

	Raji 細胞		Ramos 細胞	
	EC ₅₀ (nM)	倍率	EC ₅₀ (nM)	倍率
アイソタイプ対照	応答なし			
リツキシマブ	34.15±2.29	1	0.92±0.08	1
RAI	9.05±0.90	3.77	0.46±0.02	2.0
RAII	4.48±0.26	7.62	0.16±0.01	5.7
RAIII	7.35±0.22	4.64	試験せず	

【0237】

C1q とともにプレインキュベートした IgG の CDC アッセイ：IgG は、補体タンパク質と一緒にヒト血液中を循環する。したがって、RAI および RAII の CDC 活性を、同じモル濃度の C1q タンパク質と一緒に室温で 1 時間プレインキュベートした後に測定した。図 14 の結果から示される通り、IgG バリエントと C1q のプレインキュベーションにより、IgG 単独でおおよそ 40 % 超の死滅活性を有する場合には有意差は示されなかった。しかし、IgG 単独で 20 % 未満の死滅活性を有する場合には、プレインキュベーションにより、それらの有効性が有意に増大した。RAI または RAII バリエントと C1q のプレインキュベーションにより、C1q のみをより低い抗体濃度で用いたプレインキュベーションなしと比較して高い細胞溶解が示された。

【0238】

(実施例 13)

IgG バリエントによるがん細胞死滅についての抗体依存性細胞傷害アッセイ

ADCC アッセイ：ADCC アッセイの前日に、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) および多形核白血球 (PMN) を健康なドナー由来のヒト血液から単離した。ヒト血液 50 mL をヘパリン添加バイアル (BD biosciences) 中に採取し、チューブを数回穏やかに反転させることによって十分に混合した。血液 25 mL を 50 mL 円錐管中の室温のフィコール (Ficoll) Histopaque (Invitrogen) 25 mL 上に層状に重ねた。チューブを、スイングバケットローター中、ブレーキなしで、2,500 rpm で 30 分にわたって遠心分離した。ヒト PBMC を histopaque と培地との界面相に吸引し、ヒト PMN をペレットから採取した。ヒト PBMC および PMN を赤血球 (RBC) 溶解緩衝液 (155 mM の NH₄Cl、12 mM の NaHCO₃、および 0.1 mM の EDTA) に再懸濁させ、PBS で 2 回洗浄した。単離されたヒト PBMC または PMN を、96 ウェルプレート中、カルセイン AM で標識した Raji 細胞および様々な濃度の IgG バリエントと混合した。PMN を 10 ng/mL の GM-CSF (Life Technologies) によって活性化した。腫瘍対エフェクター細胞の比を 1:10 とし、プレートを 37 °C、5% CO₂ で 4 時間インキュベートした。溶解した腫瘍細胞の量を、CDC アッセイを使用して同じ方法によって検出した。腫瘍細胞溶解のパーセントを次式に従って算出した： $100 \times (E - S) / (M - S)$ (式中、E は実験ウェルの蛍光であり、S は抗体の非存在下での蛍光であり (腫瘍細胞を培地およびエフェクター細胞と一緒にインキュベートした)、M は溶解緩衝液を用いた腫瘍細胞の蛍光である)。実施例 7 に記載の通り、RAI および RAII では、PBMC または PMN とともにいかなる ADCC 活性も示されず、これは、RAI および RAII が FcR に対して親和性を有さないからである (図 9A ~ D および 15A ~ B)。しかし、RAIII は、FcRIIb 以外の FcR に対して親和性を有し、したがって、RAIII

では、リツキシマブとほぼ同じADCC活性が示された(図11A~Fおよび15A~B)。PBM CにおけるRAIIのEC₅₀値は2.01±0.02 nMであり、PBM CにおけるリツキシマブのEC₅₀値は2.11±0.02 nMであった。

【0239】

(実施例14)

がん細胞死滅についての補体依存性細胞傷害アッセイ

CDCCおよびCMCアッセイの前日に、ヒト末梢血単核細胞(PBM C)および多形核白血球(PMN)を健康なドナー由来のヒト血液から単離した。血清および免疫細胞の存在下で、抗体は、ADCC、ならびに、CDCCおよび補体依存性細胞傷害(CDCC)の両方に起因する細胞溶解の結果である補体媒介性細胞傷害(CMC)を活性化することが可能である。C1qに特異的なIgGバリエーションはADCC活性を示さないため、CMCのみを誘導することができる。さらに、細胞溶解の非存在下でのCDCC単独の効果(終末補体複合体TCCの形成に起因する)を、C9枯渇血清を使用して決定することができる。C9タンパク質は、TCCの形成に重要なものであり、その非存在下では、Fc受容体に結合しない抗体による細胞溶解がCDCC経路のみによって起こり得る。CDCCアッセイのために、CD20+がん細胞を、抗体、25% C9枯渇血清、およびPBM Cまたは多形核(PMN)細胞と一緒にインキュベートした。PMNを10 ng/mLのGM-CSF(Life Technologies)によって活性化した。腫瘍対エフェクター細胞の比を1:10とし、プレートを37、5% CO₂で4時間インキュベートした。溶解した腫瘍細胞の量を、実施例12におけるCDCCアッセイに使用したのと同じ方法によって検出した。腫瘍細胞溶解のパーセントを次式に従って算出した: $100 \times (E - S) / (M - S)$ (式中、Eは実験ウェルの蛍光であり、Sは、抗体の非存在下での蛍光であり(腫瘍細胞を培地およびエフェクター細胞と一緒にインキュベートした)、Mは溶解緩衝液を用いた腫瘍細胞の蛍光である)。C9枯渇血清および免疫細胞を用いると、RAIおよびRAIIはCDCCのみを活性化したが、リツキシマブはADCCとCDCCの両方を活性化することができる。RAIおよびRAIIにより、Raji細胞およびRamos細胞において、リツキシマブのADCCおよびCDCCによるものと同様のCDCCによる腫瘍細胞死滅活性が示された(図25A~D; 表12)。

【表12】

表 12. IgG バリエーションの CDCC および CMC アッセイ(データは、図 25A~D に対応する)

条件	CDCC (または ADCC + CDCC)				
	血清	C9 枯渇血清			
	がん細胞	Raji		Ramos	
	エフェクター細胞	PBMC	PMN	PBMC	PMN
Raji 細胞 における EC ₅₀ (nM)/ 増大倍率	アイソタイプ対照	応答なし			
	リツキシマブ	2.46±0.14	1.90±0.11	0.43±0.03	0.32±0.02
	RAI	6.24±0.27 /0.39	3.34±0.24 /0.57	0.45±0.03 /0.95	0.37±0.02 /0.86
	RAII	2.56±0.18 /0.96	2.10±0.15 /0.90	0.30±0.02 /1.43	0.22±0.01 /1.45

【0240】

(実施例15)

選択されたIgGバリエーションによるがん細胞死滅についての補体依存性細胞ファゴサイトーシスアッセイ

PBM Cを、新鮮なヒト血液からHistopaque密度勾配遠心分離によって精製し、CD14+単球を磁気ビーズ分離によって単離した。単球を、15% FBSおよび50 ng/mLのGM-CSFを含有するRPMI培地で7日間培養することによってマクロファージに分化させ、次いで、それらをエフェクター:腫瘍細胞比10:1で、カルセインで標識したRaji細胞および示されている抗体と混合した。補体依存性細胞ファゴ

サイトーシス (CDCP) アッセイのために、Raji 細胞を、25% C9 枯渇血清、抗体およびマクロファージと一緒にインキュベートした。37 で2時間後に、細胞を抗CD11b-APCおよび抗CD14-APCで標識した。ファゴサイトーシスをLSRF ortessa (BD Bioscience) でFACSによって評価し、試料中の腫瘍細胞の総数に対する2重陽性細胞の画分として報告した。RAIおよびRAIIによりCDCPを誘導することができ、また、ADCPとCDCPの両方を誘導することができるリツキシマブよりも良好な腫瘍細胞貪食活性が示された。RAIのEC₅₀は4.61 ± 0.05 nMであり、これは、Raji 細胞における野生型リツキシマブに対して3.78倍の増大である。RAIIのEC₅₀は3.72 ± 0.04 nMであり、これは、Raji 細胞における野生型リツキシマブに対して4.69倍の増大である (図26; 表13)。

10

【表13】

表 13. IgG バリアントの CDCP アッセイ(データは、図 26 に対応する)

	EC50 (nM)	倍率
アイソタイプ対照	応答なし	
リツキシマブ	17.44±0.18	1
RAI	4.61±0.05	3.78
RAII	3.72±0.04	4.69

【0241】

20

(実施例16)

がん細胞死滅についての補体媒介性細胞傷害アッセイ

CDCC、およびCMCアッセイの前日に、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) および多形核白血球 (PMN) を健康なドナー由来のヒト血液から単離した。CMCアッセイのために、がん細胞を、抗体、25%のプールしたヒト血清 (PHS)、およびPBMC (またはPMN) と一緒にインキュベートした。PMNを10 ng/mLのGM-CSF (Life Technologies) によって活性化した。腫瘍対エフェクター細胞の比を1:10とし、プレートを37、5%CO₂で4時間インキュベートした。溶解した腫瘍細胞の量を、CDCアッセイと同じ方法によって検出した。PHSおよび免疫細胞を用いると、RAIおよびRAIIはCMCのみを媒介することができるが、リツキシマブは、CMCに加えてADCCの全てのエフェクター機能により細胞死滅を媒介することができる。RAIおよびRAIIでは、PBMCまたはPMNを用いると、Raji 細胞およびRamos細胞でEC₅₀値の増強が示された。RAIでは、Raji を使い、PBMCをエフェクター細胞として使用するとEC₅₀値の1.4倍の増強が示され、Raji 細胞を使い、PMNをエフェクター細胞として使用するとEC₅₀値の1.3倍の増強が示され、Ramos細胞を使い、PBMCを使用するとEC₅₀値の2.7倍の増強が示され、RamosおよびPMNを用いるとEC₅₀値の1.8倍の増強が示された (全てリツキシマブと比較して)。RAIIでも同様に、全てリツキシマブと比較して、Raji およびエフェクターとしてPBMCを用いるとEC₅₀値の2.1倍の増強が示され、Raji およびPMNを用いるとEC₅₀値の1.9倍の増強が示され、RamosおよびPBMCを用いるとEC₅₀値の6.9倍の増強が示され、RamosおよびPMNを用いるとEC₅₀値の6.1倍の増強が示された (図27A~D; 表14)。

30

40

【表 14】

表 14. IgG バリエーションの CMC アッセイ(データは、図 27A~D に対応する)

条件	CMC (または ADCC + CMC)				
	血清	PHS			
	がん細胞	Raji		Ramos	
	エフェクター細胞	PBMC	PMN	PBMC	PMN
Raji 細胞 における EC ₅₀ (nM) /増大倍 率	アイソタイプ 対照	応答なし			
	リツキシマブ	0.98±0.07	0.78±0.02	0.20±0.01	0.11±0.01
	RAI	0.70±0.03 /1.4	0.58±0.05 /1.3	0.073±0.005 /2.7	0.061±0.004 /1.8
	RAII	0.46±0.02 /2.1	0.41±0.02 /1.9	0.029±0.002 /6.9	0.018±0.001 /6.1

10

【0242】

(実施例 17)

補体結合が増強された IgG バリエーションによるがん細胞死滅についての全血アッセイ
健康なドナー由来の全血を、IgG バリエーションおよびカルセイン AM で標識した Raji
細胞と一緒に、96 ウェルプレート中、37 °C、5 % CO₂ で 4 時間インキュベートした。
腫瘍細胞死滅活性を実施例 8 におけるものと同じ CDC アッセイによって測定した。
腫瘍細胞溶解のパーセントを、実施例 8 におけるものと同じ式を使用して算出した。図 1
6 に示されている通り、RAI および RAII の CDC 有効性については、リツキシマブ
では ADCC および CDC が濃度依存的に媒介されるにもかかわらず、リツキシマブより
も良好な腫瘍細胞死滅活性が示された。ADCC と CDC の両方を誘導することができる
RAIII でも同様に、リツキシマブよりも高い腫瘍細胞溶解活性が示された。

20

【0243】

(実施例 18)

選択された IgG バリエーションによる CD20 および Fc γRIIB 媒介性内部移行アッセイ

30

リツキシマブと Fc γRIIB および CD20 の共ライゲーションにより、CD20 -
抗体複合体の内部移行 (internalization) が誘導され、その後、リソソーム内経路により CD20 リガンドが分解される。この機構により、標的細胞上の CD20
発現が低減し、この機構は、リツキシマブに対するがん細胞の抵抗性に関する重大な機構
であると考えられる。TMD8 細胞 (ヒト ABC- DLBCL 細胞株) および HBL-
1 細胞 (ヒトびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫) における CD20 陽性の内部移行を評価した。
TMD8 細胞および HBL-1 細胞を、10 % FBS (Invitrogen、USA) を補充した RPMI 1640 培地 (Invitrogen、USA) で培養し、
次いで、細胞を、アイソタイプ対照、リツキシマブ、または RAII と一緒に 0 時間、2
時間、4 時間、または 6 時間インキュベートした。細胞表面に結合した抗体のレベルを、
FITC を伴うヤギ抗ヒト Fc (Abcam) によって検出した。リツキシマブでは、ど
ちらの細胞株においても時間に応じて MFI 値の低下が示された。対照的に、RAII と
一緒にインキュベートすることにより標的細胞における CD20 内部移行はもたらされず、
したがって、両方の細胞株について全ての時点において同様の MFI 値が示された (図
28A ~ B)。これらの実験を独立して 3 回繰り返した。

40

【0244】

(実施例 19)

アナフィラキシーアッセイ

動物実験は全て、施設の Animal Care and Use Committee
of the University of Texas at Austin によ

50

り承認されたプロトコールの下で実施した（ここではタンパク質の熱凝集）。免疫複合体により、Fc R 発現細胞によって媒介されるアナフィラキシー応答が引き起こされる可能性がある。アナフィラキシー応答を評価するために、免疫複合体を、陰性対照として調製した熱凝集したFabによって、ならびに陽性対照としてマウスリツキシマブによって、およびRAIIによっても、63 で1時間インキュベートすることによって形成した。各熱凝集した抗体600 µgをC57BL/6Jマウス（n=3）（The Jackson Laboratory）に静脈内注射した。アナフィラキシー応答の一般的な症状の1つは、体温の低下である。したがって、マウス深部体温を、直腸サーモプローブを使用して5分ごとに測定した。mリツキシマブで処置したマウスについては、深部体温が最初の20分で約2.4 低下し、38 まで徐々に回復した。対照的に、RAIIで処置したマウスでは、RAIIはFc Rに結合しないので、Fabのような深部体温のいかなる変化も示されなかった。

10

【0245】

（実施例20）

RAIIによるin vivo抗腫瘍有効性の評価

RAIIのin vivo抗腫瘍有効性を、異種移植モデルにおいてRaji細胞およびRamos細胞を用いて評価した。細胞を、10%ウシ胎仔血清（Life Technologies）、ペニシリン、およびストレプトマイシンを伴うRPMI 1640培地（Life Technologies）で培養した。次いで、50%マトリゲル（BD bioscience）を伴うRPMI 1640培地200 µL中 2.5×10^5 個のRaji細胞を各NOD-SCID IL2R^{-/-}マウス（n=3）の右側腹部に皮下注射した。腫瘍の発生を、カリパス測定によって決定した。平均腫瘍サイズが50 mm²になった時に（21日目）、PBS、リツキシマブ、およびRAIIを、マウス当たり抗体400 µg（20 mg/kg）の単一用量で21日目、24日目、および27日目に腹腔内（i.p.）注射することによって投与した。腫瘍を、腫瘍体積が200 mm²になるまで少なくとも週2回、カリパスを使用して測定した。RAIIにより、PBSと比較して腫瘍の成長が有意に阻害され（一元配置ANOVA；p<0.0005）、また、RAIIにより、ADCCの完全な欠如にもかかわらず、リツキシマブと同等の抗腫瘍活性が示された（図17）。

20

【0246】

次に、50%マトリゲル（BD bioscience）を伴うRPMI 1640培地200 µL中 1×10^6 個のRamos細胞を、各胸腺欠損ヌードマウス（n=6、The Jackson Laboratory）の右側腹部に皮下注射した。腫瘍領域のサイズが10~50 mm²に達したところで抗体またはPBSの投与を開始し、15日目、18日目、および21日目に、全部で3回繰り返した。腫瘍直径を3~4日毎にカリパスを用いて測定し、それぞれ腫瘍領域を式（長さ）×（幅）× によって算出した。腫瘍サイズが2500 mm³の体積に達したところでマウスを安楽死させた。RAIIにより、腫瘍の成長がPBSと比較して有意に阻害され（一元配置ANOVA；p<0.0001）、また、RAIIにより、ADCCの完全な欠如にもかかわらず、mリツキシマブよりも良好な抗腫瘍活性が示された（図30）。

30

40

【表 15】

表 15. この試験において使用したプライマー(配列番号 24～35として提供される)

配列 番号	プライマー の名称	プライマーのヌクレオチド配列(5' → 3')
24	PCH016	GTTATTACTCGCGGCCAGCCG
25	PCH017	GGGGAAGAGGAAGACTGACGGN(A10% T70% G10% C10%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A10% T10% G10% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A10% T70% G10% C10%)N(A10% T10% G10% C70%)AGGTGCTGGGCACGGTGGG
26	PCH018	CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
27	PCH019	GGTTTTCTCGATGGGGGCTGGG
28	PCH020	CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCN(A70% T10% G10% C10%)N(A10% T70% G10% C10%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T70% G10% C10%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A70% T10% G10% C10%)N(A70% T10% G10% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A70% T10% G10% C10%)N(A70% T10% G10% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G10% C70%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A70% T10% G10% C10%)N(A10% T10% G70% C10%)N(A70% T10% G10% C10%)CCACAGGTGTACACCCTGCCC
29	PCH021	CGGCCGCGAATTCGGCCCC
30	PCH022	GGGGAAGAGGAAGACTGACGG
31	PCH023	GGTTTTCTCGATGGGGGCTGGG
32	PCH001	CACCAAGGTCGACAAGAAAGTTG
33	TH084	CTCGAGCGGCCGCTCATTTACCCGGGGACAGGGAGAGGTTTAC CCGGGGACAGGGAGAGG
34	WK68	GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCCTGTACCGTGTGG
35	WK69	GTGAGGACGCTGACCACACGGTACAGGCTGTTGTACTGCTC

10

20

30

【表 16】

表 16. この試験において使用したプラスミド

プラスミド	関連する特性	参照または供給源
pMopac12-pelB-IgG-VH-CH1-CH2-CH3-FLAG	トラスツズマブの IgG VH1-CH1-CH2 ドメインおよび CH3 ドメインを含有する細菌ディスプレイベクター	Jung ら、2012 年
pBAD30- PelB-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-His-cMyc	トラスツズマブの IgG VL-Ck ドメインを含有する細菌ディスプレイベクター	Jung ら、2012 年
pBAD33-NlpA-PA ドメイン 4-His	PA ドメイン 4 を含有する細菌ディスプレイベクター	Leysath ら、2009 年
pMAZ IgH M18	M18 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	Leysath ら、2009 年
pMAZ IgL M18	M18 軽鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	Leysath ら、2009 年
pMaz-IgH-FcγRI-His	哺乳動物における単量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRI 遺伝子	Jung ら、2012 年
pMaz-IgH-FcγRIIa _{H131} -GST	哺乳動物における二量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRIIa _{H131} 遺伝子	Jung ら、2012 年
pMaz-IgH-FcγRIIa _{R131} -GST	哺乳動物における二量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRIIa _{R131} 遺伝子	Jung ら、2012 年
pMaz-IgH-FcγRIIb-GST	哺乳動物における二量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRIIb 遺伝子	Jung ら、2012 年
pMaz-IgH-FcγRIIIa _{V157} -GST	哺乳動物における二量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRIIIa _{V157} 遺伝子	Jung ら、2012 年
pMaz-IgH-FcγRIIIa _{F157} -GST	哺乳動物における二量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRIIIa _{F157} 遺伝子	Jung ら、2012 年
pMaz-IgH-FcγRIIIa _{V157} -ストレプトアビジン	哺乳動物における四量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcγRIIIa _{V157} 遺伝子	本試験
pMaz-IgH-FcRn-β2m-GST	哺乳動物における二量体での発現のための pMaz-IgH 内の FcRn-β2m 遺伝子	本試験
pcDNA3.4-IgH-リツキシマブ	リツキシマブ重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgL-リツキシマブ	リツキシマブ軽鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgH-RGI	RGI 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgH-RGII	RGII 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgH-RGIII	RGIII 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgH-RAI	RAI 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgH-RAII	RAII 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験
pcDNA3.4-IgH-RAIII	RAIII 重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター	本試験

【0247】

本明細書において開示され、特許請求されている方法は全て、本開示に照らして、過度な実験を伴わずに準備し実行することができる。本発明の組成物および方法は好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、主旨および範囲から逸脱することなく本明細書に記載の方法および方法のステップまたは一連のステップに変形を適用することができることが当業者には明らかになる。より詳細には、本明細書に記載の作用物質を

化学的かつ生理的に関連するある特定の作用物質で置換することができるが、同じまたは同様の結果が実現されることが明らかになる。当業者に対して明らかであるそのような同様の置換および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の主旨、範囲および概念の範囲内であるとみなされる。

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載のものを補足する例示的な手続き上のまたは他の詳細をもたらすものである限りでは、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

米国特許第3,817,837号	
米国特許第3,826,364号	
米国特許第3,850,752号	10
米国特許第3,939,350号	
米国特許第3,996,345号	
米国特許第4,275,149号	
米国特許第4,277,437号	
米国特許第4,284,412号	
米国特許第4,366,241号	
米国特許第4,472,509号	
米国特許第4,498,766号	
米国特許第4,661,913号	
米国特許第4,683,195号	20
米国特許第4,683,202号	
米国特許第4,714,682号	
米国特許第4,767,206号	
米国特許第4,774,189号	
米国特許第4,800,159号	
米国特許第4,857,451号	
米国特許第4,883,750号	
米国特許第4,938,948号	
米国特許第4,988,618号	
米国特許第4,989,977号	30
米国特許第5,021,236号	
米国特許第5,160,974号	
米国特許第5,302,523号	
米国特許第5,322,783号	
米国特許第5,384,253号	
米国特許第5,464,765号	
米国特許第5,478,722号	
米国特許第5,538,877号	
米国特許第5,538,880号	
米国特許第5,550,318号	40
米国特許第5,563,055号	
米国特許第5,567,326号	
米国特許第5,580,859号	
米国特許第5,589,466号	
米国特許第5,610,042号	
米国特許第5,656,610号	
米国特許第5,702,932号	
米国特許第5,736,524号	
米国特許第5,779,907号	
米国特許第5,780,448号	50

米国特許第5,789,215号	
米国特許第5,824,520号	
米国特許第5,843,650号	
米国特許第5,846,709号	
米国特許第5,846,783号	
米国特許第5,849,497号	
米国特許第5,849,546号	
米国特許第5,849,547号	
米国特許第5,858,652号	
米国特許第5,866,366号	10
米国特許第5,882,864号	
米国特許第5,912,148号	
米国特許第5,916,776号	
米国特許第5,916,779号	
米国特許第5,922,574号	
米国特許第5,928,905号	
米国特許第5,928,906号	
米国特許第5,932,451号	
米国特許第5,935,825号	
米国特許第5,939,291号	20
米国特許第5,942,391号	
米国特許第5,945,100号	
米国特許第5,981,274号	
米国特許第5,994,624号	
米国特許第7,094,571号	
米国特許第7,094,571号	
米国特許出願公開第20030180937号	
米国特許出願公開第20030219870号	
米国特許出願公開第20050260736号	
米国特許出願公開第20060173170号	30
米国特許出願公開第20080292646号	
Abbondanzoら, Breast Cancer Res. Treat., 16:182(151), 1990.	
Ahouseら, J. Immunol., 151:6076-6088, 1993.	
Allen and Seed, Nucleic Acids Res., 16:11824, 1988.	
Andersenら, Eur. J. Immunol., 36:3044-3051, 2006.	
Andersenら, Eur. J. Immunol., 36:3044-3051, 2006.	
Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988	
Athertonら, Biol. Reprod., 32(1):155-171, 1985.	
Ausubelら, In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994.	40
BaneyxおよびMujacic, Nat. Biotechnol., 22:1399-1408, 2004.	
Bellus, J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem., A31(1): 1355-1376, 1994.	
Berntzenら, J. Immunol. Methods, 298:93-104, 2005.	
Betterら, Science, 240: 1041-10433, 1988.	
BocekおよびPecht, FEBS Lett., 331, 86-90, 1993.	
Boekeら, Mol. Gen. Genet., 186, 1982.	
BollandおよびRavetch, Adv. Immunol., 72:149-177, 1999.	
Borrokら, ACS Chem. Biol., 7:1596-1602, 2012.	
Boruchovら, J. Clin. Invest., 115:2914-2923, 2005.	
Bossら, Nucleic Acids Res., 12:3791-3806, 1984.	50

- BowdenおよびGeorgiou, J. Biol. Chem., 265:16760-16766, 1990.
- Bukauら, J. Bacteriol., 163:61, 1985.
- Burmanら, J. Bacteriol., 112:1364, 1972.
- BurtonおよびBurton, Nat. Rev. Immunol., 4:89-99, 2004.
- Cabillyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273-3277, 1984.
- Carbonelliら, FEMS Microbiol Lett., 177:75-82, 1999.
- Chamesら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:7969-7974, 2000.
- ChenおよびOkayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.
- Cocea, Biotechniques, 23(5):814-816, 1997.
- Collinsら, Immunogenetics, 45:440-443, 1997. 10
- Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234, 1997.
- Dall'Acquaら, J. Immunol., 177:1129-1138, 2006.
- Daughertyら, Protein Eng., 12:613-621, 1999.
- De Jagerら, Semin. Nucl. Med., 23(2):165-179, 1993.
- de KruifおよびLogtenberg, J. Biol. Chem., 271:7630-7634, 1996.
- DecadおよびNikaido, J. Bacteriol., 128:325, 1976.
- Desaiら, Cancer Res., 58:2417-2425, 1998.
- Dholakiaら, J. Biol. Chem., 264(34):20638-20642, 1989.
- Dieboldら, Science, 343:1260-1263, 2014.
- DoolittleおよびBen-Zeev, Methods Mol Biol, 109:215-237, 1999. 20
- Edelmanら, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969.
- Eigenbrotら, J. Molec. Biol., 229:969-995, 1993.
- Elbeinら, Glycobiology, 13:17R-27, 2003.
- Elvinら, Int. J. Pharm., 440:83-98, 2013.
- 欧州出願第320 308号
- 欧州出願第329 822号
- Fahnestockら, J. Bacteriol., 167:870-880, 1986.
- Farmerら, FEMS Microbiol. Lett., 176:11, 1999.
- Fechheimerら, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
- Fraleyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979. 30
- Franciscoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10444-10448, 1993.
- Frohman, In: PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N.Y., 1990.
- Fromantら, Anal. Biochem., 224:347-353, 1995.
- Gaboriaudら, J. Biol. Chem., 278:46974-46982, 2003.
- Garinot-Schneiderら, J. Mol. Biol., 260:731-742, 1996.
- 英国出願第2 202 328号
- GeorgiouおよびSegatori, Current Opin. Biotech., 16:538-545, 2005.
- GhetieおよびWard, Annu. Rev. Immunol., 18:739-766, 2000.
- GhetieおよびWard, Annu. Rev. Immunol., 18:739-766, 2000. 40
- Golayら, Blood, 95:3900-3908, 2000.
- Gomiら, J. Immunol., 144:4046-4052, 1990.
- Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985.
- GrahamおよびVan Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
- GriffithsおよびDuncan, Curr. Opin. Biotechnol., 9:102-108, 1998.
- Guddatら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:4271-4275, 1993.
- GulbisおよびGaland, Hum. Pathol., 24(12):1271-1285, 1993.
- Guzmanら, J. Bacteriol., 177:4121-30, 1995.
- Guzmanら, J. Bacteriol., 177:4121-4130, 1995.
- Halloranら, J. Immunol., 153:2631-2641, 1994. 50

- HarlandおよびWeintraub, J. Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985.
- Harveyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:9193-9198, 2004.
- Harveyら, J. Immunol. Methods, 308:43-52, 2006.
- Hayhurstら, J. Immunol. Methods, 276:185-196, 2003.
- Hayhurstら, J. Immunol. Methods, 276:185-196, 2003.
- Hayhurstら, J. Immunol. Methods, 276:185-196, 2003.
- Hobotら, J. Bacteriol., 160:143, 1984.
- Hoogenboomら, Immunotechnology, 4:1-20, 1998.
- HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381-388, 1992.
- HooverおよびLubkowski, Nucl. Acids Res., 30:e43, 2002. 10
- HooverおよびLubkowski, Nucleic Acids Res., 30:e43, 2002.
- Hughes-JonesおよびGardner, Mol. Immunol., 16:697-701, 1979.
- Idusogieら, J. Immunol., 166:2571-2575, 2001.
- Innisら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(24):9436-9440, 1988.
- Irvinら, J. Bacteriol., 145:1397, 1981.
- Jefferis, Biotechnol. Prog., 21:11-16, 2005.
- Jefferis, Adv. Exp. Med. Biol., 564:143-148, 2005.
- JeongおよびLee, Appl. Environ. Microbiol., 69:1295-1298, 2003.
- JouenneおよびJunter, FEMS Microbiol. Lett., 56:313, 1990.
- Jungら, Biotechnol Bioeng, 98:39-47, 2007 20
- Jungら, Protein Expr. Purif., 31:240-246, 2003.
- Jungら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:604-609, 2010.
- Jungら, ACS Chem. Biol., 8:368-375, 2012.
- Kabatら, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. of Health and Hum. Serv., Bethesda, 1991.
- Kaepplerら, Plant Cell Reports, 9:415-418, 1990.
- KalergisおよびRavetch, J. Exp. Med., 195:1653-1659, 2002.
- Kanedaら, Science, 243:375-378, 1989.
- Kato et al, J. Biol. Chem., 266:3361 - 3364, 1991.
- Kawarasakiら, Nucleic Acids Res., 31:e126, 2003. 30
- Khatoonら, Ann. Neurol, 26(2):210-215, 1989.
- Kimら, Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994.
- Kingら, J. Biol. Chem., 264(17):10210-10218, 1989.
- KipriyanovおよびLittle, Mol. Biotechnol., 12:173-201, 1999.
- Kjaerら, FEBS Lett., 431:448-452, 1998.
- Knightら, Mol. Immunol., 32:1271-1281, 1995.
- KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495-497, 1975.
- KouzaridesおよびZiff, Nature, 336:646-6451, 1988.
- Kurodaら, Lancet., 357:1225 - 1240, 2001.
- Kwohら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173, 1989. 40
- Labischinskiら, J. Bacteriol., 162:9, 1985.
- Landschulzら, Science, 240:1759-1764, 1988.
- LanioおよびJeltsch, Biotechniques, 25:962-955, 1998.
- Lazarら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:4005-4010, 2006.
- Lazarら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:4005-4010, 2006.
- Leiら, J. Bacteriol., 169:4379-4383, 1987.
- Levensonら, Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
- Leysathら, J. Mol. Biol., 387:680-693, 2009.
- Liら, J. Mol. Biol., 337:743-759, 2004.
- Maniatisら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbo 50

- r Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Marcianoら, *Science*, 284:1516, 1999.
- Masakiら, *Nucleic Acids Res.*, 13:1623-1635, 1985.
- Mazorら, *Nat. Biotech.*, 25(5):563-565, 2007.
- Mazorら, *Nat. Biotech.*, 25:563-5, 2007.
- Michaelsenら, *Scand. J. Immunol.*, 70:553-564, 2009.
- Mooreら, *mAbs*, 2:181-189, 2010.
- MunsonおよびPollard, *Anal. Biochem.*, 107:220, 1980.
- NagaokaおよびAkaike, *Protein Engineering*, 16: 243-245, 2003.
- Natsumeら, *Cancer Res.*, 68:3863-3872, 2008. 10
- NicolauおよびSene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolauら, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- NikaidoおよびNakae, *Adv. Microb. Physiol.*, 20:163, 1979.
- NikaidoおよびVaara, *Microbiol. Rev.*, 49:1, 1985.
- Nikaido, *J. Bacteriology*, 178(20):5853-5859, 1996.
- O'Brienら, *Protein Expr. Purif.*, 24 :43-50, 2002.
- Oberら, *J. Immunol.*, 172:2021-2029, 2004b.
- Oberら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:11076-11081, 2004a.
- Olssonら, *Eur. J. Biochem.*, 168:319-324, 1987.
- Orlandiら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837, 1989. 20
- Osbornら, *J. Biol. Chem*, 247:3973-3986, 1972.
- OwensおよびHaley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142(3):964-971, 1987.
- Painbeniら, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6712, 1997.
- PavlouおよびBelsey, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59:389-396, 2005.
- PCT出願第PCT/US87/00880号
- PCT出願第PCT/US89/01025号
- PCT出願国際公開第88/10315号
- PCT出願国際公開第89/06700号
- PCT出願国際公開第90/07641号
- PCT出願国際公開第93/06213号 30
- PCT出願国際公開第94/09699号
- PCT出願国際公開第95/06128号
- Potrykusら, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- PotterおよびHaley, *Methods Enzymol*, 91:613-633, 1983.
- Purvisら, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3761-3769, 2005.
- RaghavanおよびBjorkman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:181-220, 1996.
- RaoおよびTorriani, *J. Bacteriol.*, 170, 5216, 1988.
- Ramslandら, *J. Immunol.*, 187:3208-3217, 2011.
- Rankinら, *Blood* 108: 2384-2391, 2006.
- RavetchおよびPerussiaら, *J. Exp. Med.*, 170:481-497, 1989. 40
- Ravetchら, *Science*, 234:718-725, 1986.
- Rippeら, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rodewald, *J. Cell Biol.*, 71:666-669, 1976.
- Ruhlmannら, *FEBS Lett.*, 235:262-266, 1988.
- Sambrookら, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sazinskyら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:20167-20172, 2008.
- Schierleら, *J. Bacteriol.*, 185:5706-5713, 2003.
- SchneiderおよびZacharias, *Mol. Immunol.*, 51:66-72, 2012.
- Searsら, *J. Immunol.*, 144:371-378, 1990. 50

- SerginaおよびMoasser, Trends in Molec. Med., 13:527-534, 2007.
 Sergina,およびMoasser, Trends in Molec. Med., 13:527-534, 2007.
 Shieldsら, J. Biol. Chem., 276:6591-6604, 2001.
 Shuttleworthら, Gene, 58(2-3):283-295, 1987.
 SimisterおよびMostov, Nature, 337(6203):184-187, 1989.
 SledgeおよびBing, J. Biol. Chem., 248:2818-2823, 1973.
 Sondermannら, J. Mol. Biol., 309:737-749, 2001.
 Stenbergら, Mol. Microbiol., 6:1185-1194, 1992.
 Stengelinら, Embo J, 7:1053-1059, 1988.
 Stuartら, Embo J., 8:3657-3666, 1989. 10
 Stuartら, J. Exp. Med., 166:1668-1684, 1987.
 Tominagaら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 168:683-689, 1990.
 Uhlenら, J. Biol. Chem., 259:1695-702, 1984.
 Van WielinkおよびDuine, Trends Biochem Sci., 15:136, 1990.
 Wadaら, J. Biol. Chem., 274:17353-17357, 1999.
 Walkerら, Nucleic Acids Res., 20(7):1691-1696, 1992.
 Wongら, Gene, 10:87 - 94, 1980.
 WrightおよびMorrison, Trends Biotechnol., 15:26-32, 1997.
 Zegerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3425-3429, 1990.
 Zhangら, Immunogenetics, 39:423-437, 1994. 20
 Zhangら, Microbiology, 144(Pt 4):985-991, 1998.
 Zohairら, Biochem. J., 257:865-873, 1989.
 米国特許第4,870,287号
 米国特許第5,739,169号
 米国特許第5,760,395号
 米国特許第5,801,005号
 米国特許第5,824,311号
 米国特許第5,830,880号
 米国特許第5,846,945号
 米国特許第5,889,155号 30
 米国特許第7,109,304号
 米国特許第8,465,743号
 米国特許出願公開第2009/0304666号
 国際公開第2012/031744号
 国際公開第2012/079000号
 国際公開第2013/059593号
 Ahmedら, HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. Clinical Cancer Research, 16(2):474-485, 2010.
 Austin-WardおよびVillaseca, Revista Medica de Chile, 126(7):838-845, 1998. 40
 Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
 Bukowskiら, Clinical Cancer Res., 4(10):2337-2347, 1998.
 ChenおよびGuillemin, Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. Int J Tryptophan Res, 2:1-19, 2009.
 Christodoulidesら, Microbiology, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
 Curranら, PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107:4275-4280 50

- , 2010.
- Davidson R, J. Immunother., 21(5):389-398, 1998.
- de Jong R, Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21(7):1320-1327, 2011.
- Della Chiesa R, The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46-and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*, 108(13):4118-4125, 2006.
- Godin-Ethier R, Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Expression in Human Cancer: Clinical and Immunologic Perspectives. *Clinical Cancer Research*, 17(22):6985-6991, 2011. 10
- Hanibuchi R, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Harkki R, *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.
- Hellstrand R, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Holmgaard R, Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 210:1389-1402, 2013.
- HooverおよびLubkowski, DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 30(10):e43-e43, 2002. 20
- Hopwood R, In: *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.
- HuiおよびHashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Ito R, *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.
- Janeway R, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6th Edition. New York: Garland Publishing, 2005.
- Kaper R, Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. *PLoS Biology*, 5(10):e257, 2007. 30
- Lipowska-Bhalla R, Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61(7):953-962, 2012.
- Lob R, Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*, 9(6):445-452, 2009.
- Lordanescu, J. *Bacteriol*, 12:597-601, 1975.
- MandiおよびVecsei, The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*, 119(2):197-209, 2012.
- Maniatis, R, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. 40
- Mellor R, *Gene*, 24:1-14, 1983.
- Mezrich R, An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 185(6):3190-3198, 2010.
- Opitz R, The Indoleamine-2, 3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *PLoS One*, 6(5):e19823, 2011.
- Opitz R, An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368):197-203, 2011.
- Penttila R, *Gene*, 61:155-164, 1987. 50

Pilotte⁵, Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(7):2497-2502, 2012.

Prendergast, Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature*, 478(7368):192-194, 2011.

Qin⁵, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.

Rutella⁵, Targeting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) to counteract tumour-induced immune dysfunction: from biochemistry to clinical development. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 9(2):151-177, 2009. 10

Schellenberger⁵, *Nature Biotech.*, 27:1186-1190, 2009.

Shin⁵, Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(30):12391-12396, 2013.

Sibakov⁵, *Eur. J. Biochem.*, 145:567-572, 1984.

Song⁵, L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *International Immunopharmacology*, 11(8):932-938, 2011.

Stone⁵, Replacing Mn^{2+} with Co^{2+} in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines. *ACS Chemical Biology*, 5:333-342, 2010. 20

Walport, Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 344:1058-1066, 2001.

Walport, Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 344:1140-1144, 2001.

Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.

WawrzynczakおよびThorpe, In: Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987. 30

Yao⁵, Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol Biosyst*, 7(9):2608-2614, 2011.

Yoshikawa⁵, Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol*, 84(4):304-309, 2010.

【図 1】

FIG. 1A

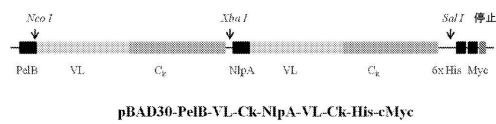
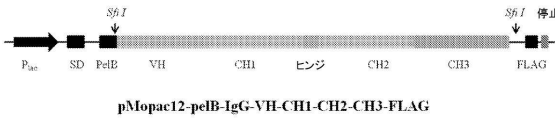


FIG. 1B



FIGS. 1A-B

【図 2】



FIG. 2

【図 3 A】

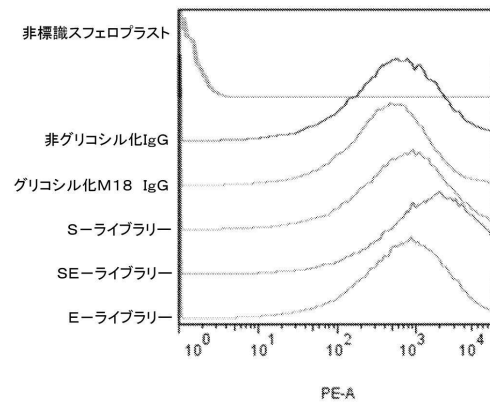


FIG. 3A

【図 3 B】

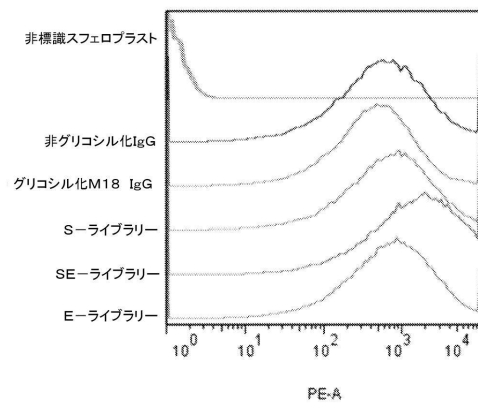


FIG. 3B

【図 3 C】

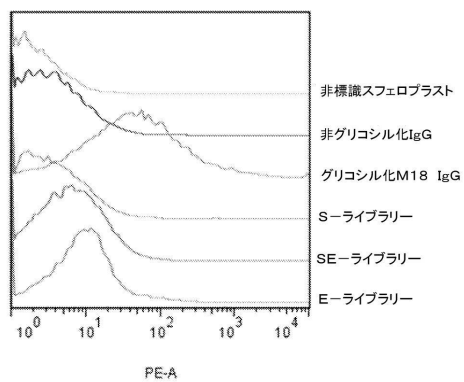


FIG. 3C

【図3D】

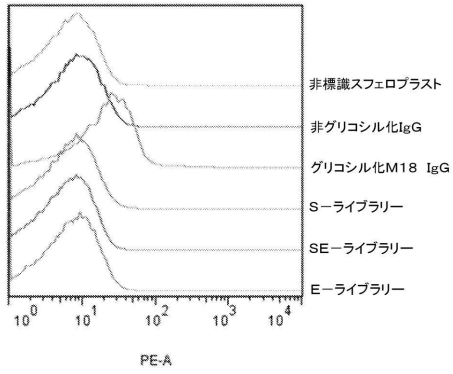


FIG. 3D

【図4】

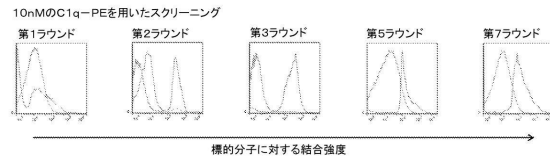


FIG. 4A

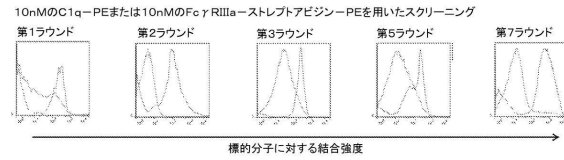


FIG. 4B

【図5】

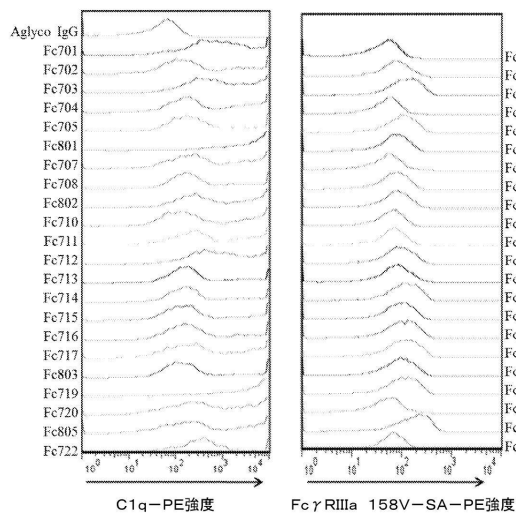


FIG. 5

【図6】

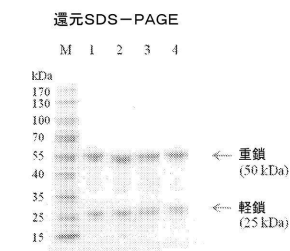


FIG. 6A

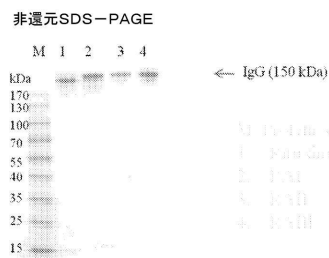


FIG. 6B

【図 7】

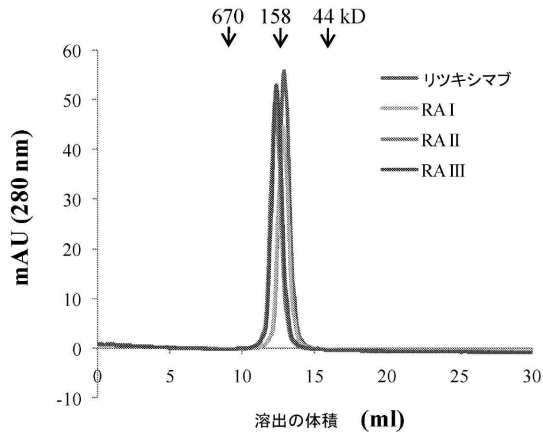


FIG. 7

【図 8 A】

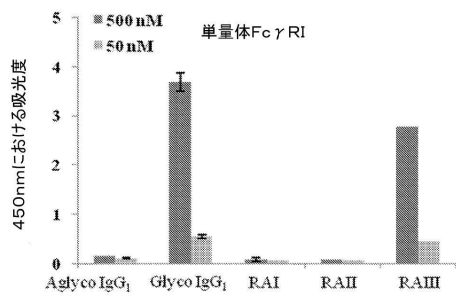


FIG. 8A

【図 8 D】

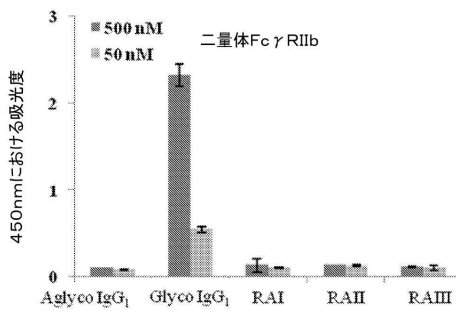


FIG. 8D

【図 8 E】

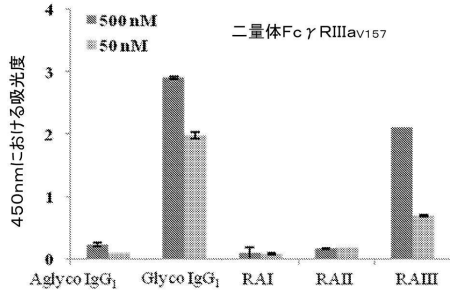


FIG. 8E

【図 8 B】

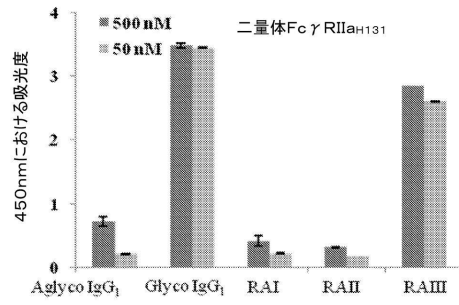


FIG. 8B

【図 8 C】

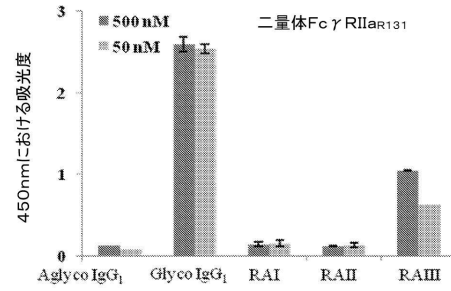


FIG. 8C

【図 8 F】

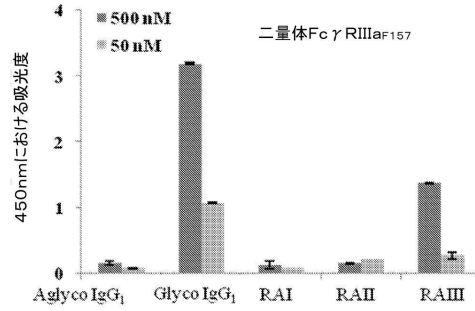


FIG. 8F

【図 9 A】

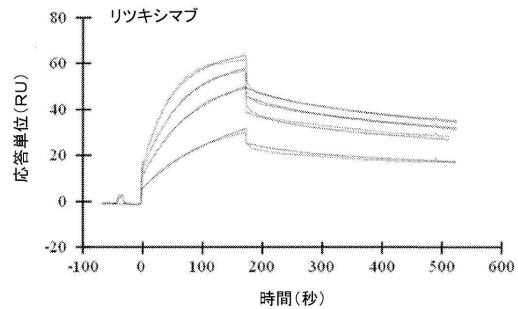


FIG. 9A

【図 9 B】

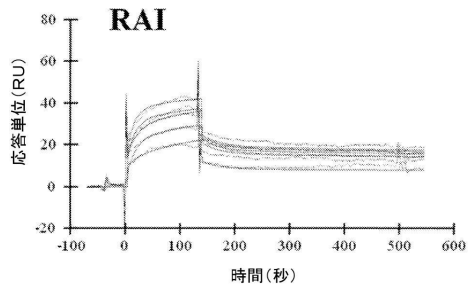


FIG. 9B

【図 9 D】

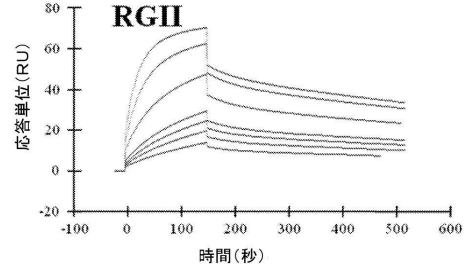


FIG. 9D

【図 9 C】

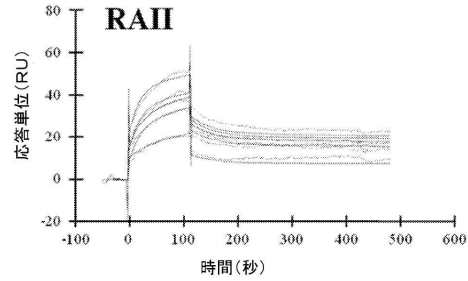


FIG. 9C

【図 1 0】

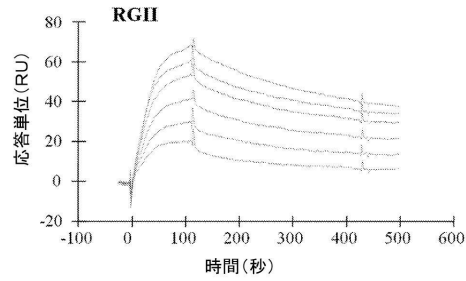


FIG. 10

【図 1 1 A】

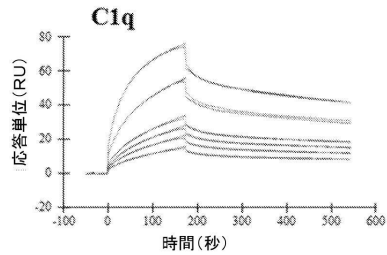


FIG. 11A

【図 1 1 C】

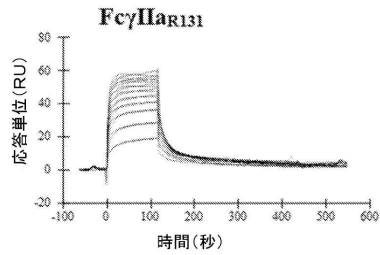


FIG. 11C

【図 1 1 B】

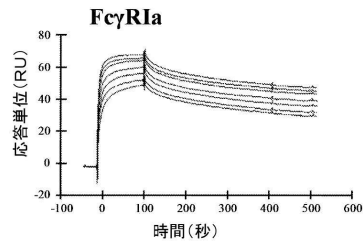


FIG. 11B

【図 1 1 D】

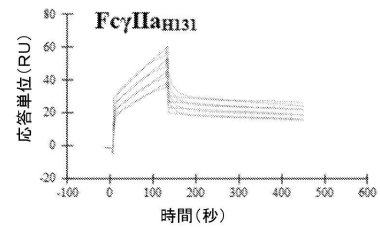


FIG. 11D

【図 1 1 E】

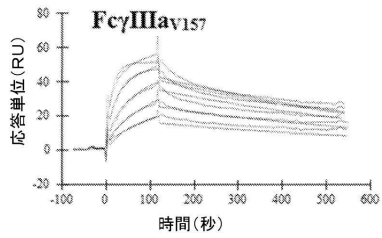


FIG. 11E

【図 1 1 F】

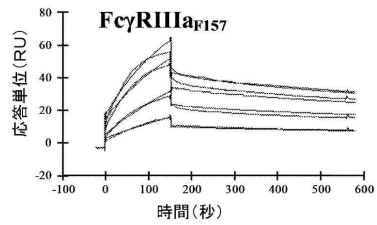


FIG. 11F

【図 1 2】

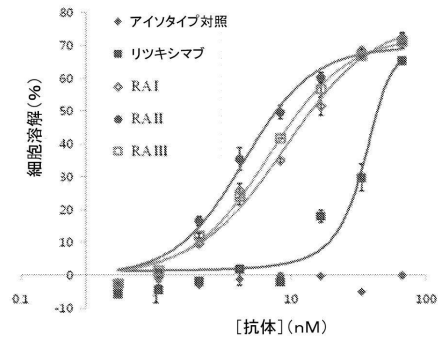


FIG. 12

【図 1 3】

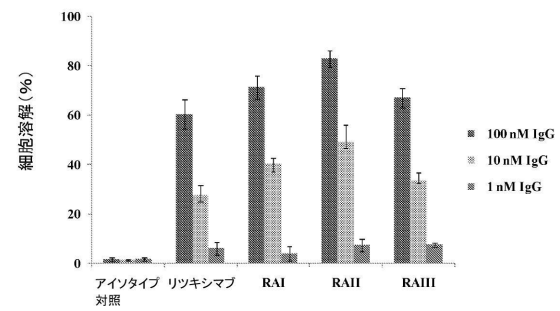


FIG. 13

【図 1 4】

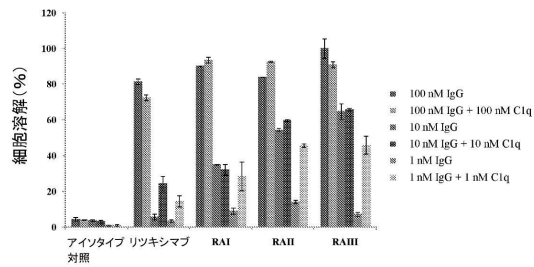


FIG. 14

【図 1 5 B】

PMN

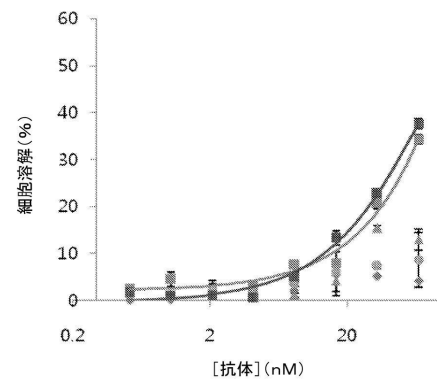


FIG. 15B

【図 1 5 A】

PBMC

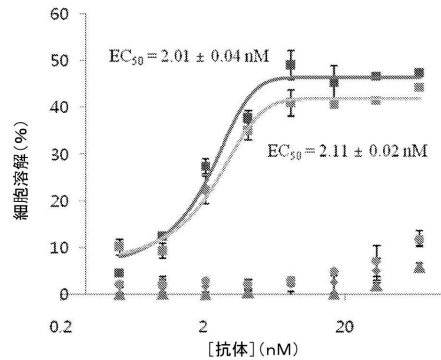


FIG. 15A

【図 1 6】

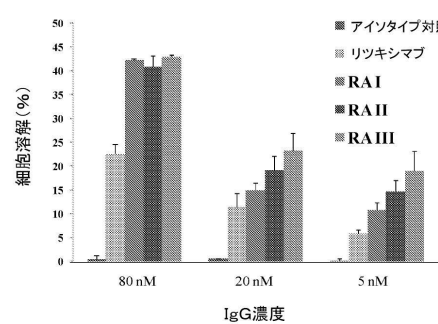


FIG. 16

【図 17】

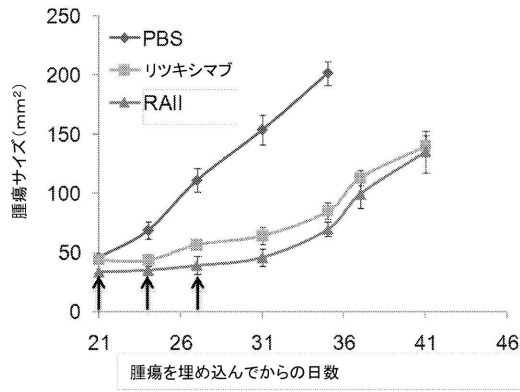


FIG. 17

【図 18 A】

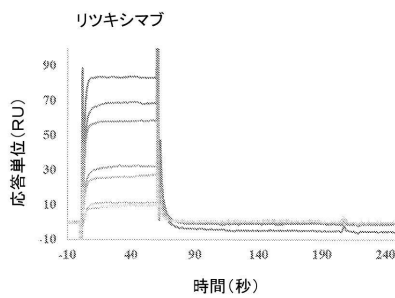


FIG. 18A

【図 18 B】

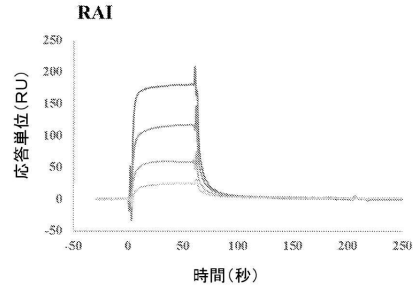


FIG. 18B

【図 18 C】

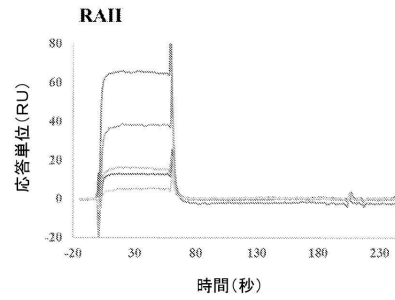


FIG. 18C

【図 18 D】

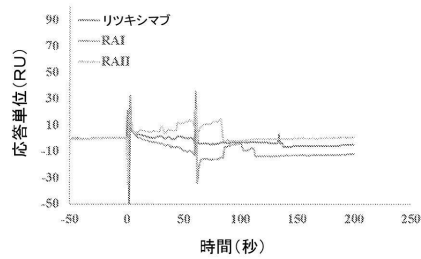


FIG. 18D

【図 20】

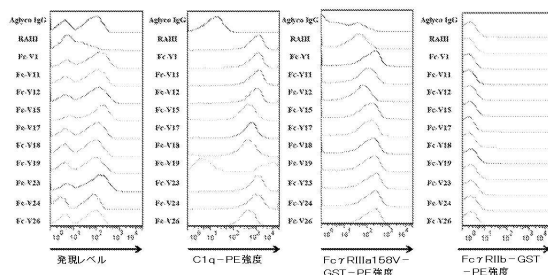


FIG. 20

【図 19】

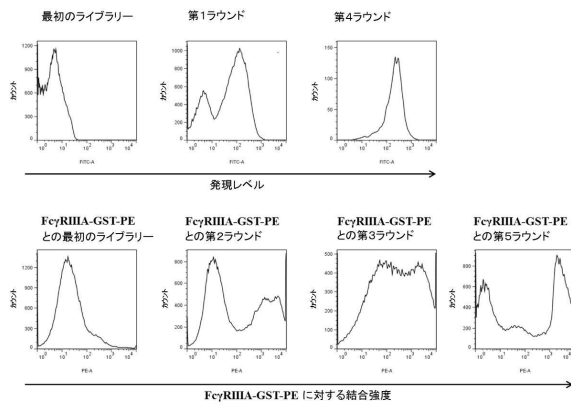


FIG. 19

【図 21】

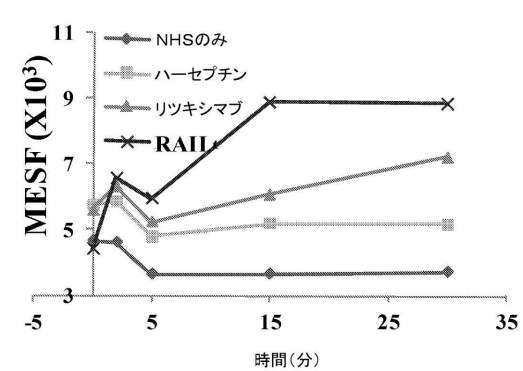


FIG. 21

【図 2 2】

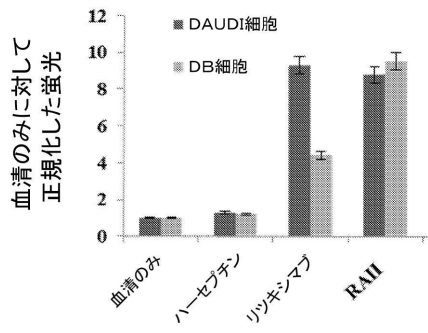


FIG. 22

【図 2 3】

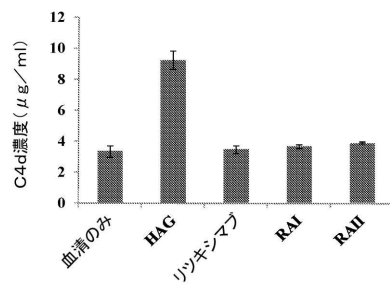


FIG. 23

【図 2 4】

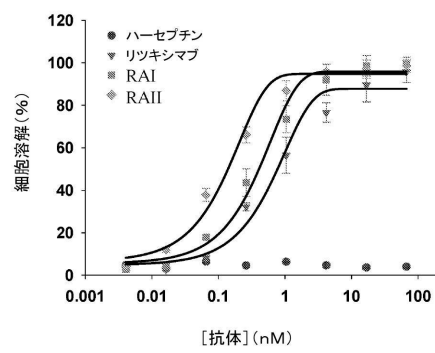


FIG. 24

【図 2 5 A】

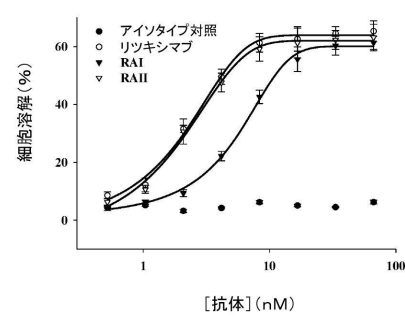


FIG. 25A

【図 2 5 B】

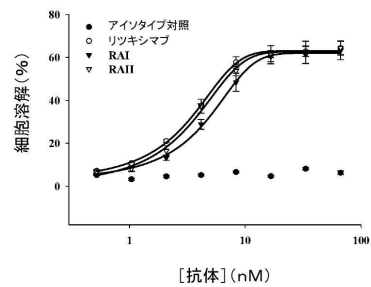


FIG. 25B

【図 2 5 D】

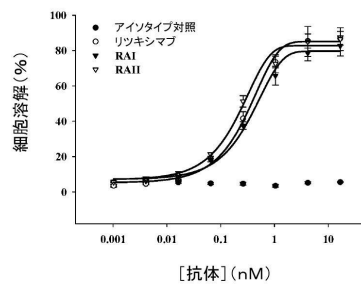


FIG. 25D

【図 2 5 C】

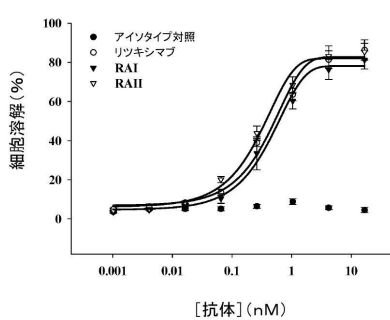


FIG. 25C

【図 2 6】

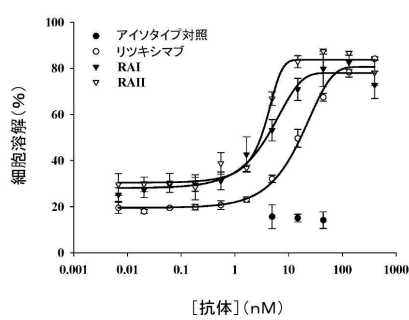


FIG. 26

【図 27A】

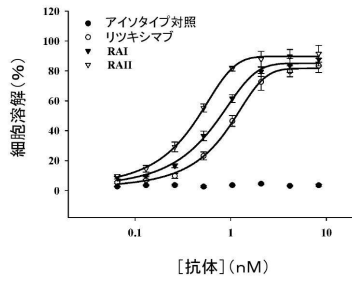


FIG. 27A

【図 27C】

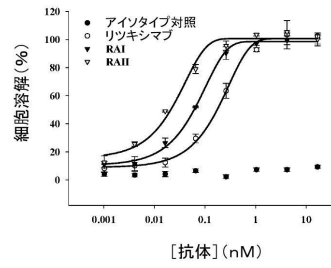


FIG. 27C

【図 27B】

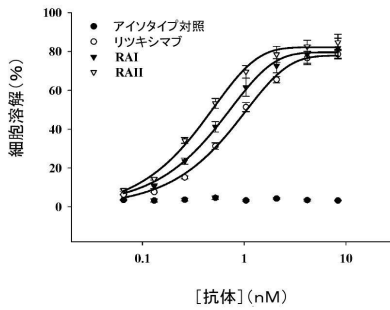


FIG. 27B

【図 27D】

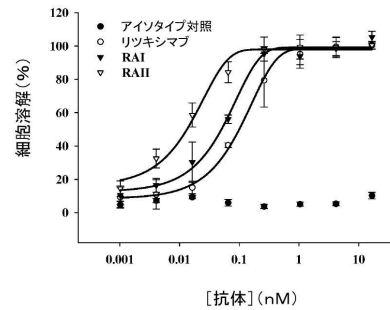


FIG. 27D

【図 28A】

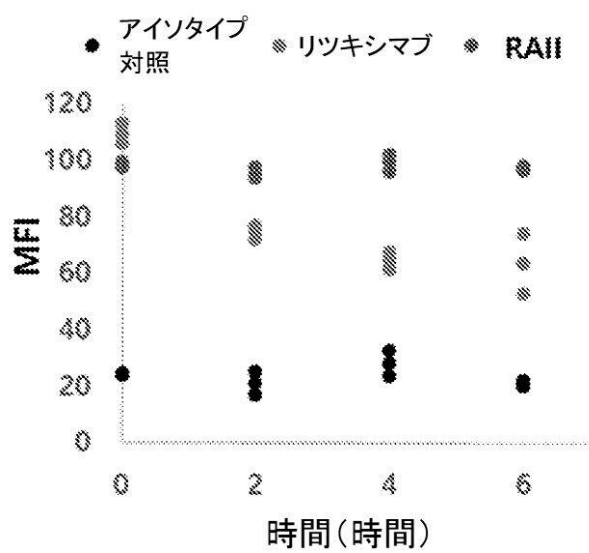


FIG. 28A

【図 28B】

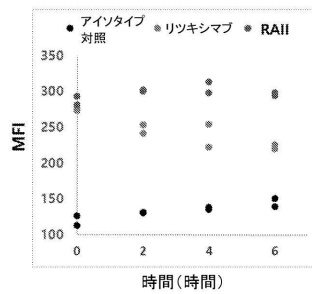


FIG. 28B

【図 29】

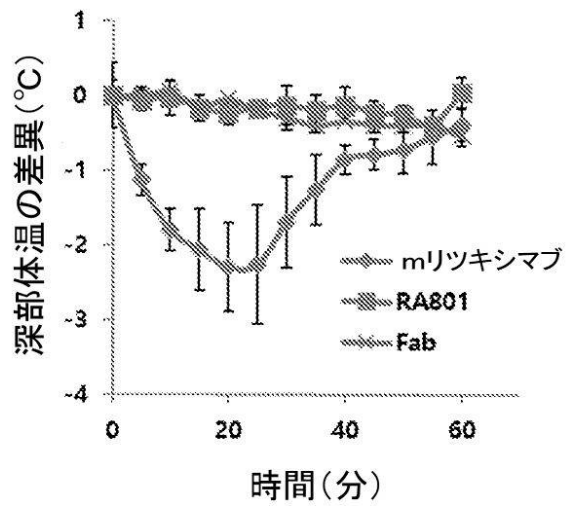


FIG. 29

【図 30】

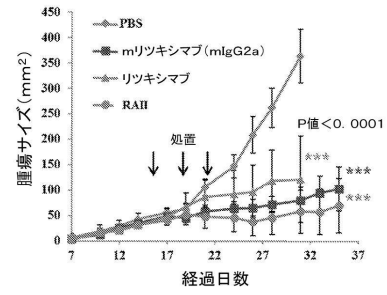


FIG. 30

【配列表】

0006724023000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		A 6 1 K 45/00
		C 1 2 N 15/13

(72)発明者 リー, チャン - ハン
 アメリカ合衆国 テキサス 78712, オースティン, シー 0400, 1 ユニバーシテ
 ィー ステーション, ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン 気付

審査官 金田 康平

(56)参考文献 国際公開第2008/030564(WO, A2)
 特表2008-505174(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q