

(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)

(86)(22)出願日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(65)公表番号 特表2020-500885(P2020-500885  
A)

(43)公表日 令和2年1月16日(2020.1.16)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/064186

(87)国際公開番号 WO2018/102668

(87)国際公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)

審査請求日 令和2年12月1日(2020.12.1)

(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)

(73)特許権者 504261103

ザ テキサス エー アンド エム ユニバ  
ーシティ システムアメリカ合衆国 テキサス州 カレッジ  
ステーション ティーエーエムユー 3 3  
6 9

(74)代理人 110000741

弁理士法人小田島特許事務所

(72)発明者 オーバー, エリザベス・サリー・ウォー  
ド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(72)発明者 デバナボイナ, ベンカタ・シバ・チャラ  
ン

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 d e g 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 ) I g G 2 又は I g G 4 由来の F c 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、 S e l d e g 。

【請求項 2】

前記標的成分は、 6 . 8 より高く且つ 7 . 5 未満の p H において 1 0 μ M 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 S e l d e g 。

【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 S e l d e g 。

【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 F c 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 F c 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 F c フラグメントは融合していない、請求項 3 に記載の S e l d e g 。

【請求項 5】

前記抗原成分が免疫グロブリン F c フラグメントのヒンジ - C H <sub>2</sub> - C H <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 F c フラグメントに融合している、請求項 1 に記載の S e l d e g 。

【請求項 6】

前記標的成分は、 S e l d e g 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 ( e n t r y ) 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 S e l d e g 。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の S e l d e g 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 F c R n 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、 S e l d e g 。

【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、シナプトタグミン 1 の C 2 A ドメインを含む、請求項 7 に記載の S e l d e g 。

【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 S e l d e g であって、

前記 S e l d e g 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 5 0 % をクリアランスするのに十分な量で患者に投与される、 S e l d e g 。

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】

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、

20

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】

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

40

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 - 117 ; 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 234 A、L 235 A、P 329 G ( E U ナンパリングシステム ) の変異、および F c R n への結合を増加させるための M 252 Y、S 254 T、T 256 E、H 433 K、N 434 F ( E U ナンパリングシステム ) 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 90 % 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 90 % 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】

【0001】

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】

【0002】

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。

【0003】

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】

【0004】

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。

## 【 0 0 0 5 】

S e l d e g 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に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。

## 【 0 0 0 6 】

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 5 0 % をクリアランスするのに十分な量で S e l d e g 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。

## 【 0 0 0 7 】

上記の S e l d e g s 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と組み合わせられる場合がある： i ) 標的成分は中性近辺の pH において 1 0  $\mu$  M 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； i i ) 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； i i i ) S e l d e g 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に構成される； i v ) 標的成分は 2 つの免疫グロブリン F c 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 F c 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 F c 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 F c フラグメントは F c 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； v i ) 免疫グロブリン F c フラグメントは F c 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； v i i ) 免疫グロブリン F c フラグメントを F c ガンマ受容体及び補体に結合するように構成することができる； v i i i ) 免疫グロブリン F c 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 F c フラグメントより高い F c R n に関する結合親和性を有するように修飾することができる； i x ) 抗原成分は、免疫グロブリン F c フラグメントのヒンジ - C H <sub>2</sub> - C H <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 F c 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 F c フラグメントを F c ガンマ受容体及び / 又は補体 ( C 1 q ) 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 F c フラグメントより低い F c ガンマ受容体及び / 又は補体 ( C 1 q ) への結合親和性を有するように修飾する場合がある； x i ) 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に構成される 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； x i i ) 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； x i i i ) 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； x i v ) 標的成分を、 S e l d e g 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 ( e n t r y ) 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する場合がある； x v ) 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； x v i ) 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； x v i i ) 抗原成分は化学反応を介して、リンカーを介して又は 1 つの組み合わせられた抗原成分 - 標的成分融合タンパク質の形成の間 ( d u r i n g f o r m a t i o n o f a s i n g l e c o m b i n e d a n t i g e n c o m p o n e n t - t a r g e t t i n g c o m p o n e n t f u s i o n p r o t e i n ) に標的成分に融合する場合がある； x v i i i ) 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 F c R n 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の場合がある； x i x ) 標的成分は、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又はナノボディーを含む場合がある； x x ) 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； $xxix$ ) 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； $xxii$ ) 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； $xxiii$ ) 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； $xiv$ ) 標的成分は、シナプトタグミン１のC2Aドメインを含む場合がある； $xv$ ) *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； $xvi$ ) *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； $xvii$ ) 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*Seldeg* を投与することを含む場合がある； $xviii$ ) 前記方法は、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*Seldeg* を投与することを含む場合がある； $ix$ ) 投与される*Seldeg* 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； $xx$ ) 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*Seldeg* を投与することを含む場合がある； $xxi$ ) 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*Seldeg* を投与する場合がある； $xxii$ ) 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*Seldeg* を再投与する場合がある； $xxiii$ ) *Seldeg* 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； $xxiv$ ) *Seldeg* 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； $xxv$ ) *Seldeg* 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； $xxvi$ ) *Seldeg* 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； $xxvii$ ) 自己免疫疾患に冒された患者に*Seldeg* 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； $xxviii$ ) 移植臓器を受け取った患者に*Seldeg* 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； $xxix$ ) 腫瘍画像化の間にコントラストを増すために*Seldeg* 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； $xl$ ) 生物学的製剤を受け取った患者に*Seldeg* 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； $xli$ ) 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*Seldeg* を患者に投与する場合があり、*Seldeg* 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； $xlii$ ) PET画像コントラスト剤を与えるために*Seldeg* を投与する場合がある； $xliii$ ) 標的抗原特異的抗体は抗MOG抗体の場合がある； $xliv$ ) 標的抗原特異的抗体は抗HER2抗体の場合がある； $lv$ ) *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、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； $lvi$ ) *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、

10

20

30

40

50

配列番号 16 プラス配列番号 18 プラス配列番号 20、配列番号 20 プラス配列番号 22 プラス配列番号 24、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有するタンパク質のヘテロダイマーを含む場合がある。

【0008】

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 (not 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】

【0009】

【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 (cellular events) の略図である；

【図2A】 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2B】 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2C】 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2D】 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2E】 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2F】 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2G】 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2H】 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2I】 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2J】 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2K】 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2L】 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2M】 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2N】 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3A】 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3B】 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 3 C】F c R n 標的化 S e l d e g の保存安定性を評価するための 4 ( 3 0 日 ) 及び 3 7 ( 5 日 ) におけるインキュベーション後の 2 つの代表的な F c R n 標的化 S e l d e g s の H P L C 分析を示す。

【図 3 D】代表的な正規化された体カウント ( b o d y c o u n t s ) 対時間を報告するグラフを示し、代表的な F c R n 標的化 S e l d e g による抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図 3 E】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 F c R n 標的化 S e l d e g による抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図 3 F】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 F c R n 標的化 S e l d e g による抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図 4 A】左上のパネルにおいて、ホスファチジルセリン ( P S ) に結合する標的タンパク質 ( シナプトタグミン 1 の C 2 A ドメイン、S y t 1 ) に融合した抗原を含む M O G - S e l d e g - P S と呼ばれる代表的な S e l d e g を示し；右上のパネルにおいて図 4 A は、M O G - S e l d e g - P S、P S への結合が実質的に減少する突然変異を有する M O G - S e l d e g - P S ( D N ) 及び抗原 ( M O G ) が結合していない F c - S y t 1 の組換えタンパク質の代表的な S D S - P A G E ゲル ( 還元及び非還元状態 ) を示し；下のパネルにおいて図 4 A は、右上の図 4 A に示される組換えタンパク質、M O G - S e l d e g - P S、M O G - S e l d e g - P S ( D N ) 及び F c - S y t 1 の代表的な H P L C 分布を示す；

【図 4 B】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 P S - 標的化 S e l d e g による抗原特異的抗体のクリアランスを示している；

【図 5 A】代表的な F c R n 標的化 S e l d e g s 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 5 B】標的抗原特異的抗体の存在下における代表的な F c R n 標的化 S e l d e g 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 5 C】標的抗原特異的抗体の存在下における代表的な F c R n 標的化 S e l d e g 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 6 A】標的抗原特異的抗体の存在下における代表的な F c R n 標的化 S e l d e g 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 6 B】S e l d e g 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 F c R n 標的化 S e l d e g 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 P S - 標的化 S e l d e g s 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 ( T f R ) 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 S e l d e g の略図である；抗原 ( M O G ) 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 H P L C 分布を示す；

【図 9】代表的 T f R - 標的化 S e l d e g 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 1 0 A】放射性標識された H E R 2 特異的抗体の送達及び代表的な F c R n 標的化 S e l d e g、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 ( P E T ) 分析の代表的な一連である。

【図 1 0 B】放射性標識された H E R 2 特異的抗体の送達及び代表的な F c R n 標的化 S

10

20

30

40

50



e l d e g、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 ( c o n t r a s t m e a s u r e s ) を報告するグラフを示す。

【 0 0 1 0 】

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渇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 S e l d e g s に関する。S e l d e g s 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。S e l d e g 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。

10

【 0 0 1 1 】

抗原特異的抗体が抗原成分に結合すると、S e l d e g 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、S e l d e g、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 ( i n t e r n a l i z a t i o n ) 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。

20

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

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。

【 0 0 1 4 】

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。

30

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

S e l d e g は、I g G 抗体のF c フラグメント ( 本明細書で「免疫グロブリンF c フラグメント」とも呼ばれる ) に融合した抗原、F c R n 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F c R n に結合し、抗原に融合しているF c R n 特異的抗体、アルブミン - 抗原融合タンパク質、P S 結合性タンパク質、T f R 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。

40

【 0 0 1 7 】

本明細書に説明されるS e l d e g s の例は、中性近辺のpHにおいて10  $\mu$  M 未満の親和性 ( 解離定数 ) を以てヒトF c R n、露出したホスファチジルセリン ( P S ) 又はトランスフェリン受容体 ( T f R ) 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。

【 0 0 1 8 】

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ボタンパク質受容体、高密度リボタンパク質受容体、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., Zandsstra, P., Wollscheid, 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>)。

10

#### 【0019】

20

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Seld eg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Seld eg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。

30

#### 【0021】

Seld eg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、Seld eg 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Seld eg 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Seld eg 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。Seld eg 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、Seld eg 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、Seld eg 20から同じ又は別のSeld eg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、Seld eg 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Seld

40

50

d e g s の場合、S e l d e g 2 0 と抗体 4 0 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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の故に受容体又は他の分子 3 0 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 4 0 に結合した S e l d e g 2 0 はリソソーム中に入り、経路 E においてフラグメント 8 0 に分解する。いくつかの S e l d e g s の場合、細胞 1 0 中への移行に続くいくつかの時点で、S e l d e g 2 0 及び標的抗原特異的抗体 4 0 が結合した受容体又は分子 3 0 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 4 0 はフラグメント 8 0 に分解する。このリソソーム中への進入は、S e l d e g 2 0 が受容体又は分子 3 0 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

#### 【 0 0 2 3 】

選択的枯渴のこの機構を介し、S e l d e g 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、体から選択的に枯渴させる。

#### 【 0 0 2 4 】

特に本明細書に説明される S e l d e g は、標的とされない特異性の抗体の枯渴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、体から選択的に枯渴させることができる。そのような不利な臨床的影響には、例えば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（l o w p l a t e l e t c o u n t s）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

#### 【 0 0 2 5 】

一般に本開示に従う S e l d e g s 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。例えば特異的に結合するために、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、E L I S A、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

#### 【 0 0 2 6 】

従って S e l d e g 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。

#### 【 0 0 2 7 】

本開示に従う S e l d e g 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 S e l d e g 当たり 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 F c 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せられて、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される。特に S e l d e g s の少なくとも 9 9 %、S e l d e g s の少なくとも 9 9 . 5 % 又は S e l d e g s の少なくとも 9 9 . 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 S e l d e g 当たり 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 S e l d e g s 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。S e l d e g 分子当たり 1 つの抗原の分子を含有する S e l d e g s が結合する抗体の 2 価性（b i v a l e n t n a t u r e）は、抗体当たり 2 つの S e l d e g 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 S e l d e g - 抗体複合体のリソソーム送達の有効性を向上させるとされる。

40

50

## 【 0 0 2 8 】

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 S e l d e g s 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。

## 【 0 0 2 9 】

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

## 【 0 0 3 0 】

従って S e l d e g s 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。

## 【 0 0 3 1 】

さらに S e l d e g s は、ヒトに投与する場合の S e l d e g 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 S e l d e g 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 S e l d e g 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。 S e l d e g 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

## 【 0 0 3 2 】

図2Aは、I g G の F c 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 S e l d e g 20aの活性の略図である。当業者が理解する通り、I g G の F c フラグメントは抗体のY形の基部 ( l o w e r b a s e ) 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C H 2 及びC H 3 ドメインである。 S e l d e g はヒンジ領域を有していないF c 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F c フラグメントを有する場合がある。F c フラグメント110は S e l d e g 20a が F c R n 発現細胞上の F c R n 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 - C H 2 - C H 3 120のN末端においてF c フラグメント110aに融合する場合がある。抗原100をF c フラグメント110aに融合させ、得られる抗原 - F c フラグメントをノブズイントゥホールズ ( k n o b s - i n t o - h o l e s ) 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 . , ( 2 0 1 1 ) . A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and

30

monovalent co-engagement of distinct target antigens . M A b s 3 , 5 4 6 - 5 5 7 に説明されているような)を用いて抗原のない別のF c 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 S e l d e g 分子20aが生産される。 S e l d e g 20aは抗原100がモノマー的に表示されたF c 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。F c フラグメント110aに融合した抗原100のみを含む S e l d e g s 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、F c 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F c フラグメント110aが融合

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、Seldeg s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

10

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末端の間における(G4S)<sub>13</sub>リンカーペプチドの挿入(例えばZhou, L., Wang, H.-Y., Tong, S., Okamoto, 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Seldeg s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。

20

#### 【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., 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)ならびにT366W:T366S:L368A/Y407V(例えばAtwell, S., Ridgway, J. B. B., Wells, J. A., Carter, P (1997) Stabel 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。

30

40

#### 【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

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., Dasjarlais, 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 antigens. 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 Fc Rs. 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 Fc Rs. 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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., Mossner, E. (2016) Novel human IgG1

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., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, 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. P E D S , 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レルギー突然変異又は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(ablate)の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Jefferys, 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., Mulkerin, 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】

Seldeg s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、Seldeg sは、Seldeg 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10 µM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Seldegがその結合した標的抗原特異的抗体を有効に移行させ、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に関する実質的に高い結合親和性を有する。この性質は、FcRn発現細胞

内における I g G の再循環及び輸送のために必須である。対照的に、p H 7 . 4 における F c R n 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。

【 0 0 4 0 】

F c フラグメント 1 1 0 を修飾して、F c ガンマ受容体及び補体 ( C 1 q ) 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、多量体の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 1 0 に説明する通り、F c 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 F c ガンマ受容体に結合しないようにすることができる ( G 2 3 6 R / L 3 2 8 R ; E U ナンバリング ) ( 例えば Moore , G . L . , Bautista , C . , Pong ,

10

E . , Nguyen , D . H . , Jacinto , J . , Eivazi A . , Much hal , U . S . Karki , S . , Chu , S . Y . , Lazar , G . A . ( 2 0 1 1 ) . A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co - engagement of distinct target antigens . M A b s 3 , 5 4 6 - 5 5 7 に説明されている通り ) ( E U ナンバリング ) 。実施例 1 0 において、これらの突然変異は F c - S y t 1 の残基 2 2 及び 1 1 4 ( 配列番号 1 0 を参照されたい ) ならびに M O G - S e l d e g - P S の残基 1 4 4 及び 2 3 6 ( 配列番号 8 を参照されたい ) に相当する。F c 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 2 9 7 A 又は N 2 9 7 Q ( E U ナンバリング ; 例えば Tao , M - H . , Morrison , S . L . ( 1 9 8 9 ) Studies of aglycosylated

20

chimeric mouse - human IgG : role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region . J . Immunol . , 1 4 3 , 2 5 9 5 - 2 6 0 1 ; Lux , A . , Yu , X . , Scanlan , C . N . , Nimmerjahn , F . ( 2 0 1 3 ) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human Fc Rs . J . Immunol . , 1 9 0 , 4 3 1 5 - 4 3 2 3 に説明されているような ) 、 D 2 6 5 A ( E U ナンバリング ; 例えば Lux , A . , Yu , X . , Scanlan , C . N . , Nimmerjahn , F . ( 2 0 1 3 ) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human Fc Rs . J . Immunol . , 1 9 0 , 4 3 1 5 - 4 3 2 3 ; Clynes , R . A . , Towers , T . L . , Presta , L . G . , Ravetch , J . V . ( 2 0 0 0 ) Inhibitory Fc receptors

30

modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets . Nat . Med . 6 , 4 4 3 - 4 4 6 に説明されているような ) 、 L 2 3 4 A / L 2 3 5 A ( E U ナンバリング ; 例えば Wins , B . D . , Powell , M . S . , Parren , P . W . H . I . , Barnes , N . , Hogarth , P . M . , ( 2 0 0 0 ) The IgG Fc contains distinct Fc receptor ( FcR ) binding sites : the leukocyte receptors Fc RI and Fc RI Ia bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein . A . J . Immunol . , 1 6 4 , 5 3 1 3 - 5 3 1 8 に説明されているような ) 、 L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / P 3 2 9 G ( E U ナンバリング ; 例えば Schlothauer , T . , Hert er , S . , Koller , C . F . , Grau - Richards , S . , Steinhart , V . , Spick , C . , Kubbies , M . , Klein , C . , Umana , P . , Mossner , E . ( 2 0 1 6 ) Novel human IgG1 a

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、Seld eg 20b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、Seld eg 20c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。

#### 【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。

#### 【0043】

図2Dは、抗原100が抗体可変領域130に結合しているSeld eg 20d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パー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GSSGGSGGGG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Seld eg s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、Seld eg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(

10

20

30

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 S G G G S [ ( G 4 S ) <sub>3</sub> ] 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 のライブラリから単離され得る。 S e l d e g 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ブ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ブ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 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。これらのライブラリをファージ又は酵母上に表示し ( d i s p l a y e d ) 、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 1 3 0 の末端位置における抗原 1 0 0 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 1 0 0 は、化学結合を介する結合、リンカーを介する結合又は 1 つの組み合わせられた抗原 - 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 1 1 0 に融合する場合がある。

#### 【 0 0 4 5 】

S e l d e g 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、 S e l d e g 2 0 e 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 1 4 0 に融合した抗原 1 0 0 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ブ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 1 4 0 の非末端位置における抗原 1 0 0 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 1 0 0 は、化学結合を介する結合、リンカーを介する結合又は 1 つの組み合わせられた抗原 - 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 1 4 0 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 1 5 0 の N 末端に結合した抗原 1 0 0 を含む代表的な S e l d e g 2 0 f 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 1 6 0 が F c フラグメント 1 5 0 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 1 5 0 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 1 0 0 を有する F c フラグメント 1 5 0 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、

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ノ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 1 5 0 a 及び 1 5 0 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 1 0 0 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 1 6 0 はそれぞれ F c フラグメント 1 5 0 a 及び 1 5 0 b の C 末端及び N 末端に融合し、S e l d e g 2 0 g を形成している。  
【 0 0 4 7 】

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 1 7 0 の C 末端に結合した抗原 1 0 0 を含む代表的な S e l d e g 2 0 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 1 0 0 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ノ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 1 0 0 が結合した抗体重鎖は抗体分子当たり 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。

20

【 0 0 4 8 】

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 ( 1 8 0 ) - F c 融合体の C 末端に結合した抗原 1 0 0 を含む代表的な S e l d e g 2 0 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 1 0 0 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ノ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 1 0 0 が結合した抗体重鎖 - s c F v 融合体は分子当たり 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

【 0 0 4 9 】

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 ( 1 8 0 ) 融合体の N 末端に結合した抗原 1 0 0 を含む代表的な S e l d e g 2 0 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 1 0 0 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ノ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 1 0 0 が結合した抗体重鎖 - s c F v 融合体は分子当たり 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

【 0 0 5 0 】

図 2 K に示す通り、代表的な S e l d e g 2 0 k において 2 つの抗原成分 ( 1 0 0 、 1 9 0 ) が標的成分、例えば F c フラグメント 1 1 0 a 及び F c フラグメント 1 1 0 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

ウーホールズ及びノ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 S e l d e g 分子中にそれぞれの型の抗原分子 ( 1 0 0 、 1 9 0 ) がある。

【 0 0 5 1 】

図 2 L は F c フラグメント 1 5 0 の N 末端に結合した抗原 1 0 0 及び抗原 1 9 0 を含む代表的な S e l d e g 2 0 l の略図である。図 2 L 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 1 6 0 は F c フラグメント 1 5 0 a 及び 1 5 0 b の C 末端に結合している。図 2 L 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ノ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 S e l d e g 分子中にそれぞれの型の抗原分子 ( 1 0 0 、 1 9 0 ) がある。図 2 L において、F c フラグメント 1 5 0 a 及び 1 5 0 b 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

【 0 0 5 2 】

図 2 M に示す通り、代表的な S e l d e g 2 0 m において同じ抗原 ( 1 0 0 ) の 2 つの分子が F c フラグメント 2 0 0 に N 末端又は他の位置において結合し、代表的な S e l d e g 2 0 m を形成する場合がある。この代表的な S e l d e g は F c R n 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ノ又は静電ステアリング突然変異を含有しない。

20

【 0 0 5 3 】

図 2 N は F c フラグメント 2 1 0 の N 末端に結合した同じ抗原 ( 1 0 0 ) の 2 つの分子を含む代表的な S e l d e g 2 0 n の略図である。図 2 N 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 1 6 0 は F c フラグメント 2 1 0 の C 末端に結合している。この代表的な S e l d e g はホモダイマーであり、ノブズイントゥーホールズ及びノ又は静電ステアリング突然変異を含有しない。図 2 N において、ホモダイマー的 F c フラグメント 2 0 0 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

【 0 0 5 4 】

F c R n を標的とする S e l d e g s のために、類似の原理を F c R n 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、F c R n 標的化 S e l d e g 又はその形成方法は F c R n 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 F c R n 結合タンパク質は形成する場合があり、その場合には各 S e l d e g 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 S e l d e g を形成する場合がある。図 2 A 、 2 B 、 2 C 、 2 F 、 2 G 、 2 H 、 2 I 、 2 J 、 2 K 、 2 L に示す例において、S e l d e g はノブズイントゥーホールズ及びノ又は静電ステアリング突然変異を用いて、1 つの F c フラグメントに連結した 1 つの抗原を含み、1 つの F c 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 ( d r i v e ) ように改変された 2 つの抗体 F c フラグメントを有する。F c 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 F c R n に結合するように改変することができるか ( 図 2 A 、 2 B 、 2 C 、 2 K 、 2 M ) 、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、s c F v フラグメント、F a b フラグメント又は他の分子に連結することができる ( 図 2 F 、 2 G 、 2 H 、 2 I 、 2 J 、 2 L 、 2 N ) 。図 2 F 、 2 G 、 2 H 、 2 I 、 2 J 、 2 L 、 2 N に示す例における F c フラグメントを、より高い親和性で F c R n に結合するように改変し、それらが F c R n 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

【 0 0 5 5 】

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FcRn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Seld egの再循環を促進することもある。類似して、抗体可変領域FcRn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FcRn結合タンパク質は免疫グロブリン可変ドメイン、scFv(VHとVLドメインがGGGSGGGSGGGG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VH:VLヘテロダイマー)又はFabフラグメントのライブラリから、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。これらのライブ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(CDRs)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」ライブ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、例えばエラーブローンPCRを用いてCDRs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CDR残基は軽鎖可変ドメインのCDR3(残基89-97; Kabatナンバリング)及び重鎖可変ドメインのCDR3(残基95-102; Kabat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(scaffold)に基づくタンパク質を単離することができる。

10

20

#### 【0056】

Seld eg 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ずれかの標的成分を含む場合もある(図2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2L又は2N)。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Seld egは1つより多い抗原の型を含むことができ、ここで各Seld eg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Fcフラグメントを含有する場合、Fc領域を、それがFc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。Seld eg sのいくつかの異なる可能な構成を図2A-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

#### 【0057】

Seld eg sはFcガンマ受容体及び補体に結合するFcフラグメントを含む場合がある。Fc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、Seld eg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、Fcガンマ受容体及び補体に結合するように構成されるSeld eg 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Fcガンマ受容体及び/又は補体(C1q)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Fcフラグメントを含むSeld eg 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。Fcガンマ受容体及び/又は補体(C1q)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Fcフラグメントを含むSeld eg 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Seld eg sを、Seld eg当たり1つより多い同じ型の抗原分子を含むように構成し(図2K、2L、2M又は2N)、免疫複合体形成を強化する場合もある。

40

#### 【0058】

例えばSeld eg sは標的ドメイン又は抗体フラグメント(例えばFabフラグメント又はscFv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）；S e l d e g s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I E G R M D、G G G G S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；S e l d e g s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；S e l d e g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】

S e l d e g s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（M O G）、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g p 39、g p 130 - R A P S、65k D a熱ショックタンパク質、フィブリリン、小核タンパク質（s n o R N P）、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g p 70、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（N M D A）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（A M P A）受容体、G A B A<sub>A</sub>及びG A B A<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（D P P X）、グルタメート受容体（G l u R 5）、電位依存性カリウムチャンネル、H u、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（T S H）受容体、甲状腺ホルモンT3及びT4、デスモグレイン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S e l d e g s中に導入され得る：H E R 2、前立腺特異的膜抗原（P S M A）、前立腺幹細胞関連抗原（P S C A）、c - M e t、E p C A M、癌胎児性抗原（C E A）。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S e l d e g s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、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、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】

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、

10

20

30

40

50

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 と少なくとも 50 % 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。

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

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び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100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。

【0066】

40

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 GenBank 及び Uniprot 及び当業者が同定可能な他のデータベース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。

【0067】

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 CL

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。

【0068】

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。

【0069】

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/改変された形態の場合がある。

【0070】

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（t r a s t u z u m a b）又はペルツズマブ（p e r t u z u m a b）（“T Z B”又は“P Z B”）及びM O G特異的抗体（“8 - 18 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。

【0071】

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、治療薬の送達のため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。

【0072】

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ず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変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、遺伝子改変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、細胞を遺伝子改変することができる。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】

Seledogs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Seledogs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Seledogs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Seledogs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る、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、Seledogs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Seledogs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。Seledogs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】

Seledogs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とき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、Seledogs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Seledogs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、Seledogs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 S e l d e g s 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 S e l d e g s 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】

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 S e l d e g s を投与する場合がある。体内における S e l d e g s 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。S e l d e g s 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 S e l d e g の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 S e l d e g s 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 S e l d e g 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 S e l d e g を投与することができる。特に例えば S e l d e g 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 S e l d e g を投与することができる。

【発明を実施するための形態】

【0079】

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 S e l d e g s の発現及び精製

細胞上の F c R n を標的とする S e l d e g s 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 S e l d e g 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 3 A) 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 S e l d e g s 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。

【0081】

代表的な H E R 2 - S e l d e g (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 - 4 7 4) 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 (o v e r l a p e x t e n t i o n) によるスプライシングを用いて I E

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 ; E U 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 ; E U 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 ; E U 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 ; E U 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 ; E U 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、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 及び 20 ) 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も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 ; E U ナンバリング ) が無いことを除いて 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 μ 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続いてフローセル ( 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

MST-HNのようなFcRn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：FcRn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Fc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Fc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イ法（Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Matesso, 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., Brewah, 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、FcRnに関する結合親和性が向上したFc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FcRnに関するより高い親和性を有するFc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、Seldogs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】

- FcRnを標的とするSeldogsが形質転換によりヒトFcRsを発現するマウス(huFcRマウス)において標的抗原特異的抗体を枯渇させる能力

Seldogs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FcRsを発現するマウス(huFcR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15µgの放射性標識された(<sup>125</sup>I標識された)MOG特異的抗体8-18C5を注入した。huFcRマウスに8-18C5を注入してから24時間後、注射を介して125µg又は31µgのMOG-Seldog又は参照標準タンパク質を投与した。図3Dにおいて、“MOG-Seldog-High”は125µgの用量に対応し、“MOG-Seldog-Low”は31µg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FcRn強化MST-HN突然変異を欠いていることを除いてMOG-Seldog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、指示される時間にとった。8-18C5投与から24時間後、Seldog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。

## 【 0 0 8 8 】

MOG - S e l d e g の 1 2 5  $\mu$  g 及び 3 1  $\mu$  g の用量は、マウスにおいて I g G レベルを全体的に排除することが示された 5 0 0  $\mu$  g , M S T - H N A b d e g の用量より約 2 ないし 8 倍低い ( 2 t o 8 - f o l d l o w e r ) ( モルに基づいて ) 。 そのように比較的低い MOG - S e l d e g の用量は、F c R n 結合に関する S e l d e g との競争を介する融合した抗原に関して特異的でない I g G s への影響を最小にするために用いられた。1 2 5  $\mu$  g 又は 3 1  $\mu$  g の用量は、8 - 1 8 C 5 標的抗原特異的抗体よりそれぞれ 1 6 倍及び 4 倍モル過剰を意味する。

## 【 0 0 8 9 】

図 3 D は、時間に対する放射性標識された 8 - 1 8 C 5 ( 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 - S e l d e g の投与は、正規化された全身カウントにおいて 8 - 1 8 C 5 の急速な用量依存性減少を生じ ( 図 3 D ) 、それは体から 8 - 1 8 C 5 を選択的に枯渇させる MOG - S e l d e g の能力を示す。対照的に、F c R n 強化 M S T - H N 突然変異を欠いた参照標準 MOG - W T の注入は、8 - 1 8 C 5 抗体枯渇に影響を有していなかった。これは、p H 6 . 0 - 7 . 4 における F c R n に関する高い結合親和性を与えるための M S T - H N 突然変異の重要性を示す。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 9 0 】

- F c R n を標的とする S e l d e g 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

S e l d e g 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に、H E R 2 特異的抗体 T Z B の行動を H E R 2 - S e l d e g 及び MOG - S e l d e g の両方の存在下で調べた ( 図 3 E ) 。図 3 E のデータを作成するために、h u F c R マウスに 1 5  $\mu$  g の放射性標識された (  $^{125}$  I 標識された ) T Z B を静脈内注射し、続いて 4 倍モル過剰の H E R 2 - S e l d e g 又は抗原特異性に関する参照標準として MOG - S e l d e g 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 ( “ P B S ” ) 、A b d e g 及び中性近辺の 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 突然変異を欠いていること以外は H E R 2 - S e l d e g に類似の構築物 ( “ H E R 2 - W T ” ) を作製するために F c フラグメントに融合した H E R 2 を含む組換え融合タンパク質である。S e l d e g と対照的に、“ A b d e g ” は M S T - H N 突然変異を有するヒト I g G 1 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 I g G 分解を引き起こす抗体なので A b d e g s と呼ばれる。

## 【 0 0 9 1 】

図 3 E 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とった。T Z B 投与から 2 4 時間後、S e l d e g 又は参照標準送達の前直前に得られる分当たりのカウント ( “ C P M ” ) を各マウスに関する 1 0 0 % とみなし、その後得られる血液及び全身の C P M 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、 $p < 0 . 0 5$  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。

## 【 0 0 9 2 】

図 3 E は、時間に対する放射性標識された T Z B ( 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。H E R 2 - S e l d e g 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 T Z B 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 T Z B を選択的に枯渇させる H E R 2 - S e l d e g の能力を示す。対照的に、参照標準タンパク質は P B S 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 3 E ) 。

## 【 実施例 4 】

## 【 0 0 9 3 】

- 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急速に枯渇させる能力  
マウスに放射性標識された (  $^{125}$  I 標識された ) T Z B ( 1 5  $\mu$  g ) を静脈内注射し、

24時間後にHER2-Seledeg (51 µg ; 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 (60 µg)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行った。TZB投与から24時間後、Seledeg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-Seledeg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-Seledegの能力を示す。注目すべきことに、TZBの血液カウントはSeledeg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-Seledegの能力をさらに支持している。対照的に、60 µg / 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)。

#### 【実施例5】

20

#### 【0096】

- 細胞表面上の露出したホスファチジルセリン(PS)を標的とするSeledeg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SeledegがhuFc R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、Seledegはそのため設計されたMOG-Seledeg-PSであり、略図的に示される(図4A)。<sup>1</sup>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-Seledeg-PS(DN)も作製した。MOG-Seledeg-PS及びMOG-Seledeg-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; 15-20 µg)を静脈内注射し、24時間後にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、40 µgのMOG-Seledeg-PS又は参照標準として34 µgのFc-Syt1(MOGが結合していない)又は40 µgのMOG-Seledeg-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-Seledeg-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-Seledeg-PS処置グループと参照標準グループ(Fc-Syt1、MOG-Seledeg-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-Seledeg-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-Seledeg-PSの能力を示す。対照的に、参照標準

50

タンパク質 Fc-Sy t 1 は PBS 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-Seledeg-PS(DN) は 8-18C5 における低下を誘導したが(PS への残留結合の故に)、影響は MOG-Seledeg-PS のそれよりずっと低かった(図 4B)。

#### 【実施例 6】

##### 【0099】

-FcRn を標的とする Seledeg 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 Seledeg 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 8-18C5 の移行及び堆積への Seledeg s の効果を分析した。最初に結合性がマウス FcRn に類似であるように突然変異したヒト FcRn-GFP 発現構築物を用いてヒト内皮細胞(HMEC-1)をトランスフェクションした。

##### 【0100】

Seledeg 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。

##### 【0101】

図 5A は平均蛍光強度(“MFI”)のグラフであり、図 5B 及び図 5C は標的抗原特異的抗体の存在下における Seledeg 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 5A はそれぞれ HER2-Seledeg s と一緒に Alexa 647 標識された T Z B 及び MOG-Seledeg と一緒に Alexa 647 標識された 8-18C5 の存在下におけるより大きな MFI を示す。このより大きな MFI は、T Z B 及び 8-18C5 とのそれぞれ HER2-及び MOG-Seledeg の共-インキュベーション(400nM の Seledeg 又は WT 参照標準プラス 100nM の抗原特異的抗体; 30 分のパルス、追跡なし又は 60 分の追跡、図 5A、5B 及び 5C においてそれぞれ 30' P 又は 30' P, 60' C と標識)が T Z B 及び 8-18C5 進入細胞の高いレベルを生ずることを示す。HER2-Seledeg の存在下で T Z B の代わりに HER2 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 5A)。さらに、各標的抗原特異的抗体の大部分は 60 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 HER2-WT(T Z B 又は P Z B に関して選択的)及び MOG-WT(8-18C5 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。

##### 【0102】

図 5B 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 Seledeg s の存在下におけるエンドソーム中の FcRn と関連していることを示す。図 5B の顕微鏡画像の作成のために、400nM の Alexa 555 標識された HER2-Seledeg 又は HER2-WT(示される通り)との複合体における 100nM の Alexa 647 標識された T Z B(HER2 特異的)を用いて HMEC-1 細胞を 30 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 60 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 5C 中のデータは、400nM の Alexa 555 標識された MOG-Seledeg 又は MOG-WT との複合体における 100nM の Alexa 647 標識された 8-18C5(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 5µm であり、それぞれの顕微鏡画像差し込み図中のバーは 0.25µm である。図 5B 及び 5C に示されるデータは、抗原特異的抗体が参照標準(WT)タンパク質の存在下と比較して FcRn に結合する Seledeg s の存在下で実質的により高いレベルまで FcRn 発現細胞中に堆積することを示している。

##### 【0103】

図 6A は標的抗原特異的抗体の存在下における Seledeg 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。

図 6 A のために A l e x a 555 標識されたデキストランを用いて H M E C - 1 細胞を 2 時間予備パルスし、洗浄し、次いで 400 n M の M O G - S e l d e g 又は M O G - W T (示される通り)との複合体における 100 n M の A l e x a 647 標識された 8 - 18 C 5 (M O G 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、A l e x a 555 標識されたデキストランを用いて H M E C - 1 細胞を 2 時間予備パルスし、洗浄し、次いで 100 n M の A l e x a 647 標識された T Z B 又は 8 - 18 C 5 抗体及び 400 n M の M O G - S e l d e g 又は H E R 2 - S e l d e g (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 (o v e r l a y i m a g e) (右の列に示す)のために、G F P、A l e x a 555 及び A l e x a 647 をそれぞれ緑、赤及び青に疑似着色した (p s e u d o - c o l o r e d)。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 0.25  $\mu$ m である。注目すべし、図 6 B はそれぞれ M O G - S e l d e g 又は H E R 2 - S e l d e g の存在下で細胞がリソソーム中に T Z B 及び 8 - 18 C 5 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 S e l d e g 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、M O G - S e l d e g - P S が M O G 特異的抗体 (キメラ 8 - 18 C 5) 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 P S 結合依存性であることを示す。P S を露出させた内皮細胞 (2 H 1 1) 又はマクロファージ (R A W 2 6 4 . 7) を、20 n M の M O G - S e l d e g - P S、M O G - S e l d e g - P S (D N) 又は F c - S y t 1 (M O G なし) と混合された 10 n M の A l e x a 647 標識されたキメラ 8 - 18 C 5 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 A l e x a 647 標識されたキメラ 8 - 18 C 5 (マウス抗体、8 - 18 C 5 の可変ドメインを当業者に周知の方法を用いてヒト I g G 1 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 (M F I) 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 P S 結合 S e l d e g 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 P S 標的化 S e l d e g 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 を含むもののような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 P S 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 S e l d e g 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 (M O G) を含む S e l d e g (M O G - S e l d e g - T f R) を作製し、図 8 に略図的に示す。M O G - S e l d e g - T f R 及び参照標準抗体、A b - T f R (M O G が存在しない) を、トランスフェクションされた H E K - 293 F 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。M O G - S e l d e g - T f R は M O G 特異的抗体 (キメラ 8 - 18 C 5) を有効に内皮 (H M E C - 1) 細胞中に移行させ、吸収は S e l d e g 中の M O G の存在に依存性である (図 9)。ヒト T f R を発現する H M E C - 1 細胞を、200 n M の M O G - S e l d e g - T f R 又は T f R 特異的抗体 (A b - T f R ; M O G なし) と混合された 50 n M の A l e x a 647 標識されたキメラ 8 - 18 C 5 (M O G 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



）。三重の試料に関する A l e x a 647 標識された 8 - 18 C 5 の平均蛍光強度 ( M F I ) 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】

- F c R n を標的とする S e l d e g 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 B A L B / c S C I D マウスに、H E R 2 陽性乳癌細胞系、H C C 1954 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 R P M I - 1640 / M a t r i g e l 中に懸濁させた ) 。 6 - 7 日後、マウスに 124 - I 標識された T Z B (  $60 \mu\text{g}$  / 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 ( P E T ) を用いて分析した。マウスにモル当量の H E R 2 - S e l d e g (  $51 \mu\text{g}$  / マウス ) 又は参照標準として M O G - S e l d e g (  $31 \mu\text{g}$  / マウス ) 若しくは P B S ビヒクルを注入した (  $n$  = グループあたりに 3 匹のマウス ) 。 S e l d e g s 又は P B S の注入から 4 時間後に P E T を用いてマウスを分析した。S i e m e n s I n v e o n P E T - c o m p u t e d t o m o g r a p h y ( C T ) M u l t i m o d a l i t y S y s t e m 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 T Z B の注入から 22 時間に ( ' 22 時間 ' ) 及び H E R 2 - S e l d e g 、M O G - S e l d e g 又は P B S 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。A M I D E ソフトウェアパッケージにおいて P E T 及び C T 画像を共登録した ( c o - r e g i s t e r e d ) 。図 10 B は 124 - I 標識された T Z B の注入後 22 時間及び H E R 2 - S e l d e g 、M O G - S e l d e g 又は P B S 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 (  $n$  = グループあたり 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。H E R 2 - S e l d e g で処置されたマウス対 M O G - S e l d e g 又は P B S 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、H E R 2 - S e l d e g の送達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 S e l d e g 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 D N A 配列は配列

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 l d e g	GGACAATTCAGAGTGATAGGACCAGGGTATCCCATCC GGGCTTTAGTTGGGGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCG CATCTCTCCTGGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTG GGTTGGTACCGTTCTCCCTTCTCAAGAGTGGTTACCT CTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCA CCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGA CTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCTTAGGATTCAGAA CGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTC TTCAGAGACCACTCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG AGTTGAAAGTGGAAGATGGAGGCGGTGGATCAGTTGA GCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCTACATCA CTCGGGAACCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC GCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGACCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC	1

10

20

30

40

【 0 1 1 1 】

50

【表 1 - 2】

	TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCTTCCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC TGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA		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 l d e g	ACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGC TCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCG CCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAAC CTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGT CCTTCTCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGT GCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTG CAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTG AGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGA CCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCCTCC CCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCA CAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAA CCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAG GACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTG TTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAG AGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCT GTGCCGGTGGCTGTGCCCCTGCAAGGGGCCACTGC CCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTG CACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTC CACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCC	3	20
			30
			40

【 0 1 1 2 】

**【 0 1 1 3 】**

50

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

及びアルギニン突然変異を有する F c	CATCACTCGGGAACCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCGCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCGCCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
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 l d e g － P S	GGACAATTCAGAGTGATAGGACCAGGGTATCCCATCC GGGCTTTAGTTGGGGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCG CATCTCTCCTGGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTG GGTTGGTACCGTTCTCCCTTCTCAAGAGTGGTTCACCT CTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCA CCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGA CTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCTTAGGATTCAGAA CGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTC TTCAGAGACCACTCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG AGTTGAAAGTGGAAGATGGAGGCGGTGGATCAGTTGA	7

10

20

30

40

【 0 1 1 5 】

【表 1 - 6】

	<p> GCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT  GCCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTT  CCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT  CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT  GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC  GTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC  CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT  CAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC  GCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA  AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGACCACCCTGCCC  CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC  TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT  CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA  CAACTACAAGACCTTCCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC  GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA  AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC  TGTGATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACGCAG  AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGAGGCGGTG  GATCAGAGAAACTGGGAAAACCTCAGTATTTCACTGGA  TTATGATTTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGGGATCA  TTCAGGCTGCCGAACCTGCCCGCCTTGGACATGGGGGG  CACATCTGATCCTTACGTGAAAGTGTTTCTGCTACCTG  ATAAGAAGAAGAAATTTGAGACAAAAGTCCACCGAAA  AACCCTTAATCCTGTCTTCAATGAGCAATTTACTTTCA  AGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAACCCTAGT  GATGGCTGTATATGATTTTGATCGTTTCTCTAAGCATG </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

【 0 1 1 6 】

	ACATCATTGGAGAATTTAAAGTCCCTATGAACACAGTG GATTTTGGCCATGTAAGTGAAGGAATGGCGTGACCTGC 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 F c - S y t 1	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCGCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCGCCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGAGG CGGTGGATCAGAGAACTGGGAAAACCTTCAGTATTCA CTGGATTATGATTTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGG GATCATTACAGGCTGCCGAAGTGGCCGCCTTGGACATG GGGGGCACATCTGATCCTTACGTGAAAGTGTTTCTGCT ACCTGATAAGAAGAAGAAATTTGAGACAAAAGTCCAC	9

40



【表 1 - 8】

	CGAAAAACCCTTAATCCTGTCTTCAATGAGCAATTTAC TTTCAAGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACC CTAGTGATGGCTGTATATGATTTTGATCGTTTCTCTAA GCATGACATCATTGGAGAATTTAAAGTCCCTATGAACA CAGTGGATTTTGGCCATGTAAGTGGGAATGGCGTGA CCTGCAAAGTGCT	
ノブズイント ゥーホールズ、 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 l d e g - P S	GGACAATTCAGAGTGATAGGACCAGGGTATCCCATCC GGGCTTTAGTTGGGGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCG CATCTCTCCTGGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTG GGTTGGTACCGTTCTCCCTTCTCAAGAGTGGTTCACCT CTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCA CCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGA CTATCAGTGAGGGAAAGGTTACCCTTAGGATTCAGAA CGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTC TTCAGAGACCACTCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG AGTTGAAAGTGGAAGATGGAGGCGGTGGATCAGTTGA GCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC GCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGACCACCCTGCCC	11

10

20

30

40

【 0 1 1 8 】

【表 1 - 9】

	CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACGACACCTTCCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCGACCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC TGTGATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGAGGCGGTG GATCAGAGAACTGGGAAAACCTCAGTATTCACCTGGA TTATGATTTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGGGATCA TTCAGGCTGCCGAACCTGCCCGCCTTGGACATGGGGGG CACATCTGATCCTTACGTGAAAGTGTTTCTGCTACCTG ATAAGAAGAAGAAATTTGAGACAAAAGTCCACCGAAA AACCTTAATCCTGTCTTCAATGAGCAATTTACTTTCA AGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACCTAGT GATGGCTGTATATGATTTTGATCGTTTCTCTAAGCATG ACATCATTGGAGAATTTAAAGTCCCTATGAACACAGTG GATTTTGGCCATGTAAGTGAAGGAATGGCGTGACCTGC AAAGTGCT		10
ノブズイント ゥーホールズ、 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 - S y t 1	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC	13	30
			40

【 0 1 1 9 】

【表 1 - 10】

	<p>TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA  AGCCCGCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA  GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC  TGCCCCCATCCCGGGATAAGCTGACCAAGAACCAGGT  CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC  GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG  GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGAAGT  CCGACGGCTCCTTCGCCCTCTACAGCAAGCTCACCGT  GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA  TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA  CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGAGG  CGGTGGATCAGAGAACTGGGAAAACCTCAGTATTCA  CTGGATTATGATTTCCAAAATAACCAGCTGCTGGTAGG  GATCATTACAGGCTGCCGAACCTGCCCGCCTTGGACATG  GGGGGCACATCTGATCCTTACGTGAAAGTGTTTCTGCT  ACCTGATAAGAAGAAGAAATTTGAGACAAAAGTCCAC  CGAAAAACCCTTAATCCTGTCTTCAATGAGCAATTTAC  TTTCAAGGTACCATACTCGGAATTGGGTGGCAAAACC  CTAGTGATGGCTGTATATGATTTTGATCGTTTCTCTAA  GCATGACATCATTGGAGAATTTAAAGTCCCTATGAACA  CAGTGGATTTTGGCCATGTAAGTGAAGGAATGGCGTGA  CCTGCAAAGTGCT</p>	
ノブズイント ウーホールズ 突然変異を有 するMOG－ S e l d e g	<p>GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAG  AAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCT  CCGGCTACACCTTTCACCTCCTACTGGATGCACTGGGT  GCGGCAGGCCCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG  CGAGATCAACCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC</p>	15

【0120】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

<p>— T f R</p>	<p>GAGAAGTTCAAGTCCCGGGCCACCCTGACCGTGGACA  AGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT  GCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGG  GGCACCCGGGCTACCACTACTGGGGCCAGGGCACCA  TGGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATC  GGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCT  GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC  TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG  GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT  CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  GTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT  ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA  GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA  ACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC  TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACC  CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC  ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG  AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT  GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTTACCGTCC  TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG  CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG  AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC  CACAGGTGACCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT  GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA  GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA  GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCTTCCC</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

【 0 1 2 1】

【表 1 - 1 2】

	<p>TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA  GCAAGCTCACCGTGGAACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG  GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT  GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  CCGGGTAAAGGAGGCGGTGGATCAGGACAATTCAGAG  TGATAGGACCAGGGTATCCCATCCGGGCTTTAGTTGG  GGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCGCATCTCTCCTGGG  AAAAATGCCACGGGCATGGAGGTGGGTTGGTACCGTT  CTCCCTTCTCAAGAGTGGTTTACCTCTACCGAAATGGC  AAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCACCTGAATACCGGG  GACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGACTATCAGTGAGGG  AAAGGTTACCCTTAGGATTCAGAACGTGAGATTCTCAG  ATGAAGGAGGCTACACCTGCTTCTTCAGAGACCACTC  TTACCAAGAAGAGGCAGCAATGGAGTTGAAAGTGGA  GAT</p>	
ノブズイント ウーホールズ 突然変異を有 する T f R A b	<p>GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAG  AAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCT  CCGGCTACACCTTACCTCCTACTGGATGCACTGGGT  GCGGCAGGCCCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG  CGAGATCAACCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC  GAGAAGTTCAAGTCCCGGGCCACCCTGACCGTGGACA  AGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT  GCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGG  GGCAGCCGGGCCTACCACTACTGGGGCCAGGGCACCA  TGGTGACCGTGTCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATC  GGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCT  GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC</p>	17

【 0 1 2 2】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 3】

	<p>TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG  GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGT  CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  GTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT  ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA  GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA  ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC  TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACC  CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC  ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG  AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT  GCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC  TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG  CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG  AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC  CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT  GACCAAGAACCAGGTCCACCTGACCTGCCTGGTCAAA  GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA  GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC  TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCTAC  AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG  GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC  TCCGGGTAAA</p>	
TfR Ab LC	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCG  CCTCCGTGGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGC</p>	19

【 0 1 2 3】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 4】

	CTCCGACAACCTGTACTCCAACCTGGCCTGGTACCAG CAGAAGCCCGGCAAGTCCCCCAAGCTGCTGGTGTACG ACGCCACCAACCTGGCCGACGGCGTGCCCTCCCGGTT CTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACC ATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAGCACTTCTGGGGCACCCCCCTGACCTTCGGC CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGT	
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 ー S e l d e g - T f R	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAG AAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCTTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGCACTGGGT GCGGCAGGCCCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG CGAGATCAACCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC GAGAAGTTCAAGTCCCGGGCCACCCTGACCGTGGACA AGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCT GCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGG GGCACCCGGGCCTACCACTACTGGGGCCAGGGCACCA TGGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT	21

10

20

30

40

【 0 1 2 4】

【表 1 - 1 5】

GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC	
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG	
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGT	
CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG	
GTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT	
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA	10
GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA	
ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC	
TGAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACC	
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC	
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG	
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT	
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC	20
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTTACCGTCC	
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG	
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCGCCAGCCCCCATCGAG	
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC	
CACAGGTGACCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT	
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA	
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA	30
GCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCTTCCC	
TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA	
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG	
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT	
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	
CCGGGTAAAGGAGGCGGTGGATCAGGACAATT CAGAG	
TGATAGGACCAGGGTATCCCATCCGGGCTTTAGTTGG	40

【 0 1 2 5 】



【表 1 - 1 6】

	GGATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCGCATCTCTCCTGGG AAAAATGCCACGGGCATGGAGGTGGGTTGGTACCGTT CTCCCTTCTCAAGAGTGGTTACCTCTACCGAAATGGC AAGGACCAAGATGCAGAGCAAGCACCTGAATACCGGG GACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGACTATCAGTGAGGG AAAGGTTACCTTAGGATTCAGAACGTGAGATTCTCAG ATGAAGGAGGCTACACCTGCTTCTTCAGAGACCACTC TTACCAAGAAGAGGCAGCAATGGAGTTGAAAGTGGAAGAT	
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	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAG AAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGCACTGGGT GCGGCAGGCCCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGG CGAGATCAACCCACCAACGGCCGGACCAACTACATC GAGAAGTTCAAGTCCCGGGCCACCCTGACCGTGGACA AGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCCCTCCCT GCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGG GGCACCCGGGCCTACCACTACTGGGGCCAGGGCACCA TGGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA	23

10

20

30

40

【 0 1 2 6】

50

【表 1 - 17】

	<p>           ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC            TGAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAC            CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC            ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG            AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT            GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC            AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC            TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG            CAAGGTCTCCAACAAAGCCCGCCCAGCCCCATCGAG            AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC            CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCT            GACCAAGAACCAGGTCCACCTGACCTGCCTGGTCAA            GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA            GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC            TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCTAC            AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG            GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC            TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC            TCCGGGTAAA         </p>		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	<p>           ACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGC            TCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCG            CCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAAC            CTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGT            CCTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGT            GCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTG            CAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTG            AGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGA         </p>	25	30

40

【 0 1 2 7 】

【表 1 - 1 8】

CCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCCTCC	
CCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCA	
CAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAA	
CCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAG	
GACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACAC	
TGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTG	10
TTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAG	
AGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCT	
GTGCCGGTGGCTGTGCCCCGCTGCAAGGGGCCACTGC	
CCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTG	
CACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTC	
CACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCC	
CAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTTGAGTC	20
CATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCCGGCGCC	
AGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTAC	
GGACGTGGGATCCTGCACCCTCGTCTGCCCCCTGCAC	
AACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGG	
TGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCCGAGTGTGCT	
ATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGCGAGAGGTGAGGGC	
AGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGCTGGCTGC	30
AAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGA	
GCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCCGCT	
CCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTTTGAGACTCTGGAA	
GAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGA	
CAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAA	
GTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACT	
CGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGG	40

【0 1 2 8】

**【 0 1 2 9 】**

GCTGCGCTCACTGAGGGAAGTGGGCAGTGGACTGGC	
CCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACA	
CGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGCACCA	
AGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAG	
TGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGC	
GCCCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGGCCCACCCAG	10
TGTGTCAACTGCAGCCAGTTCCTTCGGGGCCAGGAGT	
GCGTGGAGGAATGCCGAGTACTGCAGGGGCTCCCCAG	
GGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCGTGCCAC	
CCTGAGTGTGACCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTT	
TTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCA	
CTATAAGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCCGCTGCCCC	
AGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCATCT	20
GGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTG	
CCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGGAT	
GACAAGGGCTGCCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCCCT	
CTGACGATTGAAGGCCGCATGGATCCCAAATCTTCTG	
ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGA	
ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA	
AAACCCAAGGACACCCTCTACATCACTCGGGAACCTG	30
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA	
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG	
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC	
AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC	
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC	
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA	
TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG	40

【表 1 - 20】

	AGAACCACAGGTGACCACCCTGCCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC TTCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGG CTCTGAAATTCCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCTGGTAAA	
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Fc	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCTA CATCACTCGGGAACCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CCACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCGCCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACAC	27

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

	GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
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 P S M A - S e l d e g	GTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGAGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCTA CATCACTCGGGAACCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCGCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGACCACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCTTCCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCTGTGATGCATGAGGCTCTGAAATTCCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGAGGC GGTGGATCAAAATCCTCCAATGAAGCTACTAACATTAC TCCAAAGCATAATATGAAAGCATTTTTGGATGAATTGA AAGCTGAGAACATCAAGAAGTTCTTATATAATTTTACA CAGATACCACATTTAGCAGGAACAGAACAAAAC TTTCA GCTTGCAAAGCAAATTCAATCCCAGTGGAAGAATTT GGCCTGGATTCTGTTGAGCTAGCACATTATGATGTCCT GTTGTCCTACCCAAATAAGACTCATCCCAACTACATCT	29

40

【表 1 - 2 2】

	<p>CAATAATTAATGAAGATGGAAATGAGATTTTCAACACA  TCATTATTTGAACCACCTCCTCCAGGATATGAAAATGT  TTCGGATATTGTACCACCTTTCAGTGCTTTCTCTCCTC  AAGGAATGCCAGAGGGCGATCTAGTGTATGTTAACTAT  GCACGAACTGAAGACTTCTTTAAATTGGAACGGGACA  TGAAAATCAATTGCTCTGGGAAAATTGTAATTGCCAGA  TATGGGAAAGTTTTTCAGAGGAAATAAGGTTAAAAATGC  CCAGCTGGCAGGGGCCAAAGGAGTCATTCTCTACTCC  GACCCTGCTGACTACTTTGCTCCTGGGGTGAAGTCCT  ATCCAGATGGTTGGAATCTTCCTGGAGGTGGTGTCCA  GCGTGGAATATCCTAAATCTGAATGGTGCAGGAGAC  CCTCTCACACCAGGTTACCCAGCAAATGAATATGCTTA  TAGGCGTGGAATTGCAGAGGCTGTTGGTCTTCCAAGT  ATTCCTGTTTCATCCAATTGGATACTATGATGCACAGAA  GCTCCTAGAAAAAATGGGTGGCTCAGCACCACCAGAT  AGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTGCCCTACAATG  TTGGACCTGGCTTTACTGGAACTTTTCTACACAAAAA  GTCAAGATGCACATCCACTCTACCAATGAAGTGACAA  GAATTTACAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGAGCAGTG  GAACCAGACAGATATGTCATTCTGGGAGGTCACCGGG  ACTCATGGGTGTTTGGTGGTATTGACCCTCAGAGTGG  AGCAGCTGTTGTTTCATGAAATTGTGAGGAGCTTTGGA  ACACTGAAAAAGGAAGGGTGGAGACCTAGAAGAACAA  TTTTGTTTGCAAGCTGGGATGCAGAAGAATTTGGTCTT  CTTGTTTCTACTGAGTGGGCAGAGGAGAATTCAAGAC  TCCTTCAAGAGCGTGGCGTGGCTTATATTAATGCTGAC  TCATCTATAGAAGGAACTACACTCTGAGAGTTGATTG</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

【 0 1 3 2】

【表 1 - 2 3】

	<p>TACACCGCTGATGTACAGCTTGGTACACAACCTAACAA  AAGAGCTGAAAAGCCCTGATGAAGGCTTTGAAGGCAA  ATCTCTTTATGAAAGTTGGACTAAAAAAGTCCTTCCC  CAGAGTTCAGTGGCATGCCAGGATAAGCAAATTGGG  ATCTGGAAATGATTTTGAGGTGTTCTTCCAACGACTTG  GAATTGCTTCAGGCAGAGCACGGTATACTAAAAATTGG  GAAACAAACAAATTCAGCGGCTATCCACTGTATCACAG  TGTCTATGAAACATATGAGTTGGTGGAAAAGTTTTATG  ATCCAATGTTTAAATATCACCTCACTGTGGCCCAGGTT  CGAGGAGGGATGGTGTGTTTGAGCTAGCCAATTCCATAG  TGCTCCCTTTTGATTGTGCGAGATTATGCTGTAGTTTTA  AGAAAGTATGCTGACAAAATCTACAGTATTTCTATGAA  ACATCCACAGGAAATGAAGACATACAGTGTATCATTTG  ATTCACCTTTTTCTGCAGTAAAGAATTTTACAGAAATT  GCTTCCAAGTTCAGTGAGAGACTCCAGGACTTTGACA  AAAGCAACCCAATAGTATTAAGAATGATGAATGATCAA  CTCATGTTTCTGGAAAGAGCATTTATTGATCCATTAGG  GTTACCAGACAGGCCTTTTTTATAGGCATGTCATCTATG  CTCCAAGCAGCCACAACAAGTATGCAGGGGAGTCATT  CCCAGGAATTTATGATGCTCTGTTTGATATTGAAAGCA  AAGTGGACCCTTCCAAGGCCTGGGGAGAAGTGAAGA  GACAGATTTATGTTGCAGCCTTCACAGTGCAGGCAGC  TGCAGAGACTTTGAGTGAAGTAGCC</p>	
MST-HN、 ノブズイント ウーホールズ 及びアルギニ	<p>ATGGCATCTCCGGGCTCTGGCTTTTGGTCTTTCGGGT  CGGAAGATGGCTCTGGGGATTCCGAGAATCCCGGCAC  AGCGCGAGCCTGGTGCCAAGTGGCTCAGAAGTTCACG  GGCGGCATCGGAAACAACTGTGCGCCCTGCTCTACG</p>	31

【0 1 3 3】

10

20

30

40

50



【表 1 - 2 4】

ン突然変異を 有する G A D 6 5 - S e l d e g	GAGACGCCGAGAAGCCGGCGGAGAGCGGCGGGAGCC AACCCCCGCGGGCCGCGCCCGGAAGGCCGCCTGCG CCTGCGACCAGAAGCCCTGCAGCTGCTCCAAAGTGGA TGTCAACTACGCGTTTCTCCATGCAACAGACCTGCTGC CGGCGTGTGATGGAGAAAGGCCCACTTTGGCGTTTCT GCAAGATGTTATGAACATTTTACTTCAGTATGTGGTGA AAAGTTTCGATAGATCAACCAAAGTGATTGATTTCCAT TATCCTAATGAGCTTCTCCAAGAATATAATTGGGAATT GGCAGACCAACCACAAAATTTGGAGGAAATTTTGATG CATTGCCAAACAACCTCTAAAATATGCAATTAAACAGG GCATCCTAGATACTTCAATCAACTTTCTACTGGTTTGG ATATGGTTGGATTAGCAGCAGACTGGCTGACATCAACA GCAAATACTAACATGTTTACCTATGAAATTGCTCCAGT ATTTGTGCTTTTGGGAATATGTCACACTAAAGAAAATGA GAGAAATCATTGGCTGGCCAGGGGGCTCTGGCGATGG GATATTTTCTCCCGGTGGCGCCATATCTAACATGTATG CCATGATGATCGCACGCTTTAAGATGTTCCCAGAAGTC AAGGAGAAAGGAATGGCTGCTCTTCCCAGGCTCATTG CCTTCACGTCTGAACATAGTCATTTTCTCTCAAGAAG GGAGCTGCAGCCTTAGGGATTGGAACAGACAGCGTGA TTCTGATTAAATGTGATGAGAGAGGGAAAATGATTCCA TCTGATCTTGAAAGAAGGATTCTTGAAGCCAAACAGA AAGGGTTTGTTTCCTTTCCTCGTGAGTGCCACAGCTGG AACCACCGTGACGGAGCATTGACCCCTCTTAGCT GTCGCTGACATTTGCAAAAAGTATAAGATCTGGATGCA TGTGGATGCAGCTTGGGGTGGGGGATTACTGATGTCC CGAAAACACAAGTGGAAGTCTGAGTGGCGTGGAGAGG	
---------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

10

20

30

40

【 0 1 3 4】

【 0 1 3 5 】

	GCCAACTCTGTGACGTGGAATCCACAAGATGATGG	
	GAGTCCCCTTTGCAGTGCTCTGCTCTCCTGGTTAGAGA	
	AGAGGGATTGATGCAGAATTGCAACC AAAATGCATGCC	
	TCCTACCTCTTT CAGCAAGATAAACATTATGACCTGTC	
	CTATGACACTGGAGACAAGGCCTTACAGTGCGGACGC	
	CACGTTGATGTTTTTTAAACTATGGCTGATGTGGAGGGC	10
	AAAGGGGACTACCGGGTTTGAAGCGCATGTTGATAAA	
	TGTTTGGAGTTGGCAGAGTATTTATAACAACATCATAAA	
	AAACCGAGAAGGATATGAGATGGTGTTTGATGGGAAG	
	CCTCAGCACACAAAATGTCTGCTTCTGGTACATT CCTCC	
	AAGCTTGCGTACTCTGGAAGACAATGAAGAGAGAATG	
	AGTCGCCTCTCGAAGGTGGCTCCAGTGATTAAAGCCA	
	GAATGATGGAGTATGGAACCACAATGGTCAGCTACCA	20
	ACCCTTG GGAGACAAGGTCAATTTCTTCCGCATGGTC	
	ATCTCAAACCCAGCGGCAACTCACCAAGACATTGACT	
	TCCTGATTGAAGAAATAGAACGCCTTGGACAAGATTTA	
	GGAGGCGGTGGATCAGTTGAGCCCCAAATCTTCTGACA	
	AAACTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAACT	
	CCTGAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA	
	CCCAAGGACACCCTCTACATCACTCGGGAACCTGAGG	30
	TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC	
	TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAG	
	GTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT	
	ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT	
	CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG	
	TGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCGCC CAGCCCCATCG	
	AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA	40

【表 1 - 2 6】

	ACCACAGGTGACCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCTTC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGGCT CTGAAATTCCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA	
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 A Q P 4 - S e l d e g	ATGAGTGACAGACCCACAGCAAGGCGGTGGGGTAAGT GTGGACCTTTGTGTACCAGAGAGAACATCATGGTGGC TTTCAAAGGGGTCTGGACTCAAGCTTTCTGGAAAGCA GTCACAGCGGAATTTCTGGCCATGCTTATTTTTGTTCT CCTCAGCCTGGGATCCACCATCAACTGGGGTGGAACA GAAAAGCCTTTACCGGTGCGACATGGTTCTCATCTCCCT TTGCTTTGGACTCAGCATTGCAACCATGGTGCAGTGC TTTGGCCATATCAGCGGTGGCCACATCAACCCTGCAG TGA CTGTGGCCATGGTGTGCACCAGGAAGATCAGCAT CGCCAAGTCTGTCTTCTACATCGCAGCCCAGTGCCTG GGGGCCATCATTGGAGCAGGAATCCTCTATCTGGTCA CACCTCCCAGTGTGGTGGGAGGCCTGGGAGTCACCAT GGTTCATGGAAATCTTACCGCTGGTCATGGTCTCCTGG TTGAGTTGATAATCACATTTCAATTGGTGT T TACTATCT TTGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTCACTGG CTCAATAGCTTTAGCAATTGGATTTTCTGTTGCAATTG GACATTTATTTGCAATCAATTATACTGGTGCCAGCATG AATCCCGCCCGATCCTTTGGACCTGCAGTTATCATGGG	33

【 0 1 3 6 】

【表 1 - 2 7】

AAATTGGGAAAACCATTTGGATATATTGGGTTGGGCCCA	
TCATAGGAGCTGTCCTCGCTGGTGGCCTTTATGAGTAT	
GTCTTCTGTCCAGATGTTGAATTCAAACGTCGTTTTAA	
AGAAGCCTTCAGCAAAGCTGCCCAGCAAACAAAAGGA	
AGCTACATGGAGGTGGAGGACAACAGGAGTCAGGTAG	
AGACGGATGACCTGATTCTAAAACCTGGAGTGGTGCA	10
TGTGATTGACGTTGACCGGGGAGAGGAGAAGAAGGG	
GAAAGACCAATCTGGAGAGGTATTGTCTTCAGTAGGA	
GGCGGTGGATCAGTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAA	
CTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT	
GAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCC	
AAGGACACCCTCTACATCACTCGGGAACCTGAGGTCA	
CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA	20
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGAGTG	
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA	
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT	
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC	
AAGGTCTCCAACAAAGCCCGCCCAGCCCCCATCGAGA	
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC	
ACAGGTGACCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG	
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG	30
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG	
CAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCTTCCCT	
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA	
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG	
GGAACGTCTTCTCATGCTCTGTGATGCATGAGGCTCT	
GAAATTCCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	
CCGGGTAAA	40

【 0 1 3 7 】

## 【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 l d e g	GQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNATGMEVGW YRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISE GKVTLRIQNVRFSDEGGYTCTFFRDHSYQEEAAMELKVE DGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPVSFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKARPAIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSPRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFFPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALKFHYTQKS LSLSPGK	2
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 l d e g	TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMRLHLYQGCQVVQGNL ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNAHQVRQVPLQRL RIVRGTTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLR ELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNN QLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLT RTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGA SCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCE KCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKIF GSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLY ISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGIS WLGLRSLRELGSGLALIHNNHNLHCFVHTVPWDQLFRNP HQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPT QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCH	4

## 【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

	<p>PECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSG  VKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKG  CPAEQRASPLTIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPS  VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  KEYKCKVSNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPISR  DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTF  PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL  KFHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>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</p>	<p>VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLYIT  REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP  APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVHLTCLV  KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFALYS  KLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG  K</p>	6
<p>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 l d e  g - P S</p>	<p>GQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNATGMEVGW  YRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISE  GKVTLRINVRFSDEGGYTCTFRDHSYQEEAAMELKVE  DGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKP  KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  SNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPISRDELTKNQV  SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFPPVLDSG  SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS  LSLSPGKGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLLVGIIQAA  ELPALDMGGTSDPYVKVFLLPDKKKKFETKVHRKTLNP</p>	8

【 0 1 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

	VFNEQFTFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIGEF KVPMNTVDFGHVTEEWRLQSA	
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 F c - S y t 1	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLLVGHIQAAELPALD MGGTSDPYVKVFLLPDKKKKFETKVHRKTLNPFNEQF TFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIGEFKVPMNT VDFGHVTEEWRLQSA	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 l d e g - P S	GQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNATGMEVGW YRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISE GKVTLRINVRFSDEGGYTCFRDHSYQEEAAMELKVE DGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTFPPVLDSG SFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGSEKLGKLQYSLDYDFQNNQLLVGHIQAA ELPALDMGGTSDPYVKVFLLPDKKKKFETKVHRKTLNP VFNEQFTFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIGEF KVPMNTVDFGHVTEEWRLQSA	12
ノブズイント ウーホール	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP	14

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

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 - S y t 1	REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSEKLGLKQLQYSLDYDFQNNQLLVGHIQAAELPALD MGGTSDPYVKVFLLPDKKKKFETKVHRKTLNPVFNEQF TFKVPYSELGGKTLVMAVYDFDRFSKHDIIGEFKVPMT VDFGHVTEEWRLQSA	
ノブズイント ゥーホールズ 突然変異を有 する M O G - S e l d e g - T f R	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSAST AYMELSSLRSED TAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTFPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGQFRVIGPGYPYRAL VGDEAEAPCRISPCKNATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRN GKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISEGKVTLRIQNVRFSD EGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVED	16
ノブズイント ゥーホールズ 突然変異を有 する T f R	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSAST AYMELSSLRSED TAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS	18

【 0 1 4 1 】



【表 2 - 5】

A b	WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVHLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK		10
TfR Ab LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQK PGKSPKLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQHFWGTPITFGQGTKVEIKTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	20	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MOG - S e l d e g - T f R	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFCSRATLTVDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLR GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTFPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVM 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 QAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRA TLTVDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLR GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKARPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVHLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	24
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	TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNAHQVRQVPLQRL RIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLR ELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNN QLALTLDITNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLT RTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLA CLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGA SCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCE KCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIF GSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLY ISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGIS WLGLRSLRELGSGLALIHNNHNLHLCFVHTVPWDQLFRNP HQUALHTANRPEDECVGEGGLACHQLCARGHCWGPGPT	26

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

【表 2 - 7】

	QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCH PECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSG VKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKG CPAEQRASPLTIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT FPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LKFHYTQKSLSLSPGK		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 REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG 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 l d e g	VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARP APIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFFPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG KGGGGSKSSNEATNITPKHNMKAFDELKAENIKKFLY NFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHY DVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYEN VSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDM	30	30

40

【 0 1 4 4 】

【 0 1 4 5 】

	<p>KINCSGKIVARYGKVFRGNKVNAQLAGAKGVILYSDP  ADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLT  PGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKM  GGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIH  STNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRIYVILGGHRDSWVFGGID  PQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEF  GLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVD  CTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP  EFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGASGRARYTKNWET  NKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGG  MVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQE  MKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVL  RMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKY  AGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQ  AAAETLSEVA</p>		<p>10</p> <p>20</p>
<p>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</p>	<p>MASPGSGFWSFGSEDGSGDSENPGTARAWCQVAQKFTG  GIGNKLCALLYGDAEKPAESGGSQPPRAAARKAACACDQ  KPCSCSKVDVNYAFLHATDLLPACDGERPTLAFLQDVM  NILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELADQPQ  NLEEILMHCQTTLKYAIKTGHPRYFNQLSTGLDMVGLAA  DWLTSTANTNMFTYEIAPVFVLLLEYVTLKKMREIIGWPG  GSGDGIFSPGGAISNMYAMMIARFKMFPEVKEKGMAAL  PRLIAFTSEHSHFSLKKGAAALGIGTDSVILIKCDERGM  IPSDLERRILEAKQKGFVPFLVSATAGTTVYGAFDPLLAV  ADICKKYKIWMHVDAAWGGGLLSRKHKWKLSGVERA  NSVTWNPHKMMGVPLQCSALLVREEGLMQNCNQMHA  SYLFQQDKHYDLSYDTGDKALQCGRHVDVFKLWLMWR</p>	32	<p>30</p> <p>40</p>

【表 2 - 9】

	AKGTTGFEAHVDKCLELAELYLYNIIKNREGYEMVFDGK PQHTNVCFWYIPPSLRTLEDNEERMSRLSKVAPVIKARM MEYGTTMVSQYQPLGDKVNFFRMVISNPAATHQDIDFLIE EIERLGQDLGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKARPAIEKTISKAKGQPREPQVTTLPISR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTF PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL 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 l d e g	MS DRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKA VTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMVLISLCF GLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVF YIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAG HGLLVELIITFQLVFTIFASCDKRTDVTGSIALAIGFSVAI GHFLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYVWGP IIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGS YMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKGKD QSGEVLSSVGGGGSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLRGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKARPAIEKTISKAKGQPREPQVTTLPISR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTF PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL 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 - S e l d e g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 - 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

10

20

30

40

50

8に免疫グロブリンCH<sub>2</sub>ドメイン(ヒトIgG1由来)、残基249-355に免疫グロブリンCH<sub>3</sub>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2の代表的なMOG-Se1degは、残基160、162、164、341及び342にFcRn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、EUN numbering convention)を指していない。

【0148】

配列番号3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HER2-Se1deg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HER2-Se1deg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、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IgG1由来)、残基651-760に免疫グロブリンCH<sub>2</sub>ドメイン(ヒトIgG1由来)、残基761-876に免疫グロブリンCH<sub>3</sub>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4の代表的なHER2-Se1degは残基672、674、676、853及び854にFcRn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、EUN numbering convention)を指していない。

【0150】

配列番号5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Fc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MOG-Se1deg(配列番号2)又はHER2-Se1deg(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Fc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IgG1由来)、残基17-126に免疫グロブリンCH<sub>2</sub>ドメイン(ヒトIgG1由来)、残基127-233に免疫グロブリンCH<sub>3</sub>ドメイン(ヒトIgG1由来)を有する。配列番号6の代表的なFcフラグメントは、残基38、40、42、219及び220にFcRn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、EUN numbering convention)を指していない。

【0152】

配列番号7のDNA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MOG-Se1deg-PS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MOG-Se1deg-PS融合体のアミノ酸配列は、N末端からC末端への順序でmMOG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139-248に免疫グロブリンCH<sub>2</sub>ドメイン(ヒトIgG1由来)、残基249-355に免疫グロブリンCH<sub>3</sub>ドメイン(ヒトIgG1由来)を有する。配列番号8の代表的なMOG

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 ( 1 2 8 ) 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 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 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 ( 1 2 8 ) 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 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

40

#### 【 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。

#### 【 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 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 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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 I g 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、E U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-Seledeg-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-Seledeg-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、E U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-Seledeg-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、E U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-Seledeg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-Seledeg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-Seledeg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イン残基（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、E U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ー

50

ー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26)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28)をコードするポリヌクレオチドのものである。

【0173】

特に、配列番号28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1-16に免疫グロブリンヒンジ(ヒトI g 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I g 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I g G 1由来)を有する。配列番号28の変異体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28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

【0174】

配列番号29のDNA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30)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。

【0175】

特に、配列番号30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1-16に免疫グロブリンヒンジ(ヒトI g 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I g 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I g G 1由来)を有し、それらが残基234-238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239-945)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30の変異体P S M A - S e l d e g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135及び180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30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

30

【0176】

配列番号31のDNA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32)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。

【0177】

特に、配列番号32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65(G A D 6 5)の残基1-585、残基586-590に第1のリンカー、残基591-606に免疫グロブリンヒンジ(ヒトI g G 1由来)、残基607-716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717-823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32の変異体G A D 6 5 - S e l d e gは残基628、630、632、809及び810にF c R n結合を向上させる突然変異、残基612及び704にアルギニン突然変異ならびに残基725及び770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(596)はセリンに突然変異している。配列番号32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

【0178】

50

配列番号 33 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 34）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 Fc 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。

【0179】

特に、配列番号 34 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 - 323、残基 324 - 328 に第 1 のリンカー、残基 329 - 344 に免疫グロブリンヒンジ（ヒト I g G 1 由来）、残基 345 - 454 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 455 - 561 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 34 の変異体 A Q P 4 - S e l d e g は残基 366、368、370、547、548 に FcRn 結合を向上させる突然変異、残基 350 及び 442 にアルギニン突然変異ならびに残基 463 及び 508 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（334）はセリンに突然変異している。配列番号 34 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。

【0180】

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。

【0181】

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”、“an”及び“the”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」（“plurality”）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

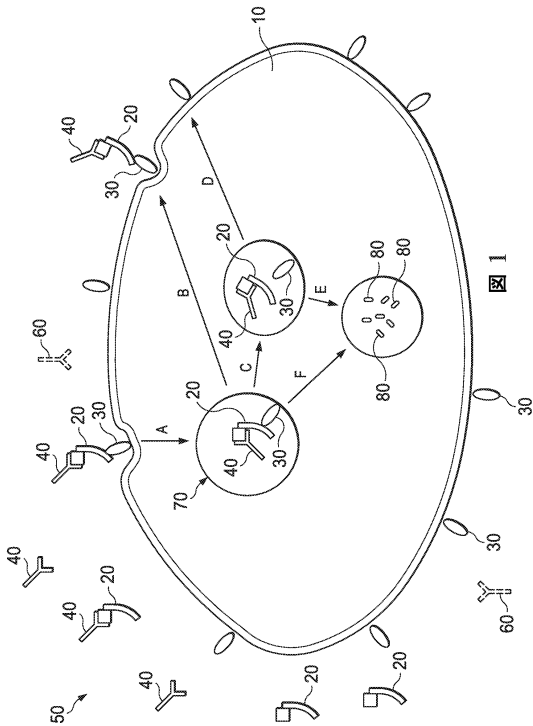
30

40

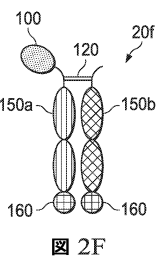
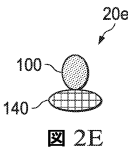
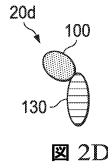
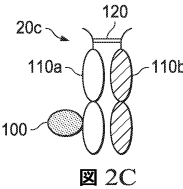
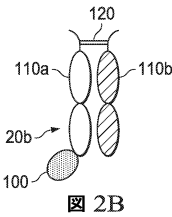
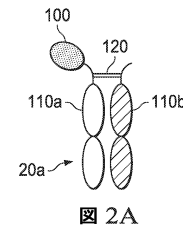
50

【図面】

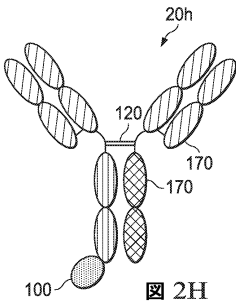
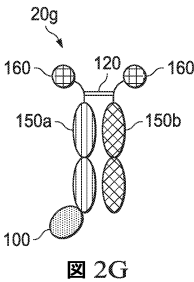
【図 1】



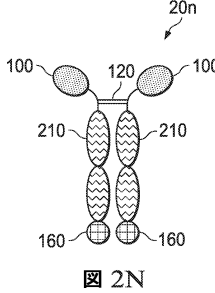
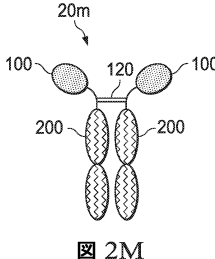
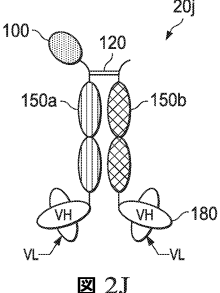
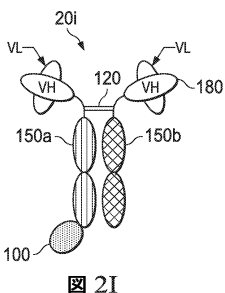
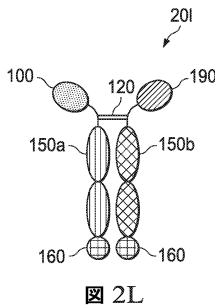
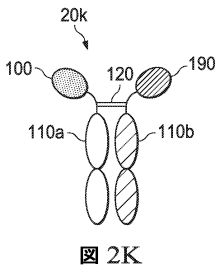
【図 2 A - 2 F】



【図 2 G - 2 J】



【図 2 K - 2 N】



10

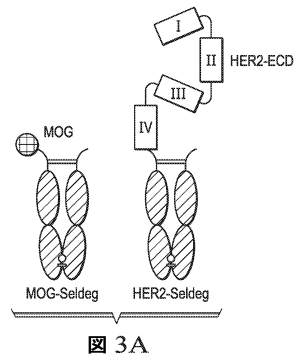
20

30

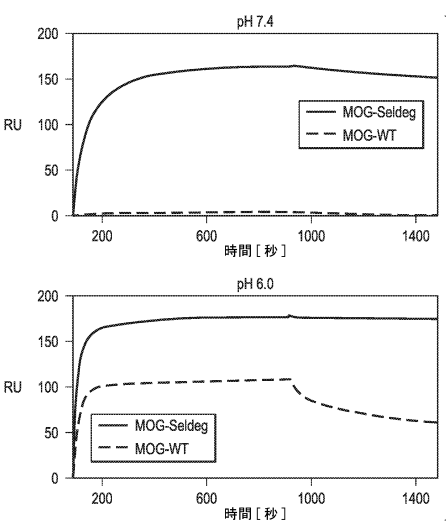
40

50

【図 3 A】

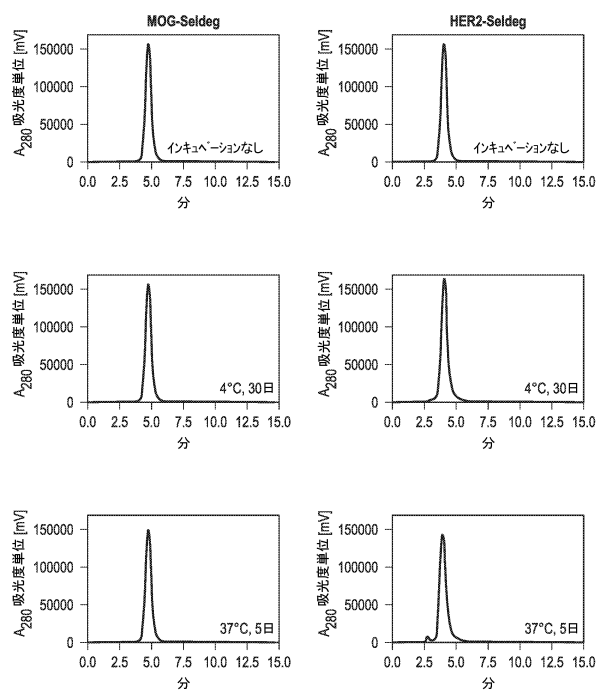


【図 3 B】

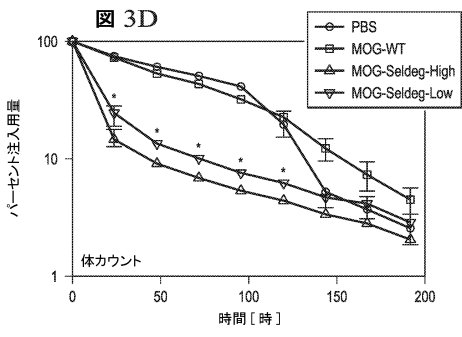


10

【図 3 C】



【図 3 D】



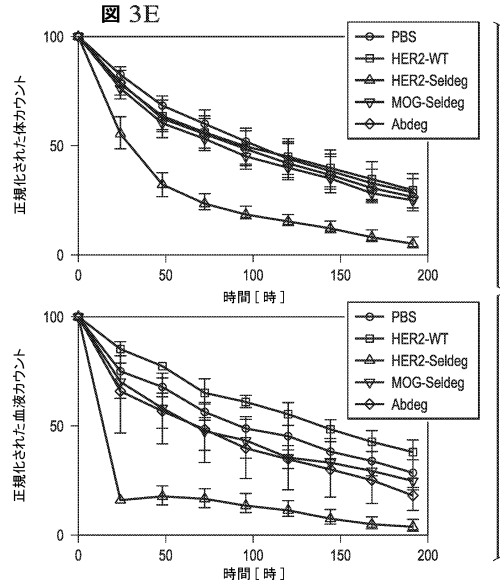
20

30

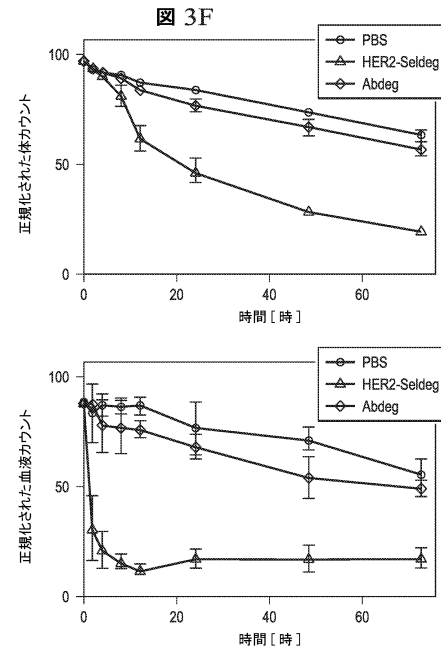
40

50

【 図 3 E 】



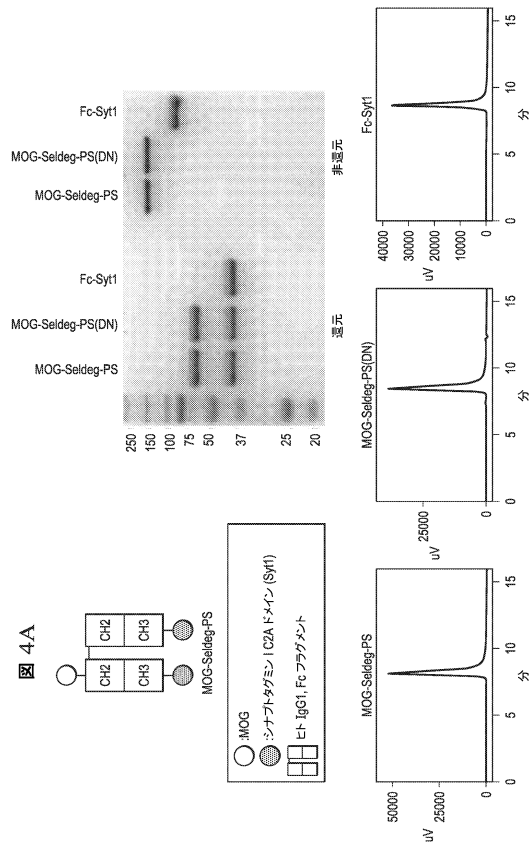
【 図 3 F 】



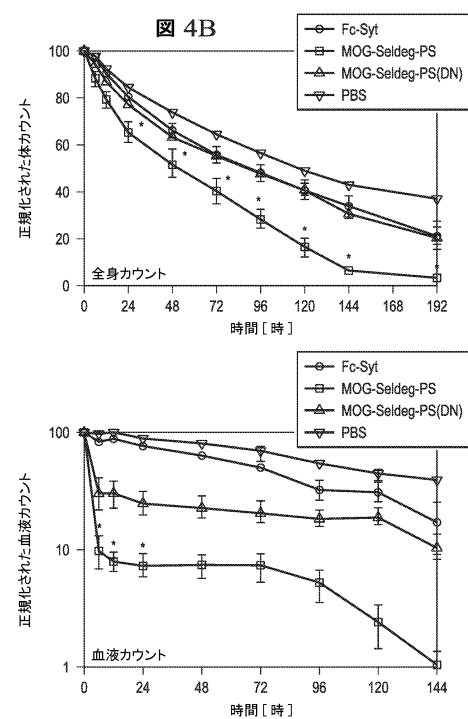
10

20

【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



30

40

50

【図 5 A】

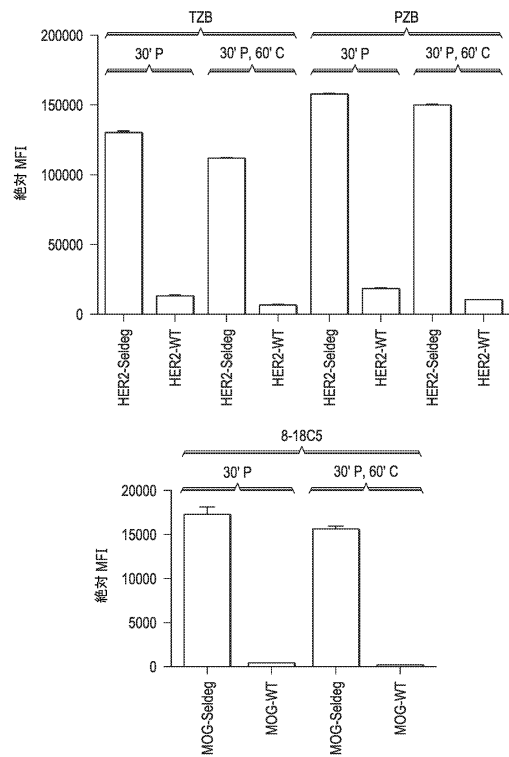


図 5A

【図 5 B】

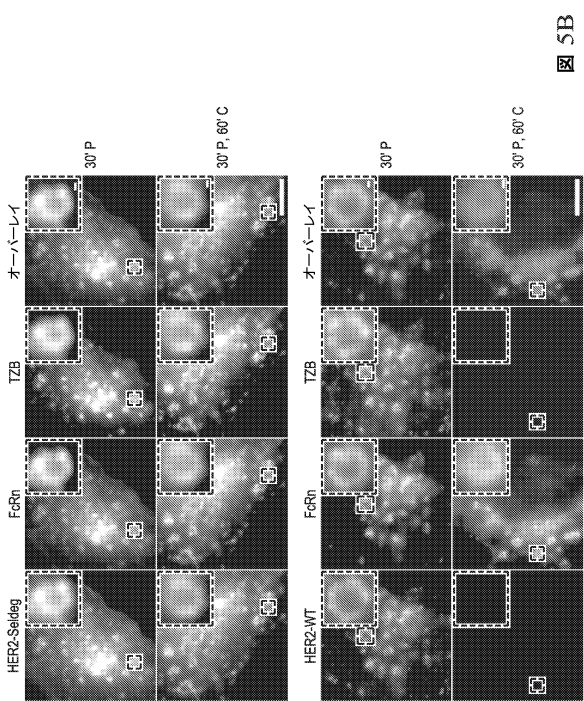


図 5B

【図 5 C】

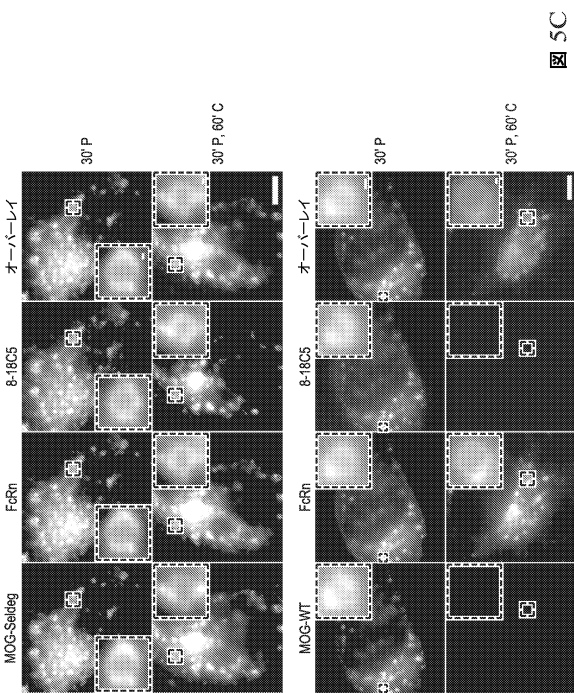


図 5C

【図 6 A - 6 B】

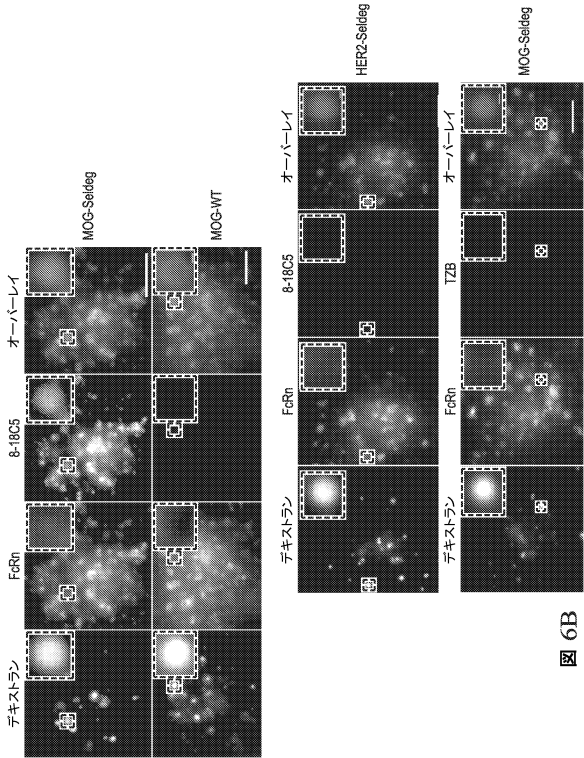


図 6A

図 6B

10

20

30

40

50

【 図 7 】

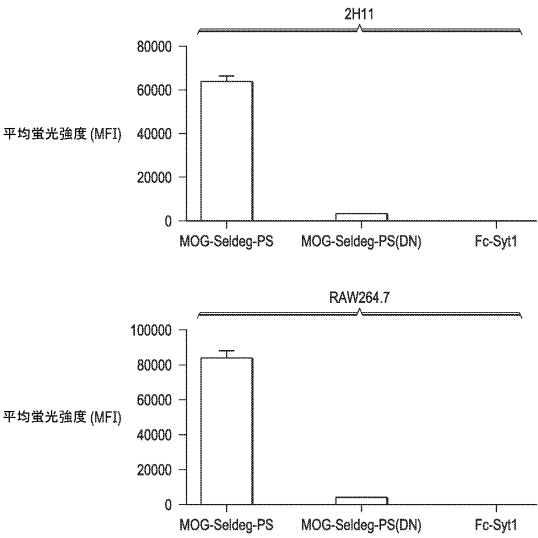


図 7

【 図 8 】

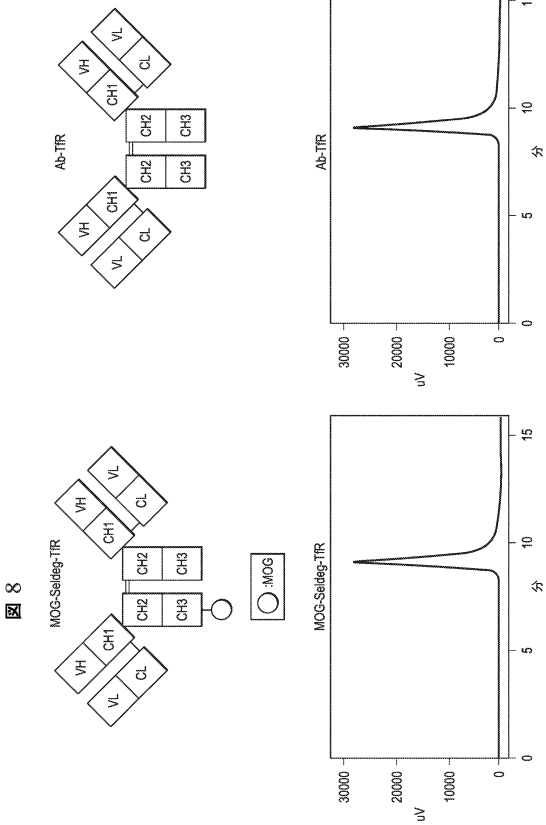


図 8

【 図 9 】

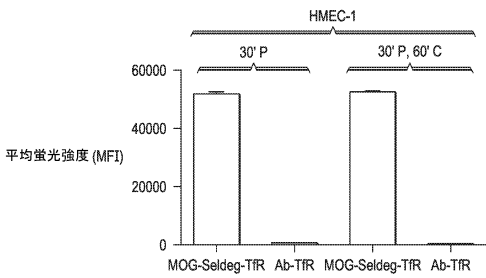


図 9

【 図 10 A 】

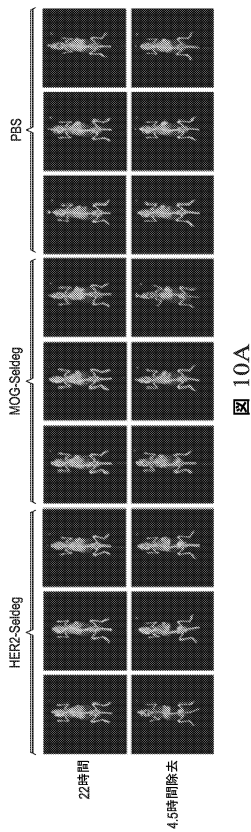


図 10A

10

20

30

40

50



【図 10 B】

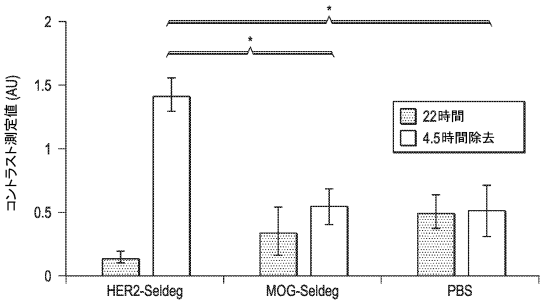


図 10B

10

【配列表】

0007295799000001.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・サウスウエ  
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., DB名)

C07K 19/00

C07K 14/47

C07K 14/76

C07K 16/28

C12N 15/11

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d