

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7231549号
(P7231549)

(45)発行日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(24)登録日 令和5年2月20日(2023.2.20)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	

請求項の数 12 (全53頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-542388(P2019-542388)	(73)特許権者	399052796
(86)(22)出願日	平成30年2月6日(2018.2.6)		ダイナ ファーバー キャンサー インス
(65)公表番号	特表2020-505054(P2020-505054 A)		ティチュート, インコーポレイテッド
(43)公表日	令和2年2月20日(2020.2.20)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(86)国際出願番号	PCT/US2018/017027		2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
(87)国際公開番号	WO2018/145075	(74)代理人	100102978
(87)国際公開日	平成30年8月9日(2018.8.9)		弁理士 清水 初志
審査請求日	令和3年2月4日(2021.2.4)	(74)代理人	100102118
(31)優先権主張番号	62/455,245		弁理士 春名 雅夫
(32)優先日	平成29年2月6日(2017.2.6)	(74)代理人	100160923
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝
前置審査		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体媒介性受容体シグナル伝達を増強するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型ヒト I g G F c 領域の I g G 4 F c 変異体を含む操作されたポリペプチドであって、前記 F c 変異体が、

3 4 5 および 4 3 0 の残基位置における、六量体化を促進するアミノ酸置換であって、残基位置 3 4 5 の グルタミン酸 (E) が、リジン (K) によって置換されており、残基位置 4 3 0 の グルタミン酸 (E) が、グリシン (G) によって置換されている、アミノ酸置換 ; ならびに

2 2 8 および 4 0 9 の残基位置における安定化を促進するアミノ酸置換であって、残基位置 2 2 8 の セリン (S) がプロリン (P) に置換されており、残基位置 4 0 9 の アルギニン (R) がリジン (K) に置換されている、アミノ酸置換

を含み、前記アミノ酸残基が、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされる、前記操作されたポリペプチド。

【請求項 2】

K a b a t の E U インデックスによる残基位置 2 3 4 のアミノ酸が、アラニン (A) によって置換されている、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

K a b a t の E U インデックスによる残基位置 2 3 5 のアミノ酸が、アラニン (A) またはグルタミン酸 (E) によって置換されている、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

K a b a t の E U インデックスによる残基位置 4 4 0 のセリン (S) が、トリプトファン (W) によって置換されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

野生型 I g G F c 領域を含むポリペプチドと比較して 1 つ以上のヒト F c 受容体に対して低い親和性を示す、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】

野生型 I g G F c 領域を含むポリペプチドと比較して受容体クラスタリングの増加をさらに示す、請求項 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

抗体または F c 融合タンパク質である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記抗体が、単一特異性抗体、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

薬物、毒素、放射性標識、またはそれらの組み合わせとコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

B C M A 、 C A I X 、 C C R 4 、 P D - L 1 、 P D - L 2 、 P D 1 、 グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (G I T R) 、 T I G I T 、 重症急性呼吸器症候群 (S A R S) 、 中東呼吸器症候群 (M E R S) 、 インフルエンザ、またはフラビウイルスに特異的な抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (G I T R) に特異的な抗体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

C C R 4 に特異的な抗体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年2月6日に出願された米国仮特許出願第62/455,245号の優先権を主張するものであり、その全開示はその全体が参照により組み込まれる。

【0002】

本明細書において引用した全ての特許、特許出願及び刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載及び特許請求された本発明の日付の時点で当業者知られている最新技術をより完全に説明するため、これらの刊行物のその全体の開示は、参照により本出願に組み込まれる。

【0003】

本特許開示は著作権保護の対象となる資料を含む。著作権所有者は、米国特許商標庁の特許ファイルまたは記録に見られるように、特許文書または特許開示のいずれかによるファクシミリ複製に異議を唱えないが、それ以外の場合は全ての著作権を留保する。

【0004】

発明の分野

本発明は、概して、機能が增强された治療用抗体に関する。具体的には、本発明は、F c 領域の変異体を含むポリペプチド、及びそれを含む抗体に関する。より詳細には本発明は、ポリペプチドの F c 領域における 1 つ以上のアミノ酸置換の結果として、エフェクター機能が変化した F c 領域含有ポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0005】

10

20

30

40

50

発明の背景

モノクローナル抗体は大きな潜在的治療能力を有し、今日の医療ポートフォリオにおいて重要な役割を果たしている。この10年間で、製薬業界における大きな流れは、がん、喘息、関節炎、及び多発性硬化症などの多くの病気の治療のための治療薬としてモノクローナル抗体 (mAb) を開発することであった。

【0006】

抗体のFc領域、すなわち、抗体全体にわたるドメインの重鎖末端であるCH2、CH3、及びヒンジ領域の一部は、可変性が制限されており、抗体が果たす生理学的役割への作用に参与している。抗体のFc領域に起因するエフェクター機能は、抗体のクラス及びサブクラスによって様々であり、様々な生物学的応答を引き起こす、細胞上の特定のFc受容体 (「FcR」) へのFc領域を介した抗体の結合が含まれる。

10

【発明の概要】

【0007】

本発明は、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体、例えば、アミノ酸置換E345K、E430G、L234A、及びL235A；またはE345K、E430G、S228P、及びR409Kを有するFc変異体を含むポリペプチドを特徴とする。残基は、KabataのEUインデックスにしたがって番号付けされる (例えば、Edelman, et al., Proc Natl Acad Sci USA 63 (1969) 78-85 参照)。ポリペプチドは、野生型IgG Fc領域を有するポリペプチドと比較して1つ以上のヒトFc受容体に対する親和性の低下及び/または受容体クラスタリングの増加を示す。

20

【0008】

本発明の一態様は、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む操作されたポリペプチドに関する。一実施形態では、Fc変異体は、残基位置228、234、235、345、409、430、440またはそれらの組み合わせにおける1つのアミノ酸置換または少なくとも2、3、4、5、6、もしくは7つの置換を含み、該アミノ酸残基は、KabataのEUインデックスにしたがって番号付けされる。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置228のアミノ酸は、プロリン (P) またはセリン (S) によって置換されている。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置234のアミノ酸は、アラニン (A) によって置換されている。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置235のアミノ酸は、アラニン (A) によって置換されている。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置345のグルタミン酸 (E) は、リジン (K)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、またはチロシン (Y) によって置換されている。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置409のアミノ酸は、リジン (K) またはアルギニン (R) によって置換されている。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置430のグルタミン酸 (E) は、グリシン (G)、セリン (S)、フェニルアラニン (F)、またはトレオニン (T) によって置換されている。一実施形態では、KabataのEUインデックスによる残基位置440のセリン (S) は、トリプトファン (W) によって置換されている。一実施形態では、アミノ酸置換は、L234A、L235A、E345K、及びE430Gを含み、該アミノ酸残基は、KabataのEUインデックスにしたがって番号付けされる。一実施形態では、アミノ酸置換は、S228P、E345K、R409K、及びE430Gを含み、該アミノ酸残基は、KabataのEUインデックスにしたがって番号付けされる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、野生型IgG Fc領域を含むポリペプチドと比較して、1つ以上のヒトFc受容体に対して低い親和性を示す。他の実施形態では、ポリペプチドは、野生型IgG Fc領域を含むポリペプチドと比較して受容体クラスタリングの増加をさらに示す。

30

40

【0009】

本発明の一態様は、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む操作されたポリペプチドに関し、該Fc変異体は、配列番号4に対して少なくとも90%の同一性を含むア

50

ミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、またはそれらの組み合わせにおいて起こる。一実施形態では、Fc変異体は、配列番号4に対して、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を含むアミノ酸配列を含む。一実施形態では、 X_1 は、セリン(S)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_2 は、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_3 は、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_4 は、リジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_5 は、リジン(K)またはアルギニン(R)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_6 は、グリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_7 は、トリプトファン(W)を含むアミノ酸置換である。

10

【0010】

本発明の一態様は、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む操作されたポリペプチドに関し、該Fc変異体は、配列番号5に対して少なくとも90%の同一性を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、またはそれらの組み合わせにおいて起こる。一実施形態では、Fc変異体は、配列番号5に対して、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を含むアミノ酸配列を含む。一実施形態では、 X_1 は、セリン(S)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_2 は、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_3 は、リジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_4 は、リジン(K)またはアルギニン(R)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_5 は、グリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_6 は、トリプトファン(W)を含むアミノ酸置換である。

20

【0011】

本発明の一態様は、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む操作されたポリペプチドに関し、該Fc変異体は、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、またはそれらの組み合わせにおいて起こる。一実施形態では、Fc変異体は、配列番号6に対して、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を含むアミノ酸配列を含む。一実施形態では、 X_1 は、KabatのEUIンデックスによる残基位置228におけるアミノ酸の置換であり、かつプロリン(P)を含む。一実施形態では、 X_2 は、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_3 は、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_4 は、リジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_5 は、リジン(K)またはアルギニン(R)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_6 は、グリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含むアミノ酸置換である。一実施形態では、 X_7 は、トリプトファン(W)を含むアミノ酸置換である。

30

40

【0012】

ポリペプチドは、例えば、抗体またはFc融合タンパク質である。抗体は、単一特異性抗体、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である。ポリペプチドは、ヒトIgG1、IgG2、またはIgG4のFc領域を有することができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、例えばCD27、OX40、4-1BB、CD40L、ICOS、及びCD28などの免疫モジュレーターに対して抗体特異的であり得る。必要に応じて、ポリ

50

ペプチドは、BCMA、CAIX、CCR4、PD-L1、PD-L2、PD1、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体(GITR)、TIGIT、重症急性呼吸器症候群(SARS)、中東呼吸器症候群(MERS)、インフルエンザ、またはフラビウイルスに特異的な抗体である。

【0013】

一実施形態では、ポリペプチドは、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体(GITR)に特異的な抗体である。一実施形態では、組換えGITR抗体は、表1Bに開示された可変領域アミノ酸配列、及び表3B(配列番号18、19、21、22、24)、表4B(配列番号18、19、20、22、26)、表5B(配列番号18、19、22、29、及び30)、または表6B(配列番号36、37、38、40、及び42)に開示された変異型Fc領域アミノ酸配列を含む。

10

【0014】

一実施形態では、ポリペプチドは、CCR4に特異的な抗体である。一実施形態では、組換えCCR4抗体は、表1Bに開示された可変領域アミノ酸配列、及び表3B(配列番号18、19、21、24)、表4B(配列番号18、19、20、26)、表5B(配列番号18、19、29、及び30)、表6B(配列番号36、37、38、及び42)、または配列番号44に開示された変異型Fc領域アミノ酸配列を含む。

【0015】

各種態様では、ポリペプチドは、当分野で実施されているように、薬物、毒素、放射性標識、またはそれらの組み合わせとコンジュゲートしている。いくつかの実施形態では、毒素は、シュドモナス外毒素、リシン、ボツリヌス毒素、またはPolitola(Biomedicines, 2016 Jun 1; 4(2). pii: E12. doi: 10.3390/biomedicines4020012)(その全体が参照により組み込まれる)によって記載されているものなどの当業者によって使用される他の毒素であり得る。いくつかの実施形態では、放射性標識は、イットリウム-90、レニウム-188、ルテチウム-177、ストロンチウム-89、ラジウム-223などであり得る。いくつかの実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、モノメチルアウリスタチンE、または例えば、Schumacherら(J Clin Immunol, 2016 May; 36 Suppl 1: 100-7. doi: 10.1007/s10875-016-0265-6. Epub 2016 Mar 22)(その全体が参照により組み込まれる)によって記載された他のものであり得る。

20

30

【0016】

本発明によるポリペプチドまたはそれをコードする核酸を投与することによって、病気に罹患している対象を治療する方法もまた本発明に含まれる。本発明によるポリペプチドまたはそれをコードする核酸と、薬学的に許容可能な担体とを含む、治療上有効量の組成物を対象に投与することによって、病気に罹患している対象を治療する方法もまた本発明に含まれる。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組換えGITR抗体を対象に投与することを含む対象における腫瘍の治療方法を提供する。一実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍または液性腫瘍である。いくつかの実施形態では、液性腫瘍は、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病(AML)、または急性リンパ芽球性白血病(ALL)であり得る。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組換えCCR4抗体を対象に投与することを含む対象における血液由来がんの治療を提供する。一実施形態では、血液由来がんは、リンパ腫または白血病である。

40

【0017】

他の態様では、本発明は、細胞と、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む、細胞上のリガンドに結合することができる抗体とを接触させることによって、細胞内シグナル伝達を増強するかまたは細胞の受容体クラスタリングを誘導する方法を提供する。Fc変異体は、E345、E430、及び/またはS440でのアミノ酸置換などのアミノ酸置換を有し、該残基は、KabattのEUIンデックスにしたがって番号付けされる。一実施形態では、突然変異には、E430G、E430S、E430F、E430T、E

50

3 4 5 K、E 3 4 5 Q、E 3 4 5 R、E 3 4 5 Y、またはS 4 4 0 Wのうちの1つ以上が含まれる。

【0018】

別途定義されていない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明に係る技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載された方法及び材料と類似または同等の方法及び材料を本明細書の実施において使用することができるが、好適な方法及び材料は以下に記載される。本明細書で言及された全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、その全体が参照により明示的に組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。加えて、本明細書に記載される材料、方法、及び例は、ただの例示であり、制限することを目的とするものではない。

10

【0019】

[本発明1001]

野生型ヒトI g G F c領域のF c変異体を含む操作されたポリペプチドであって、前記F c変異体が、残基位置228、234、235、345、409、430、440またはそれらの組み合わせにおけるアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸残基が、K a b a tのE Uインデックスにしたがって番号付けされる、前記操作されたポリペプチド。

[本発明1002]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置228のアミノ酸が、プロリン(P)またはセリン(S)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

20

[本発明1003]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置234のアミノ酸が、アラニン(A)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1004]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置235のアミノ酸が、アラニン(A)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1005]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置345のグルタミン酸(E)が、リジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

30

[本発明1006]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置409のアミノ酸が、リジン(K)またはアルギニン(R)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1007]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置430のグルタミン酸(E)が、グリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1008]

K a b a tのE Uインデックスによる残基位置440のセリン(S)が、トリプトファン(W)によって置換されている、本発明1001のポリペプチド。

40

[本発明1009]

前記アミノ酸置換が、L 234 A、L 235 A、E 345 K、及びE 430 Gを含み、前記アミノ酸残基が、K a b a tのE Uインデックスにしたがって番号付けされる、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1010]

前記アミノ酸置換が、S 228 P、E 345 K、R 409 K、及びE 430 Gを含み、前記アミノ酸残基が、K a b a tのE Uインデックスにしたがって番号付けされる、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1011]

野生型I g G F c領域を含むポリペプチドと比較して1つ以上のヒトF c受容体に対し

50

て低い親和性を示す、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1012]

野生型 I g G F c 領域を含むポリペプチドと比較して受容体クラスタリングの増加をさらに示す、本発明1011のポリペプチド。

[本発明1013]

ヒト I g G1、I g G2、または I g G4 の F c 領域を含む、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1014]

抗体または F c 融合タンパク質である、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1015]

前記抗体が、単一特異性抗体、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である、本発明1014のポリペプチド。

[本発明1016]

薬物、毒素、放射性標識、またはそれらの組み合わせとコンジュゲートしている、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1017]

B C M A、C A I X、C C R4、P D - L1、P D - L2、P D1、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (G I T R)、T I G I T、重症急性呼吸器症候群 (S A R S)、中東呼吸器症候群 (M E R S)、インフルエンザ、またはフラビウイルスに特異的な抗体である、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1018]

グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (G I T R) に特異的な抗体である、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1019]

C C R4 に特異的な抗体である、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1020]

野生型ヒト I g G F c 領域の F c 変異体を含む操作されたポリペプチドであって、前記 F c 変異体が、配列番号4に対して少なくとも90%の同一性を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換が、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、またはそれらの組み合わせにおいて起こる、前記操作されたポリペプチド。

[本発明1021]

X₁ が、セリン (S) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1022]

X₂ が、アラニン (A) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1023]

X₃ が、アラニン (A) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1024]

X₄ が、リジン (K)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、またはチロシン (Y) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1025]

X₅ が、リジン (K) またはアルギニン (R) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1026]

X₆ が、グリシン (G)、セリン (S)、フェニルアラニン (F)、またはトレオニン (T) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1027]

X₇ が、トリプトファン (W) を含むアミノ酸置換である、本発明1020のポリペプチド。

[本発明1028]

野生型ヒト I g G F c 領域の F c 変異体を含む操作されたポリペプチドであって、前記 F c 変異体が、配列番号5に対して少なくとも90%の同一性を含むアミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

アミノ酸置換が、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、またはそれらの組み合わせにおいて起こる、前記操作されたポリペプチド。

[本発明1029]

X_1 が、セリン(S)を含むアミノ酸置換である、本発明1028のポリペプチド。

[本発明1030]

X_2 が、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である、本発明1028のポリペプチド。

[本発明1031]

X_3 が、リジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含むアミノ酸置換である、本発明1028のポリペプチド。

[本発明1032]

X_4 が、リジン(K)またはアルギニン(R)を含むアミノ酸置換である、本発明1028のポリペプチド。

[本発明1033]

X_5 が、グリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含むアミノ酸置換である、本発明1028のポリペプチド。

[本発明1034]

X_6 が、トリプトファン(W)を含むアミノ酸置換である、本発明1028のポリペプチド。

[本発明1035]

野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む操作されたポリペプチドであって、前記Fc変異体が、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換が、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、またはそれらの組み合わせにおいて起こる、前記操作されたポリペプチド。

[本発明1036]

X_1 が、KababのEUインデックスによる残基位置228におけるアミノ酸の置換であり、かつプロリン(P)を含む、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1037]

X_2 が、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1038]

X_3 が、アラニン(A)を含むアミノ酸置換である、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1039]

X_4 が、リジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含むアミノ酸置換である、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1040]

X_5 が、リジン(K)またはアルギニン(R)を含むアミノ酸置換である、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1041]

X_6 が、グリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含むアミノ酸置換である、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1042]

X_7 が、トリプトファン(W)を含むアミノ酸置換である、本発明1035のポリペプチド。

[本発明1043]

表1Bに開示された可変領域アミノ酸配列、及び表3B(配列番号18、19、21、22、24)、表4B(配列番号18、19、20、22、26)、表5B(配列番号18、19、22、29、及び30)、または表6B(配列番号36、37、38、40、及び42)に開示された変異型Fc領域アミノ酸配列を含む、組換えGITR抗体。

[本発明1044]

表1Bに開示された可変領域アミノ酸配列、及び表3B(配列番号18、19、21、24)、表4B(配列番号18、19、20、26)、表5B(配列番号18、19、29、及び30)、または表6B(配列番号36、37、38、及び42)に開示された変異型Fc領域アミノ酸配列を含む、組換えCCR4抗体。

10

20

30

40

50

[本発明1045]

本発明1043の組換えG I T R抗体を対象に投与することを含む、前記対象における腫瘍の治療方法。

[本発明1046]

本発明1044の組換えC C R 4抗体を対象に投与することを含む、血液由来がんの治療方法。

[本発明1047]

前記血液由来がんが、リンパ腫または白血病である、本発明1046の方法。

[本発明1048]

細胞と該細胞上のリガンドに結合する抗体とを接触させることを含む、細胞の細胞内シグナル伝達を増強する方法であって、前記抗体が、野生型ヒトI g G F c領域のF c変異体を含み、前記F c変異体が、E 345、E 430、及び/またはS 440にアミノ酸置換を含み、前記残基が、K a b a tのE Uインデックスにしたがって番号付けされる、前記方法。

10

[本発明1049]

前記置換が、E 430 G、E 430 S、E 430 F、E 430 T、E 345 K、E 345 Q、E 345 R、E 345 Y、S 440 W、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記置換が、E 345 K及びE 430 Gである、本発明1049の方法。

[本発明1051]

細胞と該細胞上のリガンドに結合する抗体とを接触させることを含む、細胞の受容体クラスタリングを誘導する方法であって、前記抗体が、野生型ヒトI g G F c領域のF c変異体を含み、前記F c変異体が、E 345、E 430、及び/またはS 440にアミノ酸置換を含み、前記残基が、K a b a tのE Uインデックスにしたがって番号付けされる、前記方法。

20

[本発明1052]

前記置換が、E 430 G、E 430 S、E 430 F、E 430 T、E 345 K、E 345 Q、E 345 R、E 345 Y、S 440 W、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1051の方法。

[本発明1053]

前記置換が、E 345 K及びE 430 Gである、本発明1052の方法。

30

[本発明1054]

腫瘍が、固形腫瘍または液性腫瘍である、本発明1045の方法。

本発明のその他の特徴及び利点は、下記の発明を実施するための形態及び特許請求の範囲により明らかとなり、かつそれらに包含されるであろう。

【図面の簡単な説明】**【0020】**

【図1】 293F細胞から発現及び精製された抗G I T R抗体のS D S - P A G E分析である。抗G I T R抗体E 1 - 3 H 7 I g G 1 L A L A (レーン1)、E 1 - 3 H 7安定化I g G 4 (レーン2)、C T I - 10安定化I g G 4 (レーン3)、E 1 - 3 H 7 I g G 1 L A L A六量体 (レーン4)、E 1 - 3 H 7安定化I g G 4六量体 (レーン5) 及びE 1 - 3 H 7 I g G 1野生型六量体 (レーン6) をコードするp T C A Eプラスミドが293F細胞に一過的にトランスフェクトされる。細胞上清を96時間後に回収し、プロテインAアフィニティー樹脂によって精製した。精製した各抗体の約2 u g (精製後のO D 2 8 0読み取り値により決定) を4 ~ 20%ポリアクリルアミドゲルにより分析し、クマシーブルー染色により可視化した。レーン7は既知濃度の対照C T I - 10 I g G 1を含む。パネルA還元条件; パネルB非還元条件。データは各抗体が発現及び精製されたことを示す。

40

【図2】 G I T R - G I T R L相互作用が、本発明者らのアッセイに使用されるP r o m e g a製のG l o R e s p o n s e N F - k B - l u c 2 P / G I T R J u r k a t細胞アッセイシステム内でN F - k B経路を活性化することを示す図である。

50

【図3】GloResponse NF-kB-luc2P/GITR Jurkat細胞は、表面発現受容体GITRとのルシフェラーゼ活性に基づくリガンドまたは抗体反応を生じさせるレポーター細胞である。システム対照として、パネルAは、GITRリガンド(GITRL)が予想通りにルシフェラーゼ活性を誘導したことを示し、パネルBは、抗HA抗体が111ng/mlのGITRLで誘導されたルシフェラーゼ活性をさらに増強するというデータを提示する(GITRLはC末端のHAタグと融合していることに留意されたい)。パネルCは、本発明者らが新たに発見した抗GITR抗体E1-3H7-sIgG4がGITR/NF-kB依存性ルシフェラーゼ単独を誘導することができるか、または111ng/mlのGITRLで誘導されたルシフェラーゼ活性をさらに増強することを示しており、これは市販の抗GITR抗体対照、CTI-10、パネルDの挙動とは異なる。

10

【図4】六量体化抗GITR E1-3H7抗体は、GITR/NF-kB依存性ルシフェラーゼ活性の媒介において感受性が増加している。(A)抗GITR抗体E1-3H7 IgG1-LALA及び対応する六量体(E1-3H7-LALA六量体)は、GloResponse NF-kB-luc2P/GITR Jurkat細胞から用量依存的にルシフェラーゼ活性を誘導した。E1-3H7六量体は、ルシフェラーゼ誘導を抗体濃度でおよそ1log低くシフトすることができたことに注意されたい。(B)抗GITR E1-3H7抗体は、GITRL誘導ルシフェラーゼ活性をさらに増強する。ここでも、E1-3H7-LALA六量体は、はるかに低い抗体濃度でそのような誘導を達成した。パネルC及びDは、E1-3H7による類似の効果がIgG4及びその対応するsIgG4六量体を安定化させたことを示す。111ng/mlのGITRリガンドの非存在下(パネルA及びC)または存在下(パネルB及びD)において、抗GITR E1-3H7抗体を5000ng/ml~20.58ng/mlの3倍希釈で使用した。

20

【図5】六量体化抗GITR E1-3H7抗体は、GITR/NF-kB依存性ルシフェラーゼ活性の媒介において感受性が増加している。ルシフェラーゼ誘導の範囲を全て確認するために、111ng/mlのGITRリガンドの非存在下(パネルA及びC)または存在下(パネルB及びD)で抗GITR E1-3H7-IgG1-LALAまたはIgG4抗体濃度を15000ng/ml~61.73ng/mlの3倍希釈で使用したことを除いて同様の実験が図4に示されるが、それらの対応する六量体フォーマットは5000ng/ml~20.58ng/mlのままであった。無関係のIgG対照は、111ng/mlのGITRLによるルシフェラーゼ誘導のベースレベルに有意な効果を及ぼさなかったことを示した。

30

【図6】抗GITR E1-3H7抗体のIgG1 Fc野生型、IgG1 Fc LALA突然変異体、または安定化IgG4六量体は、GITR/NF-kB依存性ルシフェラーゼ活性の媒介において類似の活性を有する。111ng/mlのGITRリガンドの非存在下または存在下で、抗GITR E1-3H7-IgG1野生型またはIgG1-LALAまたはsIgG4六量体抗体濃度を5000ng/ml~20.58ng/mlの3倍希釈で使用した一方、対照IgG1は15000ng/ml~61.73ng/mlの濃度を有する。パネルAにおけるE1-3H7-IgG1野生型六量体の結果は、パネルB及びCまたはパネルD及びEに提示されたものとは別の実験からのものであったことに留意されたい。X軸及びY軸はパネルA~Eについて同じである。

40

【図7】Promegaのレポーターシステムを用いたADCCアッセイである。

【図8】IgG1の野生型及びLALA六量体突然変異体のFc領域の核酸及びアミノ酸配列である。

【図9】安定化六量体IgG4のFc領域の核酸及びアミノ酸配列である。

【図10】IgG抗体の哺乳動物発現に使用することができるベクターの発現ベクターマップである。

【図11】IgG抗体の哺乳動物発現に使用することができるベクターの発現ベクターマップである。

【図12】IgG1の野生型Fc領域のアミノ酸配列(配列番号1)、及びKababの

50

EUインデックスによる対応するアミノ酸残基番号である。

【図13】IgG2の野生型Fc領域のアミノ酸配列（配列番号2）、及びKababのEUインデックスによる対応するアミノ酸残基番号である。

【図14】IgG4の野生型Fc領域のアミノ酸配列（配列番号3）、及びKababのEUインデックスによる対応するアミノ酸残基番号である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

1つ以上の好ましい実施形態の詳細な説明が本明細書に提供される。しかしながら、本発明は様々な形態で具体化することができることを理解されたい。したがって、本明細書に開示された詳細は、限定として解釈されるべきではなく、むしろ特許請求の範囲の基礎として、及び任意の適切な方法で本発明を使用することを当業者に教示するための代表的な基礎として解釈される。

10

【0022】

Fc受容体は、Fcへの結合を媒介する細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内のいくつかのシグナル伝達事象を媒介し得る細胞内ドメインを有することができる。これらの受容体は、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、肥満細胞、血小板、B細胞、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、及びT細胞を含む様々な免疫細胞において発現される。Fc/FcR複合体の形成は、これらのエフェクター細胞を結合抗原の部位に動員し、典型的には、細胞内のシグナル伝達事象、ならびに炎症メディエーターの放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、食作用、及び細胞傷害性攻撃などの引き続いて起こる重要な免疫応答をもたらす。

20

【0023】

多くの状況では、免疫グロブリンのFc領域によって媒介される結合及びエフェクター機能の刺激は、例えば、CD20抗体にとっては非常に有益であるが、特定の場合には、エフェクター機能を低下させるか、またはさらには排除することがより有利となり得る。

【0024】

その他の場合、例えば、広く発現した受容体とその同族リガンドとの相互作用を遮断することが目的である場合、望ましくない毒性を低減させるために全ての抗体エフェクター機能を低下または排除することが有利となり得る。

30

【0025】

受容体クラスタリングを増加させることによってシグナル伝達を増強することもまた有利となり得る。

【0026】

ADCC及び/またはADCP及び/またはCDCといったエフェクター機能が大きく低下し、受容体細胞シグナル伝達が増強され、及び/または受容体細胞クラスタリングが誘導される抗体に対するニーズは満たされていない。したがって、本発明の目的は、そのような効果を促進するために導入された突然変異を有する免疫グロブリンのFc領域のポリペプチドを合成及び/または操作し、そして最終的に、操作されたFc領域を含む抗体を同定することである。

40

【0027】

本発明は、抗体の六量体化を促進することが知られている抗体のFc領域における突然変異の発見に部分的に基づいており、補体依存性細胞傷害（CDC）の増加はまた、エフェクター細胞のシグナル伝達を著しく増強するという予想外の能力を有する。本発明の抗体変異体を含むポリペプチド変異体は全て、抗体の六量体化及びエフェクター機能の低下を促進することが知られている1つ以上の突然変異（複数可）を含む免疫グロブリンの結合領域、及び完全長または部分的Fcドメインを含む。

【0028】

配列番号1は、IgG1の野生型Fc領域のアミノ酸配列（UniProtKB - P01857（IGHG1_HUMAN）；330アミノ酸）（CH1ドメインは太字であり

50

; ヒンジ領域は下線が引かれ; CH2ドメインはイタリック体であり; CH3ドメインは破線が引かれ; 影付き領域は本発明にしたがって置換され得るアミノ酸である)を提供する。図12は、配列番号1を、KabatのEUインデックスにしたがって番号付けされるアミノ酸残基と対応させる表である。

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPAPAEELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGGQPRFPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0029】

10

配列番号4は、IgG1の変異型Fc領域のアミノ酸配列(UniProtKB-P01857(IGHG1_HUMAN);330アミノ酸)(CH1ドメインは太字であり; ヒンジ領域は下線が引かれ; CH2ドメインはイタリック体であり; CH3ドメインは破線が引かれ; 影付き領域は本発明にしたがって置換され得るアミノ酸残基を表し、X1は、KabatのEUインデックスによる残基位置228におけるアミノ酸の置換であり、かつプロリン(P)を含み; X2は、KabatのEUインデックスによる残基位置234におけるアミノ酸の置換であり、かつアラニン(A)を含み; X3は、KabatのEUインデックスによる残基位置235におけるアミノ酸の置換であり、かつアラニン(A)を含み; X4は、KabatのEUインデックスによる残基位置345におけるアミノ酸の置換であり、かつリジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含み; X5は、KabatのEUインデックスによる残基位置409におけるアミノ酸の置換であり、かつアルギニン(R)を含み; X6は、KabatのEUインデックスによる残基位置430におけるアミノ酸の置換であり、かつグリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含み; かつX7は、KabatのEUインデックスによる残基位置440におけるアミノ酸の置換であり、かつトリプトファン(W)を含む)を提供する。

20

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPAPAEELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPRFPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【0030】

配列番号2は、IgG2の野生型Fc領域のアミノ酸配列(UniProtKB-P01859(IGHG2_HUMAN);326アミノ酸)(CH1ドメインは太字であり; ヒンジ領域は下線が引かれ; CH2ドメインはイタリック体であり; CH3ドメインは破線が引かれ; 影付き領域は本発明にしたがって置換され得るアミノ酸である)を提供する。図13は、配列番号2を、KabatのEUインデックスにしたがって番号付けされるアミノ酸残基と対応させる表である。

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
NFGTQTYTCNVNDRKPSNTKVDKTKVERKCCVCECPAPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
RFPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

【0031】

配列番号5は、IgG2の変異型Fc領域のアミノ酸配列(UniProtKB-P01859(IGHG2_HUMAN);326アミノ酸)(CH1ドメインは太字であり; ヒンジ領域は下線が引かれ; CH2ドメインはイタリック体であり; CH3ドメインは破線が引かれ; 影付き領域は本発明にしたがって置換され得るアミノ酸残基を表し、X1は、KabatのEUインデックスによる残基位置228におけるアミノ酸の置換であり、かつプロリン(P)を含み; X2は、KabatのEUインデックスによる残基位置2

50

35におけるアミノ酸の置換であり、かつアラニン(A)を含み；X₃は、KabatのEUインデックスによる残基位置345におけるアミノ酸の置換であり、かつリジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含み；X₄は、KabatのEUインデックスによる残基位置409におけるアミノ酸の置換であり、かつアルギニン(R)を含み；X₅は、KabatのEUインデックスによる残基位置430におけるアミノ酸の置換であり、かつグリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含み；かつX₆は、KabatのEUインデックスによる残基位置440におけるアミノ酸の置換であり、かつトリプトファン(W)を含む)を提供する。

ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV~~ERKCCVECP~~~~CPAPP~~AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
 QPRX~~PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~SVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS~~SLTVD~~
 KSRWQEGNVFSCSVMHX~~ALHNHYTQK~~LSLSLPGK

10

【0032】

配列番号3は、IgG4の野生型Fc領域のアミノ酸配列(UniProtKB - P01861 (IGHG4_HUMAN)；327アミノ酸)(CH1ドメインは太字であり；ヒンジ領域は下線が引かれ；CH2ドメインはイタリック体であり；CH3ドメインは破線が引かれ；影付き領域は本発明にしたがって置換され得るアミノ酸である)を提供する。図14は、配列番号3を、KabatのEUインデックスにしたがって番号付けされるアミノ酸残基と対応させる表である。

ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP~~CPAPE~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ
 EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
 PR~~PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA~~VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS~~SLTVDKSR~~
 WQEGNVFSCSVMHX~~ALHNHYTQK~~LSLSLPGK

20

【0033】

配列番号6は、IgG4の変異型Fc領域のアミノ酸配列(UniProtKB - P01861 (IGHG4_HUMAN)；327アミノ酸)(CH1ドメインは太字であり；ヒンジ領域は下線が引かれ；CH2ドメインはイタリック体であり；CH3ドメインは破線が引かれ；影付き領域は本発明にしたがって置換され得るアミノ酸残基を表し、X₁は、KabatのEUインデックスによる残基位置228におけるアミノ酸の置換であり、かつプロリン(P)を含み；X₂は、KabatのEUインデックスによる残基位置234におけるアミノ酸の置換であり、かつアラニン(A)を含み；X₃は、KabatのEUインデックスによる残基位置235におけるアミノ酸の置換であり、かつアラニン(A)を含み；X₄は、KabatのEUインデックスによる残基位置345におけるアミノ酸の置換であり、かつリジン(K)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、またはチロシン(Y)を含み；X₅は、KabatのEUインデックスによる残基位置409におけるアミノ酸の置換であり、かつリジン(K)を含み；X₆は、KabatのEUインデックスによる残基位置430におけるアミノ酸の置換であり、かつグリシン(G)、セリン(S)、フェニルアラニン(F)、またはトレオニン(T)を含み；かつX₇は、KabatのEUインデックスによる残基位置440におけるアミノ酸の置換であり、かつトリプトファン(W)を含む)を提供する。

ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP~~CPAPE~~~~X~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ
 EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
 QPRX~~PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA~~VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS~~SLTVDKSR~~
 WQEGNVFSCSVMHX~~ALHNHYTQK~~LSLSLPGK

30

40

【0034】

抗体の六量体化を促進することができるFc突然変異は、免疫グロブリンのFc領域の

50

約345～440位のアミノ酸残基に対応するセグメント中の1つ以上の突然変異（複数可）を含む。一実施形態では、抗体の六量体化を促進することができるFc突然変異は、IgG1中のE345～S440に対応するセグメント中の1つ以上の突然変異（複数可）を含む。そのような1つ以上の突然変異（複数可）はまた、アミノ酸残基位置345、430、及び/または440のアミノ酸残基（例えば、IgG1中のE345、E430、及び/またはS440）に対応する突然変異も含み得る。いくつかの実施形態では、突然変異は、E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、及びS440Wを含むことができる。いくつかの実施形態では、突然変異はE345K及びE430Gを含む。これらの突然変異は、本発明の文脈において「六量体化促進変異」として知られる。

10

【0035】

エフェクター機能を低下させ得るFc突然変異は、IgG1中のアミノ酸残基L234及び/またはL235～S440における1つ以上の突然変異（複数可）を含む。一実施形態では、Fc領域におけるエフェクター機能突然変異は、IgG1におけるL234A及びL235Aを含む。IgG4を安定化させ得るFc突然変異は、IgG4中にS228、L235、及び/またはR409を含むが、それらに限定されない。一実施形態では、IgG4を安定化させ得るFc突然変異は、IgG4中にS228P及びL235EまたはR409Kを含む（IgGサブクラスの構造及びエフェクター機能の一般的な考察については、Vidarsson et al., Front Immunol 2014; 5-520も参照のこと）。

20

【0036】

一実施形態では、本発明によるポリペプチドは、野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む操作されたポリペプチドであり、該Fc変異体は、残基位置228、234、235、345、409、430、440またはそれらの組み合わせにおけるアミノ酸置換を含み、該アミノ酸残基は、KabatsのEUインデックスにしたがって番号付けされる。いくつかの実施形態では、少なくとも2、3、4、5、6、または7つのアミノ酸置換が、残基位置228、234、235、345、409、430、440でなされる。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置228のアミノ酸は、プロリン（P）またはセリン（S）によって置換されている。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置234のアミノ酸は、アラニン（A）によって置換されている。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置235のアミノ酸は、アラニン（A）によって置換されている。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置345のグルタミン酸（E）は、リジン（K）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、またはチロシン（Y）によって置換されている。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置409のアミノ酸は、リジン（K）またはアルギニン（R）によって置換されている。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置430のグルタミン酸（E）は、グリシン（G）、セリン（S）、フェニルアラニン（F）、またはトレオニン（T）によって置換されている。一実施形態では、KabatsのEUインデックスによる残基位置440のセリン（S）は、トリプトファン（W）によって置換されている。

30

40

【0037】

本明細書及び特許請求の範囲において、免疫グロブリン重鎖中の残基の番号付けは、参照により本明細書に明示的に組み込まれる、Kabats, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)にあるようなEUインデックスのものである。「KabatsにあるようなEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。

【0038】

したがって、本発明は、1つ以上の六量体化促進突然変異及び1つ以上のエフェクター

50

機能低下突然変異を有する免疫グロブリンの結合領域及び完全長または部分的Fcドメインを有する抗体変異体を提供する。本発明の抗体変異体は、野生型Fcドメインを有する抗体と比較して、受容体クラスティング及び/またはエフェクター細胞シグナル伝達が増強されている。

【0039】

本明細書に記載の本発明はさらに、変異型Fcドメインを含む抗体に関する。一実施形態では、抗体は、変異型Fcドメインを含む抗GITR抗体である。表1A~1Bは、それぞれ、抗GITR抗体の重鎖及び軽鎖の変領域の核酸配列(配列番号7~8)及びアミノ酸配列(配列番号9~10)を提供する。一実施形態では、本明細書に記載の変異型Fc領域は、抗GITR抗体または抗CCR4抗体などの目的の抗体を操作するために抗体の変領域につなぎ合わせることができる。

10

【0040】

(表1A)抗体番号E1-3H7変領域核酸配列

抗体番号E1-3H7 VHのV _H 鎖 (IGHV3-23*04)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCCATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACAT ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG AAAATCGGTACGGCGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCAG (配列番号7)
抗体番号E1-3H7 VLのV _L 鎖 (IGLV1-44*01)
CAGTCTGCCCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGGGACCCCGGACAGAGGGTCACCAT CTCTTGTCTGGAGGCGTCCCAACATCGGAAGTAATCCTGTAAACTGGTACCTCCACC GCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAATAGCAATCAGTGGCCCTCAGGGGTC CCTGACCGATTTTCTGGCTCCAGGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTC CAGTCTGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGGATGGTCT GGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTAG (配列番号8)

20

【0041】

(表1B)抗体番号E1-3H7変領域アミノ酸配列

抗体番号E1-3H7 VHのV _H 鎖 (IGHV3-23*04)
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGTADAFDIWGQGTITVTVSS (配列番号9)
抗体番号E1-3H7 VLのV _L 鎖 (IGLV1-44*01)
QSALTQPPSVSGTTPGQRVTISCSGGVNPINIGSNPVNWYLHRPGTAPKLLIYNSNQWPSGVPDR FSGSRSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLDGLVFGGGTKLTVL (配列番号10)

30

【0042】

以下の表1Cは、配列番号9~10に基づく抗GITR抗体の重鎖及び軽鎖変領域のフレームワーク及びCDRの区別を示す。

40

【0043】

(表1C)抗GITR E1-3H7アミノ酸配列

VH	
FR1	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS
CDR1	GFTFSSHA
FR2	MSWVRQAPGKGLEWVSA
CDR2	ISGSGGST
FR3	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3	AKIGTADAFDI
FR4	WGQGTITVTVSS
VL	
FR1	QSALTQPPSVSGTPGQRVTISCSGG
CDR1	VPNIGSNP
FR2	VNWYLHRPGTAPKLLIY
CDR2	NSN
FR3	QWPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLQSEDEADYYC
CDR3	AAWDDSLDGLV
FR4	FGGGTKLTVL

10

【0044】

一実施形態では、抗体は、変異型Fcドメインを含む抗CCR4抗体である。表1Dは、抗CCR4抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号11～12）を提供する。一実施形態では、本明細書に記載の変異型Fc領域は、抗GITR抗体または抗CCR4抗体などの目的の抗体を操作するために抗体の可変領域につなぎ合わせることができる。

20

【0045】

（表1D）抗CCR4 mAb2.3可変領域アミノ酸配列（=親和性成熟したヒト化mAb1567）

抗CCR4 mAb2.3のV _H 鎖
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFASAWMHWMRQAPGQGLEWIGWINPGNVNT KYNEKFKGRATLTVDSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYRPLDYWGQGTITVTVSS (配列番号11)
抗CCR4 mAb2.3のV _L 鎖
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSILYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQYMSSYTFGQGTKLEIK (配列番号12)

30

【0046】

以下の表1Eは、配列番号11～12に基づく抗CCR4抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のフレームワーク及びCDRの区別を示す。

【0047】

（表1E）抗CCR4 mAb2.3アミノ酸配列

40

50

VH	
FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS
CDR1	GYTFASAW
FR2	MHWMRQAPGQGLEWIGW
CDR2	INPGNVNT
FR3	KYNEKFKGRATLTVDSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
CDR3	STYYRPLDY
FR4	WGQGTLVTVSS
VL	
FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS
CDR1	QSILYSSNQKNY
FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY
CDR2	WASTRE
FR3	SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
CDR3	HQYMSSYT
FR4	FGQGTKLEIK

10

【 0 0 4 8 】

表 2 A は、野生型 I g G 1 重鎖及び軽鎖の定常領域 (F c) の核酸配列 (配列番号 1 3 ~ 1 7) を提供する。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の F c 領域を操作するために使用することができる。

20

【 0 0 4 9 】

(表 2 A) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域核酸配列 - 野生型 I g G 1 モノマー (C L を除いて、本明細書に記載の抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

30

40

50

<p>CH1 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA (配列番号 13)</p>	
<p>ヒンジ GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA (配列番号 14)</p>	
<p>CH2 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA (配列番号 15)</p>	10
<p>CH3 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGACCACGCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号 16)</p>	20
<p>C_L GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCA AGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACA GTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCT CCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG AAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATGA (配列番号 17)</p>	

【 0 0 5 0 】

一実施形態では、本明細書に記載の軽鎖のFc領域は、抗GITR抗体または抗CCR4抗体などの目的の抗体のFc領域を操作するために使用することができる。一実施形態では、軽鎖(C_L(カッパ))のFc領域は、配列番号43:

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCT
GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
TGA

の核酸配列を含む。

【 0 0 5 1 】

一実施形態では、軽鎖(C_L(カッパ))のFc領域は、配列番号44:
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 2 】

表2Bは、野生型IgG1重鎖及び軽鎖の定常領域(Fc)のアミノ酸配列(配列番号18~22)を提供する。例えば、本明細書に記載のFc領域は、抗GITR抗体または

抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 5 3 】

(表 2 B) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域アミノ酸配列 - 野生型 I g G 1 モノマー (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである) 。例えば、C H 2 及び C H 3 中の太字の残基は、異なる I g G 1 突然変異体を作製するために突然変異させることができる野生型残基である (表 3 ~ 5 において黄色で強調された残基) 。

CH1 ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK (配列番号 18)
ヒンジ AEPKSCDKTHTCPPCP (配列番号 19)
CH2 APELLEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (配列番号 20)
CH3 GQPRLEPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 21)
C _L GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 22)

10

20

【 0 0 5 4 】

表 3 A は、I g G 1 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) の核酸配列 (配列番号 2 3) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 1 F c 変異体を作製するために F c 領域に導入された突然変異を示す。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の変異型 F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 5 5 】

(表 3 A) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域核酸配列 - I g G 1 L A L A 突然変異型モノマー (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

CH1 野生型と同じ(表2Aを参照)
ヒンジ 野生型と同じ(表2Aを参照)
CH2 GCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA (配列番号 23)
CH3 野生型と同じ(表2Aを参照)
C _L 野生型と同じ(表2Aを参照)

30

40

【 0 0 5 6 】

表 3 B は、I g G 1 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) のアミノ酸配列 (配列番号 2 4) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 1 F c 変異体を作製するために F c 領域に導入された突然変異を示す。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の変異型 F c 領域を操作するために使用する

50

ことができる。

【 0 0 5 7 】

(表 3 B) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域アミノ酸配列 - I g G 1 L A L A 突然変異型モノマー (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

CH1 野生型と同じ(表2Bを参照)	
ヒンジ 野生型と同じ(表2Bを参照)	
CH2 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (配列番号 24)	10
CH3 野生型と同じ(表2Bを参照)	
C _L 野生型と同じ(表2Bを参照)	

【 0 0 5 8 】

表 4 A は、I g G 1 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) の核酸配列 (配列番号 2 5) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 1 F c 変異体を作製するために F c 領域に導入された突然変異を示す。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の変異型 F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 5 9 】

(表 4 A) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域核酸配列 - I g G 1 野生型六量体 (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

CH1 野生型と同じ(表2Aを参照)	
ヒンジ 野生型と同じ(表2Aを参照)	
CH2 野生型と同じ(表2Aを参照)	30
CH3 GGGCAGCCCCGAAAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGGAGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号 25)	
C _L 野生型と同じ(表2Aを参照)	

【 0 0 6 0 】

表 4 B は、I g G 1 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) のアミノ酸配列 (配列番号 2 6) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 1 F c 変異体を作製するために F c 領域に導入された突然変異を示す。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の変異型 F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 6 1 】

(表 4 B) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域アミノ酸配列 - I g G 1 野生型六量体 (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

10

20

30

40

50

CH1 野生型と同じ(表2Bを参照)
ヒンジ 野生型と同じ(表2Bを参照)
CH2 野生型と同じ(表2Bを参照)
CH3 GQPRKPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 26)
C _L 野生型と同じ(表2Bを参照)

10

【 0 0 6 2 】

表 5 A は、I g G 1 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) の核酸配列 (配列番号 2 7 ~ 2 8) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 1 F c 変異体を作製するために F c 領域に導入された突然変異を示す。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の変異型 F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 6 3 】

(表 5 A) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域核酸配列 - I g G 1 L A L A 六量体 (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

20

CH1 野生型と同じ(表2Aを参照)
ヒンジ 野生型と同じ(表2Aを参照)
CH2 (表3AのCH2と同一) GCACCTGAAGCCGCGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA (配列番号 27)
CH3 (表4AのCH3と同一) GGGCAGCCCCGAAAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGGAGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号 28)
C _L 野生型と同じ(表2Aを参照)

30

40

【 0 0 6 4 】

表 5 B は、I g G 1 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) のアミノ酸配列 (配列番号 2 9 ~ 3 0) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 1 F c 変異体を作製するために F c 領域に導入された突然変異を示す。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の変異型 F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 6 5 】

(表 5 B) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域アミノ酸配列 - I g G 1 L A L A 六量体 (C L

50

を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

CH1 野生型と同じ(表2Bを参照)
ヒンジ 野生型と同じ(表2Bを参照)
CH2 (表3BのCH2と同一) APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (配列番号 29)
CH3 (表4BのCH3と同一) GQPRKPKQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 30)
C _L 野生型と同じ(表2Bを参照)

10

【 0 0 6 6 】

表 6 A は、安定化 I g G 4 重鎖及び軽鎖の定常領域 (F c) の核酸配列 (配列番号 3 1 ~ 3 5) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 4 を安定化させるために導入された突然変異である。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 6 7 】

(表 6 A) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域核酸配列 - s I g G 4 モノマー (C_L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

20

CH1 GCTAGCACCAAGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT (配列番号 31)
ヒンジ GAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCCA (配列番号 32)
CH2 GCACCTGAGTTCCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCAAAACCCAAGGACAC TCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA (配列番号 33)
CH3 GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCCGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTAACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAG GAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA (配列番号 34)
C _L GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCA AGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACA GTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCT CCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATGA ((配列番号 35)

30

40

50

【 0 0 6 8 】

表 6 B は、安定化 I g G 4 重鎖及び軽鎖の定常領域 (F c) のアミノ酸配列 (配列番号 3 6 ~ 4 0) を提供する。黄色で強調された残基は、 I g G 4 を安定させるために導入された突然変異である。太字の残基は、表 7 中の s I g G 4 六量体を作製するために突然変異させることができる野生型残基である。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 6 9 】

(表 6 B) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域アミノ酸配列 - s I g G 4 モノマー (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

10

CH1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV (配列番号 36)
ヒンジ ESKYGPPCPPCP (配列番号 37)
CH2 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAK (配列番号 38)
CH3 GQPREPQVYTLPPSPEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 39)
C _L GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKS <hr/> SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 40)

20

【 0 0 7 0 】

表 7 A は、安定化 I g G 4 重鎖及び軽鎖の変異型定常領域 (F c) の核酸配列 (配列番号 3 1 ~ 3 3、3 5、及び 4 1) を提供する。黄色で強調された残基は、 I g G 4 を安定させるために導入された突然変異である。太字の残基は、表 7 中の s I g G 4 六量体を作製するために突然変異させることができる野生型残基である。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の F c 領域を操作するために使用することができる。

30

【 0 0 7 1 】

(表 7 A) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域核酸配列 - s I g G 4 六量体 (C L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

40

50

<p>CH1 (表6Aの配列番号31と同じ)</p> <p>GCTAGCACCAAGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT</p>	
<p>ヒンジ(表6Aの配列番号32と同じ)</p> <p>GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCCA</p>	
<p>CH2 (表6Aの配列番号33と同じ)</p> <p>GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACAC TCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA</p>	10
<p>CH3</p> <p>GGGCAGCCCCGAAAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTAACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAG GAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGGAGCTCTGCACAACCACTACACACA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA (配列番号 41)</p>	20
<p>C_L (表6Aの配列番号35と同じ)</p> <p>GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCA AGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACA GTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCT CCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG AAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATGA</p>	30

【 0 0 7 2 】

表 7 B は、安定化 I g G 4 重鎖及び軽鎖の定常領域 (F c) のアミノ酸配列 (配列番号 3 6 ~ 4 0) を提供する。黄色で強調された残基は、I g G 4 を安定させるために導入された突然変異である。太字の残基は、表 7 中の s I g G 4 六量体を作製するために突然変異させることができる野生型残基である。例えば、本明細書に記載の F c 領域は、抗 G I T R 抗体または抗 C C R 4 抗体などの目的の抗体の F c 領域を操作するために使用することができる。

【 0 0 7 3 】

(表 7 B) 抗体番号 E 1 - 3 H 7 定常領域アミノ酸配列 - s I g G 4 六量体 (C_L を除いて抗 C C R 4 m A b 2 . 3 構築物と同じである)

10

20

30

40

50

CH1 (表6Bの配列番号36と同じ) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV
ヒンジ(表6Bの配列番号37と同じ) ESKYGPPCPPCP
CH2 (表6Bの配列番号38と同じ) APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK
CH3 GQPRKPKQVYTLPPSPEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHGHALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 42)
C _L (表6Bの配列番号40と同じ) GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10

【 0 0 7 4 】

1つ以上の六量体化促進突然変異及び1つ以上のエフェクター機能低下突然変異を有する抗体変異体は、改善された治療的可能性を有することとなる。特に、標的細胞表面に結合した後にアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する抗体は、生物学的活性が増大し得る。細胞表面受容体クラスタリングがそれらの生物学的機能に必要とされる場合、これは特に当てはまる。増強された受容体クラスタリング及びまたはエフェクター細胞シグナル伝達、または本発明の抗体変異体は、例えば、治療効果を達成するためのヒトモノクローナル抗体の有効量の低下及び低親和性を有する抗体の使用などの実用的な臨床的利益につながる。

20

【 0 0 7 5 】

したがって、本発明はまた、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、神経疾患、心血管疾患、感染症を治療するため、及び幹細胞系譜経路を導くための治療方法において本発明の抗体変異体を使用する方法を提供する。「治療すること」という用語は、特定の病気、疾患、及び/または状態の1つ以上の症状、特徴、または臨床症状の部分的または完全な軽減、回復、改善、緩和、発症の遅延、進行の抑制、重症度の低下、及び/または発生率の低下を指すことができる。治療は、病気、疾患、及び/または状態に関連する病状を発症するリスクを低減させることを目的として、(例えば、識別可能な病気、疾患、及び/または状態の前に)病気、疾患、及び/または状態の徴候を示さない対象、及び/または病気、疾患、及び/または状態の初期の徴候のみを示す対象に施すことができる。いくつかの実施形態では、治療は、細胞内シグナル伝達を増強すること、または細胞の受容体クラスタリングを誘導することを含む。

30

【 0 0 7 6 】

本発明の抗体変異体は、目的とする任意の標的に特異的であり得る。例えば、目的とする標的は、腫瘍関連表面抗原、例えば、E r b B 2 (H E R 2 / n e u)、がん胎児性抗原 (C E A)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、上皮成長因子受容体 (E G F R)、E G F R 変異体 I I I (E G F R v I I I)、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 4 0、ジシアロガングリオシド G D 2、管上皮ムチン、g p 3 6、T A G - 7 2、スフィンゴ糖脂質、神経膠腫関連抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン (A F P)、レクチン反応性 A F P、サイログロブリン、R A G E - 1、M N - C A I X、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、R U 1、R U 2 (A S)、腸カルボキシエステラーゼ、m u t h s p 7 0 - 2、M - C S F、プロスターゼ、プロスターゼ特異的抗原 (P S A)、P A P、N Y - E S O - 1、L A G A - 1 a、p 5 3、プロステイン (P 5 0 1)、P S M A、生存及びテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原 - 1 (P C T A - 1)、M A G E

40

50

、 E L F 2 M、好中球エラスターゼ、エフリン B 2、C D 2 2、インスリン成長因子 (I G F 1) - I、I G F - I I、I G F I 受容体、中皮、腫瘍特異的ペプチドエピトープを提示する主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) 分子、5 T 4、R O R 1、N k p 3 0、N K G 2 D、腫瘍間質抗原、フィブロネクチンのエクストラドメイン A (E D A) 及びエクストラドメイン B (E D B) ならびにテネイシン C の A 1 ドメイン (T n C A 1) ならびに線維芽細胞関連タンパク質 (f a p) ; 系譜特異的もしくは組織特異的抗原、例えば C D 3、C D 4、C D 8、C D 2 4、C D 2 5、C D 2 8、C D 3 3、C D 3 4、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C T L A - 4、B 7 - 1 (C D 8 0)、B 7 - 2 (C D 8 6)、エンドグリン、主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) 分子、B C M A (C D 2 6 9、T N F R S F 1 7)、またはウイルス特異的表面抗原、例えば H I V 特異的抗原 (例えば H I V g p 1 2 0) ; E B V 特異的抗原、C M V 特異的抗原、H P V 特異的抗原、ラッサウイルス (L a s s e V i r u s) 特異的抗原、インフルエンザウイルス特異的抗原、ならびにこれらの表面マーカーのいずれかの誘導體または変種であり得る。

10

【 0 0 7 7 】

好ましくは、抗体は、B C M A、C A I X、C C R 4、P D - L 1、P D - L 2、P D 1、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (G I T R)、T I G I T、重症急性呼吸器症候群 (S A R S)、インフルエンザ、フラビウイルス、または中東呼吸器症候群 (M E R S) に特異的である。

【 0 0 7 8 】

本発明による抗体変異体を構築するのに有用な例示的抗体には、例えば、その内容が全体として本明細書に参照により組み込まれる W O / 2 0 0 5 / 0 6 0 5 2 0、W O / 2 0 0 6 / 0 8 9 1 4 1、W O / 2 0 0 7 / 0 6 5 0 2 7、W O / 2 0 0 9 / 0 8 6 5 1 4、W O / 2 0 0 9 / 0 7 9 2 5 9、W O / 2 0 1 1 / 1 5 3 3 8 0、W O / 2 0 1 4 / 0 5 5 8 9 7、W O 2 0 1 5 / 1 4 3 1 9 4、W O 2 0 1 5 / 1 6 4 8 6 5、W O 2 0 1 3 / 1 6 6 5 0 0、及び W O 2 0 1 4 / 1 4 4 0 6 1 ; P C T / U S 2 0 1 5 / 0 5 4 2 0 2、P C T / U S 2 0 1 5 / 0 5 4 0 1 0、及び 6 2 / 1 4 4, 7 2 9 に開示される抗体が含まれる。

20

【 0 0 7 9 】

本発明の抗体及びそのフラグメントは、本明細書の表に記載されているものなどの核酸を使用して合成、操作、及び/または産生することができる。一実施形態では、核酸は、表 1 A、2 A、3 A、4 A、5 A、6 A、7 A、配列番号 4 3、またはそれらの組み合わせに開示されたヌクレオチドを含む配列を有する。別の実施形態では、核酸は、表 1 A、2 A、3 A、4 A、5 A、6 A、7 A、配列番号 4 3、またはそれらの組み合わせに開示された核酸配列と、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一な配列を有する。本発明は、本明細書に具体的に開示された配列の一部及び変異体を含むことが理解されよう。例えば、実施形態では、コドン最適化配列の形態を使用することができる。

30

【 0 0 8 0 】

コード配列は、例えば、複製または非複製アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、弱毒化 *mycobacterium tuberculosis* ベクター、*Bacillus Calmette Guerin* (B C G) ベクター、ワクシニアまたは改変ワクシニアアンカラ (M V A) ベクター、別のポックスウイルスベクター、組換えポリオ及び他の腸内ウイルスベクター、*Salmonella* 種細菌ベクター、*Shigella* 種細菌ベクター、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (V E E) ベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、またはタバコモザイクウイルスベクター中に存在することができる。コード配列はまた、例えば、C M V プロモーターなどの活性プロモーターを有する D N A プラスミドとして発現させることもできる。本発明の配列を発現するために他の生ベクターもまた使用することができる。本発明の抗体の発現は、対象自身の細胞において、該

40

50

抗体をコードする核酸のそれらの細胞への導入によって、好ましくはヒト細胞における発現を最適化するコドン及びプロモーターを用いて誘導することができる。

【0081】

本発明の実施形態は、本発明の抗体変異体を発現する細胞（すなわち、CART）を含む。細胞は、がん治療のための抗体変異体を発現することができる免疫細胞、またはCARをコードする発現ベクターを持つ細菌細胞などの細胞を含む任意の種類のものであり得る。本明細書で使用する場合、「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」という用語は互換的に使用され得る。これらの用語の全ては、それらの子孫も含み、該子孫はあらゆる後継世代である。意図的または偶然の突然変異のために、全ての子孫は同一でない場合があることが理解されよう。異種核酸配列を発現するという文脈では、「宿主細胞」とは、ベクターを複製すること、及び/またはベクターによってコードされる異種遺伝子を発現することができる真核細胞を指す。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、そして使用されてきた。宿主細胞は「トランスフェクト」または「形質転換」されてもよく、これは外来核酸が宿主細胞に移入または導入される過程を指す。形質転換細胞は、初代対象細胞及びその子孫を含む。本明細書で使用する場合、「操作された」及び「組換え」細胞または宿主細胞という用語は、外来核酸配列、例えばベクターなどが導入された細胞を指し得る。したがって、組換え細胞は、組換えにより導入された核酸を含まない天然に存在する細胞と区別することができる。本発明の実施形態では、宿主細胞は、細胞傷害性T細胞（TC、細胞傷害性Tリンパ球、CTL、Tキラー細胞、細胞傷害性T細胞、CD8+T細胞、またはキラーT細胞としても知られる）を含むT細胞である；CD4+T細胞、NK細胞、及びNKT細胞もまた本発明に包含される。

10

20

【0082】

いくつかのベクターは、それが原核細胞及び真核細胞の両方において複製及び/または発現されることを可能にする制御配列を使用し得る。当業者は、上記の全ての宿主細胞をインキュベートし、それらを維持し、ベクターの複製を可能にする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及びそれらの同族のポリペプチド、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術及び条件もまた理解され、かつ公知である。

【0083】

細胞は、自己由来細胞、同系細胞、同種異系細胞、及び場合によっては異種細胞であり得る。

30

【0084】

多くの状況において、処置を終わらせることを望む場合、細胞が腫瘍性となる場合、その細胞が存在した後に不存在となることに関心対象となる研究において、または他の場合に、改変CTLを死滅することができることが望まれ得る。この目的のために、制御された条件下で改変細胞を死滅することができる特定の遺伝子産物、例えば誘導性自殺遺伝子の発現が提供され得る。

【0085】

本発明はさらに、1つ以上のポリペプチドを分泌するように改変されたCARTを含む。ポリペプチドは、例えば抗体またはサイトカインであり得る。好ましくは、抗体は、CAIX、GITR、PD-L1、PD-L2、PD-1、CCR4、またはTIGITに特異的である。

40

【0086】

アームドCARTは、標的部位、例えば腫瘍部位でポリペプチドを同時に分泌するという利点を有する。

【0087】

アームドCARTは、細胞内シグナル伝達ドメインの後に目的のポリペプチドをコードする核酸を含むことによって構築され得る。好ましくは、配列内リボソーム侵入部位（IRES）が、細胞内シグナル伝達ドメインと目的のポリペプチドとの間に配置される。当業者は、複数のIRES配列を直列で用いることによって2つ以上のポリペプチドが発現

50

され得ることを理解することができる。

【0088】

操作されたポリペプチドを含む抗体は、タンパク質の単離及び精製のための様々な周知の技術を使用して、例えば細胞から、または組換え系から精製され得る。例えば、Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives (Basics: From Background to Bench), Springer-Verlag Ltd., New York, 2000; Basic Methods in Antibody Production and Characterization, Chapter 11, "Antibody Purification Methods," Howard and Bethell, Eds., CRC Press, 2000; Antibody Engineering (Springer Lab Manual), Kontermann and Dubel, Eds., Springer-Verlag, 2001 (これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)の抗体精製方法を参照のこと。

10

【0089】

本明細書に記載の抗体、フラグメント、及び抗体誘導体、例えばキメラ抗体またはヒト化抗体は、対象に使用するためのものなどの組成物(例えば、医薬組成物)として製剤化することができる。好適な組成物は、薬学的に許容可能な担体(例えば、水性媒体)中に溶解または分散させた抗体またはフラグメント(またはその誘導体)を含み得る。

20

【0090】

薬学的に許容可能な担体は、薬学的投与に適合性のある、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、等張剤、及び吸収遅延剤などを含み得る。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体及び薬剤の使用は、当技術分野で周知である。抗体と適合性のある任意の従来の媒体または薬剤を使用することができる。補助的な活性剤もまた、組成物中に混合することができる。薬学的に許容可能な担体の非限定例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリトリトール、マルチトール、デンプン、アラビアゴム、アルギネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、水、安息香酸メチル、安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び鉱油が挙げられるが、これらに限定されない、固体または液体の増量剤、希釈剤、及びカプセル化物質が含まれる。

30

【0091】

本発明の医薬組成物は無菌であり得、その意図される投与経路と適合するように製剤化され得る。投与経路の例としては、非経口投与、例えば静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口投与(例えば吸入投与)、経皮投与(局所投与)、経粘膜投与、及び直腸投与が挙げられる。

【0092】

例えば、注射用途に適した医薬組成物には、滅菌注射溶液または分散液の即時調製用の滅菌水溶液(水溶性の場合)または分散液及び滅菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EM(商標)(BASF, Parsippany, N.J.)、またはリン酸緩衝食塩水(PBS)が含まれる。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、注射容易性(easy syringability)が存在する程度に流動性であるべきである。それは、製造及び保管条件下で安定でなければならず、細菌及び菌類といった微生物の汚染作用を受けないように保護されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、薬学的に許容可能なポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合は必要な粒子サイズの維持によって、及び表面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の保護

40

50

は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサールなどの様々な抗細菌及び抗真菌剤によって達成することができる。多くの場合、例えば組成物中の糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが有用であり得る。注射可能な組成物の持続吸収は、吸収を遅延させる物質、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に含むことによってもたらされ得る。

【0093】

滅菌注射溶液は、必要量の抗体を、本明細書で列挙した成分の1つまたは組み合わせを含む適当な溶媒中で混合し、必要に応じて、その後濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散液は、抗体を、塩基性分散媒体及び本明細書に列挙したもののうち必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに混合することによって調製される。

10

【0094】

別の例としては、経口組成物は一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。それらはゼラチンカプセルに封入するか、または錠剤に打錠することができる。経口治療投与を目的として、抗体を賦形剤と混合して、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用することができる。

【0095】

薬学的に適合性のある結合剤、及び/またはアジュバント材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれか、または類似の性質の化合物を含有することができる：結合剤、例えば微結晶セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン；賦形剤、例えばデンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、プリモゲル(Primogel)もしくはトウモロコシデンプン；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸塩(sterotes)；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えばスクロースもしくはサッカリン；または着香剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバー。

20

【0096】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によるものでもあり得る。経粘膜または経皮投与の場合、透過される障壁に適した浸透剤が製剤で使用される。そのような浸透剤は一般に当技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与の場合、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与の場合、活性化化合物は、一般に当技術分野で公知のように軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームへ製剤化される。

30

【0097】

抗体またはフラグメント(またはその誘導体)はまた、皮膚または粘膜への局所投与(例えば直腸内または膈内投与)に適した組成物として製剤化することもできる。そのような組成物は、液体、軟膏、クリーム、ゲル及びペーストの形態をとることができる。抗体またはフラグメント(またはその誘導体)はまた、鼻腔内投与に適した組成物として製剤化することもできる。適切な組成物を調製するには標準的な製剤技術を使用することができる。

40

【0098】

本発明の抗体及び/または組成物は、対象に1回投与することができる(例えば、単回注射または沈着として)。あるいは、投与は、それを必要とする対象に対して、約2~約28日、または約7~約10日、または約7~約15日の期間、1日1回または2回であり得る。それはまた、1年に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12回、またはそれらの組み合わせの期間、対象に1日1回または2回投与することができる。

【0099】

治療上有効量の範囲は、抗体またはフラグメント(またはその誘導体)ならびに製剤の性質及び投与経路によって決まり得る。最適な用量は、過度な実験をすることなく当業者によって決定することができ、活性成分の薬力学的性質ならびにその投与方法及び投与経

50

路；活性成分の投与時期；レシピエントの年齢、性別、健康状態及び体重；症状の性質及び程度；同時治療の種類、治療の頻度及び望まれる効果；ならびに排泄速度などの既知の要因に応じて変動し得る。例えば、約 $0.1 \sim 1000 \text{ mg / kg}$ 体重の範囲の治療上有効量の抗体を使用することができる。好ましくは、約 $1 \sim 50 \text{ mg / kg}$ の範囲の用量の抗体を使用することができる。

【0100】

本発明の抗体または核酸はまた、キットで提供され得る。一実施形態では、キットは、(a) 抗体を含む組成物を収容する容器、及び必要に応じて (b) 情報資料を含む。情報資料は、本明細書に記載の方法及び/または治療効果を得るための薬剤の使用に関する記述的、説明的、マーケティング的、またはその他の資料であり得る。一実施形態では、キットはまた、病気または状態に罹患している対象を治療するための第2の薬剤を含む。例えば、キットは、ポリペプチドを含む組成物を収容する第1の容器と、第2の薬剤を含む第2の容器とを含む。

10

【0101】

キットの情報資料はその形態に限定されない。一実施形態では、情報資料は、抗体の産生、抗体の分子量、濃度、有効期限、バッチまたは生産場所の情報などに関する情報を含むことができる。一実施形態では、情報資料は、ポリペプチドまたはそれをコードする核酸を、例えば適切な用量、剤形、または投与方法（例えば、本明細書に記載の用量、剤形、または投与方法）で投与して対象を治療する方法に関する。情報は、印刷されたテキスト、コンピュータ読み取り可能な資料、ビデオ記録、または音声記録、または実質的な資料へのリンクもしくはアドレスを提供する情報を含む様々なフォーマットで提供することができる。

20

【0102】

抗体またはそれをコードする核酸に加えて、キット中の組成物は、溶媒もしくは緩衝液、安定化剤、または保存料など、他の成分を含むことができる。抗体または核酸は、任意の形態、例えば液体、乾燥または凍結乾燥形態、好ましくは実質的に純粋及び/または無菌で提供することができる。溶液で提供される場合、該溶液は水溶液であるのが好ましい。乾燥形態として提供される場合、再構成は一般に、適切な溶媒の添加による。溶媒、例えば滅菌水または緩衝液は、必要に応じてキットに提供され得る。

【0103】

キットは、抗体、核酸、またはそれらを含む組成物用の1つ以上の容器を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、組成物及び情報資料用の異なる容器、仕切り、または区画を含む。例えば、組成物は瓶、バイアル、またはシリンジに収容することができ、情報資料はプラスチック製のスリーブまたはポケットに収容することができる。他の実施形態では、キット中の異なる要素は、1つの分割されていない容器に収容されている。例えば、組成物は、ラベル形態の情報資料を添付した瓶、バイアル、またはシリンジに収容される。いくつかの実施形態では、キットは、それぞれが1つ以上の単位剤形（例えば、本明細書に記載の剤形）の抗体または核酸を含有する、複数（例えば、パック）の個々の容器を含む。容器は、組み合わせ単位用量、例えば抗体及び第2の薬剤の両方を例えば所望の比率で含む単位を含むことができる。例えば、キットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイルパッケージ、プリスターパック、または医療機器を含み、例えば、それぞれが単一の組み合わせ単位用量を含む。キットの容器は、気密性、防水性（例えば、水分または蒸発の変化に対して不透過性）、及び/または遮光性であり得る。キットは、組成物の投与に適した装置、例えばシリンジまたは他の好適な送達装置を場合により含む。装置は、予め充填された状態で提供されてもよいし空であってもよいが、充填に適したものであり得る。

30

40

【0104】

単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈で別段明確に指示されない限り、複数形の言及を含む。特許請求の範囲及び/または明細書中の用語「含む」と共に使用される場合の「1つの(a)」または「1つの(an)」とい

50

う単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、それはまた「1つ以上の」、「少なくとも1つの」、及び「1または2つ以上の」とも一致する。

【0105】

「例えば」、「などの」、「含む」などの句のいずれかが本明細書で使用される場合は常に、他に明示的に述べられていない限り、「限定されない」という句が後に続くものと理解される。同様に、「例」、「例示的」などは非限定的であると理解される。

【0106】

「実質的に」という用語は、意図する目的に悪影響を及ぼさない記述語 (d e s c r i p t o r) からの逸脱を許容する。「実質的に」という単語が明示的に記載されない場合であっても、記述的用语は「実質的に」という用語によって修飾されるものとして理解される。

10

【0107】

用語「含む (c o m p r i s i n g) 」及び「含む (i n c l u d i n g) 」及び「有する (h a v i n g) 」及び「含む (i n v o l v i n g) 」(ならびに同様に「含む (c o m p r i s e s) 」、「含む (i n c l u d e s) 」、「有する (h a s) 」、及び「含む (i n v o l v e s) 」)などは互換的に使用され、同じ意味を有する。具体的には、各用語は、一般的な米国特許法での「含む (c o m p r i s i n g) 」の定義と一致するように定義され、したがって、「少なくとも以下の」を意味するオープンタームであるとして解釈され、追加の特徴、制限、態様などを排除しないものとしても解釈される。したがって、例えば、「工程 a、b、及び c を含むプロセス」は、該プロセスが少なくとも工程 a、b、及び c を含むことを意味する。「1つの (a) 」または「1つの (a n) 」という用語が使用される場合は常に、そのような解釈が文脈上意味をなさないというわけではない限り「1つまたはそれ以上の」と理解される。

20

【0108】

本明細書で使用する場合、「約」という用語は、本明細書では、ほぼ、大まかに、おおよそ、または辺りを意味するために使用される。用語「約」が数値範囲と共に使用される場合、それは記載された数値の上下に境界を拡大することによって、その範囲を変更する。一般に、「約」という用語は、本明細書では、示された数値を20%上下の変動(より高いまたはより低い)で上下に変更するために使用される。

【0109】

本明細書及び特許請求の範囲において、免疫グロブリン重鎖中の残基の番号付けは、参照により本明細書に明示的に組み込まれる、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)にあるようなEUインデックスのものである。「KabatにあるようなEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。

30

【0110】

「親和性」は、例えば、分子(例えば抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば抗原またはFc受容体)との間の非共有相互作用の合計の強度を指すことができる。特に指示がない限り、「結合親和性」とは、結合ペア(例えば、抗体/Fc受容体、または抗体及び抗原)のメンバー間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指すことができる。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、解離定数(Kd)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されているものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。さらに、その全体が参照により本明細書に組み込まれるYang, Danlin, et al. "Determination of High-affinity Antibody-antigen Binding Kinetics Using Four Biosensor Platforms." Journal of visualized experiments: JOVE 122 (2017)を参照のこと。結合親和性を測定するための特定の例示的かつ代表的な実施形態を

40

50

以下に記載する。例えば、WO2003056296; Neri, Dario, et al. "Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities." Trends in biotechnology 14.12 (1996): 465-470; Leonard, Paul et al. "Measuring protein-protein interactions using Biacore." Protein Chromatography. Humana Press, 2011. 403-418; 及び Karlsson, Robert, et al. "Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors." Analytical biochemistry 349.1 (2006): 136-147 (これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

10

【0111】

「親和性成熟」抗体は、例えば、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらし得るそのような変化を持たない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域(HVR)に1つ以上の変化を有する抗体であり得る。

【0112】

例えば、「アミノ酸改変」は、所定のアミノ酸配列のアミノ酸配列における変化であり得る。例示的な改変は、アミノ酸置換、挿入及び/または欠失を含む。本明細書における好ましいアミノ酸改変は置換である。特定の位置、例えばFc領域における「アミノ酸改変」は、特定の残基の置換もしくは欠失、または特定の残基に隣接する少なくとも1つのアミノ酸残基の挿入を指すことができる。特定の残基に「隣接する」挿入とは、例えば、その1~2残基以内の挿入であり得る。挿入は特定の残基のN末端側またはC末端側であってよい。

20

【0113】

「アミノ酸置換」とは、所定のアミノ酸配列中の少なくとも1つの既存のアミノ酸残基を別の異なる「置換」アミノ酸残基で置換することを指す。置換残基は、「天然に存在するアミノ酸残基」(すなわち遺伝コードによってコードされる)であってよく、アラニン(Ala); アルギニン(Arg); アスパラギン(Asn); アスパラギン酸(Asp); システイン(Cys); グルタミン(Gln); グルタミン酸(Glu); グリシン(Gly); ヒスチジン(His); イソロイシン(Ile); ロイシン(Leu); リジン(Lys); メチオニン(Met); フェニルアラニン(Phe); プロリン(Pro); セリン(Ser); トレオニン(Thr); トリプトファン(Trp); チロシン(Tyr); 及びバリン(Val)からなる群から選択される。一実施形態では、置換残基はシステインではない。1つ以上の天然に存在しないアミノ酸残基による置換はまた、本明細書におけるアミノ酸置換を指すことができる。「天然に存在しないアミノ酸残基」は、例えば、ポリペプチド鎖中で隣接するアミノ酸残基(複数可)と共有結合可能である、上に列挙した天然に存在するアミノ酸残基以外の残基であり得る。天然に存在しないアミノ酸残基の非限定例としては、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、及びEllmanら(Meth. Enzym. 202(1991)301-336)に記載されているものなどの他のアミノ酸残基類似体が含まれる。このような天然に存在しないアミノ酸残基を生成するために、例えば、Norenら(Science 244(1989)182及びEllmanら, 上記)の手順を使用することができる。簡潔に述べると、これらの手順は、天然に存在しないアミノ酸残基によりサブレッサー-tRNAを化学的に活性化し、続いてRNAのインビトロ転写及び翻訳を含む。

30

40

【0114】

「アミノ酸挿入」とは、所定のアミノ酸配列への少なくとも1つのアミノ酸の組み込みを指すことができる。挿入は通常1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなり得るが、本明細書に記載されるような発明は、より大きな「ペプチド挿入」、例えば約3~約5、またはさらには約10までのアミノ酸残基の挿入を利用することができる。挿入された残

50

基（複数可）は、上記のように天然でも非天然でもよい。

【0115】

「アミノ酸欠失」とは、所定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指すことができる。

【0116】

本明細書における「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト化抗体、及び抗体フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない様々な抗体構造を、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、包含する。本発明の抗体は、本明細書に記載のものから選択されるFc配列を含むものを含む。例えば、抗体は、アミノ酸置換E345K、E430G、L234A、及びL235A；またはE345K、E430G、S228P、及びR409Kを有するFc変異体などの野生型ヒトIgG Fc領域のFc変異体を含む。残基は、KabatのEUインデックスにしたがって番号付けされる。本発明の実施形態では、インタクト抗体、抗体誘導體、またはそれらのフラグメント（例えば、抗原結合フラグメント）のいずれかを使用することができる。すなわち、例えば、インタクト抗体、Fabフラグメント、F(ab)₂フラグメント、ミニボディ、または二重特異性全抗体を、例えば、細胞シグナル伝達を増強するため、及び/または受容体クラスタリングを誘導するために、本発明の態様において使用することができる。

10

【0117】

本明細書に記載の抗体または抗体フラグメントに毒素は結合することができる。そのような毒素は、放射性同位体、生物学的毒素、ホウ素化デンドリマー、及びイムノリポソームを含むことができる（Chow et al, Adv. Exp. Biol. Med. 746: 121-41, 2012）。当技術分野で周知の方法を使用して、毒素を抗体または抗体フラグメントにコンジュゲートすることができる（Chow et al, Adv. Exp. Biol. Med. 746: 121-41 (2012)）。本明細書に開示された抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導體の組み合わせもまた本発明の方法において使用することができる。

20

【0118】

本明細書で使用される「抗体変異体」という用語は、例えば、野生型抗体に対するアミノ酸配列の変化が抗体変異体において生じることを特徴とする（例えば、野生型抗体において特定のアミノ酸残基を突然変異により導入する）、野生型抗体の変異体を指す。例えば、抗体変異体は、細胞シグナル伝達を増強する及び/または受容体クラスタリングを誘導するFc領域でのアミノ酸置換を含むことができる。そのような置換としては、ヒトIgGのFcにおけるE345K、E430G、L234A、及びL235A；またはE345K、E430G、S228P、及びR409Kなどの本明細書に記載のものが挙げられる。残基は、KabatのEUインデックスにしたがって番号付けされる。

30

【0119】

本明細書で使用される「抗体エフェクター機能（複数可）」または「エフェクター機能」という用語は、IgGのFcエフェクタードメイン（複数可）（例えば、免疫グロブリンのFc領域）によってもたらされる機能を指すことができる。そのような機能は、例えば、食作用もしくは溶解作用を有する免疫細胞上のFc受容体へのFcエフェクタードメイン（複数可）の結合、または補体系の構成成分へのFcエフェクタードメイン（複数可）の結合によって達成され得る。典型的なエフェクター機能はADCC、ADCP及びCDCである。

40

【0120】

「抗体フラグメント」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含むインタクト抗体以外の分子であり得る。抗体フラグメントの例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0121】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、例えば、競合アッセイにおいてその抗原への参照抗体の結合を50%以上遮断する抗体であり得、そして逆に、参照抗体は競合アッセイにおいてその抗原への抗体の結合を50%以上遮断する。例示的な競合アッセイが本明細書において提供される。

【0122】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」及び「ADCC」は、例えば、FcRを発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介性反応を指す。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現する一方、単球は、FcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch, and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457 - 492の464頁の表3にまとめられている。

10

【0123】

「抗体依存性細胞食作用」及び「ADCP」は、例えば、抗体被覆細胞が、免疫グロブリンFc領域に結合する食細胞性免疫細胞（例えば、マクロファージ、好中球及び樹状細胞）によって全体的にまたは部分的に内在化されるプロセスである。

【0124】

「結合ドメイン」は、例えば、別の分子に結合するポリペプチドの領域であり得る。FcRの場合、結合ドメインは、Fc領域の結合に関与するそのポリペプチド鎖の一部（例えば、その鎖）を含み得る。1つの有用な結合ドメインは、FcR鎖の細胞外ドメインである。

20

【0125】

例えば、Fc受容体への「結合」は、BIAcore.RTM.アッセイ、例えば（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden）におけるFc受容体への抗体の結合であり得る。

【0126】

BIAcore.RTM.アッセイでは、Fc受容体は表面に結合しており、変異体、例えば、突然変異が導入された抗体変異体の結合は表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定される。例えば、Rich, Rebecca L., and David G. Myszka. "Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis." *Current opinion in biotechnology* 11.1 (2000): 54 - 61; 及びRich, Rebecca L.; Rich, Rebecca L., and David G. Myszka. "Spying on HIV with SPR." *Trends in microbiology* 11.3 (2003): 124 - 133; McDonnell, James M. "Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition." *Current opinion in chemical biology* 5.5 (2001): 572 - 577; 及びDavid G. Myszka. "BIAcore J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis." *Journal of Molecular Recognition* 14.4 (2001): 223 - 228（これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。結合の親和性は、用語 k_a （抗体/Fc受容体複合体に由来する抗体の結合速度定数）、 k_d （解離定数）、及び K_D （ k_d/k_a ）によって定義することができる。あるいは、例えば、SPRセンソグラムの結合シグナルを、共鳴シグナルの高さ及び解離挙動に関して、参照物の応答シグナルと直接比較することができる。

30

40

【0127】

ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」（「C2」ドメインとも呼ばれる）は通

50

常、アミノ酸約231からアミノ酸約340まで及ぶ。CH2ドメインは別のドメインと密接に対になっていないという点で独特である。むしろ、2つのN結合型分岐状糖鎖が、インタクトな天然IgG分子の2つのCH2ドメイン間に挿入される。この糖が、ドメイン-ドメイン対の代わりを提供し得、CH2ドメインを安定化させるのを助け得ると考えられている(Burton, Molec. Immunol. 22(1985)161-206)。一実施形態では、図8、9及び11は、それぞれIgG1、IgG2、及びIgG4のCHドメインを示す。

【0128】

「CH3ドメイン」は、Fc領域中のCH2ドメインに対するC末端側残基のストレッチを含む(すなわち、IgGのアミノ酸残基約341~アミノ酸残基約447まで)。一実施形態では、図8、9及び11は、それぞれIgG1、IgG2、及びIgG4のCHドメインを示す。

10

【0129】

「がん」及び「がん性」は、例えば、典型的には無秩序な細胞増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。がんの例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、及び様々な種類の頭頸部癌が挙げられる。

20

【0130】

本明細書で使用する場合、「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」という表現は互換的に使用され、そのような呼称は全て子孫を含む。したがって、「形質転換体」及び「形質転換細胞」という単語は、初代対象細胞、及び継代の数を問わず、それに由来する培養物を含む。意図的または偶然の突然変異により、全ての子孫がDNA含量において正確に同一でない場合があることもまた理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされたものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異型子孫が含まれる。異なる呼称が意図される場合、それは文脈から明らかとなるであろう。

【0131】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体には5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのうちのいくつかは、さらにサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2に分類することができる。例えば、Vidarsson et al. "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." *Frontiers in immunology* 5(2014): 520、及びSpiegelberg, Hans L. "Biological Activities of Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses 1." *Advances in immunology*. Vol. 19. Academic Press, 1974. 259-294(それぞれの全体は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、及び μ と呼ばれる。

30

40

【0132】

例えば、本明細書で使用される「細胞傷害剤」は、細胞の機能を抑制または防止する及び/または細胞死もしくは破壊を生じる物質を指す。細胞傷害剤としては、放射性同位体(例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位体); 化学療法剤または化学療法薬(例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド(ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他の挿入剤); 成長阻害剤; 酵素及びそのフラグ

50

メント、例えば核酸分解酵素；抗生物質；毒素、例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素または酵素的に活性な毒素（それらのフラグメント及び/または変異体を含む）；ならびに本明細書で述べられる様々な抗腫瘍剤または抗がん剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

「補体依存性細胞傷害」またはCDCは、例えば、最終的に標的細胞膜に孔を形成する一連の酵素反応を標的結合抗体のFcエフェクタードメイン（複数可）が活性化し、細胞死を誘導するためのメカニズムを指す。抗原-抗体複合体（例えば、抗体被覆標的細胞上のもの）が補体成分C1qに結合し、それを活性化し、今度はそれが補体カスケードを活性化して、標的細胞死を招く。補体の活性化は、白血球上の補体受容体（例えば、CR3）への結合によりADCCを促進する、標的細胞表面上の補体成分の沈着も引き起こし得る。

10

【0134】

「疾患」は、Fc変異体を含む抗体などのポリペプチドによる治療から効果を得るであろう任意の状態であり得る。これには、哺乳動物を問題の疾患に罹患しやすくする病理状態を含む、慢性及び急性の疾患または病気が含まれる。一実施形態では、疾患はがんである。

【0135】

「エフェクター機能」は、例えば、抗体のアイソタイプによって異なる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例にはC1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；食作用（ADCP）；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；及びB細胞活性化が含まれる。

20

【0136】

本明細書で使用される「低下したエフェクター機能」は、対照（例えば、野生型Fc領域を有するポリペプチド）と比較して、少なくとも20%の、例えばADCCまたはCDCといった特定のエフェクター機能の低下を指すことができ、本明細書で使用される「大きく低下したエフェクター機能」は、対照と比較して、少なくとも50%の、例えばADCCまたはCDCといった特定のエフェクター機能の低下を指すことができる。

【0137】

薬剤（例えば、医薬製剤）の「有効量」は、必要な投薬量かつ必要な期間で、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効な量を指す。

30

【0138】

「Fc領域」は、例えば、少なくとも定常領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を指す。この用語は、天然配列のFc領域及び変異型Fc領域を含むことができる。一実施形態では、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から重鎖のカルボキシル末端まで及び、しかしながら、Fc領域のC末端リジン（Lys447）は、存在していても存在していなくともよい。本明細書で特に指示がない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabata, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に記載されているように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムにしたがう。

40

【0139】

「変異型Fc領域」は、本明細書に記載される少なくとも1つの「アミノ酸改変」により、「天然」または「野生型」配列のFc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、変異型Fc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、約1から約10のアミノ酸置換を有する。一実施形態では、変異型Fc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc

50

領域に約 1 から約 5 のアミノ酸置換を有する。本明細書の変異型 Fc 領域は、天然配列 Fc 領域及び/または親ポリペプチドの Fc 領域と少なくとも約 80% の相同性、少なくとも約 90% の相同性、少なくとも約 95% の相同性、少なくとも約 96% の相同性、少なくとも約 97% の相同性、少なくとも約 98% の相同性、または少なくとも約 99% の相同性を有することができる。

【0140】

本明細書で使用される「Fc 変異体」は、Fc ドメインに改変を含むポリペプチドを指す。本発明の Fc 変異体は、それらを構成するアミノ酸改変にしたがって定義される。したがって、例えば、P329G は、親 Fc ポリペプチドと比較して 329 位でプロリンがグリシンに置換された Fc 変異体であり、該番号付けは、EU インデックスにしたがう。野生型アミノ酸の同一性は特定されていなくてもよく、その場合、前述の変異体は P329G と呼ばれる。本発明で述べられる全ての位置について、番号付けは EU のインデックスにしたがう。EU インデックス、または Kabat もしくは EU 番号付けスキームにあるような EU インデックスは、EU 抗体の番号付けを指す（参照により完全に本明細書に組み込まれる Edelman, et al., Proc Natl Acad Sci USA 63 (1969) 78-85）。改変は、付加、欠失、または置換であり得る。置換は、天然に存在するアミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸を含み得る。変異体は、非天然アミノ酸を含み得る。例としては、米国特許番号第 6,586,207 号; WO 98/48032; WO 03/073238; US 2004/0214988 A1; WO 05/35727 A2; WO 05/74524 A2; Chin, J.W., et al., Journal of the American Chemical Society 124 (2002) 9026-9027; Chin, J.W. and Schultz, P.G., ChemBioChem 11 (2002) 1135-1137; Chin, J.W., et al., PICAS United States of America 99 (2002) 11020-11024; 及び、Wang, L., and Schultz, P.G., Chem. (2002) 1-10 (全て参照により完全に組み込まれる) が挙げられる。

【0141】

「Fc 領域含有ポリペプチド」は、Fc 領域を含む、抗体またはイムノアドヘシン（本明細書中の説明を参照のこと）などのポリペプチドを指す。

【0142】

例えば「Fc 受容体」または「FcR」は、抗体の Fc 領域に結合する受容体を説明するために使用される。例示的な FcR は天然配列ヒト FcR である。さらに、別の例示的な FcR は、IgG 抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、FcRI、FcRII 及び FcRIII サブクラスの受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子変異体及び選択的スプライス形態が含まれる。FcRII 受容体には、FcRIIA（「活性化受容体」）及び FcRIIB（「抑制性受容体」）が含まれ、それらは、その細胞質ドメインにおいて主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体 FcRIIA は、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）を含む。抑制性受容体 FcRIIB は、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン抑制性モチーフ（ITIM）を含む（Daeron, M., Annu. Rev. Immunol. 15 (1997) 203-234 の総説を参照のこと）。FcR は、Ravetch, and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34; 及び de Haas, et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-41 にて概説される。他の FcR は、将来同定されるものを含み、本明細書において用語「FcR」に包含される。この用語は、胎児への母体由来 IgG の移動に参与する新生児受容体、FcRn も含む（Guyer, et al., J. Immunol. 117 (1976) 587 及び Kim, et al., J. Immunol. 24 (1994) 249）。

10

20

30

40

50

【0143】

例えば、「IgG Fcリガンド」は、IgG抗体のFc領域に結合してFc/Fcリガンド複合体を形成する任意の生物に由来する分子、例えばポリペプチドであり得る。Fcリガンドには、FcR、FcRn、C1q、C3、マンナン結合レクチン、マンノース受容体、ブドウ球菌プロテインA、連鎖球菌プロテインG、及びウイルスのFcRが含まれるが、これらに限定されない。Fcリガンドにはまた、FcRに対して相同であるFc受容体のファミリーであるFc受容体ホモログ(FcRH)も含まれる(参照により完全に組み込まれるDavis, et al., Immunological Reviews 190(2002)123-136)。FcリガンドはFcに結合する未発見の分子を含んでもよい。特定のIgG FcリガンドはFcRn及びFcガンマ受容体である。一実施形態では、「Fcリガンド」は、抗体のFc領域に結合してFc/Fcリガンド複合体を形成する任意の生物に由来する分子、例えばポリペプチドであり得る。

10

【0144】

本明細書で使用される「Fcガンマ受容体」、「FcR」または「FcガンマR」は、IgG抗体のFc領域に結合するタンパク質のファミリーの任意のメンバーを意味し、FcR遺伝子によってコードされる。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcRIA、FcRIB、及びFcRICを含むFcRI(CD64);アイソフォームFcRIIA(アロタイプH131及びR131を含む)、FcRIIB(FcRIIB-1及びFcRIIB-2を含む)及びFcRIICを含むFcRII(CD32);及びアイソフォームFcRIIIA(アロタイプV158及びF158を含む)及びFcRIIIB(アロタイプFcRIIB-NA1及びFcRIIB-NA2を含む)を含むFcRIII(CD16)(参照により完全に組み込まれるJefferys, et al., Immunol Lett 82(2002)57-65)ならびに任意の未発見のヒトFcRまたはFcRアイソフォームもしくはアロタイプが含まれるが、これらに限定されない。FcRには、ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びサルが含まれるが、これらに限定されない任意の生物に由来してもよい。マウスFcRには、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)、FcRIII(CD16)、及びFcRIII-2(CD16-2)、ならびに任意の未発見のマウスFcRまたはFcRアイソフォームまたはアロタイプが含まれるがこれらに限定されない。

20

30

【0145】

「FcRn」または「新生児Fc受容体」は、例えば、IgG抗体のFc領域に結合するタンパク質であり得、少なくとも部分的にFcRn遺伝子によってコードされる。FcRnには、ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びサルが含まれるが、これらに限定されない任意の生物に由来してもよい。当技術分野で公知のように、機能的FcRnタンパク質は、重鎖及び軽鎖と呼ばれることが多い2つのポリペプチドを含む。軽鎖はベータ-2-ミクログロブリンであり、重鎖はFcRn遺伝子によってコードされる。本明細書で別途注記されない限り、FcRnまたはFcRnタンパク質は、ベータ-2-ミクログロブリンとのFcRn重鎖の複合体を指す。

【0146】

例えば、「野生型または親ポリペプチド」は、変異体を生成するようにその後に変更される未改変ポリペプチドであり得る。野生型ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチド、または天然に存在するポリペプチドの変異型もしくは操作型であり得る。野生型ポリペプチドは、ポリペプチド自体、親ポリペプチドを含む組成物、またはそれをコードするアミノ酸配列を指し得る。したがって、「野生型免疫グロブリン」は、変異体を生成するように改変される未改変免疫グロブリンポリペプチドを指し、「野生型抗体」は、変異抗体を生成するように改変される未改変抗体を指す。「野生型抗体」は、本明細書に記載されるような既知の市販の組換え産生抗体を含むことに注意されたい。

40

【0147】

「結晶性フラグメント(Fc)ポリペプチド」は、エフェクター分子及び細胞と相互作用

50

用する抗体分子の部分である。それは免疫グロブリン重鎖のC末端部分を含む。

【0148】

「フレームワーク」または「FR」は、例えば、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH（またはVL）における以下の配列：FR1 - H1（L1） - FR2 - H2（L2） - FR3 - H3（L3） - FR4に現れる。

【0149】

「完全長抗体」、「インタクト抗体」、及び「全抗体」は、本明細書において互換的に使用され、天然の抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

10

【0150】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞傷害性；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）の下方制御などが含まれる。このようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせられることを必要とし、例えば、本明細書に開示されるような様々なアッセイを用いて評価することができる。

【0151】

「ヒンジ領域」は、ヒトIgG1のGlu216からPro230のアミノ酸のストレッチを一般に指す（Burton, Molec. Immunol. 22 (1985) 161 - 206）。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、同じ位置内に重鎖間S - - S結合を形成する最初及び最後のシステイン残基を配置することによって、IgG1配列と整列させることができる。

20

【0152】

Fc領域の「下ヒンジ領域」は、例えば、C末端に隣接する残基からヒンジ領域までのストレッチ、すなわち、Fc領域の残基233から239に対応する。

【0153】

「相同性」は、例えば、最大相同性パーセントを達成するために、必要に応じて、配列を整列させ、ギャップを導入した後に同一であるアミノ酸配列変異体中の残基のパーセンテージとして言及する。整列のための方法及びコンピュータプログラムは当技術分野において周知である。このようなコンピュータプログラムの1つは、Genentech, Inc. によって著された「Align2」であり、このプログラムは1991年12月10日に米国著作権局、Washington, D.C. 20559にユーザ文書と共に提出された。

30

【0154】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は互換的に用いられ、外来核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫が含まれる。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、初代形質転換細胞、及び継代の数を問わず、それに由来する子孫が含まれる。子孫は、親細胞と核酸含有量において完全にはない場合があるが、突然変異を含む場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異型子孫が本明細書に含まれる。

40

【0155】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生されるか、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【0156】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つ以上のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす

50

白血球である。好ましくは、この細胞は少なくともFc R I I Iを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球が含まれ、PBMC及びNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、本明細書に記載されるような天然の供給源、例えば血液またはPBMCから単離することができる。

【0157】

「ヒト化」抗体は、例えば、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指すことができる。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことができ、そこでは、HVR(例えばCDR)の全てまたは実質的に全ては非ヒト抗体のそれらに対応し、FRの全てまたは実質的に全てはヒト抗体のそれらに対応する。ヒト化抗体は、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を場合により含むことができる。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を経た抗体を指す。例えば、「キメラ」抗体は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来するが、重鎖及び/または軽鎖の残部は異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

10

【0158】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」は、配列が超可変である、及び/または構造的に規定されたループ(「超可変ループ」)を形成する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般的に、天然4本鎖抗体は、6つのHVRを含み、このうち3つがVH(H1、H2、H3)にあり、3つがVL(L1、L2、L3)にある。HVRは一般に、超可変ループ由来のアミノ酸残基及び/または「相補性決定領域」(CDR)由来のアミノ酸残基を含み、このうち後者が、配列可変性が最も高く、及び/または抗原認識に参与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26~32(L1)、50~52(L2)、91~96(L3)、26~32(H1)、53~55(H2)、及び96~101(H3)において生じる(Chothia, and Lesk, J. Mol. Biol. 196(1987)901-917)。例示的なCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3)は、アミノ酸残基L1の24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、及びH3の95~102において生じる(Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原に接触する残基である、「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮型(abbreviated)CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3)は、アミノ酸残基L1の31~34、L2の50~55、L3の89~96、H1の31~35B、H2の50~58、及びH3の95~102において生じる(Almagro, and Fransson, Front. Biosci. 13(2008)1619-1633を参照されたい)。特に指示されない限り、可変ドメインにおけるHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書においてKabataら、上記にしたがって番号付けされる。

20

30

40

【0159】

「免疫複合体」とは、少なくとも1つの標的分子及び少なくとも1つの異種Fc領域含有ポリペプチドとが互いに結合してより大きな分子量の複合体を形成するとき形成される比較的安定な構造を指す。免疫複合体の例は、抗原-抗体凝集体及び標的分子-イムノアドヘシン凝集体である。本明細書で使用される「免疫複合体」という用語は、特に指示がない限り、エクスピボ複合体(すなわち、それが天然に見出され得る形態または設定以外のもの)を指す。しかしながら、免疫複合体は、例えば、哺乳動物における免疫複合体

50

のクリアランスを評価するために、哺乳動物に投与することができる。

【0160】

「免疫コンジュゲート」は、細胞傷害剤を含むが、これに限定されない1つ以上の異種分子（複数可）にコンジュゲートされている抗体である。

【0161】

「個体」または「対象」は、哺乳動物であり得る。哺乳動物には、飼育動物（例えば、雌ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、個体または対象は、ヒトである。

【0162】

「対象」または「患者」という用語は、例えば実験的、診断的、予防的、及び/または治療的目的のために本発明の態様を投与することができる任意の生物を指すことができる。本開示の化合物が投与され得る典型的な対象は、哺乳動物、特に霊長類、特にヒトである。獣医学的用途のために、様々な対象、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、ブタなどといった家畜；ニワトリ、カモ、ガチョウ、シチメンチョウなどといった家禽；ならびに飼育動物、特にイヌ及びネコといったペットが適切である。診断または研究用途の場合、齧歯類（例えばマウス、ラット、ハムスター）、ウサギ、霊長類、及び近交系ブタといったブタなどを含む様々な哺乳動物が、適切な対象である。「生きている対象」という用語は、上記の対象または生きている別の生物を指す。用語「生きている対象」は、対象または生物全体を指し、生きている対象から切除された部分（例えば、肝臓または他の器官）だけを指すのではない。

【実施例】

【0163】

本発明のより完全な理解を容易にするために実施例を以下に提供する。以下の実施例は、本発明を作製し、実施する代表的な方法を例示する。しかしながら、同様の結果を得るために他の方法を利用することができるため、本発明の範囲は、これらの実施例に開示されている特定の実施形態に限定されるものではなく、それらは例示の目的のためだけである。

【0164】

実施例1 - ADCCアッセイ

Promegaのレポーターシステムを用いてADCCアッセイを実施した。純度 > 99%のGITR+細胞を有する細胞集団を得るために、CHO-GITR細胞のプールを選別した。細胞を15k細胞/ウェルでプレティングし、様々な濃度の異なるaGITR抗体と共にインキュベートした。Promega ADCCバイオアッセイエフェクター細胞を5:1のE:T比で添加し、プレートを37、5%CO₂で6時間インキュベートした。インキュベーション後、Bio-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬を添加し、発光シグナルをBMG PolarStarマルチラベルプレートリーダーを用いて検出した。データは、予想通り、IgG1野生型モノマー及び六量体構築物のみが顕著なADCC活性を示したことを示している。六量体化が、野生型IgG1におけるADCCの大きさを低下させるようにみえることもまた興味深い。陰性対照IgGは、特異的ADCC活性を示さなかった。

【0165】

他の実施形態

本発明をその発明を実施するための形態と共に記載してきたが、前述の説明は例示を意図したものであり、本発明の範囲を限定するものではなく、これは添付の特許請求の範囲によって定義される。他の態様、利点、及び変更は、添付の特許請求の範囲内である。

【0166】

当業者は、単なる日常的な実験を用いて、本明細書に記載の特定の物質及び手順に対する多数の等価物を認識するか、または確認することができるであろう。そのような等価物は本発明の範囲内にあると考えられ、添付の特許請求の範囲によって網羅されている。

10

20

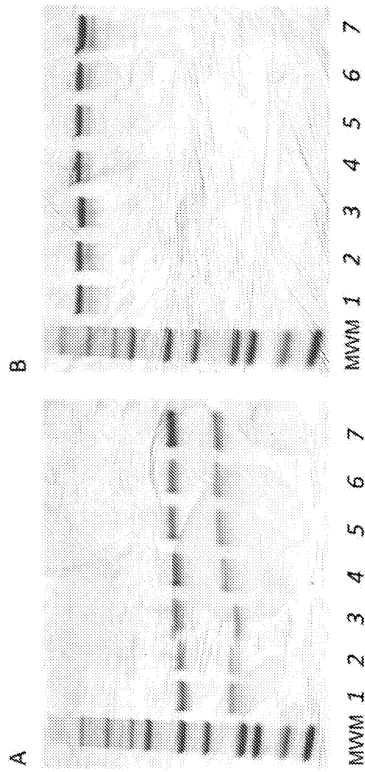
30

40

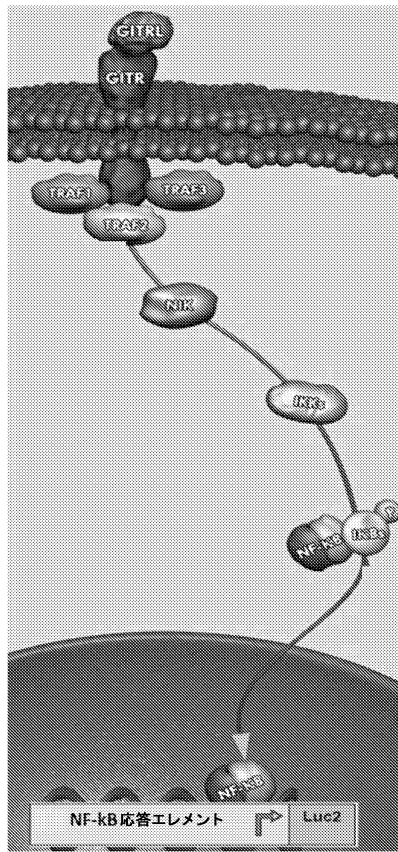
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

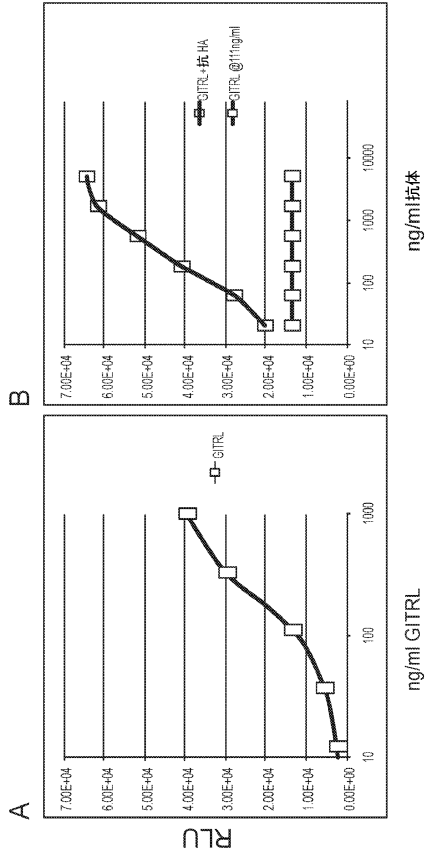
20

30

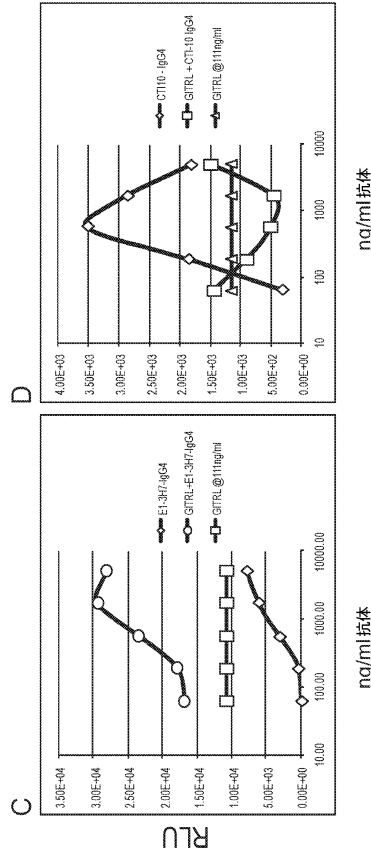
40

50

【 3 - 1 】



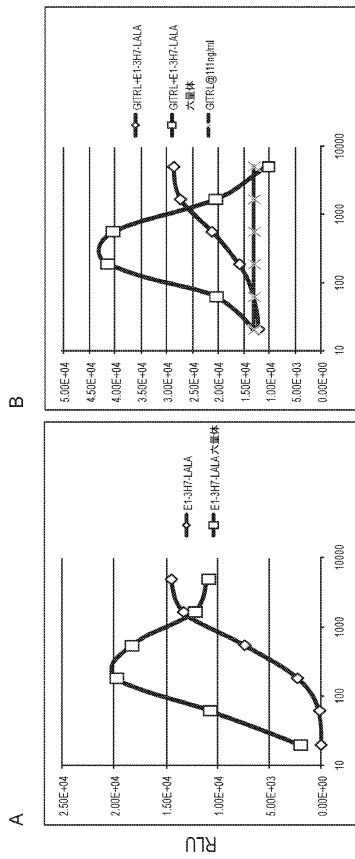
【 3 - 2 】



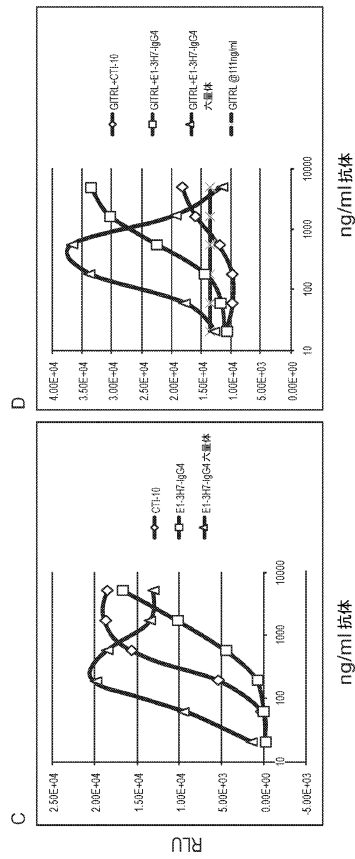
10

20

【 4 - 1 】



【 4 - 2 】

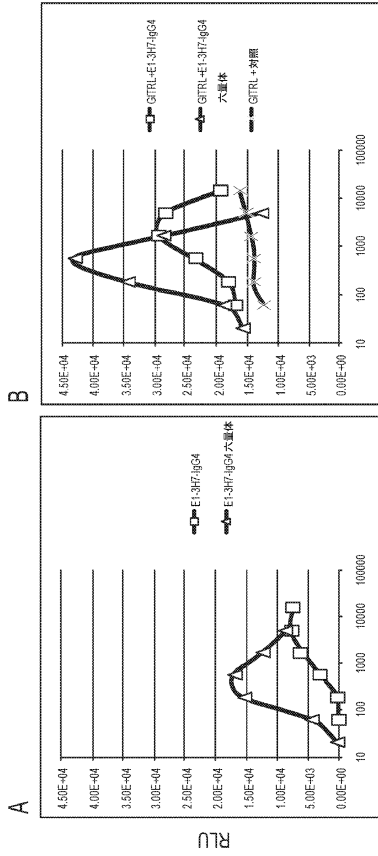


30

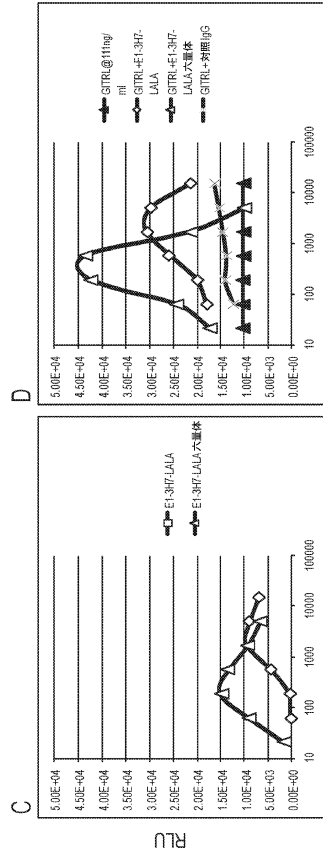
40

50

【 図 5 - 1 】



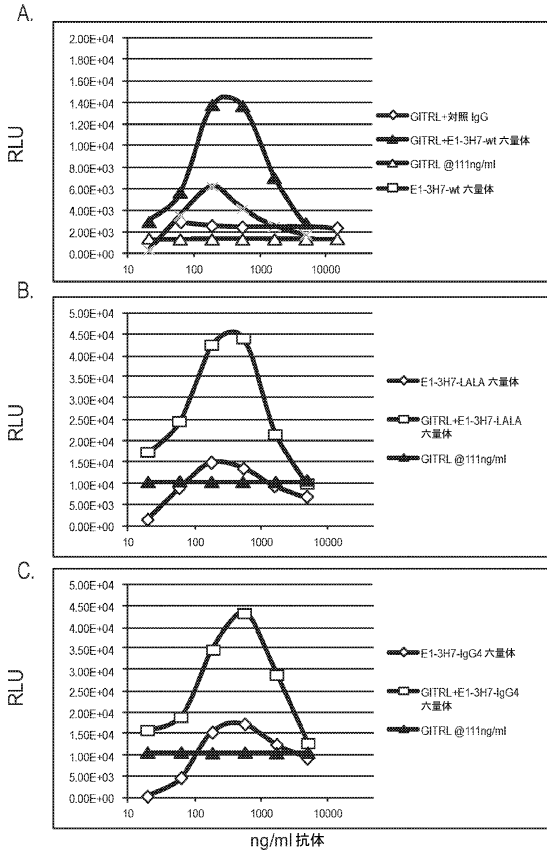
【 図 5 - 2 】



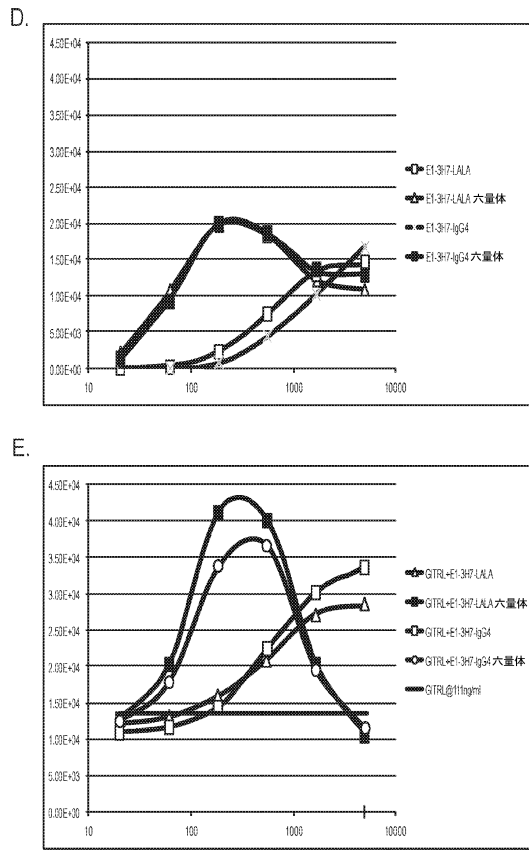
10

20

【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 2 】



30

40

50

【 1 4 - 1 】

CHI				CH2				CH3			
IGHGA 7番区 P01861	配列番号3 番号	Eu 番号 (08 aa) 118-215	Kbhit 番号	IGHGA 7番区 P01861	配列番号3 番号	Eu 番号 (110 aa) 231-340	Kbhit 番号	IGHGA 7番区 P01861	配列番号3 番号	Eu 番号 (107 aa) 341-446	Kbhit 番号
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	(A)	111	231	244	-	-	-	-
-	-	-	-	P	112	232	245	-	-	-	-
(A)	1	118	114	E	113	233	246	(G)	221	341	361
S	2	119	115	F	114	234	247	Q	222	342	363
T	3	120	116	L	115	235	248	P	223	343	364
K	4	121	117	G	116	236	249	R	224	344	365
G	5	122	118	G	117	237	250	E	225	345	366
P	6	123	119	P	118	238	251	P	226	346	367
S	7	124	120	S	119	239	252	Q	227	347	368
V	8	125	121	V	120	240	253	V	228	348	369
F	9	126	122	F	121	241	254	Y	229	349	370
P	10	127	123	L	122	242	255	T	230	350	371
L	11	128	124	F	123	243	256	L	231	351	372
A	12	129	125	P	124	244	257	P	232	352	373
P	13	130	126	P	125	245	258	P	233	353	374
C	14	131	127	K	126	246	259	S	234	354	375
S	15	132	128	P	127	247	260	Q	235	355	376
R	16	133	129	K	128	248	261	E	236	356	377

【 1 4 - 2 】

S	17	134	130	D	129	249	262	E	237	357	378
T	18	135	133	T	130	250	263	M	238	358	381
S	19	136	134	L	131	251	264	T	239	359	382
-	-	-	-	M	132	252	265	-	-	-	-
-	-	-	-	I	133	253	266	-	-	-	-
E	20	137	135	S	134	254	267	K	240	360	383
S	21	138	136	R	135	255	268	N	241	361	384
T	22	139	137	T	136	256	269	Q	242	362	385
A	23	140	138	P	137	257	270	V	243	363	386
A	24	141	139	E	138	258	271	S	244	364	387
L	25	142	140	V	139	259	272	L	245	365	388
G	26	143	141	T	140	260	273	T	246	366	389
C	27	144	142	C	141	261	274	C	247	367	390
L	28	145	143	V	142	262	275	L	248	368	391
V	29	146	144	V	143	263	276	V	249	369	392
K	30	147	145	V	144	264	277	K	250	370	393
D	31	148	146	D	145	265	278	G	251	371	394
Y	32	149	147	V	146	266	279	F	252	372	395
F	33	150	148	S	147	267	280	Y	253	373	396
P	34	151	149	Q	148	268	281	P	254	374	397
-	-	-	-	E	149	269	282	-	-	-	-
E	35	152	150	P	150	270	283	-	-	-	-
P	36	153	151	E	152	272	285	D	256	376	399

10

20

【 1 4 - 3 】

V	37	154	152	V	153	273	286	I	257	377	400
T	38	155	153	Q	154	274	287	A	258	378	401
V	39	156	154	F	155	275	288	V	259	379	402
S	40	157	156	N	156	276	289	E	260	380	405
W	41	158	157	W	157	277	290	W	261	381	406
N	42	159	162	Y	158	278	291	E	262	382	407
S	43	160	163	V	159	279	292	S	263	383	408
G	44	161	164	D	160	280	295	N	264	384	410
A	45	162	165	G	161	281	296	G	265	385	411
L	46	163	166	V	162	282	299	Q	266	386	414
T	47	164	167	E	163	283	300	P	267	387	415
S	48	165	168	V	164	284	301	E	268	388	416
-	-	-	-	H	165	285	302	N	269	389	417
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	49	166	169	N	166	286	303	N	270	390	418
V	50	167	171	A	167	287	304	Y	271	391	419
H	51	168	172	K	168	288	305	K	272	392	420
T	52	169	173	T	169	289	306	T	273	393	421
F	53	170	174	K	170	290	307	T	274	394	422
P	54	171	175	P	171	291	308	P	275	395	423
A	55	172	176	R	172	292	309	P	276	396	424
V	56	173	177	E	173	293	310	V	277	397	425
L	57	174	178	E	174	294	311	L	278	398	426

【 1 4 - 4 】

Q	58	175	179	Q	175	295	312	D	279	399	427
S	59	176	180	F	176	296	313	S	280	400	428
S	60	177	182	N	177	297	314	D	281	401	430
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	61	178	183	S	178	298	317	G	282	402	433
L	62	179	184	T	179	299	318	S	283	403	434
Y	63	180	185	Y	180	300	319	F	284	404	435
S	64	181	186	R	181	301	320	F	285	405	436
L	65	182	187	V	182	302	321	L	286	406	437
S	66	183	186	V	183	303	322	Y	287	407	438
S	67	184	189	S	184	304	323	S	288	408	439
V	68	185	190	V	185	305	324	R	289	409	440
V	69	186	191	L	186	306	325	L	290	410	441
T	70	187	192	T	187	307	326	T	291	411	442
V	71	188	193	V	188	308	327	V	292	412	443
F	72	189	194	L	189	309	328	D	293	413	444
S	73	190	195	H	190	310	329	K	294	414	445
S	74	191	196	Q	191	311	330	S	295	415	446
S	75	192	197	D	192	312	331	R	296	416	447
L	76	193	198	W	193	313	332	W	297	417	448

30

40

50

【配列表】

0007231549000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)

F I

A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 35/02

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マラスコ ウェイン エー .

アメリカ合衆国 0 2 4 8 1 マサチューセッツ州 ウェルスレイ ライス ストリート 4 3

(72)発明者 ジュー クアン カレン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 2 マサチューセッツ州 サウスボロー キャリエッジ ヒル サークル 9

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 6 4 4 8 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 3 9 3 6 5 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

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

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)