

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7295799号  
(P7295799)

(45)発行日 令和5年6月21日(2023.6.21)

(24)登録日 令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47		
C 0 7 K 14/76 (2006.01)	C 0 7 K 14/76		
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28		
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z	

請求項の数 15 (全82頁)

(21)出願番号	特願2019-529975(P2019-529975)	(73)特許権者	504261103
(86)(22)出願日	平成29年12月1日(2017.12.1)		ザ テキサス エー アンド エム ユニバ ーシティー システム
(65)公表番号	特表2020-500885(P2020-500885		アメリカ合衆国 テキサス州 カレッジ ステーション ティーエーエムユー 33
	A)		6 9
(43)公表日	令和2年1月16日(2020.1.16)	(74)代理人	110000741
(86)国際出願番号	PCT/US2017/064186		弁理士法人小田島特許事務所
(87)国際公開番号	WO2018/102668	(72)発明者	オーバー, エリザベス・サリー・ウォー ド
(87)国際公開日	平成30年6月7日(2018.6.7)		アメリカ合衆国テキサス州 7 7 8 4 5 カ レッジステーション・スプリングクリー ク 8 4 0 5
審査請求日	令和2年12月1日(2020.12.1)	(72)発明者	デバナボイナ, ベンカタ・シバ・チャラ ン
(31)優先権主張番号	62/429,367		
(32)優先日	平成28年12月2日(2016.12.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原特異的抗体を選択的に枯渇させるための融合タンパク質

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記 ( A ) および ( B ) を含む S e l e c t e d であって、

( A ) 細胞表面受容体又は細胞表面分子に特異的に結合するように構成されるタンパク質又はタンパク質フラグメントを有する標的成分、但し、前記タンパク質又はタンパク質フラグメントは、下記 ( 1 ) ~ ( 3 ) からなる群より選ばれる：

( 1 ) 抗体 F c フラグメントであって、野生型 F c フラグメントと比較して、

( i ) 6 . 8 より高く且つ 7 . 5 未満の pH での F c R n への結合親和性は増加するように改変され、且つ

( i i ) F c R 及び / 又は補体 ( C 1 q ) への低下した結合親和性を有するか、或いは I g G 2 又は I g G 4 由来の F c フラグメントである、抗体 F c フラグメント、

( 2 ) 細胞表面リガンドに特異的な抗体であって、但し、前記抗体の F c フラグメントは、

( i ) 野生型 F c フラグメントと比較して、 F c R 及び / 又は補体 ( C 1 q ) への結合親和性は低下するように改変されているか、或いは

( i i ) I g G 2 又は I g G 4 由来の F c フラグメントである、抗体、

( 3 ) 細胞表面レセプターに対するリガンドであって、但し、前記リガンドは、下記 ( i ) 又は ( i i ) の抗体 F c フラグメントと融合している

( i ) 野生型 F c フラグメントと比較して、 F c R 及び / 又は補体 ( C 1 q ) への結合親和性は低下するように改変されている抗体 F c フラグメント

10

20

( i i ) Ig G 2 又は Ig G 4 由来の Fc フラグメントである、リガンド、及び

( B ) 標的抗原特異的抗体に特異的に結合するように構成される抗原の 1 分子を有する 1 価の抗原成分、

ここで、前記標的成分は前記抗原成分と直接又は間接的に融合していることを特徴とする、Seldeg。

【請求項 2】

前記標的成分は、6.8 より高く且つ 7.5 未満の pH において 10 μM 未満の解離定数で細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合する、請求項 1 に記載の Seldeg。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの第 1 の標的成分及び第 2 の標的成分を含み、ここで第 1 の標的成分のタンパク質又はタンパク質フラグメントは第 2 の標的成分のタンパク質又はタンパク質フラグメントと異なる細胞表面受容体又は異なる細胞表面分子に結合するように構成されている、請求項 1 に記載の Seldeg。

【請求項 4】

前記第 1 及び第 2 の標的タンパク質成分は、2 つの免疫グロブリン Fc フラグメントのヘテロダイマーを含み、前記ヘテロダイマーの 1 つの免疫グロブリン Fc フラグメントは前記抗原成分に融合し、他の免疫グロブリン Fc フラグメントは融合していない、請求項 3 に記載の Seldeg。

【請求項 5】

前記抗原成分が免疫グロブリン Fc フラグメントのヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub> ドメインの N 末端又は C 末端において 1 つの免疫グロブリン Fc フラグメントに融合している、請求項 1 に記載の Seldeg。

【請求項 6】

前記標的成分は、Seldeg 及び細胞表面受容体又は細胞表面分子を含む複合体のエンドソーム中への進入 (entry) に続いて細胞表面受容体又は細胞表面分子から解離するように構成される、請求項 1 に記載の Seldeg。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の Seldeg であって、前記標的成分が、

1 つ以上のアルブミン分子、アルブミンフラグメント若しくは FcRn に特異的に結合するように構成される突然変異アルブミン変異体；

トランスフェリン受容体に結合するように構成される 1 つ以上の抗体可変ドメイン若しくはナノボディー；

トランスフェリン受容体に結合するように構成される 1 つ以上のタンパク質分子若しくはタンパク質ドメイン；

ホスファチジルセリンに結合するように構成される 1 つ以上のタンパク質分子若しくはタンパク質ドメイン；及び / 又は

ホスファチジルセリンに結合するように構成される 1 つ以上の抗体可変ドメイン若しくはナノボディー；

を含む、Seldeg。

【請求項 8】

前記 1 つ以上のタンパク質分子若しくはタンパク質ドメインは、カルシウム依存性機構を介してホスファチジルセリンに結合するように構成され、或いは、

前記標的成分が、シナブトタグミン 1 の C2A ドメインを含む、請求項 7 に記載の Seldeg。

【請求項 9】

患者から標的抗原特異的抗体を枯渇させるための、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の Seldeg であって、

前記 Seldeg が患者中の循環又は標的組織から標的抗原特異的抗体の少なくとも 50 % をクリアランスするのに十分な量で患者に投与される、Seldeg。

10

20

30

40

50

**【請求項 10】**

前記 S e l d e g が

投与から 24 時間以内に前記患者中の循環又は標的組織から前記標的抗原特異的抗体の少なくとも 50 % をクリアランスするのに十分な量、

投与から 48 時間以内に前記患者中の循環又は標的組織から前記標的抗原特異的抗体の少なくとも 50 % をクリアランスするのに十分な量、或いは

投与から 48 時間以内に前記患者中の循環又は標的組織から前記標的抗原特異的抗体の少なくとも 90 % をクリアランスするのに十分な量、のいずれかの量で投与される、請求項 9 に記載の S e l d e g 。

**【請求項 11】**

10

前記 S e l d e g が

前記循環中又は前記標的抗原特異的抗体が標的とする組織中で非標的抗体の 10 % 未満をクリアランスする、

前記循環中又は前記標的抗原特異的抗体が標的とする組織中で非標的抗体の 1 % 未満をクリアランスする、或いは

前記患者において臨床的に不利な影響を引き起こさない量の該患者の循環又は標的組織中の標的とされない抗体をクリアランスする、請求項 9 に記載の S e l d e g 。

**【請求項 12】**

20

前記 S e l d e g が

自己免疫疾患に冒された患者に投与され、前記標的抗原特異的抗体は自己抗原に特異的に結合するか、

臓器を移植された患者に投与され、前記標的抗原特異的抗体は移植された前記臓器上の抗原に特異的に結合するか、

腫瘍画像化の間にコントラストを増すために投与され、前記標的抗原特異的抗体は腫瘍抗原に特異的に結合するか、

生物学的製剤を受け取った患者に投与され、前記標的抗原特異的抗体は前記生物学的製剤であるか、

前記患者が治療薬に特異的な抗体を有する場合、治療薬の送達の前に該患者に投与され、 S e l d e g は前記治療薬に関して特異的な抗体を標的とするように構成されるか、或いは

30

診断用画像化においてコントラストの向上のために投与される、請求項 9 に記載の S e l d e g 。

**【請求項 13】**

前記 S e l d e g が細胞表面受容体又は細胞表面分子を発現する細胞によって前記標的抗原特異的抗体の分解を引き起こす、請求項 9 に記載の S e l d e g 。

**【請求項 14】**

40

請求項 1 に記載の S e l d e g であって、

前記標的抗原特異的抗体は抗 M O G 抗体であり、

前記標的抗原特異的抗体は抗 H E R 2 抗体であり、

当該 S e l d e g は、配列番号 2 、配列番号 4 、配列番号 6 、配列番号 8 、配列番号 10 、配列番号 12 、配列番号 14 、配列番号 16 、配列番号 18 、配列番号 20 、配列番号 22 、配列番号 24 、配列番号 26 、配列番号 28 、配列番号 30 、配列番号 32 、若しくは配列番号 34 のアミノ酸配列、又はこれらアミノ酸配列に対し 90 % の同一性を有する配列、の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を有するタンパク質を含むか、或いは

当該 S e l d e g は、 i ) 配列番号 2 プラス配列番号 6 、 i i ) 配列番号 4 プラス配列番号 6 、 i i i ) 配列番号 8 プラス配列番号 10 、 i v ) 配列番号 12 プラス配列番号 14 、 v ) 配列番号 16 プラス配列番号 18 プラス配列番号 20 、 v i ) 配列番号 20 プラス配列番号 22 プラス配列番号 24 、 v i i ) 配列番号 26 プラス配列番号 28 、 v i i i ) 配列番号 30 プラス配列番号 6 、 i x ) 配列番号 32 プラス配列番号 6 若しくは x ) 配列番号 34 プラス配列番号 6 のアミノ酸配列、又はこれらアミノ酸配列に対し 90 % の

50

同一性を有する配列、を有するタンパク質のヘテロダイマーを含む、S e l d e g。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の S e l d e g であって、

前記標的抗原特異的抗体は抗 M O G 抗体であり、

前記標的成分は、下記 ( i ) および ( i i ) のヘテロダイマーを含み、

( i ) 免疫グロブリン F c フラグメントに直接又はリンカーを介して連結された M O G の残基 1 - 1 1 7 ; および

( i i ) 免疫グロブリン F c フラグメント、

ここで、前記免疫グロブリン F c フラグメントは、I g G 1 由来であり、F C R および C 1 q への結合を減少させるための L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 P 3 2 9 G ( E U ナンバリングシステム ) の変異、および F c R n への結合を増加させるための M 2 5 2 Y 、 S 2 5 4 T 、 T 2 5 6 E 、 H 4 3 3 K 、 N 4 3 4 F ( E U ナンバリングシステム ) の変異を含み、

前記ヘテロダイマーの成分 ( i ) は、配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、前記ヘテロダイマーの成分 ( i i ) は、配列番号 6 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、S e l d e g。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は人為改変 ( e n g i n e e r e d ) タンパク質、そしてさらに具体的に体から標的抗原特異的抗体を選択的に枯渇させる融合タンパク質 ( " S e l d e g s " ) に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

抗体は、人体及び哺乳類の身体の血液その他の体液中に存在する Y 形のタンパク質である。抗体は体の免疫系の重要な成分である。それらは抗原と呼ばれる異種標的の独特の部分を認識することにより機能する。抗体はその 2 つの抗原結合部位を介して選択的に抗原を認識し、それへの免疫反応を開始させる ( t r i g g e r ) ことができる。それぞれの抗原結合部位は、抗体の Y 形の上部先端のそれぞれの末端にある。標的抗原は 1 つ又は両方の抗原結合部位に結合する場合がある。抗体の Y 形の基部は F c フラグメントと呼ばれる。抗体がその標的に結合すると、F c 領域は抗体エフェクター機能を介して標的クリアランスをもたらすことができる。そのような反応は抗原を破壊するための細胞プロセスを含み得る。ある種の自己免疫疾患及び他の病気において、体における自己抗原を標的とする病原性抗体が作られ、発病に寄与する場合がある。抗体は、細胞から分泌されて血漿中で遊離している可溶性の形態又は B 細胞の外膜に結合している膜結合形態の 2 つの物理的形態のいずれかにある場合がある。分泌される抗体は自己反応性抗体を含む疾患における病状 ( p a t h o l o g y ) を引き起こす。それらは移植拒絶又はタンパク質に基づく治療の排除にも寄与し得る。

【0 0 0 3】

標的分子に特異的に結合する抗体の能力の故に、それらを癌及び自己免疫のような疾患の処置に用いることができる。それらは例えばポジトロンエミッショントモグラフィー ( P E T ) において放射性標識抗体を用いる全身画像化の間に腫瘍の検出にも用途を有する。しかしながら、それらの比較的長い生体内持続性 ( i n v i v o p e r s i s t e n c e ) は非腫瘍組織における高いバックグラウンドに導き、腫瘍画像化に関する劣ったコントラスト及び望ましくないオフターゲット効果を生じ得る。

【発明の概要】

【0 0 0 4】

本開示は本明細書で " S e l d e g s " と呼ばれる融合タンパク質を含み、それは抗原特異的抗体の選択的クリアランスを可能にするように構成される。S e l d e g は細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に特異的に結合するように構成される標的成分及び抗原特異的抗体又はその変異体に特異的に結合するように構成される抗原成分を含む。

10

20

30

40

50

## 【0005】

Seldegの標的成分は、細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に特異的に結合するよう構成されるタンパク質又はタンパク質フラグメントを含む。Seldegの抗原成分は、標的抗原特異的抗体に特異的に結合するよう構成される抗原又は抗原フラグメント又は抗原類似物の1分子を含む。抗原成分は標的成分に直接又は間接的に融合している。

## 【0006】

本開示は、患者中の循環又は標的組織から標的抗原特異的抗体の少なくとも50%をクリアランスするのに十分な量でSeldegを患者に投与することにより、患者から標的抗原特異的抗体を枯渇させる方法も含む。

## 【0007】

上記のSeldegs及び方法はさらに以下の詳細を含む場合があり、それらは明らかに互いに排他的でなければ互いに組み合わされる場合がある：i) 標的成分は中性近辺のpHにおいて10μM未満の解離定数で細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合することができる；ii) 中性近辺のpHは6.8より高く且つ7.5未満の場合がある；iii) Seldegは少なくとも1つの第1の標的成分及び第2の標的成分を含むことができ、ここで第1の標的成分のタンパク質又はタンパク質フラグメントは第2の標的成分のタンパク質又はタンパク質フラグメントと異なる細胞表面受容体又は異なる細胞表面分子に結合するよう構成される；iv) 標的成分は2つの免疫グロブリンFcフラグメントのヘテロダイマーを含む場合があり、そこにおいてヘテロダイマーの1つの免疫グロブリンFcフラグメントは抗原成分に融合しており、他の免疫グロブリンFcフラグメントは融合していない場合がある；v) 免疫グロブリンFcフラグメントはFcガンマ受容体への結合が実質的に低下しているか又は検出可能な結合をしていない場合がある；vi) 免疫グロブリンFcフラグメントはFcガンマ受容体又は補体に結合しない免疫グロブリンのクラス又はイソタイプに由来することができる；vii) 免疫グロブリンFcフラグメントをFcガンマ受容体及び補体に結合するよう構成することができる；viii) 免疫グロブリンFcフラグメントの少なくとも1つを、中性近辺のpHにおいて非修飾免疫グロブリンFcフラグメントより高いFcRnに関する結合親和性を有するよう修飾することができる；ix) 抗原成分は、免疫グロブリンFcフラグメントのヒンジ-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>ドメインのN末端又はC末端において1つの免疫グロブリンFcフラグメントに融合している場合がある；x) 免疫グロブリンFcフラグメントをFcガンマ受容体及び/又は補体(C1q)への結合親和性を有していないかあるいは非修飾免疫グロブリンFcフラグメントより低いFcガンマ受容体及び/又は補体(C1q)への結合親和性を有するよう修飾する場合がある；xi) 標的成分は、細胞表面受容体又は細胞表面分子に特異的に結合するよう構成される1つ以上の抗体可変領域又はそのフラグメントを含む場合がある；xii) 抗体可変領域又はそのフラグメントは少なくとも1つのナノボディーを含む場合がある；xiii) ナノボディーはナノボディー多量体の場合があり、そこにおいて1つのナノボディーは抗原成分に融合しており、ナノボディー多量体中の他のすべてのナノボディーは融合していない場合がある；xiv) 標的成分を、Seldeg及び細胞表面受容体又は細胞表面分子を含む複合体のエンドソーム中への進入(entry)に続いて細胞表面受容体又は細胞表面分子から解離するよう構成する場合がある；xv) 抗原成分は標的成分上のN末端位置又はC末端位置に融合している場合がある；xvi) 抗原成分は標的成分上の非末端位置に融合している場合がある；xvii) 抗原成分は化学反応を介して、リンカーを介して又は1つの組み合わされた抗原成分-標的成分融合タンパク質の形成の間(during formation of a single combined antigen component-targetting component fusion protein)に標的成分に融合する場合がある；xviii) 標的成分は1つ以上のアルブミン分子、アルブミンフラグメント又はFcRnに特異的に結合するよう構成される突然変異アルブミン変異体の場合がある；xix) 標的成分は、トランスフェリン受容体に結合するよう構成される1つ以上の抗体可変ドメイン又はナノボディーを含む場合がある；xx) 標的成分は、トランスフェリン受容体に結合

10

20

30

40

50

するように構成される 1 つ以上のタンパク質分子又はタンパク質ドメインを含む場合がある ; x x i ) 標的成分は、ホスファチジルセリンに結合するように構成される 1 つ以上のタンパク質分子又はタンパク質ドメインを含む場合がある ; x x i i ) 標的タンパク質成分は、ホスファチジルセリンに結合するように構成される 1 つ以上の抗体可変ドメイン又はナノボディーを含む場合がある ; x x i i i ) 1 つ以上のタンパク質分子又はタンパク質ドメインを、カルシウム依存性機構を介してホスファチジルセリンに結合するように構成する場合がある ; x x i v ) 標的成分は、シナプトタグミン 1 の C 2 A ドメインを含む場合がある ; x x v ) S e l d e g は少なくとも 1 つの第 1 の抗原成分及び第 2 の抗原成分を含む場合があり、ここで第 1 の抗原成分の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の 1 分子は第 2 の抗原成分の抗原分子、抗原フラグメント又は抗原類似物の 1 分子と異なる ; x x v i ) S e l d e g は少なくとも 1 つの第 1 の抗原成分及び第 2 の抗原成分を含む場合があり、ここで第 1 の抗原成分の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の 1 分子は第 2 の抗原成分の抗原分子、抗原フラグメント又は抗原類似物の 1 分子と同じである ; x x v i i ) 前記方法は、投与から 5 時間以内に患者中の循環又は標的組織から標的抗原特異的抗体の少なくとも 50 % をクリアランスするのに十分な量の S e l d e g を投与することを含む場合がある ; x x v i i i ) 前記方法は、中性近辺の pH において 10  $\mu$ M 未満の解離定数で細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合するように構成されたタンパク質又はタンパク質フラグメントを含む標的成分を有する S e l d e g を投与することを含む場合がある ; x x i x ) 投与される S e l d e g の十分な量は、枯渇させられるべき標的抗原特異的抗体の量に少なくとも等モルである量の場合がある ; x x x ) 前記方法は、投与から 2 時間以内に患者中の循環又は標的組織から標的抗原特異的抗体の少なくとも 90 % をクリアランスするのに十分な量で S e l d e g を投与することを含む場合がある ; x x x i ) 投与から 1 時間以内に患者中の循環又は標的組織から標的抗原特異的抗体の少なくとも 50 % をクリアランスするのに十分な量で S e l d e g を投与する場合がある ; x x x i i ) 患者の 50 % が循環又は標的組織中で閾量の標的抗原特異的抗体を再生したと予想されるときはいつでも S e l d e g を再投与する場合がある ; x x x i i i ) S e l d e g は、循環中又は標的抗原特異的抗体が標的とする組織において非標的抗体の 10 % 未満をクリアランスする場合がある ; x x x i v ) S e l d e g は、患者において臨床的に不利な影響を引き起こさない量の患者の循環又は標的組織中の標的とされない抗体をクリアランスする場合がある ; x x x v ) S e l d e g は、循環中又は標的抗原特異的抗体が標的とする組織中で非標的抗体の 1 % 未満をクリアランスする場合がある ; x x x v i ) S e l d e g は、細胞表面受容体又は細胞表面分子を発現する細胞により、標的抗原特異的抗体の分解を引き起こす場合がある ; x x x v i i ) 自己免疫疾患に冒された患者に S e l d e g を投与する場合があり、標的抗原特異的抗体は自己抗原に特異的に結合する場合がある ; x x x v i i i ) 移植臓器を受け取った患者に S e l d e g を投与する場合があり、標的抗原特異的抗体は移植臓器上の抗原に特異的に結合する場合がある ; x x x i x ) 腫瘍画像化の間にコントラストを増すために S e l d e g を投与する場合があり、標的抗原特異的抗体は腫瘍抗原に特異的に結合する場合がある ; x 1 ) 生物学的製剤を受け取った患者に S e l d e g を投与する場合があり、標的抗原特異的抗体は生物学的製剤の場合がある ; x 1 i ) 患者が治療薬に特異的な抗体を有する場合、治療薬の送達の前に S e l d e g を患者に投与する場合があり、S e l d e g は治療薬に関して特異的な抗体を標的とするように構成される ; x 1 i i ) PET 画像コントラスト剤を与るために S e l d e g を投与する場合がある ; x 1 i i i ) 標的抗原特異的抗体は抗 M O G 抗体の場合がある ; x 1 i v ) 標的抗原特異的抗体は抗 H E R 2 抗体の場合がある ; x 1 v ) S e l d e g は配列番号 2 、配列番号 4 、配列番号 6 、配列番号 8 、配列番号 10 、配列番号 12 、配列番号 14 、配列番号 16 、配列番号 18 、配列番号 20 、配列番号 22 、配列番号 24 、配列番号 26 、配列番号 28 、配列番号 30 、配列番号 32 又は配列番号 34 あるいはそれらの相同体の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を有するタンパク質を含む場合がある ; x 1 v i ) S e l d e g は配列番号 2 プラス配列番号 6 、配列番号 4 プラス配列番号 6 、配列番号 8 プラス配列番号 10 、配列番号 12 プラス配列番号 14 、

10

20

30

40

50

配列番号 1 6 プラス配列番号 1 8 プラス配列番号 2 0 、配列番号 2 0 プラス配列番号 2 2 プラス配列番号 2 4 、配列番号 2 6 プラス配列番号 2 8 、配列番号 3 0 プラス配列番号 6 、配列番号 3 2 プラス配列番号 6 又は配列番号 3 4 プラス配列番号 6 又はそれらの相同体のアミノ酸配列を有するタンパク質のヘテロダイマーを含む場合がある。

【 0 0 0 8 】

本発明ならびにその特徴及び利点をさらに完全に理解するために、ここで添付の図面と一緒に理解される以下の記述に言及し、図面は一定の比率で拡大縮小されておらず ( n o t to scale ) 、図面中で同じ数字は同じ特徴を指す

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1 】 S e l d e g の存在下における抗原特異的抗体の分解に導く選ばれた細胞事象 ( c e l l u a r e v e n t s ) の略図である ;

【図 2 A 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 B 】 F c フラグメントの C 末端位置に融合した抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 C 】 F c フラグメントの非末端位置に融合した抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 D 】 細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメントの末端位置に融合した抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 E 】 細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメントの非末端位置に融合した抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 F 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した抗原及び F c フラグメントの C 末端に融合した細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメントを含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 G 】 F c フラグメントの C 末端位置に融合した抗原及び F c フラグメントの N 末端に融合した細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメントを含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 H 】 細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合する抗体の C 末端位置に融合した抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 I 】 F c フラグメントの C 末端位置に融合した抗原及び F c フラグメントの N 末端に融合した細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合する s c F v フラグメントを含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 J 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した抗原及び F c フラグメントの C 末端に融合した細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合する s c F v フラグメントを含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 K 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した 2 種類の抗原を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 L 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した 2 種類の抗原及び F c フラグメントの C 末端に融合した細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメントを含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 M 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した 2 個の抗原分子を含む S e l d e g の略図である ;

【図 2 N 】 F c フラグメントの N 末端位置に融合した 2 個の抗原分子及び F c フラグメントの C 末端に融合した細胞表面タンパク質又は細胞表面受容体に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメントを含む S e l d e g の略図である ;

【図 3 A 】 2 つの代表的な F c R n 標的化 S e l d e g s 、ヒト表皮成長因子受容体 2 S e l d e g ( " H E R 2 - S e l d e g " ) 及びミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 S e l d e g ( " M O G - S e l d e g " ) の略図である ;

【図 3 B 】 pH 6 . 0 及び 7 . 4 における代表的な F c R n 標的化 S e l d e g の F c R

10

20

30

40

50

nへの結合の増加を示す。

【図3C】FcRn標的化S1degの保存安定性を評価するための4（30日）及び37（5日）におけるインキュベーション後の2つの代表的なFcRn標的化S1degsのHPLC分析を示す。

【図3D】代表的な正規化された体カウント（body counts）対時間を報告するグラフを示し、代表的なFcRn標的化S1degによる抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図3E】代表的な正規化された血液及び体カウント対時間を報告する追加のグラフを示し、代表的なFcRn標的化S1degによる抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図3F】代表的な正規化された血液及び体カウント対時間を報告する追加のグラフを示し、代表的なFcRn標的化S1degによる抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図4A】左上のパネルにおいて、ホスファチジルセリン（PS）に結合する標的タンパク質（シナプトタグミン1のC2Aドメイン、Syt1）に融合した抗原を含むMOG-S1deg-PSと呼ばれる代表的なS1degを示し；右上のパネルにおいて図4Aは、MOG-S1deg-PS、PSへの結合が実質的に減少する突然変異を有するMOG-S1deg-PS（DN）及び抗原（MOG）が結合していないFc-Syt1の組換えタンパク質の代表的なSDS-PAGEゲル（還元及び非還元状態）を示し；下のパネルにおいて図4Aは、右上の図4Aに示される組換えタンパク質、MOG-S1deg-PS、MOG-S1deg-PS（DN）及びFc-Syt1の代表的なHPLC分布を示す；

【図4B】代表的な正規化された血液及び体カウント対時間を報告する追加のグラフを示し、代表的なPS-標的化S1degによる抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図5A】代表的なFcRn標的化S1degs及び参照標準タンパク質の存在下での細胞中における抗原特異的抗体の堆積を示す代表的なデータを報告するグラフを示す；

【図5B】標的抗原特異的抗体の存在下における代表的なFcRn標的化S1deg及び参照標準タンパク質の代表的な1つのシリーズの顕微鏡画像であり、代表的なエンドソームの顕微鏡画像を切り出し、拡大し、右上の角の差し込み図に示した；

【図5C】標的抗原特異的抗体の存在下における代表的なFcRn標的化S1deg及び参照標準タンパク質の別のシリーズの代表的な顕微鏡画像であり、代表的なエンドソームの顕微鏡画像を切り出し、拡大し、右上の角の差し込み図に示した；

【図6A】標的抗原特異的抗体の存在下における代表的なFcRn標的化S1deg及び参照標準タンパク質の別のシリーズの代表的な顕微鏡画像であり、代表的なリソソームの顕微鏡画像を切り出し、拡大し、右上の角の差し込み図に示した；

【図6B】S1degが標的としている抗原を認識しない抗原特異的抗体の存在下における代表的なFcRn標的化S1degの別のシリーズの代表的な顕微鏡画像であり、代表的なリソソームの顕微鏡画像を切り出し、拡大し、右上の角の差し込み図に示した；

【図7】代表的なPS-標的化S1degs及び参照標準タンパク質の存在下での細胞中における抗原特異的抗体の堆積を示す代表的なデータを報告するグラフを示す。

【図8】トランスフェリン受容体（TfR）に結合する標的タンパク質（抗体）に融合した抗原を含む代表的なS1degの略図である；抗原（MOG）が結合していない標的タンパク質（抗体）の分析を含む組換えタンパク質のHPLC分布を示す；

【図9】代表的TfR-標的化S1deg及び参照標準タンパク質の存在下での細胞中における抗原特異的抗体の堆積を示す代表的なデータを報告するグラフである；

【図10A】放射性標識されたHER2特異的抗体の送達及び代表的なFcRn標的化S1deg、参照標準タンパク質又はビヒクル参照標準を用いる処置の後のマウスにおける腫瘍のポジトロンエミッショントモグラフィー（PET）分析の代表的な一系列である。

【図10B】放射性標識されたHER2特異的抗体の送達及び代表的なFcRn標的化S

10

20

30

40

50

eldeg、参照標準タンパク質又はビヒクル参照標準を用いる処置の後の腫瘍保有マウスの腫瘍：胸部領域に関するコントラスト測定値 (contrast measures) を報告するグラフを示す。

【0010】

発明の詳細な説明

本開示は人為改変タンパク質、そしてさらに具体的に体からの枯渴のために抗原特異的抗体を選択的に標的とするように構成される融合タンパク質である Seldeg に関する。Seldeg は、抗原特異的抗体に結合し、分解酵素を含有する後期エンドソーム又はリソソームにそれらを向けることにより、標的とされる抗原特異的抗体の選択的な分解を引き起こす。Seldeg は、少なくとも 1 つの標的成分及び抗原成分を含む融合タンパク質又は分子である。標的成分は細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合するように構成されるタンパク質又はタンパク質フラグメント又は他の分子を含む。抗原成分は、標的とされる抗原特異的抗体により認識される抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の 1 分子を含む。

【0011】

抗原特異的抗体が抗原成分に結合すると、Seldeg 及び抗原特異的抗体を含む複合体が形成される。複合体は細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合するようにも構成されており、Seldeg、抗原特異的抗体及び標的とされる細胞表面受容体又は他の細胞表面分子を含む複合体の細胞内移行 (internalization) を可能にする (図 1 を参照されたい)。標的とされる細胞表面受容体又は細胞表面分子は、エンドソーム中に入ると、酸性の pH、低いカルシウム濃度及び / 又は細胞外環境からエンドソーム環境を区別する他の条件の故に、複合体から解離する場合がある。エンドソーム中への移行及びリソソーム進入は、複合体の選択的な分解を生ずる。

【0012】

本明細書で用いられる「抗原特異的抗体」という用語は、特定の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物に結合する抗体を指す。

【0013】

本明細書で用いられる「抗原フラグメント」という用語は、抗原特異的抗体により認識されることができる抗原の一部を指す。

【0014】

本明細書で用いられる「抗原類似物」という用語は、抗原特異的抗体により認識される抗原の一部と同じ全体的な形及び性質を有するタンパク質、タンパク質フラグメント、ペプチド又は他の分子を指す。

【0015】

本明細書で用いられる「細胞表面分子」という用語は、細胞の原形質膜上に露出しているタンパク質又は他の生体分子 (例えばリン脂質、炭水化物) を指す。

【0016】

Seldeg は、IgG 抗体の Fc フラグメント (本明細書で「免疫グロブリン Fc フラグメント」とも呼ばれる) に融合した抗原、FcRn 特異的ナノボディー - 抗原融合分子、その可変領域を介して FcRn に結合し、抗原に融合している FcRn 特異的抗体、アルブミン - 抗原融合タンパク質、PS 結合性タンパク質、TfR 特異的抗体あるいは本開示を読むと当業者が同定することができる細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合するように構成される他のタンパク質、タンパク質フラグメント又は他の分子を含む場合がある。

【0017】

本明細書に説明される Seldeg の例は、中性近辺の pH において 10 μM 未満の親和性 (解離定数) を以てヒト FcRn、露出したホスファチジルセリン (PS) 又はトランスフェリン受容体 (TfR) のような細胞表面分子に結合するように構成される標的成分を含む。

【0018】

10

20

30

40

50

FcRn 及び TfR はタンパク質であり、PS はリン脂質であり、それらは体内の多種の細胞タイプの表面上及び内部に見出される場合がある。本発明はこれらの受容体又は細胞表面分子を標的とすることに制限されず、当業者が同定可能な他のものの中でも低密度リポタンパク質受容体、高密度リポタンパク質受容体、アシアロ糖タンパク質受容体、阻害性 (inhibitory) Fc ガンマ受容体、T 細胞受容体、B 細胞受容体、G タンパク質共役受容体、インスリン受容体、グルカゴン受容体、ガラクトース受容体、マンノース受容体、VEGF 受容体、マンノース受容体のような多くの他の標的が包含され得る。他の標的を例えば以下の出版物又はデータベースにおいて同定することができる：Cell surface receptor atlas (Bausch-Fluck, D., Hofmann, A., Bock, T., Frei, A. P., Cerciello, F., Jacobs, A., Moest, H., Omasits, U., Gundry, R. L., Yoon, C., Schiess, R., Schmidt, A., Mirkowska, P., Haertlova, A., Van Eyk, J. E., Bourquin, J.-P., Aebersold, R., Boheler, K. R., Zandstra, P., Wolfscheid, B. (2015) A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas. PLoS One 10:e0121314) 及び the Human protein atlas (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/secretome>)。

## 【0019】

標的成分は中性近辺の pH において  $10 \mu M$  未満の親和性 (解離定数) で細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合することができる。

## 【0020】

従って Seldieg の標的成分は、細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に特異的に結合するように構成されるいずれの型の分子も含むことができる。そのような分子には、タンパク質、タンパク質フラグメント、リボ核酸又はデオキシリボ核酸のようなポリヌクレオチド、ポリペプチド、多糖類、脂質、アミノ酸、ペプチド、糖類ならびに / 或いは本開示を読むと当業者が同定することができる他の小分子又は大分子及び / 又はポリマーが含まれ得る。例えば Seldieg の標的成分は細胞受容体に関するリガンドであるポリヌクレオチドを含むことができる。

## 【0021】

Seldieg は少なくとも 1 つの第 1 の標的成分及び第 2 の標的成分を含むことができ、ここで第 1 の標的成分のタンパク質又はタンパク質フラグメントは第 2 の標的成分のタンパク質又はタンパク質フラグメントと異なる細胞表面受容体又は異なる細胞表面分子に結合することように構成される。

## 【0022】

図 1 に示される通り、Seldieg 20 は細胞 10 の表面上の細胞表面受容体又は他の分子 30 に可逆的に結合する場合がある。細胞外空間 50 に存在する標的抗原特異的抗体 40 は Seldieg 20 に可逆的に結合する場合がある。この結合は典型的に 6.8 より高く且つ 7.5 未満の pH のような中性近辺の pH において起こり、それは、それが細胞外空間 50 の典型的な pH だからである。非標的抗体 60 は Seldieg 20 に結合しないか又はいずれの結合も非特異的であるほど非常に低い親和性で結合する。Seldieg 20 及び標的抗原特異的抗体 40 が結合した細胞表面受容体又は分子 30 は経路 A を介し、エンドソーム 70 中への受容体媒介吸収を介して細胞 10 内に移行する。受容体又は他の分子を細胞の表面に再循環させて戻すことができる。従って経路 B 上で、Seldieg 20 及び標的抗原特異的抗体 40 が結合した受容体又は分子 30 を細胞 10 の表面に循環させて戻す。次いで標的抗原特異的抗体 40 は放出される場合があり、Seldieg 20 から同じ又は別の Seldieg に再結合する場合があるか又はそれは結合したままの場合がある。類似して、Seldieg 20 は次いで受容体又は分子 30 から放出される場合があり、同じ又は別の細胞表面受容体又は分子に再結合する場合がある。いくつかの Seldieg 10

10

20

30

40

50

degsの場合、Seldeg20と抗体40の複合体は、初期又は後期エンドソーム中でこの区画内の酸性のpH又は低いCa<sup>2+</sup>濃度の故に受容体又は他の分子30から解離する場合がある（経路C）。従って、経路Dにおいて受容体又は細胞表面分子は細胞表面に再循環して戻る場合があるが、抗体40に結合したSeldeg20はリソソーム中に入り、経路Eにおいてフラグメント80に分解する。いくつかのSeldegsの場合、細胞10中への移行に続くいくつかの時点に、Seldeg20及び標的抗原特異的抗体40が結合した受容体又は分子30は経路Fにおいて後期エンドソーム/リソソームに入り、そこで少なくとも標的抗原特異的抗体40はフラグメント80に分解する。このリソソーム中の進入は、Seldeg20が受容体又は分子30を二量体又はもっと高次の凝集物に架橋すると増加すると思われる。

10

#### 【0023】

選択的枯渇のこの機構を介し、Seldegは標的とされない特異性の抗体のレベルに不利に影響せずに抗原特異的抗体を標的とし、体から選択的に枯渇させる。

#### 【0024】

特に本明細書に説明されるSeldegは、標的とされない特異性の抗体の枯渇の故の患者における不利な臨床的影響を有することなく、抗原特異的抗体を標的とし、体から選択的に枯渇させることができる。そのような不利な臨床的影響には、例えは免疫抑制ならびに流行性結膜炎、気管支炎、耳感染症、副鼻腔感染症、風邪、下痢、肺炎、カンジダ症、髄膜炎、皮膚感染症及び他の日和見感染症、特に通常は抗体媒介免疫反応を介して抑制される日和見感染症のようなその症状；ならびに低血小板数（low platelet counts）又は貧血のような血液疾患ならびに低ガンマグロブリン血症及び腹痛、鼓張、吐き気、嘔吐、下痢又は体重減少のようなその症状が含まれる。

20

#### 【0025】

一般に本開示に従うSeldegsは、中性近辺のpHにおいて標的成分を介して細胞表面受容体/分子に特異的に結合するように且つ標的成分に直接又は間接的に融合した抗原成分を介して中性近辺のpHにおいて抗原特異的抗体にも特異的に結合するように構成される。本明細書で用いられる「特異的に結合する」という用語は、標的成分と細胞表面受容体/分子の間又は抗原成分と抗原特異的抗体の間の検出可能な選択的分子間相互作用を指す。例えは特異的に結合するため、抗原は標的とされている抗体との検出可能な相互作用を示す必要があり、一方で他の抗体との検出可能な相互作用を示さないことが必要である。特異的な結合の検出法は、ELISA、表面プラズモン共鳴分析及び当業者により同定され得る他の方法のように当該技術分野内で既知である。

30

#### 【0026】

従ってSeldegは、患者の循環中の抗原特異的抗体の少なくとも一部が、標的とされる細胞表面受容体又は標的とされる他の細胞表面分子を発現する細胞中に移行し、その後細胞内で分解することを可能にする。

#### 【0027】

本開示に従うSeldegは、抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の各型の、他の場合に本明細書で「1分子」と呼ばれるSeldeg当たりに1つのコピーを含有することにより免疫反応を避ける場合があり、それはFcガンマ受容体結合及び/又は補体結合を減少させるか又は排除する突然変異の挿入と組み合わされて、抗体架橋及びおそらく炎症性の免疫複合体の形成を減少させると思われる。特にSeldegの少なくとも99%、Seldegsの少なくとも99.5%又はSeldegの少なくとも99.9%は、中性近辺のpHにおいて抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物のSeldeg当たりに1つのコピーのみを含有する場合がある。本開示に従う他のSeldegsは、抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の1つより多い分子を含有することができる。Seldeg分子当たりに1つの抗原の分子を含有するSeldegが結合する抗体の2価性（bivalent nature）は、抗体当たりに2つのSeldeg分子の複合体を生ずる場合があり、それは標的受容体二量化を介してSeldeg-抗体複合体のリソソーム送達の有効性を向上させると思われる。

40

50

## 【0028】

Seldegは少なくとも1つの第1の抗原成分及び第2の抗原成分を含むことができ、ここで第1の抗原成分の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の1分子は第2の抗原成分の抗原分子、抗原フラグメント又は抗原類似物の1分子と異なる。従って少なくとも1つの第1の抗原成分及び第2の抗原成分を含むSeldegsは1つより多い特異性の抗原特異的抗体のクリアランスを可能にする。

## 【0029】

Seldegは少なくとも1つの第1の抗原成分及び第2の抗原成分を含むことができ、ここで第1の抗原成分の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の1分子は第2の抗原成分の抗原分子、抗原フラグメント又は抗原類似物の1分子と同じである。

10

## 【0030】

従ってSeldegsは、例えば標的成分のC末端及び/又はN末端に融合した1つ以上の抗原成分を含むことができ、ここでそれぞれの抗原成分の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物の1分子は同じ又は異なることができる。

## 【0031】

さらにSeldegsは、ヒトに投与する場合のSeldegへの免疫反応の可能性を避けるか又は低下させるために、ヒト又はヒト化タンパク質又はタンパク質フラグメントを含有する場合がある。抗原成分の抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物は、好ましくはヒトへのSeldegの投与のためにヒトタンパク質又はタンパク質フラグメントである。標的成分も、ヒトへのSeldegの投与のために、好ましくはヒト抗体フラグメント又はヒトアルブミン又はアルブミンフラグメントのようなヒトタンパク質又はタンパク質フラグメントあるいはヒト化抗体又はヒト化抗体フラグメントである。Seldegをヒト以外の動物における使用のために開発する場合、その動物に由来するか又はその動物と免疫学的に適合性であるように改変されたタンパク質又はタンパク質フラグメントを代わりに用いる場合がある。

20

## 【0032】

図2Aは、IgGのFcフラグメント110を有する標的成分に融合した抗原100を含むSeldeg20aの活性の略図である。当業者が理解する通り、IgGのFcフラグメントは抗体のY形の基部(lower base)のすべてであり、それはスルフヒドリル架橋ヒンジ領域及びCH2及びCH3ドメインである。Seldegはヒンジ領域を有していないFcフラグメントを有する場合があるか、又はヒンジ領域がスルフヒドリル架橋を有していないFcフラグメントを有する場合がある。Fcフラグメント110はSeldeg20aがFcRn発現細胞上のFcRn分子に結合するのを可能にする。図2Aに示される例において、抗原100はヒンジ-CH2-CH3120のN末端においてFcフラグメント110aに融合する場合がある。抗原100をFcフラグメント110aに融合させ、得られる抗原-Fcフラグメントをノブズイントゥホールズ(knobs - into - holes)戦略(例えばMoore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi, A., Muchhal, U. S., Karki, S., Chu, S. Y., Lazar, G. A., (2011). A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. Mabs 3, 546-557に説明されているような)を用いて抗原のない別のFcフラグメント110bと二量化させると、示されているようなヘテロダイマー的Seldeg分子20aが生産される。Seldeg20aは抗原100がモノマー的に表示されたFcフラグメントを有し、それは炎症又は他の不利な影響を引き起こし得る多量体的免疫複合体の形成を避ける。Fcフラグメント110aに融合した抗原100のみを含むSeldegsが生産され、いくつかの状況において用いられる場合があるが、Fcフラグメントの二量化する傾向の故に、典型的に二量体が生産されるであろう。多量体的免疫複合体の形成に導き得る両方のFcフラグメント110aが融合

30

40

50

抗原 100 を有する Fc フラグメント二量体を避けるために、Seldeggs はノブズイントウホールズ突然変異及び / 又は静電ステアリング突然変異 (electrostatic steering mutations) (例えば Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S. B., Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I. N., Wittekind, M., Yan, W. (2010) Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. *J Biol Chem* 285, 19637-19646 に説明されているような) を

用いてヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って 1 つの抗原が融合した Fc は 1 つしかない。ヘテロダイマーの形成のために、抗原 - Fc 融合体の C 末端と第 2 の Fc フラグメントの N 末端の間ににおける (G4S)13 リンカーベプチドの挿入 (例えば Zhou, L., Wang, H.-Y., Tong, S., Okamono, C.T., Shen, W.-C., Zaro, J.L. (2016) Single chain Fc-dimer-human growth hormone fusion protein for improved drug delivery. *Biomaterials*, 117, 24-31 に説明されているような) のような他の方法を用いることもできる。ノブズイントウホールズ突然変異、静電ステアリング突然変異及び / 又はアルギニン突然変異あるいは Fc ガンマ受容体及び補体結合を減少させる他の突然変異を含む Seldeggs のいくつかの例の DNA 配列及びタンパク質配列を実施例 10 に説明する。

#### 【0033】

ノブズイントウホールズ突然変異の追加の例には、当業者が同定可能な他のものの中でも Y349T / T394F : S364H / F405A 及び Y349T / F405F : S364H / T394F (例えば Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi, A., Mughal, U. S., Karki, S., Chu, S. Y., Lazar, G. A., (2011) A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. *MAbs* 3, 546-557 に説明されているような) ならびに T366W : T366S : L368A / Y407V (例えば Atwell, S., Ridgway, J. B. B., Wells, J. A., Carter, P. (1997) Stabilizing heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J. Mol. Biol.*, 270, 26-35 に説明されているような) が含まれる。これらの代表的なノブズイントウホールズ突然変異の残基のナンバリング (numbering) は、当業者が理解する通り、EU 抗体ナンバリングシステムを指す。

#### 【0034】

静電ステアリング突然変異の追加の例には、当業者が同定可能な他のものの中でも E356K / D399K : K392D / K409D 及び K409D / K370D : D357K / D399K (例えば Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S. B., Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I. N., Wittekind, M., Yan, W. (2010) Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules

10

20

30

40

50

and monovalent IgG. *J Biol Chem* 285, 19637-19646に説明されているような)が含まれる。これらの代表的な静電ステアリング突然変異の残基のナンバリングは、当業者が理解する通り、EU抗体ナンバリングシステムを指す。

【0035】

アルギニン突然変異又はFcガンマ受容体及び補体(C1q)への結合を減少させる他の突然変異の追加の例には、当業者が同定可能な他のものの中でもG236R/L328R(例えばHorton, H. M., Bennett, M. J., Pong, E., Peipp, M., Karki, S., Chu, S. Y., Richards, J. O., Vostiar, I., Joyce, P. F., Repp, R., Dasjaraais, J. R., Zhukosky, E. (2010) Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res.*, 68, 8049-8057; Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi, A., Muchhal, U. S., Karki, S., Chu, S. Y., Lazar, G. A., (2011) A novel bispecific antibody format enables

simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target anatagens. *M Abs* 3, 546-557に説明されているような)、N297A又はN297Q(例えばTao, M-H., Morrison, S. L. (1989) Studies

of aglycosylated chimeric mouse-human IgG: role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.*, 143, 2595-2601; Lux, A., Yu, X., Scanlan, C. N., Nimmerjahn, F. (2013) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcRs. *J. Immunol.*, 190, 4315-4323に説明されているような)、D265A(例えばLux, A., Yu, X., Scanlan, C. N., Nimmerjahn, F. (2013) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcRs. *J. Immunol.*, 190, 4315-4323; Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., Ravetch, J. V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6, 443-446に説明されているような)、L234A/L235A(例えばWins, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W. H. I., Barnes, N., Hogarth, P. M., (2000) The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc RI and Fc RIIa bind

to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein A. *J. Immunol.*, 164, 5313-5318に説明されているような)及びL234A/L235A/P329G(例えばSchlothauer, T., Hertter, S., Koller, C. F., Grau-Richards, S., Steinhardt, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

10

20

30

40

50

and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished effector functions. PEDI 29, 457-466に説明されているような)が含まれる。これらの代表的なアルギニン突然変異又はFcガンマ受容体及び補体(C1q)への結合を減少させる他の突然変異の残基のナンバリングは、当業者が理解する通り、EU抗体ナンバリングシステムを指す。

【0036】

Fc Rの位置及び補体結合部位におけるか又はそれらに近い残基を標的とするFc R及び/又は補体結合を排除する(obliterate)ための他の突然変異を用いることができる。IgGのFc領域上のこれらの部位は位置決定されている(例えばJeffreys, R., Lund, J. (2002) Interaction sites on human IgG-Fc for Fc R: current models. Immunol. Letts., 82, 57-65; Duncan, A.R., Winter, G. (1988) The binding site for C1q on IgG. Nature, 332, 738-740; Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, G., Mulkerrin, M.G. (2000) Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric human antibody with a human IgG1 Fc. J. Immunol., 164, 4178-4184; Hogarth, P.M., Anania, J., Wines, B.D. (2014) The Fc R of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 382, 321-352に説明されている通り)。

【0037】

Seldegsは、ヒトIgG2又はヒトIgG4のようにFcガンマ受容体又は補体に結合しないか又は非常に弱い結合を有する免疫グロブリンのクラス又はイソタイプに由来するFcフラグメントを含む場合がある。

【0038】

診断用画像化のようないくつかの用途のために、Seldegsは、Seldieg中に存在する抗原に対する炎症反応を向上させるためにFcガンマ受容体及び/又は補体に関する結合部位を有するFcフラグメントを含む場合がある。

【0039】

Fcフラグメント110を、非修飾Fcフラグメントと比較して中性近辺のpHにおけるFcRnに関するその結合親和性を実質的に向上させるように修飾する場合がある。例えば6.8より高く且つ7.5未満のpHにおけるFcフラグメント110とFcRnの間の解離定数は、表面プラズモン共鳴又は他の生物物理学的方法により決定されると10μM未満の場合がある。しかしながら、Fcフラグメント110は酸性のエンドソームpH(約6.0)において非修飾Fcフラグメントと比較して類似か又は向上したFcRnに関する親和性を有する場合があるか、又はそれを非修飾Fcフラグメントと比較してエンドソームpHにおけるFcRnに関するずっと低いか又は無視し得る結合親和性を有するように修飾する場合がある。中性近辺のpHにおけるこの結合親和性における向上は、それぞれのSeldiegがその結合した標的抗原特異的抗体を有效地に移行させ、FcRn発現細胞中の後期エンドソーム又はリソソーム中に輸送することを可能にする。FcRnに関するFcフラグメントの結合親和性の強化は、突然変異の挿入により達成される場合がある。天然に存在するIgGsは、中性近辺のpHと反対に酸性のpHレベルにおいてFcRnに関する実質的により高い結合親和性を有する。この性質は、FcRn発現細胞

10

20

30

40

50

内における IgG の再循環及び輸送のために必須である。対照的に、pH 7.4 における FcRn に関する結合親和性の向上は、例えば細胞中への受容体媒介移行及びリソソーム送達を生ずる。

【0040】

Fc フラグメント 110 を修飾して、Fc ガンマ受容体及び補体 (C1q) に関する結合親和性を取り除くか又は実質的に低下させる場合もある。この修飾は、多量体的免疫複合体の形成により引き起こされる炎症反応を予防する。例えば実施例 10 に説明する通り、Fc 領域を、本明細書で「アルギニン突然変異」とも呼ばれる突然変異をさせてそれらが Fc ガンマ受容体に結合しないようにすることができる (G236R / L328R ; EUナンパリング) (例えば Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi A., Muchhal, U. S. Karki, S., Chu, S. Y., Lazar, G. A. (2011). A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. Mabs 3, 546-557 に説明されている通り) (EUナンパリング)。実施例 10 において、これらの突然変異は Fc-Syt1 の残基 22 及び 114 (配列番号 10 を参照されたい) ならびに MOG-Seldeg-PS の残基 144 及び 236 (配列番号 8 を参照されたい) に相当する。Fc ガンマ受容体及び補体への結合を実質的に低下させるか又は排除する他の突然変異の例には、当業者が同定可能な他のものの中でも N 297A 又は N 297Q (EUナンパリング; 例えば Tao, M.-H., Morrison, S. L. (1989) Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG: role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. J. Immunol., 143, 2595-2601; Lux, A., Yu, X., Scanlan, C. N., Nimmerjahn, F. (2013) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcRs. J. Immunol., 190, 4315-4323 に説明されているよう)、D265A (EUナンパリング; 例えば Lux, A., Yu, X., Scanlan, C. N., Nimmerjahn, F. (2013) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcRs. J. Immunol., 190, 4315-4323; Clynes, R. A., Powers, T. L., Presta, L. G., Ravetch, J. V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. Nat. Med., 6, 443-446 に説明されているよう)、L234A / L235A (EUナンパリング; 例えば Wins, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W. H. I., Barnes, N., Hogarth, P. M. (2000) The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc RI and Fc RIIa bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein. A. J. Immunol., 164, 5313-5318 に説明されているよう)、L234A / L235A / P329G (EUナンパリング; 例えば Schlothauer, T., Hertel, S., Koller, C. F., Grau-Richards, S., Steinhardt, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1 a 10 20 30 40 50

nd IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished effector functions. PEDS, 29, 457-466に説明されているような)が含まれる。Fcガンマ受容体に関する結合親和性における少なくとも10分の1への低下(reduction of at least 10-fold)が好ましい。

【0041】

図2Bに示す通り、Seldeg20bにおいて抗原100は別の末端位置においてFcフラグメント110aに結合する場合があるか又は図2Cに示す通り、Seldeg20cにおいて抗原100は非末端位置で結合する場合がある。特異的なFcRn結合を妨げないいずれの位置も適している。そのような位置には、当業者が同定可能である通り、直接又は立体的にFcRn結合を遮断しないようにFcRn相互作用部位(CH2-CH3ドメイン境界面における残基252-256、309-311、433-436を包含する; EUナンバリング)から十分に遠いアミノ酸残基が含まれる。

10

【0042】

化学反応を介する結合、リンカーを介する結合又は1つの組み合わされた抗原-Fcフラグメントタンパク質の形成の間を含むいずれかの適した方法で抗原100をFcフラグメント110に融合させる場合がある。用いることができる化学結合の例は:アミンからアミン(amine-to-amine)(NHSエステル)、スルフヒドリルからスルフヒドリル(マレイミド)、アミンからスルフヒドリル(NHSエステル/マレイミド)、スルフヒドリルから炭水化物(マレイミド/ヒドラジド)又は所望の化学反応性を有する非天然アミノ酸を介する結合である。この非天然アミノ酸をFcフラグメント及び/又は抗原の組換え体生産の間に挿入することができる。ポリエチレングリコール(PEG)スペーサーを化学的に共役したタンパク質、タンパク質フラグメント又は他の分子の間に挿入することもできる。可能なリンカーにはグリシン-セリンリンカーペプチド又は他のもっと硬い(rigid)リンカーペプチドの反復が含まれ、それは抗原-Fc融合のための組換え体発現プラスミド中でコードされる。連結の化学、連結の部位及びペプチドの選択は分子モデリングにより導かれ得、当業者が理解する通り、抗原又は細胞表面分子を標的とするタンパク質/タンパク質フラグメントの結合活性の損失を最小にするように設計されることができる。

20

【0043】

30

図2Dは、抗原100が抗体可変領域130に結合しているSeldeg20dの略図である。抗体可変領域130は細胞表面受容体又は細胞表面分子に特異的に結合する。抗体可変領域130は、それが細胞表面受容体又は細胞表面分子に特異的に結合する限り、可変領域全体又はそのフラグメントの場合がある。抗体可変領域130は、細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するように構成されている抗体の非可変領域の部分を含む場合がある。例えば抗体可変領域130はシングルドメイン抗体(single-domain antibody)(sdAb)又はラクダ由来VHHドメイン(通常ナノボディーとも呼ばれる)の場合がある。そのような可変領域は2つの逆平行シートを含む免疫グロブリンドメインの全体的な折り畳み(overall fold)を有し、且つ当業者が同定可能な他のものの中でもT細胞受容体可変ドメイン、抗体の定常領域ドメイン又は補助受容体、CD4のドメインのような免疫グロブリンスープラファミリーの他のメンバーからのドメインも含むことができる。抗体可変領域130は図2Dに示す通りモノマーとして又は多量体として存在する場合がある。例えば抗体可変領域130がナノボディーとして存在する場合、第1のナノボディーのC末端と第2のナノボディーのN末端の間にGSSGGSGGGGSのようなリンカーペプチドを用いてそれを改変して二量体を形成し、標的受容体/分子に関する結合活性を向上させる場合がある。抗体可変領域130がナノボディー又は多量体を形成するように改変された別のタンパク質である場合、ちょうどFcフラグメントを含有するSeldeg5に関して上記に説明した通りに、多量体が抗原100の1つのコピーのみを含有するように、Seldeg形成の間に抗原100のない変異体を含ませる場合がある。抗体可変領域は、ペプチドリンカーにより軽鎖可変(

40

50

V L ) ドメインに連結された重鎖可変 ( V H ) ドメインのヘテロダイマーを含むこともでき、s c F v フラグメントを形成する。V H 及びV L ドメインを連結するために用いられるリンカー配列は当業者に周知であり、V H ドメインのC 末端をV L ドメインのN 末端に連結する G G G G S G G G G S G G G G S [ ( G 4 S ) 3 ] 配列を含む。いくつかの態様において、類似のリンカー配列を用いてV L ドメインのC 末端をV H ドメインのN 末端に連結することができる。細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合する s c F v s は、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ又は他の抗体ディスプレイ法を用いて s c F v s のライプラリから単離され得る。Seldegの標的タンパク質成分は、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイなどを用いて F a b フラグメントのライプラリから単離され得る抗体の F a b フラグメントを含むこともできる。ナノボディー、s c F v s 及び F a b フラグメントのために、相補性決定領域 ( C D R s ) 中の残基をランダムに突然変異させるか、又はエラープローンポリメラーゼ連鎖反応を用い、突然変異したナノボディー又は可変ドメインのライプラリを形成することにより細胞表面受容体又は細胞表面分子への結合に関する親和性を向上させることができる。標的とされる代表的な C D R 残基は軽鎖可変ドメインの C D R 3 ( 残基 89 - 97 ; Kabat ナンバリング ) 及び重鎖可変ドメインの C D R 3 ( 残基 95 - 102 ; Kabat ナンバリング ) 中のものである。これらのライプラリをファージ又は酵母上に表示し ( display ) 、当業者に既知の方法を用いて親和性がより高い変異体を選択することができる。

#### 【 0 0 4 4 】

図 2 D は抗体可変領域 130 の末端位置における抗原 100 を示しているが、それは代わりに非末端位置にある場合もある。抗原 100 は、化学結合を介する結合、リンカーを介する結合又は 1 つの組み合わされた抗原 - 抗体可変領域融合タンパク質の形成の間を含むいずれかの適した方法で抗体可変領域 110 に融合する場合がある。

#### 【 0 0 4 5 】

Seldeg は、抗体又は抗体フラグメント以外のタンパク質を含む標的成分に融合した抗原成分を含有する場合もあり、但しこのタンパク質は細胞表面受容体又は他の細胞表面分子に結合するように構成される。例えば図 2 E に示す通り、Seldeg 20e は F c R n に結合することができるアルブミン又はアルブミンフラグメント 140 に融合した抗原 100 を含む。アルブミン又はアルブミンフラグメントを、それが向上した親和性で F c R n に結合するように突然変異させるか又は修飾する場合がある。例えばエラープローン P C R を用いて ( ヒト血清 ) アルブミンの F c R n 結合ドメイン ( D I I I ) 中に突然変異を挿入し、続いて突然変異したアルブミン変異体のライプラリを酵母又はファージ上に表示し、親和性がより高い変異体を選択することができる。あるいはまた、アルブミン : F c R n 境界面におけるか又はその近辺の残基を突然変異させ、結合親和性が向上したアルブミン変異体を選択するか又はそれに関してスクリーニングすることにより、親和性がより高い変異体を生むことができる。図 2 E はアルブミン又はアルブミンフラグメント 140 の非末端位置における抗原 100 を示しているが、それは代わりに末端位置にある場合もある。抗原 100 は、化学結合を介する結合、リンカーを介する結合又は 1 つの組み合わされた抗原 - F c R n 結合タンパク質の形成の間を含むいずれかの適した方法でアルブミン又はアルブミンフラグメント 140 に融合する場合がある。

#### 【 0 0 4 6 】

図 2 F は、F c フラグメント 150 のN 末端に結合した抗原 100 を含む代表的な Seldeg 20f の略図である。図 2 F に示す例において、細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメント 160 が F c フラグメント 150 a のC 末端に結合している。例えばタンパク質又はタンパク質フラグメントはホスファチジルセリン ( P S ) に結合するシナプトタグミンの C 2 A ドメインの場合がある。F c フラグメント 150 を向上した親和性で F c R n に結合するように改変することができ、且つそれが F c ガンマ受容体及び補体に非常に低いか又は検出可能でない結合親和性で結合するように突然変異させる場合がある。融合した抗原 100 を有する F c フラグメント 150 a を 2 つ有する F c フラグメントホモダイマーは多量体的免疫複合体の形成に導き得、

10

20

30

40

50

それを避けるために、図 2 F に示す S e l d e g s はノブズイントゥーホールズ及び / 又は静電ステアリング突然変異を用い、ヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って 1 つの F c - 抗原を有する F c は 1 つだけある。図 2 F において、F c フラグメント 150 a 及び 150 b の両方がそれらに融合したタンパク質又はタンパク質フラグメントを有し、それは細胞表面タンパク質又は他の細胞表面分子に結合する；あるいはまた、1 つのみのそのようなタンパク質又はタンパク質フラグメントが存在する場合がある。図 2 G に示す代表的な S e l d e g において、抗原 100 及び細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメント 160 はそれぞれ F c フラグメント 150 a 及び 150 b の C 末端及び N 末端に融合し、S e l d e g 20 g を形成している。

【0047】

10

図 2 H は、細胞表面タンパク質又は細胞表面分子に結合する抗体 170 の C 末端に結合した抗原 100 を含む代表的な S e l d e g 20 h の略図である。抗体中の F c フラグメント ( F c ) を向上した親和性で F c R n に結合するように改変することができ、それが F c ガンマ受容体及び補体に非常に低いか又は検出可能でない結合親和性で結合するように突然変異させる場合がある。多量体的免疫複合体の形成に導き得る両方の F c フラグメントに抗原 100 が融合した抗体ホモダイマーを避けるために、図 2 H に示す S e l d e g s はノブズイントゥーホールズ及び / 又は静電ステアリング突然変異を用い、ヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って抗原 100 が結合した抗体重鎖は抗体分子当たりに 1 つだけある。抗体の両方の F a b フラグメントは同じ細胞表面タンパク質又は他の細胞表面分子に結合する場合があるか、あるいはまたそれらは 2 種類以上の細胞表面タンパク質又は分子に結合することができる。

【0048】

20

図 2 I は、細胞表面タンパク質又は細胞表面分子に結合する s c F v ( 180 ) - F c 融合体の C 末端に結合した抗原 100 を含む代表的な S e l d e g 20 i の略図である。抗体中の F c フラグメント ( F c ) を向上した親和性で F c R n に結合するように改変することができ、それが F c ガンマ受容体及び補体に非常に低いか又は検出可能でない結合親和性で結合するように突然変異させる場合がある。多量体的免疫複合体の形成に導き得る両方の F c フラグメントに抗原 100 が融合した抗体ホモダイマーを避けるために、図 2 I に示す S e l d e g s はノブズイントゥーホールズ及び / 又は静電ステアリング突然変異を用い、ヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って抗原 100 が結合した抗体重鎖 - s c F v 融合体は分子当たりに 1 つだけある。抗体の両方の s c F v フラグメントは同じ細胞表面タンパク質又は他の細胞表面分子に結合する場合があるか、あるいはまたそれらは 2 種類以上の細胞表面タンパク質又は分子に結合することができる。

30

【0049】

図 2 J は、細胞表面タンパク質又は細胞表面分子に結合する - F c - s c F v ( 180 ) 融合体の N 末端に結合した抗原 100 を含む代表的な S e l d e g 20 j の略図である。抗体中の F c フラグメント ( F c ) を向上した親和性で F c R n に結合するように改変することができ、それが F c ガンマ受容体及び補体に非常に低いか又は検出可能でない結合親和性で結合するように突然変異させる場合がある。多量体的免疫複合体の形成に導き得る両方の F c フラグメントに抗原 100 が融合した抗体ホモダイマーを避けるために、図 2 J に示す S e l d e g s はノブズイントゥーホールズ及び / 又は静電ステアリング突然変異を用い、ヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って抗原 100 が結合した抗体重鎖 - s c F v 融合体は分子当たりに 1 つだけある。抗体の両方の s c F v フラグメントは同じ細胞表面タンパク質又は他の細胞表面分子に結合する場合があるか、あるいはまたそれらは 2 種類以上の細胞表面タンパク質又は分子に結合することができる。

40

【0050】

図 2 K に示す通り、代表的な S e l d e g 20 k において 2 つの抗原成分 ( 100, 190 ) が標的成分、例えば F c フラグメント 110 a 及び F c フラグメント 110 b に N 末端又は他の位置で結合し、異なる特異性の抗原特異的抗体をクリアランスすることができる S e l d e g を形成する場合がある。図 2 K に示す S e l d e g s は、ノブズイント

50

ウーホールズ及び／又は静電ステアリング突然変異を用い、ヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って各 *Se1deg* 分子中にそれぞれの型の抗原分子 (100, 190) がある。

#### 【0051】

図2LはFcフラグメント150のN末端に結合した抗原100及び抗原190を含む代表的な *Se1deg* 201の略図である。図2Lに示す代表的な態様において、細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメント160はFcフラグメント150a及び150bのC末端に結合している。図2Lに示す *Se1deg* sは、ノブズイントゥーホールズ及び／又は静電ステアリング突然変異を用い、ヘテロダイマー形成を促進するように設計され、従って各 *Se1deg* 分子中にそれぞれの型の抗原分子 (100, 190) がある。図2Lにおいて、Fcフラグメント150a及び150bの両方はそれらに融合したタンパク質又はタンパク質フラグメントを有し、それは細胞表面タンパク質又は他の細胞表面分子に結合するが、他の態様において、1つのみのそのようなタンパク質又はタンパク質フラグメントが存在する場合がある。

10

#### 【0052】

図2Mに示す通り、代表的な *Se1deg* 20mにおいて同じ抗原 (100) の2つの分子がFcフラグメント200にN末端又は他の位置において結合し、代表的な *Se1deg* 20mを形成する場合がある。この代表的な *Se1deg* sはFcRnへの結合を強化する突然変異を含有するホモダイマーであり、ノブズイントゥーホールズ及び／又は静電ステアリング突然変異を含有しない。

20

#### 【0053】

図2NはFcフラグメント210のN末端に結合した同じ抗原 (100) の2つの分子を含む代表的な *Se1deg* 20nの略図である。図2Nに示す代表的な態様において、細胞表面受容体又は細胞表面分子に結合するタンパク質又はタンパク質フラグメント160はFcフラグメント210のC末端に結合している。この代表的な *Se1deg* sはホモダイマーであり、ノブズイントゥーホールズ及び／又は静電ステアリング突然変異を含有しない。図2Nにおいて、ホモダイマー的Fcフラグメント200は両方のポリペプチド鎖に融合したタンパク質又はタンパク質フラグメントを有し、それらは細胞表面タンパク質又は他の細胞表面分子に結合するが、他の態様において1つのみのそのようなタンパク質又はタンパク質フラグメントが存在する場合がある。

30

#### 【0054】

FcRnを標的とする *Se1deg* sのために、類似の原理をFcRnに結合することができる他のタンパク質に適用する場合がある。さらに、FcRn標的化 *Se1deg* s又はその形成方法はFcRn結合タンパク質の性質により影響される場合がある。アルブミンは二量体又は他の多量体を形成しない傾向があるが、他のFcRn結合タンパク質は形成する場合があり、その場合には各 *Se1deg* sが抗原の1つだけのコピーを含有するように抗体フラグメントを含有する方法に類似の方法で最終的な *Se1deg* sを形成する場合がある。図2A、2B、2C、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2Lに示す例において、*Se1deg* sはノブズイントゥーホールズ及び／又は静電ステアリング突然変異を用いて、1つのFcフラグメントに連結した1つの抗原を含み、1つのFcフラグメントに抗原が結合していないヘテロダイマーの形成を促進する (drive) ように改変された2つの抗体Fcフラグメントを有する。Fcフラグメントをさらに中性近辺のpHにおいて向上した親和性でFcRnに結合するように改変することができるか (図2A、2B、2C、2K、2M)、又は1つ以上の細胞表面受容体若しくは分子を標的とする1つ以上のタンパク質、scFvフラグメント、Fabフラグメント又は他の分子に連結することができる (図2F、2G、2H、2I、2J、2L、2N)。図2F、2G、2H、2I、2J、2L、2Nに示す例におけるFcフラグメントを、より高い親和性でFcRnに結合するように改変し、それらがFcRn及び1つ以上の細胞表面受容体又は分子の両方を標的とするようにすることもできる。

40

#### 【0055】

50

アルブミンは酸性の pH において中性の pH におけるより強く F c R n に結合する。しかしながらアルブミンを修飾して中性近辺の pH 又はエンドソーム pH におけるその結合親和性を変え、標的抗原特異的抗体の分解及び S e 1 d e g の再循環を促進することもある。類似して、抗体可変領域 F c R n 結合タンパク質はそのタンパク質に特異的なやり方で pH により影響を受ける場合があるが、それでもそれらを修飾して中性近辺の pH 又はエンドソーム pH におけるその結合親和性を変え、標的抗原特異的抗体の分解を促進する場合がある。これらの F c R n 結合タンパク質は免疫グロブリン可変ドメイン、s c F v ( V H と V L ドメインが G G G G S G G G G S G G G G S のようなリンカーペプチドにより互いに連結されている V H : V L ヘテロダイマー ) 又は F a b フラグメントのライプラリから、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ又は当業者に既知の他の方法を用いて単離され得る。これらのライプラリは天然に存在する抗体可変遺伝子に由来することができるか、又は相補性決定領域 ( C D R s ) がランダム化オリゴヌクレオチド配列を用いて作られる「半合成」ライプラリを生ずる方法を用いて作成され得る。さらなるそれらの親和性の向上を、例えばエラープローン P C R を用いて C D R s にランダム突然変異を挿入し、続いてファージディスプレイ又は酵母ディスプレイを用いて選択することにより達成することができる。標的とされる代表的な C D R 残基は軽鎖可変ドメインの C D R 3 ( 残基 8 9 - 9 7 ; K a b a t ナンバリング ) 及び重鎖可変ドメインの C D R 3 ( 残基 9 5 - 1 0 2 ; K a b a t ナンバリング ) 中のものである。類似の方法を用い、他の細胞表面受容体 / 分子に結合する抗体に基づくタンパク質又は足場 ( s c a f f o l d ) に基づくタンパク質を単離することができる。

10

20

#### 【 0 0 5 6 】

S e 1 d e g s は細胞表面上の受容体又は他の分子に特異的に結合するように構成されるいすれかの標的成分を含む場合もある ( 図 2 D 、 2 E 、 2 F 、 2 G 、 2 H 、 2 I 、 2 J 、 2 L 又は 2 N ) 。標的成分を直接又は間接的に ( 例えばリンカーを介して ) 、抗体媒介架橋を減少させるために抗原、抗原フラグメント又は抗原類似物のそれぞれの型の 1 分子を有する抗原成分に融合させる。本明細書で用いられる「抗原の型」という用語は、特異的な抗体に結合する抗原を指す。従って S e 1 d e g は 1 つより多い抗原の型を含むことができ、ここで各 S e 1 d e g はそれぞれの抗原の型の 1 分子のみを有する。標的タンパク質が免疫グロブリン由来 F c フラグメントを含有する場合、F c 領域を、それが F c ガンマ受容体及び補体に結合しないか又は実質的に低下したレベルで結合するように突然変異させることができる。S e 1 d e g s のいくつかの異なる可能な構成を図 2 A - N に示す ; 多数の他の構成も当業者により構想され得るので、これらは例として示され、制限ではない。

30

#### 【 0 0 5 7 】

S e 1 d e g s は F c ガンマ受容体及び補体に結合する F c フラグメントを含む場合がある。F c ガンマ及び補体結合部位の存在は、特定の用途分野の状況下で、S e 1 d e g 中の抗原に対する免疫反応が望まれる場合 ( 例えば腫瘍画像化において ) に望ましい場合がある。そのような用途において、F c ガンマ受容体及び補体に結合するように構成される S e 1 d e g s が好ましい場合がある。例えばアルギニン突然変異のような、本明細書に説明される F c ガンマ受容体及び / 又は補体 ( C 1 q ) に関する結合親和性が低下したか又は結合親和性を有さないための改変された突然変異がない F c フラグメントを含む S e 1 d e g s を、そのような免疫反応を引き出すように構成する場合がある。F c ガンマ受容体及び / 又は補体 ( C 1 q ) への結合を向上させるための当業者に既知の突然変異を有する F c フラグメントを含む S e 1 d e g s を、そのような免疫反応を引き出すように構成する場合もある。そのような S e 1 d e g s を、S e 1 d e g 当たりに 1 つより多い同じ型の抗原分子を含むように構成し ( 図 2 K 、 2 L 、 2 M 又は 2 N ) 、免疫複合体形成を強化する場合もある。

40

#### 【 0 0 5 8 】

例えば S e 1 d e g s は標的ドメイン又は抗体フラグメント ( 例えば F a b フラグメント又は s c F v フラグメント ) の数が変動させることができ、それは 1 - 3 個の標的ドメ

50

イン又は抗体フラグメントの範囲である(図2)。これらの標的ドメイン又は抗体フラグメントを免疫グロブリンFcフラグメントに連結することができるが、他の場合、標的ドメイン又は抗体フラグメントを互いに連結する場合がある；抗原及び抗体フラグメントをFcフラグメントに又は互いに、種々の向き(orientation)で融合させることができる(図2)；Seldeggsはリンカー配列を含むことができ、それは融合タンパク質の間で長さ及び組成においてさまざまであり、ドメイン又はフラグメント、例えばIEGRMD、GGGGS又はこのリンカーの2-3個の反復を用いることができる；小分子又はペプチドのような抗原類似物を用いることができる；Seldeggs中のFcフラグメントを、それがFcガンマ受容体、補体に関する実質的に低下した結合親和性及びFcRnへの結合に関する向上した親和性を有するように突然変異させる場合がある；SeldegのFcフラグメントは、抗原連結Fcフラグメントと非抗原連結Fcフラグメントのヘテロダイマー又は2種類の抗原を含有するヘテロダイマーが形成されるように、ノブズイントゥーホールズ及び/又は静電ステアリング突然変異のような突然変異を有する場合がある。

#### 【0059】

Seldeggsは、自己免疫性脳炎を含む自己免疫疾患と関連するタンパク質、糖タンパク質及び核酸を含む以下の抗原を含むことができる：当業者が同定可能な他のものの中でもミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリン関連糖タンパク質、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質、トランスアルドラーゼ、アセチルコリン受容体、筋特異的キナーゼ、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質4、インスリン、膵島抗原2、グルタミン酸デカルボキシラーゼ65、亜鉛トランスポーター8、シトルリン化抗原、カルバミル化抗原、コラーゲン、軟骨gp39、gp130-RAPS、65kDa熱ショックタンパク質、フィブリラリン、小核タンパク質(snORNP)、アクアポリン4、甲状腺刺激因子受容体、核抗原、DNA、ヒストン、糖タンパク質gp70、リボソーム、ピルビン酸デヒドロゲナーゼデヒドロリオアミドアセチルトランスフェラーゼ、毛包抗原、ヒトトロポミオシンイソフォーム5、N-メチル-D-アスパルテート(NMDA)受容体、-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸(AMPA)受容体、GABA<sub>A</sub>及びGABA<sub>B</sub>受容体、グリシン受容体、ジペプチジル-ペプチダーゼ様タンパク質6(DPPX)、グルタメート受容体(GluR5)、電位依存性カリウムチャンネル、Hu、甲状腺ペルオキシダーゼ、チログロブリン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)受容体、甲状腺ホルモンT3及びT4、デスマグレイン1及び3。以下の抗原は腫瘍と関連する抗原の例であり、診断用画像化の間に腫瘍特異的抗体をクリアランスするためにSeldeggs中に導入され得る：HER2、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺幹細胞関連抗原(PSCA)、c-Met、EpCAM、癌胎児性抗原(CEA)。他の抗原には、患者が特異的な抗体を有している治療薬又は移植片受容者中の抗体が認識する移植抗原が含まれる。さらに、抗原の分子類似物(合成、タンパク質フラグメントなど)を作製することが可能であり、これらをSeldeggsの作製に用いることもできる。上記の抗原は例であり、本開示を読んで当業者が同定し得る追加の型の可能な抗原を制限していない。

#### 【0060】

本明細書に説明するいくつかの例において、Seldegは配列番号2プラス配列番号6、配列番号4プラス配列番号6、配列番号8プラス配列番号10、配列番号12プラス配列番号14、配列番号16プラス配列番号18プラス抗体軽鎖配列番号20、配列番号22プラス配列番号24プラス抗体軽鎖配列番号20、配列番号26プラス配列番号28、配列番号30プラス配列番号6、配列番号32プラス配列番号6又は配列番号34プラス配列番号6又はそれらの相同体のアミノ酸配列を含む融合タンパク質のヘテロダイマーであることができる。

#### 【0061】

Seldegは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、

10

20

30

40

50

配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2 又は配列番号 3 4 と少なくとも 5 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合タンパク質であることができる。

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書で用いられる場合、2 つの核酸又はポリペプチド配列の状況における「配列同一性」又は「同一性」は、特定される比較ウィンドウ ( comparison window ) にわたって最大対応 ( maximum correspondence ) に関して並べられると同じである 2 つの配列におけるヌクレオチド塩基又は残基を指す ( make reference )。タンパク質への言及において配列同一性又は類似性のパーセンテージが用いられる場合、同一でない残基の位置は多くの場合に同類アミノ酸置換により異なることが認識され、同類アミノ酸置換ではアミノ酸残基が類似の物理化学的性質を有するアミノ酸残基の機能的に等価の残基で置換され、従って分子の機能的性質を変化させない。

10

#### 【 0 0 6 3 】

本明細書で用いられるアミノ酸の機能的に等価の残基は、典型的に最初のアミノ酸に実質的に類似の物理化学的及び立体化学的特性を有する他のアミノ酸残基を指す。物理化学的性質には水溶性 ( 疎水性又は親水性 ) 、誘電的及び電気化学的性質、生理学的 pH 、側鎖の部分的電荷 ( 正、負又は中性 ) 及び当業者が同定可能な他の性質が含まれる。立体化学的特性にはアミノ酸の空間的及びコンフォーメーション的配置ならびにそれらのキラリティーが含まれる。例えばグルタミン酸は本開示の意味においてアスパラギン酸に機能的に等価の残基であると考えられる。チロシン及びトリプトファンはフェニルアラニンに機能的に等価の残基と考えられる。アルギニン及びリシンはヒスチジンに機能的に等価の残基と考えられる。

20

#### 【 0 0 6 4 】

当業者は、典型的に 2 つのポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を並べて整列配列 ( aligned sequences ) を形成し、次いで 2 つの整列配列の間で一致する文字、すなわち類似又は同一の文字の数を検出し、ギャップ ( gaps ) を含む各ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列中の整列文字の合計数で割られる一致する文字の合計数を計算する段階を含む方法により、配列間の類似性が測定されることを理解するであろう。類似性の結果は同一性のパーセンテージとして表される。

30

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書で用いられる場合、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウに及ぶ 2 つの最適整列配列の比較により決定される値を意味し、ここでポリヌクレオチド配列の比較ウィンドウ中の部分は 2 つの配列の最適整列のための参照配列 ( 付加又は欠失を含まない ) と比較して付加又は欠失 ( ギャップ ) を含む場合がある。パーセンテージは、両配列中に同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して一致する位置の数を与え、一致する位置の数を比較のウィンドウ中の位置の合計数で割り、結果を 1 0 0 倍して配列同一性のパーセンテージを与えることにより計算される。

40

#### 【 0 0 6 6 】

本明細書で用いられる場合、「参照配列」は配列比較のための基礎として用いられる定義された配列である。参照配列は、例えば全長タンパク質又はタンパク質フラグメントの切片として特定される配列のサブセット又は全体の場合がある。参照配列は、例えば G en Bank 及び UniProt 及び当業者が同定可能な他のデータベースのようなデータベースにおいて同定され得る配列の場合がある。

40

#### 【 0 0 6 7 】

当業者が理解する通り、いずれの 2 つの配列間のパーセント同一性の決定も、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。配列同一性の決定のための配列の比較のために、適した数学的アルゴリズムのコンピューターインプリメンテーションを用いることができる。そのようなインプリメンテーションには：当業者が同定可能な他のものの中でも C L

50

U S T A L、A L I G N、G A P、B E S T F I T、B L A S T、F A S T A が含まれるがこれらに限られない。

【 0 0 6 8 】

例えば本開示に従う S e l d e g s は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 又は配列番号 8 又は配列番号 10 又は配列番号 12 又は配列番号 14 又は配列番号 16 又は配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32 又は配列番号 34 に比較して少なくとも 50 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 90 %、最も好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することができる。

【 0 0 6 9 】

S e l d e g s が標的とする抗原特異的抗体は、当業者が同定可能な他のものの中でも患者中に存在する自己抗体、治療薬に結合する抗体、移植片を認識する抗体及び診断用画像化において用いられる修飾された（例えば放射性標識された）抗体又はフラグメント／改变された形態の場合がある。

【 0 0 7 0 】

下記の実施例に示す通り、S e l d e g s はそれらの融合した抗原に関する特異性を有する標的抗原特異的抗体、例えば標的抗原特異的抗体 H E R 2 - 特異的トラスツズマブ (trastuzumab) 又はペルツズマブ (pertuzumab) ("T Z B" 又は "P Z B") 及び M O G 特異的抗体 ("8 - 1 8 C 5") を選択的に枯渇させることができる。下記の実施例に示す通り、全体的な I g G レベルに負の影響を与えるか又は不利な免疫反応を引き出すことなく、標的抗原特異的抗体を選択的に枯渇させることができる。これらの発見は、処置が F c R n 阻害剤又は B 細胞を破壊する抗体の使用を介して全体的な I g G s の枯渇を生ずる他の方法と対照的である。そのような方法は、それらが S e l d e g s により与えられる選択性を欠いているために、標的とされない特異性の抗体又は B 細胞機能に不利に影響する。

【 0 0 7 1 】

この独特の選択性に基づき、S e l d e g プラットフォームは多くの用途を有し、それは多くの他の標的タンパク質及び抗原を有する S e l d e g s が作製される場合があるからである。そのような用途の例には自己免疫疾患の処置、移植前又はその間の抗体媒介拒絶の処置、腫瘍の全身画像化の間のコントラストの向上（例えば追加の S e l d e g s の開発のために抗原として腫瘍抗原 P S M A、E p C A M 及び C E A が用いられる場合がある）、投与後に不利な反応が観察された場合の特定の生物学的製剤の体濃度の枯渇、治療薬の送達の前の治療薬を認識する抗体をクリアランスするための抗体のクリアランスが含まれる。

【 0 0 7 2 】

S e l d e g s は、注射、特に静脈内、皮下若しくは筋肉内注射あるいは枯渇させられるべき抗原特異的抗体が標的とする組織中への注射を介するような、標的とされている細胞表面上の受容体又は他の分子を発現する細胞にそれらを送達できるいざれかの方法で投与される場合がある。S e l d e g s をコードする発現構築物を含有するように遺伝子改变された細胞において S e l d e g s を発現させることもできる。特に、遺伝子改变された細胞からその場で S e l d e g s を分泌することを可能にするタンパク質又はペプチドを含む S e l d e g タンパク質をコードする発現構築物を導入することにより、細胞を遺伝子改变することができる。例えば S e l d e g s をコードする発現構築物を用いて患者由来の細胞をトランスフェクションし、トランスフェクションされた細胞をキメラ抗原 - 受容体 (C A R) T 細胞治療に関して説明されている方法に類似の方法を用いて患者内に送達して戻すことができる。発現構築物は当業者に既知の発現ベクターを含み、例えば M O G - S e l d e g をコードする遺伝子（配列番号 1 及び 5）を、成熟 M O G - S e l d e g (配列番号 1) 及び F c (配列番号 5) に関するコード配列の 5' 末端に連結した免疫グロブリン遺伝子に由来するもののような分泌リーダーペプチドと一緒に含有する場合がある。

10

20

30

40

50

## 【0073】

Seldegsは、すべての標的とされる受容体／細胞表面分子を遮断せず、細胞表面受容体／分子の正常な機能を可能にする量で投与される場合がある。用いられるSeldegの用量は、クリアランスのために標的とされている抗体の量に類似している場合があり、それは例えば抗体媒介疾患の詳細(specifics)又はSeldegsが診断用画像化においてコントラストの向上ために用いられているかどうかに依存するであろう。用いられるSeldegの量は標的とされている受容体の型の合計数未満であると思われ、標的とされる受容体の正常な機能は不利に影響されない。さらに、例えばIgG結合部位と重ならない部位でFcRnに結合するナノボディー(VHH)を用いることにより、Seldegsを、それらが細胞表面受容体又は細胞表面分子の自然のリガンドと結合に関して競争しないように設計することができる(例えばAndersen, J. T., Gonzalez-Pajuelo, M., Foss, S., Landsverk, O. J. B., Pinto, D., Szyroki, A., de Haard, H. J., Saunders, M., Vanlandshoot, P., Sandlie, I. (2012) Selection of nanobodies that target human neonatal receptor. Sci. Rep., 3, 1118に説明されている通り)。さらにSeldegsは循環中又は枯渇させられるべき抗原特異的抗体が標的とする組織中の標的とされない抗体の10%未満、5%未満、1%未満又は0.1%未満をクリアランスする場合がある。Seldeg処置の間及び後の標的とされない抗体の保持は、本明細書に説明される他の効果の中でも正常な免疫機能及び感染の回避において重要な場合がある。

10

20

## 【0074】

Seldegsは毎日か、毎週か、患者の50%が循環中又は標的とされる抗原特異的抗体が認識する組織中で閾量の標的とされる抗原特異的抗体を再生したと予想されることはいつでも投与される場合がある。標的とされる抗原特異的抗体のレベルは、血清試料を分析するための酵素結合イムノソルベント検定(ELISAs)を用いることにより決定され得る。あるいはまた、当業者に周知の他の方法を用いることができる。

## 【0075】

抗体媒介拒絶に関するリスクがある移植患者において、Seldegsは移植の前又は後に投与される場合がある。標的抗原特異的抗体が循環中又は標的抗原特異的抗体により認識される組織中で標的抗原特異的抗体の閾値に達したら、緊急時用量(emergency dose)のSeldegsを投与する場合がある。標的とされる抗原特異的抗体のレベルは、血清試料を分析するための酵素結合イムノソルベント検定(ELISAs)を用いることにより決定され得る。あるいはまた、当業者に周知の他の方法を用いることができる。

30

## 【0076】

タンパク質に基づく治療薬のような治療薬に関して特異的な抗体を有する患者において、Seldegsはそのような抗体を枯渇させるために治療薬の送達の前に投与される場合がある。これは、治療薬が前の送達の間に免疫反応を引き出していた場合、又は治療薬に特異的な既存の抗体が患者内に存在している場合、急速な治療薬の抗体媒介クリアランスに関連する問題を克服すると思われる。タンパク質に基づく治療薬に関して特異的な既存の又は誘導される抗体を複数の異なる方法を用いて検出することができる(例えばXue, L., Clements-Egan, A., Amaravadi, L., Birchler, M., Gorovits, B., Liang, M., Myler, H., Purushothama, S., Manning, M. S., Sung, C. (2017) Recommendations for the assessment and management of pre-existing drug-reactive antibodies during biotherapeutic development. AAPS, 19, 1576-1586に説明されているもののような)。

40

## 【0077】

50

診断用 / セラノスティック画像化において、放射性標識された画像化抗体の送達に腫瘍局在化 (localization) を許すある期間が続くであろうと思われる。続いて Seldeggs を用いてオフターゲット部位 (例えば循環) から放射性標識された抗体をクリアランスし、コントラストの向上を生ずる。例えばこの方法は以下の段階を含むことができる: 第 1 に腫瘍抗原に結合する放射性標識 (又は他の標識) された抗体を患者に注入する。第 2 に、放射性標識された抗体が腫瘍に結合するのを許すためのある期間 (例えば 16 - 24 時間) の後に、注入された画像化剤の用量にモル量において等しい量で Seldeggs を注入する。クリアランス期間 (例えば 4 - 24 時間) の後にポジトロンエミッショントモグラフィー又は他の全身画像化様式を用いて患者を画像化する。

## 【0078】

10

投与から 1 時間以内、2 時間以内、5 時間以内、24 時間以内又は 48 時間以内あるいはもっと長い時間以内に循環中又は標的抗原特異的抗体により認識される組織中の標的抗原特異的抗体の濃度の少なくとも 50%、少なくとも 80% 又は少なくとも 90% を枯渇させるのに十分な量で Seldeggs を投与する場合がある。体内における Seldeggs の持続性は、抗原特異的抗体の枯渇においてそれがどれだけ長く活性を有しているかの決定要因であろう。Seldeggs を、それらが標的とする細胞表面受容体又は細胞表面分子の行動により種々の生体内半減期を有するように設計することができる。この細胞表面受容体又は細胞表面分子に関する Seldeg 的親和性を突然変異誘発及び当業者に既知の方法を用いて修飾し、循環及び / 又は組織中における種々の持続性を有する Seldeggs を生ずることもできる。特に枯渇させられるべき抗原特異的抗体の量と少なくとも大体等モルにおける量で Seldeg を投与する場合がある。例えば標的抗原特異的抗体に対して約 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1 又はもっと高いモル比にある量で Seldeg を投与することができる。特に例えば Seldeg が患者に投与される抗体 (例えば抗 M O G 又は抗 H E R 2 抗体など) を標的とする場合、例えば投与される標的抗原特異的抗体に対して約 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1 又はもっと高いモル比にある用量で Seldeg を投与することができる。

20

## 【発明を実施するための形態】

## 【0079】

30

以下の実施例は本開示の特定の態様をさらに例示するために与えられる。それらは本開示のそれぞれの及びすべての側面を完全に詳細に開示又は説明することを意図しておらず、そのように理解されるべきではない。他にことわらなければ、細胞系及び組成物の呼称は、これらの実施例全体を通じて一貫して用いられる。

## 【実施例 1】

## 【0080】

## - F c R n に結合する Seldeggs の発現及び精製

細胞上の F c R n を標的とする Seldeggs は、中性近辺の pH においてヒト F c R s との相互作用を排除し且つ F c R n への Seldeg F c フラグメントの結合親和性を強化するための突然変異を有する二量体的ヒト I g G 1 由来 F c フラグメント (図 3A) に連結したモノマーとしての組換え抗原を含有する。これらの 2 つの Seldeggs のヘテロダイマー形成は、C H 3 ドメインにおけるノブズイントゥーホールズ突然変異の挿入により達成される。

40

## 【0081】

代表的な H E R 2 - Seldeg (配列番号 3、4、5 及び 6) を作製するための発現構築物を以下の通りに作製した: 改変された F c フラグメントに融合した H E R 2 を有するポリペプチド鎖を発現するために (配列番号 3)、H E R 2 リーダーペプチド及び細胞外ドメイン (630 残基からなる E C D ) をコードする遺伝子を標準的な分子生物学的方法を用いて H E R 2 過剰発現乳癌細胞系 (B T - 474) から単離した。この遺伝子をヒト I g G 1 由来 F c フラグメントをコードする遺伝子のヒンジ領域の N 末端に、オーバーラップ伸長 (overlap extension) によるスプライシングを用いて I E

50

G R M D リンカーペプチドを介して融合させた。F c R sへの結合を排除するため (G 2 3 6 R / L 3 2 8 R ; EUナンバリング)、F c R nへの結合を強化するため (M S T - H N ; M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E / H 4 3 3 K / N 4 3 4 F ; EUナンバリング) 及び ‘ノブズイントゥーホールズ’ を作製するため (Y 3 4 9 T / T 3 9 4 F ; EUナンバリング) の突然変異を標準的な方法を用いて F c フラグメント遺伝子中に挿入した。軽鎖定常領域中のシステインと架橋するヒンジ領域中のシステイン (C 2 2 0 ; EUナンバリング) もセリンに突然変異させた。F c R n 強化突然変異、F c R s 結合を排除するための突然変異を有し、融合抗原のない F c フラグメント遺伝子を相補的ノブズイントゥーホールズ突然変異を用いて作製した (S 3 6 4 H / F 4 0 5 A ; EUナンバリング) (配列番号 5)。G i b c o E x p i 2 9 3 <sup>TM</sup> 発現系キット (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いる一過性トランスフェクションの後に H E K - 2 9 3 F (l i f e T e c h n o l o g i e s) 細胞中で組換えタンパク質を発現させた。アニオン交換カラム (S O U R C E - 1 5 Q , G E H e a l t h c a r e) を用い、p H 8 . 0 及び直線状塩勾配 (0 - 0 . 5 M N a C l) において H E R 2 - S e l d e g を培養上澄み液から精製した。あるいはまた、タンパク質 A - セファロース及び標準的な方法を用いて H E R 2 - S e l d e g を精製することができる。カラム (イオン交換又はタンパク質 A - セファロース) からの溶離の後、H E R 2 - S e l d e g をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に対して透析した。実験における使用の前に P B S (L o n z a) 中でサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) (G E H e a l t h c a r e) を用いて H E R 2 - S e l d e g をさらに精製した。類似の方法及びトランスフェクションされた H E K - 2 9 3 F 細胞中で発現される組換えタンパク質を用いて他の S e l d e g s のための発現プラスミドを作製した。F c R n 強化突然変異のない S e l d e g s (例えば M O G - S e l d e g - P S、M O G - S e l d e g - T f R ; 配列番号 7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9 及び 2 0) をタンパク質 G - セファロースを用いて精製した。

#### 【 0 0 8 2 】

2 つの抗原に関して特異的な抗体を標的とする S e l d e g s : (1) H E R 2 - S e l d e g ; 及び (2) M O G - S e l d e g を作製した。抗原 H E R 2 はトラスツズマブ (T Z B) 又はペルツズマブ (P Z B) のような H E R 2 特異的抗体を用いる治療のため及び H E R 2 過剰発現腫瘍の診断用画像化のために十分に定義された標的である。抗原 M O G は多発性硬化症 (M S) の動物モデル及びヒトにおける M S の両方において自己反応性抗体 (a u t o r e a c t i v e a n t i b o d i e s) により認識される。

#### 【 0 0 8 3 】

H E R 2 - S e l d e g 及び M O G - S e l d e g は、中性近辺の p H における結合親和性を向上させる F c R n 強化 M S T - H N 突然変異 (M 2 5 2 Y , S 2 5 4 T , T 2 5 6 E , H 4 3 3 K , N 4 3 4 F ; EUナンバリング) がないことを除いて H E R 2 - S e l d e g 及び M O G - S e l d e g に類似の構築物 (それぞれ “H E R 2 - W T” 及び “M O G - W T”) を作製するために F c フラグメントに融合された H E R 2 又は M O G を含む組換え融合タンパク質と対照的に、中性の p H 及び酸性の p H において F c R n に関する有意により高い結合親和性を保持している (図 3 B)。B I A c o r e T 2 0 0 (G E H e a l t h c a r e) を用いて、組換えタンパク質と F c R n の相互作用を分析するための表面プラズモン共鳴実験を行った。P B S (p H 6 . 0 又は 7 . 4) プラス 0 . 0 1 % v / v T w e e n - 2 0 中の固定化された F c R n (C M 5 センサーチップ上に ~ 6 0 0 R U において結合) 上に 1 0 0 n M の M O G / H E R 2 - S e l d e g 又は M O G / H E R 2 - W T を 1 0  $\mu$  l / 分の流量で注入することにより S e l d e g / W T の組換えマウス F c R n への結合を分析した。0 . 1 5 M N a C l , 0 . 1 M 重炭酸ナトリウム, p H 8 . 5 を用いて、各注入及び解離段階に統いてフローセル (f l o w c e l l s) を再生させた。データをゼロ調整し、バックグラウンドを引き去った (バックグラウンドは結合反応の間に緩衝液のみと結合したフローセル上に注入することにより得られた)。

#### 【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

M S T - H N のような F c R n 結合を向上させるための突然変異は以下の方法を用いて同定された：F c R n 結合に必須であることが既知のアミノ酸（例えば 253、435）に近接する残基を F c フラグメント遺伝子においてランダムに突然変異させ、突然変異した F c フラグメントのライブラリをファージ上で表示する。ファージディスプレー法 (Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Mateșoi, D., Medesan, C., Ober, R. J., Ward, E. S. (1997) Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, *Nature Biotech.*, 15, 637 - 640; Dall'Acqua, W. F., Woods, R. M., Ward, E. S., Palaszynski, S. R., Patel, N. K., Brrewah, Y. A., Wu, H., Kiener, P. A., Langermann, S. (2001) Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal receptor: biological consequences, *J. Immunol.*, 169, 5171 - 5180) を用い、F c R n に関する結合親和性が向上した F c フラグメントを選択した。あるいはまた、これらの残基をすべての他の可能なアミノ酸に突然変異させ、ELISA 又は表面プラズモン共鳴結合分析のような方法を用いて F c R n に関するより高い親和性を有する F c フラグメントを同定することができる。

#### 【0085】

サイズ排除分析は、最高で 4 で 30 日間又は 37 で 5 日間インキュベートされる場合、Seldeg を含む組換えタンパク質がリン酸緩衝生理食塩水中のインキュベーション後に凝集物を形成しないことを示す（図 3C）。

#### 【実施例 2】

#### 【0086】

- F c R n を標的とする Seldeg が形質転換によりヒト F c R s を発現するマウス (huFc R マウス) において標的抗原特異的抗体を枯渇させる能力

Seldeg が標的抗原特異的抗体を枯渇させる能力を決定するために、外来遺伝子導入によりヒト F c R s を発現するマウス (huFc R マウス; Smith, P., Dilillo, D. J., Bournazos, S., Li, F., Ravetch, J. V. (2012). Mouse model recapitulating human Fc receptor structural and functional diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 6181 - 6186. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203954109>) に 15 μg の放射性標識された (125 I 標識された) MOG 特異的抗体 8-18C5 を注入した。huFc R マウスに 8-18C5 を注入してから 24 時間後、注射を介して 125 μg 又は 31 μg の MOG - Seldeg 又は参照標準タンパク質を投与した。図 3D において、“MOG - Seldeg - High” は 125 μg の用量に対応し、“MOG - Seldeg - Low” は 31 μg の用量に対応する。参照標準はリン酸緩衝生理食塩水 (“PBS”) 及び非修飾 MOG - Fc 融合タンパク質 (“MOG - WT”) である。MOG - WT は、それが中性近辺の pH における結合親和性を向上させる Fc R n 強化 M S T - H N 突然変異を欠いていることを除いて MOG - Seldeg に類似の構築物である。

#### 【0087】

図 3D のデータを作成するために、放射性標識された 8-18C5 の全身カウントを、指示される時間に取った。8-18C5 投与から 24 時間後、Seldeg 又は参照標準送達の直前に得られる分当たりのカウント (“CPM”) を各マウスに関する 100% とみなし、その後に得られる全身の CPM をこの時点に正規化する。エラーバー (error bars) は標準偏差を示し、チューキーの多重比較 (Tukey's multiple comparisons) と共に二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用い、p < 0.05 及び n = グループ当たり 6 匹のマウスで統計的に有意な差を決定した。

10

20

30

40

50

## 【0088】

MOG - Seldeg の  $125\text{ }\mu\text{g}$  及び  $31\text{ }\mu\text{g}$  の用量は、マウスにおいて IgG レベルを全体的に排除することが示された  $500\text{ }\mu\text{g}$  , MST - HN Abdeg の用量より約 2 ないし 8 倍低い ( 2 to 8 - fold lower ) ( モルに基づいて ) 。そのように比較的低い MOG - Seldeg の用量は、 FcRn 結合に関する Seldeg との競争を介する融合した抗原に関して特異的でない IgGs への影響を最小にするために用いられた。  $125\text{ }\mu\text{g}$  又は  $31\text{ }\mu\text{g}$  の用量は、 8 - 18C5 標的抗原特異的抗体よりそれぞれ 16 倍及び 4 倍モル過剰を意味する。

## 【0089】

図 3D は、時間に対する放射性標識された 8 - 18C5 ( 標的抗原特異的抗体 ) の正規化された体カウントのグラフを与えている。 MOG - Seldeg の投与は、正規化された全身カウントにおいて 8 - 18C5 の急速な用量依存性減少を生じ ( 図 3D ) 、それは体から 8 - 18C5 を選択的に枯渇させる MOG - Seldeg の能力を示す。対照的に、 FcRn 強化 MST - HN 突然変異を欠いた参照標準 MOG - WT の注入は、 8 - 18C5 抗体枯渇に影響を有していなかった。これは、 pH 6.0 - 7.4 における FcRn に関する高い結合親和性を与えるための MST - HN 突然変異の重要性を示す。

10

## 【実施例 3】

## 【0090】

- FcRn を標的とする Seldeg s の特異性ならびに血液中及び体全体の両方において標的抗原特異的抗体レベルにおける有意な低下を誘導するそれらの能力

20

Seldeg s の特異性及び種々の抗原認識性を有する抗体へのそれらの影響を分析するため、 HER2 特異的抗体 TZB の行動を HER2 - Seldeg 及び MOG - Seldeg の両方の存在下で調べた ( 図 3E ) 。図 3E のデータを作成するために、 huFcR マウスに  $15\text{ }\mu\text{g}$  の放射性標識された (  $^{125}\text{I}$  標識された ) TZB を静脈内注射し、 続いて 4 倍モル過剰の HER2 - Seldeg 又は抗原特異性に関する参照標準として MOG - Seldeg を静脈内注射した。追加の参照標準はリン酸緩衝生理食塩水 ( " PBS " ) 、 Abdeg 及び中性近辺の pH における結合親和性を向上させる FcRn 強化 MST - HN 突然変異を欠いていること以外は HER2 - Seldeg に類似の構築物 ( " HER2 - WT " ) を作製するために Fc フラグメントに融合した HER2 を含む組換え融合タンパク質である。 Seldeg と対照的に、 " Abdeg " は MST - HN 突然変異を有するヒト IgG1 由来抗体であり、それは非選択的に抗体を枯渇させる。そのようなタンパク質は、それらが一般的に IgG 分解を引き起こす抗体なので Abdeg s と呼ばれる。

30

## 【0091】

図 3E のデータを作成するために、マウスを出血させ、血液及び全身カウントを指示される時間に取った。 TZB 投与から 24 時間後、 Seldeg 又は参照標準送達の直前に得られる分当たりのカウント ( " CPM " ) を各マウスに関する 100 % とみなし、その後に得られる血液及び全身の CPM をこの時点に正規化する。エラーバーは標準偏差を示し、 チューキーの多重比較と共に二元配置分散分析を用い、  $p < 0.05$  及び  $n =$  グループ当たり 6 匹のマウスで統計的に有意な差を決定した。

40

## 【0092】

図 3E は、時間に対する放射性標識された TZB ( 標的抗原特異的抗体 ) の正規化された血液及び体カウントのグラフを与えている。 HER2 - Seldeg の投与は、血液及び全身カウントの両方において正規化された TZB の体カウントにおける有意な低下を引き起こし、それは体から TZB を選択的に枯渇させる HER2 - Seldeg の能力を示す。対照的に、参照標準タンパク質は PBS 参照標準に関して観察された行動に類似の行動を示した ( 図 3E ) 。

## 【実施例 4】

## 【0093】

- FcRn を標的とする Seldeg s が標的抗原特異的抗体を急速に枯渇させる能力  
マウスに放射性標識された (  $^{125}\text{I}$  標識された ) TZB (  $15\text{ }\mu\text{g}$  ) を静脈内注射し、

50

24時間後にHER2-Seldeg(51μg; TZBより4倍モル過剰)を静脈内送達した。追加の参照標準はリン酸緩衝生理食塩水("PBS")及びAbdeg(60μg)である。

【0094】

図3Fのデータを作成するために、マウスを出血させ、血液及び全身カウントを指示される時間に取った。TZB投与から24時間後、Seldeg又は参照標準送達の直前に得られる分当たりのカウント("CPM")を各マウスに関する100%とみなし、その後に得られる血液及び全身のCPMをこの時点に正規化する。エラーバーは標準偏差を示し、チューキーの多重比較と共に二元配置分散分析を用い、 $p < 0.05$ 及び $n$  = グループ当たり5-6匹のマウスで統計的に有意な差を決定した。

10

【0095】

図3Fは、時間に対する放射性標識されたTZB(標的抗原特異的抗体)の正規化された血液及び体カウントのグラフを与えている。HER2-Seldegの投与は、正規化されたTZBの体及び血液カウントにおける急速な低下を引き起こし、それは体からTZBを急速に枯渇させるHER2-Seldegの能力を示す。注目すべきことに、TZBの血液カウントはSeldeg投与から2時間以内にバックグラウンドレベルの近くまで低下し(図3F)、体から標的抗原特異的抗体を急速に枯渇させるHER2-Seldegの能力をさらに支持している。対照的に、60μg/マウスの用量におけるAbdegの送達はPBS参照標準に関して観察された行動に類似の行動を示した(図3F)。

20

【実施例5】

【0096】

- 細胞表面上に露出したホスファチジルセリン(PS)を標的とするSeldegsの活性  
我々は、標的タンパク質がシナプトタグミン1のC2ドメイン(Syt1)であるSeldegがhuFcRマウスにおいてMOGに関して特異的な抗体を選択的に枯渇させる能力も調べた。Syt1は細胞上の露出したPSに結合し、Seldegはそのために設計されたMOG-Seldeg-PSであり、略図的に示される(図4A)。'DN'突然変異(D173N, D179N, D231N, D233N及びD239N)の存在の故にPSに結合しないMOG-Seldeg-PS(DN)も作製した。MOG-Seldeg-PS及びMOG-Seldeg-PS(DN)を、トランスフェクションされたHEK-293F細胞の培養上澄み液からタンパク質G-セファロース及び標準的な方法を用いて精製した。ヘテロダイマー形成はFc領域中へのノブズイントゥーホールズ及び静電ステアリング突然変異の挿入により達成され、サイズ排除分析は組換えタンパク質が良好に行動することを示す(図4A)。

30

【0097】

図4Bに示すデータの作成のために、マウスに放射性標識された(<sup>125</sup>I)キメラ8-18C5(ヒト定常/マウス可変ドメイン; MOG特異的; 15-20μg)を静脈内注射し、24時間後にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、40μgのMOG-Seldeg-PS又は参照標準として34μgのFc-Syt1(MOGが結合していない)又は40μgのMOG-Seldeg-PS(DN)を静脈内送達した。指示される時間に放射性レベルを決定した。MOG-Seldeg-PS又は参照標準送達の直前に得られる全身CPM又は血液CPMレベルを100%とみなし、得られる続くCPMのすべてをこれらのCPMレベルに対して正規化した。エラーバーは標準誤差(SEM)を示し、MOG-Seldeg-PS処置グループと参照標準グループ(Fc-Syt1, MOG-Seldeg-PS(DN)及びPBS)の間の統計的に有意な差を\*により示した( $p < 0.05$ 、チューキーの多重比較を用いる二元配置分散分析;  $n$  = グループ当たり5-6匹のマウス)。

40

【0098】

MOG-Seldeg-PSの投与は血液及び全身カウントの両方において8-18C5の正規化された体カウントにおける有意な低下を引き起こし、それは体から8-18C5を選択的に枯渇させるMOG-Seldeg-PSの能力を示す。対照的に、参照標準

50

タンパク質 F c - S y t 1 は P B S 参照標準に関して観察された行動と類似の行動を示し、MOG - S e l d e g - P S ( D N ) は 8 - 1 8 C 5 における低下を誘導したが ( P S への残留結合の故に)、影響は MOG - S e l d e g - P S のそれよりずっと低かった ( 図 4 B )。

【実施例 6】

【 0 0 9 9 】

- F c R n を標的とする S e l d e g s が標的抗原特異的抗体を有効にエンドソーム中に移行させ、リソソームへの送達を介して分解を引き起こす能力

細胞レベルにおける S e l d e g s の活性の機構を決定するために、フローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡検査を行い、標的抗原特異的抗体 T Z B 、 P Z B 及び 8 - 1 8 C 5 の移行及び堆積への S e l d e g s の効果を分析した。最初に結合性がマウス F c R n に類似であるように突然変異したヒト F c R n - G F P 発現構築物を用いてヒト内皮細胞 ( H M E C - 1 ) をトランスフェクションした。

【 0 1 0 0 】

S e l d e g s は、結合した標的抗原特異的抗体を有効に細胞内のエンドソーム中に移行させ、8 時間のインキュベーション後に標的抗原特異的抗体はリソソームに送達された。

【 0 1 0 1 】

図 5 A は平均蛍光強度 ( “ M F I ” ) のグラフであり、図 5 B 及び図 5 C は標的抗原特異的抗体の存在下における S e l d e g 活性の顕微鏡画像であり、代表的なエンドソームの顕微鏡画像を切り出し、拡大し、右上の角の差し込み図に示した。図 5 A はそれぞれ H E R 2 - S e l d e g s と一緒に Alexa 647 標識された T Z B 及び MOG - S e l d e g と一緒に Alexa 647 標識された 8 - 1 8 C 5 の存在下におけるより大きな M F I を示す。このより大きな M F I は、 T Z B 及び 8 - 1 8 C 5 とのそれぞれ H E R 2 - 及び MOG - S e l d e g の共 - インキュベーション ( 4 0 0 n M の S e l d e g 又は W T 参照標準プラス 1 0 0 n M の抗原特異的抗体 ; 3 0 分のパルス、追跡なし又は 6 0 分の追跡、図 5 A 、 5 B 及び 5 C においてそれぞれ 3 0 ' P 又は 3 0 ' P , 6 0 ' C と標識 ) が T Z B 及び 8 - 1 8 C 5 進入細胞の高いレベルを生ずることを示す。 H E R 2 - S e l d e g の存在下で T Z B の代わりに H E R 2 特異的抗体ペルツズマブ ( P Z B ) を用いた場合、類似の結果が得られた ( 図 5 A )。さらに、各標的抗原特異的抗体の大部分は 6 0 分の追跡の間、細胞により保持された。対照的に、負の参照標準 H E R 2 - W T ( T Z B 又は P Z B に関して選択的 ) 及び MOG - W T ( 8 - 1 8 C 5 に関して選択的 ) の存在下で細胞内の標的抗原特異的抗体の堆積は実質的により低かった。

【 0 1 0 2 】

図 5 B 及び C は抗原特異的抗体が細胞中に堆積すること、そして S e l d e g s の存在下におけるエンドソーム中の F c R n と関連していることを示す。図 5 B の顕微鏡画像の作成のために、4 0 0 n M の Alexa 555 標識された H E R 2 - S e l d e g 又は H E R 2 - W T ( 示される通り ) との複合体における 1 0 0 n M の Alexa 647 標識された T Z B ( H E R 2 特異的 ) を用いて H M E C - 1 細胞を 3 0 分間パルスし、洗浄し、直後に固定するか又は洗浄し、媒体中で 6 0 分間追跡し、続いて固定した。固定された細胞を蛍光顕微鏡検査を用いて画像化した。図 5 C 中のデータは、4 0 0 n M の Alexa 555 標識された MOG - S e l d e g 又は MOG - W T との複合体における 1 0 0 n M の Alexa 647 標識された 8 - 1 8 C 5 ( MOG 特異的 ) を用いる以外は同じ方法を用いて作成された。それぞれの顕微鏡画像中のバーは 5  $\mu$ m であり、それぞれの顕微鏡画像差し込み図中のバーは 0 . 2 5  $\mu$ m である。図 5 B 及び 5 C に示されるデータは、抗原特異的抗体が参照標準 ( W T ) タンパク質の存在下と比較して F c R n に結合する S e l d e g s の存在下で実質的により高いレベルまで F c R n 発現細胞中に堆積することを示している。

【 0 1 0 3 】

図 6 A は標的抗原特異的抗体の存在下における S e l d e g 活性の顕微鏡画像を示し、代表的なリソソームの顕微鏡画像を切り出し、拡大し、右上の角の差し込み図に示した。

10

20

30

40

50

図 6 A のために Alexa 555 標識されたデキストランを用いて HMEC - 1 細胞を 2 時間予備パルスし、洗浄し、次いで 400 nM の MOG - Seldeg 又は MOG - WT (示される通り) との複合体における 100 nM の Alexa 647 標識された 8 - 18C5 (MOG 特異的) を用いて 30 分間パルスし、続いて 8 時間追跡し、洗浄し、固定し、画像化した。図 6 B の顕微鏡画像の作成のために、Alexa 555 標識されたデキストランを用いて HMEC - 1 細胞を 2 時間予備パルスし、洗浄し、次いで 100 nM の Alexa 647 標識された TZB 又は 8 - 18C5 抗体及び 400 nM の MOG - Seldeg 又は HER2 - Seldeg (示される通り) を用いて 30 分間パルスし、続いて 8 時間追跡し、洗浄し、固定し、画像化した。それぞれのオーバーレイ画像 (overlap image) (右の列に示す) のために、GFP、Alexa 555 及び Alexa 647 をそれぞれ緑、赤及び青に疑似着色した (pseudo-color ed)。それぞれの顕微鏡画像中のバーは 5 μm であり、それぞれの顕微鏡画像差し込み図中のバーは 0.25 μm である。注目すべてことに、図 6 B はそれぞれ MOG - Seldeg 又は HER2 - Seldeg の存在下で細胞がリソソーム中に TZB 及び 8 - 18C5 を堆積させないことを示し、それはそれらの効果の抗原特異性を示している。

#### 【実施例 7】

##### 【0104】

- ホスファチジルセリンを標的とする Seldeg s が標的抗原特異的抗体を有効に細胞中に移行させる能力

図 7 は、MOG - Seldeg - PS が MOG 特異的抗体 (キメラ 8 - 18C5) を内皮細胞及びマクロファージ中に有効に移行させること及び吸収は PS 結合依存性であることを示す。PS を露出させた内皮細胞 (2H11) 又はマクロファージ (RAW264.7) を、20 nM の MOG - Seldeg - PS、MOG - Seldeg - PS (DN) 又は Fc - Syt1 (MOG なし) と混合された 10 nM の Alexa 647 標識されたキメラ 8 - 18C5 と一緒に 2 時間インキュベーションした。三重の試料に関する Alexa 647 標識されたキメラ 8 - 18C5 (マウス抗体、8 - 18C5 の可変ドメインを当業者に周知の方法を用いてヒト IgG1 の定常領域、C に融合させることにより作製) の平均蛍光強度 (MFI) をフローサイトメトリーにより決定した。

##### 【0105】

この代表的な PS 結合 Seldeg はカルシウム依存性であり、従ってカルシウム濃度がずっと低いエンドソーム中で解離する。当業者に理解される通り、すべての PS 標的化 Seldeg がカルシウム依存性であるわけではないと思われるが、いくつか、アネキシン V を含むもののようにいくつかもこの性質を有するであろう。さらに、いくつかの抗体はベータ 2 糖タンパク質 1 に結合することができ、それが今度は PS に結合することができる。

#### 【実施例 8】

##### 【0106】

- トランスフェリン受容体を標的とする Seldeg s が標的抗原特異的抗体を有効にヒトトランスフェリン受容体を発現する細胞中に移行させる能力

トランスフェリン受容体を標的とする抗体に融合した抗原 (MOG) を含む Seldeg (MOG - Seldeg - TfR) を作製し、図 8 に略図的に示す。MOG - Seldeg - TfR 及び参考標準抗体、Ab - TfR (MOG が存在しない) を、トランスフェクションされた HEK - 293F 細胞の培養上澄み液からタンパク質 G - セファロース及び標準的な方法を用いて精製した。MOG - Seldeg - TfR は MOG 特異的抗体 (キメラ 8 - 18C5) を有効に内皮 (HMEC - 1) 細胞中に移行させ、吸収は Seldeg 中の MOG の存在に依存性である (図 9)。ヒト TfR を発現する HMEC - 1 細胞を、200 nM の MOG - Seldeg - TfR 又は TfR 特異的抗体 (Ab - TfR; MOG なし) と混合された 50 nM の Alexa 647 標識されたキメラ 8 - 18C5 (MOG に関して特異的) と一緒に 30 分間インキュベーションし、続いて洗浄し、追跡しないか (30' P) 又は 30 分間に続いて洗浄し、60 分間追跡した (30' P, 60' C)

10

20

30

40

50

）。三重の試料に関する *Alexa 647* 標識された *8-18C5* の平均蛍光強度 (MFI) をフローサイトメトリーにより決定した (図 9)。

【実施例 9】

【0107】

- *FcRn* を標的とする *Seldeg*s が放射性標識された抗体を用いる腫瘍のポジトロンエミッショントモグラフィー分析の間にバックグラウンドをクリアランスする能力

雌の BALB/c SCID マウスに、HER2 陽性乳癌細胞系、HCC1954 を乳房脂肪体中において移植した (マウス当たり  $0.5 \times 10^6$  個の細胞; 注入前に細胞を RPMI-1640 / Matrigel 中に懸濁させた)。6-7 日後、マウスに 124-I 標識された TZB (60  $\mu$ g / マウス) を注入し、22 時間後にポジトロンエミッショントモグラフィー (PET) を用いて分析した。マウスにモル当量の HER2-Seldeg (51  $\mu$ g / マウス) 又は参照標準として MOG-Seldeg (31  $\mu$ g / マウス) 若しくは PBS ビヒクルを注入した (n = グループ当たりに 3 匹のマウス)。Seldeg 又は PBS の注入から 4 時間後に PET を用いてマウスを分析した。Siemens Inveon PET-computed tomography (CT) Multimodality System を用いてマウスの画像化を行った。

【0108】

図 10 A に示すデータの作成のために、124-I 標識された TZB の注入から 22 時間に (‘22 時間’) 及び HER2-Seldeg、MOG-Seldeg 又は PBS の注入から 4.5-5 時間後に (‘4.5 時間クリアランス’) マウスを画像化した。AMID-E ソフトウェアパッケージにおいて PET 及び CT 画像を共登録した (co-registed)。図 10 B は 124-I 標識された TZB の注入後 22 時間及び HER2-Seldeg、MOG-Seldeg 又は PBS の注入から 4.5-5 時間後の場合の放射性標識強度に関するコントラスト測定値のグラフを与えている。コントラスト測定値の決定のために、問題の 2 つの領域を胸部領域 (バックグラウンド) 及び腫瘍において同定した。腫瘍における平均強度対胸部領域における平均強度の比に関する平均値 (n = グループ当たり 3 匹のマウス) をプロットする。エラーバーは標準誤差を示す。HER2-Seldeg で処置されたマウス対 MOG-Seldeg 又は PBS で処置されたマウスの間の統計的に有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。データは、HER2-Seldeg の送達がマウスの胸部領域におけるバックグラウンドを低下させることを示している。

【実施例 10】

【0109】

- 代表的な *Seldeg*s 及び参照標準ならびにノブズイントゥーホールズ突然変異、アルギニン突然変異及び静電ステアリング突然変異のような突然変異を有するそれらの変異体の DNA 及びタンパク質配列

表 1 は、本明細書に説明される代表的なタンパク質をコードするポリヌクレオチドの DNA 配列を示し、表 2 は表 1 に示されるポリヌクレオチドによりコードされる代表的なタンパク質のアミノ酸配列を示し、ここで配列番号 1 の DNA 配列は配列番号 2 のタンパク質をコードし、配列番号 3 の DNA 配列は配列番号 4 のタンパク質をコードし、配列番号 5 の DNA 配列は配列番号 6 のタンパク質をコードし、配列番号 7 の DNA 配列は配列番号 8 のタンパク質をコードし、配列番号 9 の DNA 配列は配列番号 10 のタンパク質をコードし、配列番号 11 の DNA 配列は配列番号 12 のタンパク質をコードし、配列番号 13 の DNA 配列は配列番号 14 のタンパク質をコードし、配列番号 15 の DNA 配列は配列番号 16 のタンパク質をコードし、配列番号 17 の DNA 配列は配列番号 18 のタンパク質をコードし、配列番号 19 の DNA 配列は配列番号 20 のタンパク質をコードし、配列番号 21 の DNA 配列は配列番号 22 のタンパク質をコードし、配列番号 23 の DNA 配列は配列番号 24 のタンパク質をコードし、配列番号 25 の DNA 配列は配列番号 26 のタンパク質をコードし、配列番号 27 の DNA 配列は配列番号 28 のタンパク質をコードし、配列番号 29 の DNA 配列は配列番号 30 のタンパク質をコードし、配列番号 31 の DNA 配列は配列番号 32 のタンパク質をコードし、配列番号 33 の DNA 配列は配列

10

20

30

40

50

番号 3 4 のタンパク質をコードする。

【 0 1 1 0 】

【表 1 - 1】

表 1. 代表的なタンパク質をコードするポリヌクレオチドのDNA配列

タンパク質を コードするポ リヌクレオチ ド	DNA 配列	配列 番号
M S T - H N 、 ノブズイント ウ一ホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する M O G - S e l d e g	GGACAATT CAGAGT GATAGG ACCAGGGT ATCCC ATCC GGGCTT TAGTT GGGGAT GAAG CAGAG CTGCC GTGCC CATCTCTC CTGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTG GGTTGGT ACCGTT CTCCCT TCTCAAGAGTGGTT CACCT CTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCA CCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGA CTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCCTTAGGATT CAGAA CGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTC TTCAGAGACC ACTCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG AGTTGAAAGTGGAAAGATGGAGGCGGTGGATCAGTTGA GCCCAAATCTTCTGACAAA ACTCACACATGCC CACCGT GCC CAGCACCTGAAACTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC TCTACATCA CTCGGGAACCTGAGGT CACATGCGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGT CCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC GCC CAGCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGACCACCC TGCC CCATCCC GGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGT CAGCC	10 1 20 30 40

【 0 1 1 1 】

【表 1 - 2】

	TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCTCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTC TGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA	10
M S T - H N、 ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する H E R 2 - S e 1 d e g	ACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGC TCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGGACATGCTCCG CCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAAC CTGGAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGT CCTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGT GCTCATCGCTCACAAACCAAGTGAGGCAGGTCCCAC TG CAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTTTG AGGACAACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGA CCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCCTCC CCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCA CAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAA CCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTGTGGAAG GACATCTTCCACAAGAACAAACCAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTGGGCCTGCCACCCCTG TTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGAGAG AGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCT GTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGC CCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTG CACGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTC CACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCC	3 20 30 40

【0 1 1 2】

【表 1 - 3】

	CAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACAGCTTGAGTC CATGCCAATCCGAGGGCCGGTATAACATTGGCGCC AGCTGTGACTGCCTGTCCCTACAACACACCTTCTAC GGACGTGGGATCCTGCACCCCTCGTCTGCCCTGCAC AACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGG TGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCT ATGGTCTGGGCATGGAGCACTGCGAGAGGTGAGGGC AGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTGCTGGCTGC AAGAAGATCTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGA GCTTGATGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCGCT CCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGAGACTCTGGAA GAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGA CAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTCCAGAACCTGCAA GTAATCCGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACT CGCTGACCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGG GCTGCGCTCACTGAGGAACTGGCAGTGGACTGGC CCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTGTGACA CGGTGCCCTGGGACCAGCTTCCGGAACCCGCACCA AGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAG TGTGTGGCGAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGCT GCCCGAGGGCACTGCTGGGTCCAGGGCCCACCCAG TGTGTCAACTGCAGCCAGTTCTCGGGCCAGGAGT GCGTGGAGGAATGCCAGTACTGCAGGGCTCCCCAG GGAGTATGTGAATGCCAGGCAGTGTGCTGGCCTGCCAC CCTGAGTGTCAAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTT TTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGCTGGCCTGTGCCCA CTATAAGGACCCCTCCCTCTGCGTGGCCCGCTGCCCA	
10		
20		
30		
40		

【0113】

【表1-4】

	AGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCT GGAAGTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTG CCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGGAT GACAAGGGCTGCCCGCCGAGCAGAGAGGCCAGCCCT CTGACGATTGAAGGCCGCATGGATCCAAATCTTCTG ACAAAACACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCCTACATCACTCGGGAACCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCGCCAGCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCG AGAACACAGGTGACCACCCCTGCCCATCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC TTCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGG CTCTGAAATTCCACTACACGCAGAACAGGCCTCCCT GTCTCCTGGTAAA	10 20 30 40
M S T - H N、 ノブズイント ウ一ホールズ	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACACTCACACATGCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTCCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCTA	5

【0114】

【表 1 - 5】

及びアルギニン突然変異を有する F c	CATCACTCGGGAACCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAA AGCCCGCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGT CCACCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT CCGACGGCTCCTCGCCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAA	10
		20
ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニン突然変異を有する M O G - S e 1 d e g - P S	GGACAATTCAAGAGTGATAGGACCAGGGTATCCCATCC GGGCTTTAGTTGGGGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCG CATCTCTCCTGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTG GGTTGGTACCGTTCTCCCTCTCAAGAGTGGTTCACCT CTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCA CCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGA CTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCCTTAGGATTAGAA CGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTC TTCAGAGACCACTCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG AGTTGAAAGTGGAAAGATGGAGGCGGTGGATCAGTTGA	7
		30
		40

【0115】

【表 1 - 6】

	GCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCCT GCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC GCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGACCACCCCTGCC CCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCTTCCCTCCCGTCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTC TGTGATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGAGGCGGTG GATCAGAGAAACTGGAAAACCTCAGTATTCACTGGA TTATGATTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGGGATCA TTCAGGCTGCCGAACTGCCCGCCTGGACATGGGGGG CACATCTGATCCTACGTGAAAGTGTCTGCTACCTG ATAAGAAGAAGAAATTGAGACAAAAGTCCACCGAAA AACCTTAATCCTGTCTCAATGAGCAATTACTTTCA AGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACCTAGT GATGGCTGTATATGATTTGATCGTTCTCTAAGCATG	
10		
20		
30		
40		

【0116】

【表1 - 7】

	ACATCATTGGAGAATTAAAGTCCCTATGAACACAGTG GATTTGGCCATGTAACTGAGGAATGGCGTGACCTGC AAAGTGCT	
ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する Fc - Sy t 1	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCC ACCGTGCCCCAGCACCTGAACCTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCCCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGG CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTCGCCCTCTACAGCAAGCTACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACA CGCAGAACAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGAGG CGGTGGATCAGAGAAACTGGGAAAACCTCAGTATTCA CTGGATTATGATTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGG GATCATTCAAGGCTGCCGAACTGCCGCCTGGACATG GGGGGCACATCTGATCCTACGTGAAAGTGTGCT ACCTGATAAGAAGAAATTGAGACAAAAGTCCAC	9 10 20 30 40

【0117】

【表 1 - 8】

	CGAAAAACCTTAATCCTGTCTCAATGAGCAATTAC TTTCAAGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACC CTAGTGATGGCTGTATATGATTTGATCGTTCTCTAA GCATGACATCATTGGAGAATTAAAGTCCCTATGAACA CAGTGGATTTGCCATGTAACTGAGGAATGGCGTGA CCTGCAAAGTGCT		10
ノブズイント ウーホールズ、 静電ステアリ ング及びアル ギニン突然変 異を有する M O G - S e 1 d e g - P S	GGACAATTCAAGAGTGATAGGACCAGGGTATCCCATCC GGGCTTAGTTGGGGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCG CATCTCTCCTGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTG GGTGGTACCGTTCTCCCTCTCAAGAGTGGTCACCT CTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCA CCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTCTGAAAGAGA CTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCCTAGGATTCAAGAA CGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTC TTCAGAGACCCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG AGTTGAAAGTGGAAAGATGGAGGCGGTGGATCAGTTGA GCCCAAATCTTCTGACAAAACACACATGCCACCGT GCCAGCACCTGAACCTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC GCCCAAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGACCACCCCTGCC	11	20
			30
			40

【0118】

【表 1 - 9】

	CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACGACACCTTCCCTCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCGACCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTC TGTGATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGAGGCGGTG GATCAGAGAAAATGGGAAAATTCAGTATTCACTGG TTATGATTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGGGATCA TTCAGGCTGCCGAACTGCCCGCCTGGACATGGGGGG CACATCTGATCCTTACGTGAAAGTGTTCCTGCTACCTG ATAAGAAGAAGAAAATTGAGACAAAAGTCCACCGAAA AACCCCTTAATCCTGTCTTCAATGAGCAATTACTTCA AGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACCTAGT GATGGCTGTATATGATTTGATCGTTCTCTAACGATG ACATCATTGGAGAATTAAAGTCCTATGAACACAGTG GATTTGGCCATGTAACTGAGGAATGGCGTGACCTGC AAAGTGCT	10
ノブズイント ウーホールズ、 静電ステアリ ング及びアル ギニン突然変 異を有する F c - Syt 1	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCC ACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCAT GATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGC	30 13 40

【0119】

【表 1 - 10】

	TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCGGGATAAGCTGACCAAGAACAGGT CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGAAGT CCGACGGCTCCTCGCCCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGAGG CGGTGGATCAGAGAAACTGGAAAATTCAGTATTCA CTGGATTATGATTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGG GATCATTCAAGGCTGCCGAACTGCCGCCTGGACATG GGGGCACATCTGATCCTTACGTGAAAGTGTGCTGCT ACCTGATAAGAACAGAAAGAAATTGAGACAAAAGTCCAC CGAAAAACCTTAATCCTGTCTCAATGAGCAATTAC TTTCAAGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACC CTAGTGATGGCTGTATATGATTGATCGTTCTCTAA GCATGACATCATTGGAGAATTAAAGTCCCTATGAACA CAGTGGATTGCCCCATGTAACTGAGGAATGGCGTGA CCTGCAAAGTGCT	10 20 30 40
ノブズイント ウ一ホールズ 突然変異を有 する M O G - S e 1 d e g	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAG AAGCCCGCGCCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTCACCTCCTACTGGATGCACTGGGT GCGGCAGGCCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG CGAGATCAACCCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC	15

【0120】

【表 1 - 11】

- T f R	GAGAAGTTCAAGTCCCAGGGCACCCTGACCGTGGACAGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGCACCCGGGCCTACCAACTACTGGGGCCAGGGCACCATCTGGTGACCGTGTCCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCACGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACCTCCCGTGTGCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCTGCCCCAGCACCTGAACTCC	10
	TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCCACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGACCACCCCTGCCCATCCCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGTGGAGTGGAGAAGCAATGGGAGGAGAACAACACTACAAGACCTTCCC	20
	GGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAAGCAATGGGAGGAGAACAACACTACAAGACCTTCCC	30
	GCAATGGGAGGCCGGAGAACAAACTACAAGACCTTCCC	40

【0121】

【表 1 - 1 2】

	TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTCACAAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGAGGCGGTGGATCAGGACAATTCAAGAGTGATAGGACCAGGGTATCCCATCCGGGCTTAGTTGGGGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCATCTCTCCTGGGAAAAATGCCACGGCATGGAGGTGGTGGTACCGTTCTCCCTCTCAAGAGTGGTTCACCTCTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCACCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGACTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCTTAGGATTCAAGACGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTCTCAGAGACCACCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGGAGTTGAAAGTGGAA	10
ノブズイント ウ一ホールズ 突然変異を有 する T f R A b	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGCACTGGTGGGCAGGCCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGCGAGATCAACCCACCAACGGCCGGACCAACTACATCGAGAAGTTCAAGTCCCAGGCCACCCCTGACCGTGGACAGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTCGGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGCACCCGGGCCTACCAACTACTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGTCCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCACCGTCTCCACCGCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC	17
		20
		30
		40

【0 1 2 2】

【表 1 - 13】

	TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTCCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCAGTGCAGCAGCTGAACCTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCCTTAAACCC CAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGATGAGCT GACCAAGAACCAAGGTCCACCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCGCCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCCCTGTC TCCGGGTAAA	10 20 30 40
TfR Ab LC	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCG CCTCCGTGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGC	19

【0 1 2 3】

【表1-14】

	CTCCGACAACCTGTACTCCAACCTGGCCTGGTACCA CAGAAGCCCGGCAAGTCCCCAAGCTGCTGGTGTACG ACGCCACCAACCTGGCCGACGGCGTGCCTCCCGGTT CTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCCCTGACC ATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAGCACTTCTGGGGCACCCCCCTGACCTCGGC CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAC TG C C T C T G T G T G C C T G C T G A A T A A CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGT	10
ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有するM O G — S e 1 d e g-T f R	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAG AAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGCACTGGGT GCGGCAGGCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG CGAGATCAACCCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC GAGAAGTTCAAGTCCGGGCCACCCCTGACCGTGGACA AGTCGGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT GCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGG GGCACCCGGGCCTACCAACTACTGGGGCCAGGGCACCA TGGTGACCGTGTCCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT	21 30 40

【0124】

【表 1 - 15】

	GGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACTGTGCCCTCAGCAGCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCAACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCC TGAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTTAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTTACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCGCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGACCACCCCTGCCCATCCGGATGAGCT GACCAAGAACCAAGGTCAAGCTGACCTGCCGTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCTTCCC TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCCTAC GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCAACTACACGCAAGAGCAGGTGGTCAA CCGGGTAAAGGAGGCGGTGGATCAGGACAATTAGAG TGATAGGACCAGGGTATCCCATCCGGCTTAGTTGG	10 20 30 40
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

【0125】

【表 1 - 16】

	GGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCGCATCTCTCCTGGG AAAAATGCCACGGGCATGGAGGTGGTTGGTACCGTT CTCCCTTCTCAAGAGTGGTTCACCTCTACCGAAATGGC AAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCACCTGAATACCGGG GACGCACAGAGCTCTGAAAGAGACTATCAGTGAGGG AAAGGTTACCCTTAGGATTCAAACGTGAGATTCTCAG ATGAAGGAGGCTACACCTGCTTCTCAGAGACCCTC TTACCAAGAAGAGGCAGCAATGGAGTTGAAAGTGGAA GAT	10
ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する T <sub>f</sub> R A b	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGCGCCGAGGTGAAG AAGCCCGGCGCCTCCGTAAAGGTGTCCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGCCTGGGT GCGGCAGGCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG CGAGATCAACCCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC GAGAAGTTCAAGTCCCAGGCCACCCCTGACCGTGGACA AGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT GCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGG GGCACCCGGGCCTACCAACTACTGGGGCCAGGGCACCA TGGTGACCGTGTCCCTCCGCCCTCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACCTCAG GCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGGCCAAATCTTGTGACAAA	23 20 30 40

【0126】

【表 1 - 17】

	ACTCACACATGCCAACCGTCCCAGCACCTGAACCTCC TGAGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCGCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCT GACCAAGAACCAAGGTCCACCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCGCCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA	10
M S T - H N 及びノブズイ ントゥーホー ルズを有する H E R 2 - E C D - F c	ACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCAGC TCCCTGCCAGTCCCAGAGACCCACCTGGACATGCTCCG CCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAAC CTGGAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGT CCTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGT GCTCATCGCTCACAAACCAAGTGAGGCAGGTCCCAC CAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTTTG AGGACAACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGA	25
		30
		40

【0127】

【表 1 - 18】

	CCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCCTCC CCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCA CAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGAA CCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTGTGGAAG GACATCTTCCACAAGAACAAACCAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTGGGCCTGCCACCCCTG TTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGAGAG AGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCT GTGCCGGTGGCTGTGCCGCTGCAAGGGGCCACTGC CCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTG CACGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTC CACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCC CAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTGAGTC CATGCCCAATCCGAGGGCCGGTATACATTGGCGCC AGCTGTGACTGCCTGTCCTACAACACTACCTTCTAC GGACGTGGGATCCTGCACCCCTCGTCTGCCCGTGCAC AACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGG TGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCT ATGGTCTGGGATGGAGCACTTGCGAGAGGTGAGGGC AGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTGCTGGCTGC AAGAAGATCTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGA GCTTGATGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCGCT CCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGAGACTCTGGAA GAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGA CAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTCCAGAACCTGCAA GTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACT CGCTGACCCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGG	
		10
		20
		30
		40

【0128】

【表 1 - 19】

	GCTGCGCTCACTGAGGGAACCTGGCAGTGGACTGGC CCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACA CGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTCGGAACCCGCACCA AGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAG TGTGTGGCGAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGC GCCCGAGGGCACTGCTGGGTCCAGGGCCCACCCAG TGTGTCAACTGCAGCCAGTTCCCTCGGGGCCAGGAGT GCGTGGAGGAATGCCAGGCAGTGCAGGGCTCCCCAG GGAGTATGTGAATGCCAGGCAGTGTGACCTGACCTGACCTG CTATAAGGACCCCTCCCTCTGCGTGGCCGCTGCC AGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCATCT GGAAGTTCCAGATGAGGAGGGCGATGCCAGCCTTG CCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGACCTGGAT GACAAGGGCTGCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCC CTGACGATTGAAGGCCGATGGATCCAAATCTTCTG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCCTCTACATCACTCGGGAACCTG AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG	
10		
20		
30		
40		

【0129】

【表 1 - 20】

	AGAACACAGGTGACCACCCCTGCCCATCCGGAT GAGCTGACCAAGAACCAAGGTAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC TTCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGAACGTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGG CTCTGAAATTCCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCT GTCTCCTGGTAAA		10
M S T - H N 及びノブズイ ントゥーホー ルズ突然変異 を有する F c	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACACACATGCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTCCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCTA CATCACTCGGAACCTGAGGTACATGCGTGGTGGT GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGT CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTCGCCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACAC	27 20 30 40	

【0130】

【表 1 - 21】

	GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
M S T - H N、 ノブズイント ウ一ホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する P S M A - S e 1 d e g	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACACACATGCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCTA CATCACTCGGGAACCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCGCCCAGCCCCATCGAGAAAACCCTCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGACCACC CTGCCCTCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCTCCCTCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCA TGCTCTGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGAGGC GGTGGATCAAATCCTCCAATGAAGCTACTAACATTAC TCCAAAGCATAATATGAAAGCATTGGATGAATTGA AAGCTGAGAACATCAAGAAGTTCTTATATAATTTCAC CAGATACCACATTAGCAGGAACAGAACAAACTTTCA GCTTGCAAAGCAAATTCAATCCCAGTGGAAAGAATT GGCCTGGATTCTGTTGAGCTAGCACATTATGATGTCCT GTTGTCCTACCCAAATAAGACTCATCCAACTACATCT	29 10 20 30 40

【0131】

【表 1 - 2 2】

	CAATAATTAATGAAGATGGAAATGAGATTTCAACACA TCATTATTGAACCACCTCCTCCAGGATATGAAAATGT TTCGGATATTGTACCACCTTCAGTGCTTCTCTCCTC AAGGAATGCCAGAGGGCGATCTAGTGTATGTTAACTAT GCACGAACTGAAGACTTCTTAAATTGGAACGGGACA TGAAAATCAATTGCTCTGGAAAATTGTAATTGCCAGA TATGGGAAAGTTTCAGAGGAAATAAGGTTAAAATGC CCAGCTGGCAGGGGCCAAAGGAGTCATTCTACTCC GACCCTGCTGACTACTTGCTCCTGGGTGAAGTCCT ATCCAGATGGTTGGAATCTCCTGGAGGTGGTGTCCA GCGTGGAAATATCCTAAATCTGAATGGTGCAGGAGAC CCTCTCACACCAGGTTACCCAGCAAATGAATATGCTTA TAGGCGTGGATTGCAGAGGCTTGGTCTTCCAAGT ATTCCCTGTTCATCCAATTGGATACTATGATGCACAGAA GCTCCTAGAAAAATGGGTGGCTCAGCACCACAGAT AGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTGCCCTACAATG TTGGACCTGGCTTACTGGAAACTTTCTACACAAAAAA GTCAAGATGCACATCCACTCTACCAATGAAGTGACAA GAATTACAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGAGCAGTG GAACCAGACAGATATGTCATTCTGGGAGGTACCGGG ACTCATGGGTGTTGGTGGTATTGACCTCAGAGTGG AGCAGCTGTTGTTCATGAAATTGTGAGGGAGCTTGG ACACTGAAAAAGGAAGGGTGGAGACCTAGAAGAACAA TTTGTTGCAAGCTGGGATGCAGAAGAATTGGTCTT CTTGGTTCTACTGAGTGGCAGAGGAGAATTCAAGAC TCCTCAAGAGCGTGGCGTGGCTTATATTAATGCTGAC TCATCTATAGAAGGAAACTACACTCTGAGAGTTGATG	
		10
		20
		30
		40

【0 1 3 2】

【表1 - 23】

	TACACCGCTGATGTACAGCTTGGTACACAACCTAACAA AAGAGCTGAAAAGCCCTGATGAAGGCTTGAGGCAA ATCTCTTATGAAAGTTGGACTAAAAAAAGTCCTTCCC CAGAGTTCAGTGGCATGCCAGGATAAGCAAATTGGG ATCTGGAAATGATTGAGGTGTTCTCCAACGACTTG GAATTGCTTCAGGCAGAGCACGGTATACTAAAAATTGG GAAACAAACAAATTCAAGCGGCTATCCACTGTATCACAG TGTCTATGAAACATATGAGTTGGTGGAAAAGTTTATG ATCCAATGTTAAATATCACCTCACTGTGGCCCAGGTT CGAGGAGGGATGGTGGTGGAGCTAGCCAATTCCATAG TGCTCCCTTTGATTGTCGAGATTATGCTGTAGTTTA AGAAAGTATGCTGACAAATCTACAGTATTCTATGAA ACATCCACAGGAAATGAAGACATAACAGTGTATCATTG ATTCACTTTCTGCAGTAAAGAATTTCAGAAATT GCTTCCAAGTTCACTGAGAGACTCCAGGACTTGACA AAAGCAACCAATAGTATTAAGAATGATGAATGATCAA CTCATGTTCTGGAAAGAGCATTATTGATCCATTAGG GTTACCAGACAGGCCTTTTATAGGCATGTCATCTATG CTCCAAGCAGCCACAACAAGTATGCAGGGGAGTCATT CCCAGGAATTATGATGCTCTGTTGATATTGAAAGCA AAGTGGACCCTCCAAGGCCTGGGGAGAAGTGAAGA GACAGATTATGTTGCAGCCTCACAGTGCAGGCAGC TGCAGAGACTTGAGTGAAGTAGCC	10 20 30 40
MST-HN、 ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ	ATGGCATCTCCGGGCTCTGGCTTTGGTCTTCGGGT CGGAAGATGGCTCTGGGGATTCCGAGAATCCGGCAC AGCGCGAGCCTGGTGCCAAGTGGCTCAGAAGTTCACG GGCGGCATGGAAACAAACTGTGCGCCCTGCTACG	31

【0133】

【表1-24】

ン突然変異を 有するG A D 6 5 - S e 1 d e g	GAGACGCCGAGAACGCCGGAGAGCGGCCGGAGCC AACCCCCGCCGGCGCCGCCGGAGGCCCTGCG CCTGCGACCAGAACGCCCTGCAGCTGCTCAAAGTGG TGTCAACTACGCGTTCTCCATGCAACAGACCTGCTGC CGGCGTGTGATGGAGAAAGGCCACTTGCGTTCT GCAAGATGTTATGAACATTTCAGTATGTGGTGA AAAGTTTCGATAGATCAACCAAAGTGATTGATTCCAT TATCCTAATGAGCTTCTCCAAGAACATATAATTGGAAATT GGCAGACCAACCACAAAATTGGAGGAAATTGATG CATTGCCAACAACTCTAAAATATGCAATTAAACAGG GCATCCTAGATACTTCAATCAACTTCTACTGGTTGG ATATGGTTGGATTAGCAGCAGACTGGCTGACATCAACA GCAAATACTAACATGTTCACCTATGAAATTGCTCCAGT ATTGCTTGGATATGTCACACTAAAGAAAATGA GAGAAATCATTGGCTGGCCAGGGGGCTCTGGCGATGG GATATTCTCCGGTGGCGCCATATCTAACATGTATG CCATGATGATCGCACGCTTAAGATGTTCCCAGGCTCATTG AAGGAGAAAGGAATGGCTGCTCTCCAGGCTCATTG CCTTCACGTCTGAACATAGTCATTTCTCTCAAGAAC GGAGCTGCAGCCTTAGGGATTGGAACAGACAGCGTGA TTCTGATTAATGTGATGAGAGAGGGAAAATGATTCCA TCTGATCTGAAAGAAGGATTCTGAAGCCAAACAGA AAGGGTTGTTCCCTTCCTCGTGAGTGCCACAGCTGG AACCAACCGTGTACGGAGCATTGACCCCCCTTAGCT GTCGCTGACATTGCAAAAGTATAAGATCTGGATGCA TGTGGATGCAGCTGGGGTGGGGATTACTGATGTCC CGAAAACACAAGTGGAAACTGAGTGGCGTGGAGAGG	10 20 30 40
--------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

【0134】

【表 1 - 25】

	GCCAACTCTGTGACGTGGAATCCACACACAAGATGATGG GAGTCCCTTGAGTGCAGTGCTCTGCTCTCCTGGTTAGAGA AGAGGGATTGATGCAGAATTGCAACCAAATGCATGCC TCCTACCTCTTCAGCAAGATAAACATTATGACCTGTC CTATGACACTGGAGACAAGGCCTACAGTGCAGACGC CACGTTGATGTTTAAACTATGGCTGATGTGGAGGGC AAAGGGACTACCGGGTTGAAGCGCATGTTGATAAA TGTGAGTTGGCAGAGTATTATACAACATCATAAA AAACCGAGAAGGATATGAGATGGTGTGATGGGAAG CCTCAGCACACAAATGTCTGCTTCTGGTACATTCCCTCC AAGCTTGCCTACTCTGGAAAGACAATGAAGAGAGAATG AGTCGCCTCTCGAAGGTGGCTCCAGTGATTAAAGCCA GAATGATGGAGTATGGAACCACAATGGTCAGCTACCA ACCCCTGGGAGACAAGGTCAATTCTTCCGCATGGTC ATCTCAAACCCAGCGGCAACTCACCAAGACATTGACT TCCTGATTGAAGAAATAGAACGCCTTGGACAAGATTAA GGAGGCCGTGGATCAGTTGAGCCCCAAATCTTCTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCCAGCACCTGAAC CCTGAGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCCCCCAAA CCCAAGGACACCCCTTACATCACTCGGGAACCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCGCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA	
10		
20		
30		
40		

【0135】

【表 1 - 2 6】

	ACCACAGGTGACCACCCCTGCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCCAGGTAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCTTC CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGAACGTCTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGGCT CTGAAATTCCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA	10
M S T - H N、 ノブズイント ウ一ホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する A Q P 4 - S e l d e g	ATGAGTGACAGACCCACAGCAAGGCGGTGGGTAAGT GTGGACCTTGTGTACCAAGAGAGAACATCATGGTGGC TTTCAAAGGGTCTGGACTCAAGCTTCTGGAAAGCA GTCACAGCGGAATTCTGGCCATGCTTATTGGTCT CCTCAGCCTGGATCCACCATCAACTGGGTGGAACA GAAAAGCCTTACGGTCGACATGGTCTCATCTCCCT TTGCTTGGACTCAGCATTGCAACCATGGTGCAGTGC TTTGGCCATATCAGCGGTGGCCACATCAACCCTGCAG TGACTGTGCCATGGTGTGCACCAGGAAGATCAGCAT GCCAAGTCTGTCTTACATCGCAGCCCAGTGCCTG GGGCCATCATTGGAGCAGGAATCCTCTATCTGGTCA CACCTCCCAGTGTGGTGGGAGGCCTGGAGTCACCAT GGTCATGAAATCTTACCGCTGGTCATGGTCTCCTGG TTGAGTTGATAATCACATTCAATTGGTGTACTATCT TTGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTCACTGG CTCAATAGCTTAGCAATTGGATTTCTGTTGCAATTG GACATTATTGCAATCAATTATACTGGTGCCAGCATG AATCCCGCCCGATCCTTGGACCTGCAGTTATCATGGG	33 20 30 40

【0 1 3 6】

【表 1 - 27】

	AAATTGGGAAAACCATTGGATATATTGGGTTGGGCCA TCATAGGAGCTGTCCTCGCTGGTGGCCTTATGAGTAT GTCTTCTGTCCAGATGTTGAATTCAAACGTCGTTAA AGAAGCCTTCAGCAAAGCTGCCAGCAAACAAAAGGA AGCTACATGGAGGTGGAGGACAACAGGAGTCAGGTAG AGACGGATGACCTGATTCTAAAACCTGGAGTGGTGCA TGTGATTGACGTTGACCGGGGAGAGGAGAAGAAGGG GAAAGACCAATCTGGAGAGGTATTGTCTTCAGTAGGA GGCGGTGGATCAGTTGAGGCCAAATCTTCTGACAAAAA CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCT GAGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCC AAGGACACCCCTCTACATCACTCGGAACCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCGCCAGCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCC ACAGGTGACCACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTG ACCAAGAACCAAGGTCACTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCTCCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGGCTCT GAAATTCCACTACACGCAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA	
10		
20		
30		
40		

【0137】

## 【表2-1】

表2. 代表的なタンパク質のアミノ酸配列

タンパク質	アミノ酸配列	配列番号
M S T - H N、ノブズイ ントゥーホー ルズ及びアル ギニン突然変 異を有するM O G - S e 1 d e g	GQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNATGMEVGW YRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTTELLKETISE GKVTLRIQNVRFSDEGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVE DGGGGSVEPKSSDKTHTCPCPAPELLRGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKARPAPIEKTIISKAKGQPREPQVTTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKS LSLSPGK	2 10 20
M S T - H N、ノブズイ ントゥーホー ルズ及びアル ギニン突然変 異を有する H E R 2 - S e 1 d e g	TQVCTGTDMLKRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL ELTYLPTNASLSFLQDIQEYQGYVLIAHNQVRQVPLQRL RIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVTGASPGLR ELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNN QLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLT RTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGA SCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDEGTQRCE KCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEAGCKKIF GSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLY ISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGIS WLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTPWDQLFRNP HQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGBT QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCH	4 30 40

## 【0138】

【表 2 - 2】

	PECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSG VKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKG CPAEQRASPLTIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAELLRGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKARPAPIEKTISKAKGQPREPVTTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTF PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL KFHYTQKSLSLSPGK		10
M S T - H N、ノブズイ ントゥーホー ルズ及びアル ギニン突然変 異を有する F c	VEPKSSDKTHTCPPCPAELLRGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG K	6	20
ノブズイント ゥーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する M O G - S e 1 d e g - P S	GQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNATGMEVGW YRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISE GKVTLRIQNVRFSDDEGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVE DGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAELLRGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKARPAPIEKTISKAKGQPREPVTTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLLVGIIQAA ELPALDMGGTSDPYVKVFLLPDKKKKFETKVHRKTLNP	8	30
			40

【0139】

【表 2 - 3】

	VFNEQFTFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIIGEF KVPMTVDGHVTEEWRLDLQSA	
ノブズイント ウ一ホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する F c - S y t 1	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLLVGIIQAAELPALD MGGTSDPYVKVFLLPDKKKFETKVRKTLNPVFNEQF TFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIIGEFKVPMT VDFGHVTEEWRLDLQSA	10 10
ノブズイント ウ一ホール ズ、静電ステ アリング及び アルギニン突 然変異を有す るMOG-S e 1 d e g - P S	GQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNATGMEVGW YRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISE GKVTLRIQNVRFSDEGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVE DGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTFPPVLDSDG SFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLLVGIIQAA ELPALDMGGTSDPYVKVFLLPDKKKFETKVRKTLNP VFNEQFTFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIIGEF KVPMTVDGHVTEEWRLDLQSA	12 20 30
ノブズイント ウ一ホール	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP	14 40

【 0 1 4 0 】

【表 2 - 4】

ズ、静電ステアリング及びアルギニン突然変異を有する Fc-Syt 1	REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVHLTCLV KGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLVGIIQAAELPALD MGGTSDPYVKVFLLPDKKKFETKVHRKTLNPVFNEQF TFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIIGEFKVPMT VDFGHVTEEWRLDLQSA		10
ノブズイント ウーホールズ 突然変異を有する MOG - S 1 d e g - T f R	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKS RATLTVDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQT YICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTFPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGQFRVIGPGYPIRAL VGDEAELPCRISPGKNATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRN GKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISEGKVTLRIQNVRFSD EGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVED	16	20
ノブズイント ウーホールズ 突然変異を有する T f R	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKS RATLTVDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS	18	30

【0141】

【表 2 - 5】

A b	WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVHLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
TfR Ab LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASDNLYSNLAWYQQK PGKSPKLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQHFWGTPLTFGQGTKVEIKTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	20
ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有するM O G — S e 1 d e g — T f R	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKS RATLTVDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAELLR GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTFPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGQFRVIGPGYPIRAL VGDEAELPCRISPGKNATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRN	22 30 40

【 0 1 4 2 】

【表 2 - 6】

	GKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISEGKVTLRIQNVRFSD EGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVED	
ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ ン突然変異を 有する T f r A b	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKS RATLTVDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSS ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAELLR GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKARPAPIEKTI SKAKGQQREPQVYTL PPSRDELTKNQVHLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	24 10 20
M S T - H N 及びノブズイ ントウーホー ルズを有する H E R 2 - E C D - F c	TQVCTGTDMLRPLASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLLAHNQVRQVPLQRL RIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVTGASPGGLR ELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNN QLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLT RTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGA SCVTACPYNYLSTDVGSC TLVCPLHNQEVTAEDEGTQRCE KCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFA GCKKIF GSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLY ISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGIS WLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNP HQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGP GPT	26 30 40

【 0 1 4 3 】

【表 2 - 7】

	QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCH PECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSG VKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCHSCVDLDDKG CPAEQRASPLTIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVTTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT FPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA LKHYTQKSLSLSPGK		10
M S T - H N 及びノブズイ ントゥーホー ルズ突然変異 を有する F c	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALKFHYTQKSLSLSPG K	28	20
M S T - H N、ノブズイ ントゥーホー ルズ及びアル ギニン突然変 異を有する P S M A - S e 1 d e g	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALKFHYTQKSLSLSPG KGGGGSKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLY NFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHY DVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYEN VSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDM	30	30
			40

【0144】

【表 2 - 8】

	KINCSGKIVIARYGKVFRGNVKVNAQLAGAKGVILYSDP ADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLT PGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKM GGSAPPDSSWRGSLKVPYNVPGFTGNFSTQKVKMHIH STNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGID PQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEF GLLGSTEWAEEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVD CTPLMYSLVHNLTKEALKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EFSGMMPRIKGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWET NKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGG MVFELANSIVLPFDRCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQE MKTYSVSDLSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVL RMMNDQLMFLERAFIGPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKY AGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAFTVQ AAAETLSEVA		10
M S T - H N、ノブズイ ントゥーホー ルズ及びアル ギニン突然変 異を有する G A D 6 5 - S e l d e g	MASPGSGFWFGSEDGSGDSENPGTARAWCQVAQKFTG GIGNKLCALLYGDAEKPAESGGSQPPRAAARKAACACDQ KPCSCSKVDVNYAFLHATDLLPACDGERPTLAFLQDVM NILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELADQPQ NLEEEILMHCQTTLKYAIKTGHPRYFNQLSTGLDMVGLAA DWLTSTANTNMFTYEIAPVFVLEYYVTLKKMREIIGWPG GSGDGIFSPGGAISNMYAMMIARFKMFPEVKEKGMAAL PRLIAFTSEHSHFSLKKGAAALGIGTDSVILIKCDERGKM IPSDLERRILEAKQKGFPFLVSATAGTTVYGAFDPLLAV ADICKKYKIWMHVDAAWGGGLLMSRKHKWKLSGVERA NSVTWNPHKMMGVPLQCSALLVREEGLMQNCNQMHA SYLFQQDKHYDLSYDTGDKALQCGRHVDVFKLWLMWR	32	30
			40

【0145】

【表 2 - 9】

	AKGTTGFEAHVDKCLELAEYLYNIKNREGYEMVFDGK PQHTNVCFWYIPPSLRTLEDNEERMSRLSKAPVIKARM MEYGTTMVSYQPLGDKVNFFRMVISNPAATHQDIDFLIE EIERLGQDLGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKARPAPIEKTIISKAKGQPREPVTTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTF PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL KFHYTQKSLSLSPGK	10
M S T - H N、ノブズイ ントゥーホー ルズ及びアル ギニン突然変 異を有する A Q P 4 - S e 1 d e g	MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKA VTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMVLISLCF GLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVF YIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAG HGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSIALAIGFSVAI GHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGP IIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGS YMEVEDNRSQVETDDLILKPGVHVIDVDRGEEKKGKD QSGEVLSVGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKARPAPIEKTIISKAKGQPREPVTTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTF PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL KFHYTQKSLSLSPGK	34 20 30 40

## 【0146】

配列番号1のDNA配列は、FcRn結合を向上させる突然変異、ノブズイントゥーホールズ及びアルギニン突然変異を有する代表的なMOG-Seldeg融合タンパク質(配列番号2)をコードするポリヌクレオチドのものである。それぞれ配列番号1及び2のMOGの代表的なDNA及びアミノ酸配列はマウス起源のものである。

## 【0147】

特に配列番号2の代表的なMOG-Seldegのアミノ酸配列は、N末端からC末端への順序でマウス(m)MOGの残基1-117、残基118-122に第1のリンカー、残基123-138に免疫グロブリンヒンジ(ヒトIgG1由来)、残基139-24

8 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来)、残基 249 - 355 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来) を有する融合タンパク質を形成する。配列番号 2 の代表的な M O G - S e l d e g は、残基 160、162、164, 341 及び 342 に F c R n 結合を向上させる突然変異、残基 144 及び 236 にアルギニン突然変異ならびに残基 257 及び 302 に ‘ノブズイントゥーホールズ’ 突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基 (128) はセリンに突然変異している。配列番号 2 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定 (E U n u m b e r i n g c o n v e n t i o n) を指していない。

【 0148 】

配列番号 3 の D N A 配列は、F c R n 結合を向上させる突然変異、ノブズイントゥーホールズ及びアルギニン突然変異を有する代表的な H E R 2 - S e l d e g 融合タンパク質 (配列番号 4) をコードするポリヌクレオチドのものである。

【 0149 】

特に配列番号 4 の代表的な H E R 2 - S e l d e g のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で H E R 2 の残基 1 - 630、残基 631 - 636 に第 1 のリンカー、残基 637 - 650 に免疫グロブリンヒンジ (ヒト Ig G 1 由来)、残基 651 - 760 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来)、残基 761 - 876 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来) を有する融合タンパク質を形成する。配列番号 4 の代表的な H E R 2 - S e l d e g は残基 672、674、676、853 及び 854 に F c R n 結合を向上させる突然変異、残基 656 及び 748 にアルギニン突然変異ならびに残基 769 及び 814 に ‘ノブズイントゥーホールズ’ 突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基 (640) はセリンに突然変異している。配列番号 4 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

【 0150 】

配列番号 5 の D N A 配列は、F c R n 結合を向上させる突然変異、ノブズイントゥーホールズ及びアルギニン突然変異を有する代表的な F c フラグメント (配列番号 6) をコードするポリヌクレオチドのものである。配列番号 6 の融合タンパク質は、例えば M O G - S e l d e g (配列番号 2) 又は H E R 2 - S e l d e g (配列番号 4) 融合体とのヘテロダイマー形成のために構成される。

【 0151 】

特に配列番号 6 の代表的な F c フラグメントのアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で 残基 1 - 16 に免疫グロブリンヒンジ (ヒト Ig G 1 由来)、残基 17 - 126 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来)、残基 127 - 233 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来) を有する。配列番号 6 の代表的な F c フラグメントは、残基 38、40、42、219 及び 220 に F c R n 結合を向上させる突然変異、残基 22 及び 114 にアルギニン突然変異ならびに残基 150 及び 191 に ‘ノブズイントゥーホールズ’ 突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基 (6) はセリンに突然変異している。配列番号 6 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

【 0152 】

配列番号 7 の D N A 配列は、ノブズイントゥーホールズ突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的な M O G - S e l d e g - P S 融合体をコードするポリヌクレオチドのものであり、コードされる融合タンパク質の対応するアミノ酸配列は配列番号 8 である。

【 0153 】

特に配列番号 8 の代表的な M O G - S e l d e g - P S 融合体のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で m M O G の残基 1 - 117、残基 118 - 122 に第 1 のリンカー、残基 123 - 138 に免疫グロブリンヒンジ (ヒト Ig G 1 由来)、残基 139 - 248 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来)、残基 249 - 355 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト Ig G 1 由来) を有する。配列番号 8 の代表的な M O G

10

20

30

40

50

- S e l d e g - P S は、残基 1 4 4 及び 2 3 6 にアルギニン突然変異ならびに残基 2 5 7 及び 3 0 2 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基(128)はセリンに突然変異している。シナプトタグミンの C 2 A P S 結合ドメインの残基 1 4 1 - 2 6 6 (S y t 1) (残基 3 6 1 - 4 8 6 として示されている)が G G G G S リンカーペプチド(残基 3 5 6 - 3 6 0)を介して C H 3 ドメインの C 末端に融合している。配列番号 8 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

#### 【 0 1 5 4 】

配列番号 9 の D N A 配列は、例えば M O G - S e l d e g - P S (配列番号 8) とのヘテロダイマー形成のために構成されるノブズイントゥーホールズ突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的な F c - S y t 1 融合体(配列番号 1 0)をコードするポリヌクレオチドのものである。

10

#### 【 0 1 5 5 】

特に配列番号 1 0 の代表的な F c - S y t 1 融合体のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 6 に免疫グロブリンヒンジ(ヒト I g G 1 由来)、残基 1 7 - 1 2 6 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン(ヒト I g G 1 由来)、残基 1 2 6 - 2 3 3 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン(ヒト I g G 1 由来)を有する。配列番号 1 0 の代表的な F c - S y t 1 融合タンパク質は、残基 2 2 及び 1 1 4 にアルギニン突然変異ならびに残基 1 5 0 及び 1 9 1 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基(6)はセリンに突然変異している。シナプトタグミンの C 2 A P S 結合ドメインの残基 1 4 1 - 2 6 6 (S y t 1) (残基 2 3 9 - 3 6 4 として示されている)が G G G G S リンカーペプチド(残基 2 3 4 - 2 3 8)を介して C H 3 ドメインの C 末端に融合している。配列番号 1 0 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

20

#### 【 0 1 5 6 】

配列番号 1 1 の D N A 配列は、ノブズイントゥーホールズ突然変異、静電ステアリング突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的な M O G - S e l d e g - P S 融合体(配列番号 1 2)をコードするポリヌクレオチドのものである。

#### 【 0 1 5 7 】

特に配列番号 1 2 の代表的な M O G - S e l d e g - P S 融合体のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で m M O G の残基 1 - 1 1 7 、残基 1 1 8 - 1 2 2 に第 1 のリンカー、残基 1 2 3 - 1 3 8 に免疫グロブリンヒンジ(ヒト I g G 1 由来)、残基 1 3 9 - 2 4 8 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン(ヒト I g G 1 由来)、残基 2 4 9 - 3 5 5 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン(ヒト I g G 1 由来)を有する。配列番号 1 2 の代表的な M O G - S e l d e g - P S は、残基 1 4 4 及び 2 3 6 にアルギニン突然変異、残基 3 0 0 及び 3 1 7 に静電ステアリング突然変異ならびに残基 2 5 7 及び 3 0 2 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基(128)はセリンに突然変異している。シナプトタグミンの C 2 A P S 結合ドメインの残基 1 4 1 - 2 6 6 (S y t 1) (残基 3 6 1 - 4 8 6 として示されている)が G G G G S リンカーペプチド(残基 3 5 6 - 3 6 0)を介して C H 3 ドメインの C 末端に融合している。配列番号 1 2 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

30

#### 【 0 1 5 8 】

配列番号 1 3 の D N A 配列は、例えば M O G - S e l d e g - P S (配列番号 1 2) とのヘテロダイマー形成のために構成されるノブズイントゥーホールズ突然変異、静電ステアリング突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的な F c - S y t 1 融合体(配列番号 1 4)をコードするポリヌクレオチドのものである。

40

#### 【 0 1 5 9 】

特に配列番号 1 4 の代表的な F c - S y t 1 融合タンパク質のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 6 に免疫グロブリンヒンジ(ヒト I g G 1 由来)、残

50

基 1 7 - 1 2 6 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）、残基 1 2 7 - 2 3 3 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）を有する。配列番号 1 4 の代表的な M O G - S e l d e g - P S は、残基 2 2 及び 1 1 4 にアルギニン突然変異、残基 1 4 3 及び 1 8 5 に静電ステアリング突然変異ならびに残基 1 5 0 及び 1 9 1 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基（6）はセリンに突然変異している。シナプトタグミンの C 2 A P S 結合ドメインの残基 1 4 1 - 2 6 6 (S y t 1)（残基 2 3 9 - 3 6 4 として示されている）が G G G G S リンカーペプチド（残基 2 3 4 - 2 3 8）を介して C H 3 ドメインの C 末端に融合している。配列番号 1 4 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

10

#### 【 0 1 6 0 】

配列番号 1 5 の D N A 配列は、ノブズイントゥーホールズ突然変異を有する T f R 特異的抗体重鎖を含む代表的な M O G - S e l d e g - T f R 融合タンパク質（配列番号 1 6）をコードするポリヌクレオチドのものである。

#### 【 0 1 6 1 】

特に配列番号 1 6 の代表的な T f R 特異的抗体重鎖 - M O G 融合体（M O G - S e l d e g - T f R）のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 1 6 に T f R 特異的 V H ドメイン、残基 1 1 7 - 2 1 3 に免疫グロブリン C H 1 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）、残基 2 1 4 - 2 2 9 に免疫グロブリンヒンジ（ヒト Ig G 1 由来）、残基 2 3 0 - 3 3 9 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）、残基 3 4 0 - 4 4 6 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）を有する。配列番号 1 6 の代表的な T f R 特異的抗体重鎖は残基 3 4 8 及び 3 9 3 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。m M O G の残基 1 - 1 1 7（残基 4 5 2 - 5 6 8 として示される）が G G G G S リンカーペプチド（残基 4 4 7 - 4 5 1）を介して C H 3 ドメインの C 末端に融合している。配列番号 1 6 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

20

#### 【 0 1 6 2 】

配列番号 1 7 の D N A 配列は代表的な T f R 特異的抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドのものである。ノブズイントゥーホールズ突然変異を有するコードされる融合タンパク質（配列番号 1 8）は、例えば M O G - S e l d e g - T f R（配列番号 1 6）とのヘテロダイマー形成のために構成される。

30

#### 【 0 1 6 3 】

特に、T f R 特異的抗体重鎖 - M O G 融合体（配列番号 1 6）とのヘテロダイマー形成のための配列番号 1 8 の代表的な T f R 特異的抗体重鎖のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 1 6 に T f R 特異的 V H ドメイン、残基 1 1 7 - 2 1 3 に免疫グロブリン C H 1 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）、残基 2 1 4 - 2 2 9 に免疫グロブリンヒンジ（ヒト Ig G 1 由来）、残基 2 3 0 - 3 3 9 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）、残基 3 4 0 - 4 4 6 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）を有する。配列番号 1 8 の代表的な T f R 特異的抗体重鎖は残基 3 6 3 及び 4 0 4 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。配列番号 1 8 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

40

#### 【 0 1 6 4 】

配列番号 1 9 の D N A 配列は、代表的な T f R 特異的抗体の軽鎖（配列番号 2 0）をコードするポリヌクレオチドのものであり、例えば M O G - S e l d e g - T f R 融合体（配列番号 1 6）及び T f R 特異的抗体重鎖（配列番号 1 8）とのヘテロダイマー形成のために構成される。

#### 【 0 1 6 5 】

特に、配列番号 2 0 の代表的な T f R 特異的抗体軽鎖のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 0 7 に T f R 特異的 V L ドメイン及び残基 1 0 8 - 2 1 3 に免疫グロブリン C L ドメイン（ヒト C ）を有する。配列番号 2 0 において言及されるア

50

ミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、EUナンバリング協定を指していない。

【0166】

配列番号21のDNA配列は、アルギニン突然変異及びノブズイントゥーホールズ突然変異を有するTfR特異的抗体重鎖を有する代表的なMOG-Seldeg-TfR融合タンパク質（配列番号22）をコードするポリヌクレオチドのものである。

【0167】

特に、配列番号22の代表的なTfR特異的抗体重鎖-MOG融合体（MOG-Seldeg-TfR）のアミノ酸配列は、N末端からC末端への順序で、残基1-116にTfR特異的VHドメイン、残基117-213に免疫グロブリンCH1ドメイン（ヒトIgG1由来）、残基214-229に免疫グロブリンヒンジ（ヒトIgG1由来）、残基230-339に免疫グロブリンCH2ドメイン（ヒトIgG1由来）、残基340-446に免疫グロブリンCH3ドメイン（ヒトIgG1由来）を有する。配列番号22の代表的なTfR特異的抗体重鎖は残基235及び327にアルギニン突然変異ならびに残基348及び393に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。mMOGの残基1-117（残基452-568として示される）がGGGGSリンカーペプチド（残基447-451）を介してCH3ドメインのC末端に融合している。配列番号22において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、EUナンバリング協定を指していない。

10

【0168】

配列番号23のDNA配列は、アルギニン突然変異及びノブズイントゥーホールズ突然変異を有し、例えばMOG-Seldeg-TfR融合体（配列番号22）とのヘテロダイマー形成のために構成される代表的なTfR特異的抗体重鎖（配列番号24）をコードするポリヌクレオチドのものである。

20

【0169】

特に、配列番号24の代表的なTfR特異的抗体重鎖のアミノ酸配列は、N末端からC末端への順序で、残基1-116にTfR特異的VHドメイン、残基117-213に免疫グロブリンCH1ドメイン（ヒトIgG1由来）、残基214-229に免疫グロブリンヒンジ（ヒトIgG1由来）、残基230-339に免疫グロブリンCH2ドメイン（ヒトIgG1由来）、残基340-446に免疫グロブリンCH3ドメイン（ヒトIgG1由来）を有する。配列番号24のTfR特異的抗体重鎖は残基235及び327にアルギニン突然変異ならびに残基363及び404に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。配列番号24において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、EUナンバリング協定を指していない。

30

【0170】

配列番号25のDNA配列は、FcRn結合を向上させる突然変異及びノブズイントゥーホールズ突然変異を有する代表的なHER2-Seldeg融合タンパク質（配列番号26）をコードするポリヌクレオチドのものである。

【0171】

特に、配列番号26の代表的な変異体HER2-Seldegのアミノ酸配列は、N末端からC末端への順序で、HER2の残基1-630、631-636に第1のリンカー、残基637-650に免疫グロブリンヒンジ（ヒトIgG1由来）、残基651-760に免疫グロブリンCH2ドメイン（ヒトIgG1由来）、残基761-867に免疫グロブリンCH3ドメイン（ヒトIgG1由来）を有する融合タンパク質を形成する。配列番号26のHER2-Seldegは残基672、674、676、853及び854にFcRn結合を向上させる突然変異及び残基769及び814に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシスティン残基（640）はセリンに突然変異している。配列番号26において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、EUナンバリング協定を指していない。

40

【0172】

配列番号27のDNA配列は、FcRn結合を向上させる突然変異及びノブズイントゥ

50

一ホールズ突然変異を有し、例えば H E R 2 - S e l d e g (配列番号 2 6 )とのヘテロダイマー形成のために構成される代表的な F c フラグメント (配列番号 2 8 )をコードするポリヌクレオチドのものである。

【 0 1 7 3 】

特に、配列番号 2 8 の代表的な変異体 F c フラグメントのアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 6 に免疫グロブリンヒンジ (ヒト I g G 1 由来)、残基 1 7 - 1 2 6 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト I g G 1 由来)、残基 1 2 7 - 2 3 3 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト I g G 1 由来)を有する。配列番号 2 8 の変異体 F c フラグメントは残基 3 8 、 4 0 、 4 2 、 2 1 9 及び 2 2 0 に F c R n 結合を向上させる突然変異ならびに残基 1 5 0 及び 1 9 1 に 'ノブズイントゥーホールズ' 突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基 (6) はセリンに突然変異している。配列番号 2 8 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

【 0 1 7 4 】

配列番号 2 9 の D N A 配列は、F c R n 結合を向上させる突然変異、ノブズイントゥーホールズ突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的な前立腺特異的膜抗原 (P S M A ) - S e l d e g 融合タンパク質 (配列番号 3 0 )をコードするポリヌクレオチドのものである。この融合タンパク質は、例えば代表的な F c フラグメント (配列番号 6 )とヘテロダイマーを形成するであろう。

【 0 1 7 5 】

特に、配列番号 3 0 の代表的な変異体 P S M A - S e l d e g のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、残基 1 - 1 6 に免疫グロブリンヒンジ (ヒト I g G 1 由来)、残基 1 7 - 1 2 6 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト I g G 1 由来)、残基 1 2 7 - 2 3 3 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト I g G 1 由来)を有し、それらが残基 2 3 4 - 2 3 8 におけるリンカーを介して P S M A の細胞外ドメイン (残基 2 3 9 - 9 4 5 ) に C 末端において融合している融合タンパク質を形成する。配列番号 3 0 の変異体 P S M A - S e l d e g は、残基 3 8 、 4 0 、 4 2 、 2 1 9 及び 2 2 0 に F c R n 結合を向上させる突然変異、残基 2 2 及び 1 1 4 にアルギニン突然変異ならびに残基 1 3 5 及び 1 8 0 に 'ノブズイントゥーホールズ' 突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基 (6) はセリンに突然変異している。配列番号 3 0 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

【 0 1 7 6 】

配列番号 3 1 の D N A 配列は、F c R n 結合を向上させる突然変異、ノブズイントゥーホールズ突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的な G A D 6 5 - S e l d e g 融合タンパク質 (配列番号 3 2 )をコードするポリヌクレオチドのものである。この融合タンパク質は、例えば代表的な F c フラグメント (配列番号 6 )とヘテロダイマーを形成するであろう。

【 0 1 7 7 】

特に、配列番号 3 2 の代表的な変異体 G A D 6 5 - S e l d e g のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端への順序で、ヒトグルタミン酸カルボキシラーゼ 6 5 (G A D 6 5 )の残基 1 - 5 8 5 、残基 5 8 6 - 5 9 0 に第 1 のリンカー、残基 5 9 1 - 6 0 6 に免疫グロブリンヒンジ (ヒト I g G 1 由来)、残基 6 0 7 - 7 1 6 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン (ヒト I g G 1 由来)、残基 7 1 7 - 8 2 3 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン (ヒト I g G 1 由来)を有する融合タンパク質を形成する。配列番号 3 2 の変異体 G A D 6 5 - S e l d e g は残基 6 2 8 、 6 3 0 、 6 3 2 、 8 0 9 及び 8 1 0 に F c R n 結合を向上させる突然変異、残基 6 1 2 及び 7 0 4 にアルギニン突然変異ならびに残基 7 2 5 及び 7 7 0 に 'ノブズイントゥーホールズ' 突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基 (5 9 6 ) はセリンに突然変異している。配列番号 3 2 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、E U ナンバリング協定を指していない。

【 0 1 7 8 】

10

20

30

40

50

配列番号 3 3 の D N A 配列は、 F c R n 結合を向上させる突然変異、ノブズイントゥーホールズ突然変異及びアルギニン突然変異を有する代表的なアクアポリン 4 - S e l d e g 融合タンパク質（配列番号 3 4 ）をコードするポリヌクレオチドのものである。この融合タンパク質は、例えば代表的な F c フラグメント（配列番号 6 ）とヘテロダイマーを形成するであろう。

【 0 1 7 9 】

特に、配列番号 3 4 の代表的な変異体アクアポリン 4 ( A Q P 4 ) - S e l d e g のアミノ酸配列は、 N 末端から C 末端への順序で、ヒトアクアポリン 4 の残基 1 - 3 2 3 、残基 3 2 4 - 3 2 8 に第 1 のリンカー、残基 3 2 9 - 3 4 4 に免疫グロブリンヒンジ（ヒト Ig G 1 由来）、残基 3 4 5 - 4 5 4 に免疫グロブリン C H 2 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）、残基 4 5 5 - 5 6 1 に免疫グロブリン C H 3 ドメイン（ヒト Ig G 1 由来）を有する融合タンパク質を形成する。配列番号 3 4 の変異体 A Q P 4 - S e l d e g は残基 3 6 6 、 3 6 8 、 3 7 0 、 5 4 7 、 5 4 8 に F c R n 結合を向上させる突然変異、残基 3 5 0 及び 4 4 2 にアルギニン突然変異ならびに残基 4 6 3 及び 5 0 8 に‘ノブズイントゥーホールズ’突然変異を有する。通常免疫グロブリン軽鎖と対をなすシステイン残基（ 3 3 4 ）はセリンに突然変異している。配列番号 3 4 において言及されるアミノ酸残基の番号はタンパク質配列の番号であり、 E U ナンバリング協定を指していない。

【 0 1 8 0 】

上記で開示した主題は例であって制限的ではないと考えられるべきであり、添付の特許請求の範囲は本開示の真の精神及び範囲内に含まれる修正、強調及び他の態様のすべてを網羅することを意図している。かくして法が許す最大の程度まで、本開示の範囲は以下の請求項及びそれらの同等事項の許される最も広い解釈により決定されるべきであり、前記の詳細な記述により限定又は制限されるべきではない。

【 0 1 8 1 】

本出願及び添付の特許請求の範囲中で用いられる場合、単数形“ a ”、“ a n ”及び“ t h e ”は、内容が明らかに他のように指定していなければ、複数の指示対象を含む。「複数の」（“ p l u r a l i t y ”）という用語は、内容が明らかに他のように指定していなければ、2つ以上の指示対象を含む。他に断らなければ、本明細書で用いられるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野における通常の熟練者が通常理解すると同じ意味を有する。

10

20

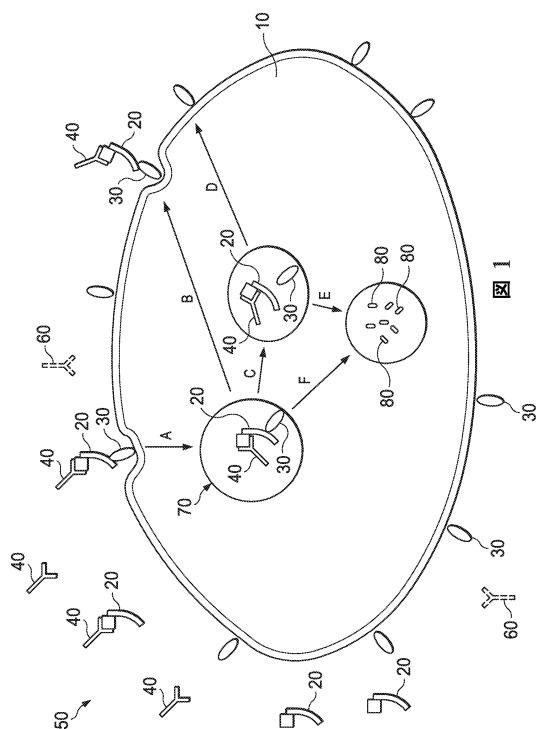
30

40

50

## 【図面】

## 【図 1】



## 【図 2 A - 2 F】

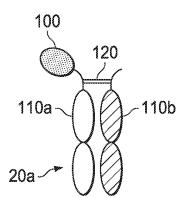


図 2A

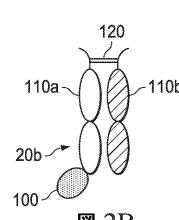


図 2B

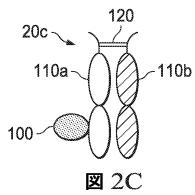


図 2C

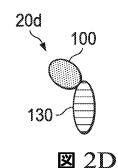


図 2D

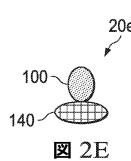


図 2E

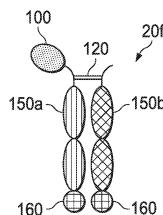


図 2F

## 【図 2 G - 2 J】

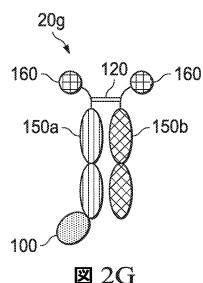


図 2G

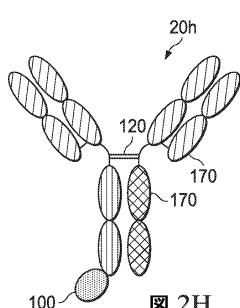


図 2H

## 【図 2 K - 2 N】

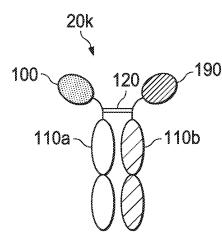


図 2K

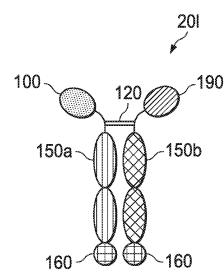


図 2L

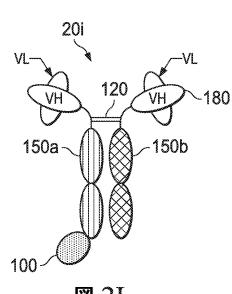


図 2I

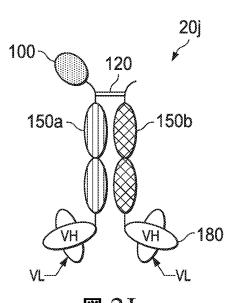


図 2J

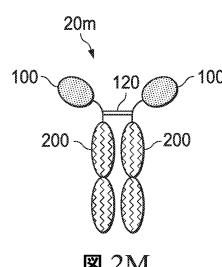


図 2M

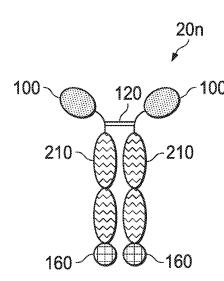


図 2N

10

20

30

40

50

【図 3 A】

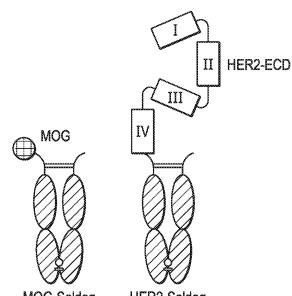


図 3A

【図 3 B】

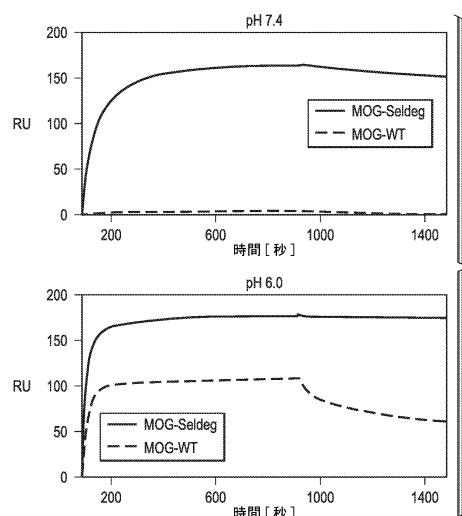


図 3B

【図 3 C】

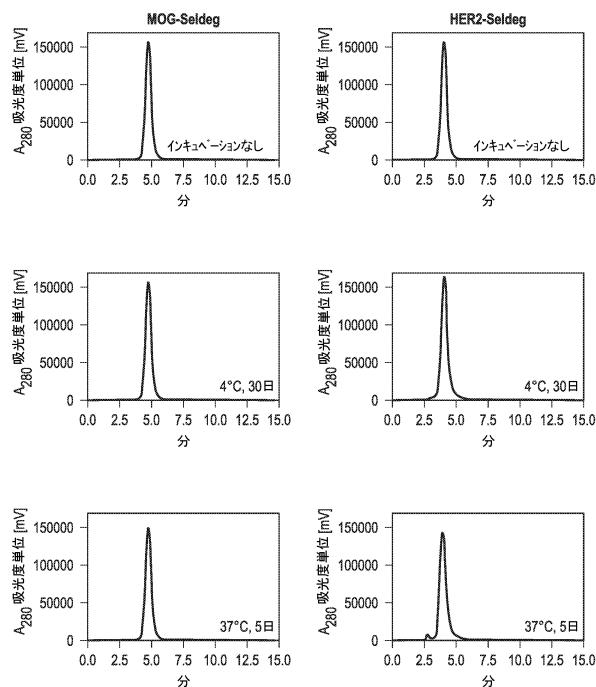


図 3C

【図 3 D】

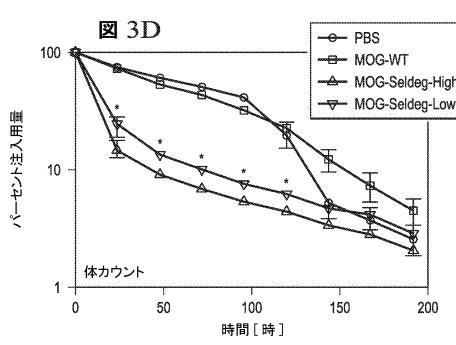


図 3D

10

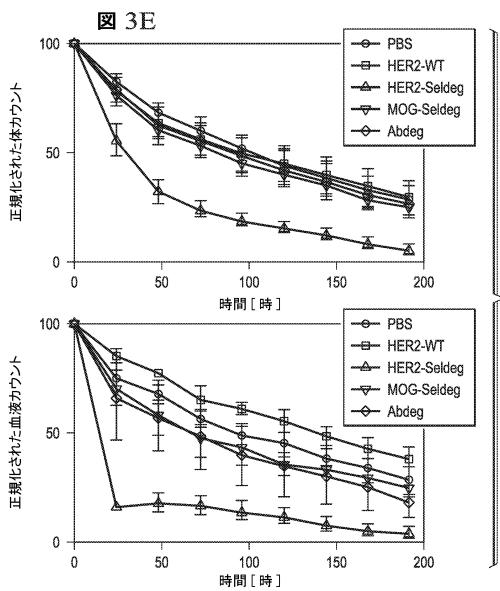
20

30

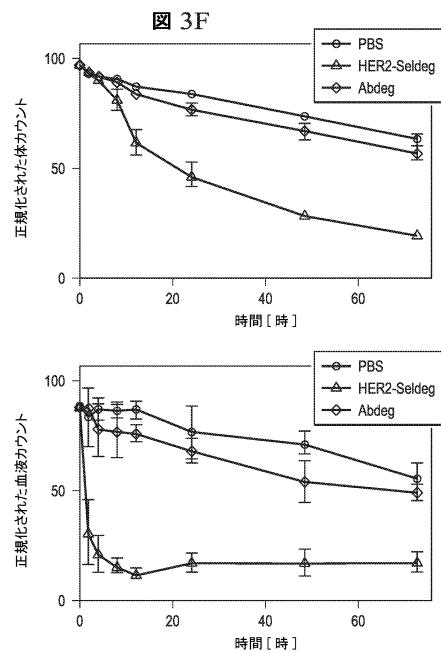
40

50

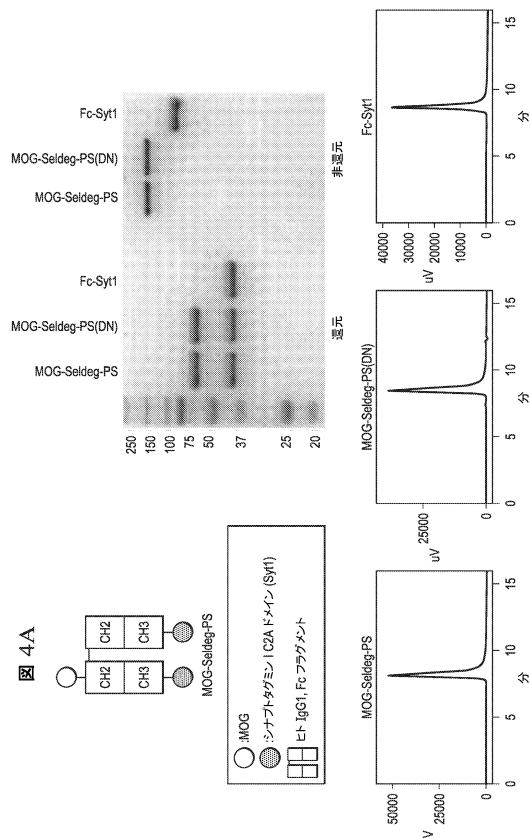
### 【図3E】



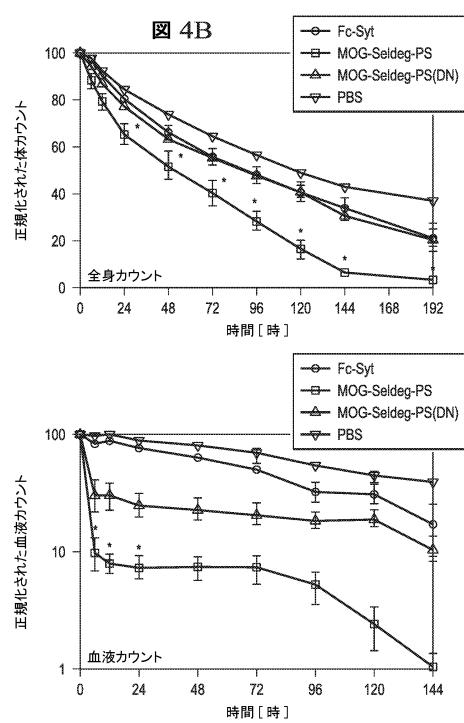
【図3F】



【図4A】



【図4B】



【図 5 A】

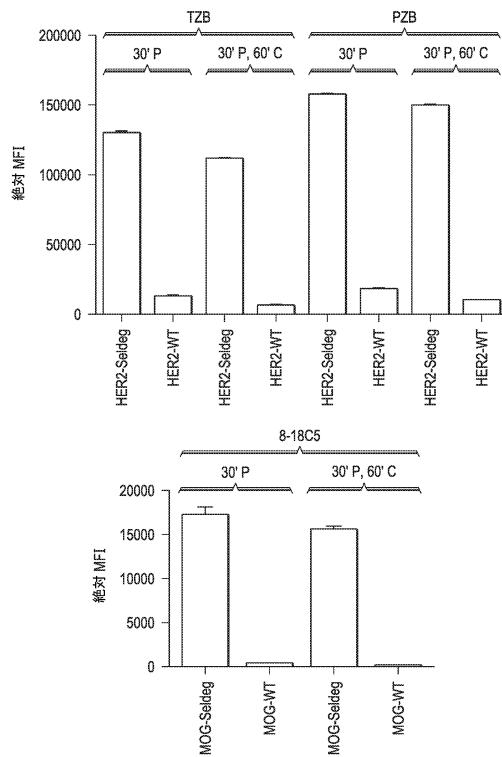


図 5A

【図 5 B】

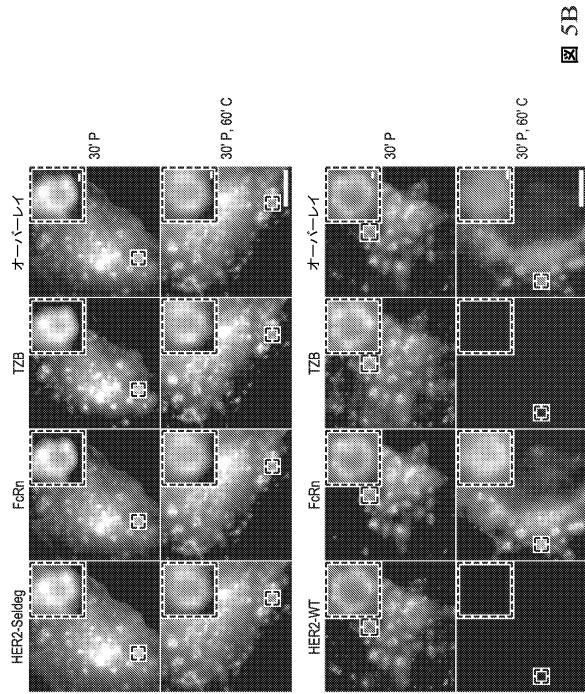


図 5B

10

20

30

40

【図 5 C】

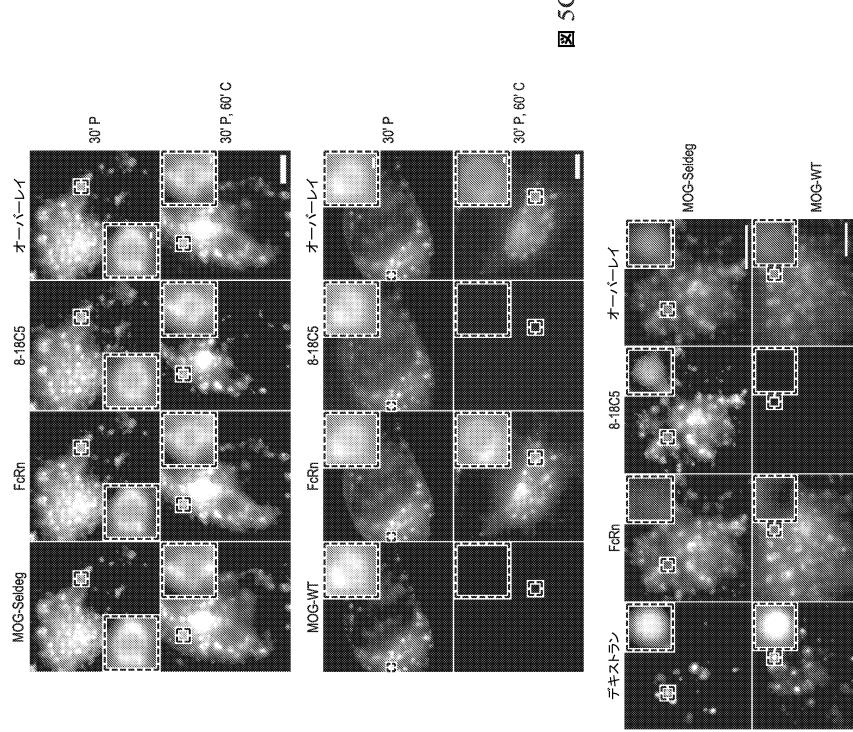


図 5C

【図 6 A - 6 B】

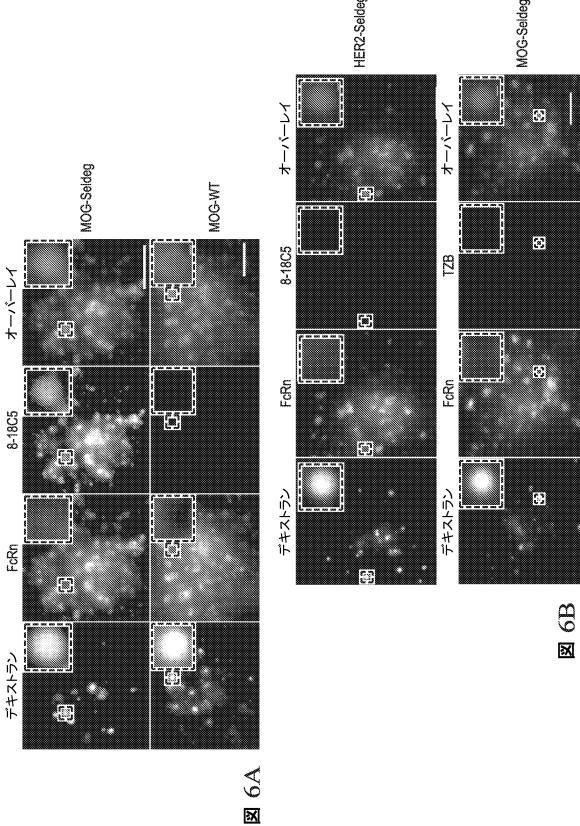


図 6B

50

【図 7】

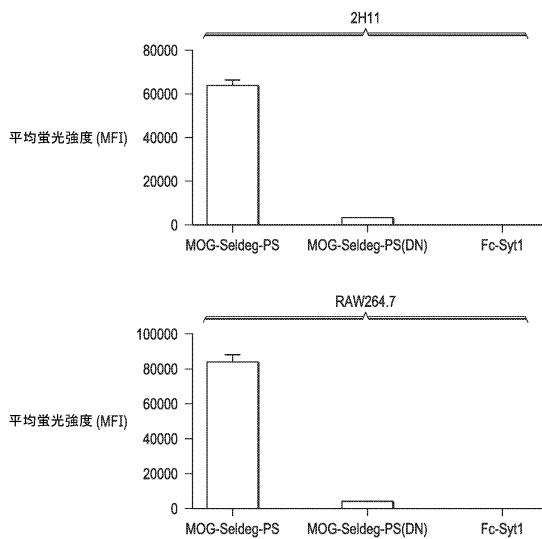
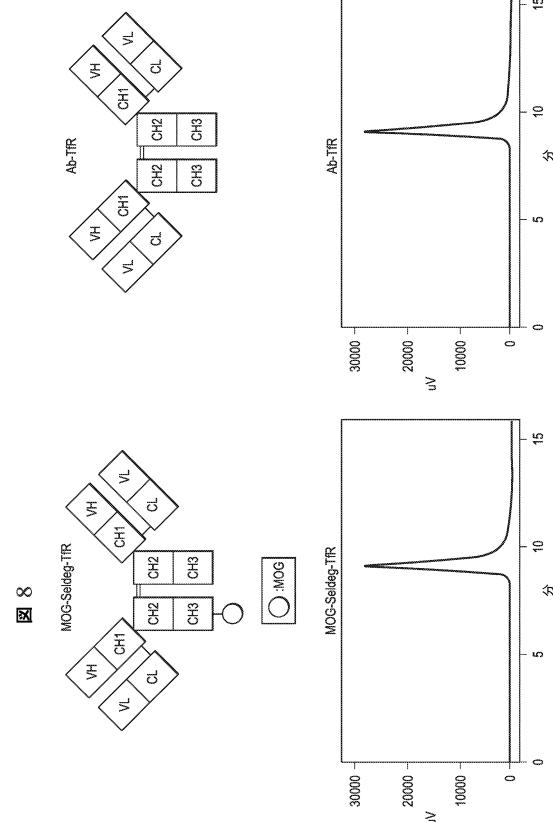


図 7

【図 8】



10

20

30

40

【図 9】

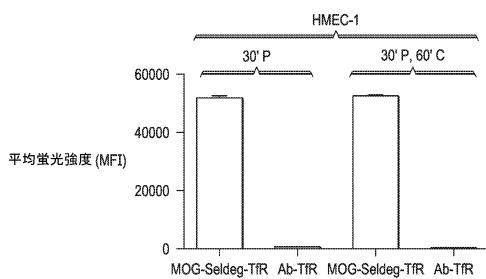


図 9

【図 10 A】

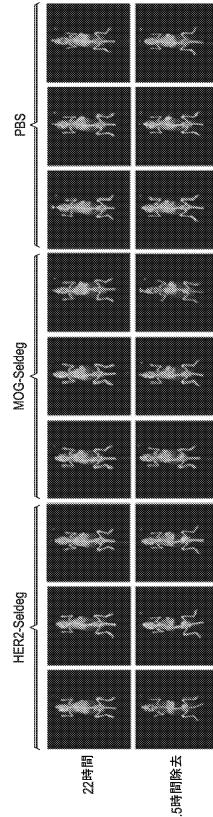


図 10A

50

## 【図 10B】

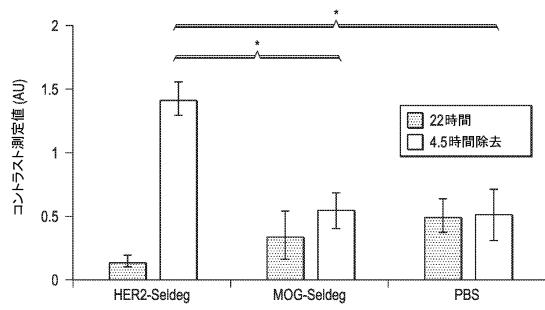


図 10B

10

## 【配列表】

00072957990000001.app

20

30

40

50

---

フロントページの続き

アメリカ合衆国テキサス州 77840 カレッジステーション・アパートメント 203・サウスウェストパークウェイ 503

(72)発明者 オーバー, ライムンド・ヨハネス

アメリカ合衆国テキサス州 77845 カレッジステーション・スプリングクリーク 8405

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表 2012-503007 (JP, A)

The International Journal of Biological Markers, 2004, Vol.19, No.3, p.213-220

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 07K 19/00

C 07K 14/47

C 07K 14/76

C 07K 16/28

C 12N 15/11

C Aplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

UniProt / GeneSeq

PubMed