

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4046354号
(P4046354)

(45) 発行日 平成20年2月13日 (2008. 2. 13)

(24) 登録日 平成19年11月30日 (2007. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
C 0 7 K 16/00 (2006. 01)
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 39/395 Z
 A 6 1 K 39/395 M
 A 6 1 K 39/395 B
 C 0 7 K 16/00

請求項の数 2 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-533488
 (86) (22) 出願日 平成9年3月3日 (1997. 3. 3)
 (65) 公表番号 特表2000-507816 (P2000-507816A)
 (43) 公表日 平成12年6月27日 (2000. 6. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/003321
 (87) 国際公開番号 W01997/034631
 (87) 国際公開日 平成9年9月25日 (1997. 9. 25)
 審査請求日 平成16年3月1日 (2004. 3. 1)
 (31) 優先権主張番号 60/013, 563
 (32) 優先日 平成8年3月18日 (1996. 3. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者

ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
 ーシティ オブ テキサス システム
 アメリカ合衆国 テキサス 78701,
 オースティン, ウェスト 7ティール
 ストリート 201

(74) 代理人

弁理士 清水 初志

(74) 代理人

弁理士 新見 浩一

(72) 発明者

ワード, エリザベス サリー
 アメリカ合衆国 テキサス 75230,
 ダラス, ノエル ロード ナンバー209
 9 12856

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増大した半減期を有する免疫グロブリン様ドメイン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IgGに対して増大した血清半減期を有する変異IgG分子を含む組成物であって、ここで該変異IgG分子が、下記のアミノ酸置換を含む、組成物。

252位におけるスレオニンからロイシン、

254位におけるスレオニンからセリン、及び、

256位におけるスレオニンからフェニルアラニン、

ここで、上記アミノ酸の各位置は、K a b a tの番号付けシステムに従って番号付けされている。

【請求項 2】

薬学的に許容される組成物としてさらに規定される、請求項 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

1. 発明の分野

本発明は、一般に、FcレセプターFcRnにより媒介される、血清タンパク質および抗体の輸送の分野、およびさらにはpH依存様式でFcレセプターと相互作用する因子の血清半減期に対する効果に関連する。

2. 関連技術の説明

IgGは、ヒトおよび他の哺乳動物の血清において最も優勢な免疫グロブリンクラスを構成し、そして驚くほど一定レベルに維持される。最近の研究により、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) - クラス I 関連レセプターFcRnが血清IgGのホメオスタシスに関与しているこ

とが示される (Ghetieら、1996 ; JunghansおよびAnderson、1996 ; Israelら、1996)。このレセプターは、ほぼ間違いなくサルベージレセプターとして作用し、そしてこのことは、新生児消化管 (WallaceおよびRees、1980 ; RodewaldおよびKraehenbuhl、1984) および卵黄嚢 (Robertsら、1990 ; Israelら、1995) または胎盤 (KristoffersenおよびMatre、1996 ; Simisterら、1996 ; Leachら、1996) を横切って、インタクトな形態のIgGを経細胞輸送するその既知の能力と一致する。マウスIgG1 (mIgG1) に対するFcRnの相互作用部位は、組換えFc-ヒンジフラグメントの部位特異的変異誘発、続いてインビボおよびインビトロの両方でのこれらのフラグメントの分析を使用してマッピングされた (Kimら、1994b ; Medesanら、1996 ; 1997)。これらの研究から、I253 (EU番号付 (Edelmanら、1969))、H310、H435、およびH436 (より劣った程度で) は、この相互作用において中心的な役割を演じる。これらのアミノ酸は、CH2-CH3ドメイン界面に位置し (Deisenhofer、1981)、そしてこれらの残基への機能的部位のマッピングは、ラットFcと複合体化したラットFcRnのX線結晶学的構造と一致する (Burmeisterら、1994b)。

FcRnの相互作用部位は、一次アミノ酸配列では遠位である配列から構成される、空間的に接近した3つのループを包含する。この部位の構築におけるFcヒスチジンの中心的役割は、Fc-FcRn相互作用の顕著なpH依存性 (pH6.0で結合、pH7.4で遊離) (RodewaldおよびKraehenbuhl、1984 ; Raghavanら、1995 ; Popovら、1996) を説明する。なぜなら、イミダゾールプロトンの1つのpKaが、このpH範囲にあるからである。I253、H310、H435、およびH436 (より劣った程度で) は、ヒトおよび齧歯類の両方のIgGにおいて高度に保存されている (Kabatら、1991)。このことは、FcRnのヒトホモログの単離 (Storyら、1994) と考え合わせると、IgGホメオスタシスに関与する分子メカニズムが、マウスおよびヒトの両方で共通であり、そしてこれは、治療における使用のためのIgGの薬物動態の調整に影響を及ぼすことを示す。

現在まで、Fc上のFcRn相互作用部位を同定する研究において、対応するFc-ヒンジフラグメントの血清半減期を減少させる、Fc-ヒンジフラグメントの変異が作成された (Medesanら、1997 ; Kimら、1994a)。血清半減期とFcRnの結合親和性 (affinity) との間の相関は、これらの変異させたFc-ヒンジフラグメントについて極めて良好であり (Kimら、1994b ; Popovら、1996)、このことは、FcRn-Fc相互作用の親和性が、pH依存性をなお保持しながら増大する場合、これは、延長された血清存続性を有するFcフラグメントを生じること示唆する。このようなフラグメントの産生は、改善された薬物動態 (例えば、循環における増大した存続性) を有する治療用IgGを新たに作製するエンジニアリングにおける顕著な前進である。しかし、現在、そのようなフラグメントは産生されていない。

免疫グロブリンFcドメインはまた、抗体安定化、異化作用、および免疫系のさらなる分子との抗体の相互作用のメカニズムを研究する目的にとっても重要である。これらは、抗体のクラスに依存して、補体との相互作用、および他の細胞 (マクロファージ、好中球およびマスト細胞を含む) の特異的レセプターへの結合を包含する。Fc領域の生物学のより詳細な知識は、免疫系の種々の分子プロセス (例えば、食作用、抗体依存性細胞媒介細胞毒性およびアレルギー反応) を理解する上で重要である。

FcRnへの結合が増大した、より長く生存するFcフラグメントの産生は、魅力的である。なぜなら、このようなフラグメントは、治療試薬をタグ付けするために使用され得るからである。この様式で産生されるキメラタンパク質は、高いインビボ安定性という利点を有する。この安定性は、血流中での増大した存続性を通じて、因子がより少ない投与で治療に使用されることを可能にし、そしておそらくより低い用量の因子が使用されることを可能にする。不運にも、増大した血清存続性を有するタンパク質 (例えば、抗体フラグメント) を作製する方法論は、まだ開発されていない。

発明の要旨

本発明は、Fcレセプター (FcRn) との相互作用により増大した血清半減期を有する機能的なタンパク質、抗体または他の因子を提供することによって、当該分野における欠陥を克服しようとする。これらの機能的因子には、pH依存的な様式でFcRnと結合し、その結果、結合親和性が、pH7.4での結合と比べて、約pH6 ~ 約pH6.5で強い任意の分子が含まれる。

生理学的には、このことは、因子が、より低いpHでFcRnによりサルベージされ、そして血清の本質的に中性なpH環境中に遊離されることを可能にする。本開示には、IgGに対して改変された血清半減期を有するタンパク質およびペプチド組成物、公知の配列から開始するかまたはランダム配列をスクリーニングすることによるかのいずれかでこのようなタンパク質またはペプチドを作製する方法、およびpH依存性FcRn結合について未知の候補因子をスクリーニングする方法が含まれる。さらに、改変された血清半減期を有する因子を、FcRnとの相互作用により増大した血清半減期を有すると同定された部分にその因子を接合させるかまたはそうでなければ結合させることによって作製する方法が、本明細書中に開示される。このような因子には、抗体、抗体のフラグメント、ホルモン、レセプターリガンド、イムノトキシン、任意の種類の治療薬物、T細胞レセプター結合抗原、および本発明の増大した血清半減期部分に結合され得る他の任意の因子が含まれるが、これらに限定されない。

10

タンパク質またはペプチドが、増大した血清半減期を有するように、FcRn結合タンパク質またはペプチドのFcRn結合親和性を増大させる方法もまた、開示される。これらの方法は、FcRnと直接相互作用するアミノ酸を同定することを包含する。これらのアミノ酸は、それらが、広範囲の種にわたり高度に保存されていることによって、または他の任意の方法によって同定され得る。他の方法には、例えば、アミノ酸変異またはブロッキング、およびFcRnに対する減少した結合についてのスクリーニングを包含するか、または相互作用の三次元構造の研究、または当該分野において公知の他の方法による。直接相互作用する残基が同定される場合、その側鎖が直接的相互作用の空間的近傍にある二次アミノ酸が、同定される。抗体の場合、これら二次アミノ酸は、しばしばループで生じ、その結果、これらは溶媒に曝される。この様式では、これらのアミノ酸の変異はネイティブなタンパク質構造を破壊すると期待されない。次いで、これらの同定された二次アミノ酸は、ランダムに変異され、次いで、この変異タンパク質またはペプチドは、約pH 6で、非変異タンパク質またはペプチドに対して、FcRnに関する増大した結合親和性についてスクリーニングされる。この方法は、pH依存性様式でFcRnと結合する任意のタンパク質またはペプチドに適用可能であり、そしてこのようなタンパク質またはペプチドすべてが、本願発明に包含される。ランダム変異はそれ自体は本発明を構成しないこと、および二次アミノ酸は、当該分野において公知の任意の方法で、特異的に、変異または改変あるいは誘導体化され得、次いでFcRn結合に対する効果についてスクリーニングされ得ることもまた理解される。

20

30

特定の広い局面では、本発明は、増大したインビボまたは血清半減期を有するよう操作された、組換え抗体または抗体Fc-ヒンジドメインの設計および産生を包含する。本発明の増大した血清半減期を有するFc-ヒンジドメイン変異体は、一般に、Fc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメイン界面における1つ以上の天然残基が、別のアミノ酸と交換されている変異体として定義される。このようなFc-ヒンジドメイン変異体はまた、損なわれたSpA（スタフィロコッカスタンパク質A）結合を示す変異体として機能的に定義され得る。好ましい実施態様において、増大した半減期のFc-ヒンジ変異体は、「異化作用制御部位」を形成するかまたはこれに対して極めて近位にあることが見出されている、残基252付近と残基436付近との間の特定のアミノ酸に変化を有する。

さらなる実施態様において、本発明は、IgG:FcRn相互作用の親和性より必ずしも小さくなくとも良い親和性を有する、FcRnと結合するペプチドまたは因子（しかし、このペプチドまたは因子は、なお、本明細書中に記載のようなpH依存性様式でFcRnと結合しない同様なペプチドまたは因子より、測定可能に長い半減期を有する）の単離を包含する。このようなペプチドまたは因子は、治療用因子またはタンパク質のための安定化「タグ」として有用であることが、予想される。

40

より具体的には、本発明は、1つ以上の下記のアミノ酸が他の残基と交換されているドメインを有する変異Igドメインおよび抗体に関する：252位のスレオニン（thr）、254位のスレオニン、256位のスレオニン（ここで、アミノ酸は、Kabatら（1991）に従って番号付けられている）。Fc-ヒンジドメインまたはインタクトな抗体の半減期を増大させるために、上記の残基のうちの任意のものは、任意の他のアミノ酸残基と置換され得、次いで、

50

FcRnに関するより高い親和性を有する変形体は、例えば、バクテリオファージディスプレイを使用して、または当業者に公知の任意の他の方法によって選択され得る。置換は、本明細書において下記に示すように、当業者に公知の任意の分子生物学的技術によって、または化学的改変によってさえも、有利に達成され得る。

特定の増大した半減期の抗体またはドメインは、Kabatの番号付けシステムでの1つ以上の下記の置換、または異なる番号付けシステムでのそれらの等価物を含むものである：スレオニン(thr)252からロイシン(leu)252、スレオニン254からセリン(ser)254、スレオニン256からフェニルアラニン(phe)256。本明細書中に開示される例は、以下の3つの変異を含むLSFと呼ばれる三重変異体である：スレオニン252からロイシン252、スレオニン254からセリン254、スレオニン256からフェニルアラニン256。

より長いインピボ半減期を有するFc-ヒンジドメインの産生は、それが、Fc-ヒンジフラグメントの特異的領域に対するIgG1異化作用の制御部位をさらに正確に描写する点、および実用的見地からは、いくつかの重要な適用を有する点で、有利な進展である。これは、より長い半減期を有する抗体分子、ドメイン、またはフラグメント(例えば、二価Fabフラグメント)の設計および構築を可能にする。これらは、より緩慢な生物学的クリアランス時間が、抗体またはワクチンのより少ない回数の投与に至り、その結果、より少ない回数の「追加免疫」ワクチン接種で済ませられ得る点で、一般に有用である。さらに、より長い半減期を有するこれらの分子は、他の治療分子(例えば、ワクチン分子)をタグ付けするために使用され得る。本発明において正確に描写された異化作用部位は、ADCCおよび補体結合部位とは異なる。このことは、完全に機能的でより長い半減期を有する抗体が産生され得るので、重要である。他の重要な使用には、例えば、抗体ベースの全身性薬物送達、より長い寿命を有するイムノトキシンの作製、または慢性疾患もしくは病的状態(例えば、枯草熱または他のアレルギー反応)のための抗体ベースの免疫療法、あるいは抗T細胞レセプター抗体またはT細胞抗原によるT細胞媒介性自己免疫疾患の処置が含まれる。Fc-ヒンジドメイン変異体はまた、臨床的投与を含むもの以外の実施態様、例えば、IgGの異化作用に関与するレセプターの単離において用いられ得る。この目的のために、変異体が、可能性のある異化作用レセプターに対して結合または増大した結合を示す、スクリーニングアッセイまたはディファレンシャルスクリーニングアッセイが使用され得る。

抗体異化作用に関して本明細書において開示された知見はまた、ヒトまたは動物に投与することを所望される、実質的に任意の組換えタンパク質(および特に組換え抗体)のインピボ半減期を増大させるために有用であることを想像させる。理想的に所望されるより迅速に身体から排除されることが見出された抗体または組換えタンパク質は、本明細書中で同定される残基において、またはFcRnと直接相互作用することが見出されるアミノ酸の近傍で操作され得、その結果、そのインピボ半減期を増大させた。

特定の他の実施態様において、本発明は、増大したインピボ半減期を有する組換え分子、特に抗体構築物(ワクチンおよびイムノトキシンを含む)の作製を企図する。組換え分子の長寿はしばしば必要とされ、そしていくつかのプロトコルが、設計した作用の発揮後、循環からより緩慢に除去される分子の設計から利益を得る。これには、例えば、病原体、トキシン、生物学的不均衡を引き起こす物質を取り除き、このことによりこれらが身体を傷つけるのを防ぐ目的で投与される抗体；および免疫治療薬物およびワクチンの長期間の全身性送達を提供するよう設計された抗体が含まれる。

より長い半減期を有するドメイン、抗体、または抗体構築物を作製するために、「異化作用制御部位」を形成するか、またはこれに対して極めて近傍にある、Fc-ヒンジのCH2-CH3ドメイン界面の天然残基が改変される。抗体分子または抗体接合体に容易に操作され得るいくつかの異化作用制御変異が、本明細書に記載される。これらには、スレオニン252、スレオニン254、スレオニン256、メチオニン309、グルタミン311および/またはアスパラギン315(Kabatら、1991)を別の残基に置換することを包含する。本発明はまた、異化作用制御に重要な他の残基を決定するために有利な方法を提供する。

本発明のタンパク質またはペプチドは、組換え宿主細胞における、免疫グロブリン様ドメイン(例えば、抗体ドメイン)または他のタンパク質もしくはペプチドの発現用に適合さ

10

20

30

40

50

れた組換えプラスミドまたは発現ベクターから発現され得る。従って、組換えプラスミドは、1つ以上の免疫グロブリン様ドメインをコードするDNAセグメントを含有し得る。従って、任意の、1つ以上の広範な種々の免疫グロブリン様ドメインまたは他のタンパク質もしくはペプチドは、組換えベクターに組み込まれ得、そして本明細書に従って宿主細胞中で発現される。これらには、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEの可変ドメインもしくは定常ドメイン、T細胞レセプター、MHCクラスIもしくはMHCクラスII、およびさらにCD2、CD4、CD8、CD3ポリペプチド、Thy-1、およびPDGFレセプター、N-CAMもしくはNg-CAM由来のドメインが含まれるが、これらに限定されない。

特定の実施態様において、本発明は、抗体定常ドメインの発現および産生に関する。抗体Fc-ヒンジ、Fc、CH2-ヒンジまたはCH3ドメインの産生が好ましく、Fc-ヒンジまたはFcドメインが、それらのより長いインビボ半減期のために特に好ましい。他の例では、thr252、thr254またはthr256での変異を有するFc-ヒンジドメイン（またはこのようなドメインを組み込んでいる抗体）の産生が好ましい。なぜなら、これらは特異的により長い半減期を有するからである。このような変異体は、thr252からleu252、thr254からser254、およびthr256からphe256によって例示される。

上記の任意のドメインの種々のセグメントまたはサブフラグメント、ならびに他の可変ドメインもしくは定常ドメインもまた、本明細書に従って用いられ得る。これらのドメインには、例えば、免疫グロブリンドメインCH1が含まれる。上で具体的に記載されたもの以外の免疫グロブリンドメインの変形もまた、本発明の範囲である。このような変形は、天然に生じる変異または遺伝子操作された変異（例えば、点変異、1つ以上のアミノ酸に影響する欠失およびその他の改変、またはN末端もしくはC末端でのアミノ酸の付加）から生じ得る。

さらに、本発明は、マウスFcRnおよび免疫グロブリンフラグメントを用いて例示されたが、同様な戦略は、種々の他の種（ラットのような哺乳動物を含む）に由来する免疫グロブリン様ドメインまたは他のタンパク質もしくはペプチド、およびより具体的にはヒト免疫グロブリン様分子に適用可能である。免疫グロブリン様ドメインの構造的相似性、および進化を通じての免疫グロブリンスーパーファミリーの保存の観点から、本発明の技術は、任意の種からの免疫グロブリン様ドメインの発現および組換え産生に直接適用可能であると考えられる。

記載される免疫グロブリン様ドメインに連結した他のDNAセグメントもまた、含まれ得る。例えば、種々の特異性を有する1つ以上の組換え抗体可変ドメインは、1つ以上の抗体定常ドメイン、免疫グロブリン定常ドメイン、またはさらには他のタンパク質（例えば、バクテリオファージコートタンパク質遺伝子、ホルモン、またはT細胞レセプター抗原を含む抗原）に連結され得る。本発明の抗体定常ドメインはまた、別の免疫グロブリンドメイン、またはもちろん任意の他のタンパク質と組合せられ得る。免疫グロブリン定常ドメインは、単一のドメイン（例えば、CH3ドメイン）として；または1つ、2つ、または3つ以上のドメイン（例えばCH2-ヒンジドメイン、Fcドメイン、または全Fcヒンジドメイン）と組み合わせ多様に発現され得る。特定の実施態様において、以下により詳細に記載されるが、FcまたはFcヒンジドメインは、任意のタンパク質に連結されて増強された生物学的安定性を有する組換え融合体を産生し得るか、または特定の変異体が、増大した半減期を有する抗体もしくは融合タンパク質を生成するために用いられ得る。

一旦発現されると、本明細書中の任意の産物は、放射標識もしくは蛍光標識され、またはセファロースもしくは磁性ビーズもしくはリボソームのような合成二重層を含む固体支持体に付着される。産物はまた、ウシ血清アルブミンのようなキャリアタンパク質に連結され得る。Fc定常ドメイン、または他のタンパク質と組み合わせた定常ドメインはまた、コレセプター（例えば、CD4またはCD8の細胞外ドメイン）に合成的に連結され得る。

組換えまたはクローニングベクターは、本発明の1つの局面に含まれる。このようなベクターおよびDNA構築物は、タンパク質発現を指向するために有用であるばかりか、インビトロ変異誘発のためのテンプレートとしての使用に関しても有用である。ベクターは、一般に、リーダー配列、好ましくはpelB（Betterら、1988）を含むが、他のリーダー配列（

10

20

30

40

50

例えば、アルカリホスファターゼ (phoA) またはompA) も用いられ得る。好ましい実施態様において、peIBリーダーセグメントは、単一の制限部位 (例えば、NcoI) で改変され、抗体可変ドメイン遺伝子の挿入を可能にする。このような制限部位の導入は、リーダー配列と同じリーディングフレームのDNAセグメントにクローニングする便利な手段である。リーダー配列DNAの改変は、1つ以上のヌクレオチドを、部位特異的変異誘発を用いて変更することによって達成され得る。一般に、部位特異的変異誘発の技術は、刊行物 (Carterら、1985; Sambrookら、1989) によって例示されるように当該分野で周知である。理解されるように、この技術は代表的には、一本鎖および二本鎖形態の両方において存在するファージミドベクターを用いる。あるいは、変異体はPCRTMを用いて生成され得る。部位特異的変異誘発に有用な代表的なベクターには、M13ファージ (Messingら、1981) または pUC 119のようなベクターが含まれる。これらベクターは、容易に商業的に入手可能であり、そしてそれらの使用は、一般に当業者に周知である。あるいは、二本鎖プラスミドまたはファージミドなどを使用する部位特異的変異誘発の方法はまた、当該分野で周知であり、そして本発明の実施においても用いられ得る。

本発明に従う部位特異的変異誘発は、まず、リーダー配列 (peIBが本明細書中で用いられる) をコードするDNA配列をその配列内に含む一本鎖ベクターを得ることによって行われる。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成的に (例えば、Narangら、(1980) の方法によって) 調製される。プライマーは、一本鎖ベクターとアニールされ、そしてE.coliポリメラーゼIクレノウフラグメントのようなDNAポリマー化酵素に供される。変異を有する鎖の合成を完了するために、ヘテロ二重鎖が形成され、ここで一方の鎖が元の非変異配列をコードし、そして第2の鎖は所望の変異を有する。ヘテロ二重鎖は、細菌細胞 (E.coliが好ましい) 中に、形質転換され得る。クローンは、コロニーハイブリダイゼーションおよび放射標識された変異原性オリゴヌクレオチドを用いてスクリーニングされ、変異プラスミドDNAを含むコロニーを同定する (Carterら、1985) 。二本鎖DNAテンプレートを用いるPCRTM指向変異誘発は、増大した半減期を有する変異体を生成するために特に適している。PCRTM変異誘発は、代表的には、1以上の増幅反応において1つ以上の代替の (alternate) またはランダムなアミノ酸をコードするプライマーの使用を含む。

構築物はまた、発現されたポリペプチド産物の単離および精製のために有用な「タグ」を含む。タグは、検出、単離、および精製を容易にする機能を有する所望のポリペプチド (例えば、ポリヒスチジン) をコードする配列にインフレームで融合された比較的短いDNAセグメントである。例えば、親和性ペプチドは、セグメントによってコードされ得、特定の抗体または親和性樹脂に選択的に結合することによって単離を可能にする。任意の多くのタグ (c-mycタグ、(his)₆タグ、デカペプチドタグ (Huseら、1989)、FlagTM (Immunex) タグなどを含む) が用いられ得る。多くのタグがまた、ウエスタンブロッティングを用いる、発現されたタンパク質の検出のために有用である (Wardら、1989; Towbinら、1979) 。

例えば (His)₆タグは、Ni²⁺のような金属に基づいた親和性金属クロマトグラフィーカラム上での、分泌されたポリペプチド産物の精製のために好ましい。(his)₆ペプチドは、Ni²⁺イオンを高親和性でキレートする。NまたはC末端にこれらの残基を含むポリペプチド産物は、親和性カラムに結合し、ポリペプチド不純物および他の汚染物が精製工程の一部として洗浄除去されることを可能にする。次いでポリペプチド産物は、例えば250mMイミダゾールを用いて、カラムから高い効率で溶出され得る。

ペプチドタグまたはリンカーはまた、免疫グロブリン産物中に組み込まれ得る。一本鎖FvまたはT細胞レセプター (TCR) フラグメントについて、好ましいリンカーペプチドは、15マー (例えば、(gly₄ser)₃)、またはFilpulaおよびWhitlow (1991) に記載されるような他のリンカーを含む。

上述のように、本発明の組換えベクターはまた、種々の他のタンパク質をコードするDNAセグメントを含み得る。特に、抗体FcヒンジまたはFcドメインをコードする組換えベクターはまた、より長い血清半減期を有する形態においてタンパク質を産生することを所望す

10

20

30

40

50

る場合は特に、他のタンパク質またはそのフラグメントをコードするDNAセグメントを含み得ると考えられる。動物またはヒトへの投与について意図されるタンパク質またはペプチドの血清安定性は、この様式で増大され得ることが予想される。このようなタンパク質またはペプチドの例には、例えば、インターロイキン2、インターロイキン4、インターフェロン、インシュリン、T細胞エпитープなど、およびさらにTCR Va V が含まれる。種々の合成薬物が、同様にこの様式で安定化され得る。

このようなタンパク質をコードするDNAセグメントは、Fcベースのドメインと上流下流に関わらずインフレーションで、ベクターがタンパク質：Fcドメイン融合タンパク質（またはタンパク質：Fcヒンジ融合タンパク質）を発現し得るような位置で組換えベクター中に作動可能に組み込まれ得る。例えば、制限エンドヌクレアーゼを用いる遺伝子工学によりこの様式でDNAセグメントを操作するための技術は、本開示およびSambrookら（1989）のよう

10

な参考文献の両方に照らして当業者に理解される。本発明は、原核生物宿主細胞を用いて例示されたが、これは制限であることを意味しない。本明細書中に記載される原核生物の特異的プロモーターおよびリーダー配列は、真核生物の対応物によって容易に置換され得る。任意の多くの免疫グロブリン様ドメインをコードするDNAセグメントでの宿主細胞の形質転換は、例えば機能的IgGのような完全に機能的なタンパク質を産生する便利な手段を提供すると認識される。cDNAおよびゲノム配列の両方は、真核生物性の発現のために適切である。なぜなら、宿主細胞は、もちろん、タンパク質への翻訳のための機能的mRNAを生じるためにゲノム転写物をプロセスするからである。増大した半減期を有する変異体ドメインおよび抗体は、補体を固定しそしてADCCを媒介する真核生物系でグリコシル化形態において産生され得る。

20

ほぼ任意の真核生物発現系が、本発明のタンパク質およびペプチドの発現のために使用され得ることが同様に考えられる。例えば、バキュロウイルスベースの、COS細胞ベースの、ミエローマベースの系が用いられ得る。プラスミドベクターは、pCMV5のようなpCMVシリーズの真核生物ベクターによって例示されるように、複製起点および効率的な真核生物プロモーターを組み込む。

この様式での発現のために、コード配列をプロモーターに隣接して、そしてプロモーターの制御下に配置する。このようなプロモーターの制御下にコード配列を配置するために、タンパク質の翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位の5'末端を、選択されたプロモーターの約1～約50ヌクレオチド「下流」（すなわち、3'側）に配置することが当該分野で理解される。

30

真核生物発現が意図される場合、代表的には、元のクローニングセグメント内に含まれていなければ、適切なポリアデニル化部位（例えば、5'-AATAAA-3'）を、転写ユニット中に組み込むこともまた所望される。代表的には、ポリA付加部位を、転写終結の前の位置で、タンパク質の終結部位の約30～2000ヌクレオチド「下流」に配置する。

本明細書中で使用される用語「操作された」または「組換え」細胞は、免疫グロブリン様ドメインをコードする遺伝子のような組換え遺伝子が導入されている細胞をいうことが意図される。それゆえ、操作された細胞は、トランスフェクションまたは形質転換技術によって導入される組換え遺伝子を含まない天然に存在する細胞とは区別され得る。従って、操作された細胞は、人為的に導入された遺伝子を有する細胞である。

40

本発明の実施において有用である適切な宿主細胞は、グラム陰性生物を含み、そして*Serratia marcescens*、*Salmonella typhimurium*、および類似の種を含み得る。特に好ましい宿主細胞は、*Escherichia coli*および容易に入手可能でありそして当業者に周知の*E. coli*のいくつかの改変体である。

本発明の特定の局面は、免疫グロブリン様ドメイン（例えば、ネイティブのもしくは変異体の抗体定常ドメイン、またはそれらのサブフラグメントもしくは融合タンパク質）の産生のための方法である。このようなドメインまたは改変されたドメインを産生するために、グラム陰性微生物宿主細胞をまず任意の開示された組換えベクターで形質転換し、次いで適切な細菌培養培地中で免疫グロブリン様ドメインの発現を可能にする条件下で培養し、続いてこれを単離し得る。

50

培養は、代表的には、増殖および誘導を包含する。増殖は、簡便には、1%グルコースを含むLuriaブロス、1%グルコースを含む4×TY(二倍強度2×TY)、カザミノ酸および5%w/vグリセロールを含む最小培地のような培地において、20～約37の範囲、好ましくは25～30の間の範囲の温度で行われる。好ましい実施態様では、培地は、発現プラスミドを含む細菌細胞を選択するために、アンピシリンのような選択剤を0.1mg/mlの濃度で含む。当然、当業者に公知のように、元々使用されたプラスミド構築物と組み合わせて、特定の選択剤を選択する。

発現の誘導は、代表的には、増殖が開始された後の時点で、通常12～16時間後に、30で行われる。この時間の長さは、誘導期で初期静止相にある細胞を生じる。増殖培地がグルコースを含む場合、グルコースは発現の誘導を阻害するので、細胞をペレット化し、そして洗浄し、その後イソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)のようなインデューサーを濃度0.1～1mMで添加する。再び、種々の他のインデューサーが、元々用いられたベクター構築物に従って、当該分野で公知のように、用いられ得る。細胞は、誘導の前により短い期間、例えば6～10時間、または増殖の中期対数期まで増殖され得る。細胞は、5～28時間誘導される。5～6時間の誘導は、タンパク質が周辺質から単離される場合には、好ましい誘導時間である。なぜなら、より長い誘導時間は、タンパク質の培養上清への漏出を生じるからである。しかし、外部培地から産物を単離することが望ましくあり得、この場合はより長い誘導時間の使用が好ましい。20～37の範囲の温度は、増殖および誘導温度として使用され得、25が好ましい誘導温度である。

微生物宿主細胞によって産生されそして周辺質空間に位置するポリペプチド産物を単離することは、代表的には、微生物を、一般には浸透圧ショック、超音波処理、または溶解のような手段によって、しかし好ましくは浸透圧ショックによって破壊する工程を包含する。一旦細胞が破壊されると、細胞または細胞細片は、簡便に、例えば、遠心分離または濾過によって除去され得る。タンパク質は、例えば、適切なペプチドタグがポリペプチド産物に付着されている場合、親和性金属樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製され得る。

あるいは、誘導期間が8時間より長く(例えば、25で)、その結果タンパク質が培養上清中に漏出する場合、細胞は、培養物から遠心分離によって除去され得、そして培養上清は濾過され、そして(例えば、10～20倍に)濃縮される。次いで、濃縮された上清は、リン酸緩衝化生理食塩水に対して透析され、そして分離がカラムクロマトグラフィー(例えば、親和性または吸着クロマトグラフィー)によって達成される。一例には、適切にタグ化されたタンパク質(例えば、(his)₆タグを保有するタグ化タンパク質)を分離するためのNi²⁺-NTA-アガロースによる分離がある。これらのタグが発現ベクターの構築において用いられる場合、ヒスチジンタグは、特に好ましい。なぜなら、それらはNi²⁺-NTAアガロースのような金属樹脂上での単離および精製を容易にするからである。

本明細書中で使用される用語「生物学的に安定なタンパク質」は、改変された結果、血清半減期が元のタンパク質と比較して増大したタンパク質をいうことが意図される。この用語は、公知の組換えタンパク質およびまた組換え形態がまだ報告されていないタンパク質の両方を含む。このように、増大した生物学的安定性は、公知のまたは元の組換えタンパク質、あるいはネイティブのタンパク質に比較して測定され得る。生物学的安定性は、例えば、放射標識タンパク質を用い血清の放射活性のレベルを時間の関数として測定することによって、またはELISAを用いて血清中にインタクトな抗体のレベルを時間の関数としてアッセイすることによって、種々のインビトロまたはインビボ手段によって測定され得る。ここで、増大した生物学的安定性の特に好ましい測定は、血清半減期の増大およびクリアランス速度の減少によって証明される。

目的のタンパク質が抗体Fcヒンジドメインまたは抗体Fcドメインに連結している生物学的に安定な組換えタンパク質を産生するためには、本明細書に従って、まずタンパク質:Fcヒンジまたはタンパク質:Fcドメイン融合タンパク質を、本明細書中上記のように、グラム陰性宿主において発現し得る組換えベクターを調製し得る。次いで、組換えベクターをグラム陰性細菌に挿入し、そしてその細菌を融合タンパク質の発現を可能にするのに効果

10

20

30

40

50

的な条件下で培養する。この後、次いでこのように産生された融合タンパク質を、例えば本発明の方法を用いて単離する。

上記の方法は、改善された生物学的安定性を有する一連の治療化合物の生成における使用に提案される。このような化合物は、例えば、インターロイキン2、インシュリン、インターロイキン4、およびインターフェロン、またはさらにT細胞レセプター $V_{\alpha}V_{\beta}$ を含む。本発明の組換えFcドメインはまた、広範囲の薬物を安定化することにおいて有用であることが意図され、このことは、それらの反復投与に対する必要性を軽減する可能性がある。しかし、本発明の方法は、ヒトへの投与のためのタンパク質の産生のみに限定されず、そして増大した安定性を有する大量のタンパク質を産生するために用いられ得る。例えば、免疫化プロトコル、獣医による動物の処置、または齧歯類のインビボ治療モデルにおいて用いられ得る。

10

変異体Fcヒンジドメインが、本発明において生成され、そして本明細書中でネイティブのドメインに比較して劇的に増大したインビボ半減期を有することが示される。それゆえ、本発明は、延長された生物学的半減期を有する抗体またはタンパク質を産生するための方法をさらに包含する。これらの方法は、上記のように、まずタンパク質または抗体の可変ドメインを、本発明の増大した半減期変異体ドメインにカップリングする工程を包含する。このような抗体またはタンパク質を産生するために、所望の融合または変異タンパク質を発現し得る組換えベクターを調製し、そのベクターをグラム陰性細菌中に挿入し、それを培養して発現させ、そしてこのように産生された抗体またはタンパク質を単離する。これらの技術は、より長い生物学的半減期を有することを所望される任意の抗体またはタンパク質（抗体およびイムノトキシンを含む）に適用可能である。

20

本発明の別の方法は、増加した血清半減期を有する抗体の生産に特に適し、代謝制御部位においてまたはその近傍のいずれかで、与えられた抗体を、本明細書に開示された残基の1つまたはそれ以上で単に改変することである。これは、化学的に、またはランダムもしくは部位特異的変異誘発および任意の公知の生産方法を用いる組換え生産により達成され得る。好適な方法は、示された残基を、残りの19の残基のすべてで置き換え、次いでFcRnに対してより高い親和性を有する変異体を（1つ以上の残基が同時に変異する場合ファージディスプレイを用いて）選択することである。選択された変異体はまた、本明細書に記載されるように、pH依存性様式でFcRnに結合し、このpHは選択ステップの間制御され得る。この選択方法はまた、ランダムペプチドライブラリーまたは任意の他のランダムに変異されたタンパク質に適用可能である。このように操作された抗体は、単一の抗体、ドメイン、Fabフラグメント、またはイムノトキシンのような抗体結合物および治療養生法に用いられる抗体であり得る。

30

本発明の範囲内に含まれるのはまた、可変または定常抗体ドメインのような組換え免疫グロブリン様ドメイン産物；抗体、抗体構築物、抗体ドメインまたは延長した半減期を有するイムノトキシン；あるいは、MHC分子またはCD2、CD4、CD8、CD3、N-CAM、もしくはNg-CAMのようなシグナリング分子由来のドメイン、またはPDGFレセプタードメイン、またはそれらのフラグメントである。好適な実施態様では、これらは、Fcヒンジ、Fc、CH2-ヒンジおよびCH3ドメインのような抗体定常ドメイン産物；およびより長いインビボ半減期を有するように加工された、例えば、LSF変異体のような抗体Fcヒンジドメインを含む。これらのドメインの組成において、例えば、基礎となるDNAを変更することにより、改変または変化がなされ得て、そしてなお同様のまたはそうでなければ所望の特性を有する分子を得ることが認識される。それ故に、これらの免疫グロブリン様ドメインの生物学的機能的等価物、およびFcRnに結合するペプチドおよびその他のランダムに変異されたタンパク質のような変異体もまた、本発明の範囲内に含まれる。

40

一般に、特定のアミノ酸は、例えば抗体の抗原結合領域またはレセプター部位のような構造との相互作用結合能力の認識され得る損失なくして、タンパク質構造中のその他のアミノ酸を置換し得る。そのタンパク質の生物学的機能的活性を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質であるので、特定のアミノ酸配列置換は、タンパク質配列（または、勿論、その基礎となるDNAコード配列）でなされ得、そしてそれにも関わらず、同様

50

のまたは匹敵する性質（例えば、アンタゴニスト的またはアゴニスト的）でさえ有するタンパク質を得る。従って、コードされたタンパク質の生物学的有用性または活性の認識し得る損失なくして、免疫グロブリン様ドメインのコード配列中に、種々の変化がなされ得ることが予期される。このようなドメイン中で特定の残基を変化させ、例えば、FcRnに対するFcの結合親和性を増加することにより、それらの生物学的有用性を増強すること、またはそれらの相互作用能力を増大することさえ可能であり得る。

本明細書で例示されるように、形質転換された宿主細胞は、免疫グロブリン様ドメインの特に良好な収率を提供する。得られる収率は、CH3について約 2 mg/L ; CH2-ヒンジについて 1 ~ 1.5mg/L ; Fcについて1.5 ~ 2 mg/L ; およびFcヒンジについて0.5 ~ 1 mg/Lのオーダーである。このような値は、容易にスケールアップされ、例えば、Ni²⁺-NTA-アガロースを用いる親和性精製のための(his)₆タグを利用して、数日のうちに、比較的大量のこれらドメインを生産し得ることが予期される。従って、発現系は、比較的成本的に有効な方式で得られ得る免疫グロブリン様ドメインタンパク質の容易な供給を提供する。

ネイティブな抗体定常ドメインのような免疫グロブリン様ドメイン、または増大した半減期を持つFcヒンジドメインの精製は、クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離および電気泳動的方法を含む多くの方法で達成され得る。

本発明は、広範な種類の実施態様で利用され得るヒト供給源由来の免疫グロブリン様ドメインを含む、免疫グロブリン様ドメインの大スケール生産を容易にする。これらは、インビトロ変異誘発研究、およびNMRおよびX線結晶学のような高分解能構造分析におけるそれらの使用を含む。FcヒンジおよびFcドメイン分析は、抗体代謝に關与する領域の輪郭を描写することを可能にし、残基イソロイシン(ile) 253、ヒスチジン(his) 310、his435 およびhis436が重要であることを示した。組換えフラグメント、ドメイン、またはそれらのサブフラグメントでさえ、FcRnへの結合に機能的に重要なFc残基をマッピングするために用い得る。組換えFcフラグメントの残基は、本明細書に開示されるような可溶性タンパク質として、またはバクテリオファージの表面上(McCaffertyら、1990)での発現の前に、改変され得、そしてFcRnに対してより高い親和性を有する変異体結合が、FcRnでコートされた固体表面または溶液中のFcRnを用いてスクリーニングまたは選択され得る。好適な方法は、溶液中のFcRnを用いることであり、次いでビーズ上のFcRn:バクテリオファージ複合体を捕捉する。

他のタンパク質または薬物に連結した免疫グロブリンFcヒンジまたはFcドメインの大スケール生産もまた、免疫療法に対して可能性を有している。特定の実施態様では、キメラ(chimaeric)タンパク質または薬物が、延長された半減期の利点を有して生産され得、そして非グリコシル化Fcは、Fcレセプターに対する結合親和性が非常に低いので、それらは、これらのレセプターを有する大多数の免疫細胞に結合し得ない。これは、そのことが非特異的結合を低減するので顕著な利点である。このような非グリコシル化Fcフラグメントはまた、補体を固定せず、そして重要なことには、このことは、局所炎症反応の発生をおそらく低減する。

本発明はまた、血清中のIgGレベルを調節する方法として記載され、この方法は、上記IgGに対するFcRn結合を増大する工程を包含する。この調節は、FcRnの発現の変更による内因性FcRnレベルを増大もしくは低減することにより、またはFcRnを発現する組換え細胞の使用により達成され得る。さらに、この調節は、IgGに対する変更された結合親和性を有するFcRnを提供することにより達成され、そしてそれによってIgGレベルを調節する。

さらなる実施態様で本発明は、拡張して、その他のタンパク質、ペプチド、または非タンパク質リガンドを含むリガンドを包含し得、そしてこれらは本明細書に開示された例示の抗体のそのような高親和性およびpH依存様式でFcRnに結合し、その結果それらの半減期が延長される。

本発明は、可変領域および定常領域の両方の免疫グロブリン様ドメイン、ならびに遺伝子操作された変異体ドメインの大量生産により例示される。元は抗体分子由来の免疫グロブリン様ドメインの生産例もまた含まれる。特に、抗体Fcヒンジ、Fc、CH2-ヒンジおよびCH3ドメイン ; ならびに増大した血清半減期を有するFcヒンジ変異体ドメインの生産が、開

10

20

30

40

50

示される。しかし、免疫グロブリン様スーパーファミリーおよびその改変のスペクトルをカバーするこのような広範な範囲の例を考慮して、本発明がこれらの例のみに制限されないことが理解される。むしろ、それは、本明細書中上記のすべての免疫グロブリン様構造を包含する。

先の論議を考慮して、本発明は、IgGに対して増大した血清半減期を有する変異体IgG分子を含む組成物として特定の広範な局面で記載され得、そしてここで、上記変異体IgG分子は、Fcヒンジ領域中に少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。このIgGは、任意のIgG分子であり得、そして特定の実施態様では好ましくはヒトIgGである。

本発明はまた、特定の実施態様において、IgGの血清半減期に対して増大した血清半減期を有する変異体IgG Fcヒンジフラグメントを含む組成物として記載され、そしてここで、上記フラグメントは、FcRnに対して増大した結合親和性を有する。従って、本発明の組成物は、CH2ドメインにおける番号252、254、256、309、311もしくは315、またはCH3ドメインにおける433もしくは434から選択される1つまたはそれ以上、あるいは3つものアミノ酸におけるアミノ酸置換を有する分子またはフラグメントを含み得、そして特定の実施態様では以下のアミノ酸置換を有し得る：位置252におけるトレオニンに対するロイシン、位置254におけるトレオニンに対するセリン、および位置256におけるトレオニンに対するフェニルアラニン。抗体、または特にIgGの場合、FcRnに対する増大した結合親和性は、表面プラズモン共鳴分析により測定したとき、約7 nMより小さい、pH6におけるFcRnへの結合に対する解離定数を有するとして規定され得る。本発明の任意の組成物がまた、特定の実施態様では、薬学的に受容可能な組成物として規定され得ることが理解される。

特定の広範な局面では、本発明は、因子の血清半減期を増大する方法として記載され得、上記因子を、上記のように増大した血清半減期を有する変異体IgGまたはIgG Fcヒンジフラグメントに結合させる工程を包含する。好適な因子は、治療薬物、抗原結合性ポリペプチド、抗原もしくはレセプター結合性リガンド、またはT細胞レセプター結合性リガンドでさえ、またはT細胞レセプタードメインを包含するがこれらに限定されない。

本発明はまた、増大した血清半減期を有する抗体の作成方法を含み、FcRn結合に直接関与すると考えられるIgGヒンジ領域中の第1のアミノ酸を同定する工程、1つまたはそれ以上の第2のアミノ酸を同定する工程であって、ここで上記第2のアミノ酸の各々は上記第1のアミノ酸の空間領域中にあり、そしてここでこの第2のアミノ酸の側鎖はネイティブな抗体において溶媒に曝されている工程、変異体抗体を作成するために、上記第2のアミノ酸の1つまたはそれ以上のランダムアミノ酸置換を有する抗体を作成する工程、および増大した血清半減期を有する変異体抗体を同定する工程を包含する。この方法はさらに抗体を単離する工程を包含し得る。この方法の実施において、第1のアミノ酸は、Fcフラグメントのアミノ酸番号253、310、435または436であり得、そして第2または2次アミノ酸は、CH2ドメイン中のアミノ酸番号252、254、256、309、311または315、あるいはCH3ドメイン中の433または434であり得る。

特定の広範な局面では、本発明は、Fcフラグメントを含む組成物として記載され、このFcフラグメントは、IgG抗体の約アミノ酸250から約アミノ酸440までのフラグメントを含み、上記IgG抗体よりFcRnに対してより高い結合親和性を有し、1つまたはそれ以上のFcRn結合性アミノ酸残基の近傍領域に1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有し、そしてpH7.4よりもpH6でFcRnに対するより高い結合親和性を有するとしてさらに規定され得る。

本発明の別の局面は、被験体において内因性の血清IgGを低減する方法であって、被験体に、増大した血清半減期を有するタンパク質またはペプチドを含む組成物の有効量を投与する工程、そして特に増大した血清半減期を有するIgGを投与する工程を包含する。

本発明の特定の実施態様はまた、IgGの血清半減期に対して増大した血清半減期について、因子をスクリーニングする方法を包含し、この方法は、候補因子を得る工程、pH7.4および約pH6においてこの因子のFcRnに対する結合親和性を測定する工程、pH7.4においてより約pH6においてFcRnに対するより高い結合親和性を有する候補因子を選択する工程、および同一条件下で上記選択された因子のFcRnに対する結合親和性とIgGのFcRnに対する結合親和性と比較する工程を包含し、ここで、IgGの結合親和性と比較してFcRnに対する

増大した結合親和性が、増大した血清半減期を有する因子の指標である。特定の好適な候補因子は、ペプチドまたはポリペプチド、あるいは抗体または抗体のフラグメントでさえあり得る。代替の実施態様では、このペプチドは、ランダムペプチドライブラリーから選択され得るか、またはランダムに変異されたタンパク質、または合成ペプチドでさえあり得る。

特定の実施態様では、本発明はまた、治療的因子の血清半減期を増大する方法であり得、この治療的因子を、本明細書に開示され請求項に記載された方法により同定されたIgGの血清半減期と比較して増大した血清半減期を有する因子に結合する工程を包含する。

【図面の簡単な説明】

図1は、大腸菌(E.coli)中の免疫グロブリン定常領域フラグメントの発現および分泌に用いたプラスミドの部分の概略図である。a)CH3ドメイン；b)CH2-ヒンジ；c)Fcフラグメント、およびd)Fcヒンジフラグメント。lacZプロモーターは白抜き丸、pelBリーダーは斜線の箱、免疫グロブリンドメイン[ヒンジ領域(H)およびCH2、CH3ドメイン]は白抜き箱、およびhis₆ペプチドタグ(his)は黒塗りの箱により表される。

図2Aは、組換え[CH2-ヒンジ]₂についてのクリアランス曲線である。この曲線は、急速な相(血管空間の内と外との間の注入タンパク質の平衡を表す；このタンパク質の相は部分的にサイズにより決定される)およびより長い相(血管内空間におけるタンパク質の異化を表す)を有する2相性である。このフラグメントの相の半減期は表Iに示され、そしてこれらはタンパク質の生物学的半減期を表す。

図2Bは、グリコシル化IgG1分子についてのクリアランス曲線である。

図3Aは、SVEC細胞に対する、¹²⁵I-標識WT FcヒンジおよびHQ-310/HN-433変異体の結合を示す。白抜きの棒は、洗浄後の細胞に結合した量を表し、そして斜線の棒は、2.5mg/mlのCHAPSを用いた抽出後に細胞ペレットから抽出された量を示す。

図3Bは、図3Aに示される研究の繰り返しからのデータである。

図4Aは、¹²⁵I-標識mIgG1、FcヒンジフラグメントおよびIgAの異化である。閉じた三角および+は、WT Fcヒンジを表し；閉じた四角およびXは、2m+/+(閉じた三角および四角)および2m-/-(+およびX)マウス中のHQ-310/HN-433変異体を表す。

図4Bは、¹²⁵I-標識mIgG1、FcヒンジフラグメントおよびIgAの異化である。白抜き三角および白抜き四角はIgAを表し、白抜き菱形はおよびX印の箱は、2m+/+(白抜き三角および白抜き四角)および2m-/(白抜き菱形はおよびX印の箱)マウス中のmIgG1を表す。各タンパク質について、各群内から1匹のマウスについての代表的な曲線が示される。これらのデータは、C57BL/6バックグラウンドのマウスについてである。

図5は、SWISSマウス中のFcヒンジフラグメントのクリアランス曲線である。各群内から1匹の代表的なマウスについての曲線が示される。

図6Aは、pH6.0における、野生型(WT)(黒塗り四角)およびLSF変異体(黒塗り三角)Fcヒンジフラグメントの解離を示すSPRセンサーグラムの領域である。プロットは、BIAevaluation 2.1ソフトウェアを用いて描かれる。時間の関数としての応答は、応答単位(RU)で示される。

図6Bは、pH7.4における、WT(黒塗り四角)およびLSF変異体(黒塗り三角)Fcヒンジフラグメントの解離を示すSPRセンサーグラムの領域である。矢印は、緩衝液がpH6.0から7.4に変化した点を示す。プロットは、BIAevaluation 2.1ソフトウェアを用いて描かれる。時間の関数としての応答は、応答単位(RU)で示される。pH7.4緩衝液がpH6.0緩衝液に対するために(後者がベースラインとして用いられる)大きな下向きのシフトは、マイナスのRU値を生じる。

図7は、マウスIgG1分子およびIgG1由来フラグメントのクリアランス曲線である。

図8は、マウスIgG1、Fab、Fc-パパインおよび組換えFcフラグメントの腸移入を示す。各試験に用いたマウスの数は、6(Fab)、12(mIgG1)、16(Fc-パパイン)、31(WT Fc)、5(HQ-310/HN-433)、5(成体マウス中のWT Fc)、および14(Fc-ハイブリッド)である。

図9は、相半減期と、組換えWTおよび変異体Fcフラグメントについての移入の阻害との

10

20

30

40

50

間の相関関係を示す。

図10は、非標識IgG1、WTおよびHQ-310/HN-433変異体Fcフラグメントによる、単離された刷子縁に対する¹²⁵I-IgG1結合の阻害を示す。

図11は、Fc遺伝子(WTまたは変異体)を含む発現/ファージディスプレイベクターである。白丸=lacZプロモーター、斜線の箱=peIBリーダー、白箱=WTFcまたはHQ-310/HN-433変異体、両斜線の箱=c-mycタグ、および斜線の箱=cplII遺伝子。単一の線=骨格ベクターである。

図12Aは、組換えFcヒンジフラグメントの経細胞輸送である。括弧内の番号は、各実験に用いたマウスの数を表す。SCIDマウス中の組換えFcヒンジフラグメントの母胎転移を示す。

図12Bは、BALB/c新生児中の組換えFcヒンジフラグメントによる放射標識mIgG1の腸伝達の阻害を示す。H433Aに対する値は、WT Fcヒンジに対する値とは有意に異ならない(Studentの検定による。p=0.127)。

図13Aは、組換えFcヒンジフラグメントのFcRnに対する結合を示す。mIgG1-セファロースへのFcRn結合の、インヒビター非存在下での結合に対する阻害パーセントを示す(3つの別々の試験の平均)。

図13Bは、組換えFcヒンジフラグメントのSpAに対する結合を示す。SpA-セファロースへのFcヒンジフラグメント結合の、WT Fcヒンジの結合に対するパーセンテージを示す(3つの別々の試験の平均)。

好適な実施態様の詳細な説明

本発明は、宿主細胞中で、免疫グロブリン様ドメインならびに加工されたおよび変異体ドメインの、この免疫グロブリン様産物が増大した血清持続性を有するようなクローニングおよび発現に関する。

本明細書に開示されるのは、延長されたインビボ半減期を有する抗体FcフラグメントおよびサブフラグメントおよびFcヒンジドメインのような、免疫グロブリン様ドメインおよびその部分をコードする組換えベクターである。大量の、例えば、インタクトな抗体と同じインビボ安定性を有する免疫グロブリンFcおよびFcヒンジドメインを生産する方法が、増大した半減期を有する抗体およびその他の分子を生産する方法として記載される。これらのDNA構築物およびタンパク質ドメインは、免疫治療薬またはその他の安定な組換えタンパク質の生産において、あるいは構築物の生産においてのような、種々の用途があるように考案される。

本発明は、抗体Fcヒンジ、Fc、CH2-ヒンジおよびCH3ドメイン；ならびに、例えば、LSFと称される変異体のような延長されたインビボ半減期を有する加工されたFcヒンジドメインを含む、種々の免疫グロブリン様ドメインの生産により例示されるので；本発明の方法を利用してその他の免疫グロブリン様ドメインが発現され得ることが理解される。

かなりの数の免疫系の鍵となる分子が相同なドメインを含むことが認められ、その構造は、進化を通じて保存されている。このような分子は、免疫グロブリンのスーパーファミリーのメンバーであり、それは、抗体およびT細胞レセプターのみならず、MHCクラスIおよびII糖タンパク質、CD2、CD4およびCD8細胞-細胞接着タンパク質、ならびに種々のFcレセプター(そのすべては1つ以上の免疫グロブリン様ドメインを含む)を含む。

代表的には、これらドメインの各々は、約100アミノ酸長であり、そして通常保存されたジスルフィド結合により安定化される2つの逆平行シートからなる特徴的なサンドイッチ様構造に折り畳まれていると考えられている。これら分子の多くは、1つの鎖の免疫グロブリン相同性単位が別の鎖中の相同性単位と相互作用するダイマーまたはそれ以上のオリゴマーである。

通常、各免疫グロブリン相同性単位は別々のエキソンによりコードされ、そして完全なスーパー遺伝子ファミリーが、初期の細胞-細胞相互作用を媒介することに関与し得る、Thy-1または₂-マイクログロブリンをコードする免疫グロブリン相同性単位に類似の単一の免疫グロブリン相同性単位をコードする遺伝子から進化したようである。Thy-1-様分子がヤリイカの脳から分離されたので、そのような根源的な遺伝子が、約4億年前に脊椎動物

10

20

30

40

50

がそれらの無脊椎動物祖先から分かれる前に生じた可能性がある。新たなファミリーメンバーは、おそらく、エキソンおよび遺伝子重複により生じ、そして同様の重複事象が、おそらく、抗体およびT細胞レセプターをコードする複数の遺伝子セグメントを生じた。抗体およびT細胞レセプターの他に、免疫グロブリン様ドメインを含む最も特徴付けられたタンパク質は、MHC分子およびCD4およびCD8糖タンパク質である。2つの主要なクラスのMHC（主要組織適合性複合体）分子、クラスIおよびIIが存在し、各々は1セットの細胞表面糖タンパク質からなる。MHC糖タンパク質の両方のクラスは、相同な全体構造を有するヘテロダイマーであり、そのアミノ末端ドメインは、T細胞への呈示のために抗原結合のために特殊化されていると考えられている。しかし、MHCクラスIの相同体であるFcRnは、別の機能、即ち血清IgGレベルの調節を有している。

10

各クラスI MHC遺伝子は、鎖と呼ばれるその大部分が3つの細胞外球形ドメインに折り畳まれる単一の膜貫通ポリペプチド鎖をコードする。各鎖は、 α_2 -マイクログロブリンと呼ばれる非グリコシル化小タンパク質と非共有結合的に会合する。膜に最も近接している α_2 -マイクログロブリンおよび β_3 ドメインは、両方とも免疫グロブリンドメインに相同性であり、そしてそれ故両タンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。膜から最も遠い鎖の2つのアミノ末端ドメインは、T細胞により認識される多形性（可変）残基を含む。T細胞はまた、クラスI分子に結合するウイルス由来ペプチドを認識し、そしてこれは細胞性免疫において特に重要である。

クラスI MHC分子と共通して、クラスII MHC分子は、膜に近接する2つの保存された免疫グロブリン様ドメインおよび膜から最も離れた2つの多形性（可変）アミノ末端ドメインを有するヘテロダイマーである。しかし、これらの分子では、両鎖は膜にまたがる。両クラスのMHC分子の多形性領域が外来抗原と相互作用し、しかもT細胞レセプターにより認識されるのはMHC分子と外来抗原との複合体であるという強い証拠がある。

20

CD4およびCD8は、ヘルパーおよび細胞障害性T細胞の表面上でそれぞれ発現される。両糖タンパク質はMHC分子の不変部分、CD4はクラスII、そしてCD8はクラスI MHC糖タンパク質に結合すると考えられている。

続いて、その他の分子が、免疫グロブリン様ドメインを含むことが示された。これらは、例えば、5つの免疫グロブリン様ドメインに折り畳まれると考えられる細胞外ドメインであるPDGFレセプターを含む。脊椎動物において細胞-細胞接着を媒介する、増加する数の細胞表面糖タンパク質がまた、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するとして同定された。これらは、神経細胞およびグリア細胞の表面上で発現され、そして Ca^{2+} 非依存性細胞接着を媒介する大きな単回通過膜貫通糖タンパク質であるN-CAMを含む。N-CAMポリペプチドの細胞外部分はまた、5つの免疫グロブリン様ドメインに折り畳まれる。L1糖タンパク質（ニューロン-グリア細胞-接着分子、またはNg-CAMとしても知られる）もまた、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。

30

A：増大した血清持続性を有するFcRnリガンドの単離

Fcフラグメント上のFcRnの相互作用部位の近傍にある領域をランダムに変異させ、次いで変異体のライブラリーからより高い親和性結合体について選択することにより、増大した血清半減期を有する改変体Fcフラグメントが単離され得る。これらのより高い親和性変異体は、それらの結合のpH依存性をなお維持すべきである。何故なら、データは、これがFcRnが働く、即ち酸性区画においてIgG類へ結合し次いで約pH7.4で血清中に放出される方式の重要な側面であることを示すからである。従って、この方法は、特にFcRnを可溶性形態で用いてリガンドを単離する場合、pH依存様式でFcRnに結合する任意のリガンド（タンパク質、ペプチド、または非タンパク質リガンドでさえ）を選択するために用いられ得る。事実、開示された発明を用いて、合成の化学的化合物のライブラリー、ランダム化された表面ループを有するペプチドライブラリーまたはタンパク質のライブラリーのいずれかからリガンドを単離し、当業者に周知の標準的な単離手法により1週間程度で可溶性タンパク質またはペプチドを得、次いでこれらのペプチド（ループ）またはタンパク質を用いてACDデータベースを用いて合成リガンドを調製し、ホモログを同定し得ることは明白である。さらに、このようなFcRnリガンドは、IgGまたはフラグメントより有用であり得る。

40

50

何故なら、それらはより小さく、そして合成リガンドの場合、非免疫原性であると考えられ得るからである。この観点から、FcRnに対してIgGより低い親和性を有するリガンド、および同一またはより高い親和性を有するリガンドの単離が有用であると考えられる。例えば、mIgG1より数倍低い親和性を有するリガンドはなお、FcRnに対して検出し得る親和性を有さない類似のリガンドより有意に長い半減期を有し得る。

薬物、タンパク質、ペプチドなどの血清半減期を増大するために用いられ得る分子の使用は巨大である。原理的には、そのような分子は、任意の治療薬の血清持続性を増大するために用いられ得る。従って、請求項に記載された発明は、ほとんど無制限の数の疾患または障害の処置に対する治療用途に広く適用可能である。何故なら、それは、必要な治療投与量の数を低減することによりコストおよび患者の不快感の両方を低減するために用いられ得るからである。

B：抗体定常ドメイン

高いインビボ安定性を決定する免疫グロブリン分子の特徴は、本発明の前に完全には理解されていなかった。先の研究は、CH2ドメインが抗体の異化の制御において重要な役割を果たし得ることを示し、そして最近の研究はまた、CH3ドメイン中の配列が関与し得ることを示唆した（Ellersonら、1976；Muellerら、1990；Pollockら、1990、Kimら、1994a；Medesanら、1997）。CH2ドメイン上の炭水化物残基の存在は、安定性について有意であっても重要でない影響を与えるようであり、そしてこの影響の範囲はイソタイプに依存する（TaoおよびMorrison、1989）。

本発明の一部として、マウスIgG1定常領域由来の組換えCH2-ヒンジ、CH3、FcおよびFcヒンジフラグメントが宿主細胞から発現された。フラグメントは精製され、放射標識され、そしてマウスにおけるクリアランス研究で用いられた。クリアランス速度は、Fvフラグメントおよび完全グリコシル化IgG1分子のそれと比較された。組換えFcヒンジフラグメントは、完全免疫グロブリン分子のそれに非常に類似である安定性性質を有している。対照的に、モノマー性CH2-ヒンジおよびCH3フラグメントは、両方とも急速にそしてFvフラグメントと類似の様式で浄化された。これは、CH2およびCH3両領域中の配列が、インビボ安定性に重要であり、そしてさらに、グリコシル化はこのイソタイプの異化の制御において重要な役割を果たしていないことを示す。

CH3ドメイン、FcフラグメントおよびFcヒンジフラグメントはすべて、ホモダイマー性タンパク質であることが見いだされた。FcおよびCH3ドメインについては、ダイマーは非共有結合的に結合し、そしておそらく非共有結合的相互作用により安定化されている。Fcヒンジダイマーについては、このフラグメントは、ヒンジ領域システイン間の-S-S-架橋により共有結合で結合している。

この研究の特に重要な局面は、宿主細胞中での発現の後に精製された免疫グロブリンFcヒンジおよびFcフラグメントが、ネイティブな抗体分子と同じインビボ安定性を有しているという発見である。これは、時間の関数として¹²⁵I-放射標識免疫グロブリンフラグメントのインビボでのクリアランス速度を測定することにより決定された。これら試験からの結果は、組換え非グリコシル化FcヒンジまたはFcフラグメントが、完全グリコシル化IgG1分子と類似のインビボ安定性を有することを実証した。

組換え非グリコシル化Fcヒンジフラグメントは、完全グリコシル化IgG1免疫グロブリン分子のそれと同様の相を有していることが見いだされた。事実、Fcヒンジの除去は、わずかな半減期の減少をもたらした（Kimら、1995）。これらの結果は、マウスIgG1イソタイプにとって、炭水化物残基の存在は、それはなおマイナーな役割を果たし得るが、インビボ安定性にとって必要であるには見えないことを示す。タンパク質化学を用いて得た先のデータは、CH2ドメインがインビボ安定性の原因であることを示唆したが（Ellersonら、1976）、最近の研究は、CH3ドメイン中の残基もまた、マウスIgG2aおよびIgG2bイソタイプの異化制御に関与し得ることを示した（Pollockら、1990）。

安定性に関する本発明の発見は特に重要である。何故なら、非グリコシル化Fcフラグメントのインビボ安定性は先に評価されていなかった（Noseら、1990）からである。非グリコシル化Fcフラグメントは、（哺乳類細胞により生産された免疫グロブリンのタンパク質分

10

20

30

40

50

解により調製された)グリコシル化型と比較して、補体C1qに対する結合が低下し、単球上のFcレセプターへの結合が顕著に低下することが公知である(Noseら、1990; Leatherbarrowら、1985; NoseおよびWigzell、1983; TaoおよびMorrison、1989)。しかし、これら有利な性質は、非グリコシル化分子が不安定であることが見いだされた場合、ほとんど重要ではないであろう。本発明者らは、インビボで安定であることが証明された非グリコシル化Fcフラグメントを発現し得た。

E.coli中のIgG1 FcヒンジまたはFcフラグメントの生産は、インビボの抗体安定性および異化の制御に関与するこの領域の重要な残基が解明されることを可能にする。これらの結果は実施例8に記載される。さらに、本発明に従って、ヒトFcドメインが今やE.coliで生産され得、ヒトタンパク質のさらに詳細な研究を可能にする。さらに、マウスまたはヒト起源のいずれかに関わらず、FcまたはFcヒンジドメイン、あるいはFcまたはFcヒンジドメイン：融合タンパク質の細菌による分泌が考案され、長い血清存続性を有する新規なタンパク質生産のための、便利な、経済的に魅力的でありかつ迅速なルートを提供する。構造分析に次いで、Fc構造のより小さな領域が、タンパク質キメラ、または融合タンパク質に利用され、生物学的に安定な治療薬を生産し得る。これは特に、タンパク質分解のために、哺乳類細胞のようなその他の発現系から得られることが出来ない治療薬の生産に特に有用である。それ故、本発明のFcヒンジまたはFcドメイン、またはその部分は、治療用途のキメラタンパク質を含む組換え分子のタグ化および安定化の両方に有用なモジュールであることが提案される。

C : IgG分子の異化部位

Igクラス(IgA、IgE、IgM、IgDおよびIgG)の中で、IgG分子が最も長いインビボ半減期を持つ(Zuckierら、1990)。異化を制御するIgG分子の領域(「異化部位」)は、数十年の間Fcフラグメントに在ることが知られていた。この試験は、最初、SpiegelbergおよびWeigle(1966)により実施され、そして後に多くの他の研究者により確認され(Zuckierら、1990に概説されている)、タンパク質分解により生産されたFcフラグメントが完全IgG分子と同じインビボ半減期を有することが示された。Dorringtonおよび共同研究者による研究(DorringtonおよびPainter、1974; Ellersonら、1976; Yasmeenら、1976)は、トリプシン消化により生産されたCH2ドメインフラグメントが完全IgG分子のそれと同じ半減期を有したことを示した。初期およびより最近の両データは、CH2ドメインがIgG異化の制御に関与していることを示したが、これらデータのいくつかは、CH3ドメインのさらなる関与については一致していない(ArendおよびWebster、1977; Dimaら、1983; Muellerら、1990; Kimら、1994a; Batraら、1993)。実際、最近の研究は、CH2ドメインおよびCH3ドメインの両方が、IgG分子の血清存続性を制御する配列を含むことを示した(Kimら、1994a; Pollockら、1990; Kimら、1994c; Medesanら、1997)。特に、部位特異的変異誘発を用いて、マウスにおいて血清IgG1レベルの維持に重要であるCH2-CH3ドメイン界面中のアミノ酸残基が同定され(Kimら、1994a; Medesanら、1997)、そしてそれ故この研究は異化部位の正確な位置を示した。これらの残基は、ヒトおよびマウスIgGイソタイプの両方で高度に保存されており(Kimら、1994a; 表I)、ヒトおよびマウスIgGの異化部位が同じであることを示唆する。異化および腸転移に関する、2つの二重変異体(HQ-310、His310がAlaおよびGln311がAsnに; HN-433、His433がAlaおよびAsn434がGlnに)の影響が、これらの位置の単一変異よりもむしろ、単一変異(Ile253がAla253に)の影響とともに特徴付けられた(Kimら、1994a; Kimら、1994b)。より最近の研究では(Medesanら、1997)、His310からAla310、His435からAla435、His436からAla436、His433からAla433、Asn434からAla434またはGln434の変異の影響が分析された。

表 I

異化部位の領域におけるマウスおよびヒトIgGの配列

	252~254	308~312	433~436**
mIgG1 [*]	TIT	IMHQD	HNHH
mIgG2a	MIS	IQHQD	HNHH
mIgG2b	MIS	IQHQD	KNYY
mIgG3	MIS	IQHQD	HNHH
hIgG1 ⁺	MIS	VLHQD	HNHY
hIgG2	MIS	VVHQD	HNHY
hIgG3	MIS	VLHQD	HNRF
hIgG4	MIS	VLHQD	HNHY

^{*} mIgG1=マウスIgG1、⁺hIgG+ヒトIgG1

^{**} 二重変異としてのHis433およびAsn434は影響を有したが、単一変異としての、his433からala433およびasn436からala436は、影響が観察されなかった (Medesanら、1997)。

変異しており、そしてクリアランス速度に影響することが見いだされた残基 (Kimら、1994a) に下線を付する。

His435からAla435への変異は、異化作用および経細胞輸送の両方に強力な影響を有し、一方、His436からAla436への変異は、より小さな影響を有する (Medesanら、1997)。His310からAla310への変異のみは、His310からAla310およびGln311からAsn311の両方の変異と同じ影響を有する。このことは、Gln311がFc:FcRn相互作用に関連しないことを示唆する。His433からAlaへ、およびAsn434からAla/Glnへの個々の変異は、FcRn異化または経細胞輸送への結合において影響を有さず、その一方、初期の研究 (Kimら、1994a;1994c) において、His433、Asn434の二重変異が中程度の影響を有することが留意されていた。この変動は、Fc:FcRn相互作用における433および434の直接的な関与よりもむしろ二重変異によるHis435のような隣接する重要な残基の摂動に起因する (その一方単一変異は摂動が少ない)。

Thr252、Thr254、Thr256、Met309およびAsn315に加えて、変異誘発のための有用な標的であり得る他の残基は、Gln311、His433およびAsn434である。さらに、本明細書中に開示されるデータは、His433およびAsn434の二重変異は異化に対して影響を有するが、Gln311、His433またはAsn434が異化部位を構成すると述べることは妥当でないことを示す。

CH2ドメイン由来の炭水化物残基の除去は、IgGのインビボでの半減期に小さな影響を有するか、または全く影響を有さず、そしてこの影響の程度は、イソタイプに依存する (NoseおよびWigzell, 1983; TaoおよびMorrison, 1989; Wawrzynczakら、1989)。IgGの異化に関与するFcの領域 (Kimら、1994a) は、Fc RI、RIIおよびRIIIレセプター (「古典的」FcR) の結合に関与する部位とは異なるようである。なぜなら、これらの認識配列は、より低いヒンジ領域に主として位置するからである (Duncanら、1988; Lundら、1992; Sarmayら、1992; Jefferisら、1990; CanfieldおよびMorrison, 1991; Wawrzynczakら、1992)。さらに、異化部位は、補体因子C1q結合部位 (Glu318、Lys320およびLys322) とは異なる (Wawrzynczakら、1992; DuncanおよびWinter, 1988)。従って、異化部位の変異は、補体結合にもFc RI、RIIおよびRIIIへの結合にも影響しないはずである。

IgG2bおよび他のマウスイソタイプ

マウスIgG2bは、IgG1、IgG2aおよびIgG3よりも迅速なクリアランス速度を有することが示されている (Pollackら、1990)。異化部位を構築することに重要であることが示されているCH2-CH3ドメイン界面の残基に関する配列差異に関する分析は、IgG2bにおいて、IgG1、IgG2aおよびIgG3のHis433、His435、His436は、IgG2bにおいて、Lys433、Tyr435およびTyr436に置換されていることを示す (表 I)。これらの配列差異は、観察されているクリ

10

20

30

40

50

アランス速度および新生児転移における差異を説明し得る (McNabbら、1976; Guyerら、1976)。この点に関して、Scharffおよび共同研究者 (Pollockら、1990) は、IgG2aおよびIgG2bのCH3ドメインにおける配列差異が、IgG2aと比較してIgG2bがより速いクリアランス速度を担うことを示しているが、関連する残基は同定されていない。さらに、マウスIgG2bは、マウスIgG1と同じくらい効率的には新生児の腸管を横切って転移されない (Guyerら、1976)。マウスIgG1のCH3領域における配列差異 (表I) は、異化および経細胞輸送を制御することにおける位置433、435および436の役割を分析するための理想的なシステムを提供する。IgG2b分子における、his433からala433、チロシン (tyr) 435からhis435、およびtyr436からhis436への変換は、マウスIgG1と同じインビボ半減期を有する変異IgG2bを生じる。さらに、IgG1、IgG2およびIgG4と比較したヒトIgG3のより速いクリアランス速度は、残基435 (表I) が、血清IgGレベルを調節することに関与することをさらに示す。

10

IgG異化の考えられる機構

全くの定常レベルでの血清IgG濃度の維持は、効果的な免疫に重要である。さらに、異常に高い (高 グロブリン血症) または低い (低 グロブリン血症) 血清IgGレベルは、臨床的な症状を生じる。効果的であるために、血清IgGレベルの感知および調節の両方を行う恒常性機構は、生物のB細胞によるIgG分子の連続的かつ可変性の産生を扱い得なければならない。このような恒常性がどのようにしてもたらされるかは未だ不明であり、そしていくつかの機構が、血清中のIgGレベルの制御を説明するために提案されている (Brambellら、1964; Brambell, 1966; Ghetieら、1981)。明白に、いずれのモデルも、血清IgGレベルにおける変化に感受性であり、かつ応答性であるフィードバックシステムを引き合いに出さねばならない。

20

Brambellおよび共同研究者 (Brambellら、1964; Brambell, 1966) は、限られた数の細胞性レセプター (この提案においてFcRcと称される) が、IgG分子に結合し、そして分解からIgG分子を保護することを提案している。結合し、そしてインターナライズしたIgG分子は、タンパク質分解から保護され、引き続いて血管内プールに放出されて戻され、一方、結合レセプターを有さないインターナライズしたIgG分子は分解される。従って、IgG崩壊を担う細胞はまた、崩壊に対するIgGの保護に関与することが逆説的に提案される (Brambellら、1964; Brambell, 1966)。これらのレセプターは、飽和し得、そして高 グロブリン血症の個体におけるこのモデルで一貫し、血管内IgGは、低 グロブリン血症におけるよりも多いに迅速に分解される。この濃度依存性の異化速度は、濃度-異化現象と呼ばれる。レセプターモデルはまた、IgG1分子CH2-CH3界面の特定残基の変異が迅速な血管内クリアランスを生じることを示す最近のデータ (Kimら、1994a) と一致する。このことは、変異が「保護的」レセプターによる認識の損失を生じたことを示唆する。

30

免疫グロブリンクリアランスの部位

IgGが異化され、そしてプロテアーゼが関与する部位は、なおも特徴付けられなければならない。肝臓および胃腸管は両方とも、IgGの異化に役割を果たすことが示されているが (Covellら、1986; Hopfら、1976; DobreおよびGhetie, 1979)、いずれの器官も、異化の主要な部位であることが示されていない。それゆえ、身体全体での散在性異化の可能性が、考慮されるべきである (WaldmannおよびStrober, 1969)。このような散在性異化は身体全体の内皮系で生じ得る。なぜなら、この系の細胞は血管内プールと緊密に接触し、そしてIgGは内皮細胞を絶えず横断して、血管外スペースに進入する。最近のデータは、内皮細胞の関与の可能性とともに散在性異化の概念を支持する。

40

膜を横切るIgGの転移 (経細胞輸送)

新生児における腸管転移

母から若年 (胎児/新生児) への受動免疫の転移に関与する機構は、Brambell (1966) によって提案され、そして最近のデータにより支持されるような異化の制御に関与する機構と類似性を共有し得る。齧歯類において、IgGの腸管転移は、出生後の2週間までに生じ得、そして乳児の齧歯類が母性のIgGを必要とする主要な経路である (Morris, 1978; JonesおよびWaldmann, 1972にレビューされている)。卵黄嚢を横切るIgGの母性-胎児転移は

50

、ヒト（ここでは母性-胎児転移が唯一の経路である）とは対照的に、齧歯類における転移のよりマイナーな経路である。

Fcレセプター（FcRn）は、初乳または乳から新生児ラットおよびマウスの血流中へのIgGの転移に関係している（Brambell, 1966; Rodewald, 1976）。新生児におけるその役割と一致して、レセプターFcRnは、成体齧歯類の十二指腸において発現されない。単離したラット刷子縁の結合研究（WallaceおよびRees, 1980; Rodewaldら、1983）により、異なる親和性のFcレセプターの2つのクラスが存在することを示し、そしてデータは、より高い親和性のFcRが経細胞輸送に関与することを示唆する（Hobbsら、1987; RodewaldおよびKraehenbuhl, 1984）。FcRnは、乳児ラットの十二指腸の上皮刷子縁から単離され（RodewaldおよびKraehenbuhl, 1984; SimisterおよびRees, 1985）、そして対応する遺伝子がクローン化された（SimisterおよびMostov, 1989a; SimisterおよびMostov, 1989b）。このFcレセプターは、51kDaおよび14kDaの2つのポリペプチドのヘテロダイマーを含む。興味深いことに、14kDa成分は、2-ミクログロブリンであり、そして51kDa成分は、クラスI MHCタンパク質の重鎖に相同性を有する。このタンパク質は、組換え形態において高収量で発現され得、そして最近、X線結晶学によって分析されている（Burmeisterら、1994a; Burmeisterら、1994b）。マウスFcRnをコードする遺伝子が単離され、そしてラットのそれに高度に相同的であることが示されている（Ahouseら、1993）。興味深いことに、ラットおよびマウスFcRnの両方はまた、最近単離された、ヒト胎盤由来のFcレセプター（これはおそらく母性-胎児転移に関与する）と相同性を共有する（Storyら、1994）。従って、入手可能なデータは、ラット、マウスおよびヒトにおけるIgG経細胞輸送が、類似のレセプターによって実行され、そして結果として共通の機構を共有することを示す。

経腸管輸送の提案される機構は、腸管上皮細胞のルーメン側におけるFcRnがpH6~6.5（腸管ルーメンのpH）でIgGに結合し、そしてIgG-FcRn複合体が細胞を横切って側底表面に輸送されることである（ここで開口分泌が、新生児齧歯類の血流に生じる）。IgGのFcRnとの会合が、それが細胞を介して輸送されるとき、リソソームの分解からIgG分子を保護すると推論される。血漿のpH（7.4）は、循環への結合IgGの放出を生じる。FcRnのIgG（またはFc）への結合の分析は、このモデルで一貫したpH依存性（すなわち、pH6~6.5での強い結合およびpH7.4での非常に弱い（たとえ存在したとしても）結合）を示す（Rodewald, 1976; WallaceおよびRees, 1980）。組換えFcフラグメントを用いて、マウスFcRnは異化制御に関与する領域と重なり合うマウスIgG1分子の領域と相互作用し、そしてIle253、His310、Gln311、His433およびAsn434を含む（Kimら、1994b）。より最近のデータは、His435およびHis436の関与、ならびにHis433およびAsn434（個々に変異し、そして二重変異としてではなく）が、FcRnとの相互作用において役割を果たさないことも示している（Medesanら、1997）。さらに、His310からAla310への単一変異は、His310からAla310およびGln311からAsn311の二重変異と同じ効果を有する。このことは、Gln311がFcRnと相互作用しないことを示す（Medesanら、1997）。同様の結論が、ラットFcRnにおけるX線結晶学的データおよびBjorkmanおよび共同研究者のインビトロ結合研究から引き出されている（Burmeisterら、1994a; Burmeisterら、1994b; Raghavanら、1994）。さらに、腸管転移に関して、データは、ラットFcRnのFcへの結合の化学量論が2:1であるという報告（Huberら、1993）と一致して、Fc当たり2つのFcRn部位が必要であることを実証している（Kimら、1994b）。FcRnとの相互作用におけるIgG1分子のHis310、His435およびHis436の関与は、少なくとも部分的に、FcRn-Fc相互作用のpH依存性を説明する（Kimら、1994b; Raghavanら、1993）。

マウス卵黄嚢を横切る転移（母胎転移）

マウスFcRnは、新生児腸管および卵黄嚢の両方において高レベルで発現され（Ahouseら、1993）、そしてFcRnに構造的に類似するFcRはまた、ラット卵黄嚢から単離されている（Robertsら、1993）。FcRnへのIg結合に関する細胞位置は、2つのプロセスにおいて異なるようであるが（Robertsら、1993）、これらのデータは、本明細書中に開示されるインビボ研究とともに、母体-胎児および腸管輸送が、FcRnによって実行されることを強く示唆する。ラットにおいて、卵黄嚢FcRは、尖端および側底の細胞質中の小胞に位置し、そし

て卵黄嚢細胞のルーメン表面に位置しない (Robertsら、1993)。位置の差異は必要であると考えられる。なぜなら、卵黄嚢を取り囲むルーメンのpHは、わずかに塩基性であり (Robertsら、1993)、そしてFcRnのIgGへの結合の親和性このpHでは低いからであり (Hobbsら、1987; RodewaldおよびKraehenbuhl、1984) ; 従って、母性IgGが、非特異的エンドサイトーシス工程において卵黄嚢細胞によって取り込まれ、次いでわずかに酸性のエンドソーム区画においてFcRnに結合することが示唆された。IgGの胎児循環への送達は、次いで、腸管の経細胞輸送の送達と類似の様式で生じることが提案されている (Robertsら、1993)。同様に、IgG異化の制御に関して、IgGは、非特異的エンドサイトーシス工程において「異化」細胞によって取り込まれ、そして続いてエンドソーム区画においてFcRnに結合する。

10

IgG経細胞輸送と異化の制御との間の相互作用

データ (Kimら、1994a; Kimら、1994b) は、Brambellおよび共同研究者によって最初に提案されたように、異化制御、母胎転移および腸管転移に関与するFcレセプターは、マウスIgG1の同一 (同一でない場合には、緊密に関連した) 部位に結合する。この仮説の支持において、発現分析は、マウスの卵黄嚢および新生児腸管におけるFcRnの高レベルの発現に加えて、FcRnが、マウスの心臓、肺、肝臓、脾臓および内皮細胞株において低レベルで偏在的に発現されるが、Tリンパ球でもBリンパ球でも発現されないことを示す。

Fc:FcRn相互作用の親和性が増大し、そして血清存続性が長くなる場合に、受動性免疫の乳児への母性転移が改善されることが予想される。治療的IgGの増強された血清存続性および母胎転移に関して、それらのプロセスに関与するFcレセプターへの結合に対してより高度な親和性を有するIgGを付与することが好ましい。結果として、より高度な親和性のIgGは、高濃度の内因性IgGを競合 (out-compete) し得なければならない (マウスにおける5 mg/mlおよびヒトにおける10 mg/ml)。

20

D : 延長されたインビボ半減期を有する操作された抗体ドメイン

IgG分子のインビボ異化を調節することに関与する機構は、現在十分に理解されていないが、Fc領域は、IgGの血清存続性に重要である配列を含有していると考えられている (SpiegelbergおよびWeigle、1965)。本明細書中およびPollockら、(1990) に記載されるように、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、IgGの生物学的半減期に影響することが示されている。

StaphylococcusのプロテインA (SpA) - IgG複合体は、非複合体化IgG分子よりも迅速に血清から取り除かれることが観察されている (Dimaら、1983)。X線結晶学研究由来の結果は、Fc-ヒンジ領域中の残基がSpA結合に関与することを示している (Deisenhofer、1981)。これらの異なる系統の情報は、マウスIgG1分子由来の (上記の) 組換えFc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメイン界面の残基を変異させること、および得られる変異体の異化を調査することを、本発明者らに促した。

30

このアプローチを用いて、CH2ドメインのいくつかのアミノ酸残基、Ile-253およびHis-310 (およびHis310、Gln-311からAla310、Asn311の二重変異)、ならびにCH3ドメインのいくつかのアミノ酸残基 (His-433-Asn-434の二重変異、His433およびAsn434の単一変異、ならびにHis435およびHis436の単一変異) をインビトロ変異誘発によって変化させた。次いで、変異タンパク質を、組換えE.coli細胞から精製し、そして薬物動態学的なパラメーターをマウスにおいて測定した。このような研究からの結果は、CH2ドメイン由来のアミノ酸残基、およびCH3ドメイン由来のアミノ酸残基が、マウスIgG1の異化に直接的に関与することを実証する。従って、異化を制御するIgG1分子の部位は、CH2-CH3ドメイン界面に位置し、そしてFcレセプターへの結合に関与するより低いヒンジ領域とは異なる (Duncanら、1988; Lundら、1991)。異化制御に関与する特定のアミノ酸残基の同定は、レセプターを持つ細胞が血清IgGレベルを調節することに重要であり得るという仮説を支持する (Brambellら、1964)。

40

本発明者らは、マウスIgG1分子の特定の残基 (このイソタイプの異化の制御に関与することを本発明者らが見出した) を「異化制御部位 (catabolic control site)」と名付けた。この領域は、従来のFcレセプター (Fc RI、Fc RII、およびFc RIII) との相互作用

50

の部位とは異なるが、SpA結合部位と重複する。それゆえ、これは、SpA-免疫グロブリン複合体が、複合体化されていない免疫グロブリンより迅速に浄化されたことを示した以前のデータと一致する (Dimaら、1983)。このデータは異化制御におけるFcフラグメントのさらなる残基の関与を排除しないが、それによって抗体または抗体に基づく分子または結合体の生物学的半減期が短縮され得る明らかな手段を提供する。それはまた、それによって、所望であれば、ile253、his310、his435、およびhis436のような残基を再挿入することにより (任意のそのような残基が特定の抗体 (例えば、IgG2b) において異なることが見出された場合)、特定の抗体の寿命が増加され得る手段を提供する。また、これらの鍵となるアミノ酸に隣接する残基のランダムな変異誘発、それに続く選択は、増加した半減期を有するFcフラグメントを生じ得る。

10

IgG分子の異化に関与する機構はなお完全には解明されていないが、本明細書中に示されるデータは、SpA様「保護的」レセプターがIgG上のCH2-CH3ドメイン界面に結合し、そしてそれらを分解から保護するという概念を支持する。本発明のこれらの局面を形成する加工されたFc-ヒンジフラグメントは、種々の実施態様において有用な試薬であると想像される。例えば、それらは、推定のレセプター (これはおそらくFcRnである) の単離において、そしてさらにIgG異化の部位および機構を描写することにおいて用いられ得る。

組換えFc-ヒンジフラグメントはまた、動物におけるイムノトキシンの存続性を調節することが所望される場合、イムノトキシンの調製および送達のために有用であり得る。イムノトキシンは、細胞の増殖もしくは細胞分裂を抑制するかまたは死滅させる能力を有する別の因子 (特に、細胞傷害性のまたはそうでなければ抗細胞性の因子) に結合された抗体成分を有する因子である。イムノトキシンの調製は、一般に、当該分野において周知である (例えば、米国特許第4,340,535号 (本明細書中に参考として援用される) を参照のこと)。

20

E : FcRn

グロブリン (IgG) が免疫において担う中心的な役割にもかかわらず、それによって顕著に一定のIgGレベルが血清において維持される分子的機構および原動力についてはほとんど知られていない。IgGホメオスタシスを分子レベルで維持するプロセスを理解することは、IgG欠損の処置および治療用抗体の有効な送達に関連する。新生児マウスにおける機能研究は、IgGの異化を調節するマウスIgG1 (mIgG1) の同じアミノ酸 (Fc残基Ile253、His310、His433、Asn434、His435、およびHis436、ここでHis433およびAsn434は二重変異である) がまた、MHCクラスIホモログであるFcRnへの結合に関与することを示し、そしてこれはラットFcRn : Fc複合体のX線結晶構造と一致する (Burmeisterら、1994a、b)。齧歯類FcRnは、母体から子への、主に経細胞輸送を介するIgGの受動転移に関連付けられており (RodewaldおよびKraehenbuhl、1984 ; SimisterおよびRees、1985)、そして 2-ミクログロブリン (2m ; SimisterおよびMostov、1989b) と会合した45~50kDaの鎖を含む。組換えFc-ヒンジフラグメントの生理学的半減期に対する、および新生児経細胞輸送に対するIle253、His310、His433、Asn434、His435、およびHis436の変異の効果は、密接に関連する。このことは、FcRn、または近縁のタンパク質が、もともとBrambellおよび共同研究者らによって血清IgGレベルの調節に関与することが示唆された今までのところ未同定のFcレセプターであり得ることを示唆する (Brambellら、1964)。そのようなFcレセプターは、IgGを結合しそして循環中にIgGを放出し戻すことにより、IgGホメオスタシスを維持することが提唱され、そしてIgGがレセプターに対して飽和濃度に達すると、過剰のIgGは分解に運命付けられる (Brambellら、1964)。

30

IgGの異化は、肝臓 (FukumotoおよびBrandon、1979) ならびに腸 (Covellら、1986) のような特定の器官だけでなく、脾臓、皮膚、および筋肉のような網内皮成分を含有する組織においても生じる分散的なプロセスである (MarianiおよびStrober、1990)。逆説的に、これらの細胞はまた、IgGをリサイクルする推定のFcレセプター (Brambellら、1964) を有し得る。IgGの母胎 / 新生児転移に関与する細胞外でのラットFcRn (SimisterおよびMostov、1989a) およびヒトFcRnホモログ (Storyら、1994) の偏在性の発現は、身体中の部位においてIgGレベルを制御することにおける役割と一致する。

40

50

実施例7に記載のように、マウス組織および細胞株におけるFcRnの発現は、逆転写酵素 (RT)-PCRTMを使用して分析されている。FcRn-鎖mRNAは、成体組織/細胞型、特に内皮細胞に富む成体組織/細胞型において偏在的に分布している。2m遺伝子の破壊に起因してFcRn発現を欠く遺伝子操作されたマウス (2m-/-マウス)におけるFc-ヒンジフラグメントの薬物動態学 (Zijlstraら、1990; Kollerら、1990) もまた分析されている。データは、IgGの異化の調節におけるFcRnの関与を支持する。

実施例7に記載の研究において、2m-/-マウスにおけるIgG/Fcフラグメントの薬物動態学の分析は、2m依存性タンパク質 (Zijlstraら、1990) であるFcRnが、血清IgGレベルの維持に関与し得るという概念を支持する証拠を提供する。この役割におけるFcRnの示唆された意義は、ラット (SimisterおよびMostov、1989a)、ヒト (Storyら、1994) およびマウス (図4A~図4C) におけるFcRnまたはそのホモログの偏在性の発現、およびさらに、新生児経細胞輸送の制御、IgG異化、および組換えFcRnへの結合に関与するIgGの領域間の密接な重複 (Kimら、1994b; Popovら、1996; Medesanら、1997) と一致する。

RT-PCRTM分析は、FcRnが、肝臓、脾臓、および肺においては発現されるが、クローン性BおよびT細胞株/ハイブリドーマにおいては発現されないことを実証する。マウスの内皮細胞株および肝細胞の両方における発現のさらなる分析は、FcRnが、これらの細胞型においても発現されることを示した。定量的PCRTMは、これらの細胞における発現のレベルが、新生児刷子縁における発現のレベルよりも実質的に低いことを示し、そしてこのことは、ノーザンブロッティングを使用して以前に報告された新生児刷子縁および卵黄嚢以外の組織におけるマウスFcRn-鎖mRNAの検出の欠如 (Ahouseら、1993) を説明し得る。内皮細胞株SVECを用いる直接的結合研究は、WT Fc-ヒンジが、HQ-310/HN-433変異体より有意に高いレベルで結合することを示す。変異体Fc-ヒンジフラグメントがバックグラウンドレベルで単離された新生児刷子縁 (Kimら、1994b)、および検出不能に組換えFcRn (Popovら、1996) に結合することを実証する以前の観察は、ディファレンシャルな結合がFcRnにより媒介されることを示唆する。ディファレンシャルな結合がFcγRI、IIおよび/またはIIIとの相互作用に起因するという可能性は、Fc上のこれらのレセプターの相互作用部位がCH2-CH3ドメイン界面に対して遠位であること (Duncanら、1988; CanfieldおよびMorrison、1991; Lundら、1991)、ならびにさらに、非グリコシル化 (aglycosylated) Fcフラグメントがこれらのレセプターへの結合において損なわれていること (TaoおよびMorrison、1989; Noseら、1990) を実証する報告により、なさそうにされる。それゆえ、結合データは、FcRnがSVEC細胞において機能的であり、そしてFcRn-鎖mRNAが発現される他の細胞型において機能的であると意図されることを示唆する。機能的なFcRnはまた、SephacroseにカップリングされたマウスIgG1 (mIgG1) を使用して、SVEC細胞溶解物から単離されている。

内皮細胞および肝細胞の両方におけるFcRnの発現の機能的意義は、これらの細胞型のいずれかまたは両方が、IgGホメオスタシスの維持に関与し得ることを示唆する。これに関して、FcRnがラット肝細胞から免疫沈降により検出されており、そしてIgGの胆管への輸送の媒介における役割が、近年この部位における免疫監視に関連することが示唆されている (Blumbergら、1995)。しかし、肝細胞FcRnについての異なる機能は、このタンパク質が結合しているIgGを胆汁中への送達から孤立させ、そして非結合 (過剰) IgGのみが胆管における異化のために送達されるということであり得る。これは、ヒツジにおいてIgGが肝臓細胞を介して胆汁中へ分解のために送達されることを示すデータと一致する (FukumotoおよびBrandon、1979)。しかし、他者の以前のデータ (MarianiおよびStrober、1990; Zuckierら、1989において概説される) と考え合わせると、本研究における知見は、肝臓およびより分散して位置する内皮細胞の両方の関与を支持する。

薬物動態学データは、mIgG1またはWT Fc-ヒンジが、2m-/-マウスにおいて異常に短い血清半減期を有することを実証する。これらの血清半減期は、血清IgGレベルの維持におけるなんらかの普遍的な欠損に起因するのではない。なぜなら、IgAの血清半減期は2m+/+マウスおよび2m-/-マウスの両方において同じだからである。多くの研究が、血清IgG濃度とIgGの半減期との間に逆の相関が存在することを示しており、そしてこれは濃度-異化

10

20

30

40

50

現象 (concentration-catabolismphenomenon) と呼ばれている (WaldmannおよびStrober、1969; Zuckierら、1989)。それゆえ、mIgG1/WT Fc-ヒンジの迅速な排除は、2m-/-マウスにおける異常に高レベルの内因性血清IgGに起因し得る。

しかし、これは明らかにその例ではない。なぜなら血清IgGレベルは両方のバックグラウンドの2m-/-マウスにおいて異常に低く、そしてこれらの低い血清IgG濃度は他者の観察と一致するからである (Spriggsら、1992; Israelら、1995)。対照的に、血清IgAおよびIgM濃度 (これらは、IgGホメオスタシスに関与する機構とは異なる機構により調節される) (Stroberら、1968) は正常範囲にある。

今日までに、2m-/-マウスにおける低い血清IgG濃度の媒介においてIgG分解速度が有し得る役割は研究されていない。正常マウスにおいて、母体IgGが内因性免疫グロブリン合成を刺激し、そして2m-/-マウスにおける母体転移の欠如が低いIgGレベルを説明するということが以前に示唆されている (Israelら、1995)。しかし、この研究におけるデータは、両方のバックグラウンドの2m-/-マウスはより低いIgG1合成速度を有するが、低い血清IgGレベルのさらなる原因は異化速度の増加であることを示す。C57BL/6×129/Olaバックグラウンドのマウスについての状況は、このバックグラウンドの2m+/+動物についてさえ、IgGおよびIgG1レベルが異常に低いという観察により、より複雑にされる。これは、この混合バックグラウンドの2m-/-マウスについての合成速度よりも、予想外に低い合成速度に起因する。従って、混合バックグラウンドのマウスにおけるIgGの新生児転移の存在または非存在には依存せずに、IgG1合成速度は異常に低く、そしてこの理由は未知である。このバックグラウンドの2m+/+マウスにおける低い血清IgG濃度の結果として、そして濃度-異化現象と一致して (WaldmannおよびStrober、1969; Zuckierら、1989)、IgG1およびWT Fc-ヒンジの半減期は、2m+/+C57BL/6マウスにおけるよりもこの系統において有意に長い。

2m-/-マウスにおける観察は、それによって、正常マウスにおいて血清IgGレベルを調節する2m依存性Fcレセプター (すなわち、FcRn) が2m-/-マウスにおいて存在しないかまたは機能不全であるかのいずれかのモデルと一致する。しかし、特に2mの欠如が現在利用可能なデータが示すより多面発現性である場合は、別の説明は排除され得ない。これは、2m-/-マウスにおける見かけ上正常なCD4+CD8-サブセットの存在 (Zijlstraら、1990; Kollerら、1990) およびB細胞がT細胞依存性抗体応答を備える能力 (Spriggsら、1992; Mozesら、1993) により、なさそうにされる。他の可能性 (例えば、IgG産生前駆細胞における欠損、または低い血清IgGレベルを生じるCD8+細胞により産生される因子/サイトカインの非存在のいずれか) は、2m-/-マウスが正常数のB220+/sIgM細胞を有する (Spriggsら、1992)、およびLyt2ノックアウトマウスにおいてCD8+細胞の欠如は減少したIgGレベルを生じない (Fung-Leungら、1991) という観察により排除される。さらに、FcRn自体ではなくFcRnに類似する2m依存性タンパク質がIgGホメオスタシスに関与するという可能性は、マウスにおいてFcRnは近縁のホモログを有しないことを示すサザンブロットイングデータにより、なさそうにされる (Kandilら、1995)。しかし、FcRnと同じ部位においてFcまたはIgGに結合する、無関係な、今までのところ未同定の、2m依存性タンパク質が、血清IgGレベルの維持において役割を担うことが考えられる。

IgGに結合し、そして新生児腸および卵黄嚢細胞を横断してのIgGの輸送を媒介するFcRnの能力は、それによって、FcRnが、他の組織において、IgGを分解から、それに結合しそして血清中に再循環させることにより保護する機構を示唆する。FcRn発現の一定のレベルは、いかにして、B細胞による変動するIgG産生にかかわらず、IgGホメオスタシスが維持されるかを説明する。なぜなら、一旦FcRnが飽和すると、過剰のIgGはエンドサイトーシス取り込み後の分解に運命付けられるからである (Brambellら、1964)。FcRn-IgG複合体形成の部位に関して、この相互作用のpH依存性 (RodewaldおよびKraehenbuhl、1984; SimisterおよびRees、1985; Gastinelら、1992) は、血清IgGレベルの維持のために、細胞内、酸性区画中への液相エンドサイトーシスによる取り込み後に、FcRnがIgGに結合することを示唆する。これは、新生児腸を横断しての経細胞輸送の間に空腸上皮細胞の先端細胞表面におけるわずかに酸性の媒質において生じるFcRn-Fc相互作用とは対照的である (Rodew

10

20

30

40

50

ald、1973)。しかし、ヒト(Leachら、1990)およびラット(Robertsら、1990)の両方におけるIgGの母胎転移についての類似の機構を支持するデータが報告されている。

まとめると、知見は、以前に割り当てられていた機能(RodewaldおよびKraehenbuhl、1984; SimisterおよびRees、1985)とは異なるFcRnについての新たな役割を示唆し、そしてこれは、IgGホメオスタシスを維持する分子的機構の理解に対する関連を有する。齧歯類FcRnと近年同定されたヒトFcR(Storyら、1994)との間の配列類似性は、本発明の知見がヒトにおけるIgG-関連免疫不全の治療に、そしてまたヒト胎盤を横断しての治療用IgGの母体-胎児転移の媒介に関連を有することを示唆する。

F: 変異誘発

本発明において、アミノ酸残基の変異誘発は、ランダムまたは部位特異的のいずれかであり得る。タンパク質において完全にランダムな変異を作製すること、または実施例4に記載のように特定の残基のみをランダムに変異することを選択し得る。また、残基を任意の他のアミノ酸残基に変化させ得るが、しかし、特定の残基が好ましくありそうである。例えば、タンパク質の三次または三次元構造を維持するために必須である親水性残基を大きな疎水性残基に変異させることは、おそらく所望されない。なぜなら、そのような変異は抗体を不安定化させ得、そして分子の半減期を延長しないかもしれないからである。さらに、露出した残基を変異させることが好ましい。なぜならそれらはおそらくFcRnと相互作用するからである。

部位特異的変異誘発は、基礎をなすDNAの特異的変異誘発を通しての、個々のタンパク質もしくはペプチド、または生物学的機能的に等価なタンパク質もしくはペプチドの調製において有用な技術である。この技術はさらに、DNA中に1つ以上のヌクレオチド配列変化を導入することにより、1つ以上の上記の考慮を取り込んで、配列改変体を調製および試験する容易な能力を提供する。部位特異的変異誘発は、特異的オリゴヌクレオチド配列の使用を通しての変異体の産生を可能にする。この特異的オリゴヌクレオチド配列は、所望の変異のDNA配列および十分な数の隣接するヌクレオチドをコードして、横断される欠失連結部の両側において安定な二重鎖を形成するに十分な大きさおよび配列の複雑さのプライマー配列を提供する。代表的には、変化される配列の連結部の両側に約5~10残基を有する、約17~25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

一般に、部位特異的変異誘発の技術は当該分野において周知である。理解されるように、この技術は代表的には、一本鎖形態および二本鎖形態の両方で存在するバクテリオファージベクターを用いる。部位特異的変異誘発において有用な代表的なベクターとしては、M13ファージのようなベクターまたはpUC119のようなファージミドベクターが挙げられる。これらのファージベクターは市販されており、そしてそれらの使用はおおむね当業者に周知である。二本鎖プラスミドもまた、PCRTMを使用する部位特異的変異誘発(これは、一本鎖DNAを生成する工程を排除する)において慣習的に用いられる。

一般に、部位特異的変異誘発は、最初に一本鎖ベクターを得るか、またはその配列内に所望のタンパク質をコードするDNA配列を含む二本鎖ベクターの2つの鎖を融解することにより行われる。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは合成的に調製される。次いで、このプライマーは、変異保有鎖の合成を完了するために、一本鎖DNA調製物とアニーリングされ、そしてE. coliポリメラーゼIクレノウフラグメントのようなDNAポリマー化酵素に供される。このように、ヘテロ二重鎖が形成され、ここで1つの鎖がもとの非変異配列をコードし、そして第2の鎖が所望の変異を保有する。次いで、このヘテロ二重鎖ベクターは適切な細胞(例えば、E. coli細胞)を形質転換するために使用され、そして変異配列配置を保有する組換えベクターを含むクローンが選択される。

あるいは、二本鎖DNAのPCRTM特異的変異誘発が、変異されるべき部位に重複するオリゴヌクレオチドプライマーを設計することにより使用され得る。このような変異体は、例えば、核酸再生技術(例えば、米国特許第4,603,102号(本明細書中で参考として援用される)のPCRTM技術)の適用によってFcフラグメントを直接合成することにより容易に調製され得る。

部位特異的変異誘発を使用する選択遺伝子の配列改変体の調製は、潜在的に有用な種を産

10

20

30

40

50

生する手段として提供され、そしてこれはそれに制限することを意図しない。なぜなら、遺伝子の配列改変体を得られ得る他の方法が存在するからである。例えば、所望の遺伝子をコードする組換えベクターが、配列改変体を得るために、ヒドロキシシルアミンのような変異原性因子で処理され得る。

G：ワクチン

本発明は、能動免疫および受動免疫の両方の実施態様で使用するためのワクチンを意図する。ワクチンとしての使用が適切であることが提案される免疫原性組成物は、最も容易に、本明細書中に開示される様式で調製される、操作された抗体Fcフラグメント、ドメインおよび/またはペプチドから直接調製され得る。好ましくは、抗原性物質は、十分に透析されて所望でない低分子量の分子が除去される、および/または所望のビヒクル中へより容易に処方するために凍結乾燥される。

有効成分としてペプチド配列を含むワクチンの調製は一般に、米国特許第4,608,251号；同第4,601,903号；同第4,599,231号；同第4,599,230号；同第4,596,792号；および同第4,578,770号（これら全ては、本明細書中で参考として援用される）に例示されるように、当該分野で良く理解されている。代表的には、このようなワクチンは、注射剤として調製される。液体溶液または液体懸濁液のいずれかとして；注入前の、液体中溶液または液体中懸濁液に適切である固体形態もまた調製され得る。調製物はまた、乳化され得る。活性な免疫原性成分は、しばしば、薬学的に受容可能でありそして有効成分と適合性である賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。さらに、所望であれば、ワクチンは、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、またはワクチンの有効性を増強するアジュバントのような微量の補助物質を含み得る。

ワクチンは、従来のように、非経口的に、注射（例えば、皮下または筋肉内のいずれか）により投与され得る。投与の他の態様に適切なさらなる処方物は、坐薬および、特定の場合、経口処方物を含む。坐薬について、従来の結合剤およびキャリアは、例えば、ポリアルキレン（polyalkylene）グリコールまたはトリグリセリドを含み得る：このような坐薬は、0.5%～10%、好ましくは1～2%の範囲で有効成分を含む混合物から形成され得る。経口処方物は、例えば、薬学的グレードのマンニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような通常用いられる賦形剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性処方物、または粉末の形態をとり、そして10～95%、好ましくは25～70%の有効成分を含む。

タンパク質は、中性すなわち塩形態としてワクチンに処方される。薬学的に受容可能な塩は、酸添加塩（ペプチドの遊離のアミノ基により形成される）および無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）により形成されるものを含む。遊離のカルボキシル基により形成される塩はまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化鉄）および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど）から誘導され得る。

ワクチンは、投与処方に適合性の様式で、および治療に有効でありかつ免疫原性であるような量で投与される。投与されるべき量は、処置されるべき被験体に依存し、これは、例えば、個体の免疫系の抗体を合成する能力、および所望される防御の程度を含む。投与されることが必要である有効成分の正確な量は、医師の判断に依存する。しかし、適切な投与範囲は、1ワクチン接種あたり数百マイクログラムの有効成分のオーダーである。最初の投与および追加免疫の注射に適切なレジメはまた変化し得るが、最初の投与、続く後の接種または他の投与により代表される。

適用の様式は、広範に変化し得る。ワクチンの投与のための任意の従来の方法が適用され得る。これらは、固体の生理学的に受容可能な基剤でのまたは生理学的に受容可能な分散液での経口適用、非経口、注射などを含むと考えられる。ワクチンの投与は投与経路に依存し、そして宿主のサイズに従って変化する。

ワクチンのためのアジュバント効果を達成する種々の方法は、通常、リン酸緩衝化生理食塩水中で0.05～0.1パーセントの溶液として使用される水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム (alum) のような薬剤、0.25パーセント溶液として使用される糖類の合成ポリマー (Carbopol) との混合物、70～101の間の範囲の温度で30秒～2分間の加熱処理によるワクチン中のタンパク質の凝集物のそれぞれの使用を含む。アルブミンに対するペプシン処理 (Fab) 抗体での再活性化による凝集物、細菌細胞 (例えば、*C. parvum*) またはグラム陰性細菌のエンドトキシンもしくはリボポリサッカライド成分との混合物、生理学的に受容可能な油性ビヒクル (例えば、マンニト (mannide) モノオレイン酸 (Ara celA)) 中のエマルジョン、あるいはブロック置換基として使用されるパーフルオロカーボン (Fluosol-DA) の20パーセント溶液とのエマルジョンがまた用いられ得る。

10

多くの例において、一般には6回のワクチン接種を超えない、より一般には4回のワクチン接種を超えない、そして好ましくは1回以上、一般には少なくとも約3回のワクチン接種である、ワクチンの複数回の投与を有することが望まれる。ワクチン接種は、通常、2～12週の間隔で、より一般には3～5週の間隔である。1～5年の間隔、一般には3年の間隔での周期的な追加免疫は、抗体の防御レベルを維持するために望まれる。免疫の過程には、上清抗原に対する抗体についてのアッセイが続き得る。アッセイは、放射性核種、酵素、蛍光などの従来 of 標識で標識することにより行われ得る。これらの技術は周知であり、そしてこれらのタイプのアッセイを例示としての、広範な種々の特許 (例えば、米国特許第3,791,932号；同第4,174,384号；および同第3,949,064号) において見出され得る。

20

以下の実施例は、本発明の実施を例示することを意図し、それらに制限されることを意図しない。本発明は、マウス抗体のFc-ヒンジ、Fc、CH2-ヒンジおよびCH3ドメインを含む種々の免疫グロブリン様ドメイン；ならびに安定性が増加した変異体ドメインにより示されるが、他のタンパク質またはペプチドが、本明細書中に記載されるものと類似する構築物に適合可能であることが理解される。同様に、種々のタグ、リンカー配列およびリーダー配列が、ポリペプチド産物を得るために望ましい特定の精製または単離方法に依存して用いられ得る。

実施例 1

以下の実施例は、発現宿主として *E. coli* を使用した、免疫グロブリンのFc-ヒンジまたはFcフラグメントおよびFc-ヒンジまたはFc由来サブフラグメントの、ミリグラム量での産生を例示する。これらの結果は、この系の、組換えタンパク質の商業的な大量生産についての適切性を示す。

30

プラスミド、発現および精製

PCRTMを使用して、マウスIgG1免疫グロブリン分子9E10 (Honjoら、1979；Evanら、1985) に由来するフラグメントをコードする遺伝子を発現プラスミド (図1) 中に連結するために単離しそして改変した。これを達成するために、全RNAを 1×10^7 の9E10ハイブリドーマ細胞から本明細書中上記のように抽出した。cDNAを、CH3ドメイン遺伝子/Fcフラグメント遺伝子またはCH2ドメイン遺伝子のいずれかをそれぞれ単離するためのオリゴヌクレオチドCH3forBstまたはCH2forBst (以下を参照のこと；Honjoら、1979) を使用してプライムした。次いで、この遺伝子を、PCRTMおよび以下に示すプライマーを使用して単離した。列挙したように、5つの異なる配列は、それぞれ、配列番号1から配列番号5で表される。

40

a) CH3 ドメイン,

CH3bakNco = 5' ATC ACC ATG GCC GGC AGA CCG AAG GCT CCA CAG 3';

CH3forBst = 5' TAC AGG TGA CCT TAC CAG GAG AGT GGG AGA GGC T 3'

b) CH2- ヒンジ,

HingebakNco = 5' ATC ACC ATG GCC GTG CCC AGG GAT TGT GGT TG 3'

CH2forBst = 5' ATC AGG TGA CCT TGG TTT TGG AGA TGG TTT T 3'

c) Fc フラグメント,

CH2bakNco = 5' ATC ACC ATG GCC GAA GTA TCA TCT GTC TTC ATC 3'

CH3forBst; 上記のとおり

d) Fc- ヒンジフラグメント,

HingebakNcoおよびCH3forBst; ともに上記のとおり

代表的なPCRTMは、以下を含んだ：100mlの最終容量中、3ユニットのPromegaTaqポリメラーゼ、10μl Promega緩衝液、10mlの0.2mM dNTP cDNA合成反応溶液。サイクル条件は、Tchne温度サイクリングブロックを使用し、94（0.5分）、55（0.5分）、72（1分）を30サイクルであった。各オリゴヌクレオチドは、NcoIまたはBstEIIのいずれかの制限部位（下線が引かれ、そしてイタリックである配列により示される）をコードし、マウスIgG1定常領域遺伝子（Honjoら、1979）にアニーリングするオリゴヌクレオチドの領域を示す；これはPCRTM産物の制限消化、続くゲル精製およびNcoI-BstEIIフラグメントとしての

Vapal His中への連結を可能にする（Wardら、1992）。次いで、連結したDNAを上記のようにE. coli BMH 71-18中へ形質転換した。全てのプラスミド構築物の挿入物の配列を、ジデオキシヌクレオチド法ならびに一本鎖DNAテンプレートのためのSequnase（USB）および二本鎖DNAテンプレートのためのFemtomoleキット（Promega）のいずれかを使用して分析した。

これらの抗体フラグメントを組換えE. coli細胞から発現させ、そして分泌させ得る。そしてカルボキシ末端His₆ペプチドタグはNi²⁺-NTA-アガロースを使用する精製を可能にする。図1に示すプラスミドを保有するE. coli BMH 71-18形質転換体を、本明細書中上記のように、増殖させそして発現のために誘導した。組換えタンパク質を、ペリプラズムから、浸透圧ショック、続くNi²⁺-NTA-アガロースを使用する親和性精製により単離した。組換えフラグメントを、CH3ドメイン、CH2-ヒンジフラグメント、FcフラグメントおよびFc-ヒンジフラグメントについて、それぞれ、培養物1リットルあたり2、1~1.5、1.5~2および0.5~1ミリグラムの収量で精製した。組換えタンパク質の純度を、SDSゲル電気泳動（Laemmli）およびクーマシーブルーR-250での染色を使用して評価した。

インビトロ分析

HPLC分析の結果は、CH3ドメイン、FcフラグメントおよびFc-ヒンジフラグメントが全て発現され、そしてホモダイマーのタンパク質として精製されることを示した。FcおよびCH3ドメインについては、非還元PAGEでの分析（図2B）により示されるように、ダイマーは非共有結合されている。FcフラグメントおよびCH3ドメインのダイマー化は、おそらく、CH3フラグメント間の非共有相互作用により安定化される。これらは免疫グロブリン構造において密に並置されている（Marquardtら、1980）。Fc-ヒンジダイマーについては、フラグメントはまた、ヒンジ領域システイン間の-S-S-架橋により共有結合されている。

対照的に、HPLCを使用したCH2-ヒンジフラグメントの分析は、タンパク質の約10%がダイマーとして発現および精製され、そして残りはモノマーとして発現および精製されることを示す。免疫グロブリンの構造分析は、抗体分子のFc領域中のCH2ドメインがわずかな相互作用を形成し、そして比較的弱いこれらの相互作用（例えば、CH3ドメイン間の相互作用と比較して）が、おそらく、低い割合の発現されたダイマーを生じること示す。ダイマーは-S-S-架橋により共有結合されている；ヒンジ領域を有さないCH2ドメインの発現および精製は、非共有結合されているダイマーを形成する、有意な割合のこのタンパク質を生じ、さらに、分子内-S-S-架橋により正確に折り畳まれている免疫グロブリンドメインで予想されるように遊離のスルフヒドリル基が存在しない。これは、CH2-ヒンジフラグメントにおいて、-S-S-架橋が、ヒンジ領域に位置するシステイン残基間で形成されることを示唆する。

実施例 2

以下の実施例は、E. coliでの発現後に精製された、ネイティブな配列の免疫グロブリンのFc-ヒンジおよびFcフラグメントが、ネイティブなIgG1抗体分子に類似するインビボ安定性を有することを例示する。

免疫グロブリンフラグメントのインビボでのクリアランス速度を決定するために、組換えタンパク質を¹²⁵Iで放射標識し、そして血清の放射標識レベルを時間の関数としてモニターした。次いで、クリアランス速度を、インタクトなマウスIgG1（ハイブリドーマから発現および精製した）およびマウスD1.3抗体由来の細菌で発現させたD1.3 Fvフラグメント（Wardら、1989）の速度と比較した。クリアランス曲線は、すべて二相性であることが見出された（図2Aおよび図2B）。相および相の半減期を表IIに示す。D1.3 Fv、モノマーCH2-ヒンジおよびCH3フラグメントについては、相は迅速過ぎて正確に決定されなかった（図2Aおよび図2B）。

クリアランス速度のデータから、いくつかの結論が導かれ得る。最初に、組換え非グリコシル化Fc-ヒンジフラグメントは、完全にグリコシル化されたIgG1分子と同じインビボでの安定性を有する。a相（血管組織と血管外組織との間の平衡相を表す）のより短い半減期は、そのより小さなサイズのため、組換えFc-ヒンジフラグメントについてより短い。第2に、CH3ドメインおよびモノマーのCH2-ヒンジフラグメントの両方は、D1.3 Fvフラグメントの速度に類似する速度で浄化される（図2Aおよび図2B）。

表II

免疫グロブリンフラグメントのβ相の半減期

免疫グロブリン（フラグメント）	β相（半減期（時間））
CH2+ヒンジ	29.1±1.2
[CH2+ヒンジ] ₂	61.6±10.7
CH3	21.3±2.3
Fv	24.1±3.5
Fc-ヒンジ	82.9±10.0
完全な免疫グロブリン（IgG1）	89.2±10.6

組換え免疫グロブリンフラグメントを精製し、そしてBolton Hunter試薬 (Amersham, 2000Ci/mmol) またはIodogen (Amersham) のいずれかをを用いて $10^5 \sim 10^7$ cpm/mgタンパク質の比活性に放射標識した。コントロールとして使用した完全なIgG1抗体を、哺乳動物細胞から、標準的方法論を用いて精製した。グリコシル化Fc-ヒンジフラグメントを、パパイン消化、プロテインAセファロース (Pierce) を用いたその後の精製により、このIgG1抗体から得た。半減期の測定のために、2～4匹のBALB/cマウス (23～28 g、雌) に、0.1mlの放射標識タンパク質 ($10^6 \sim 10^7$ cpmを含む約1～50 μ gのタンパク質) を尾部または眼窩後部に注射し、そして注射後2分～72時間の時点で眼窩後部から採血した。血液サンプル中に存在する放射活性の量を、シンチレーションカウンターを用いて決定した。

高い比率 (約90%) のCH2-ヒンジフラグメントは、ダイマー形態よりもむしろモノマー形態で発現および精製され、従って、安定性の決定基がCH2-ヒンジダイマー上に位置する可能性が残った。CH2-ヒンジダイマーがインビボで安定であるか否かを決定するために、CH2-ヒンジフラグメントのダイマーを、サイズ排除によりモノマーから分離し、そしてKimら (1994c) により記載されたような薬物動態学的研究における使用のために放射標識した。CH2-ヒンジダイマーのモノマーを、還元およびアルキル化によりダイマーから生成し、そしてこれらのモノマーもまた放射標識し、そして薬物動態学的研究に使用した。このダイマーの相の半減期は、優先的にはモノマーであるCH2-ヒンジドメインの半減期よりも有意に長い。

これらのデータは、組換え非グリコシル化Fc-ヒンジフラグメントが、完全なグリコシル化IgG1免疫グロブリン分子に類似の相を有することを実証する。従って、炭水化物残基は、安定性において主要な役割を果たさないようである。さらに (Kimら, 1995)、ヒンジの存在は、半減期の僅かな増加をもたらす。対照的に、モノマーCH2-ヒンジフラグメントおよびCH3フラグメントの両方が、抗体Fvフラグメントと同程度に早く異化される。このことは、CH2ドメインおよびCH3ドメインの両方における配列の存在が、組換えFc-ヒンジまたはFcフラグメントのインビボでの安定性に必要であることを示す。しかし、CH2-ヒンジダイマーは、CH2-ヒンジモノマーよりも長い半減期を有するが、CH3ドメインについての必要性と一致して、CH2-ヒンジダイマーの半減期はFc-ヒンジの半減期よりも短い。E. coliにおけるIgG1 Fc-ヒンジまたはFcフラグメントの産生は、インビボでの免疫グロブリン分子の異化を制御することに関与する重要な残基の記載を可能にすると予想される。本研究を考慮すれば、E. coliにおけるヒトFc領域の産生および分析がここで可能である。この研究がまた、動物またはヒトの治療において用いられる種々の組換え分子とともに使用するための新規なタギングおよび安定化方法の開発をもたらすことが予想される。

実施例3

以下の実施例は、2-ミクログロブリン欠損マウスにおけるIgGの異常に短い半減期を示し、そして成体の肝臓、肺、脾臓、および内皮細胞におけるFcRn鎖の発現を実証する。これは、血清IgGレベルの維持におけるFcRnの役割を意味する。

細胞株

マウスB細胞株BCL1/3B3 (Brooksら, 1983) およびT細胞ハイブリドーマ2B4 (Chienら, 1984) を、本研究に用いた。2つの内皮細胞株 (マウス肺毛細血管内皮細胞 (B10、D2.PCE) およびSV40形質転換内皮細胞 (Kimら, 1994c) (SVEC)) は、それぞれ、B10.DBA/2マウスおよびC3H/HeJマウスの肺に由来した。B10、D2.PCE細胞株を、A. Curtis教授から得た。マウス肝細胞ガン株Hepa 1-6を、ATCC (1830-CRL) から得た。

マウス系統

2m-/- (Kollerら, 1990; C57BL/6 \times 129/OlaおよびC57BL/6バックグランド; 混合バックグランドについては、129/Olaマウスは少なくとも2～3回、C57BL/6バックグランドに戻し交配されており、そしてコロニーは同腹子交配により維持された) および 2m+/+ [(C57BL/6 \times 129/Ola) F2] マウスは、Jackson Laboratoriesからであった。2m+/+ (C57BL/6) マウスは、Southwestern Medical Center Animal Resources Centerからであった。

RT-PCRTM分析

肺、肝臓、肝細胞、脾臓、および卵黄嚢を、成体BALB/cマウスおよび12日齢BALB/cマウス

10

20

30

40

50

からの新生児刷子縁から単離した。肝細胞の単離のために、ラット肝細胞の単離について既に記載された方法を用いた (Quistorffら, 1993)。これは、95%を越えるものが肝細胞である細胞集団をもたらした。RNAを組織 / 細胞株から抽出し、そしてcDNA合成をプライマー B でプライミングした。プライマー B は、既に記載された方法 (Kimら, 1994a) を用いて制限部位を「付加 (add-on)」するために加えられた13塩基を有する、FcRn 鎖 (Ahouseら, 1993) のコード鎖の塩基1075~1095に相補的である。cDNA合成物のアリコートを、プライマー A (配列番号6) および B またはプライマー B および C のいずれかとともにPCRTMに用いた。プライマー A (配列番号6) および C は、それぞれ、FcRn 鎖遺伝子 (Ahouseら, 1993) のコード鎖の塩基640-656および964-996にマッチする。プライマー C は、制限部位を「付加」するために加えられた12塩基を有する。RT-PCRTM産物の予想サイズは469bp (プライマー A (配列番号6) および B) および157bp (プライマー B および C) である。

10

RT-PCRTMのコントロールとして、アクチンプライマー (マウス アクチンコード配列の塩基352~368であり、そして アクチンコード配列の塩基781~787に相補的である) を、cDNA合成およびPCRTMに用いた。サザンブロッティング (Sambrookら, 1989) を、クローン化FcRn 鎖由来の³²P 標識SacI-BstEIIフラグメント (塩基688~1028) をプローブとして用いて行なった。

内皮細胞由来の完全なFcRn 鎖遺伝子の単離およびヌクレオチド配列決定

FcRn 鎖全体をコードする遺伝子を、2つの重複するクローンから以下の通りに単離した。総RNAを内皮細胞株から単離し、そして細胞外ドメイン (リーダーペプチドを含む) をコードする遺伝子セグメントを、FcRnのコード配列 (Ahouseら, 1993) の塩基1~24にマッチし、そしてその塩基841~870に相補的であるプライマーを用いてRT-PCRTMにより単離した。D10、D2.PCE細胞由来のこの遺伝子を用いて、昆虫細胞における可溶性FcRnの発現のためのプラスミドを構築した (Popovら, 1996)。塩基640~1095をコードするセグメント (膜貫通領域および細胞質テールを含む) を、RT-PCRTMならびにプライマー A (配列番号6) および B を用いて単離した。PCRTM産物をpGEM-T (Promega) 中にクローン化し、次いでSphI-SalIフラグメントとして両方向でpUC118/pUC119中に再クローン化した。ssDNAを得られたクローンから単離し、そしてジデオキシヌクレオチド法 (Sangerら, 1977) およびSequenase^R (USB Biochemicals) を用いて配列決定した。各フラグメントについて、いくつかの独立したPCRTM単離物を分析した。

20

30

定量的PCRTM

本質的に、ScheuermannおよびBauer (ScheuermannおよびBauer, 1993) の方法論を用いた。FcRnのカルボキシ末端領域および3'非翻訳領域をコードする遺伝子セグメント (Ahouseら, 1993) を、PCRTMならびにプライマー5' TCT GGC TCC TCC GTG CT 3' (配列番号6) (FcRnコード配列の塩基640~656) および

5' ATCATC TAG ATT TTT TTG TTG GGG CCA AAT TTA TG 3' (配列番号7)

(XbaI部位を下線で示し、そしてポリ A テールおよび上流領域に相補的である配列を斜体で示す) を用いて単離した。次いで、PCRTM産物を、XbaI (プライマー中にコードされる) およびNcoI (FcRnコード配列中の内部部位およびFcRn非翻訳3'テール) を用いて制限処理して、NcoIフラグメント (塩基992~1192) およびNcoI-XbaIフラグメント (塩基1200~1285) を生成した。これらの2つのフラグメントを、塩基640~1095をコードする配列を含むpUC119誘導体とともに用いて、FcRnコード配列の塩基640~1095および3'非翻訳領域 (すなわち、塩基640~1285) をコードする遺伝子を組立てた。この構築物を、唯一のBstEII部位 (FcRnの塩基1021~1027) で制限処理し、そして100bpの「フィラー」フラグメントを挿入してからpSP64 (Promega) へ再クローン化した。ポリ A + RNAを、Riboprobe system II (Promega) を用いて合成し、そしてオリゴdTセルロースを用いてポリ A + RNAを精製した。このRNA (FcRnポリ A) を、定量的PCRTMにおける内部標準として用いた。

40

総RNAを、既に記載されたように (Kimら, 1994a)、またはQiagen (Chatsworth, CA) からのRNeasy総RNAキットを用いて細胞株から抽出した。cDNAを合成反応を、0.8~2.2 μg

50

RNA (各細胞株について一定に保持した) ならびに $10^5 \sim 10^8$ FcRnポリ A 分子 (この範囲で変化した) および上記のポリ A プライマーを用いて行なった。

cDNA合成物のアリコート、以下のプライマーを含む二連PCRTMにおいて使用した:

5' ATC ACC ATG GCC GGT AGG ATG CGC AGC GGT CTG CCA GCC 3'、配列番号 8

(斜体の塩基はFcRnコード配列の塩基967~990にマッチする) および32-P 標識

5' ATC AGT CGA CCT TGG AAG TGG GTG GAA AGG CAT T 3'、配列番号 9

(斜体の塩基はFcRnの塩基1075~1095に相補的である)。各PCRTMの10分の1を、4%アガロースゲル上で分析した。PCRTM産物に対応するバンドを切り出し、そしてcpmレベルをガンマ計測により決定した (FcRnポリ A に由来する産物は、100bpのサイズ差により、本物のFcRn転写産物に由来する産物とは区別され得る)。

標準サンプルおよび試験サンプルの取り込まれたcpmを、添加した標準物の量に対してプロットし、そして交差点をFcRn転写産物およびFcRnポリ A 標準物の量の等量に対応するとした。単一の刷子縁細胞を計数することは不可能であるので、定量を総RNA 1 μ gあたりの転写産物の数として表した。

免疫グロブリンの放射標識

mIgG1、組換えFc-ヒンジフラグメントおよびIgAを、記載された (Kimら, 1994a) ようにIodo-Gen試薬 (Amersham) を用いてヨウ素化した。

組換えFc-ヒンジフラグメントの結合研究

コンフルエントな層のSVEC細胞を、0.26または0.4mg/mlの 125 I 標識WT Fc-ヒンジまたはH Q-310/HN-433変異体とともに37℃にて一晚 (16~18時間) インキュベートし、培地 (完全RPMI, Gibco, Grand Island, NY, +10%ウシ胎児血清) で洗浄し、そして50mMリン酸緩衝液 (pH7.5) 中の5mM Na₂EDTAとの5分間のインキュベーションにより剥離した。細胞を移し、そして 10^7 細胞あたりの放射活性を決定した。

次いで、細胞をペレット化し、そして0.3mg/ml PMSF、25mg/mlペプスタチン、および0.1mg/mlアプロチニンを含有する2.5mg/ml CHAPS、0.1M Tris-HCl pH8.0 2ml中に再懸濁し、そして室温にて30分間インキュベートした。懸濁液を、12000gで30分間遠心分離し、そしてペレットおよび上清中の放射活性の量を決定した。上清値を用いて、 10^7 細胞あたりの抽出された量を計算した。

薬物動態学的研究

ヨウ素化mIgG1、組換えFc-ヒンジフラグメント、およびIgAの薬物動態学を、既に記載された (Kimら, 1994a) ように決定した。

血清Ig濃度の決定

血清Igの濃度を、放射状免疫拡散法およびBindaridキット (The Binding site Ltd., Birmingham, UK) を用いて決定した。沈澱環の直径を電氣的に測定した。

マウスIgG1の合成速度の決定

IgG1の合成速度 (SR) を、b相半減期 (日) および血清濃度 (c (mg/ml)) から式 (MarianiおよびStrober, 1990) を用いて計算した:

$$SR (\text{mg/日/マウス}) = (2.77 c) / (T_{1/2})$$

そして、2.77の定数は $(100 \times \ln 2 \times V) / (IV)$ に由来する

ここで、V = 血液容量 (全てのマウスについて2mlとした) そしてIV = 血管内IgG1の% (全てのマウスについて50%とした)。

FcRn 鎖mRNA発現

本明細書中に開示されたデータは、FcRnが血清IgGレベルを調節することに関与し得ることを示唆した。IgG異化の部位は依然として明確には決定されていない (MarianiおよびStrober, 1990) ので、種々のマウス組織および細胞株におけるFcRn 鎖の発現を、RT-PCRTMおよびFcRn 鎖遺伝子 (Ahouseら, 1993) 由来のプライマーを用いて分析した。RT-PCRTMが特異的であったことを確実にするためにサザンハイブリダイゼーションを行なった。卵黄嚢および新生児刷子縁に加えて、FcRn 鎖は、肺、肝臓、および脾臓において発

10

20

30

40

50

現されるが、B細胞株BCL1/3B3 (Brooksら, 1983) およびT細胞ハイブリドーマ2B4 (Chienら, 1984) により示されたクローンリンパ球集団においては検出可能なレベルではない。PCRTM産物の同一性の確認が、ヌクレオチド配列決定により得られた。

FcRn 鎖の遍在的な発現は、それがこれらの組織内で内皮細胞において産生され得ることを示唆した。従って、RT-PCRTM分析を、2つのマウス内皮細胞株B10、D2.PCEおよびSVEC (O'ConnellおよびEdidin, 1990) を用い、FcRn 鎖 (Ahouseら, 1993) に特異的なプライマーを用いて行なった。両方の株について、FcRn 鎖mRNAの発現が観察された。他の研究者の研究 (Ahouseら, 1993; Kandilら, 1995) と一致して、SVEC細胞由来のFcRn 鎖の完全なコード配列の遺伝子の単離および配列決定は、これがC3H/HeJマウス (Kandilら, 1995) 由来の配列と同じ配列を有することを実証した。この配列は、元々記載されたマウス (FVB/N株) FcRn遺伝子 (Ahouseら, 1993) とは、コドン26、52、212、230、244、および299で異なる。変化は、コドン52でのGからAへの変化 (パリンからメチオニン) を除いてサイレントである。B10、D2.PCE細胞由来のFcRn 鎖遺伝子の配列は、FVB/N株 (Ahouseら, 1993) の配列とは、コドン52、212、230、および244で異なり、そしてこれらの位置でSVEC細胞の配列と同じ配列を共有する。従って、B10、D2.PCE遺伝子は、以前に記載されていないFcRn 鎖の多型変異体を示す。

肝臓は、IgG異化に関与することが示唆されており (FukmotoおよびBrandon, 1979; MarianiおよびStrober, 1990)、従ってこの器官におけるFcRnの発現をさらに分析した。肝細胞を成体マウスから単離し、そしてRT-PCRTMにより分析し、そしてこれは予想されたサイズのPCRTM産物を生じた。単離された肝細胞は完全には均一ではなかった (他の細胞 (例えば、Kupffer細胞) で5%未満の夾雑物) ので、RNAをマウス肝細胞ガン株Hepa 1-6から抽出し、そしてRT-PCRTM分析において用いた。これは、予想されたサイズの産物の単離をもたらした。内皮細胞株 (SVEC、B10、D2.PCE) およびHepa 1-6細胞株におけるFcRnの発現のレベルを定量的PCRTMを用いて研究し、そしてSVEC、B10、D2.PCE細胞およびHepa 1-6細胞におけるFcRn 鎖発現レベルは新生児刷子縁における発現よりも約1000倍低い。

結合研究

研究を、野生型 (WT) およびHQ-310/HN-433変異体Fc-ヒンジフラグメントの内皮細胞への結合を分析するために行った。HQ-310/HN-433変異体を、それが、His310、Gln311、His433、Asn434 ~ Ala310、Asn311、Ala433、Gln434の変異に起因して、単離された新生児刷子縁 (Kimら, 1994a) に対してはバックグランドレベルで結合し、そして組換え可溶性FcRn (Popovら, 1996) に対しては検出不可能なレベルで結合するものとして用いた。内皮細胞株SVECでの結合研究は、2つの独立した研究において、WT Fc-ヒンジがHQ-310/HN-433変異体よりもずっと高いレベルで結合することを示す (図3Aおよび図3B)。さらに、WT Fc-ヒンジフラグメントについてよりも高い比率の結合HQ-310/HN-433は、CHAPSを用いて抽出されるが、これは第1の研究についてさらに顕著であった (図3Aおよび図3B)。

2m-/-マウスにおける薬物動態学的分析

上記のデータは、遍在的に発現されるFcRnが血清IgGレベルを調節し得るという概念を支持する。2m-/-マウスは、クラスI MHC分子およびFcRnの発現が欠損していることが知られており (Zijlstraら, 1990; Kollerら, 1990)、従ってこの仮説を試験するために有益な道具を提供する。BALB/cマウスを用いる以前の研究では、HQ-310/HN-433変異体は、WT Fc-ヒンジフラグメントよりも有意に短い 相半減期を有することが見出された (Kimら, 1994a)。従って、mIgG1に加えてこれらの2つの組換えFc-ヒンジフラグメントは放射標識され、そしてそれらの薬物動態学を 2m-/-および 2m+/+マウス (C57BL16 × 129/OlaおよびC57BL/6バックグランド) において比較した (図4Aおよび図4B; 表III)。

2m-/-マウス株における3つのタンパク質の全ての 相半減期は、有意には異ならず、そして非常に短い (図4Aおよび図4B; 表III)。対照的に、mIgG1およびWT Fc-ヒンジの相半減期は、HQ-310/HN-433変異体の半減期よりも 2m+/+マウスにおいて実質的に長く、BALB/cマウスにおける以前の観察 (Kimら, 1994a) と一致する。予想外に、mIgG1およびWT Fc-ヒンジの半減期は、2m+/+ (C57BL/6) マウスにおいてよりも 2m+/+ (C57BL/6 × 129/Ola) マウスにおいて有意に長く、そしてさらなる分析は、これがこれらのマウスにお

10

20

30

40

50

ける血清IgGの異常に低いレベルの原因であることを示した。

2m-/-マウスがIgレベルの維持におけるいくつかの一般化された欠損を有さないことを確実にするために、マウスIgAの薬物動態学をまた、2m-/-マウスおよび2m+/+マウスの両方において決定した(図4Aおよび図4B;表III)。クリアランス速度に有意差はなく、そしてIgA 相半減期は、他の2m+/+マウス株で観察された半減期の典型である(表IIならびにWaldmannおよびStrober, 1969;VieiraおよびRajewsky, 1988)。

血清Igレベルの分析

両方のバックグランドの2m-/-マウスにおける血清IgGレベルの決定は、これらが異常に低い(表IV)ことを示した。このことは、他の研究者の観察(Spriggsら, 1992;Israelら, 1995)と一致する。さらに、C57BL/6×129/Olaバックグランドの2m+/+マウスについては、血清IgGレベルはC57BL/6 2m+/+マウスのレベルよりも低い。IgAおよびIgMの濃度はまた、2m+/+マウスおよび2m-/-マウスの両方について分析されており、そしてそれらのレベルは正常範囲内である(Goding, 1983)。薬物動態学および血清IgG1濃度に基づいて、IgG1の合成速度もまた決定され得(表V)、そしてこれらのデータを以下でより十分に議論する。

表 III

$\beta 2m^{-/-}$ および $\beta 2m^{+/+}$ マウスにおけるIgおよびFcヒンジフラグメントの β 相半減期

マウスの系統	β 相半減期(時間)			
	mlgG1	IgA	WT Fc ^a	HQ-310/HN-433
$\beta 2m^{-/-}$ (C57BL/6)	17.6 \pm 0.7 (5) ^b	24.0 \pm 0.8 (3)	12.6 \pm 0.7 (4)	14.8 \pm 0.6 (3)
$\beta 2m^{-/-}$ (混合) ^c	21.2 \pm 0.9 (3)	25.0 \pm 2.2 (4)	12.8 \pm 1.5 (5)	13.7 \pm 1.7 (6)
$\beta 2m^{+/+}$ (C57BL/6)	97.7 \pm 5.6 (3)	21.3 \pm 0.7 (3)	76.9 \pm 3.6 (4)	14.3 \pm 0.5 (4)
$\beta 2m^{+/+}$ (混合)	199.5 \pm 30.8 (3)	27.0 \pm 1.2 (3)	154.3 \pm 30.8 (4)	15.2 \pm 1.1 (3)

^a 野生型 Fcヒンジフラグメント

^b 括弧内で使用されたマウスの数

^c C57BL/6 \times 129/Ola1バックグラウンド

10

20

30

40

表 IV

$\beta 2m^{-/-}$ および $\beta 2m^{+/-}$ マウスにおける血清IgG, IgG1, IgAおよびIgM濃度

マウスの系統	濃度 (mg/ml)			
	IgG	IgG1	IgA	IgM
$\beta 2m^{-/-}$ (C57BL/6)	0.30 ± 0.05 (9) ^a	0.05 ± 0.01 (9)	0.58 ± 0.16 (9)	0.12 ± 0.02 (9)
$\beta 2m^{-/-}$ (混合) ^b	1.22 ± 0.35 (19)	0.07 ± 0.03 (19)	1.46 ± 0.68 (19)	0.35 ± 0.10 (19)
$\beta 2m^{+/-}$ (C57BL/6)	7.80 ± 1.22 (14)	1.39 ± 0.33 (14)	2.27 ± 0.48 (14)	0.24 ± 0.11 (14)
$\beta 2m^{+/-}$ (混合)	1.52 ± 0.29 (13)	0.25 ± 0.10 (13)	ND	ND

^a 括弧内で使用されたマウスの数

^b C57BL/6 \times 129/Ola H²バックグラウンド

10

20

30

40

表V

 $\beta 2m^{-/-}$ および $\beta 2m^{+/+}$ マウスにおけるIgG1の合成速度

マウスの系統	合成速度 (mg/日/マウス)
$\beta 2m^{-/-}$ (C57BL/6)	0.189
$\beta 2m^{-/-}$ (混合) ^a	0.220
$\beta 2m^{+/+}$ (C57BL/6)	0.946
$\beta 2m^{+/+}$ (混合)	0.083

10

^aC57BL/6 × 129/Ola ハイブリッド

実施例 4

以下の実施例は、FcRn-IgG相互作用部位に近位のアミノ酸残基のランダム変異誘発によって生じたIgGフラグメントの増大した半減期および血清持続性を示す。結果は、マウスの血清IgGのホメオスタシスにおけるFcRnの関与への支持を提供し、そしてまた免疫グロブリンフラグメントの半減期を増大するための方法実証する。相同なFcRnがヒトにおいてIgGレベルを調節するという示唆は、このアプローチが治療抗体の血清持続性増大のための意味を有することを示唆する。

20

Fc-ヒンジ変異体のライブラリーの構築

野生型 (WT) Fcヒンジ遺伝子 (Kimら、1994a) を、以下のオリゴヌクレオチドを用いるオーバーラップ伸長 (Hortonら、1989) によるスプライシングにおけるテンプレートとして使用した: HingebakNco (Kimら、1994a)、5' ATC ACC ATG GCC GTG CCC AGG GAT TGT GG T TG 3'、配列番号3 (NcoI部位を下線で示す); 252for、5' CAA CAC ACG TGA CCT TAG CSN NCA GSN NAA TSN NGA GC 3'、配列番号10、(N=T、C、G、またはAおよびS=A、GまたはC; Sを終止コドンの産生を最小限にするためにゆらぎ部位で相補体に挿入した); 252bak 5' GTC ACG TGT GTT G3'、配列番号11; Xmafor、5' GCT CCT CCC GGG GTT GCG T 3'、配列番号12 (XmaI部位を下線で示す)。PCRTM産物をXmaIおよびNcoIで消化し、そしてpHE N1 (Hoogenboomら、1991) における対応するWT Fc-ヒンジ遺伝子のセグメント (pelBリー

30

ライブラリーのパンニング

ライブラリーストックを記載 (Marksら、1991) されたように使用してファージを生成した。ファージ (2×10^{12} p.f.u./mlの100 μ l) を以下のように溶液パンニングアプローチを用いてパンニングした: ファージを2%粉ミルク、20mM MES (MM緩衝液) pH6.0に再懸濁し、そして振動しながら室温で350ng組換え可溶性FcRn (Popovら、1996) と1時間混合した。次いで、MM緩衝液 (pH6.0) 中のNi²⁺-NTA-アガロース (Qiagen) の50%懸濁液を30マイクロリットル添加し、10分間インキュベートし、そして遠心分離によりペレット化した。ビーズを0.5ml MM緩衝液 (pH6.0) で20回洗浄し、そしてファージを100 μ lリン酸緩衝化生理食塩水 (pH7.4) 中で20分間室温でインキュベートすることにより溶出した。ファージを使用して、指数関数的に増殖するE. coli TG1を記載 (Marksら、1991; Ward, 1994) のように再感染させた。パンニングを2回行った。

40

選択したクローンからの浸透圧ショック画分の産生

パンニングから生じたプレートからのコロニーを1ml培養物として増殖させ、そして記載 (Kimら、1994a) のようにFcヒンジ発現のために誘導した。浸透圧ショック画分を細胞ペレットの15 μ lクロロホルムへの再懸濁によって作製し (Amesら、1984)、そして50mM MES (pH6.0)、0.01% Tween, 150mM NaClへの10倍希釈した。細胞細片を遠心分離によりペレット化し、そして上清を表面プラスモン共振 (SPR) 研究に使用した。浸透圧ショック画

50

分中の各Fcヒンジフラグメントの量を測定するために、以前に記載 (Wardら、1989) されたようにこれらの画分を抗c-myc抗体を用いる検出を使用するイムノプロットングにより、分析した。

可溶性Fcヒンジフラグメントの発現および精製

変異されたFcヒンジフラグメントをコードする遺伝子を、ポリヒスチジンタグをコードするコドンのすぐ5'に挿入されたインフレームNotI部位を有する改変された形態のV_{pe1Bh}is (Ward, 1992) に、NcoI-NotIフラグメントとして再クローン化した。組換えクローンを増殖させ、発現のために誘導し、そしてFcヒンジフラグメントを以前に記載 (Kimら、1994a) されたように精製した。SPR研究において使用する前に、Superdex-75 (Pharmacia, Piscataway, NJ) カラム上での調製物が分析的分析の55kDaに対応する移動で1つより10
10
20
30
40
50
多いのピークを示す場合、同じカラム上でのサイズ排除によりFcヒンジフラグメントをさらに精製した。

薬物動態学的分析

タンパク質をIodo-Gen (Amersham, Arlington Heights, IL) を用いてNa¹²⁵Iで放射標識し、そして薬物動態学的分析をSWISS (Taconic) およびBALB/c (Harlan) マウスにおいて以前に記載 (Kimら、1994a) されたように行った。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定

これらの研究は、BIAcore2000 (BIAcore Inc.) およびFc-FcRn相互作用を分析するために以前に記載された方法論 (Popovら、1996) に類似のものを用いて行った。浸透圧ショック画分におけるFcヒンジフラグメントの結合活性を、BIAcoreセンサーチップ (研究等級CM5チップ) に結合したFcRnを使用して半定量的に分析し、そしてWT Fcヒンジよりも明らかに高い親和性 (特に、pH6.0でより低い解離速度 (off-rate) を有するもの) を有するフラグメントを産生するクローンを、さらに精製タンパク質として試験した。100~300nMの範囲の濃度での精製Fcヒンジフラグメントの固定化FcRnへの結合を、40 μl/分の流速を用いて分析した。Fcヒンジフラグメントをまた、コートしていないCM5チップ上に流し、そしてBIA評価2.1ソフトウェアを用いて、これらの分析からのセンサーグラム (sensorgram) をFcRn結合チップで得られたものから差し引いた。結合および解離速度 (on-and off-rate) 計算のために、同じソフトウェアを用いてデータをそれぞれ式 $R=R_{eq} (1-e^{-(k_s C_n + k_d)(t-t_0)})$ および $R=R_0 e^{-k_d(t-t_0)}$ に適合させた。より複雑な解離モデル (例えば、2つの平衡解離反応) へのデータの適合は、いくつかの変異体について k_{d1} の負の値を生じ、そして従ってこのモデルは適切ではなかった。再結合による k_{ds} の影響を最小限にするために、解離プロットの初期の部分 (最初の10~15秒) を分析に使用した。WT Fcヒンジについては、この分析は、以前計算された速度 (Popovら、1996) より高い解離速度を生じ、そしてこれはこの実施例において観察された、以前記載された親和性よりも約4倍低い親和性の主な原因である。各Fcヒンジフラグメントについて、 k_a および k_d の値を3~4センサーグラムから抽出し、そして平均値を計算した。各センサーグラムについての K_D s (k_d/k_a) もまた計算し、そして平均値を決定した。

変異誘発および選択

I253に密に近接し、溶液に曝されそしてIgGにおいて高度に保存されていない (Kabatら、1991) 3残基 (T252、T254、およびT256) をランダムなPCRTM指向変異誘発のために選んだ。組換えFcヒンジフラグメントを、ベクターpHEN1 (Hoogenboomら、1991) を用いてファージディスプレイライブラリー (約20,000クローン) として発現させた。アンバーコードンの読み取りの漏出性は、Fcヒンジ：遺伝子IIIコートタンパク質の混合物を生じ、そして可溶性Fcヒンジフラグメントは、ファージディスプレイされ、遺伝子IIIコートタンパク質に結合したFcヒンジホモダイマーとして発現され、そして構築される。ファージ調製物と組換え可溶性FcRn (ポリヒスチジンタグ化) を溶液中でインキュベートし、続いてNi²⁺-NTA-アガロースビーズを用いるファージ-FcRn複合体の捕捉によって2回のパンニングを行った。結合したファージをpH7.4で溶出し、野生型 (WT) Fcヒンジの特徴である結合のpH依存性を保持するFcヒンジフラグメントを選択した。

パンニングから生じた10個のクローン由来の組換えFcヒンジフラグメントを、E. coli形

質転換体の浸透圧ショック画分における可溶性フラグメントとしてさらに分析した。表面プラスモン共鳴 (SPR) を用いて、固定化FcRnへの結合について、WT Fcヒンジフラグメントの親和性よりも類似またはより高い親和性を有する5つが観察された。これらのFcヒンジフラグメントをコードする遺伝子をインフレームC末端ポリヒスチジンタグを有するベクター中に再クローン化し、 Ni^{2+} -NTA-アガロース上での可溶性タンパク質の精製を可能にした。精製の後、WT Fcヒンジに類似のHPLCおよびSDS-PAGEプロファイル (約55kDa、スルフィドリル結合および非共有結合ホモダイマーの混合物を含む) を有する3つのFcヒンジフラグメントが見出され、そしてこれらのタンパク質を続いて分析した。

コドン位置251~257での3つの変異のアミノ酸配列を表VIに示す。変異体を、位置252、254、および256でのアミノ酸に従って名付けた (表VI)。対応する遺伝子の残りの配列は、変異体ASAがコドン272でグアノシン (G) からアデノシン (A) への変化 (これは、グルタミン酸からリジンへの変化を生じた) を除いて、WT Fcヒンジフラグメントの配列と同じであった。このアミノ酸は、IgGのヒンジ領域の近隣に位置し (Deisenhofer, 1981)、従ってFc-FcRn相互作用には影響しないらしい。

表VI

Fcヒンジ変異体の変異および隣接領域のアミノ酸配列

名前	配列 (251~257)
ASA	LAISLAP*
VSH	LVISLHP
LSF	LLISLFP

*変異誘発から生じた残基を太字で示す。

Fcヒンジフラグメントの薬物動態学

Fcヒンジフラグメントを放射ヨウ素標識し、そしてSWISSマウスにおけるその薬物動態学を分析した (表VII: 図5)。3つの変異体において、変異体LSFはWT Fcヒンジフラグメントまたは変異体ASAもしくはVSHのいずれかよりも有意に長い 相半減期を有した。後者の3つのフラグメントの半減期はそれぞれ有意には異ならなかった。BALB/cマウスにおいてもまた薬物動態学研究を行い、そして再び変異体LSFはWT Fcヒンジフラグメントまたは変異体ASAもしくはVSHのいずれかよりも有意に長い 相半減期を有した (表VII)。BALB/cマウスにおいて、SWISSマウスにおけると同様に、後者3つのフラグメントの半減期は有意に異ならなかった。

10

20

30

表VII

WTおよび変異体Fcヒンジフラグメントの薬物動態学

Fc- ヒンジ フラグメント	SWISS マウス		BALB/c マウス	
	マウスの数	β 相半減期 (h)*	マウスの数	β 相半減期 (h)*
WT	9	123.5 \pm 13.3	4	92.8 \pm 12.9
ASA	4	116.0 \pm 19.9	9	104.6 \pm 10.4
VSH	4	98.2 \pm 6.5	9	107.1 \pm 10.8
LSF	9	152.3 \pm 16.0	5	152.8 \pm 12.0

*スチューデント t 検定によりWTの値はASAおよびVSH変異体の値とは有意に異ならないが、一方LSF変異体の値は有意に異なった（SWISSおよびBALB/cマウスそれぞれについて $p < 0.003$ および $P < 0.001$ ）。

表面プラスモン共鳴（SPR）分析

3つの変異体の各々の組換え固定化マウスFcRnとの相互作用動態学をSPRを用いて分析した（表VIII）。全ての変異体は、WT Fcヒンジフラグメントの結合速度と類似の結合速度（ k_{on} s）を有した。WT（7.44nM）と比較して変異体ASA（4.13nM）およびLSF（2.16nM）の親和性（ K_D ）差異は、主に有意な解離速度の差異によった（ASAおよびLSFは、それぞれ約2倍および約4倍低い k_{off} sを有する）（表VIII；図6Aおよび図6B）。これら2つの変異体の相対親和性もまた、阻害結合研究を用いて分析した。ここで、Sephacroseに結合したマウスIgG1への、放射標識した可溶性FcRnの結合を、各Fcヒンジフラグメントが阻害する能力を定量した。SPR分析と一致して、結合の50%阻害に必要なFcヒンジフラグメントの量はWT > ASA > LSFの順に減少した。

表VIII

FcRnへのFcヒンジフラグメントの結合の速度論のSPR分析

Fc- ヒンジ	$k_{\text{on}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})/10^5$		$k_{\text{off}}(\text{s}^{-1})/10^{-3}$		$K_D(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})(\text{nM})$	
野生型	6.20	\pm 0.19	4.61	\pm 0.10	7.44	\pm 0.19
ASA	5.01	\pm 0.17	2.07	\pm 0.03	4.13	\pm 0.10
VSH	5.38	\pm 0.14	4.48	\pm 0.40	8.33	\pm 0.68
LSF	4.72	\pm 0.20	1.02	\pm 0.20	2.16	\pm 0.36

重要なことに、このFcレセプターの正確な機能に必要と考えられるFc-FcRn相互作用の特徴的なpH依存性に、変異はほとんど影響を有さなかった。WT、ASA、およびVSH FcヒンジフラグメントのpH7.4での解離速度は、SPRによっては測定不可能に速かった。しかし、変異体LSFはWT、ASA、またはVSHフラグメントよりpH7.4で低い解離速度を有した（図6Aおよび図6B）が、それでも約 0.027s^{-1} の解離速度はpH6.0（表VIII）におけるよりなお約25倍速い。pH依存結合の存続性は、変異残基に隣接するループに位置するH310、H435、お

よびH436の、この特性の媒介における示唆された関与に一致した (Raghavanら、1995 ; Me desanら、1997)。

SPRデータは、WTに比較して変異体LSFのより長い半減期が、FcRnとの相互作用に対して約3.5倍高い親和性により説明されることを示した (これは、主に解離速度の減少による)。これらのデータは、FcRnが飽和可能であり (Brambell, 1964)、そしてより高い親和性のFcフラグメントは、分解されるよりもサルベージされそしてリサイクルされるので、内因性IgGに競合的利点を有するというコンセプトに一致する。しかし、ASA変異体はWTよりも1.8倍高いFcRnへの親和性を有し、そして有意に長いインビボ半減期を示さなかった。これは、観察されるべき血清持続性への有意な影響のためには、FcRn結合への親和性の実質的な増大が必要とされたことを示唆した。あるいは、ASA変異体における変異は、血清プロテアーゼによる攻撃に対して、または変性に対して増大した感受性により、血清において比較的低い安定性を有するFcヒンジフラグメントに生じたのであろう。

3つの変異体の配列の分析は、多くの異なる残基がFcRn結合 (変異体VSH) の傷害にならない位置252、254および256において耐性であり得ることを示した。そして、変異体ASAおよびLSFについては、親和性までもが改良されていた。この点で、データは、位置252および256について、ASA変異体内のアラニンにおけるT252およびT256の置換が親和性増加を生じたように、WT残基がFcRnで好ましい接触をなし得ないことを示した。これは、この位置でのアラニンで置換が、親和性の実質的減失 (3000倍) を生じた (Popovら、1996) ような、高親和性Fc-FcRn相互作用を媒介する際のI253の明白に決定的な役割とは対照をなした。他の残基が、FcRn結合能力に変化を与えずにI253を置換し得ることは想像されるが、I253は全ての哺乳動物IgG全体に保存されている (Kabatら、1991)。

位置252において疎水性側鎖を伴うアミノ酸についての選択が存在するようである。そして、WT Fcヒンジの活性に類似したFcRn結合活性におけるさらなる変異体の配列決定は、この位置におけるPheを明らかにした。興味深いことには、また、マウス、ラットおよびヒトの大多数の自然発生IgGに存在する位置254 (Kabatら、1991) で、全ての3つの変異体は、セリンを有した。この位置でのセリンで変異体の明らかな選択は、FcRn結合活性の保持のために、セリンが好ましい残基であることを示唆する。しかし、WT Fcヒンジ (IgG1) はこの位置でスレオニンを有する。そして、それでもなお高親和性Fc-FcRn相互作用を示し、それゆえに、他の残基がこの位置に存在し得ること、および活性を結合しているFcRnが保持され得ることが、想像される。

変異体の配列の分析は、活性を結合しているFcRnがアミノ酸 (Ala、HisおよびPhe) の多様なセットで、位置256で保持されることを示した。これは、この領域がFc-FcRn相互作用の近傍にあり得ないことを示唆する。しかし、この位置での残基は、齧歯動物およびヒトIgGにおいて、高度に保存される (分析されたIgG中の約94%のセリンまたはスレオニン、Kabatら、1991)。これは、このアミノ酸がまだ未確認の機能を有し得ることを示す。ASAおよびVSH変異体において、それぞれLSF変異体のF256の疎水性側鎖が、より疎水性でないアラニン残基またはヒスチジン残基によりなされ得ないFcRnとの好ましい相互作用を行う可能性もある。これらの二つの変異体が、目に見える分ではこの位置だけでお互いと異なっているので、このような相互作用はVSHに比較してLSF変異体の増大した親和性を説明する。

変異体LSFは、WT Fcヒンジまたは変異体ASAおよびVSHより低いFcRnからのオフレートはpH 7.4において有したが、このオフレートは、pH6.0において、それより顕著に迅速であった。このより低いオフレートは、細胞表面上のFcRnの半減期 (pH7.4) が十分に長く、この変異体の有意な量を血清に遊離させ得ることを意味する。この点で、pH7.4でのFcRn-LSF変異体複合体の半減期は、約26秒である。

これらのデータは、FcRnについてのFcヒンジフラグメントの親和性と位相半減期との間の相関を拡張し、そしてさらにFcRnが、直接的にIgG恒常性に関係しているという提案 (Ghetieら、1996 ; JunghansおよびAnderson、1996 ; Israelら、1996) を支持する。さらなる親和性の改良は、mIgG1分子 (例えば、CH2ドメイン内のH310を含有している表面ループ構造内の分子) の他の領域を標的とすることによりなされ得ることが、想像される。脱グ

10

20

30

40

50

リコシル化Fcヒンジフラグメントが完全グリコシル化IgG1と同じ半減期を有するという観察 (Kimら、1994a) は、これらのデータがインタクトなIgGの血清存続性を延長することに直接の関連を有することを示す。さらに、変異を受けた部位が、Fc RI、Fc RII、Fc RIII (Duncanら、1988 ; Sarmayら、1992) と補体C1q (DuncanおよびWinter、1988) との相互作用部位から離れている。これは、より長い血清存続性を生じる変異が、ADCCまたは補体結合のいずれにも影響を及ぼさないことを示唆する。最後に、マウスFcRnのヒト相同染色体の同定 (Storyら、1994) は、これらの研究が疾患治療 (例えばガンおよび自己免疫) のための治療抗体の薬物動態学の最適化に関連性があることを示唆する。

実施例 5

本実施例において、pH6で高い親和性およびpH7.4で低親和性を有するFcRnに結合するペプチドを単離する。単離に続いて、結合ペプチドを分析して、それらが、FcRnへの結合についてFcと競合するかどうか、すなわち、それらが同じまたは重複する部位に結合するかどうかを決定する。ペプチド (開示された方法に従って調製される) は、他の治療のタンパク質または薬物に連結され得、そしてこのことにより効果的にタンパク質の半減期を増大し得、そして薬物をタグ化し得る。小さいペプチドは、全長タンパク質と比較して大量に製作するのが比較的より簡便である。しかし、現在まで、ペプチドは、それらの短い半減期のために治療の使用が限定されている。

ペプチドライブラリーの生成

ファージディスプレイベクターpHEN1 (Hoogenboomら、1991) を、使用する。ランダムなペプチドライブラリーを、終止コドンの生成を最小限にするために、センス鎖において揺らぎ位置がTまたはGのいずれかであることを除いて、ランダムに挿入した塩基で各位置でセンス鎖オリゴヌクレオチドを合成することによって、生成する。まず最初に、オリゴヌクレオチドは10および15アミノ酸をコードするために設計するが、この長さは変化し得る。オリゴヌクレオチドを、NcoIおよびNotI制限部位をコードする突出部を有して作製する。オリゴヌクレオチド二重鎖を、PCRTMおよび合成オリゴヌクレオチドの5'および3'末端にアニールするプライマーを使用して生成する。PCRTM産物をNcoI-NotIで制限したpHEN1に連結し、連結混合物を、コンピテントE. coli細胞に以前に記載 (Ward、1995、Popovら、1996a) のように形質転換する。20~30個の別々のクローンの挿入物を配列決定し (Sambrookら、1989)、ライブラリーの多様性を分析する。

ライブラリーのパンニングおよび結合剤の選択

クローンのライブラリーを増殖させ、以前に記載されたように濃縮したファージ粒子を形成した (Ward、1995 ; Popovら、1996a) 。ファージを、パンニングにおいて、高い親和性 (低いオフレート) ペプチドを単離するために設計した以下の手順で使用する。ファージを、全てのインキュベーションをpH6で実行することを除いては、Hawkinsら (1992) が記載した方法に類似の方法で、限界濃度 (10nM) 可溶性ビオチン化FcRnとインキュベートする。1時間のインキュベーションに続いて、混合液のアリコートをし、過剰な非標識FcRn (20 μM) で希釈し、そしてストレプトアビジンコート常磁性ビーズの添加の前に、ビオチン化FcRnI-ファージ複合体を捕捉するために、様々な時間でインキュベートした。あるいは、実施例 4 に記載するパンニング手順を、使用する。次いで、ファージをpH7.4の緩衝液で溶出し、そして第2のラウンドのパンニングのための拡大の前に、E. coliを再感染するために使用する。

パンニングの2~3ラウンドに続いて、感染により溶出したファージで生成するE. coliクローンを増殖させ、そして96ウェルマイクロタイタープレートの上をコートするFcRnへの結合について、押し出したファージを酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) で分析した。結合活性を有するファージをウェルに添加する前に可溶性FcまたはIgGをファージに加える競合結合アッセイにおいて、さらに分析する。それらのFcRnへの結合が可溶性Fc/IgGにより阻害されるファージを産生しているクローンを、さらに特徴づける。

FcRnに結合するペプチドをコードする遺伝子を配列決定し、そして対応するペプチドを合成する。ペプチド-FcRn相互作用の親和性を、SPRおよびBIAcore (Pharmacia) を使用して決定する。

10

20

30

40

50

ペプチドを、ビオチン化形態において合成して、BIAcoreチップにストレプトアビジン（ストレプトアビジン-コートチップは、多数の供与源から市販される）を介する直接の結合を可能にさせるために合成する。pH6およびpH7.4でのオンおよびオフ速度は、先述の方法を使用して決定する

(Popovら、1996a ; Jönssonら、1991)。

pH6において最も高い親和性を示すペプチドおよび / または最も著しいpH依存性を示すペプチドを、さらに分析する。

ペプチドのFcRn媒介性転移

ポリIgAレセプターを発現しているMadin-Darbyイヌ腎臓（MDCK）細胞単層について記載された方法論（MostovおよびDietcher 1986）に類似の方法論を使用して、FcRnの機能活性 10
についてのインビトロアッセイを開発する。このアッセイは、細胞単層の一方の側からもう一方までの結合リガンドのトラフィッキングを媒介する際のFcRnの機能活性の決定を可能にする。代替アッセイが、新生児マウスにおいて以前にFcフラグメントについて記載（Kimら、1994b）されたように（放射標識した）ペプチドの転移を分析する。

インビトロおよびインビボアッセイのために、ペプチドはN末端チロシンを有するように合成し、そしてIodo-Gen試薬（Amersham）を使用して放射標識する。ペプチドが一つ以上のチロシンを内部位置で含有する場合、これは明らかに有用なアプローチではない。このような場合、ペプチドを合成の間N末端グリシンで延長させ、Rinkリンカー（Rink、1987）を介して樹脂に連結させて、そして次いで放射標識したスクシンイミジルヒドロキシフェニルプロピオネートにN末端で直接結合させる。多様な濃度のペプチド（1 µg/ml ~ 1 20
mg/ml）を、トランスウェルの適切な側面に添加し、そして単層をまたぐペプチドの転移をガンマ計数によって定量化する。

Fcヒンジが1分子あたり2つのFcRn相互作用部位を有するように、「反複」ペプチド（すなわち所望の薬物動態の特徴を達成するために、1分子につき2つの相互作用部位を有するペプチド）を調製し得る（タンパク質1分子あたり2つの相互作用部位を有することによって成し遂げられる、改良された薬物動態学を実証する例示的なデータについて実施例 6 および表 X において言及する）。

実施例 6

マウスIgG1 Fc領域の部位特異的変異誘発

組換えFcヒンジフラグメントを、異化コントロール（Kimら、1994a）に関係しているマウスIgG分子の部位を決定するために使用した。以前の研究で、IgG複合体化Staphylococcusのプロテイン A（SpA）が複合体化されていないIgG分子より迅速に排出されることを示した（Dimaら、1983）。SpAは、CH2-CH3ドメイン界面に位置する残基に結合し（Deisenhofer、1981）、そしてこれはこの領域に位置するアミノ酸残基がまた、IgG分子の異化の制御時に関与することを示唆した。従って、Fc変異体を、組換え体E. coli細胞において発現し、そしてNi²⁺NTAアガロースを使用して精製した。 30

野生型（WT）および変異体Fcヒンジフラグメントを、培養物1リットルあたり0.5ミリグラムの収率において、各々精製する。HPLCならびに還元および非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析により、WTおよび変異体Fcヒンジフラグメントは、正しく折り畳まれたFcヒンジフラグメントについて予測されるようにジスルフィド連結ホモダイマーとして発現され、そして精製されることが示された。 40

WTおよび変異体Fcヒンジフラグメントの薬物動態学

WTおよび変異体FcヒンジフラグメントをIodo-Gen試薬（Frakerら、1978）を使用して放射標識し、そしてマウスの薬物動態学の研究において使用した（Kimら、1994a）。全てのタンパク質について、cpmの90%より大きい部分が、10%TCAによって、沈澱性であった。さらに、注射後24時間の血漿試料のHPLC（SEC-250カラム、Bio-Rad）を使用した分析は、他の血清蛋白（Kimら、1994a）と結合しないインタクトな分子（大きさ55kDa）として、WTおよび変異体Fcヒンジフラグメントが血清に残留することを示した。薬物動態学的パラメーターを、表IXに示す。

表IX

WTおよび変異体Fcフラグメントの薬物動態学パラメーター

Fc- ヒンジ フラグメント	α 相 $t_{1/2}$ (時間)	β 相 $t_{1/2}$ (時間)	MRT ¹ (時間)	AUC ² 1 総: (ng/時間/ml)	PC ³ (ng/時間)
IgG1	20.1±0.4	85.3±0.1	117.1±6.0	5651±75	1.85±0.02
野生型	10.5±0.8	82.9±10.0	104.4±12.8	1949±257	5.4±0.8
I-253	6.7±0.2	20.0±0.6	16.3±0.8	548±27	22.5±1.2
HQ-310	6.0±0.6	17.5±1.6	12.1±1.0	528±127	20.4±4.7
HN-433	10.3±1.2	50.3±2.9	60.0±5.1	1469±232	6.9±0.9
HQ-310/HN-433	5.8±0.2	15.6±0.8	10.4±0.6	529±70	20.0±4.3
H-285	8.7±1.1	761±4.6	102.1±21.0	1572±310	6.5±1.5

¹MRT, 平均滞留時間²AUC, 曲線下面積³PC, 血漿クリアランス

CH2ドメインにおける変異 (HQ-310およびI-253) が、および 相半減期について、CH3ドメインにおける変異 (HN-433) よりも著しい効果を有することは、これらのデータ (表IX) から明白である。しかし、さらなる研究 (実施例10を参照のこと) からのデータは、His435およびHis436が血清持続性のために重要であること、そしてHis433およびAsn434の変異が個別に血清持続性に影響を及ぼさないことを示す。さらに、HQ-310/HN-433変異体は、最も短い および 相半減期を有する。変異体Fcフラグメントの折り畳まれた状態を分析するために、円二色性 (CD) 分析を190~260nmの範囲内で実行した (Kimら、1994a; Medesanら、1997)。得られたスペクトルは、変異が組換えFcフラグメントの折り畳みミスを生じないことを示す (Kimら、1994a; Medesanら、1997)。さらに、CDを使用した変性分析は、WTおよび全ての変異体Fcフラグメントが、使用した条件 (10mMリン酸ナトリウム、pH7.0) 下で、類似した変性温度 (65) を有することを示す。これらの研究のためのさらなるコントロールとして、IgG1 Fcの保存されたヒスチジン (残基285、EU計数法、Edelmanら、1969) をアラニンに転換し、そして変異体 (H-285という) を薬物動態学的に特徴づける (Kimら、1994c)。この変異体の 相半減期 (76+/-14.6時間) は、WT Fc (表IX) の半減期からは統計学的に識別不可能であり、このことは、CH2-CH3ドメイン界面 (Deisenhoferら、1976) から離れたヒスチジンの変異は、Fcフラグメントの異化速度に影響を及ぼさないことを示す。これは、さらにCH2-CH3ドメイン変異が薬物動態上の特定の効果を有し、そしてFc構造を一般的に不安定にさせる効果による、Fcのより迅速なクリアランスを生じないというアイデアを支持する。

Fc由来フラグメントの発現

CH2ヒンジフラグメント、CH2ドメインおよびCH3ドメインをコードする遺伝子を、設計したオリゴヌクレオチドプライマーおよびPCRTM (Saikiら、1988) を使用して単離し、そしてNcoI-BstEIIフラグメントとしてV_{pe}IBHis (Ward、1992) に連結した。CH2-ヒンジ、CH2ドメインおよびCH3フラグメントを発現し、そして記載 (Kimら、1994c) のようにNi²⁺-NTAアガロースを使用して精製し、そして発現タンパク質の収率は、培養物 1 リットルあたり、1~1.5 (CH2ヒンジ)、2 (CH2ドメイン) および1.5~2 (CH3ドメイン) ミリグラムであった。これらの研究用のコントロールとしての使用のために、抗リゾチームD 1.3 Fv (Wardら、1989) もまた発現し、そして組換えE. coli細胞から精製した。

還元および非還元SDSゲル電気泳動を使用した分析は、FcおよびCH3フラグメントがホモダイマーとして発現されることを示す。対照的に、CH2ヒンジフラグメントは、モノマーと-

S-S-結合ダイマーとの混合物として発現される。ダイマーを、HPLCを使用してモノマーから分離し、そして薬物動態の研究において使用した。CH2ドメインを発現し、そしてモノマー（おそらくIgG分子内のCH2-CH2ドメイン相互作用の相対的な弱さによる（Deisenhoferら、1976））として精製した。

発現フラグメントの薬物動態学

インビボのIgGフラグメントのクリアランス速度を決定するために、それらをIodo-Gen試薬（FrakerおよびSpeck、1978）を使用して¹²⁵Iで放射標識した。Kimら（1994a、1994c）が記載のように、マウスにおける および 相半減期を決定し、そして表Xに示す。CH2ヒンジダイマーおよびCH2ドメインモノマーの 相半減期における差は、フラグメントあたり2つの異化部位が血清存続性のために必要であることを示唆する。

10

表X

組換えFcおよびFc由来フラグメントの半減期

誘導体	マウスの数	半減期（時間）	
		α 相	β 相
IgG1	7	19.2±1.2	89.2±10.6
CH2ヒンジダイマー	10	6.3±1.2	61.6±10.7
CH2ヒンジモノマー	7	4.3±0.1	29.1±1.2
(還元および			
アルカリ化)			
CH2	4	2.9±0.1	25.5±2.3
CH3	9	3.4±0.1	21.3±2.3
Fv	4	3.4	24.1±3.5
WT Fcヒンジ	9	10.5±0.8	82.9±10.0
HQ-310/HN-433	7	5.8±0.2	15.6±0.8
変異体Fcヒンジ			
Fcハイブリッド	16	7.3±1.2	37.9±7.1

20

30

CH2ヒンジダイマーに対するCH2ドメインのより短い半減期が後者におけるヒンジ配列に起因したという可能性を除外するために、CH2ヒンジダイマーを、還元およびアルカリ化によってモノマーへと変換した（Kimら、1994c）。得られたモノマーを薬物動態学的に分析し、そしてCH2ドメインモノマーの 相半減期（25.5時間）に類似する短い 相半減期（29.1時間）を有することを見出した。これは、1つのCH2ヒンジフラグメントにつき2つの異化部位が、1つのCH2ヒンジにつき1つの部位よりも長い血清存続性を生じること示す。あるいは、モノマーとダイマーとのサイズの差異は、血清存続性における差異を説明し得る。この可能性を調査するために、1つの変異体（mutant）（HQ-310/HN-433）ポリペプチドに付随する1つのWT Fcフラグメントを含む、ハイブリッドFcを作製した。このハイブリッドを、変異体Fcをc-mycタグ（カナマイシン耐性を与えるプラスミド中）でタグ化し、そしてWT FcをHis₆ペプチド（アンピシリン耐性を与えるプラスミド中）でタグ化し、そして2つのポリペプチドを同一の細菌細胞において同時に発現させることにより、単離した（Kimら、1994c）。ヘテロダイマーを、Ni²⁺-NTA-アガロースカラムに続いて9E10-Sepharoseカラムを使用して精製した（後者はc-mycエピトープを認識する、Wardら、1989）。ハイブリッドタンパク質を、薬物動態学的研究において使用した（図7および表

40

50

X)。Fcハイブリッドについての37.9分の 相半減期は、WTホモダイマーの 相半減期よりも小さいが、しかし変異体ホモダイマーの 相半減期よりも大きい。これは、Fcにつき1つの異化部位が、FcフラグメントにWTホモダイマーの薬物動態学的特徴を与えるのに十分でないことを示す。Brambellの仮説 (Brambellら, 1964; Brambell, 1966) の枠組みの中では、データは、ハイブリッドが保護レセプターへの結合について減少したアビディティを有し、その結果がこのWT Fcホモダイマーのより迅速な消去であることを示唆する。しかし、Fcハイブリッドに対する変異体ホモダイマーのより迅速な消去は、後者がホモダイマーよりも保護レセプターに対する高い結合親和性を保持することを示唆し、そしてこのFcハイブリッドの組換えFcRnに対する結合が、最近になってSPRを使用して示されている (Popovら, 1996b)。

10

新生マウスにおけるFcフラグメントの腸管転移

表XIに示す変異の、新生マウスにおける組換えFcフラグメントの腸管転移に対する影響が、以下に記載する種々のアプローチを使用して分析されている。

表XI

腸管転移研究において使用されるFc誘導体

名称	変異
WT Fc	なし
I-253	Ile253→Ala253
HQ-310	His310→Ala310およびGln311→Asn311
HN-433	His433→Ala433およびAsn434→Gln434
HQ-310/HN-433	同一のFcヒンジ内でHQ-310およびHN-433
Fcハイブリッド	WT-FcヒンジおよびHQ-310/HN-433変異体のヘテロダイマーを含むハイブリッド

20

腸管内腔から血漿へのFcフラグメントの直接転移

30

完全なIgG1分子 (mIgG1)、WTおよび変異体 (HQ310/HN-433) Fcフラグメントを放射標識し、そして10~14日齢マウスにおけるインビボ転移アッセイにおいて分析した (Kimら, 1994b)。コントロールとして、パパイン消化によって産生されたFcフラグメントおよびFabフラグメントを使用した。ハイブリッドFcフラグメントもまた分析した。

図8に示す結果は、WT FcフラグメントがFcパパインおよびmIgG1と同様に転移することを示し、グリコシル化 (またはその欠失) が転移に影響を与えないことを示す。これはHobbsおよび共同研究者の過去のデータと矛盾しない (Hobbsら, 1992)。これらの結果は、変異体HQ-310/HN-433が転移において損なわれていることを示し、異化部位が腸管転移に関与する部位と重複すること、およびFcハイブリッドが転移において損なわれていることを示唆し、Fcにつき2つの機能性部位が必要であることを示す。これは、異化調節における2つの異化部位の必要性に関する発見に類似する (上記データおよびKimら, 1994c)。

40

競合転移アッセイ

これらのアッセイにおいて、未標識WTおよび変異体Fcフラグメントが放射標識マウスIgG1の転移を阻害する能力を分析した。HQ-310/HN-433変異体に加えて、表XIに記載の変異体もまた使用した。これらの研究の結果を表XIIに示す。データは、変異体が、FcRnへの結合について完全なIgG1分子との競合において欠陥を有することを明らかに示した。さらに、半減期に対する各変異の影響は、阻害能力に対する影響との優れた相関関係を示す (図

50

9)。

表XII

組換えFc誘導体による、放射標識マウスIgG1 (mIgG1) の腸管伝達の阻害

競合体	伝達の阻害 (%) *
IgG1	51.4
Fcパパイン	62.5
WT Fc	55.3
I-253	20.2
HQ-310	8.9
HN-433	44.4
HQ-310/HN-433	5.4
Fcハイブリッド	21.5
BSA#	8.9

*PBSの存在下での放射標識IgG1の伝達と比較して

#BSA、ウシ血清アルブミン

これらの結果をさらに確認しそして拡張するために、新生児刷子縁を単離し、そしてWT FcおよびHQ-310/HN-433変異体Fcとの結合研究において使用した。そこでは、mIgG1、WT Fc、およびHQ-310/HN-433変異体がmIgG1の単離された新生児刷子縁への結合を阻害する能力を評価した(図10)。

結論として、これらの研究は、マウスIgG1分子の新生児マウスにおける腸管転移の間のFcRnとの相互作用に関与する部位の同定という結果を得た。データは、異化部位とFcRn結合部位とが密接に関連することを示す。

WTおよび変異体Fcフラグメントの母胎転移

マウスIgG1 (mIgG1)、WT Fc、およびHQ-310/HN-433変異体の母胎転移を分析するために、以下の実施例9に記載の方法論を使用して研究を行った。データは、変異体がmIgG1およびWT Fcよりも有意に低いレベルで転移することを明らかに示す(表XIII)。

表XIII

mIgG1、WT Fc、およびHQ-310/HN-433変異体の母胎転移

	mIgG1	WT Fc	HQ-310/HN-433
注射された放射活性 (cpm)	2,005,435	1,890,540	1,958,436
3分後における母体血液 中の放射活性 (cpm)	1,085,000	770,350	836,150
4時間後における母体血 液中の放射活性 (cpm)	725,501	215,431	219,431
4時間後における胎児中 の放射活性 (cpm)	28,450	13,750	1,359
3分後におけるレベルと 比較しての伝達%	2.71	1.78	0.16
4時間後におけるレベル と比較しての伝達%	4.05	6.38	0.62

実施例 7

実施例 3 および 4 において上記のデータは、マウスFcRnとFcRc (異化調節に関与する推定上の「保護」レセプター) とが関連し、そして共通の配列を分かち合い得ることを示す。従って、マウス組織および細胞株からの推定上のFcRcをコードする遺伝子の単離を行った。これを本実施例において記載する。

マウスClass I分子に相同ではない (SimisterおよびMostov, 1989a) マウスFcRn (Ahouseら, 1993) の配列に基づくPCRTMプライマーを、以下のように設計した:

プライマーA: 5' CAG GAA GCT GAC CCC TGT GGG NN 3' (配列番号13)

このプライマーは、マウスFcRnのセンス鎖の塩基190~212をコードする。

プライマーB: TTC CGT CTC AGG CCA CTC CCC NN 3' (配列番号14)

このプライマーは、FcRnのセンス鎖の塩基452~474に相補的である。両プライマーについて、FcRcの配列がFcRnに正確に適合しない場合、2つの縮重塩基が各プライマーの3'末端において挿入されていることに留意のこと。

総RNAを、2つの内皮細胞株 [SVEC (C3H/HeJマウス (O'ConnellおよびEdidin, 1990) 由来)、およびMPCE (B10.DBA/2マウス肺由来)]; それぞれ、Prof. P. ThorpeおよびProf. A. Curtisから入手] から単離し、そしてcDNA合成をプライマーBでプライムした。次いで、cDNAをプライマーAおよびBを用いるPCRTMにおいて使用し、そして両方のcDNAについて、285bpのPCRTM産物を生成した。陰性コントロールにおいて産物は全く観察されず、これはこの結果が新生児マウス腸管によるPCRTM汚染に起因していないことを示す。PCRTM産物をTAクローニングシステム (Promega) を使用してクローン化し、そしてジデオキシヌクレオチド法 (Sangerら, 1977) を使用して配列決定した。複数の独立したクローンの配列決定は、285bpフラグメントの配列が、1つの塩基変化 (A → G) (これはコドン73においてバリンをメチオニンに変換する) を除いて、FcRnの配列と同一であることを示す。内皮細胞株からの285bpフラグメントの単離は、膜貫通領域および原形質内末端 (cytopla

smic tail) をコードする遺伝子を増幅するための、以下のようなPCRTMプライマーの設計を促した:

プライマーC: 5' TCT GGC TCC TCC GTG CT 3' (配列番号6)

(FcRnのセンス鎖の塩基640~656をコードする)

プライマーD: 5' TCA GGA AGT GGC TGG AAA GGC ATT 3' (配列番号15)

(FcRnのセンス鎖の塩基1075~1095に相補的である)

2つの内皮細胞株、マウス心臓、肝臓、肺、脾臓、卵黄嚢、新生児刷子縁、およびプライマーDとプライムするT/B細胞ハイブリドーマに由来するRNAから、相補的DNA(cDNA)を合成した。組織についてはBALB/cマウスを使用し、そして2B4細胞(T細胞、Chienら, 1984)およびY-3P(B細胞、Janewayら, 1984)ハイブリドーマを、それぞれ、B10.AおよびBALB/cByJ細胞から得た。PCRTMにおけるこれらのcDNAのプライマーCおよびDとの使用は、T細胞とB細胞とのハイブリドーマ以外の全ての細胞からの、予想されたサイズの産物の単離を生じた。全ての場合において、予想されたサイズのPCRTM産物を、アクチン特異的プライマーを使用して観察した。

上記の組織/細胞から得たPCRTM産物の量には、一貫して定量的な差異(これは同様にmRNAの異なるレベルを示唆する)が存在する。卵黄嚢および新生児腸管(刷子縁)が最大量を産生し、そして他の組織における量は以下の順で減少する: 肝臓>脾臓、肺>心臓。定量的PCRTMを実施して、異なる細胞型におけるmRNAレベルを評価する。肝臓、脾臓、新生児刷子縁、および肺からの定量的PCRTM産物は、領域640~870においてクローン化および配列決定されており、そしてFcRnと高い割合の相同性を共有することが見出されている。さらに、完全なFcRnホモログが、2つの内皮細胞株からプライマーDおよびEを使用して単離されており、そして複数の独立した単離物が配列決定されている: 全部で4つのヌクレオチド差異が存在し、その内の3つはサイレントであり、そして1つはコドン73におけるA→G変化(バリンをメチオニンに変換する)である。コドン233、251、および265におけるサイレント変異はまた、肝臓、脾臓、新生児刷子縁、および肺(BALB/cマウスに由来する)から単離されたPCRTM産物においても観察されている。

プライマーE: 5' ATG GGG ATG CCA CTG CCC TGG 3' (配列番号16)

(リーダー配列を含んだFcRnのセンス鎖の塩基1~21をコードする)。

公表されたFcRn配列と単離されたFcRn配列との間の配列差異は、本発明者らおよびSimisterおよび共同研究者(FVA/Nマウス(Ahouseら, 1993)を使用した)によって使用された異なるマウス株に起因する対立遺伝子差異である可能性が最も高い。Simisterらは、マウス胎盤、成体マウス近位小腸、胸腺、脾臓、腎臓、または肝臓への、FcRn cDNAプローブのハイブリダイゼーションを全く見出さなかったが、マウス線維芽細胞におけるタンパク質レベルでの発現を除外しなかった。これらの差異の理由は、使用された方法(すなわち、PCRTM対ノーザンブロッティング)の感度における差異に起因し得る。データに矛盾することなく、Simisterら(Storyら, 1994)は、多くの他の成体ヒト組織における広範な発現に加えて、FcRnホモログがヒト胎盤において高レベルで発現されることを、最近になって報告している。ラットについてもまた、成体組織由来のRNAへのFcRnプローブの弱いハイブリダイゼーションが、高ストリンジェンシー洗浄の後に観察されている(SimisterおよびMostov, 1989a; SimisterおよびMostov, 1989b)。遍在性の内皮細胞(すなわち、全ての脈管化器官)における異化の調節に關与するレセプターの低レベル発現は、一定の血清IgGレベルの維持におけるこのタンパク質の提案された役割と矛盾しない。これらの発現データは、上記の実施例3および4において提示されたデータと共に、FcRcおよびFcRnが単一かつ同一であることを示唆する。

バキュロウイルス系の可溶形態におけるFcRnの発現

FcRnの細胞外領域(コドン1~290、リーダーペプチドを含む)をコードする遺伝子は、3' His₆ペプチドコドンでタグ化され(Ward, 1992)、PCRTMを使用してBamHI部位を改変さ

れ (tailored)、そしてバキュロウイルス系における発現のためにpACUW51 (Invitrogen) のBglIII部位に連結されている (O'Reillyら, 1992)。2ミクログロブリンをコードする遺伝子もまた、PCRTMを使用してそしてBglIII部位をタグ化して増幅し、そしてpACUW51のBamHI位に連結した。ベクターFcRn-pACを使用して、Spodoptera frugiperda (Sf9) 細胞へトランスフェクトした組換えウイルスブランクを精製した。組換えウイルスのストックを生成して、そしてSf9よりも高いレベルの組換えタンパク質を発現するHigh-5細胞 (Trichoplusia ni; Invitrogen) を感染させるために使用した。4日間の感染に続いて、培養上清および溶解したペレットを、Ni²⁺-アガロース上を通過させ、そして結合タンパク質を溶出させた。この系を使用して、1リットルにつき15ミリグラムのFcRnをルーチン的に精製した。SDS-PAGEおよび免疫ブロッティング (抗2ミクログロブリンを使用する) 分析は、タンパク質が重鎖と2ミクログロブリンとのヘテロダイマーとして精製されることを示す。HPLC分析は、FcRn重鎖が2ミクログロブリンに定量的に会合することを示す。さらに、マウスIgG1-Sepharoseへの、放射標識した可溶性FcRn (sFcRnと称する) を用いる結合研究は、sFcRnが、pHに依存的かつ特異的な様式で、Sepharoseに結合したmIgG1へと結合することを示す (表XIV)。

表XIV

mIgG1-セファロースへのsFcRnの結合

インキュベーションのpH	添加した		pH7.5での洗浄後の
	最初の放射活性	結合した放射活性	結合した放射活性
6.0	913,948cpm [#]	271,425cpm	42,552cpm
6.0	937,685cpm	227,828cpm	42,656cpm
6.0	937,985cpm	70,659cpm*	26,492cpm
7.5	931,302cpm	19,576cpm	16,816cpm
7.5	943,936cpm	11,556cpm	10,269cpm
7.5	958,958cpm	12,339cpm	9,468cpm

* 500 μ gのmIgG1の存在下

[#] 標識したrFcRnの比活性は10⁶cpm/ μ gであった

FcRnへのWTおよび変異体Fcフラグメントの結合

IgG-セファロースへの¹²⁵I-sFcRnの結合をマウスIgG1、WTまたは変異体Fcフラグメントによって阻害した研究は、I-253、HQ-310、HQ-310/HN-433変異体がsFcRnへの結合においてWT Fcに比較して全てを欠損していることを示す。このことは、単離した刷子縁を用いたインビボの転移データおよびインビトロの結合研究と一致する (表XV)。

表XV

マウスIgG1、WT、および変異体FcフラグメントによるマウスIgG1-セファロースに対する¹²⁵-I標識sFcRnの結合の阻害

インヒビター	%阻害	
	インヒビター/FcRnのモル比	
	1/500	1/1000
mIgG1	24.7	45.6
WT Fc	18.4	34.1
HQ-310/HN-433	0.2	4.0
I-253	2.3	6.5
HQ-310	1.6	6.1

バクテリオファージの表面上でのFcフラグメントの発現

ファージディスプレイベクターの構築

図11に示すファージミド構築物を作製した。WT FcおよびHQ-310/HN-433フラグメント（ヒンジ領域を含む）をコードする遺伝子を、ベクターpHEN1（Hoogenboomら、1991）へNcoI-NotIフラグメントとして連結するために、PCRTMによって作製した。この作業についてpHEN1を使用する利点は、以下の通りである：Fc遺伝子を、抑制可能な停止コドン（amber）を介してフィラメント様バクテリオファージfdのcplIIコートタンパク質に連結する。従って、amberサプレッサー株E. coli TG1（Gibson、1984）のファージミドでのトランスフェクション、続くヘルパーファージでの重感染は、ファージミド粒子の排出を生じる（Hoogenboomら、1991）。この場合、ファージミド粒子は、表面結合Fcフラグメントを有する。しかし、抑制は完全ではなく、その結果、Fcフラグメントの有意な割合が、可溶性の非結合分子として輸送される（イムノプロットにおいて明瞭に観察される）。従ってこれらの可溶性のFcフラグメントは、Fabフラグメント上の重鎖および軽鎖成分について以前に記載された方法（Hoogenboomら、1991）と同様の方法で、表面結合Fcフラグメントと会合してホモダイマーを形成する。

ファージディスプレイFcフラグメントの機能的活性：sFcRnへの結合

pHEN1中にWT FcまたはHQ-310/HN-433変異体のいずれかを有するE. coli TG1形質転換体を増殖させ、ファージを排出させ、そしてポリエチレングリコール沈殿によって濃縮した（Marksら、1991）。ファージペレットを2%粉乳/PBS（pH 6）、および10 µg/mlの濃度で添加した精製したsFcRn中に、50 µgマウスIgG1の存在または非存在下で再懸濁した。2時間のインキュベーション後、sFcRn-ファージ複合体を、10 µlのNi²⁺-NTA-アガロースの添加によって単離し、そしてアガロースビーズを0.1%Tween/PBS（pH 6）で、次いでPBS（pH 6）で大規模に洗浄した。特異的に結合したファージを、50mMのTris-HCl（pH 7.5）を用いて溶出し、そして記載されるように（Marksら、1991）、指数的に増殖しているE. coli TG1を感染させるために使用した。感染させたTG1細胞を連続希釈し、プレーティングし、そしてcfuを決定した（表XVI）。

表XVI

sFcRnに対するFcフラグメントを有するファージのバンニング

添加したIgG1の量 (μ g)	コロニーの数	
	ファージを有する WT Fc	ファージを有する HQ-310/HN-433
50	41	230
0	>2000	109

10

これらのデータおよび実施例 4 から、この系が、sFcRnに特異的に結合するFcフラグメントのファージディスプレイを生じ、従って、この系が、FcRn結合について高い親和性を有するFc変異体の選択のための適切な系であることが明らかである。

実施例 8

この実施例において、血清IgGレベルおよび経細胞輸送の制御における残基His433、His435、およびHis436の役割を、薬物動態学的研究において試験した。mIgG2b分子が、mIgG2aまたはmIgG1のいずれかより短い血清持続性を有することが以前に注目されているが (Pollockら、1990)、これを担っている配列はマッピングされていない。以前のデータに基づいて、本発明者らは、半減期における差異が433、435、および436位でのCH3ドメインにおける配列の差異に起因し得ることを明記した。IgG2aおよびIgG1において、これらの位置の残基は、His433、His435、およびHis436であり、そしてデータは、His435およびHis436 (ならびに、His433-Asn434の二重変異の状況である場合、His433) が血清持続性の調節に關与することを示す (Medesanら、1997)。mIgG2bにおいて、これらの位置の残基は、Lys433、Tyr435、およびTyr436である。本発明者らは、mIgG2b中の残基433、435、および436を、これらの変異がmIgG2b分子の半減期を増大させ得るとの予想の下に、mIgG1中の対応する残基に変異させた。

20

タンパク質の調製および放射標識

組換えFcフラグメントを Ni^{2+} -NTA-アガロースを使用して精製し、そして以前に記載された (Kimら、1994a) Iodo-Gen試薬 (Amersham) を使用して放射性ヨウ素標識する。

30

薬物動態学的研究

以前に記載された (Kimら、1994a) 方法論を本質的に使用する。簡潔には、タンパク質を放射標識し、 10^7 cpm/ μ gの比活性をこの方法を使用して日常的に得、そして遊離のヨウ素を、セファロースG-25M上での2回の連続的なゲル濾過によって除去する。放射標識したFcフラグメントを、マウスへの注射の前に浸透HPLCによってSEC-250カラム上で分析する。放射標識したタンパク質を、 $150\mu\text{l}$ を超えない容量、および $1 \sim 5 \times 10^7$ cpmの放射活性負荷で尾静脈に注射する。マウスを、注射後120時間まで一定の間隔でヘパリン化したキャピラリーチューブで採血する。血漿中に存在する放射活性を記載される (Kimら、1994a) ように決定し、そして血漿のアリコートに10%トリクロロ酢酸 (TCA) に添加して沈殿し得ないcpmを決定する。血漿を注射後24時間で採集し、そしてSEC-250カラム上でのHPLCによって分析する (Kimら、1994a)。

40

より長い血清持続性を有するマウスIgG2b (mIgG2b) 抗体の作製

意外なことに、E. coliから発現されそして精製されたmIgG2b Fc-ヒンジフラグメントは、完全にグリコシル化されたマウスIgG2b分子よりも短い血清持続性を有する (これは、物質を発現するE. coliが完全にグリコシル化されたIgG1と同じ半減期を有する場合、マウスIgG1 Fc-ヒンジについて得られる結果と対照的であることに注意)。従って、ベクターは、バキュロウイルス発現系を使用して、完全なマウスIgG2b分子 (野生型、ならびにLys433、Tyr435、およびTyr436がHis433、His435、およびHis436に変更された変異した誘導体；後者はKYY変異体と称される) を発現するように構築されている。昆虫細胞中での発現は、哺乳動物細胞において使用されるものと同じグリコシル化のための認識配列を使

50

用する、グリコシル化タンパク質を生じることが公知である。IgG2b定常領域をコードする遺伝子を、PCRTM、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して単離し、そして抗リゾチーム抗体のVHドメイン遺伝子(D1.3; Amitら、1986)をコードする遺伝子にスプライシングした。同様に、マウスCドメインをコードする遺伝子を、D1.3 Vドメインにスプライシングした。分泌リーダーをまた、PCRTMを使用して、重鎖および軽鎖遺伝子の両方の上流に挿入した。次いで、軽鎖および重鎖をコードする免疫グロブリン遺伝子を、バキュロウイルス発現ベクターpACUW51(Pharminogen)中に連結した。

ベクターを、Sf9(Spodoptera frugiperda)細胞へトランスフェクトし、組換えウイルスのプラークを精製し、そして発現のためにHigh 5(Trichoplusia ni)細胞を感染させるために使用した。感染の4日後、組換え抗体を記載されるように(Wardら、1989)リゾチームセファロースを使用して培養上清から精製した。変異体mIgG2b(KYY)分子を精製し、そしてそのインビボの半減期をSWISSマウス中で分析した。半減期を、骨髄腫(B細胞)が発現したmIgG2b(変異していない)およびmIgG1と比較し、結果を表XVIIに示す。

表XVII

**mIgG1、mIgG2b(骨髄腫が発現した)、
および変異したmIgG2b(KYY変異体)の半減期**

抗体	β 相半減期(時間)
mIgG1	123.5 \pm 13.3
mIgG2b(WT)	56.1 \pm 5
mIgG2b(KYY変異体)	110.9 \pm 16.2

明らかに、変異は、半減期において有意な延長を生じ(56.1時間から110.9時間)、そして変異したIgG2b分子の半減期はSWISSマウス中のmIgG1の半減期と同じである。従って、433、435、および436での残基の差異のいくつかまたは全てが、野生型mIgG2bとmIgG1との間の半減期の差異を担っている。

実施例9

材料および方法

mIgG1由来の変異したFcヒンジフラグメントの作製

変異を、設計した変異誘発オリゴヌクレオチド、および重複伸長(Hortonら、1989)または部位特異的変異誘発(Carterら、1985; Kunkel、1985)によるいずれかのスプライシングを使用して作製した。変異体を表XVIIIに記載し、そして変異体1253AおよびH285Aの作製は以前に記載されている(Kimら、1994a; 1994c)。他の変異体について、部位特異的変異誘発に使用した変異誘発性オリゴヌクレオチドは以下の通りである(下線は変異させた塩基を示す): H433A、5'-GGTGGTTGGCCAGGCCCT-3'(配列番号17); H435A、5'-CAGTATGGCGTTGTGCA-3'(配列番号18); およびH436A、5'-CTCAGTAGCGTGGTTGTG-3'(配列番号19)。変異体H310A、N434A、およびN434Qを、以下の変異誘発オリゴヌクレオチドを用いる重複伸長(Hortonら、1989)によるスプライシングを使用して作製した: H310A、5'-CCCA TCATGGCCAGGACTGG-3'(配列番号20)および5'-CCAGTCCTGGCCATGATGGG-3'(配列番号21); N434A、5'-GGCCTGCACGCGCACCATACT-3'(配列番号22)および5'-AGTATGGTGCAGCGTGCAGGCCCT-3'(配列番号23); ならびにN434Q、5'-AGTATGGTGTGGTGCAG-3'(配列番号24)および5'-CTGCACCAACACCATACT-3'(配列番号25)。すべての変異体について、対応する遺伝子を、機能的分析の前に、ジデオキシヌクレオチド法(Sangerら、1977)およびSequenase^Rを使用して配列決定した。

組換えタンパク質の発現および精製

野生型(WT)およびカルボキシ末端ヘキサヒスチジンペプチドでタグ化した変異体Fcヒンジフラグメントを、Ni²⁺-NTA-アガロース(Qiagen、Chatsworth、CA)を使用して以前に記載されたように(Kimら、1994a)精製した。15mMのリン酸緩衝液/50mM NaCl(pH7.5)

に対する透析後、変異体を、短期間の保存（＜10日）のためには4℃、または長期間の保存のためには凍結乾燥のいずれかで維持した。組換え可溶性マウスFcRnを、以前に記載されるような（Popovら、1996b）バキュロウイルス系を使用して発現させ、精製し、そして4℃で保存した。

表XVIII

本研究で使した組換えFc-ヒンジ誘導体

名称	変異	ドメイン
WT Fc-ヒンジ	なし	
1253A ^a	Ile253からAla	CH2
H285A ^a	His285からAla	CH2
H310A	His310からAla	CH2
H433A	His433からAla	CH3
H433A/N434Q ^a	His433からAlaおよび Asn434からGln	CH3
N434A	Asn434からAla	CH3
N434Q	Asn434からGln	CH3
H435A	His435からAla	CH3
H436A	His436からAla	CH3

^a 以前に記載された変異体（Kimら、1994a；1994c）

SDS-PAGEおよび循環型ジクロイズム（CD）を使用する変異体Fcヒンジフラグメントの分析 SDS-PAGE（Laemmli、1970）およびCD分析を、以前に記載された（Laemmli、1970）ように行った。

タンパク質の放射標識

モノクローナルmIgG1、組換えマウスFc_γ1ヒンジフラグメント、および組換えマウスFcRn（mFcRn）（Popovら、1996b）を、以前に記載されたような（Kimら、1994a）Iodogen試薬（FrakerおよびSpeck、1978）を使用して[¹²⁵I]Na（Amersham、Arlington Heights、IL）で放射標識した。遊離のヨウ素をMicroSpin G-25カラム（Pharmacia、Piscataway、NJ）上での遠心分離によって除去した。放射標識したタンパク質の比活性は、約5×10⁶cpm/μgであり、＜5%の遊離のヨウ素を含んだ。放射活性タンパク質をマウスへの注射の前に1週間以内4℃で保存した。

クロマトグラフィー分析

すべての放射標識したFcヒンジフラグメントを、浸透HPLCによってs-250カラム（Bio-Rad、Hercules、CA）上で分析した。放射標識したFcヒンジフラグメントで注射したマウスから24時間にて採集した血清をプールし、そしてs-250カラム（Bio-Rad）上でのHPLCによって分析した。クロマトグラフィー画分の放射活性をガンマカウンターで測定し、そして放射活性ピークの分子量および異質性を決定した。

血清IgG濃度の決定

血清IgGの濃度を、Nanorid and Bindaridキット（The Binding Site、Birmingham、UK）を用いる放射性免疫拡散法を使用して決定した。沈降素環の直径を、電子的に測定した。

薬物動態学的分析

放射性ヨウ素標識Fcヒンジフラグメントの薬物動態学を、6週齢のBALB/cマウス（Harlan Sprague-Dawley Laboratory、Indianapolis、IN）中で以前に記載されたように（Kimら

10

20

30

40

50

、1994a；1994c）決定した。

母体胎児（maternofetal）伝達

以前に記載された方法論（Medesanら、1996）を、妊娠中の異系交配SCIDマウス（Taconic Co.、Germantown、NY）について分娩期に（15～18日）使用した。簡潔には、マウスに飲料水中の0.01%のNaIを給餌し、次いで、1日後に、放射標識タンパク質（ 2×10^7 および 5×10^7 cpm）を尾静脈に注射した。マウスを20 μ lのキャピラリーで注射後3分で採血し、そして24時間後、胎児を帝王切開によって取り出した。いくつかの胎児をプールし（胎盤を廃棄して）、生理食塩水中で洗浄し、秤量し、液体窒素中で凍結させ、そして10容量の10%TCA中でホモジナイズした。懸濁物を遠心分離し、そして沈澱の放射活性をガンマカウンターにおいて決定した。伝達の割合を、以下の式で計算した：

$$\% \text{伝達} (\% T) = (R3) / [(R1 - R2) \times (W \times 0.72) / 0.02]$$

ここで、R1は、3分での母体血液中の放射活性、R2は24時間での母体血液中の放射活性、Wは、体重（グラム）、そしてR3は胎児の放射活性である。

所定の同腹子中の胎児の総重量および数は同腹子間で変化した。従って、伝達データを、同腹子当たりに移された量よりむしろ、胎児の単位重量当たりで示す（%T/g）（Medesanら、1996）。妊娠マウスの血液容量は体重の7.2%であると考えられた（Guyerら、1976）。胎児への伝達に利用可能な母体血液中の放射活性を、放射標識タンパク質の注入の3分後に測定してから24時間後に残存する放射活性を推定することにより計算した。

経腸転移の阻害

BALB/c新生児マウス（10～14日齢）を、以前に記載（Kimら、1994b）のように、約2000のFc/IgGモル比での $[^{125}\text{I}]$ mIgG1およびFcヒンジフラグメントの混合物で挿管した（intubate）。阻害パーセントを、インヒビターのない同量の $[^{125}\text{I}]$ mIgG1の転移に対して計算した。

mIgG1-セファロースへのFcRn結合の阻害

全てのFcヒンジ誘導体を、250mM NaClおよび5mM Na₂EDTAを有する50mMリン酸緩衝液（pH6.0）（PB-6）中で透析し、そして1mg/mlの濃度に調整した。300 μ lのFcヒンジ（WTまたは変異体）またはPB-6を、エッペンドルフチューブ中で、25℃で30分間回転させながら、150 μ lのmIgG1-セファロース（1mg/ml充填ゲル、50%懸濁液）、50 μ lのPB-6（10mg/ml OVA（Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO）を含有する）、および10 μ lの $[^{125}\text{I}]$ FcRn（0.1 μ g/200,000cpm）と共にインキュベートした。インキュベーション後、500 μ lの氷冷PB-6を添加し、そしてゲルを、氷冷PB-6（+ 1mg/ml OVA）を用いて12,000 \times gで3分間遠心分離することにより、3回洗浄した。ゲルに結合した放射活性を決定した。ゲルペレットを、1mlのPB-7.5中に再懸濁し（250mM NaCl、5mM Na₂EDTAを含有する50mMリン酸緩衝液（1mg/ml OVAを有する））、そして上清を遠心分離後に捨てた。ゲルに結合した残存放射活性を決定した。mIgG1-セファロースゲルに特異的に結合した放射活性を、結合放射活性から残存放射活性を引き算することにより計算した。Fc誘導体によるFcRnのmIgG1-セファロースへの結合阻害を、以下の式を用いて計算した：阻害% = 100 - 100 A/B、ここでAはFcヒンジフラグメントの存在下でmIgG1セファロースに結合した特異的放射活性であり、そしてBはFcヒンジフラグメントの非存在下で結合した特異的放射活性である。

ブドウ球菌プロテイン A（SpA）への結合の分析

SpA-アガロースゲル（0.5ml）をBP-7（250mM NaCl、5mM Na₂EDTAを含有する50mMリン酸緩衝液）および1mg/ml OVA（BP-7.5）と平衡させた。50～100 μ lの各 $[^{125}\text{I}]$ 標識Fcヒンジフラグメント（50 μ gのタンパク質を含有する）をカラム上にロードし、15分間インキュベートし、次いで10カラム容量の同じ緩衝液で洗浄した。結合Fcヒンジフラグメントを100mM酢酸で溶出した。素通り画分、洗浄液、および溶出液中の放射活性の量を決定した。結合/非結合の比を計算し、そしてWTRFcヒンジフラグメントに対する各変異体の結合の割合を決定した。

結果

マウスFc_γ1ヒンジ変異体の発現および分析

WT Fcヒンジおよび変異体をコードするプラスミド（表XVIII）を構築し、そしてタンパク

10

20

30

40

50

質を*Escherichia coli*を宿主として用いて発現させ、そして精製した。H285A変異体を除いて、変異した残基は全て、CH2-CH3ドメイン界面 (Deisenhofer, 1981) に非常に密接しており、そしてまた、マウスおよびヒトの両方のIgGイソタイプ (Kabatら、1991) において高度に保存されている。以前に記載のように、放射標識Fcヒンジ誘導体は、本質的に、s-250カラム上で分析されたときに55kDaに対応する保持時間を伴うシングルピークとして出現した (Kimら、1994a)。HPLC分析と共に考慮すると、還元および非還元SDS-PAGE分析は、Fcヒンジ誘導体が非共有結合ホモダイマーおよびスルフヒドリル結合ホモダイマーの混合物として発現されていることを示した。さらに、Fcヒンジ誘導体のCD研究は、変異が組換えタンパク質の構造において大規模な変化を生じないことを示した。

Fcヒンジフラグメントの薬物動態学的分析

放射標識Fcヒンジフラグメントをマウスに注入し、そして血清放射活性を注入後の種々の時点でモニターした。各Fcヒンジ誘導体について、異なるマウスにおける除去曲線は類似であった。

各組換えFcヒンジフラグメントについて、1つの群内のマウスから24時間の時点で採集した血清サンプルをプールし、これをs-250カラムにおけるHPLCに供した。全てのFcヒンジフラグメントについて、大部分の放射活性は、注入タンパク質の分子量 (55kDa) に対応する保持時間を伴うシングルピークとして溶出した。以前の結果 (Kimら、1994a) と一致して、このことは、Fcヒンジ誘導体が、ホモダイマー分子として血清中に存続しており、タンパク質分解により消化されておらず、他の血清タンパク質と会合していないことを示す。Fcヒンジ誘導体の薬物動態学パラメーターを表XIXに示し、相は、血管内隙と血管外隙との間の平衡時間を表すが、相は、血管内隙からの平衡化タンパク質の除去を表す。さらに、相の間で、組換えタンパク質調製物中に存在し得るいずれのミスフォールドタンパク質分子も除去される；従って、相は、血管内隙からの正確にフォールドされたタンパク質の除去を表す。

本データは、いくらかの変異が対応するFcヒンジフラグメントの相半減期に対して有意な効果を有することを、明らかに実証する。従って、CH2ドメインにおけるH310の変異は、異化速度に対して顕著な効果を有する (表XIX)。対照的に、H285 (CH2-CH3界面に遠位のCH2ドメインの外部表面上のループ中に位置する (Deisenhofer, 1981)) の変異は、異化速度に対して何の効果も有さず、これは以前の知見 (Kimら、1994c) と一致する。H433およびN434の同時変異は、これらの各位置での単一変異がWT Fcヒンジと同じ半減期を有する2つの変異体 (H433AおよびN434A) を生じたのに対し、相半減期を77時間に減少させた (36%減少)。N434のグルタミンでの置換もまた、WT Fcヒンジの半減期と同様の半減期を有するFcヒンジフラグメントを生じた (表A)。H433A-N434Q変異体の半減期 (76.9h) は、以前に報告された値 (50.3h) (Kimら、1994a) より大きく、そしてこれはまた、WT Fcヒンジフラグメント (119対82.9h)、H28A (106対85h)、およびI253A (26対20h) についても観察される。これらの見かけの相違の説明は、本研究において用いたBALB/cマウス (Harlan Laboratoriesから入手) は、 1.0 ± 0.4 mg/mlのIgG濃度 (25マウスの平均) を有することであり、この値は、初期の研究 (Kimら、1994a、1994c) において用いられた動物集団からのBALB/cマウスにおけるIgG濃度 (4.6 ± 0.8 mg/ml) よりかなり低い。濃度 - 異化関係 (MarianiおよびStrober, 1991) により、IgGの半減期は、より低い血清IgG濃度を有するマウスにおいてより長いことが推定される。そしてこのことにより、直接比較がなされた上記の場合における、Fcヒンジフラグメントのより長い半減期が説明される。

CH3ドメインにおけるH435の変異は、CH2ドメイン中のI253またはH310の変異により誘導されるのとはほぼ同様に顕著な効果を有する。このことは、明らかに、このCH3ドメイン残基がmIgG1の異化部位を構築するにおいて重要な役割を果たすことを示している。さらに、H436A変異体は49時間の半減期を有し、H436が、異化の制御においてI253、H310、またはH453より微小な役割しか果たさないことが実証される (表XIX)。

表XIX

BALB/cマウスにおける組換えFcヒンジフラグメントの異化

Fc-ヒンジフラグメント	α 相半減期	β 相半減期
WT Fc-ヒンジ	11.9 ± 0.2	119.1 ± 11.5
1253A	9.0 ± 1.8	26.2 ± 1.9
H285A	10.8 ± 3.0	106.4 ± 11.7
H310A	5.8 ± 0.2	16.8 ± 1.2
H433A	9.6 ± 1.0	114.8 ± 10.8
H433A/N434Q	9.4 ± 1.1	76.9 ± 10.3
N434A	9.0 ± 0.2	110.0 ± 9.2
N434Q	11.7 ± 0.3	115.0 ± 12.6
H435A	4.4 ± 0.2	17.4 ± 2.8
H436A	8.5 ± 0.3	48.7 ± 2.4

母胎転移

Fcヒンジフラグメントの薬物動態学分析を母胎転移研究に拡張した。分娩期近くの妊娠SCIDマウスの循環から胎児への放射標識Fcヒンジ誘導体の転移を、転移研究のために用いられた24時間の間、母体血液中に存在する放射活性に対して1同腹子の胎児により採取したタンパク質結合放射活性を測定することにより分析した。初期の研究において、wtおよび変異体の両Fcヒンジフラグメントがインタクトな分子として胎児に転移されることが実証された (Medesanら、1996)。従って、転移における差異は、wt分子と変異体分子とのタンパク質分解に対する感受性における差異に起因するわけではないようである。1253A、H310A、およびH435A変異体の伝達は、WT FcヒンジまたはH285Aの約10~20%でしかなかった。このことにより、IgGの母胎転移においてこれらの残基により果たされる中心的な役割が実証される。従って、これらの変異は、母胎転移および異化に対して同様の効果を有する。しかし、1253A、H310A、H433A、およびH435Aについて見出された 相半減期と母胎伝達との間の相関は、H436A変異体については観察されなかった。WT Fcヒンジに対して、この変異体は、母胎伝達において同様の活性を有したが、より短い半減期を有する (表XIXおよび図12A)。

腸管転移

組換えFcヒンジ誘導体の腸管伝達を、新生児マウスの腸管壁を横切る放射標識mIgG1の転移を阻害するそれらの能力を測定することにより分析した (図12B)。結果は、1253A、H310A、およびH435A変異体の母胎伝達について得られたデータと一致する。このことは、同じレセプターおよび伝達機構が、両方の経細胞輸送プロセスに参与していることを示す。しかし、H436A変異体は、WT Fcヒンジとほぼ同じ効率でSCIDマウスの母胎障壁を横切って転移され (図12A)、そしてなお新生児腸管を横切るmIgG1の転移を有効には阻害しない。従って、この変異体については、半減期および新生児転移の阻害はWT Fcヒンジに対して減少しており、そしてなお母胎転移は影響を受けないようである。

FcRnに対する親和性

組換えFcヒンジフラグメントの組換えmFcRnへの結合についての相対的親和性を、 $[^{125}\text{I}]$ FcRnのmIgG1-セファロースへの結合を阻害するそれらの能力を測定することにより概算した (図13A)。本データは、全ての場合において、短い半減期および経細胞輸送アッセイ (母胎および新生児) における減少した活性を有する変異体がまた、H436Aを除いて、F

cRnへの結合についてより低い親和性を有することを実証する。FcRnについてより低い相対的親和性であるにも関わらず、この変異体は、WT Fcヒンジとほぼ同じ効率で母胎障壁を横切って転移され、そしてなお減少した血清半減期および腸管転移アッセイにおける減少した活性を有する。

SpAへの結合

SpA結合部位および異化部位はmIgG1のCH2-CH3ドメイン界面に位置することが以前に示されており (Kimら、1994a)、従って、FcヒンジフラグメントのSpAへの結合に対する変異の影響を、直接結合研究において分析した (図13B)。本データは、H310AおよびH435AはSpA結合を大いに損なう (WTの9~12%) が、I253またはH433の変異はそれほど顕著な影響を有さない (WTの30~35%) ことを示す。

本研究は、CH2ドメイン (I253およびH310) およびCH3ドメイン (H435および、より少ない程度ではH436) のアミノ酸残基が経細胞輸送およびmIgG1の血清持続性の調節に関与していることを実証する。この結論は、非グリコシル化 (aglycosylated) 形態で発現された組換えFcヒンジフラグメントの分析から導かれるが、初期の研究は、WT Fcヒンジフラグメントが、完全なグリコシル化mIgG1と同じ 相半減期 (Kimら、1994a) および経細胞輸送アッセイにおける同じ活性 (Kimら、1994b) を有することを実証した。このことは、このイソタイプについて、非グリコシル化Fcヒンジフラグメントを用いる研究を完全IgGに拡張することが妥当であることを示す。従って、両ドメイン中の残基は、FcRn-mIgG1相互作用を含む2つのプロセスにおいて重要な役割を果たす。この結論は、CH2ドメインにおける変異がCH3ドメインにおける変異よりもより顕著な効果を有するという初期の提言 (Kimら、1994a; 1994c; 1994b; Medesanら、1996) に矛盾するようであり得る。しかし、これらの初期の研究では、経細胞輸送/異化におけるH433およびN434の両方の同時変異の効果のみを分析しており、これは、これらの残基について微小な役割を示した。最近の研究では、これらの2つのアミノ酸のそれぞれの変異は、独立して、経細胞輸送および異化の両方に対して有意でない効果を有する。H433およびN434の両変異の観察された効果についての最も妥当な説明は、これらの2つのアミノ酸の同時変異が、隣接したヒスチジン (H435) (H433およびN434とは対照的に、FcRn-mIgG1相互作用において本質的な役割を果たす) の方向付けにおいて、局所的な混乱を引き起こすということである。

H310およびQ311を含む領域 (以前、H310、Q311からA310、N311への同時変異の状況で分析された) のさらなる分析は、FcRn-mIgG1相互作用におけるH310の中心的役割を実証する。H310のアラニンへの変異は、初期に分析したH310A/Q311N変異体について見られるのと同程度に顕著である効果を有する。この理由のため、Q311単独の変異効果を現研究において調べなかった。I253、H310、およびH435とは対照的に、H436は、血清IgGレベルおよび経細胞輸送の維持においてより微小な役割を果たす。I253およびH310はともに、全てのマウスおよびヒトIgGイソタイプで高度に保存されており (Kabatら、1991)、一方、H435およびH436は、より低い程度の保存を示す (mIgG2bにおいては、Y435、Y436; mIgG2aアロタイプにおいては、L436; ヒトIgG1、IgG2、およびIgG4においては、Y436; ヒトIgG3においては、F436; ならびにヒトIgG3アロタイプにおいては、R435)。これらの配列の差異は、他のIgGイソタイプに対するmIgG2bおよびヒトIgG3のより短い血清半減期 (WardおよびGhetie、1995) を説明し得た。今日まで、異なるヒトIgGイソタイプ (MellbyeおよびNatvig、1973) およびマウスIgGイソタイプ (Guyerら、1976) の相対的経細胞輸送活性に関して利用可能な一貫したデータは存在しない。従って、母胎または新生児転移に対する435位および436位でのアミノ酸差異の効果について、仮定することができない。IgGとは対照的に、IgM、IgE、およびIgAは、短い血清半減期を有し、そして胎盤/卵黄嚢障壁または新生児腸を横切って転移されない (Zuckierら、1989; Wild、1973)。これらの観察と一致して、Fc-FcRn相互作用を媒介するのに重要であると本研究で示された残基のいずれもが、ヒトおよびマウスの両方のIgM、IgE、およびIgAはそれぞれの分子の他の領域ではIgGと有意な相同性を共有している (Kabatら、1991) にも関わらず、これらの3つのIgクラスには存在しない。

I253は、哺乳動物に属する全てのIgG分子において保存されている、高度に曝露された疎

10

20

30

40

50

水性の残基である (Kabatら、1991)。本研究では、このイソロイシンのアラニンへの変異は、血清半減期および母胎障壁または新生児腸を横切る経細胞輸送においてかなりの減少を生じた。このことは、I253がSpAへの結合 (Deisenhofer、1981) 以上に重要な生理的役割を満たすことを、明らかに示す。I253に隣接するアミノ酸残基は、ヒトFcのSpAへの結合 (Deisenhofer、1981) に関与しており、そしてFcRnの結合におけるそれらの関与は排除され得ない。従って、M252は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、およびヒトの全てのIgGイソタイプにおいて高度に保存されており、但し、mIgG1およびラットIgG1 / IgG2a (トレオニンがメチオニンに置換されている) のようないくつかの例外を除く (Kabatら、1991)。同様に、254位は、全てのイソタイプおよび種についてセリンで占められており、但し上述のマウスおよびラットイソタイプ (この位置にトレオニンを有する) を除く。252位および254位におけるこれらの変化は、他のイソタイプと比較した、mIgG1のより長い半減期およびより効率的な経細胞輸送と関連し得る。

H433AおよびH436Aを除く全ての変異体について、FcRnおよびSpAへの結合は同程度に損なわれている。H433Aは、WT Fcヒンジに比較してSpA結合を減少させたが、FcRnと相互作用するとき影響はない。逆に、H436A変異は反対の効果を有する。従って、SpAおよびFcRn相互作用部位は重複するが、この重複は完全ではなく、mIgG1におけるSpAおよびFcRnの「フットプリント」は別個である。このことはまた、FcRn-mIgG1およびSpA-mIgG1相互作用について観察されたpH依存性の差異 (WallaceおよびRees、1980 ; RodewaldおよびKrachenhuhl、1984 ; Eyら、1978) と一致する。

IgGおよびFcRn間の相互作用のpH依存性 (pH 6 ~ 6.5で結合し、そしてpH 7 ~ 7.5で遊離する) (WallaceおよびRees、1980 ; RodewaldおよびKrachenhuhl、1984) は、ヒスチジンのイミダゾール側鎖のpK値の範囲内に入る。本研究からのデータと共に考慮すると、この情報は、IgG-FcRn相互作用の顕著なpH依存性が、CH2およびCH3ドメインの界面に位置する310位、435位、および436位の表面に近接可能なヒスチジン残基により決定されることを示唆し、そしてこの結論は、Bjorkmanおよびその共同研究者のデータと一致する。このことは、mIgG2aについて、6.4 ~ 6.9のpH範囲に3つの滴定可能な残基が存在することを示す (Raghavanら、1995)。これらの研究 (Raghavanら、1995) と一致して、H310A変異体の分析は、H310Aが、Fc-FcRn相互作用を媒介することにおいてインピトロおよびインピボの両方で役割を果たすことを実証する。しかし、対照的に、H433AおよびH435Aの分析は、mIgG1について、H435のアラニンへの変異がFcRnについての親和性の損失を生じ、一方、H433は、FcRn結合において何の役割も果たさないことを示す。さらに、H436のアラニンへの変異は、FcRnに対して減少した親和性を有するFcヒンジフラグメントを生じる。従って、mIgG1-FcRn相互作用の高度の親和性を媒介することにおいて役割を果たすヒスチジンは、H310、H435、および、より低い程度ではH436である。これらのデータと他のデータ (Raghavanら、1995) との間のH433およびH435における見かけの差異の理由は明らかではないが、後者の研究では、FcRn相互作用部位およびその部位に近接した両方の残基において結果的な配列差異を伴う異なるイソタイプ (mIgG2a、mIgG2b、およびヒトIgG4) が用いられた。従って、周囲残基の配列における差異の状況では、H433およびH435の相対的役割は異なるイソタイプでは別個であると考えられる。

薬物動力学に対するFcヒンジフラグメントの変異の効果、新生児刷子縁 / 卵黄嚢を横切る経細胞輸送、およびFcRnについての親和性の間の密接な相関 (表XX) は、FcRnがこれら全てのプロセスに関与している (Ghetieら、1996 ; JunghansおよびAnderson、1996) という概念を支持する。これはまた、 γ_2 m発現の喪失に起因してFcRnを欠損するマウスにおいて、IgGが腸管伝達を減少させ (Israelら、1995 ; Zijlstraら、1990)、そして異常に短い血清半減期を有する (Ghetieら、1996 ; JunghansおよびAnderson、1996) ことを示す研究と一致する。異化および経細胞輸送の制御の両方について、FcRnに結合したIgG分子のみが分解から保護され、そして循環に再入する (異化) か、または卵黄嚢 / 新生児腸管を横断する (経細胞輸送) と仮定されている (Brambellら、1964)。FcRnは、最初、母親から胎児または新生児への抗体の伝達に関与する異なる種の組織 (胎盤、卵黄嚢、および新生児腸管の刷子縁) において機能的タンパク質として同定された (WallaceおよびRees、198

10

20

30

40

50

0 ; RodewardおよびKrachenbuhl、1984 ; Robertsら、1990 ; Simisterら、1996 ; KristoffersenおよびMatre、1996 ; Leachら、1996)。より最近では、マウスFcRn 鎖mRNAがIgGの母体伝達に関与しない器官 (例えば、肝臓、肺、心臓、および脾臓) から単離されている (Ghetieら、1996)。FcRnのラットおよびヒトホモログがまた、mRNAレベルで偏在的に発現されていることが見出されている (Storyら、1994 ; SimisterおよびMostov、1989b ; Blumbergら、1995)。このことは、FcRnがそれらの器官内で内皮細胞により合成され得ることを強く示唆する。このことと一致して、FcRn 鎖mRNA (Ghetieら、1996) および対応するタンパク質が培養マウス内皮細胞 (SVEC) から単離されており、これにより、内皮細胞がIgG異化の部位であり得ることが示唆される。ヒトIgGにおけるI253、H310、およびH453の高度の保存を伴う (Kabatら、1991)、成体組織において偏在的に発現されるFcRnのヒトホモログ (Storyら、1994) が、ヒト胎盤から単離されたこと (Simisterら、1996 ; KristoffersenおよびMatre、1996 ; Leachら、1996) は、血清IgGの母胎転移およびホメオスタシスの同じ機構がヒトIgGにおいて作用することを示す。分子詳細においてこれらのプロセスを理解することは、治療的IgGの薬物動態学の調整およびIgGの母胎転移の増強 (胎児の受動免疫において価値があり得る) の両方について含蓄を有する。

表XX

Pearson相関係数検定

	異 化	腸管転移	FcRn への親和性	ブドウ糖結合
母 胎	$r=0.8703$	$r=0.8928$	$r=0.8358^a$	$r=0.8838$
伝 達	$p=0.0049$	$p=0.0028$	$p=0.0097$	$p=0.0036$
異 化		$r=0.9450$	$r=0.9776$	$r=0.7107$
		$p=0.0004$	$p=0.00003$	$p=0.0482$
腸管転移			$r=0.9531$	$p=0.8361$
			$p=0.00025$	$p=0.0097$
FcRn への親和性				$r=0.7709$
				$p=0.0251$

^aH436Aについて得た値を除く相関係数 ; $r=0.9917$; $p=0.00001$ 。

FcRn-IgG相互作用のpH依存性 (WallaceおよびRees、1980 ; RodewardおよびKrachenbuhl、1984) は、結合が生じるサブ細胞部位 (細胞表面または細胞内区画) が、以前に議論された (Ghetieら、1996) ように、新生児経細胞輸送および母胎転移 / 異化の制御について異なることを示唆する。他の未知の要素 (例えば、これらの異なる細胞区画における再利用率) もまた、FcRnの有効濃度を決定することに役割を果たし得る。関与するプロセスおよび細胞型の間のこれらの相違は、共通のレセプターの関与にもかかわらず、H436A変異体の挙動 (半減期、腸管転移、およびFcRnへの親和性が他の変異体ほど密接に母胎伝達と関係しない) を説明し得る。H436A変異の異常な影響についてのさらなる説明は、以下の通りであり得る : H436のアラニンへの変異は、異化、腸管転移の阻害、およびFcRnへの結合に、I253A、H310A、およびH435Aについて観察されたほど著しい影響を有さず、そして、他の3つのアッセイとは対照的に、母胎転移アッセイは、内因性IgGによる競合の非存在下でSCIDマウスを用いて行われる。従って、この状況では、母胎転移に対するこの変異の

影響は、伝達の時間経過の分析が行われるかまたは転移が内因性の競合するIgGの存在下で例えばBALB/cマウスにおいて分析される場合にのみ、それ自身表れる。対照的に、競合アッセイにおいてFcRnへの結合についてH436Aよりも低い親和性を有する変異体（例えば、I253A、H310A、およびH435A）については、3つ全てのインビボアッセイ（異化、母胎転移、および新生児経細胞輸送の阻害）における低い活性は密接に関連する。

まとめると、この研究は、異化および母胎/新生児経細胞輸送の制御におけるmIgG1の3つの高度に保存されたヒスチジン（H310、H435、およびより低い程度でH436）の役割の明快な同定をもたらした。従って、これらのプロセスにおけるI253に関する以前のデータとひとまとめにして考えると、これらの残基は、FcRn-mIgG1相互作用に重要である。この研究はさらに、経細胞輸送および異化の両方におけるFcRnの関与を支持する証拠を拡張し、そしてIgGのこれらの必須の機能を調節する分子機構の理解に対する関連性を有する。

10

実施例10

コグネイト抗原に結合するための抗体の親和性改善のためのバクテリオファージディスプレイの力は、既に実証されている。本研究では、この系を用いて変異Fcフラグメントを発現させ、そしてFcRnへの結合についてより高い親和性の変異体を選択する。本研究のために、ミリグラム量の可溶性FcRn（sFcRn）を用い、そしてWT Fcフラグメントを機能的に活性な形態でファージの表面上に発現させる。

変異誘発のためのストラテジー

以前の研究は、Ile253、His310、His433、Asn434、His435、およびHis436が直接的または間接的のいずれかで、FcRnへの結合において役割を果たすことを示している（Kimら、1994a；1994b；Medesanら、1997および実施例9）。これらの重要な残基に隣接する残基およびヒトIgG1のX線構造（Deisenhofer、1981）からCH2-CH3ドメイン界面の近傍に最も曝されるようである側鎖を有する残基を、ランダムな変異誘発のために選択した。さらに、これらの残基は、種内および種間（例えば、ヒトと比較してマウスにおいて）で保存されていないはずである。このことは、これらが、異化の制御および経細胞輸送（またはIgGのいくつかの他の重要な機能）に（直接的には）関与しないことを示唆する。マウスIgG1イソタイプについてのこのような残基の例は、EU番号付け（Edelmanら、1969）で、CH2ドメインにおけるThr252、Thr254、Thr256（分析については実施例4を参照のこと）、Met309、Gln311、Asn315、ならびにCH3ドメインにおけるHis433およびAsn434である。

20

ランダムな変異誘発の前に、sFcRnへのFcフラグメントの結合に対する、これらの残基のそれぞれのアラニンへの変異の影響を分析する。これらの残基のいずれかが10倍を越えて親和性を低く変化させる場合、これらはランダムには変異されない。しかし、上記に列挙したこれらの残基の大部分は、高度には保存されておらず（Kabatら、1991）、従ってこれらは、Fc:FcRn相互作用および拡大すると、異化およびIgG経細胞輸送の制御において重要な役割を果たすようであると考えられる。His433およびAsn434はCH3ドメインから突出しているループ上で高度に露出されている（Deisenhofer、1981）ので、変異誘発の好ましい候補である隣接残基はほとんど存在しない。より多数の変異が、CH3ドメインよりもCH2ドメインで作製される。

30

これらの残基を、2～6の群（例えば、Gln309/Arg315ランダム変異体を、Thr252、Thr254、およびThr256ランダム変異体と組み合わせる）で、隣接コドンと正確にマッチするが変異した残基に対応するコドンの位置にランダムな塩基を挿入するオリゴヌクレオチドを用いて、ランダムに変異させる。同じFc遺伝子内で相互に遠位である変異コドンの挿入のために、2つ以上の異なるオリゴヌクレオチドとともに2回のPCRTMを用いる。オリゴヌクレオチドにおけるランダムな塩基を、コドン末端のゆらぎ位置がAで終了するように設計し、そして特定のアミノ酸に対する偏りを避けるために、Cもまたゆらぎ位置から除去され得る（HoogenboomおよびWinter、1992により記載されたように）。変異遺伝子を、オーバーラップ伸長によるスプライシング（Hortonら、1989）によるかまたは唯一の制限部位を用いる（変異部位の近位に位置する場合）ことによるかのいずれかにより組み立てる。変異誘発に続いて、各変異誘発オリゴヌクレオチドを用いて作製された約20クローンを、ジデオキシヌクレオチド法（Sangerら、1977）を用いて配列決定する。約20クローンの

40

50

発現レベルを、以前に記載されたように (Wardら, 1989) 抗myc抗体9E10および免疫ブロッキングを用いて分析する。

FcRnへの結合に対してより高い親和性を有する変異体の選択

変異Fc遺伝子のライブラリーからのより高い変異体の選択のための2つの戦略を用いる。第1に、変異遺伝子をpHEN1 (Hoogenboomら, 1991) 内で組み立て、そしてE. coli TG1をトランスフェクトするために用いる。上記で示したように、抑制の漏出は、組換え細胞から搬出される可溶性Fcおよびファージに結合したFcフラグメントの両方をもたらす、そしてこれらはファージの表面上にホモダイマーとして組立てられるべきである。Fcフラグメントを有するファージ (「Fc-ファージ」) を増殖し、ポリエチレングリコール沈澱により濃縮し、そして以前に記載された (Marksら, 1991; Ward, 1977; Popovら, 1995) ように、sFcRnコートDynabeads/ Ni^{2+} -NTA-アガロース上でパンニングする。sFcRnを、以前に記載された (Popovら, 1996) ように、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞から精製する。パンニングとその後のファージ増殖の繰り返しは、より高い親和性のバインダーの富化をもたらすはずである。さらに、より高い親和性の変異体を選択するために、Winterおよび共同研究者 (Hawkinsら, 1992) により記載された手順と類似の手順を用いる; 第1に、抗原がファージよりも過剰であるが必要とされる解離定数の濃度 (7.8nM; Raghavanら, 1994) よりも低い濃度であるように、ファージを少量の可溶性ビオチン化sFcRn ($< 1 \mu\text{g}$) と混合する。次いで、sFcRnに結合したFc-ファージ粒子を用い、そして Ni^{2+} -NTA-アガロースを添加してsFcRnに結合したファージを分離する。第2に、より低いオフ速度を有するFcフラグメントを選択するために、Fc-ファージ粒子をビオチン化sFcRnに予めロードし、次いで以前に記載された (Hawkinsら, 1992) ように、ストレプトアビジンでコートしたビーズの添加の前に、可変の倍数で過剰な非標識抗原中に希釈する。あるいは、実施例4で用いられた選択方法を利用する。

全ての結合工程を、pH6で行い、そして結合したファージをpH7.4で溶出してから指数関数的に増殖したE. coli TG1細胞に感染させる。数回のパンニングの後、宿主株を非サプレッサー株E. coli HB2151 (Marksら, 1991) に切り替える。Fc変異体を、検出のために抗mycタグ抗体9E10に由来するビオチン化Fabフラグメントを用いて、sFcRnコートプレートを用いるELISAにおいて可溶性分泌Fcフラグメントとして分析する (完全な9E10抗体は、これがマウスIgG1抗体であり、そしてFcRnへの結合についてFcフラグメントと競合するので使用しないことに留意されたい)。このために、Fcフラグメントを、親和性精製タグとしてc-mycタグを用いて組換えE. coli細胞から精製する (Marksら, 1991; Popovら, 1995); あるいは、遺伝子を、 Ni^{2+} -NTA-アガロースを用いる精製のためのインフレイムなポリヒスチジンタグとともに、VpelBHis (Ward, 1992) のベクター誘導体中にNcoI-NotIフラグメントとして再クローン化する。His₆タグ化タンパク質の検出のために、Fcフラグメントをビオチン化してから使用する (Amershamビオチン化キット)。ELISAにおける全ての結合工程を、pH6で行う。

マウスFcフラグメントはFcRnへの結合に高い親和性を有すると期待される (ラットFcRn:Fc相互作用との類似性による) ので、FcRn:Fc相互作用について増加した親和性を有する変異体を選択するのは、特に1つのFcあたり2つの機能性結合部位が存在する (親和力が増大する) 場合は、困難であるかもしれない。従って、先のFcハイブリッドの研究 (Kimら, 1994c) に基づくアプローチをとる。Fcハイブリッドは、1つの変異体 (HQ-310/HN-433) と会合した1つのWT Fcポリペプチドのヘテロダイマーを含み、そしてHQ-310/HN-433変異体はFcRnに不十分にしか結合しない (Kimら, 1994b; Popovら, 1996b) ので、親和力の喪失により減少した結合親和性を有する。従って、ランダムに変異したWT FcフラグメントとHQ-310/HN-433との同時発現は、FcRnにモノマーとして強く結合する、より高い親和性の変異体の選択を容易にし得る。このような変異体は、続いてホモダイマーとして発現され得、そしてそれらの二価のフラグメントとしての親和性が決定され得る。

ランダムに変異したFcフラグメント (WT Fcに由来する) を、部位特異的変異誘発により停止コドンが除去されている改変版のpHEN1中 (ZollerおよびSmith, 1982) に連結する。従って、E. coliへの形質転換に続いて、全てのランダム変異体を、cpIII結合融合体とし

10

20

30

40

50

て発現する。E.coliをまた、HQ-310/HN-433 Fc遺伝子をpBGS19 (カナマイシン耐性を与えるpUC119の誘導体; Sprattら, 1986) 中に連結することにより以前に作製されたプラスミドを用いて同時形質転換する。二重トランスフェクタントを、アンピシリン+カナマイシンプレート上で (Kimら, 1994c; Riechmannら, 1988により記載されたように) 選択し、そしてファージを増殖し、ポリエチレングリコール沈澱により濃縮し、そしてsFcRnでコートしたDynalビーズ/ Ni^{2+} -NTA-アガロース上で、上記のより高い親和性の変異体についての選択のためのアプローチを用いてパンニングする。

より高い親和性の変異体を可溶性分泌タンパク質として発現するために、遺伝子をpHEN1中に再クローン化し、そしてE.coli HB2151を宿主として使用して発現させる。あるいは、遺伝子をV_{pel}BHis (Ward, 1992) 誘導体中にクローン化して上記のような Ni^{2+} -NTA-アガロースを用いる精製を可能にする。ELISAもまた上記のように行う。

10

より高い親和性の変異体の親和性測定

FcRnへのより高い親和性を有するFc変異体を、以前に記載された (Ward, 1992; Marksら, 1991; Popovら, 1995) ように、c-mycエピトープまたはポリヒスチジンペプチドを親和性精製タグとして用いて、組換えE.coli細胞から精製する。sFcRnへの結合についてのこれらのFcフラグメントの親和性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) およびBIAcore (Karlssonら, 1991) を用いて決定する。このアプローチは、抗体-抗原相互作用を分析するために用いられており (Ward, 1994; Borrebaeckら, 1992)、そしてBjorkmanおよび共同研究者は、SPRを用いてIgGとラットFcRnとの相互作用を特徴付けた (Raghavanら, 1994; Popovら, 1996b)。

20

平衡結合定数および速度解離定数 ($K_d = k_{off} / k_{on}$ 、ここで k_{off} および k_{on} はそれぞれオフ速度およびオン速度である) をともに決定する研究を行う。精製したsFcRnは、標準的なアミンカップリング手順を用いてCM5チップ (Pharmacia) に直接カップリングさせる。化学的カップリングのために、sFcRnを、10mM酢酸緩衝液 (pH5.5) 中で20 $\mu\text{g/ml}$ でカップリングさせる。最初に、両方の型のセンサーチップを用い、そして結合した正確に折り畳まれたsFcRnの相対量を、マウスIgG1またはWT Fcのいずれかを用いて決定する。Fcフラグメントを、脱塩カラムまたは透析のいずれかを用いてBIAcoreランニング緩衝液 (10mM HEPES、3.4mM EDTA、150mM EDTA、150mM NaCl、および0.05%P20、pH7.4) に移し、そして最初に0.05 ~ 0.5mg/mlの濃度範囲で使用する。これらのフラグメントをまた、凝集物を除去するために、使用の直前にサイズ排除 (HPLC) により精製する (これはアーチファクトを避けるために必須であるからである)。5 ~ 30 $\mu\text{l/分}$ の流速を用いる。

30

代替的なアッセイ形式として、Fcフラグメントを上記のCM5チップにカップリングし、そしてBIAcoreランニング緩衝液中のsFcRnを最初に0.05 ~ 0.5mg/mlの濃度範囲で用いる。最初の研究を、sFcRnと完全なIgG1/WT Fcとの間の相互作用を分析するために行い、次いでより高い親和性をおそらく有する変異体Fcフラグメントの分析に拡張する。

Fc変異体の母胎転移および腸管転移の薬物動態学

先の実施例において上述した方法を用いる。

より高い親和性変異のIgG2aへの取り込み

マウスイソタイプの内、IgG2aはADCCで最も効率的であり、そしてまた補体媒介性溶解を有効に行う (HerlynおよびKoprowski, 1982; Bindonら, 1988)。異化部位の残基Ile253、His310、His435、およびHis436はまた、IgG2a中にも存在し (表I)、そしてこれに一致して、IgG1およびIgG2aの半減期は同様である (Pollockら, 1990)。従って、このイソタイプの経細胞輸送および血清持続性を改善するために、IgG1の改善した経細胞輸送および血清持続性をもたらすことが見出された同じ変異を、Y-3Pハイブリドーマ (IgG2a; Janewayら, 1984) 由来の組換えFcフラグメントに取り込ませる。組換えFcフラグメントを、先の実施例で記載された方法と同じ方法を用いて精製および分析する。

40

完全なグリコシル化IgGに対する変異の影響の分析

IgG1イソタイプ

マウスIgG1抗体 (抗アルソン酸) の発現のための構築物を、pRL1 (Riechmannら, 1988) 中への連結のための適切な制限部位とともにPCRTMを用いて作製し、そしてミエローマNS0

50

細胞をトランスフェクトするために用いる。さらに、FcRnへのより高い親和性結合、増大した経細胞輸送、およびおそらく改善された血清持続性をもたらす、Fcフラグメントの変異を、部位特異的変異誘発 (ZollerおよびSmith, 1982) を用いてこの構築物のFc遺伝子に取り込ませる。全ての変異体を、発現分析の前に配列決定 (Sangerら, 1977) し、第2の部位の変異が存在しないことを確実にする。

安定なトランスフェクタントを、以前に記載された (Riechmannら, 1988) ようにNSO細胞のエレクトロポレーション、その後のミコフェノール酸を用いる選択により、またはより好ましくは実施例8に記載されたように昆虫細胞をトランスフェクトするためにバキュロウイルス系を用いることにより作製する。この後者の系は、それがより早いので好ましい。NSO細胞トランスフェクションのために、クローンを限界希釈により単離し、そして個々のクローンの発現レベルを、細胞を ^{35}S -メチオニンでパルス標識し、その後培養上清のSDS-PAGEにより決定する。PAGEゲルを乾燥し、そしてオートラジオグラフィーを行う。IgG1変異体を、アルソニン酸 (Ars) -Sephadexまたはプロテイン A -Sephadexを用いて精製する (しかし、FcRnへのより高い親和性結合をもたらす変異がプロテイン A 結合に有害な影響を有することが考えられ得、従ってArs-Sephadexの使用が好ましいかもしれない)。WTおよび変異体のIgG1抗体を放射標識し、そして記載された (Kimら, 1994a; Kimら, 1994c) ように、薬物動態学、母胎転移、および腸管転移の研究に用いる。

他のイソタイプ

IgG1以外のマウスイソタイプ (または変異体誘導体) をコードする遺伝子を用いて、上記の発現構築物中のIgG1定常領域を置換する。これらの構築物を用いて、NSO細胞をトランスフェクトし、そしてArs特異的抗体を、Ars-SephadexまたはSpA-Sephadexを用いて精製する。あるいは、完全なグリコシル化IgGを、マウスIgG2bについて実施例8に記載されたバキュロウイルス系において発現する。これらの抗体を、上記のように薬物動態学、母胎転移、および腸管転移の研究に用いる。

CH2-CH3ドメイン界面での変異ならびに補体結合およびADCCへの影響

変異体抗体がそれら自身の機能 (補体結合およびADCC) を有して治療に用いられる場合、これらがより高い親和性でFcRnに結合し、そして結果としてより効率的に経細胞輸送され、そしてより長い血清持続性を有するならば、これらはまたADCCおよび補体結合に関してそれらの元の特性を保持することを確実にすることが重要である。マウスIgG2aおよび2bは、補体結合およびADCCで最も有効であり (HerlynおよびKoprowski, 1982; Bindonら, 1988)、従ってこれらが活性を喪失していないことをチェックすることが特に重要である。対照的に、マウスIgG1は、これらの2つのエフェクター機能において相対的に不活性である (HerlynおよびKoprowski, 1982; Bindonら, 1988)。従って以下のアッセイを行う。

補体媒介性溶解

DuncanおよびWinter (1988) により記載された方法と同様の方法を用いる。ヒツジ赤血球 (RBC) をPBS中で洗浄し、そして 10^9 細胞/mlで再懸濁する。アルソネートを、以前に記載された方法 (HarlowおよびLane, 1988) を用いて-p-アゾベンゼンアルソネート-L-チロシン-t-Boc-N-スクシンイミドを添加することにより細胞にカップリングする。細胞を補体結合希釈物 (CFD) 中で3回洗浄し、そして 10^8 細胞/mlで再懸濁する。細胞を、 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (細胞1mlあたり0.2ml、比活性1~10mCi/ml) とともに37°Cで4時間インキュベートすることにより標識する。抗体 (野生型および変異体) の系列希釈を、96ウェルプレートの平底ウェルでCFD中に作製する。50 μl の1:10希釈のモルモット血清および100 μl 誘導体化標識細胞を各ウェルに添加する。結果を以下の式を用いて表す：

(観察された放出-自然放出)

$$^{51}\text{Cr} \text{ 比放出} = \frac{\text{観察された放出} - \text{自然放出}}{\text{取り込まれた総活性}} \times 100$$

取り込まれた総活性

本質的にSarmayおよび共同研究者(1992)の方法を用いる。マウスまたはニワトリのRBCを、上記のようにアルソネートを用いて誘導体化し、そして $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ を用いてパルス標識する。WTおよび変異体の抗体の系列希釈を96ウェルプレートのウェル(10^5 細胞/ウェルを含む)に添加し、そしてエフェクター細胞を0.5~5(エフェクター:標的)の範囲の比率で標的細胞に添加する。エフェクター細胞として、IFN- γ で活性化したマウス腹膜マクロファージまたはP388D1細胞(Nathanら,1983)を用いる。細胞を、 37°C で12時間インキュベートし、そして ^{51}Cr 比放出を上記のように決定する。

実施例11

この実施例は、FcRnに結合しない $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントよりもずっと長い血清持続性を有するFabフラグメントを記載する。これらのフラグメントは、ある範囲の親和性でFcRnに結合し、そしてより長い血清持続性を有する非Fcリガンドを示す。

10

長い血清持続性を有する $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントの単離

ニュージーランド白ウサギを、適切な抗FcRn力価が達成されるまで2週間間隔で、その後の注射のために不完全Freundアジュバント中に乳濁化した $100\mu\text{g}$ FcRnを用いて、可溶性組換えFcRn(Popovら,1996b)で皮下免疫した。次いで、ポリクロール血清を単離し、そしてIgGをプロテインA-Sepharose(Pharmacia,Piscataway,NJ)を用いて精製した。IgGをペプシンで消化して $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントおよびFcフラグメントを生成し、そして精製した $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントをFcおよび全ての未消化IgGからプロテインA-Sepharoseを用いて分離した。抗FcRn $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントを、FcRn-Sepharoseを用いて精製し、次いでMHCクラスI発現RMA細胞を用いて吸着し、交差反応性抗MHCクラスI $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントを取り出した。FcRn(「コントロール」 $\text{F}(\text{ab}')_2$)に結合しない $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントを、IgGの精製、その後のペプシンでの消化について同じ方法を用いてウサギの免疫前血清から得た。両方の $\text{F}(\text{ab}')_2$ 調製物を、以前に記載されたようにIodogenを用いて放射標識し、そしてSWISSマウス(1群あたり3~4マウス)におけるクリアランス研究において使用した。相半減期は、コントロール $\text{F}(\text{ab}')_2$ については 24.6 ± 3.6 時間であり、そして抗FcRn $\text{F}(\text{ab}')_2$ については 78.2 ± 4.8 であった。明らかに、抗FcRn $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメント(または最もありそうなのは、ポリクロール集団内の $\text{F}(\text{ab}')_2$ のサブセット)は、同じ系統におけるマウスIgG1またはFc-ヒンジの相半減期(約120時間)に近い長い血清持続性を有した。

20

* * *

30

本発明の組成物および方法を好ましい実施態様に関して記載してきたが、本明細書中に記載の組成物、方法、および方法の工程または順序に、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱せずに変更が適用され得ることが当業者には明らかである。より詳細には、化学的および生理学的の両方で関連する特定の因子が本明細書中に記載の因子について置換され得るが、同じまたは同様の結果が達成されることは明らかである。当業者に明らかなこのような同様の置換および改変の全ては、添付の請求の範囲により定義された本発明の精神、範囲、および概念内にあると判断される。請求した全ての主題は、過度の実験を伴わずに成され得る。

参考文献

以下に列挙した参考文献は、本明細書中で用いた方法、技術、および/または組成物についての背景を補充、説明、提供し、またはそれらを教示する程度に、本明細書中に参照として援用されている。

40

米国特許第3,791,932号

米国特許第3,949,064号

米国特許第4,174,384号

米国特許第4,554,101号

米国特許第4,578,770号

米国特許第4,596,792号

米国特許第4,599,230号

米国特許第4,599,231号

50

米国特許第4,601,903号

米国特許第4,603,102号

米国特許第4,608,251号

Adelman, Hayflick, Vasser, Seebury, *DNA*, 2/3:183-193, 1983.

Ahouse, Hagerman, Mittal, Gilbert, Copeland, Jenkins, Simister, "Mouse MHC Class I-like Fc receptor encoded outside the MHC," *J. Immunol.*, 151:6076-6088, 1993.

Ames, Prody, Kustu, "Simple, rapid and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform," *J. Bacteriol.*, 160:1181-1183, 1984.

Amit, Mariuzza, Phillips, Poljak, *Science*, 233:747-752, 1986.

- Arend and Webster, "Catabolism and biologic properties of two species of rat IgG2a fragments," *J. Immunol.*, 118:395-400, 1977.
- Batra, Kasturi, Gallo, Voorman, Maio, Chaudhury, Pastan, "Insertion of constant region domains of human IgG1 into CD4-PE40 increases its plasma half life," *Mol. Immunol.*, 30:379-386, 1993.
- Better, Chang, Robinson, Horwitz, *Science*, 240:1041-1043, 1988.
- Bhat, Bentley, Fischmann, Boulot, Poljak, *Nature*, 347:483-485, 1990.
- Bindon, Hale, Waldmann, "Importance of antigen specificity for complement-mediated lysis by monoclonal antibodies," *Eur. J. Immunol.*, 18:1507-1514, 1988. 10
- Blumberg, Koss, Story, Barisani, Polischuk, Lipin, Pablo, Green, Simister, "A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes," *J. Clin. Invest.*, 95:2379, 1995.
- Borrebaeck, Malmberg, Furebring, Michaelsson, Ward, Danielsson, Ohlin, "Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interaction: relation between structural domains and antigen binding," *Bio/technol.*, 10:697-698, 1992.
- Borst *et al.*, *Nature* 325:683-688, 1987. 20
- Brambell, "The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins," *Lancet*, ii:1087-1093, 1966.
- Brambell, Hemmings, Morris, "A theoretical model of gammaglobulin catabolism", *Nature*, 203:1352-1355:1964.
- Brenner *et al.*, *Nature* 322, 145-149, 1986.
- Brooks, Yuan, Uhr, Krammer, Vitetta, *Nature*, 302:825, 1983.
- Burmeister, Gastinel, Simister, Blum, Bjorkman, "Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor," *Nature*, 372:336-341, 1994a. 30
- Burmeister, Huber, Bjorkman, "Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc," *Nature*, 372:379-383, 1994b.
- Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.*, 173:1483, 1991.
- Carter, Bedouelle, Winter, *Nucleic Acids Res.*, 13:4431-4443, 1985.
- Chien, Gascoigne, Kavaler, Lee, Davis, "Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene," *Nature*, 309:322-326, 1984. 40
- Chothia, Boswell, Lesk, *EMBO J.*, 7:3745-3755:1986.

- Covell, Barbet, Holton, Black, Parker, Weinstein, "Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')₂ and Fab' in mice," *Cancer Res.*, 46:3969-3978, 1986.
- Deisenhofer, "Crystallographic refinement and atomic models of human Fc fragment and its complex from fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9 and 2.8 Å resolution," *Biochemistry*, 20:2361-2370, 1981.
- Deisenhofer, Colman, Epp, Huber, "Crystallographic studies of a human Fc fragment. II. A complete model based on a Fourier map at 3.5 Å resolution," *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357:1421-1434, 1976.
- Devaux, Bjorkman, Stevenson, Greif, Elliot, Sagerström, Clayberger, Krensky, Davis, *Eur. J. Immunol.*, 21:2111-2119, 1991. 10
- Dima, Medesan, Mota, Moraru, Sjöquist, Ghetie, "Effect of protein A and its fragment B on the catabolic and Fc receptor sites of IgG," *Eur. J. Immunol.*, 13:605-614, 1983.
- Dobre and Ghetie, "Binding of cytophilic rabbit IgG to homologous hepatocytes," *Experientia*, 35:763-764, 1979.
- Dorrington and Painter, "Functional domains of immunoglobulin G," *Prog. Immunol.*, 2:76, 1974.
- Duncan and Winter, "The binding site for C1q on IgG," *Nature*, 332:738-740, 1988. 20
- Duncan, Woof, Partridge, Burton, Winter, "Localization of the binding site for the human high affinity Fc receptor on IgG," *Nature*, 332:563-564, 1988.
- Edelman, Cunningham, Gall, Gottlieb, Rutishauser, Waxdal, "The covalent structure of an entire γG immunoglobulin molecule," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63:78-85:1969.
- Ellerson, Yasmeen, Painter, Dorrington, "Structure and function of immunoglobulin domains. III. Isolation and characterization of a fragment corresponding to the Cγ2 homology regions of human immunoglobulin G1," *J. Immunol.*, 116:510-517, 1976.
- Evan, Lewis, Ramsay, Bishop, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3610-3616, 1985. 30
- Ey, Prowse, Jenkin, "Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose," *Immunochemistry*, 15:429, 1978.
- Filpula and Whitlow, "Single chain Fvs and their fusion proteins", *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105, 1991.
- Fleury, Lamarre, Meloche, Ryu, Cantin, Hendrickson, Sekaly, *Cell*, 66:1037-1049, 1991.
- Fraker and Speck, "Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramine, 1,3,4,6,-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80:847-849, 1978. 40

- Fukumoto and Brandon, *In: Protein Transmission through living membranes*, Hemmings, W.A. (Ed.), Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, p. 399, 1979.
- Fung-Leung, Schilham, Rahemtulla, Kundig, Vollenweider, Potter, van Ewijk, Mak, *Cell*, 65:43, 1991.
- Gascoigne, *J. Biol. Chem.*, 265:9296-9301, 1990.
- Gastinel, Simister, Bjorkman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:638, 1992.
- Ghetie, Hubbard, Kim, Tsen, Lee, Ward, "Abnormally short serum half-lives of IgG in β 2-microglobulin deficient mice", *Eur. J. Immunol.*, 26:690-696, 1996. 10
- Ghetie, Onica, Lenkei, Margineau, "An immunological hypothesis for plasma protein catabolism," *Mech. Aging and Dev.*, 17:27-39, 1981.
- Gibson, "Studies on the Epstein-Barr virus genome," Ph.D. Thesis, University of Cambridge, U.K., 1984.
- Gittin and Koch, "On the mechanism of maternofetal transfer of human albumin and γ -globulin in the mouse," *J. Clin. Invest.*, 47:1204-1209, 1968.
- Goding, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, London, 1983. 20
- Gram, Marconi, Barbas, Collet, Lerner, Kang, "In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580, 1992.
- Gregoire, Rebai, Schweisguth, Necker, Mazza, Auphan, Millward, Schmitt-Verhulst, Malissen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8077-8081, 1991.
- Guyer, Koshland, Knopf, "Immunoglobulin binding by mouse intestinal epithelial cell receptors," *J. Immunol.*, 117:587-593, 1976.
- Harding and Unanue, *Nature*, 346:574-576, 1990. 30
- Harlow and Lane, *In: Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Hawkins, Russell, Winter, "Selection of phage antibodies by binding affinity; mimicking affinity maturation," *J. Mol. Biol.*, 226:889-896, 1992.
- Herlyn and Koprowski, "IgG2a monoclonal antibody inhibits tumor growth through interaction with effector cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4761-4765, 1982.
- Higuchi, "Using PCR™ to engineer DNA, in 'PCR™ Technology'," (ed. H.A. Erlich, Stockton Press), 61-70, 1989. 40

- Hobbs, Jackson, Hoadley, "Interaction of aglycosyl immunoglobulins with the IgG Fc transport receptor from neonatal rat gut: comparison of deglycosylation by tunicamycin treatment and genetic engineering," *Mol. Immunol.*, 29:949-956, 1992.
- Hobbs, Jackson, Peppard, "Binding of subclasses of rat immunoglobulin G to detergent-isolated Fc receptor from neonatal rat intestine," *J. Biol. Chem.*, 262:8041-8046, 1987.
- Hogg, Nancy, *Immunology Today*, 9(7 & 8):185-193, 1988.
- Honjo, Tasuku, Obata, Masanori, Yamawaki-Kataoka, Yuriko, Kataoka, Tohru, Kawakami, Toshiaki, Takahashi, Naoki, and Mano, Yoshitake, *Cell*, 18:559-568, 1979. 10
- Hoogenboom and Winter, "By-passing immunisation: human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*," *J. Mol. Biol.*, 227:381-388, 1992.
- Hoogenboom, Griffiths, Johnson, Chiswell, Hudson, Winter, "Multisubunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains", *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137, 1991.
- Hopf, Meyer, zum Büschenfelde, Dierich, "Demonstration of binding sites for IgG, Fc and the third complement component (C3) on isolated hepatocytes," *J. Immunol.*, 117:639, 1976. 20
- Horton, Hunt, Ho, Pullen, Pease, "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension," *Gene*, 77:61-68, 1989.
- Howell, Winters, Olee, Powell, Carlo, Brostoff, *Science*, 246:668-670, 1989.
- Huber, Kelley, Gastinel, Bjorkman, "Crystallization and stoichiometry of a complex between a rat intestinal Fc receptor and Fc," *J. Mol. Biol.*, 230:1077-1083, 1993.
- Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281, 1989.
- Huston, Levinson, Mudgett-Hunter, Tai, Novotny, Margolies, Ridge, Brucoleri, Haber, Crea, Opperman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988. 30
- Ishioka *et al.*, *J. Immunol.*, 152:4310-4319, 1994.
- Israel, Patel, Taylor, Marshak-Rothstein, Simister, "Requirement for a β_2 -microglobulin associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice," *J. Immunol.*, 154:6246, 1995.
- Israel, Wilsker, Hayes, Schoenfeld, Simister, "Increased clearance of IgG in mice that lack β_2 -microglobulin: possible protective role for FcRn", *Immunol.*, 89:573-578, 1996.
- Janeway, Conrad, Lerner, Babich, Wettstein, Murphy, "Monoclonal antibodies specific for Ia glycoproteins raised by immunization with activated T cells; possible role of T cell bound antigens as targets of immunoregulatory T cells," *J. Immunol.*, 132:662-667, 1984. 40

- Jefferis, Lund, Pound, "Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors (huFcγR)," *Mol. Immunol.*, 27:1237-1240, 1990.
- Johnson, *Proteins*, 7:205-214, 1990.
- Jones and Waldmann, "The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport in the neonatal rat," *J. Clin. Invest.*, 51:2916-2927, 1972.
- Jönsson *et al.*, *BioTechniques*, 11:620-627, 1991.
- Junghans and Anderson, "The protection receptor for IgG catabolism is the β2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5512-5516, 1996. 10
- Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, *In: Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, 1991.
- Kandil, Noguchi, Ishibashi, Kasahara, *J. Immunol.*, 154:5907, 1995.
- Kappler, Staerz, White, Marrack, *Nature*, 332:35-40, 1988.
- Karlsson, Michaelsson, Mattsson, "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system," *J. Immunol. Methods*, 145:229-240, 1991. 20
- Kim, Tsen, Ghetie, Ward, "Catabolism of the murine IgG molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG1 in the circulation of mice," *Scand. J. Immunol.*, 40:457, 465, 1994c.
- Kim, Tsen, Ghetie, Ward, "Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis," *Eur. J. Immunol.*, 24:542-548, 1994a.
- Kim, Tsen, Ghetie, Ward, "Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor," *Eur. J. Immunol.*, 24:2429-2434, 1994b. 30
- Kim, Tsen, Ghetie, Ward, "Evidence that the hinge region plays a role in maintaining serum levels of the murine IgG1 molecule", *Mol. Immunol.* 32:467-475, 1995.
- Koller, Marrack, Kappler, Smithies, *Science*, 248:1227, 1990.
- Kristoffersen and Matre, "Co-localisation of the neonatal Fcγ receptor and IgG in human placental term syncytiotrophoblast," *Eur. J. Immunol.*, 26:1668, 1996.
- Kunkel, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488, 1985. 40
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.

- Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, 227:680-685, 1970.
- Laemmli, *Nature*, 227:680-685, 1970.
- Leach, Eaton, Firth, Contractor, *Cell Tissue Res.*, 261:383, 1990.
- Leach, Sedmark, Osborne, Rahill, Lairmore, Anderson, "Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast," *J. Immunol.*, 157:3317, 1996.
- Leatherbarrow, Rademacher, Dwek, *Molecular Immunology*, 22(4):407-415, 1985. 10
- Lin, Devaux, Green, Sagerström, Elliott, Davis, *Science*, 249:677-679, 1990.
- Lund, Pound, Jones, Duncan, Bentley, Goodall, Levine, Jefferis, Winter, "Multiple binding sites on the CH2 domain of IgG for mouse FcγRII," *Mol. Immunol.*, 29:53-59, 1992.
- Lund, Winter, Jones, Pound, Tanaka, Walker, Artymiuk, Arata, Burton, Jefferis, Woof, *J. Immunol.*, 147:2657-2662, 1991.
- Mariani and Strober, "Immunoglobulin metabolism," In: *Fc Receptors and the Action of Antibodies*, H. Metzger, Ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 94, 1991. 20
- Mariani and Strober, In: *Fc receptors and the action of antibodies*, Metzger, H. (Ed.), ASM, Washington D.C., p. 94, 1990.
- Mariuzza and Winter, *J. Biol. Chem.*, 264:7310-7316, 1989.
- Marks, Griffiths, Malmqvist, Clackson, Bye, Winter, "By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling," *Bio/technol.*, 10:779-783, 1992.
- Marks, Hoogenboom, Bonnert, McCafferty, Griffiths, Winter, "By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage," *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991. 30
- Marquart, Deisenhofer, Huber, *J. Mol. Biol.*, 141:369-391, 1980.
- McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552, 1990.
- McNabb, Koh, Dorrington, Painter, "Structure and function of immunoglobulin domains. V. Binding of immunoglobulin G and fragments to placental membrane preparations," *J. Immunol.*, 117:882, 1976.
- Medesan, Matesoi, Radu, Ghetie, Ward, "Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1", *J. Immunol.*, 158:2211-2217, 1997. 40
- Medesan, Radu, Kim, Ghetie, Ward, "Localization of the site of the IgG molecule that regulates maternofetal transmission in mice," *Eur. J. Immunol.*, 26:2533, 1996.

- Mellbye and Natvig, "Presence and origin of human IgG subclass proteins in newborns," *Vox Sang.*, 24:206, 1973.
- Messing *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:309, 1981.
- Morris, "The receptor hypothesis of protein ingestion," *In: Antigen Absorption by the Gut*, University Park Press, Baltimore, USA (ed. W.A. Hemmings), pp. 3-22, 1978.
- Mostov and Dietcher, *Cell*, 46:613-621, 1986.
- Mozes, Kohn, Hakim, Singer, *Science*, 261:91, 1993. 10
- Mueller, Reisfeld, Gillies, "Serum half life and tumor localization of a chimeric antibody deleted of the CH2 domain and directed against the disialoganglioside GD2," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:5702-5705, 1990.
- Narang, Brousseau, Hsuing, Michniewicz, *Methods in Enzymology*, 65:610, 1980.
- Nathan, Murray, Wiebe, Rubin, "Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity," *J. Exp. Med.*, 158:670-689, 1983.
- Nose and Wigzell, "Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6632-6636, 1983. 20
- Nose, Takano, Tyo, Nakamura, Satoshi, Arata, Yoji, Kyogoku, Masahisa, *International Immunology*, 2(11):1109-1112, 1990.
- Novotny, Gahjn, Smiley, Hussey, Luther, Recry, Siciliaro, Reinher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8646-8650, 1991.
- Novotny, Tonegawa, Saito, Kranz, Eisen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:742-746, 1986.
- O'Connell and Edidin, "A mouse lymphoid cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells," *J. Immunol.*, 144:521-525, 1990. 30
- O'Reilly, Miller, Luckow, "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual," W.H. Freeman and Co., New York, 1992.
- Offner, Hashim, Vandenbark, *Science*, 251:430-432, 1991.
- Perrier and Mayerson, "Noncompartmental determination of the steady state volume of distribution for any mode of administration," *J. Pharm. Sci.*, 71:372-373, 1986.
- Pollock, French, Metlay, Birshstein, Scharff, "Intravascular metabolism of normal and mutant mouse immunoglobulin molecules," *Eur. J. Immunol.*, 20:2021-2027, 1990. 40

- Popov, Hubbard, Kim, Ober, Ghetie, Ward, "The stoichiometry and affinity of interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn", *Mol. Immunol.*, 33:521-530, 1996b.
- Popov, Hubbard, Ward, "A novel and efficient method for the isolation of antibodies that recognise T cell receptor V α s", *Mol. Immunol.* 33:493-502, 1996a.
- Quistorff, Dich, Grunnert, *In: Animal Cell Culture*, Pollard, J.W. and Walker, J.M. (Eds.), Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 151-160, 1993.
- Raghavan, Bonagura, Morrison, Bjorkman, "Analysis of the pH dependence of the neonatal receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants", *Biochemistry*, 34:14649-14657, 1995. 10
- Raghavan, Chen, Gastinel, Bjorkman, "Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand," *Immunity*, 1:303-315, 1994.
- Raghavan, Gastinel, Bjorkman, "The class I major histocompatibility complex related Fc receptor shows pH-dependent stability differences correlating with immunoglobulin binding and release," *Biochem.*, 32:8654-8660, 1993.
- Riechmann, Foote, Winter, "Expression of an antibody Fv fragment in myeloma cells," *J. Mol. Biol.*, 203:825-828, 1988. 20
- Rink, *Tet. Lett.* 28:3787-3790. 1987.
- Roberts, Guenther, Rodewald, "Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat," *J. Cell Biol.*, 111:1867-1876, 1990.
- Rodewald and Kraehenbuhl, "Receptor-mediated transport of IgG," *J. Cell Biol.*, 99:154s-164s, 1984.
- Rodewald, "pH dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat," *J. Cell. Biol.*, 71:666-670, 1976. 30
- Rodewald, *J. Cell. Biol.*, 58:189, 1973.
- Rodewald, Lewis, Kraehenbuhl, "Immunoglobulin G receptors of intestinal brush borders of neonatal rats," *Ciba Foundation Symp.*, 95:287-296, 1983.
- Rüther, Koenen, Otto, Müller-Hill, *Nucl. Acids Res.*, 9:4087-4098, 1981.
- Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf, Higuchi, Horn, Mullis, Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase," *Science*, 239:487-491, 1988.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis, "Molecular Cloning; a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, 1989. 40

- Sanger, Nicklen, Coulson, "DNA sequencing with chain terminating inhibitors," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467, 1977.
- Sarmay, Lund, Rozsnyay, Gergely, Jefferis, "Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADC) through different types of human Fc receptor", *Mol. Immunol.*, 29:633-639, 1992.
- Scheuermann and Bauer, *Meths. Enzymol.*, 218:446, 1993.
- Schumaker, "PKCALC: a basic interactive complex program for statistical and pharmacokinetic analysis of data," *Drug. Metab. Rev.*, 17:331-348, 1986. 10
- Simister and Mostov, "An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens," *Eur. J. Immunol.*, 15:733-738, 1985.
- Simister and Mostov, "Cloning and expression of the neonatal rat intestinal Fc receptor, a major histocompatibility complex class I antigen homolog," *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, LIV, 571-580, 1989b.
- Simister and Mostov, *Nature*, 337:184, 1989a.
- Simister and Rees, "Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine," *Eur. J. Immunol.*, 15:733-738, 1985. 20
- Simister, Story, Chen, Hunt, "An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta," *Eur. J. Immunol.*, 26:1527, 1996.
- Skerra and Plückthun, *Science*, 240, 1038-1041, 1988.
- Sleckman, Peterson, Jones, Foran, Greenstein, Seed, Burakoff, *Nature*, 328:351-353, 1987.
- Solomon, In: *Foetal and Neonatal Immunity*, North Holland Publishing Company, Amsterdam/London, and American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, pp. 96-114, 1971. 30
- Spiegelberg and Weigel, "Studies on the catabolism of γ G subunits and chains," *J. Immunol.*, 95:1034-1040, 1966.
- Spiegelberg and Weigle, *J. Exp. Med.*, 121:323-328, 1965.
- Spratt, Hedge, te Heesen, Edelman, Broome-Smith, "Kanamycin resistant vectors that are analogous to plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9," *Gene*, 41:337-342, 1986.
- Spriggs, Joller, Sato, Morrissey, Fanslow, Smithies, Voice, Widmer, Maliszewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6070, 1992. 40
- Story, Mikulska, Simister, "A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus," *J. Exp. Med.*, 180:2377-2381, 1994.

- Strober, Wochner, Barlow, McFarlin, Waldmann, *J. Clin. Invest.*, 47:1905, 1968.
- Takagi, Morinaga, Tsuchiya, Ikemura, Inouye, *Biotechnol.*, 6:948-950, 1988.
- Tao and Morrison, "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, 1989.
- Towbin, Stachelin, Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:4350-4354, 1979.
- Vandenbark, Hashim, Offner, *Nature*, 331:541-544, 1989. 10
- Vieira and Rajewsky, *Eur. J. Immunol.*, 18:313, 1988.
- Viera and Messing, *In: Methods in Enzymology*, (Eds. R. Wu and L. Grossman, Academic Press, New York), 153:3-11, 1987.
- Waldmann and Strober, "Metabolism of Immunoglobulins," *Progr. Allergy*, 13:1-110, 1969.
- Wallace and Rees, "Studies on the immunoglobulin-G Fc-fragment receptor from neonatal rat small intestine," *Biochem. J.*, 188:9-16, 1980.
- Ward and Ghetie, "The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy," *Ther. Immunol.*, 2:77, 1995. 20
- Ward, "Secretion of soluble T cell receptor fragments from recombinant *Escherichia coli* cells," *J. Mol. Biol.*, 224:885-890, 1992.
- Ward, "VH shuffling can be used to convert an Fv fragment of anti-hen egg lysozyme specificity to one that recognises a T cell receptor V α ," *Mol. Immunol.*, 32:147-156, 1995.
- Ward, Güssow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*," *Nature*, 341:544-546, 1989. 30
- Ward, *Mol. Immunol.*, 32:147-156, 1995.
- Wawrzynczak, Cumber, Parnell, Cumber, Jones, Winter, "Recombinant mouse monoclonal antibodies with single amino acid substitutions affinity C1q and high affinity Fc receptor binding have identical serum half lives in the BALB/c mouse," *Mol. Immunol.*, 29:213-220, 1992.
- Weitzman, Palmer, Grennon, "Serum decay and placental transport of mutant mouse myeloma immunoglobulin with defective polypeptide and oligosaccharide," *J. Immunol.*, 122:12-18, 1979.
- Whitlow and Filpula, *In: Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2(2):97-105, 1991. 40

Wild, "Transport of immunoglobulin and other proteins from mother to young," *In: Lysosomes in Biology and Pathology*, Part 3, J.T. Dingle, Ed., North Holland, Amsterdam, p. 179, 1973.

Wraith, Smilek, Mitchell, Steinman, McDevitt, *Cell*, 59:247-255, 1989.

Yasmeen, Ellerson, Dorrington, Painter, "The structure and function of immunoglobulin domains. IV. The distribution of some effector functions among the C γ 2 and C γ 3 homology regions of human immunoglobulin G1," *J. Immunol.*, 116:518-526, 1976.

Zijlstra, Bix, Simister, Loring, Raulet, Jaenisch, " β_2 -Microglobulin deficient mice lack CD4 $^+$ cytolytic T cells," *Nature*, 344:742, 1990.

10

Zoller and Smith, "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA," *Nucl. Acids Res.*, 10:6487-6500, 1982.

Zuckier, Rodriguez, Scharff, "Immunologic and pharmacologic concepts of monoclonal antibodies," *Semin. Nucl. Med.*, 29:166-186, 1990.

Zuckier, Rodriguez, Scharff, *Sem. Nucl. Med.*, 19:166, 1989.

配列表

20

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：

(A) 名称：ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム

(B) 番地：ウエスト 7 ティーエイチ ストリート 201

(C) 市：オースティン

(D) 州：テキサス

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：78701

(G) 電話：(512) 418-3000

30

(H) テレファックス：(713) 789-2679

(ii) 発明の名称：増大した半減期を有する免疫グロブリン様ドメイン

(iii) 配列数：25

(iv) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.30 (EPO)

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特徴：

40

(A) 長さ：33塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号1：

ATCACCATGG CCGGCAGACC GAAGGCTCCA CAG

33

(2) 配列番号2の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：34塩基対

50

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号2：

TACAGGTGAC CTTACCAGGA GAGTGGGAGA GGCT

34

(2)配列番号3の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：32塩基対

(B)型：核酸

10

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号3：

ATCACCATGG CCGTGCCCAG GGATTGTGGT TG

32

(2)配列番号4の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：31塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

20

(xi)配列：配列番号4：

ATCAGGTGAC* CTTGGTTTTG GAGATGGTTT T

31

(2)配列番号5の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号5：

ATCACCATGG CCGAAGTATC ATCTGTCTTC ATC

33

30

(2)配列番号6の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：17塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号6：

TCTGGCTCCT CCGTGCT

17

(2)配列番号7の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：35塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号7：

ATCATCTAGA TTTTTTGTG GGGGCCAAAT TTATG

35

(2)配列番号8の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：39塩基対

(B)型：核酸

50

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号8：

ATCACCATGG CCGGTAGGAT GCGCAGCGGT CTGCCAGCC

39

(2)配列番号9の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：34塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

10

(xi)配列：配列番号9：

ATCAGTCGAC CTTGGAAGTG GGTGGAAGG CATT

34

(2)配列番号10の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：38塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：modified_base

20

(B)存在位置：21..34

(D)他の情報：/注記 = 「 N = A , G , C または T 」

(ix)配列の特徴

(A)特徴を表す記号：modified_base

(B)存在位置：20

(D)他の情報：/注記 = 「 S = G または C 」

(xi)配列：配列番号10：

CAACACACGT GACCTTAGCS NNCAGSNNA TSNNAGC

38

(2)配列番号11の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：13塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

30

(xi)配列：配列番号11：

GTCACGTGTG TTG

13

(2)配列番号12の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：19塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

(xi)配列：配列番号12：

GCTCCTCCCG GGGTTGCGT

19

(2)配列番号13の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：23塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

50

(ix)配列の特徴

(A)特徴を表す記号：modified_base

(B)存在位置：22..23

(D)他の情報：/注記 = 「 N = A , G , C または T 」

(xi)配列：配列番号13：

CAGGAAGCTG ACCCCTGTGG GNN

23

(2)配列番号14の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：23塩基対

(B)型：核酸

10

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴

(A)特徴を表す記号：modified_base

(B)存在位置：22..23

(D)他の情報：/注記 = 「 N = A , G , C または T 」

(xi)配列：配列番号14：

TTCCGTCTCA GGCCACTCCC CNN

23

(2)配列番号15の情報：

(i)配列の特徴：

20

(A)長さ：24塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号15：

TCAGGAAGTG GCTGGAAAGG CATT

24

(2)配列番号16の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：21塩基対

(B)型：核酸

30

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号16：

ATGGGGATGC CACTGCCCTG G.

21

(2)配列番号17の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：19塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

(xi)配列：配列番号17：

GGTGGTTGGC CAGGCCCCCT

19

(2)配列番号18の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：18塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号18：

CAGTATGGGC GTTGTGCA

18

50

(2) 配列番号19の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号19：

CTCAGTAGCG* TGGTTGTG

18

(2) 配列番号20の情報：

10

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号20：

CCCATCATGG CCCAGGACTG G

21

(2) 配列番号21の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

20

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号21：

CCAGTCCTGG GCCATGATGG G

21

(2) 配列番号22の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

30

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号22：

GGCCTGCACG CGCACCATAC T

21

(2) 配列番号23の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：24塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

40

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号23：

AGTATGGTGC GCGTGCAGGC CCTC

24

(2) 配列番号24の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号24：

50

AGTATGGTGT TGGTGCAG

18

(2) 配列番号25の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号25：

CTGCACCAAC ACCATACT

18

【図1】

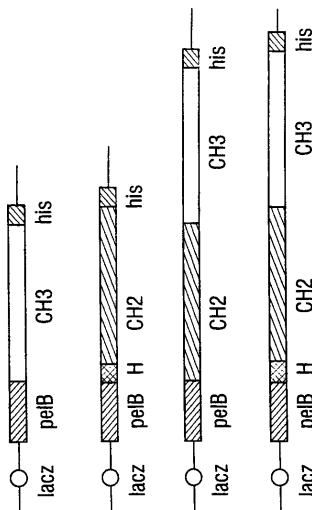


FIG. 1

【図2A】

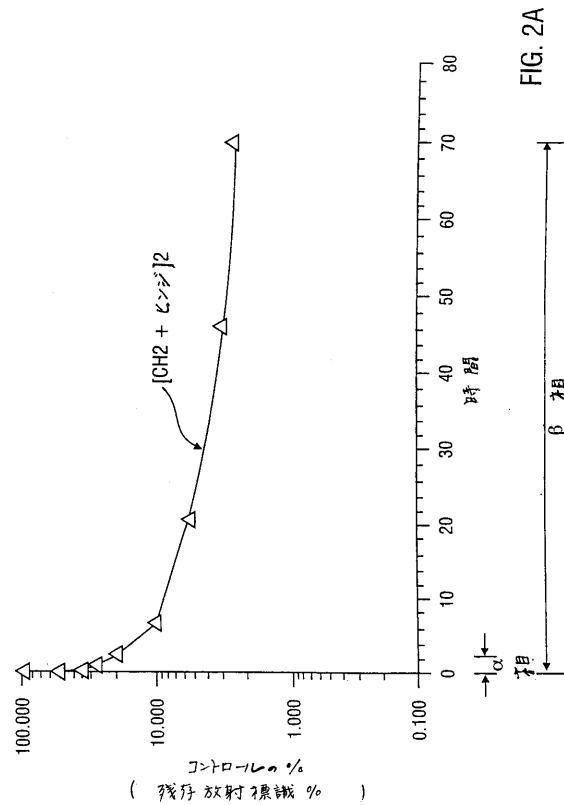
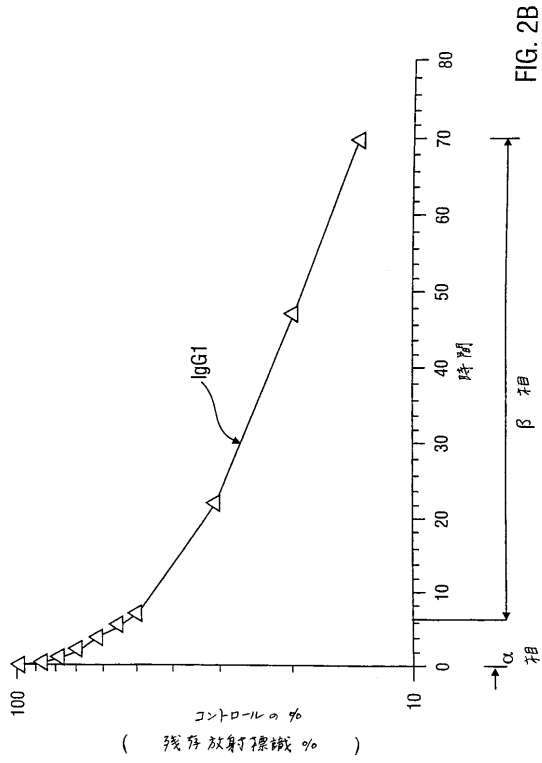


FIG. 2A

【図 2 B】



【図 3 A】

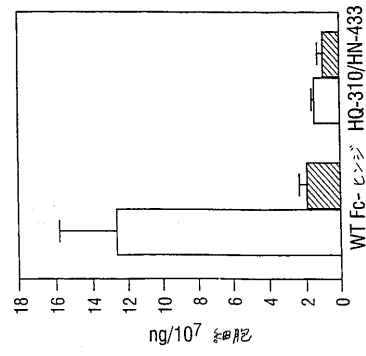


FIG. 3A

【図 3 B】

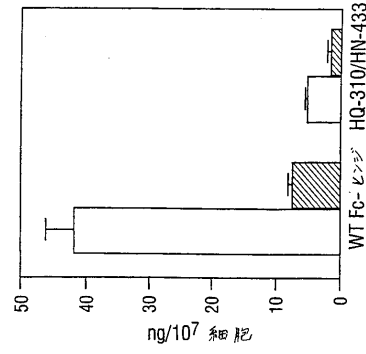


FIG. 3B

【図 4 A】

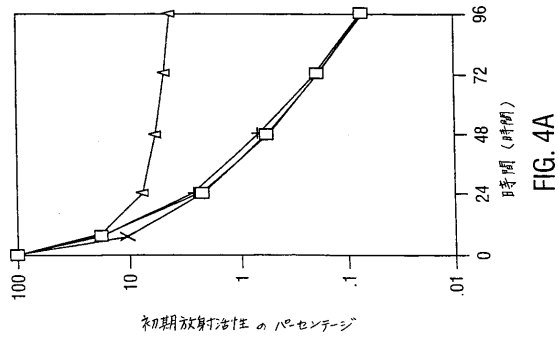


FIG. 4A

【図 4 B】

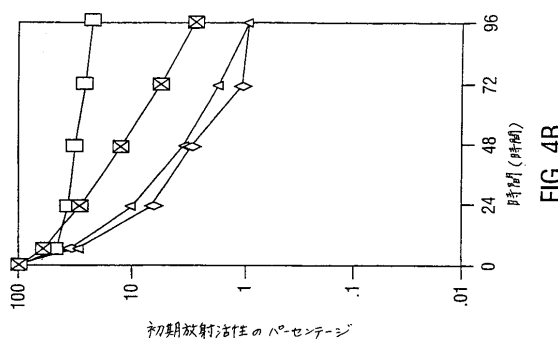


FIG. 4B

【図 5】

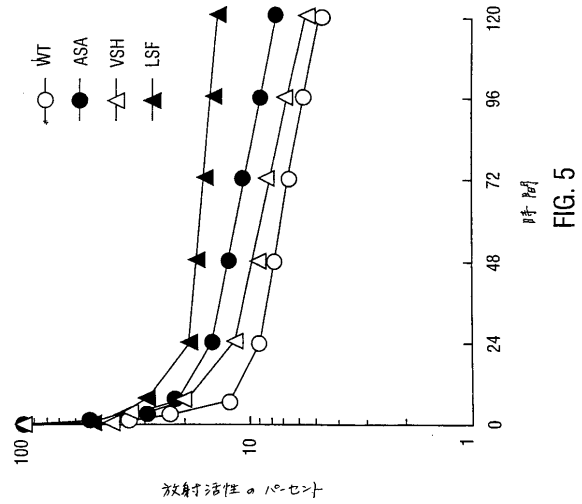


FIG. 5

【図 6 A】

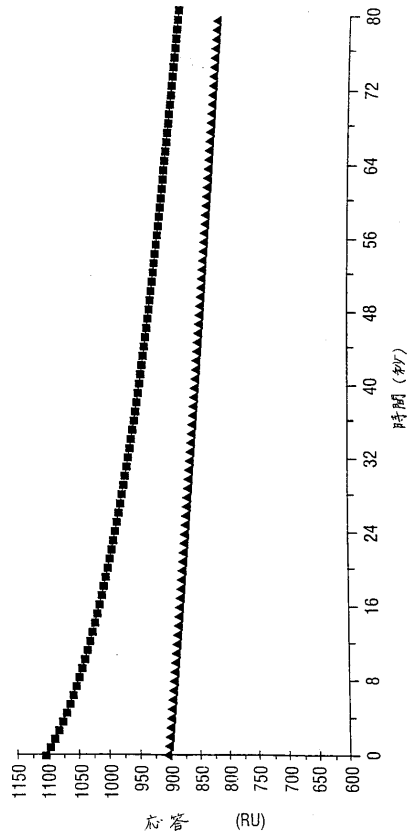


FIG. 6A

【図 6 B】

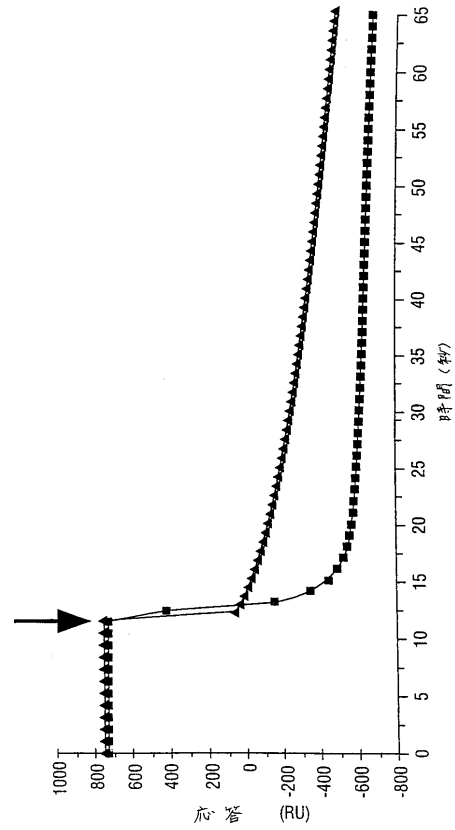


FIG. 6B

【図 7】

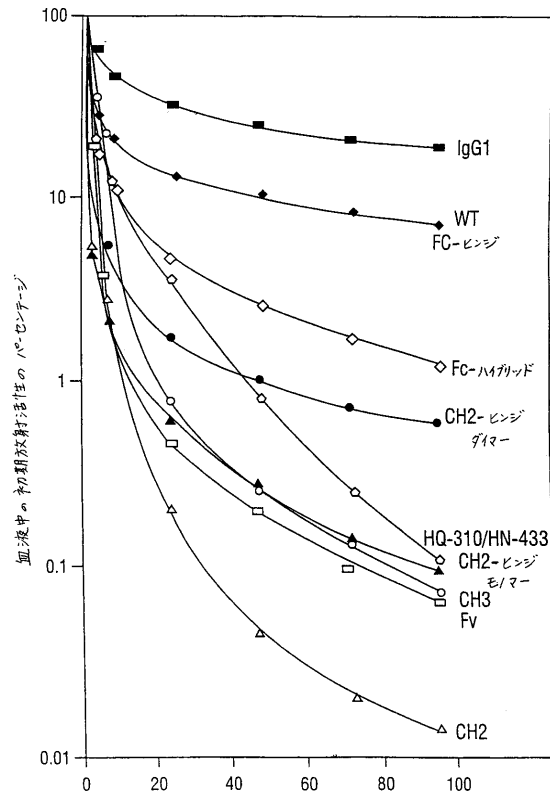


FIG. 7

【図 8】

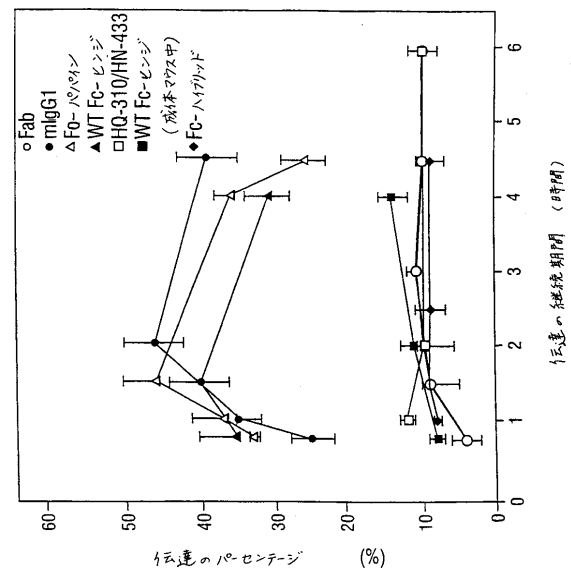
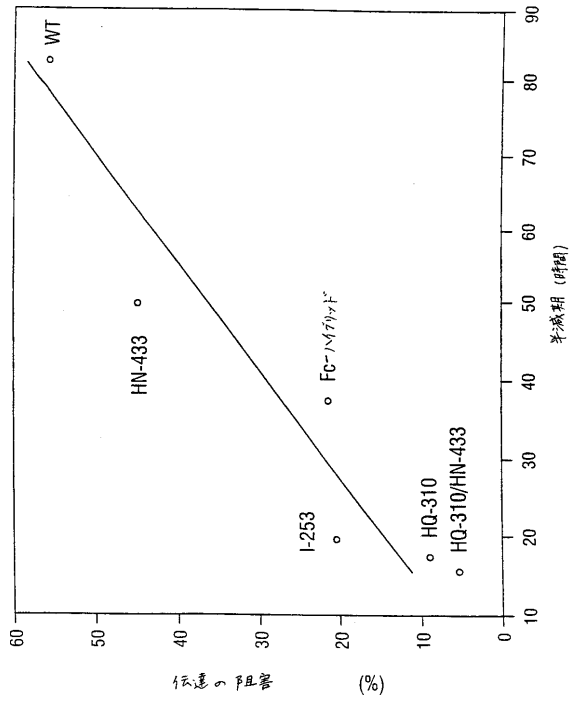


FIG. 8

【図 9】



【図 10】

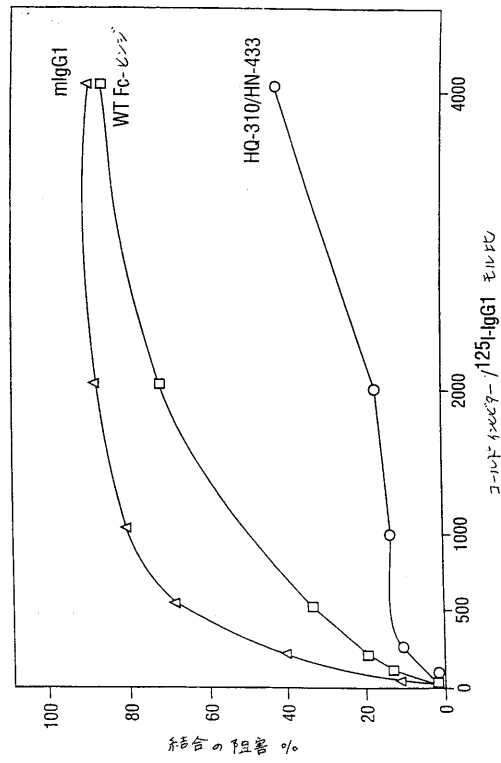


FIG. 10

【図 11】

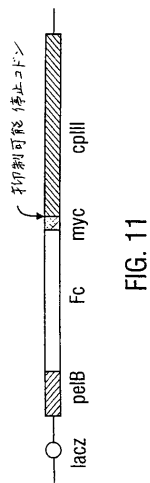


FIG. 11

【図 12 A】

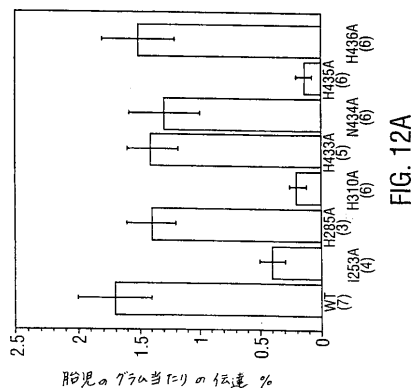


FIG. 12A

【図 12 B】

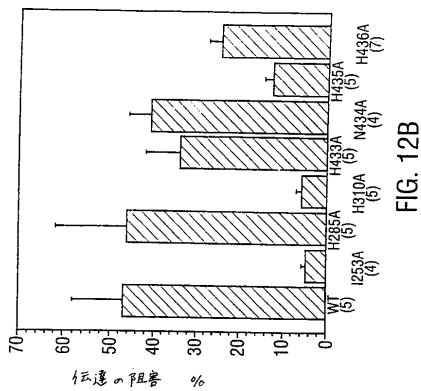


FIG. 12B

【図 13 A】

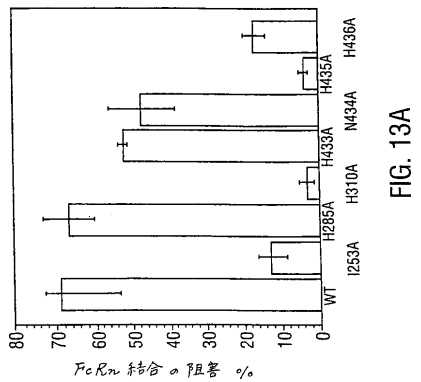


FIG. 13A

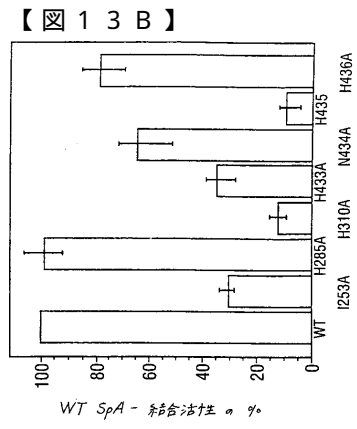


FIG. 13B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/08

審査官 西 剛志

(56)参考文献 国際公開第 9 4 / 0 0 4 6 8 9 (W O , A 1)

欧州特許出願公開第 0 0 3 2 7 3 7 8 (E P , A 1)

国際公開第 9 6 / 0 3 2 4 7 8 (W O , A 1)

特開平 0 6 - 2 0 5 6 9 4 (J P , A)

Ghetie, V., et al., Eur. J. Immunol., 1 9 9 6 年, Vol.26(3), p.690-6

Wawrzynczak, E.J., et al., Mol. Immunol., 1 9 9 2 年, Vol.29(2), p.213-220

Batra, J.K., et al., Mol. Immunol., 1 9 9 3 年, Vol.30(4), p.379-86

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed