

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-121657  
(P2018-121657A)

(43) 公開日 平成30年8月9日(2018.8.9)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-85040 (P2018-85040)  
 (22) 出願日 平成30年4月26日 (2018.4.26)  
 (62) 分割の表示 特願2017-37848 (P2017-37848) の分割  
 原出願日 平成24年6月1日 (2012.6.1)  
 (31) 優先権主張番号 61/492, 617  
 (32) 優先日 平成23年6月2日 (2011.6.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/498, 266  
 (32) 優先日 平成23年6月17日 (2011.6.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513168518  
 ダイアックス コーポレーション  
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O  
 2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シャイ  
 アー ウェイ  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

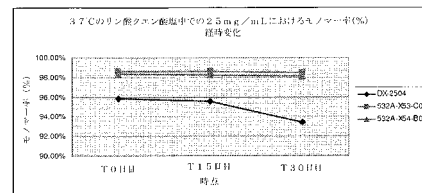
(54) 【発明の名称】 Fcレセプター結合タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 Fcレセプター (FcRn) と結合する抗体と、それらの抗体を用いる方法の提供。

【解決手段】 VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む特定のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (VL) を含み、少なくとも1つのCDR3領域の最初の位置にシステインを有さないヒトFcRnと結合する単離抗体。抗体を被検者に投与し自己免疫障害を治療する方法、及び抗体を被検者に投与し、抗体とFcRnとの相互作用を検出し、被験者体内のFcRnを検出する方法。

【選択図】 図3



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトFcRnと結合する単離抗体であって、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2、およびV<sub>L</sub> CDR3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含み、  
V<sub>L</sub> CDR3が、SSYAGSGIYV(配列番号12)またはASYAGSGIYV(配列番号13)の配列と少なくとも85%の同一性を有し、  
少なくとも1つのCDR3領域の最初の位置にシステインを有さない単離抗体。

## 【請求項 2】

前記単離抗体のV<sub>L</sub> CDR1がTGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)と、  
V<sub>L</sub> CDR2がGDSQRPS(配列番号15)と、少なくとも85%の同一性を有する、請求項1に記載の単離抗体。

10

## 【請求項 3】

V<sub>L</sub> CDR1が、TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)と少なくとも90%の同一性を有し、  
V<sub>L</sub> CDR2が、GDSQRPS(配列番号15)と少なくとも90%の同一性を有し、および/または  
V<sub>L</sub> CDR3が、SSYAGSGIYV(配列番号12)もしくはASYAGSGIYV(配列番号13)と少なくとも90%の同一性を有する、  
請求項1または請求項2に記載の単離抗体。

## 【請求項 4】

(a) V<sub>L</sub> CDR1がTGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)であり、  
(b) V<sub>L</sub> CDR2がGDSQRPS(配列番号15)であり、および/または  
(c) V<sub>L</sub> CDR3がSSYAGSGIYV(配列番号12)もしくはASYAGSGIYV(配列番号13)である、  
請求項1～3のいずれかに記載の単離抗体。

20

## 【請求項 5】

前記V<sub>L</sub> CDR1がTGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)であり、  
前記V<sub>L</sub> CDR2がGDSQRPS(配列番号15)であり、および  
前記V<sub>L</sub> CDR3がSSYAGSGIYV(配列番号12)もしくはASYAGSGIYV(配列番号13)である、  
請求項4に記載の単離抗体。

30

## 【請求項 6】

前記単離抗体のV<sub>L</sub>が、配列番号10または配列番号11と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれかに記載の単離抗体。

## 【請求項 7】

前記単離抗体のV<sub>L</sub>が、配列番号10または配列番号11のアミノ酸配列を含む、請求項6に記載の単離抗体。

## 【請求項 8】

ヒトFcRnと結合する単離抗体であって、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2、およびV<sub>L</sub> CDR3領域を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含み、  
V<sub>L</sub> CDR3領域が、SSYAGSGIYV(配列番号12)またはASYAGSGIYV(配列番号13)の配列と比べて、最大3個のアミノ酸置換を有し、  
少なくとも1つのCDR3領域の最初の位置にシステインを有さない単離抗体。

40

## 【請求項 9】

V<sub>L</sub> CDR 1、V<sub>L</sub> CDR 2、およびV<sub>L</sub> CDR 3が、  
(a) CDR1 : TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)  
(b) CDR2 : GDSQRPS(配列番号15)  
(c) CDR3 : SSYAGSGIYV(配列番号12)またはASYAGSGIYV(配列番号13)  
の配列と比べて、合わせて最大10個のアミノ酸置換を有する、請求項8に記載の単離

50

抗体。

【請求項 10】

$V_H$  CDR 1、 $V_H$  CDR 2、および $V_H$  CDR 3を含む重鎖可変領域( $V_H$ )をさらに含み、 $V_H$  CDR 3が、LAIGDSY(配列番号24)と少なくとも85%の同一性を有する、請求項1~9のいずれかに記載の単離抗体。

【請求項 11】

前記単離抗体の $V_H$  CDR 1がEYAMG(配列番号22)と、 $V_H$  CDR 2がSIGSSGGQTKYADSVKG(配列番号23)と、少なくとも85%の同一性を有する、請求項10に記載の単離抗体。

【請求項 12】

(a)  $V_H$  CDR 1が、EYAMG(配列番号22)と少なくとも90%の同一性を有し、

(b)  $V_H$  CDR 2が、SIGSSGGQTKYADSVKG(配列番号23)と少なくとも90%の同一性を有し、および/または

(c)  $V_H$  CDR 3が、LAIGDSY(配列番号24)と少なくとも90%の同一性を有する、

請求項10に記載の単離抗体。

【請求項 13】

(a)  $V_H$  CDR 1がEYAMG(配列番号22)であり、

(b)  $V_H$  CDR 2がSIGSSGGQTKYADSVKG(配列番号23)であり、および/または

(c)  $V_H$  CDR 3がLAIGDSY(配列番号24)である、

請求項12に記載の単離抗体。

【請求項 14】

前記単離抗体の $V_H$ が、配列番号9と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の単離抗体。

【請求項 15】

前記単離抗体の $V_H$ が配列番号9のアミノ酸配列を含む、請求項14に記載の単離抗体。

【請求項 16】

重鎖可変領域( $V_H$ )および重鎖定常領域を含む重鎖を含む単離抗体であって、 $V_H$ が、LAIGDSY(配列番号24)と少なくとも85%の同一性を有するCDR 3領域と、配列番号17のC末端リジン残基に対応する位置に欠失を有する定常領域とを含む単離抗体。

【請求項 17】

EYAMG(配列番号22)と少なくとも85%の同一性を有する $V_H$  CDR 1と、SIGSSGGQTKYADSVKG(配列番号23)と少なくとも85%の同一性を有する $V_H$  CDR 2とを $V_H$ がさらに含む、請求項16に記載の単離抗体。

【請求項 18】

前記定常領域が配列番号26のアミノ酸配列を含む、請求項16または請求項17に記載の単離抗体。

【請求項 19】

CSYAGSGIYV(配列番号25)と少なくとも85%同一である $V_L$  CDR 3を含む軽鎖可変領域( $V_L$ )をさらに含む、請求項16~18のいずれかに記載の単離抗体。

【請求項 20】

TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)と少なくとも85%同一な $V_L$  CDR 1と、GDSQRPS(配列番号15)と少なくとも85%同一な $V_L$  CDR 2とを $V_L$ がさらに含む、請求項19に記載の単離抗体。

【請求項 21】

10

20

30

40

50

(a) V<sub>L</sub> CDR1がTGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)であり、  
 (b) V<sub>L</sub> CDR2がGDSQRPS(配列番号15)であり、および/または  
 (c) V<sub>L</sub> CDR3がCSYAGSGIYV(配列番号25)、SSYAGSGIYV(配列番号12)、もしくはASYAGSGIYV(配列番号13)である、  
 請求項20に記載の単離抗体。

【請求項22】

V<sub>L</sub>が、配列番号8、配列番号10、または配列番号11のアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の単離抗体。

【請求項23】

10nM未満の解離定数(K<sub>D</sub>)でヒトFcRnと結合する、請求項1~22のいずれか一項に記載の抗体。 10

【請求項24】

完全長抗体である、請求項1~23のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項25】

ヒト抗体もしくはヒト化抗体であるか、または、ヒトにおいて非免疫原性である、請求項1~24のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項26】

ヒト抗体フレームワーク領域を含む、請求項1~25のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項27】

マウス抗体である、請求項1~24のいずれか一項に記載の抗体。 20

【請求項28】

キメラ抗体である、請求項1~24のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項29】

Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fv、およびscFvからなる群から選択される、請求項1~23および25~28のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項30】

モノクローナル抗体である、請求項1~29のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項31】

請求項1~30のいずれか一項に記載の抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。 30

【請求項32】

請求項1~30のいずれかに記載の抗体をコードする配列を含む単離核酸。

【請求項33】

請求項32に記載の核酸を含むベクター。

【請求項34】

請求項33に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項35】

試料中のFcRnを検出する方法であって、前記試料を、請求項1~30のいずれか一項に記載の抗体と接触させる工程と、前記抗体とFcRnとの相互作用が存在する場合、その相互作用を検出する工程とを含む方法。 40

【請求項36】

被検者体内のFcRnを検出する方法であって、請求項1~30のいずれか一項に記載の抗体を前記被検者に投与する工程と、前記抗体とFcRnとの相互作用が存在する場合、その相互作用を検出する工程とを含む方法。

【請求項37】

FcRn活性を調節する方法であって、FcRnを、請求項1~30のいずれか一項に記載の抗体と接触させることによって、FcRnの活性を調節する工程を含む方法。

【請求項38】

前記接触工程をインビトロで行う、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

被検者の自己免疫障害を治療する方法であって、  
自己免疫障害を治療するのに十分な量で、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の抗体  
を被検者に投与する工程  
を含む方法。

【請求項 40】

被検者体内の循環 I g G の半減期 / レベルを調節する方法であって、  
前記被検者体内の循環 I g G の半減期 / レベルを調節するのに有効な量で、請求項 1 ~  
30 のいずれか一項に記載の抗体を前記被検者に投与する工程  
を含む方法。

【請求項 41】

被検者の自己免疫障害を治療するのに用いる医薬組成物であって、請求項 1 ~ 30 のい  
ずれか一項に記載の抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 42】

被検者体内の循環 I g G の半減期 / レベルを調節するのに用いる医薬組成物であって、  
請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬  
組成物。

【請求項 43】

被検者体内の F c R n 活性を調節するのに用いる医薬組成物であって、請求項 1 ~ 30  
のいずれか一項に記載の抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 44】

自己免疫障害を治療するのに用いる医薬の製造に、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記  
載の抗体を用いること。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2011年6月2日に提出された米国特許仮出願第61/492,617号お  
よび2011年6月17日に提出された米国特許仮出願第61/498,266号を基礎  
とする、米国特許法第119条に基づく優先権を主張するものである。これらのいずれの  
米国特許仮出願の内容の全体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の分野は、Fcレセプターと結合するタンパク質に関する。

【背景技術】

【0003】

血清において最も豊富な抗体のアイソタイプはI g Gであり、I g Gは、病原体に対す  
る防御への媒介、ならびに、免疫系成分の組織、粘膜、および皮膚表面への動員を加速さ  
せるアレルギーおよび炎症反応の媒介において重要な役割を有する(Junghans,  
Immunologic Research 16(1):29(1997)(非特許文  
献1))。さらに、I g Gは、さまざまな自己免疫疾患の主要な構成要素でもある。正常  
な状態では、血清におけるI g Gの半減期は、マウスでは5~7日、ヒトでは22~23  
日の範囲であり、他の血漿タンパク質の血清中半減期よりも期間が長い。その理由の1つ  
は、新生児FcRnレセプター(FcRn)が、ピノサイトーシスによって取り込まれた  
I g Gを分解性のリソソームから守り、そのI g Gを細胞外区画に再度リサイクルするか  
らである(Junghans and Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512(1996)(非特許文  
献2)、Roopenia  
n et al. J. Immunology 170:3528(2003)(非特許文  
献3))。

【0004】

FcRnは、I g GのFc部分に結合する。I g GのFc領域とFcRnとの相互作用  
はpHに依存する。I g Gは、液相エンドサイトーシスによって細胞内に進入すると、エ

10

20

30

40

50

ンドソーム内に隔離され、酸性pH(6~6.5)において高い親和性でFcRnに結合し、IgG-FcRn複合体が原形質膜に移行すると、IgGは、血流中で弱塩基性pH(約7.4)においてFcRnから速やかに解離する。このレセプター媒介性リサイクル機構により、FcRnは、IgGをリソソームでの分解から効果的に守ることによって、循環IgGの半減期を延長する。

#### 【0005】

FcRnは、内皮細胞および上皮細胞のエンドソームに典型的には存在する非共有結合型ヘテロ二量体である。FcRnは、1回膜を貫通する膜結合型レセプターで、3つの重鎖ドメイン(1、2、および3)と、1つの可溶性軽鎖2-ミクログロブリン(2)ドメインを有する。構造的には、2を共有の軽鎖として有する主要組織適合遺伝複合体クラス1分子のファミリーに属する。FcRnの鎖は、1重鎖ドメイン、2重鎖ドメイン、および3重鎖ドメインを含む細胞外ドメインと、膜貫通領域と、比較的短い細胞質尾部からなる46kDのタンパク質である(Burmeister et al. Nature 372:366(1994)(非特許文献4))。

10

#### 【0006】

FcRnは、新生児ラットの腸内で初めて同定された。ラットの腸内では、FcRnは、母乳からのIgG抗体の吸収を媒介する役割を果たすとともに、IgG抗体の循環系への輸送を促す(Leach et al. J Immunol 157:3317(1996)(非特許文献5))。FcRnはヒトの胎盤からも単離されており、ヒトの胎盤でも、母性IgGの胎児循環への吸収と輸送を媒介する。成体では、FcRnは、肺、腸管、腎臓の上皮組織、ならびに、鼻、腔、および胆管表面を含む多くの組織で発現される(米国特許第6,030,613号(特許文献1)および同第6,086,875号(特許文献2)、Israel et al. Immunology 92:69(1997)(非特許文献6)、Kobayashi et al. Am J Physiol(2002)、Renal Physiol 282:F358(2002)(非特許文献7))。

20

#### 【0007】

FcRnのIgGの恒常性への寄与を調べるために、マウスを操作して、2およびFcRn重鎖をコードする少なくとも一部の遺伝子を「ノックアウト」して、これらのタンパク質が発現されないようにした(国際公開第02/43658号(特許文献3)、Junghans and Anderson, Proc Natl Acad Sci US 93:5512(1996)(非特許文献2))。これらのマウスでは、IgGの血清中半減期および血清中濃度は著しく低下し、これにより、IgGの恒常性に関わるFcRn依存的機構が示された。

30

#### 【0008】

これらのFcRnノックアウトマウスで、抗ヒトFcRn抗体を生成でき、これらの抗体がIgGのFcRnへの結合を防止できることも示唆されている。しかしながら、このような抗体を生成したり、試験したりはしていない(国際公開第02/43658(特許文献3))。

#### 【0009】

IgGのFcRnへの結合が阻害されると、IgGのリサイクルを防止することによって、IgGの血清中半減期が短縮する。この原理は、自己免疫性皮膚水疱性疾患のマウスモデルにおいて治療上有効であることが示されている(Li et al. J Clin Invest 115:3440-3450(2005)(非特許文献8))。したがって、不適切に調節されたIgG抗体の存在によって特徴付けられる自己免疫疾患または障害、および炎症性疾患または障害を治療または予防する方法において、IgGのFcRnへの結合をブロックまたは拮抗する作用剤を用いることができる。拮抗性抗ラットFcRnモノクローナル抗体(mAb)1G3は、ラット受身モデルにおいて、30mg/kgの用量で、実験的自己免疫性重症筋無力症(EAMG)の予防に成功した。この用量は、MG、SLE、およびITPの治療で用いる静注IgG(IVIg)よりも約100倍

40

50

少ない。さらに、遺伝的に、狼瘡または関節炎のような自己免疫障害を罹患する傾向がある FcRn 欠損マウスでは、その疾患の重症度が有意に低下する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許第6,030,613号

【特許文献2】米国特許第6,086,875号

【特許文献3】国際公開第02/43658号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Jungmans, Immunologic Research 16 (1): 29 (1997)

【非特許文献2】Jungmans and Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5512 (1996)

【非特許文献3】Roopenian et al. J. Immunology 170: 3528 (2003)

【非特許文献4】Burmeister et al. Nature 372: 366 (1994)

【非特許文献5】Leach et al. J Immunol 157: 3317 (1996)

【非特許文献6】Israel et al. Immunology 92: 69 (1997)

【非特許文献7】Kobayashi et al. Am J Physiol (2002)、Renal Physiol 282: F358 (2002)

【非特許文献8】Li et al. J Clin Invest 115: 3440-3450 (2005)

【発明の概要】

【0012】

本開示は、ヒトFcレセプターと結合する単離抗体、このような抗体をコードする核酸、およびこれらの抗体を用いて、FcRnの存在を検出し、Fcレセプター活性を調節し、自己免疫障害を治療する方法を提供する。

【0013】

したがって、本開示の1つの態様は、ヒトFcRnに結合する単離抗体を特色とする。本開示の抗FcRn抗体は、V<sub>L</sub> CDR1領域、V<sub>L</sub> CDR2領域、およびV<sub>L</sub> CDR3領域を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含み、このV<sub>L</sub> CDR3領域は、SSYAGSGIYV(配列番号12)またはASYAGSGIYV(配列番号13)というV<sub>L</sub> CDR3領域と少なくとも85%(例えば90%または95%)の相同性を有する。任意により、本開示の抗FcRn抗体のV<sub>L</sub> CDR1は、TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)というV<sub>L</sub> CDR1領域と、V<sub>L</sub> CDR2は、GDSQRPS(配列番号15)というV<sub>L</sub> CDR2領域と、少なくとも85%(例えば少なくとも90%または95%)の相同性を有する。本開示の抗FcRn抗体は、少なくとも1つのCDR3領域、例えばV<sub>L</sub> CDR3領域のうちの少なくとも1つの最初の位置に、システインを有さない。

【0014】

いくつかの実施形態では、本開示の抗FcRn抗体は、TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)と少なくとも90%の相同性を有するV<sub>L</sub> CDR1、GDSQRPS(配列番号15)と少なくとも90%の相同性を有するV<sub>L</sub> CDR2、および/またはSSYAGSGIYV(配列番号12)もしくはASYAGSGIYV(配列番号13)と少なくとも90%の相同性を有するV<sub>L</sub> CDR3を含む。1つの例では、本開示の抗FcRn抗体は、TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)というV<sub>L</sub> CDR1

10

20

30

40

50

領域、GDSQRPS (配列番号15) というV<sub>L</sub> CDR2領域、および/またはSSYAGSGIYV (配列番号12) もしくはASYAGSGIYV (配列番号13) というV<sub>L</sub> CDR3領域を含む。

【0015】

別の実施形態では、本明細書に開示されている単離抗FcRn抗体は、配列番号10または配列番号11と少なくとも85% (例えば少なくとも90%、95%、または98%) の同一性を有するアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。1つの例では、本開示の単離抗体のV<sub>L</sub>は、配列番号10または配列番号11のアミノ酸配列を含む。

【0016】

本開示の別の態様は、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2、およびV<sub>L</sub> CDR3領域を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) を含む単離抗FcRn抗体を特色とし、このV<sub>L</sub> CDR3領域は、SSYAGSGIYV (配列番号12) またはASYAGSGIYV (配列番号13) という配列と比べて、最大で3個のアミノ酸置換を有し、この単離抗体は、少なくとも1つのCDR3領域、例えばV<sub>L</sub> CDR3領域のうちの少なくとも1つの最初の位置に、システインを有さない。任意により、本開示の抗FcRn抗体のV<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2、およびV<sub>L</sub> CDR3は合わせて、下記の配列と比べて、最大で10個のアミノ酸置換を含む。

(a) CDR1 : TGTGSDVGSYNLVS (配列番号14)

(b) CDR2 : GDSQRPS (配列番号15)

(c) CDR3 : SSYAGSGIYV (配列番号12) またはASYAGSGIYV (配列番号13)

【0017】

上記の抗FcRn抗体のいずれも、V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、およびV<sub>H</sub> CDR3を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) をさらに含むことができ、このV<sub>H</sub> CDR3は、LAIGDSY (配列番号24) と少なくとも85% (例えば少なくとも90%または95%) の同一性を有する。任意により、本開示の抗FcRn抗体のV<sub>H</sub> CDR1はEYAMG (配列番号22) と、V<sub>H</sub> CDR2はSIGSSGGQTKYADSVKG (配列番号23) と、少なくとも85% (例えば少なくとも90%または95%) の同一性を有する。

【0018】

いくつかの実施形態では、本開示の抗FcRn抗体は、EYAMG (配列番号22) と少なくとも90%の同一性を有するV<sub>H</sub> CDR1、SIGSSGGQTKYADSVKG (配列番号23) と少なくとも90%の同一性を有するV<sub>H</sub> CDR2、および/またはLAIGDSY (配列番号24) と少なくとも90%の同一性を有するV<sub>H</sub> CDR3を含む。1つの例では、本開示の抗FcRn抗体は、EYAMG (配列番号22) というV<sub>H</sub> CDR1領域、SIGSSGGQTKYADSVKG (配列番号23) というV<sub>H</sub> CDR2領域、および/またはLAIGDSY (配列番号24) というV<sub>H</sub> CDR3領域を含む。

【0019】

別の実施形態では、本明細書に開示されている抗FcRn抗体は、配列番号9と少なくとも85% (例えば少なくとも90%、95%、または98%) の配列同一性を有するV<sub>H</sub>を含む。1つの例では、本開示の単離抗体のV<sub>H</sub>は、配列番号9のアミノ酸配列を含む。

【0020】

別の態様では、本開示は、重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と重鎖定常領域とを含む重鎖を含む単離抗FcRn抗体を提供し、そのV<sub>H</sub>は、LAIGDSY (配列番号24) と少なくとも85% (例えば少なくとも90%または95%) の同一性を有するCDR3領域を含み、定常領域は、配列番号17のC末端リジン残基に対応する位置に欠失を有する。いくつかの例では、この抗FcRn抗体の重鎖可変領域は、V<sub>H</sub> CDR1とV<sub>H</sub> CDR2をさらに含み、このV<sub>H</sub> CDR1はEYAMG (配列番号22) と、V<sub>H</sub> CDR2はSI

10

20

30

40

50



G S S G G Q T K Y A D S V K G (配列番号 23) と、少なくとも 85% (例えば少なくとも 90% または 95%) の相同性を有する。別の例では、この抗 FcRn 抗体の重鎖定常領域は、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む。

【0021】

上記の抗 FcRn 抗体は、DX - 2504 の V<sub>L</sub> CDR3 (C S Y A G S G I Y V、配列番号 25) と少なくとも 85% (例えば少なくとも 90% または 95%) 同一である V<sub>L</sub> CDR3 と、任意により、T G T G S D V G S Y N L V S (配列番号 14) と少なくとも 85% (例えば少なくとも 90% または 95%) 同一である V<sub>L</sub> CDR1 と、G D S Q R P S (配列番号 15) と少なくとも 85% (例えば少なくとも 90% または 95%) 同一である V<sub>L</sub> CDR2 とを含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) をさらに含むことができる。1つの例では、上記の抗 FcRn 抗体は、T G T G S D V G S Y N L V S (配列番号 14) という V<sub>L</sub> CDR1 領域、G D S Q R P S (配列番号 15) という V<sub>L</sub> CDR2 領域、および/または、C S Y A G S G I Y V (配列番号 25)、S S Y A G S G I Y V (配列番号 12)、もしくは A S Y A G S G I Y V (配列番号 13) という V<sub>L</sub> CDR3 領域を含む。別の例では、上記の抗 FcRn 抗体の V<sub>L</sub> は、配列番号 8、配列番号 10、または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む。

10

【0022】

上記の抗 FcRn 抗体のいずれも、10 nM 未満の解離定数 (K<sub>D</sub>) でヒト FcRn と結合することができる。本開示に示されている抗 FcRn 抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であることも、ヒトにおいて非免疫原性であることもできる。例えば、本開示の抗 FcRn 抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含むことができる。あるいは、本開示の抗 FcRn 抗体はマウス抗体であることができる。別の例では、本開示の抗 FcRn 抗体はキメラ抗体であることができる。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書に示されている抗 FcRn 抗体は、完全長抗体 (Fcドメインを含む) である。あるいは、本開示の抗 FcRn 抗体は、Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fv、または ScFv のような抗原結合性断片であることができる。所望される場合、本開示の抗 FcRn 抗体はモノクローナル抗体である。

【0024】

本明細書では、(i) 本明細書に記載されている抗体のいずれかと、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物、(ii) 本明細書に示されている抗体のいずれかをコードする配列を含む単離核酸、(iii) 本明細書に示されている抗体のいずれかをコードする配列を含む核酸のいずれかを含むベクター、および (iv) 本明細書に示されている抗体のいずれかをコードする配列を含む核酸のいずれかを含むベクターを含む宿主細胞も開示する。

30

【0025】

本明細書に記載されている抗 FcRn 抗体のいずれかを用いて、インビボまたはインビトロのいずれかで、FcRn の存在を検出したり、または FcRn の活性を調節したりできる。

【0026】

1つの態様では、本開示においては、試料における FcRn を検出する方法であって、試料を、本明細書に示されている抗体のいずれかと接触させる工程と、その抗体と FcRn との相互作用が存在する場合、その相互作用を検出する工程とを含む方法を提供する。

40

【0027】

別の態様では、本開示は、被検者体内の FcRn を検出する方法であって、本明細書に示されている抗体 (イメージング用標識 (蛍光または放射性標識) のような検出可能な分子とコンジュゲートできる) のいずれかを被検者に投与する工程と、その抗体と FcRn との相互作用が存在する場合、その相互作用を検出する工程とを含む方法を提供する。

【0028】

さらに別の態様では、本開示は、FcRn 活性を調節する方法であって、FcRn を、

50

本明細書に示されている抗体のいずれかと接触させ、それによってFcRnの活性を調節する工程を含む方法を提供する。

【0029】

1つの態様では、本発明は、被検者の自己免疫障害を治療するか、または、循環IgGの半減期/レベルを調節する方法であって、被検者の自己免疫障害を治療するか、または、循環IgGの半減期/レベルを調節するのに有効な量で、本明細書に示されている抗体のいずれかを被検者に投与する工程を含む方法を提供する。

【0030】

(a) FcRnの活性を調節し、循環IgGの半減期/レベルを調節し、および/または自己免疫障害を治療する必要がある被検者におけるFcRnの活性を調節し、循環IgGの半減期/レベルを調節し、および/または自己免疫障害を治療するのに用いる医薬組成物であって、本明細書に記載されている抗FcRn抗体のうちの1種以上と、製薬学的に許容可能な担体とをそれぞれ含む医薬組成物、(b)上記のうちのいずれかの目的で、本明細書に記載されている抗FcRn抗体のいずれかを用いること、ならびに、(c)被検者(例えばヒト患者)におけるFcRnの活性を調節し、循環IgGの半減期/レベルを調節し、および/または自己免疫障害治療のための医薬を製造する目的で、本開示の抗FcRn抗体のいずれかを用いることも本開示の範囲内である。

【0031】

本発明の上記およびその他の態様および実施形態について以下でさらに詳細に説明する。

【0032】

本発明の限定的記載のいずれも、本発明のさまざまな実施形態を含むことができる。したがって、いずれか1つの要素または要素の組み合わせを含む本発明の限定的記載のいずれも、本発明の各態様に含めることができると予想される。本発明は、その用途において、下記の説明に示されているか、または図面に示されている構成成分の構成および配置の詳細に限定されない。本発明は、他の実施形態も可能であり、さまざまな方法で実施または実行できる。また、本明細書で用いられている語法および専門用語は、説明のためのものであり、限定するものとして解釈すべきではない。本明細書において、「挙げられる」、「含む」、または、「有する」、「含有する」、「伴う」、およびこれらの変形表現を用いることは、その後列挙されているアイテム、それらの同等物、および追加のアイテムを包含することを意味する。

[本発明1001]

ヒトFcRnと結合する単離抗体であって、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2、およびV<sub>L</sub> CDR3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含み、

V<sub>L</sub> CDR3が、SSYAGSGIYV(配列番号12)またはASYAGSGIYV(配列番号13)の配列と少なくとも85%の同一性を有し、

少なくとも1つのCDR3領域の最初の位置にシステインを有さない単離抗体。

[本発明1002]

前記単離抗体のV<sub>L</sub> CDR1がTGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)と、V<sub>L</sub> CDR2がGDSQRP S(配列番号15)と、少なくとも85%の同一性を有する、本発明1001の単離抗体。

[本発明1003]

V<sub>L</sub> CDR1が、TGTGSDVGSYNLVS(配列番号14)と少なくとも90%の同一性を有し、

V<sub>L</sub> CDR2が、GDSQRP S(配列番号15)と少なくとも90%の同一性を有し、および/または

V<sub>L</sub> CDR3が、SSYAGSGIYV(配列番号12)もしくはASYAGSGIYV(配列番号13)と少なくとも90%の同一性を有する、

本発明1001または本発明1002の単離抗体。

[本発明1004]

10

20

30

40

50

(a)  $V_L$  CDR1がTGTGSDVGSYNLVS (配列番号14)であり、  
 (b)  $V_L$  CDR2がGDSQRPS (配列番号15)であり、および/または  
 (c)  $V_L$  CDR3がSSYAGSGIYV (配列番号12)もしくはASYAGSGIYV (配列番号13)である、  
 本発明1001~1003のいずれかの単離抗体。

[本発明1005]

前記 $V_L$  CDR1がTGTGSDVGSYNLVS (配列番号14)であり、  
 前記 $V_L$  CDR2がGDSQRPS (配列番号15)であり、および  
 前記 $V_L$  CDR3がSSYAGSGIYV (配列番号12)もしくはASYAGSGIYV (配列番号13)である、  
 本発明1004の単離抗体。

10

[本発明1006]

前記単離抗体の $V_L$ が、配列番号10または配列番号11と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1001~1005のいずれかの単離抗体。

[本発明1007]

前記単離抗体の $V_L$ が、配列番号10または配列番号11のアミノ酸配列を含む、本発明1006の単離抗体。

[本発明1008]

ヒトFcRnと結合する単離抗体であって、 $V_L$  CDR1、 $V_L$  CDR2、および  
 $V_L$  CDR3領域を含む軽鎖可変領域( $V_L$ )を含み、  
 $V_L$  CDR3領域が、SSYAGSGIYV (配列番号12)またはASYAGSGIYV (配列番号13)の配列と比べて、最大3個のアミノ酸置換を有し、  
 少なくとも1つのCDR3領域の最初の位置にシステインを有さない単離抗体。

20

[本発明1009]

$V_L$  CDR1、 $V_L$  CDR2、および $V_L$  CDR3が、  
 (a) CDR1: TGTGSDVGSYNLVS (配列番号14)  
 (b) CDR2: GDSQRPS (配列番号15)  
 (c) CDR3: SSYAGSGIYV (配列番号12)またはASYAGSGIYV (配列番号13)  
 の配列と比べて、合わせて最大10個のアミノ酸置換を有する、本発明1008の単離抗体。

30

[本発明1010]

$V_H$  CDR1、 $V_H$  CDR2、および $V_H$  CDR3を含む重鎖可変領域( $V_H$ )をさらに含み、 $V_H$  CDR3が、LAIGDSY (配列番号24)と少なくとも85%の同一性を有する、本発明1001~1009のいずれかの単離抗体。

[本発明1011]

前記単離抗体の $V_H$  CDR1がEYAMG (配列番号22)と、 $V_H$  CDR2がSIGSSGGQTKYADSVKG (配列番号23)と、少なくとも85%の同一性を有する、本発明1010の単離抗体。

[本発明1012]

(a)  $V_H$  CDR1が、EYAMG (配列番号22)と少なくとも90%の同一性を有し、  
 (b)  $V_H$  CDR2が、SIGSSGGQTKYADSVKG (配列番号23)と少なくとも90%の同一性を有し、および/または  
 (c)  $V_H$  CDR3が、LAIGDSY (配列番号24)と少なくとも90%の同一性を有する、  
 本発明1010の単離抗体。

40

[本発明1013]

(a)  $V_H$  CDR1がEYAMG (配列番号22)であり、  
 (b)  $V_H$  CDR2がSIGSSGGQTKYADSVKG (配列番号23)であり、  
 および/または

50

(c)  $V_H$  CDR3がLAIGDSY (配列番号24)である、  
本発明1012の単離抗体。

[本発明1014]

前記単離抗体の $V_H$ が、配列番号9と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む、  
本発明1010の単離抗体。

[本発明1015]

前記単離抗体の $V_H$ が配列番号9のアミノ酸配列を含む、本発明1014の単離抗体。

[本発明1016]

重鎖可変領域( $V_H$ )および重鎖定常領域を含む重鎖を含む単離抗体であって、 $V_H$ が  
、LAIGDSY (配列番号24)と少なくとも85%の同一性を有するCDR3領域と、配  
列番号17のC末端リジン残基に対応する位置に欠失を有する定常領域とを含む単離抗体。

10

[本発明1017]

EYAMG (配列番号22)と少なくとも85%の同一性を有する $V_H$  CDR1と、SIGSSGGQTKEYADSVKG (配列番号23)と少なくとも85%の同一性を有する $V_H$   
CDR2とを $V_H$ がさらに含む、本発明1016の単離抗体。

[本発明1018]

前記定常領域が配列番号26のアミノ酸配列を含む、本発明1016または本発明1017の単離  
抗体。

[本発明1019]

CSYAGSGIYV (配列番号25)と少なくとも85%同一である $V_L$  CDR3を含  
む軽鎖可変領域( $V_L$ )をさらに含む、本発明1016~1018のいずれかの単離抗体。

20

[本発明1020]

TGTGSDVGSYNLVS (配列番号14)と少なくとも85%同一な $V_L$  CDR1  
と、GDSQRP (配列番号15)と少なくとも85%同一な $V_L$  CDR2とを $V_L$ がさ  
らに含む、本発明1019の単離抗体。

[本発明1021]

(a)  $V_L$  CDR1がTGTGSDVGSYNLVS (配列番号14)であり、  
(b)  $V_L$  CDR2がGDSQRP (配列番号15)であり、および/または  
(c)  $V_L$  CDR3がCSYAGSGIYV (配列番号25)、SSYAGSGIYV  
(配列番号12)、もしくはASYAGSGIYV (配列番号13)である、  
本発明1020の単離抗体。

30

[本発明1022]

$V_L$ が、配列番号8、配列番号10、または配列番号11のアミノ酸配列を含む、本発明102  
1の単離抗体。

[本発明1023]

10nM未満の解離定数( $K_D$ )でヒトFcRnと結合する、本発明1001~1022のいずれ  
かの抗体。

[本発明1024]

完全長抗体である、本発明1001~1023のいずれかの抗体。

[本発明1025]

ヒト抗体もしくはヒト化抗体であるか、または、ヒトにおいて非免疫原性である、本発  
明1001~1024のいずれかの抗体。

40

[本発明1026]

ヒト抗体フレームワーク領域を含む、本発明1001~1025のいずれかの抗体。

[本発明1027]

マウス抗体である、本発明1001~1024のいずれかの抗体。

[本発明1028]

キメラ抗体である、本発明1001~1024のいずれかの抗体。

[本発明1029]

Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fv、およびscFvからなる群から選択される、本発明1001

50

~1023および1025~1028のいずれかの抗体。

[本発明1030]

モノクローナル抗体である、本発明1001~1029のいずれかの抗体。

[本発明1031]

本発明1001~1030のいずれかの抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物

。

[本発明1032]

本発明1001~1030のいずれかの抗体をコードする配列を含む単離核酸。

[本発明1033]

本発明1032の核酸を含むベクター。

[本発明1034]

本発明1033のベクターを含む宿主細胞。

[本発明1035]

試料中のFcRnを検出する方法であって、前記試料を、本発明1001~1030のいずれかの抗体と接触させる工程と、前記抗体とFcRnとの相互作用が存在する場合、その相互作用を検出する工程とを含む方法。

[本発明1036]

被検者体内のFcRnを検出する方法であって、本発明1001~1030のいずれかの抗体を前記被検者に投与する工程と、前記抗体とFcRnとの相互作用が存在する場合、その相互作用を検出する工程とを含む方法。

[本発明1037]

FcRn活性を調節する方法であって、FcRnを、本発明1001~1030のいずれかの抗体と接触させることによって、FcRnの活性を調節する工程を含む方法。

[本発明1038]

前記接触工程をインビトロで行う、本発明1037の方法。

[本発明1039]

被検者の自己免疫障害を治療する方法であって、自己免疫障害を治療するのに十分な量で、本発明1001~1030のいずれかの抗体を被検者に投与する工程を含む方法。

[本発明1040]

被検者体内の循環IgGの半減期/レベルを調節する方法であって、前記被検者体内の循環IgGの半減期/レベルを調節するのに有効な量で、本発明1001~1030のいずれかの抗体を前記被検者に投与する工程を含む方法。

[本発明1041]

被検者の自己免疫障害を治療するのに用いる医薬組成物であって、本発明1001~1030のいずれかの抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

[本発明1042]

被検者体内の循環IgGの半減期/レベルを調節するのに用いる医薬組成物であって、本発明1001~1030のいずれかの抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

[本発明1043]

被検者体内のFcRn活性を調節するのに用いる医薬組成物であって、本発明1001~1030のいずれかの抗体と、製薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

[本発明1044]

自己免疫障害を治療するのに用いる医薬の製造に、本発明1001~1030のいずれかの抗体を用いること。

【図面の簡単な説明】

【0033】

図面は実例のためのものに過ぎず、本明細書に開示されている本発明の実現のために必

10

20

30

40

50

須のものではない。

【0034】

【図1】DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)解析を示す図である。

【図2】DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03のSDS-PAGE解析を示す図である。

【図3】DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03の温度安定性を示す図である。

【図4】DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03のpH安定性を示す図である。

【図5】DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03のpH8.3における安定性を示す図である。

【図6】DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03の化学変性に対する安定性を示す図である。

【図7】pH6におけるhFcRnの固定化DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03との相互作用の速度論的解析を示す図である。

【図8】pH7.5におけるhFcRnの固定化DX-2504、532A-X53-C02、および532A-X54-B03との相互作用速度論的解析を示す図である。

【図9】DX2504(配列番号8)、532A-X53-C02(配列番号10)、および532A-X54-B03(配列番号11)の配列を示す図である。

【図10】抗hFcRn H-CDR3とFab-310との長さ分布の対比を示す図である。

【図11】所定の抗FcRn結合タンパク質のいくつかの特性を特徴付ける2つのグラフを示す図である。

【図12】TG32Bマウスにおける、抗FcRn抗体のhIgG異化に対する作用を示す図である。

【図13】カニクイザルに投与したDX-2504およびDX-2507の血清中濃度を示す図である。

【図14】DX-2504およびDX-2507の投与後のカニクイザルにおけるIgGレベルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本明細書では、ヒトFcRnに結合できる単離抗体と、FcRnの存在を検出し、FcRn活性を調節し、循環IgGの半減期/レベルを調節し、および/または、自己免疫障害(例えば多発性硬化症、関節リウマチ、狼瘡、免疫性血小板減少症、強直性脊椎炎、および天疱瘡)、ならびに、炎症性障害(炎症性腸疾患など)のようなIgG異常と関連する障害を治療するのに、その抗体を使用することを開示する。好ましくは、このような抗FcRn抗体は、(a)非特異的なヒトIgG/Fc部分のFcRn-Fc相互作用部位への結合をブロックでき、(b)ヒトFcRnとラットFcRn(可溶性および細胞)の両方に結合でき、(c)pH6においてFcRnに結合でき、および/または、(d) 2にしか結合できないわけではない。

【0036】

正常な状況では、FcRnは、循環IgGの半減期を延長できる。FcRnに結合する抗体を用いて、例えばFcRnとIgGとの相互作用を防止することによって、FcRnの機能を調節できる。特に、FcRnとIgGとの相互作用をブロックする抗体を用いて、IgG分子の半減期を短縮できる。

【0037】

1つの態様では、本開示はとりわけ、自己免疫障害の治療とIgGの循環レベルの低減に利用可能なヒト拮抗性抗ヒトFcRn抗体を提供する。抗原結合ドメインを介して結合して、IgG-FcとヒトFcRnまたはラットFcRnとの相互作用をブロックする能

10

20

30

40

50

力を有する高親和性可溶性 Fab ( s Fab ) も開示する。

【 0 0 3 8 】

定義

「結合タンパク質」という用語は、標的分子と相互作用できるタンパク質を指す。この用語は、「リガンド」と同義的に用いられる。「FcRn結合タンパク質」または「FcRn結合リガンド」は、FcRnと相互作用できるタンパク質を指し、特に、FcRnと優先的に相互作用するタンパク質、例えばIgGが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を指す。例えば、抗体は、重(H)鎖可変領域(本明細書ではV<sub>H</sub>と略す)と軽(L)鎖可変領域(本明細書では、V<sub>L</sub>と略す)を含むことができる。別の例では、抗体は、2つの重(H)鎖可変領域と2つの軽(L)鎖可変領域を含む。「抗体」という用語は、抗体の抗原結合性断片(例えば、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')<sub>2</sub>、Fd断片、Fv断片、scFv、ならびにdAb断片)と、完全抗体(完全長抗体)を包含する。

10

【 0 0 4 0 】

V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域はさらに、より一定に保たれた「フレームワーク領域」(「FR」)という領域が組み入れられた「相補性決定領域」(「CDR」)という超可変性の領域に細分化できる。フレームワーク領域とCDRの範囲は、精密に定義されている(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917を参照されたい。http://www.hgmp.mrc.ac.ukも参照されたい)。本発明ではKabatの定義を用いる。各V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は典型的には、3つのCDRと4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端に向かってFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で配列されている。

20

【 0 0 4 1 】

完全長抗体の「抗原結合性断片」(または単に「抗体部分」もしくは「断片」という用語は、本明細書で使用する場合、目的の標的に特異的に結合する能力を保持する、完全長抗体の1つ以上の断片を指す。完全長抗体の「抗原結合性断片」という用語に包含される結合性断片の例としては、(i) Fab断片(V<sub>L</sub>ドメイン、V<sub>H</sub>ドメイン、C<sub>L</sub>ドメイン、およびC<sub>H</sub>1ドメインからなる一価の断片)、(ii) F(ab')<sub>2</sub>断片(ヒンジ領域でジスルフィド結合によって結合している2つのFab断片を含む二価の断片)、(iii) V<sub>H</sub>ドメインおよびC<sub>H</sub>1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのV<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインからなるFv断片、(v) V<sub>H</sub>ドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)、ならびに(vi) 機能性を保持する単離相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>は別の遺伝子によってコードされるが、組換え法を用いて、これらのドメインを一本のタンパク質鎖にして、V<sub>L</sub>領域とV<sub>H</sub>領域が対となって一本鎖Fv(scFv)として知られる一価の分子を形成することができる合成リンカーによって、これらのドメインを結合することができる。例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426、およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい。

30

40

【 0 0 4 2 】

当業者に知られている従来の技法を含むいずれかの適切な技法を用いて、抗体断片を得ることができる。「単特異性抗体」という用語は、特定の標的、例えばエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す抗体を指す。この用語は、「モノクローナル抗体

50

」または「モノクローナル抗体組成物」（本明細書で使用する場合、単一の分子組成物の抗体またはその断片の調製物を指す）を含む。本明細書で使用する場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えばIgMまたはIgG1）を指す。

#### 【0043】

本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、見かけ会合定数、すなわち $K_a$ を指す。 $K_a$ は解離定数（ $K_d$ ）の逆数である。結合タンパク質の特定の標的分子に対する結合親和性は例えば、少なくとも $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、および $10^{-11}$  Mであってよい。結合リガンドが第2の標的よりも第1の標的に対して高い親和性で結合することは、第2の標的に結合する際の $K_a$ （または $K_d$ の数値）よりも、第1の標的に結合する際の $K_a$ が高いこと（ $K_d$ の数値が小さいこと）によって示すことができる。このようなケースでは、結合タンパク質は、第2の標的（例えば、第2のコンホメーションの同じタンパク質またはその模擬体、すなわち第2のタンパク質）よりも、第1の標的（例えば、第1のコンホメーションのタンパク質またはその模擬体）に対して特異性を有する。結合親和性の差（例えば特異性またはその他の比較）は、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、70倍、80倍、100倍、500倍、1000倍、または $10^5$ 倍であることができる。

10

#### 【0044】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲルろ過、ELISA、表面プラズモン共鳴、または分光法（例えば蛍光アッセイを用いるもの）を含むさまざまな方法によって割り出すことができる。結合親和性評価するための例示的な条件は、pH7.2、30のPBS（リン酸緩衝生理食塩水）中である。これらの技法を用いて、結合した結合タンパク質と遊離の結合タンパク質の濃度を結合タンパク質（または標的）濃度の関数として測定できる。下記の方程式により、結合した結合タンパク質（[結合]）の濃度は、遊離の結合タンパク質（[遊離]）濃度と、標的上の結合タンパク質の結合部位の濃度に相関しており、式中の（N）は、1標的分子当たりの結合部位の数である。

20

（数1）

$$[\text{結合}] = N \cdot [\text{遊離}] / ((1 / K_a) + [\text{遊離}])$$

#### 【0045】

$K_a$ を正確に割り出す必要は必ずしもない。親和性の定量的測定値を得れば十分な場合があり、例えば、ELISAまたはFACS解析のような方法を用いて割り出した値は $K_a$ に比例するので、親和性が高いか、例えば2倍高いか割り出すなどの比較に用いて、親和性の定性的測定値を得たり、または、例えば、機能アッセイ、例えばインビトロもしくはインビボアッセイにおける活性によって、親和性の推測を得たりできる。

30

#### 【0046】

「同族リガンド」という用語は、その天然の変異体（例えばスプライス変異体、天然の変異体、およびアイソフォーム）を含め、FcRnの天然のリガンドを指す。

#### 【0047】

「保存的アミノ酸置換」は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基にアミノ酸残基を置換したものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。多くのフレームワークおよびCDRアミノ酸残基が1つ以上の保存的置換を含むことができる。

40

#### 【0048】

50



バイオポリマーのコンセンサス配列は、アミノ酸により異なり得る位置を含むことができる。例えば、このような場合の「X」という記号は一般に、いずれかのアミノ酸（例えば20個の天然アミノ酸のいずれか、または、19個のシステイン以外のアミノ酸のいずれか）を指す。その他の許容されるアミノ酸は、例えば、括弧とスラッシュを用いて示すこともできる。例えば、「(A/W/F/N/Q)」は、アラニン、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギン、およびグルタミンがその特定の位置で許容されることを意味する。

【0049】

「有効なヒト」免疫グロブリン可変領域は、その免疫グロブリン可変領域が健常なヒトにおいて免疫原性反応を引き起こさないように、十分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含む免疫グロブリン可変領域である。「有効なヒト」抗体は、その抗体が健常なヒトにおいて免疫原性反応を引き起こさないように、十分な量のヒトアミノ酸位置を含む抗体である。

10

【0050】

「エピトープ」は、結合タンパク質（例えばFabまたは完全長抗体のような抗体）が結合する、標的化合物上の部位を指す。標的化合物がタンパク質であるケースでは、この部位は、全体がアミノ酸成分からなるか、全体が、タンパク質のアミノ酸の化学修飾（例えばグリコシル部分）からなるか、または、これらの組み合わせからなることができる。重複するエピトープは、共通のアミノ酸残基を少なくとも1つ含む。

【0051】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」（これらの用語は、本明細書では同義的に用いる）の算出は、以下のように行う。最適な比較のために、配列をアラインさせる（例えば、最適なアラインメントのために、第1のアミノ酸または核酸配列と第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入でき、比較のために、非相同配列を無視することができる）。ギャップペナルティー12、ギャップ伸長ペナルティー4、およびフレームシフトギャップペナルティー5で、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムをBlasum62スコアリングマトリックスとともに用いて、スコアが最大なものとして最適なアラインメントを割り出す。続いて、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合には、それらの分子は、その位置において同一である（本明細書で使用する場合、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と同義である）。2つの配列間の同一性（%）は、それらの配列に共通する同一な位置の数の関数である。

20

30

【0052】

1つの実施形態では、比較のためにアラインさせる基準配列の長さは、その基準配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%、または100%である。例えば、基準配列は、免疫グロブリン可変ドメイン配列の長さであってよい。

【0053】

「ヒト化」免疫グロブリン可変領域は、その免疫グロブリン可変領域が健常なヒトにおいて免疫原性反応を引き起こさないように、十分な量のヒトフレームワークアミノ酸位置を含むように改変されている免疫グロブリン可変領域である。「ヒト化」免疫グロブリンの説明としては、例えば米国特許第6,407,213号、および米国特許第5,693,762号が挙げられる。

40

【0054】

本明細書で使用する場合、「低ストリンジェントな条件、中ストリンジェントな条件、高ストリンジェントな条件、または超高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を説明するものである。ハイブリダイゼーション反応を行うためのガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.

50

Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6に見ることができ、この文献は、参照により組み込まれる。この参照文献には、水性法と非水性法が記載されており、このいずれも用いることができる。本明細書で言及されている具体的なハイブリダイゼーション条件は、(1) 6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC)、約 45 でハイブリダイズしてから、0.2 × SSC、0.1% SDS、少なくとも 50 で 2 回洗浄する低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件 (低ストリンジェントな条件では、洗浄の温度は 55 まで上昇させることができる)、(2) 6 × SSC、約 45 でハイブリダイズしてから、0.2 × SSC、0.1% SDS、60 で 1 回以上洗浄する中ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件、(3) 6 × SSC、約 45 でハイブリダイズしてから、0.2 × SSC、0.1% SDS、65 で 1 回以上洗浄する高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件、および (4) 0.5 M リン酸ナトリウム、7% SDS、65 でハイブリダイズしてから、0.2 × SSC、1% SDS、65 で 1 回以上洗浄する超高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件である。超高ストリンジェントな条件 (4) が好ましい条件であり、別段の定めのない限り、使用すべき条件である。本開示は、低、中、高、または超高ストリンジェントな条件で、本明細書に記載されている核酸、またはそれらの相補体とハイブリダイズする核酸、例えば、本明細書に記載されている結合タンパク質をコードする核酸を含む。この核酸は、標準核酸の長さと同じ長さであることも、または標準核酸の長さの 30%、20%、または 10% 以内であることもできる。この核酸は、免疫グロブリン可変ドメイン配列をコードする領域に対応することができる。

10

20

#### 【0055】

FcRn 結合タンパク質は、本明細書に記載されている結合タンパク質と比べて、変異 (例えば少なくとも 1 つ、2 つ、もしくは 4 つ、および / または、15 個未満、10 個未満、5 個未満、もしくは 3 個未満) (例えば保存的アミノ酸置換または非必須アミノ酸置換) であって、タンパク質機能に対して実質的な影響を有さない変異を有してもよい。特定の置換が許容されるか、すなわち、結合活性のような生物学的特性に悪影響を及ぼさないかは、例えば、Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310 の方法を用いて予測できる。

#### 【0056】

「免疫グロブリンドメイン」は、免疫グロブリン分子の可変または定常ドメイン由来のドメインを指す。免疫グロブリンドメインは典型的には、約 7 本の ストランドおよび保存されたジスルフィド結合から形成される 2 つの シートを含む (例えば A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6:381-405 を参照されたい)。

30

#### 【0057】

本明細書で使用する場合、「免疫グロブリン可変ドメイン配列」は、1 つ以上の CDR 領域が、抗原結合部位に適するコンホメーションで位置するように、免疫グロブリン可変ドメインの構造を形成できるアミノ酸配列を指す。例えば、この配列は、天然の可変ドメインのアミノ酸配列の全部または一部を含んでよい。例えば、この配列は、1 つ、2 つ、または 3 つ以上の N または C 末端のアミノ酸、内部のアミノ酸を省略しても、1 つ以上の挿入または追加の末端のアミノ酸を含んでも、その他の改変を含んでもよい。1 つの実施形態では、免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むポリペプチドは、別の免疫グロブリン可変ドメイン配列と結合して、標的結合構造 (または「抗原結合部位」)、例えば、FcRn 構造と優先的に相互作用する構造を形成できる。

40

#### 【0058】

本開示の抗体の V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> 鎖はさらに、重または軽鎖定常領域の全部または一部を含むことができ、それにより、免疫グロブリン重または軽鎖をそれぞれ形成する。1 つの実施形態では、本開示の抗体は、2 本の免疫グロブリン重鎖と 2 本の免疫グロブリン軽鎖の四量体であり、これらの免疫グロブリン重および軽鎖は、例えばジスルフィド結合によって結合し合っている。その重鎖定常領域は、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、および C<sub>H</sub>3 という 3 つ

50

のドメインを含む。軽鎖定常領域は、C Lドメインを含む。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は典型的には、免疫系のさまざまな細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的補体系の第1の構成成分（C1q）を含む宿主組織または因子への抗体の結合に媒介する。「抗体」という用語は、I g A、I g G、I g E、I g D、I g Mのタイプ（およびこれらのサブタイプ）のそのままの免疫グロブリンである。免疫グロブリンの軽鎖は、カッパまたはラムダのタイプであってよい。1つの実施形態では、抗体はグリコシル化されている。抗体は、抗体依存性細胞障害機能および/または補体媒介性細胞障害機能を有することができる。

#### 【0059】

抗体の1つ以上の領域は、ヒトまたは有効なヒト領域であることができる。例えば、可変領域の1つ以上は、ヒトまたは有効なヒト領域であることができる。例えば、C D Rの1つ以上、例えば、H C C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、L C C D R 1、L C C D R 2、およびL C C D R 3が、ヒト領域であることができる。各軽鎖C D Rがヒト領域であることができる。H C C D R 3がヒト領域であることができる。フレームワーク領域の1つ以上、例えばH CまたはL CのF R 1、F R 2、F R 3、およびF R 4がヒト領域であることができる。1つの実施形態では、すべてのフレームワーク領域がヒト領域、例えばヒト体細胞由来の領域（例えば、免疫グロブリンを産生する造血細胞または非造血細胞）であることができる。1つの実施形態では、ヒト配列は、例えば生殖系列核酸によってコードされる生殖系列配列である。定常領域の1つ以上は、ヒトまたは有効なヒト領域であることができる。1つの実施形態では、抗体の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、もしくは98%、またはすべてがヒトまたは有効なヒト領域であることができる。

10

20

#### 【0060】

抗体のすべてまたは一部は、免疫グロブリン遺伝子またはその一部によってコードできる。例示的なヒト免疫グロブリン遺伝子としては、 $\kappa$ 、 $\lambda$ （I g A 1およびI g A 2）、 $\gamma$ （I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、 $\mu$ 、および $\delta$ 、および $\mu$ 定常領域遺伝子、ならびに、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。完全長免疫グロブリン「軽鎖」（約25 K D a、214個のアミノ酸）は、N H 2末端（約110個のアミノ酸）の可変領域遺伝子およびC O O H末端の定常領域遺伝子によってコードされる。完全長免疫グロブリン「重鎖」（約50 K D a、446個のアミノ酸）は同様に、可変領域遺伝子（約116個のアミノ酸）、および上記のものとは別の定常領域遺伝子の1つ、例えば定常領域遺伝子（約330個のアミノ酸をコードする）によってコードされる。

30

#### 【0061】

「単離組成物」は、その単離組成物をもたらすことができる天然の試料の少なくとも1つの構成成分の少なくとも90%から除去された組成物を指す。目的の種または種の集団が、重量対重量基準で少なくとも純度5%、10%、25%、50%、75%、80%、90%、92%、95%、98%、または99%であれば、人為的または自然に生成される組成物は、「少なくとも」ある程度の純度の「組成物」であることができる。

#### 【0062】

「模擬体」という用語は、F c R nまたはその一部のコンホメーションの模擬体に関しては、天然のF c R nまたはその一部と比べて、少なくとも1つの特定のコンホメーションをとる傾向がある改変F c R nを指す。

40

#### 【0063】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を喪失させたり、または実質的に変化させたりすることなく、結合作用物質、例えば抗体の野生型配列から改変できる残基であり、「必須」アミノ酸残基は、このようは変化を生じさせる残基である。

#### 【0064】

「非経口投与」および「非経口投与する」という語句は、本明細書で使用する場合、腸内投与および局所投与以外の投与方法で、通常注射による投与方法を意味し、静脈内、筋内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節

50

内、被膜下、クモ膜下、髄腔内、硬膜外、および胸骨内注射および注入が挙げられるが、これらに限らない。

【0065】

「ポリペプチド」または「ペプチド」という用語（同義的に用いてよい）は、ペプチド結合によって結合した3個以上のアミノ酸のポリマー（例えば3～30、12、および60個、または、30～300個、さらには300個超のアミノ酸の長さ）を指す。ポリペプチドは、1つ以上の非天然アミノ酸を含んでもよい。典型的には、ポリペプチドは天然アミノ酸のみを含む。「タンパク質」は、1本以上のポリペプチド鎖を含むことができる。したがって、「タンパク質」という用語は、ポリペプチドを包含する。タンパク質またはポリペプチドは、1つ以上の修飾、例えばグリコシル化、アミド化、リン酸化、ニトロシル化なども含むことができる。「小ペプチド」という用語は、3～30個のアミノ酸の長さ、例えば8～24個のアミノ酸の長さのポリペプチドを説明するのに用いることができる。

10

【0066】

「予防に有効な量」は、必要な用量および期間で、所望の予防成果を得るのに有効な量を指す。典型的には、疾患の初期以前または初期の被検者に予防的な量を用いるので、予防に有効な量は治療上有効な量よりも少なくなる。

【0067】

本明細書で使用する場合、「実質的に同一」（または「実質的に相同」）という用語は、本明細書においては、第1および第2のアミノ酸または核酸配列が、類似の活性、例えば結合活性、結合選択性、または生物学的活性を有するように（または類似の活性を有するタンパク質をコードするように）、第2のアミノ酸または核酸配列と同一または等価なアミノ酸残基（例えば類似の側鎖、例えば保存的アミノ酸置換）またはヌクレオチドを十分な数含む第1のアミノ酸または核酸配列を指すものとして用いる。抗体のケースでは、第2の抗体は、同じ抗原に対して同じ特異性を有するとともに、同じ抗原に対して少なくとも50%の親和性を有する。

20

【0068】

本明細書に開示されている配列と類似または相同な（例えば配列同一性が少なくとも約85%の）配列も、本願の一部である。いくつかの実施形態では、この配列同一性は、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上であることができる。加えて、核酸断片が選択的ハイブリダイゼーション条件（例えば高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）でそのストランドの補体にハイブリダイズする場合、実質的な同一性が存在する。核酸は、全細胞、細胞溶解物、部分精製体、または実質的に純粋な形態で存在してよい。

30

【0069】

統計的有意性は、当該技術分野において既知のいずれかの方法によって割り出すことができる。例示的な統計的検定としては、スチューデントt検定、マンホイットニーUノンパラメトリック検定、およびウイルコクソンノンパラメトリック統計的検定が挙げられる。統計的にいくらか有意な関係のP値は0.05または0.02未満である。特定の結合タンパク質は、統計的に有意である（例えばP値<0.05または0.02）特異性または結合性の差を示してよい。例えば2つの状態間の区別可能な質的または量的な差を示す「誘発する」、「阻害する」、「増強する」、「高める」、「向上させる」、「低下させる」などの用語は、2つの状態間の差、例えば統計的に有意な差を指してよい。

40

【0070】

「治療上有効な用量」は、測定可能なパラメーター、例えば循環IgG抗体のレベルを未治療の被検者と比べて統計的に有意な程度、または少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約60%、もしくは少なくとも約80%調節する。化合物が測定可能なパラメーター、例えば自己免疫を調節する能力は、ヒト自己免疫障害における効能を予測する動物モデル系で評価することができる。あるいは、組成物の上記の特性は、インビトロで化合物がパラメーターを調節する能力を調べることによって、例えば、熟練した開

50

業医に知られているアッセイによって評価できる。

【0071】

本発明のその他の特色および利点は、下記の詳細な説明と特許請求の範囲からさらに明らかになるであろう。本発明の実施形態は、本明細書に記載されている特色のいずれの組み合わせも含むことができる。いかなる場合においても、「実施形態」という用語は、本明細書に開示されている1つ以上の他の特色を除外することはない。

【0072】

F c R n 配列

下記の配列アラインメントは、ヒト F c R n 鎖のアミノ酸配列とラット F c R n 鎖のアミノ酸配列のものである。例示的な F c R n タンパク質は、これらの2つの配列またはそれらの断片、例えばシグナル配列を含まない断片の1つを含むことができる。

シグナル配列 <sub>1</sub> ドメイン

HUMAN: MGVPRPQPWALGLLLFLLPGLG AESHLSLL

RAT: MGMSQPGV - LLSLLLVLLPQTWG AEPRLPLM

<sub>1</sub> ドメイン

\_\_HUMAN: YHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPPQQYLSYNS

\_\_RAT: YHLAAVSDLSTGLPSFWATGWLGAQQYLTYN

<sub>1</sub> ドメイン

\_\_HUMAN: LRGEAEP CGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKE

\_\_RAT: LRQEADPCGAWIWENQVSWYWEKETTDLKSKE

<sub>1</sub> ドメイン <sub>2</sub> ドメイン

KLFLEAFKALGGK - - GP YTLQGLLGCELGPD

QLFLEAIRTLLENQINGT FTLQGLLGCELAPD

<sub>2</sub> ドメイン

\_\_HUMAN: NTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPE

\_\_RAT: NSSLPTAVFALNGEEFMRFNPRRTGNWSGEWPE

<sub>2</sub> ドメイン

\_\_HUMAN: ALAISQRWQQQDKAANKELTFLLFSCPHRLRE

\_\_RAT: TDIVGNLWMKQPEAARKESEFLLTSCPERLLG

<sub>2</sub> ドメイン <sub>3</sub> ドメイン

RGNLEWK EPPSMRLKARPSSPGFSVL

RQNLEWK EPPSMRLKARPGNSGSSVL

<sub>3</sub> ドメイン

\_\_HUMAN: TCSAFSFPPELQLRFLRNLGLAAGTGQGDFGP

\_\_RAT: TCAAFSFPPELKFRFLRNLGLASGSGNCSTGP

<sub>3</sub> ドメイン

\_\_HUMAN: NSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLA

\_\_RAT: NGDGSFHAWSLLEVKRGDEHHYQCQVEHEGLA

<sub>3</sub> ドメイン トランスメンブレン

LE SPAKSSVLVVGIVIGVLLLTAAA

LD SPARSSVPVVGIIILGLLLVVVAI

10

20

30

40

50

	トランスメンブレン	細胞質ドメイン
__HUMAN :	VGGALLW	RRMRSGLPAPWISLRGDDTG V
__RAT :	AGGVLLW	NRMRSGLPAPWLSLSGDDSD

細胞質ドメイン

__HUMAN :	LLPTPGAQAQDADLKDVNVIPTA (配列番号1)	__
RAT :	LLPGGNLPPEAEPQGVNAFPATS (配列番号2)	

【0073】

下記の配列アラインメントは、ヒト 2マイクログロブリンのアミノ酸配列とラット 2  
 ミクログロブリンのアミノ酸配列のものである。例示的なFcRnタンパク質は、これら  
 の2つの配列またはそれらの断片、例えばシグナル配列を含まない断片の1つを含むこと  
 ができる。

	シグナル配列	2マイクログロブリン
2m__human :	MSRSVALAVLALLSLGLEA	IQRTPKIQV
2m__rat :	MARSVTVIFLVLSIAVLA	IQKTPQIQV

2マイクログロブリン

2m__human :	YSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDL	20
2m__rat :	YSRHPPENGKPNFLNCYVVSQFHPPQIEIEL	

2マイクログロブリン

2m__human :	LKNGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTE
2m__rat :	LKNGKKIPNIEMSDLSFSKDW SFYILA HTE

2マイクログロブリン

2m__human :	FTPTEKDEYACRVNHVTL S QPKIVKWDRDM	(配列番号3)
-------------	----------------------------------	---------

2m__rat :	FTPTE TDVYACRVKHVTL KE PKTVTWDRDM	30
-----------	-----------------------------------	----

(配列番号4)

【0074】

FcRnタンパク質の鎖をコードする例示的な核酸配列は、下記の配列を含むこと  
 ができる。

FcRnヌクレオチド配列(ヒト) :

GTTCTTTCAGGTACGAGGAGGGCATTGTTGTCAGTCTGGA  
 CCGAGCCCGCAGAGCCCTCCTCGGCGTCCCTGGTCCCGGC  
 CGTGCCCGCGGTGTC CCGGGAAGGAAGGGGCGGGCCGGGGG  
 TCGGGAGGAGTCA CGTGCC C C C C T C C C G C C C C A G G T C G T C C  
 TCTCAGCATGGGGGTCCCGCGGCCTCAGCCCTGGGCGCTG 40  
 GGGCTCCTGCTCTTTCTCCTTCTGAGCCTGGGCGCAG  
 AAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACTTACC GCGGTGT C  
 CTCGCCTGCCCCGGGGA CTCTGCCTTCTGGGTGTCCGGC  
 TGGCTGGGCCCCGCA GCA G T A C C T G A G C T A C A A T A G C C T G C  
 GGGGCGAGGCGGAGCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAA  
 CCAGGTGTCCTGGTATTGGGAGAAAAGAGACCACAGATCTG  
 AGGATCAAGGAGAAAGCTCTTTCTGGAAGCTTTCAAAGCTT  
 TGGGGGGGAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCTGGG  
 CTGTGA ACTGGGCCCTGACAAACACTCGGTGCCCAACGCC  
 AAGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTTCATGAATTTTCGACC 50

T C A A G C A G G G C A C C T G G G G T G G G G A C T G G C C C G A G G C C C T  
G G C T A T C A G T C A G C G G T G G C A G C A G C A G G A C A A G G C G G C C  
A A C A A G G A G C T C A C C T T C C T G C T A T T C T C C T G C C C G C A C C  
G C C T G C G G G A G C A C C T G G A G A G G G G C C G C G G A A A C C T G G A  
G T G G A A G G A G C C C C C C T C C A T G C G C C T G A A G G C C C G A C C C  
A G C A G C C C T G G C T T T T C C G T G C T T A C C T G C A G C G C C T T C T  
C C T T C T A C C C T C C G G A G C T G C A A C T T C G G T T C C T G C G G A A  
T G G G C T G G C C G C T G G C A C C G G C C A G G G T G A C T T C G G C C C C  
A A C A G T G A C G G A T C C T T C C A C G C C T C G T C G T C A C T A A C A G  
T C A A A A G T G G C G A T G A G C A C C A C T A C T G C T G C A T T G T G C A  
G C A C G C G G G G C T G G C G C A G C C C C T C A G G G T G G A G C T G G A A  
T C T C C A G C C A A G T C C T C C G T G C T C G T G G T G G G A A T C G T C A  
T C G G T G T C T T G C T A C T C A C G G C A G C G G C T G T A G G A G G A G C  
T C T G T T G T G G A G A A G G A T G A G G A G T G G G C T G C C A G C C C C T  
T G G A T C T C C C T T C G T G G A G A C G A C A C C G G G G T C C T C C T G C  
C C A C C C C A G G G G A G G C C C A G G A T G C T G A T T T G A A G G A T G T  
A A A T G T G A T T C C A G C C A C C G C C T G A C C A T C C G C C A T T C C G  
A C T G C T A A A A G C G A A T G T A G T C A G G C C C C T T T C A T G C T G T  
G A G A C C T C C T G G A A C A C T G G C A T C T C T G A G C C T C C A G A A G  
G G G T T C T G G G C C T A G T T G T C C T C C C T C T G G A G C C C C G T C C  
T G T G G T C T G C C T C A G T T T C C C C T C C T A A T A C A T A T G G C T G  
T T T T C C A C C T C G A T A A T A T A A C A C G A G T T T G G G C C C G A A A  
A ( 配列番号 5 )

10  
20  
30  
40

【 0 0 7 5 】

例示的なヒトFcRnの核酸配列（細胞外ドメイン）とGPI DNA配列（太字の小文字）を下に示す。

A T G G G G G T C C C G C G G C C T C A G C C C T G G G C G C T G G G G C T C  
C T G C T C T T T C T C C T T C C T G G G A G C C T G G G C G C A G A A A G C C  
A C C T C T C C C T C C T G T A C C A C C T T A C C G C G G T G T C C T C G C C  
T G C C C C G G G G A C T C C T G C C T T C T G G G T G T C C G G C T G G C T G  
G G C C C G C A G C A G T A C C T G A G C T A C A A T A G C C T G C G G G G C G  
A G G C G G A G C C C T G T G G A G C T T G G G T C T G G G A A A A C C A G G T  
G T C C T G G T A T T G G G A G A A A G A G A C C A C A G A T C T G A G G A T C  
A A G G A G A A G C T C T T T C T G G A A G C T T T C A A A G C T T T G G G G G  
G A A A A G G T C C C T A C A C T C T G C A G G G C C T G C T G G G C T G T G A  
A C T G G G C C C T G A C A A C A C C T C G G T G C C C A C C G C C A A G T T C  
G C C C T G A A C G G C G A G G A G T T C A T G A A T T T C G A C C T C A A G C  
A G G G C A C C T G G G G T G G G G A C T G G C C C G A G G C C C T G G C T A T  
C A G T C A G C G G T G G C A G C A G C A G G A C A A G G C G G C C A A C A A G  
G A G C T C A C C T T C C T G C T A T T C T C C T G C C C G C A C C G C C T G C  
G G G A G C A C C T G G A G A G G G G C C G C G G A A A C C T G G A G T G G A A  
G G A G C C C C C C T C C A T G C G C C T G A A G G C C C G A C C C A G C A G C  
C C T G G C T T T T C C G T G C T T A C C T G C A G C G C C T T C T C C T T C T  
A C C C T C C G G A G C T G C A A C T T C G G T T C C T G C G G A A T G G G C T  
G G C C G C T G G C A C C G G C C A G G G T G A C T T C G G C C C C A A C A G T  
G A C G G A T C C T T C C A C G C C T C G T C G T C A C T A A C A G T C A A A A  
G T G G C G A T G A G C A C C A C T A C T G C T G C A T T G T G C A G C A C G C  
G G G G C T G G C G C A G C C C C T C A G G G T G G A G C T G G A A T C T C C A  
G C C A A G T C C T C C c g g c c g c t c g a c g g g c t a c g a g c a t c a g  
t a a c a c t a c t a g g c g c a g g c c t a c t a c t a t c a c t a c t a c c

50

agcactactacgatttgggccataa (配列番号6)

【0076】

2マイクログロブリン(2)をコードする例示的な核酸配列は、下記の配列を含むことができる。

2マイクログロブリン(B2M)ヌクレオチド(ヒト) :

AATATAAGTGGAGGCGTCGCGCTGGCGGGCATTCCCTGAAGCTGACAGCATTCCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAGAATTCAAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAAATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGACTTTGTCTTTTCAGCAAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTCCAGCCCAAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGTAAGCAGCATCATGGAGGTTTGAAGATGCCCGCATTTGGATTGGATGAATTCCAAATTCCTGCTTGCTTTGCTTTTTTAATAATTGATATGCTTATACACTTACACTTTATGCACAAATAATGTAGGGTTATAATAATGTTAACATGGACATGATCTTCTTTATAAATTCCTACTTTGAGTGTCTGTCTCCA

10  
20  
30

【0077】

FcRn結合抗体

DX2504は、国際公開第2009/131702号および米国特許出願公開第2009-0324614-A1号に記載されているFcRn結合抗体である。国際公開第2009/131702号および米国特許出願公開第2009-0324614-A1号のいずれも、参照により、その全体が本願に組み込まれる。DX2504は、モノクローナル抗体技術と、FcRnポリペプチドまたはFcRnを発現する細胞を標的として用いたファージディスプレイ実験との組み合わせによって作製した。加えて、DX2504の配列を生殖系列化して、免疫原性を低下させた。DX2504の軽鎖および重鎖の配列を下に示す。

40

軽鎖可変領域(配列番号8) :

FR1-L CDR1-L  
QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTGSDVGSYNLVS  
FR2-L CDR2-L FR3-L  
WYQQHPGKAPKLMIY GDSQRPS GVSNRFSGSKSGNTAS  
FR3-L CDR3-L FR4-L  
LTISGLQAEDDADYYC CSYAGSGIYV FGTGTVTVL

50



軽鎖完全長（配列番号16、C<sub>L</sub>：下線）：

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T G S D V G S Y N L V S W Y Q Q  
 H P G K A P K L M I Y G D S Q R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G L  
 Q A E D E A D Y Y C C S Y A G S G I Y V F G T G T K V T V L G Q P K A N P T V T  
L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D G S P V K  
A G V E T T K P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T  
H E G S T V E K T V A P T E C S

重鎖可変領域（配列番号9）：

F R 1 - H C D R 1 - H E V Q 10  
 L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S E Y A M G

F R 2 - H C D R 2 - H  
 W V R Q A P G K G L E W V S S I G S S G G Q T K Y A D S V K G

F R 3 - H C D R 3 - H R  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L A I G D S Y

F R 4 - H 20  
 W G Q G T M V T V S S

重鎖完全長（配列番号17、C<sub>H</sub>：下線）

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S E Y A M G W V R Q A  
 P G K G L E W V S S I G S S G G Q T K Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L A I G D S Y W G Q G T M V T V S S A S T K  
G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G  
A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N  
V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F  
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G  
V E V H N A K T K P R E E Q Y S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K 30  
V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q  
V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G  
S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S  
L S P G K

【0078】

DX2504または前駆体抗体は、FcRnとの結合に加えて、IgG-FcのFcRn発現細胞への結合をブロックすることが示されている（国際公開第2009/131702号の実施例21）。さらに、Tg32Bマウス（マウスFcRnがヒトFcRnによって置換されているマウス）にDX2504を投与したところ、事前にマウスに投与したヒトIgGのレベルが低下した（国際公開第2009/131702号の実施例27）。 40  
 さらに、カニクイザルへのDX2504の投与により、IgG血清レベルが低下した（国際公開第2009/131702号の実施例27）。

【0079】

本発明では、DX2504の軽鎖のCDR3の改変（例えば、本明細書に記載されているシステイン変異体）、または重鎖の定常領域の改変（例えば、本明細書に記載されている欠失変異体）のいずれかにより、DX2504と比べると特性が改善されたFcRn結合抗体が得られることが予想外にも分かった。少なくとも部分的には、DX2504のように、何ラウンドもの配列最適化を行った抗体に対しては、追加の変異を導入してもさらなる最適化は容易には行えないので、この発見は予想外であった。

【0080】

### システイン変異体

本明細書に記載されているDX2504のシステイン変異体は、少なくとも1つのCDR3の最初の位置、例えばDX2504のV<sub>L</sub> CDR3の最初の位置のシステイン残基が欠損しており、Ala、Ser、またはその保存的置換体のような別のアミノ酸残基と置換されている。例示的なシステイン変異体としては、532A-X53-C02（配列番号10として示されているV<sub>L</sub>を有する）および532A-X53-B03（配列番号11として示されているV<sub>L</sub>を有する）が挙げられるが、これらに限らない。このような変異体は、FcRn結合活性を保持し、例えば、10nM未満の解離定数（K<sub>D</sub>）でヒトFcRnに結合する（解離定数は、常法によって割り出すことができる）。いくつかの例では、システイン変異体は2本のV<sub>L</sub>鎖を含み、これらの一方または両方は、V<sub>L</sub> CDR3領域の最初の位置にシステインを有さない。

10

#### 【0081】

本明細書に記載されているシステイン変異体はV<sub>L</sub>鎖を含むことができ、そのCDR1がDX2504のV<sub>L</sub> CDR1（配列番号14、532A-X53-C02のV<sub>L</sub> CDR1と同一である）と、CDR2がDX2504のV<sub>L</sub> CDR2（配列番号15、532A-X53-B03のV<sub>L</sub> CDR2と同一である）と、CDR3がDX2504の改変V<sub>L</sub> CDR3（配列番号12または13、532A-X53-C02または532A-X53-B03のV<sub>L</sub> CDR3）と少なくとも70%（例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、V<sub>L</sub> CDRの1つ以上は、532A-X53-C02または532A-X53-B03の対応するCDRと少なくとも70%の配列同一性を有する。例えば、本開示のシステイン変異体は、V<sub>L</sub> CDR3領域において、SSYAGSGIYV（配列番号12）またはASYAGSGIYV（配列番号13）という配列と少なくとも70%（少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）の同一性を有する。

20

#### 【0082】

別の実施形態では、本開示のシステイン変異体のV<sub>L</sub> CDR全体は、532A-X53-C02または532A-X53-B03のV<sub>L</sub> CDR全体と少なくとも70%の配列同一性を有する。例えば、CDR1、CDR2、およびCDR3領域において、基準CDR配列と少なくとも90%の同一性を有する抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3を合わせた領域内の10個のアミノ酸のうち少なくとも9個が、532A-X53-C02のCDR1、CDR2、およびCDR3を合わせた領域にあるアミノ酸と同一である抗体を指す。

30

#### 【0083】

あるいは、上記の抗体は、V<sub>L</sub> CDR3領域に、SSYAGSGIYV（配列番号12）またはASYAGSGIYV（配列番号13）の配列と比べて、最大1個、最大2個、最大3個、最大4個、または最大5個のアミノ酸置換を有することができる。いくつかの実施形態では、本開示のシステイン変異体は、V<sub>L</sub> CDR3領域に、DX2504のCDR3領域と比べて最大3個の置換を含むことができる。アミノ酸置換の1つ以上は保存的アミノ酸置換であることができる。

40

#### 【0084】

さらに、本開示のシステイン変異体抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3領域に、532A-X53-C02または532A-X53-B03のCDR1、CDR2、およびCDR3領域の配列と比べて最大1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個、最大10個、または最大15個のアミノ酸置換を有することができる。いくつかの実施形態では、本開示のシステイン変異体抗体は、V<sub>L</sub> CDR1、CDR2、およびCDR3領域に合わせて最大10個の置換を含むことができる。1つの例では、アミノ酸置換の1つ以上は保存的アミノ酸置換である。

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、本開示のシステイン変異体は、532A-X53-C02のV<sub>L</sub>配列（配列番号10）または532A-X53-B03のV<sub>L</sub>配列（配列番号11）

50

と少なくとも70%（例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、または98%）の配列同一性を有するV<sub>L</sub>鎖を含む。1つの例では、本開示のシステイン変異体は、532A-X53-C02または532A-X53-B03と同じV<sub>L</sub> CDR3領域と、任意により、これらの2つの例示的な変異体と同じV<sub>L</sub> CDR1およびCDR2領域を含む。

#### 【0086】

2つのアミノ酸配列の「同一性(%)」は、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990のアルゴリズムをKarlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993に記載のように修正したものを用いて割り出すことができる。このようなアルゴリズムをAltschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)に組み込む。XBLASTプログラムで、スコア=50、語長=3にてBLASTタンパク質検索を実施して、目的のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。2つの配列間にギャップが存在する場合、Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997に記載されているように、Gapped BLASTを用いることができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いるときには、各プログラム(例えばXBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを用いることができる。

10

20

#### 【0087】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているシステイン変異体は、フレームワーク領域(FR)内に、上記および実施例1に後述されている2つの例示的な変異体と比べて、1つ以上の変異(例えば保存的アミノ酸置換)を含むことができる。当該技術分野において知られているように、FR領域内の変異は、抗体の抗原結合活性に作用する可能性が低い。別の実施形態では、本明細書に記載されているシステイン変異体は、CDR領域の1つ以上の中に、532A-X53-C02または532A-X53-B03のCDR領域と比べて、1つ以上の変異(例えば1個、2個、3個の保存的アミノ酸置換のような変異)を含むことができる。好ましくは、このような変異体は、親抗体と同じ、抗原結合を担う領域/残基(CDR内の同じ特異性決定残基など)を保持する。

30

#### 【0088】

一般に、システイン残基は、ユニークな特性を有するタンパク質をもたらす。システイン残基は、他のシステインと共有結合を形成できるからである。システインの変異により、特性が有意に改変されたタンパク質が得られる場合が多い。したがって、サイズ排除クロマトグラフィー(図1)およびSDS-PAGE解析(図2)によって測定したところ、軽鎖のCDR3にセリン(C54-C02)またはアラニン(X54-B03)のいずれかに変異したシステインを有する抗体が、DX-2504よりも同質であることが分かったのは予想外であった。30日間、37のインキュベーションの間(図3)、またはpH8.3での15日のインキュベーション後(図4)に、システイン変異体が、IgG種モノマー率に関して、安定性が高くなるのも予想外であった。抗体のCDR内の変異は、抗原結合の親和性を低下させる場合が多い。したがって、DX-2504の軽鎖のCDR3内のシステインの変異が、抗原結合の親和性に作用しなかった(図7および8)のはさらに予想外であった。

40

#### 【0089】

上記のシステイン変異体のいずれも、重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)をさらに含むことができ、この重鎖可変領域は、V<sub>H</sub> CDR1領域、V<sub>H</sub> CDR2領域、およびV<sub>H</sub> CDR3領域を含む。このV<sub>H</sub>は、DX2504のV<sub>H</sub>(配列番号9)またはその機能的変異体と同じであることができる。いくつかの実施形態では、この機能的変異体のV<sub>H</sub> CDRは、DX2504のV<sub>H</sub> CDR(配列番号22、23、および24)と少なくとも70%（例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）の配列同一性を有

50

する。1つの例では、 $V_H$  CDRの1つ以上は、DX2504の対応する $V_H$  CDRと少なくとも70%の配列同一性、例えば、 $V_H$  CDR3領域において、LAIGDSY（配列番号24）の配列と少なくとも70%（少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）の相同性を有する。

【0090】

別の例では、上記の機能的変異体の $V_H$  CDR全体は、DX2504の $V_H$  CDR全体と少なくとも70%の配列同一性を有する。例えば、CDR1、CDR2、およびCDR3領域において、基準CDR配列と少なくとも90%の相同性を有する抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3領域全体において、10個のアミノ酸のうち少なくとも9個が、DX2504のCDR1、CDR2、およびCDR3領域全体にあるアミノ酸と同一である抗体を指す。

10

【0091】

あるいは、上記の機能的変異体は、CDR3領域に、DX2504のCDR3配列（LAIGDSY、配列番号24）と比べて、最大1個、最大2個、最大3個、最大4個、または最大5個のアミノ酸置換を含むことができる。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、 $V_H$  CDR3領域に、DX2504のCDR3領域と比べて、最大3個の置換を含む。1つの例では、アミノ酸置換の1つ以上は保存的アミノ酸置換である。

【0092】

さらに、上記の機能的変異体は、CDR1、CDR2、およびCDR3領域に、DX2504のCDR1、CDR2、およびCDR3領域の配列と比べて、最大1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個、最大10個、最大11個、最大12個、最大13個、最大14個、または最大15個のアミノ酸置換を含むことができる。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、 $V_H$  CDR1、CDR2、およびCDR3領域全体に最大10個の置換を含む。1つの例では、アミノ酸置換の1つ以上は保存的アミノ酸置換である。

20

【0093】

いくつかの実施形態では、上記の機能的変異体は、DX2504の $V_H$  配列（配列番号9）と少なくとも70%（例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、または98%）の配列同一性を有する $V_H$  鎖を含む。1つの例では、機能的変異体は、DX2504と同じ $V_H$  CDR3領域と、任意により、DX2504と同じ $V_H$  CDR1およびCDR2領域を含む。

30

【0094】

所望の場合、本明細書に記載されているようなDX2504重鎖の機能的変異体は、DX2504のフレームワーク領域（FR）内に1つ以上の変異（例えば保存的アミノ酸置換）を含むことができる（上記の説明を参照されたい）。当該技術分野において知られているように、FR領域内の変異は、抗体の抗原結合活性に作用する可能性が低い。別の実施形態では、本明細書に記載されているシステイン変異体は、CDR領域の1つ以上に、DX2504と比べて、1つ以上の変異（例えば1個、2個、または3個の保存的アミノ酸置換のような変異）を含むことができる。好ましくは、このような変異体は、親抗体と同じ、抗原結合を担う領域/残基（同じCDR内特異性決定残基など）を保持する。

40

【0095】

1つの例では、本明細書に記載されているDX2504のシステイン変異体は、532A-X53-C02または532A-X53-B03と、少なくとも70%（例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）相同な軽鎖と、DX2504のCDRと同じCDR（例えばDX2504の重鎖可変領域と同じ重鎖可変領域）を含む重鎖を含む。別の例では、本開示の変異体は、532A-X53-C02または532A-X53-B03と同じ $V_L$ と、DX2504と同じ $V_H$ を含む。

【0096】

欠失変異体

予想外にも、DX2504の重鎖のC末端リジン残基を欠失させたところ、動物モデル

50

において、DX2504と比べて、抗体滞留量が高いとともに、IgGの減少度が大きい抗FcRn抗体(DX2507)が得られる(図13および14)ことも発見した。

【0097】

したがって、本明細書には、その重鎖において、DX2504の重鎖と比べてC末端リジン残基が欠損している欠失変異体も記載されている。より具体的には、本明細書に記載されている欠失変異体の重鎖は、さもなければ、DX2504の重鎖(配列番号17)内のC末端リジン残基に対応するアミノ酸残基の欠失を除き、DX2504の重鎖(配列番号17)、または上記のようなDX2504の機能的変異体のいずれかの重鎖と同一であることができる。このような重鎖の1例は、下記の実施例2に記載されているDX2507の重鎖(配列番号19)である。

10

【0098】

本開示の欠失変異体はさらに軽鎖を含むことができ、この軽鎖は、DX2504のV<sub>L</sub>領域、または本明細書に記載されているシステイン変異体のいずれかのV<sub>L</sub>領域を含むことができる。

【0099】

いくつかの例では、本開示の欠失変異体は、DX2504、532A-X53-C02、または532A-X53-B03と同じV<sub>L</sub> CDR(例えば、DX2504、532A-X53-C02、または532A-X53-B03と同じV<sub>L</sub>)を含む軽鎖と、DX2504と同じV<sub>H</sub> CDR(例えばDX2504と同じV<sub>H</sub>)を含む重鎖と、DX2504の重鎖のC末端リジン残基に対応する位置に欠失を有する重鎖定常領域を含む。

20

【0100】

本明細書に記載されているシステイン変異体および欠失変異体のいずれも、10nM未満の解離定数(K<sub>D</sub>)で、ヒトFcRnに結合できる。

【0101】

本明細書に記載されている抗FcRn抗体は、本明細書に記載されているアミノ酸配列を有するのに加えて、いずれかの構造フレームワークを有してもよい。したがって、例えば、上記のCDR1、CDR2、およびCDR3領域を「従来の」抗体フレームワークに埋め込んでも、scFvまたはFabフレームワークに埋め込んでもよい。本明細書に記載されている抗FcRn抗体は、完全長抗体であることも、その抗原結合性断片、例えば、Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fv、またはScFv抗体であることもできる。本明細書に記載されている抗FcRn抗体は、マウス抗体(例えばハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体)のような非ヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であることができる。

30

【0102】

本明細書に記載されている抗FcRn抗体(例えば本明細書に記載されているシステイン変異体のいずれかまたは欠失変異体のいずれか)のいずれかのV<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>をコードするヌクレオチド配列を含む核酸も本開示の範囲内である。このような核酸配列は、発現ベクターに挿入でき、このベクターは、組換え技術による抗FcRn抗体の産生のために、好適な宿主細胞(例えば大腸菌細胞のような菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳類細胞)に導入できる。

40

【0103】

マウスモノクローナル抗体の作製法

モノクローナル抗体の作製法が説明されている(Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988))。場合によっては、第1の工程として、げっ歯類、例えばマウスを抗原性ポリペプチドで免疫して、抗体応答を生じさせる。FcRnはユビキタスに発現し、種間で高い相同性を示すので、ポリペプチドでの免疫では、高親和性FcRn特異的モノクローナル抗体またはFcRnモノクローナルブロック抗体の産生は成功していなかった。この問題を解決するために、DNAワクチンの投与を行うことができる(Casta

50

gliola et al., J. Immunology 160:1458 (1998))。DNAワクチンの投与は、FcRnまたはその断片をコードするcDNAコンストラクトでげっ歯類、例えばマウスを免疫することを含む。免疫は、筋内投与、腹腔内投与、皮下投与、静脈内投与、皮内投与、またはリンパ節への直接投与によって行うことができる。1つの実施形態では、免疫は筋内投与で行う。DNAワクチンは、アジュバント、例えばフロイント完全アジュバント、またはフロイント不完全アジュバントとともに投与することができる。DNAワクチンの投与は、心臓毒の投与により抗体価を向上させることによって行うことができる。心臓毒の投与により、細胞死と、投与したDNAワクチンの細胞内取り込みを増加させる細胞の再生を惹起する。心臓毒は、より強固な免疫応答をもたらす炎症を増大させることもできる。

10

## 【0104】

抗体分泌細胞(B細胞)をげっ歯類から単離する。典型的には、B細胞は、げっ歯類の脾臓から単離でき、骨髓腫細胞株と融合できる。骨髓腫細胞株は、抗体を産生しない不死化細胞株である。骨髓腫細胞株は、P3-X63Ag8、X63Ag8.653、Sp2/0-Ag14、FO、NSI/1-Ag4-1、NSO/1、FOX-NY、Y3-Ag1.2.3、YB2/0、およびIR983Fから選択できるが、これらに限らない。

## 【0105】

脾細胞を骨髓腫細胞株と融合してハイブリドーマを形成する。これらの2つの細胞種をポリエチレングリコールと適切な期間(例えば5分間)混合することによって、融合を媒介することができる。形成されたハイブリドーマは、適切な選択培地(例えばHAT)を用いて細胞培養液中で増殖させ、FcRnに対するモノクローナル抗体を産生する能力についてスクリーニングする。スクリーニングは、既知の免疫学的技法、例えばELISAを用いて行うことができる。

20

## 【0106】

FcRn特異的モノクローナル抗体を作製する別のアプローチは、トランスジェニックFcRnノックアウトマウスを可溶性ヒトFcRnで免疫することである(国際公開第02/43658号を参照されたい)。国際公開第02/43658号には、そのゲノムが内因性FcRn遺伝子のホモ欠損を含み、前記ホモ欠損が機能的FcRnタンパク質の発現を阻止するトランスジェニックマウスが記載されている。本発明のモノクローナル抗体は、そのゲノムが内因性FcRn遺伝子のホモ欠損を含み、前記ホモ欠損が機能的FcRnタンパク質の発現を阻止するトランスジェニックマウスでは作製されない。本発明のモノクローナル抗体は、そのゲノムが内因性FcRn遺伝子のホモ欠損を含み、前記ホモ欠損が機能的FcRnタンパク質の発現を阻止するトランスジェニックマウス由来のB細胞からは構成されない。

30

## 【0107】

ヒト化抗FcRn抗体ディスプレイライブラリー

ディスプレイライブラリーを用いて、FcRnに結合する抗体を同定することができる。ディスプレイライブラリーは、実体の集合であり、各実体は、利用可能なポリペプチド構成成分、およびそのポリペプチド構成成分をコードまたは同定する回収可能な構成成分を含む。ポリペプチド構成成分は多様であるため、さまざまなアミノ酸配列が提示される。ポリペプチド構成成分は、いずれかの長さ、例えば3個のアミノ酸~300個超のアミノ酸であることができる。選択では、ライブラリーの各メンバーのポリペプチド構成成分をFcRnでプローブし、そのポリペプチド構成成分がFcRnに結合する場合、そのディスプレイライブラリーのメンバーは、典型的には支持体上に担持することによって同定する。加えて、ディスプレイライブラリーの実体は、2個以上のポリペプチド構成成分、例えばsFabの2本のポリペプチド鎖を含むことができる。

40

## 【0108】

担持したディスプレイライブラリーメンバーを支持体から回収して解析する。解析は、増幅、およびその後行われる類似条件または異なる条件下における選択を含むことができる。例えば、陽性選択と陰性選択を交互に行うことができる。解析は、ポリペプチド

50

構成成分のアミノ酸配列の決定、および詳細な特徴付けのためのポリペプチド構成成分の精製も含むことができる。

【0109】

ディスプレイライブラリーにはさまざまなフォーマットを用いることができる。例としては、以下のものが挙げられる。

【0110】

ファージディスプレイ：1つのフォーマットでは、ウイルス、特にバクテリオファージを利用する。このフォーマットは「ファージディスプレイ」と呼ばれている。タンパク質構成成分は典型的には、バクテリオファージのコートタンパク質に共有結合する。この結合は、コートタンパク質に融合するタンパク質構成成分をコードする核酸の翻訳に起因する。この結合は、フレキシブルなペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、または終止コドンの抑制により組み込まれるアミノ酸を含むことができる。ファージディスプレイは例えば、米国特許第5,223,409号、Smith(1985)Science 228:1315-1317、国際公開第92/18619号、国際公開第91/17271号、国際公開第92/20791号、国際公開第92/15679号、国際公開第93/01288号、国際公開第92/01047号、国際公開第92/09690号、国際公開第90/02809号、de Haard et al.(1999)J.Biol.Chem 274:18218-30、Hoogenboom et al.(1998)Immunotechnology 4:1-20、Hoogenboom et al.(2000)Immunol Today 2:371-8、Fuchs et al.(1991)Bio/Technology 9:1370-1372、Hay et al.(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81-85、Huse et al.(1989)Science 246:1275-1281、Griffiths et al.(1993)EMBO J 12:725-734、Hawkins et al.(1992)J Mol Biol 226:889-896、Clackson et al.(1991)Nature 352:624-628、Gram et al.(1992)PNAS 89:3576-3580、Garrard et al.(1991)Bio/Technology 9:1373-1377、およびHoogenboom et al.(1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137に記載されている。

10

20

30

【0111】

ファージディスプレイ系は、繊維状ファージ(fl、fd、およびM13ファージ)、ならびに他のバクテリオファージに対して開発されている。繊維状ファージディスプレイ系では典型的には、マイナーコートタンパク質(遺伝子IIIタンパク質など)、およびメジャーコートタンパク質である遺伝子VIIタンパク質への融合を利用するが、遺伝子VIタンパク質、遺伝子VIIタンパク質、遺伝子IXタンパク質、またはこれらのドメインのような他のコートタンパク質への融合を用いることもできる(例えば国際公開第00/71694号を参照されたい)。1つの実施形態では、この融合は、遺伝子IIIタンパク質のドメイン、例えばアンカードメインまたは「スタンプ」に対するものである(例えば、遺伝子IIIタンパク質のアンカードメインの説明については米国特許第5,658,727号を参照されたい)。非ペプチド結合を用いて、提示されているタンパク質をコートタンパク質に物理的に結合させることも可能である。

40

【0112】

タンパク質構成成分を提示しているバクテリオファージを増殖させ、標準的なファージ調製法(例えば、増殖培地からのPEG沈殿)を用いて回収することができる。個々のディスプレイファージを選択後、増幅してから、所定のファージに感染した細胞から、またはファージ自体から、所定のタンパク質構成成分をコードする核酸を単離することができる。個々のコロニーまたはプラークを取り、核酸を単離して配列を決定することができる。

【0113】

50

他のディスプレイフォーマット：他のディスプレイフォーマットとしては、細胞ベースのディスプレイ（例えば国際公開第03/029456号を参照されたい）、タンパク質-核酸融合体（例えば米国特許第6,207,446号を参照されたい）、およびリボソームディスプレイ（例えばMattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022、Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92、Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328:404-30、およびSchaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35を参照されたい）が挙げられる。

#### 【0114】

足場：ディスプレイの足場としては、抗体（例えばFab断片、一本鎖Fv分子（scFv）、単ドメイン抗体、ラクダ抗体、およびラクダ化抗体）、T細胞レセプター、MHCタンパク質、細胞外ドメイン（例えばフィブロネクチンIII型反復ドメイン、EGF反復ドメイン）、プロテアーゼインヒビター（例えばKunitzドメイン、Ecotin、BPTIなど）、TPR反復ドメイン、トリフォイル構造、ジンクフィンガードメイン、DNA結合タンパク質、特に単量体のDNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、酵素、例えばプロテアーゼ（特に不活化プロテアーゼ）、RNase、シャペロン、例えばチオレドキシンおよび熱ショックタンパク質、細胞内シグナル伝達ドメイン（SH2およびSH3ドメインなど）、線状および拘束ペプチド、ならびに線状ペプチド基質を挙げることができる。ディスプレイライブラリーは、合成および/または天然の多様性を含むことができる。例えば米国特許出願公開第2004-0005709号を参照されたい。

#### 【0115】

ディスプレイ技術を用いて、標的の特定のエピトープと結合する抗体を得ることもできる。これは、例えば、特定のエピトープが欠損しているか、または、エピトープ内に変異、例えばアラニンへの変異を有する非標的分子との競合を用いて行うことができる。このような非標的分子は、後述されているような陰性選択手順において、ディスプレイライブラリーが標的に結合したときの競合分子として、または、例えば標的に特異的でないディスプレイライブラリーメンバーを解離させる洗浄溶液中に捕捉するための前溶出剤として用いることができる。

#### 【0116】

反復選択：1つの実施形態では、ディスプレイライブラリー技術は、反復モードで用いる。第1のディスプレイライブラリーを用いて、標的と結合する1つ以上の抗体を同定する。続いて、変異誘発法を用いて、これらの同定された抗体を変化させて、第2のディスプレイライブラリーを形成する。例えば、より高ストリンジェントか、またはより競合的な結合および洗浄条件を用いて、第2のライブラリーから親和性がより高い抗体を選択する。

#### 【0117】

いくつかの実施態様では、変異誘発では、結合界面に存在することが知られているか、存在する可能性が高い領域を標的とする。抗体のケースでは、変異誘発は、本明細書に記載されているような重または軽鎖のCDR領域に対して行うことができる。さらに、変異誘発は、CDRの近くか、またはCDRに隣接するフレームワーク領域に対して行うことができる。抗体のケースでは、変異誘発は、1つまたは数個のCDRに限定して、例えば、正確に段階的に改善することもできる。例示的な変異誘発技法としては、エラープロードンPCR、組換え、DNAシャッフリング、部位特異的変異誘発、およびカセット式変異誘発が挙げられる。

#### 【0118】

反復選択の1つの例では、本明細書に記載されている方法を用いて、まず、標的に対して少なくとも最小の結合特異性または最小の活性で、例えば1nM、10nM、または100nM未満の結合平衡解離定数でFcRnと結合するディスプレイライブラリーから抗

10

20

30

40

50



体を同定する。変異を導入するための鋳型核酸として、最初に同定された抗体をコードする核酸配列を用いて、例えば、最初の抗体と比べて特性（例えば結合親和性、速度論的特性、または安定性）が高まっている第2の抗体を同定する。

【0119】

オフレート選択：解離速度が遅いと、特に抗体とその標的との相互作用に関して、親和性が高いと予測できるので、本明細書に記載されている方法を用いて、標的との結合相互作用について所望の解離速度（例えば低下した解離速度）を有する抗体を単離することができる。

【0120】

ディスプレイライブラリーから解離速度が遅い抗体を選択するために、そのライブラリーを固定化標的と接触させる。続いて、非特異的に、または弱く結合している生体分子を除去する第1の溶液で、固定化標的を洗浄する。続いて、飽和量の遊離標的または標的特異的高親和性競合モノクローナル抗体、すなわち、粒子に付着していない標的の複製を含む第2の溶液で、結合抗体を溶出する。遊離標的は、標的から解離した生体分子に結合する。かなり低濃度の固定化標的に対して、飽和量の遊離標的によって、再結合を効果的に防止する。

10

【0121】

第2の溶液は、実質的に生理的な溶液条件またはストリンジェントな溶液条件を有することができる。典型的には、第2の溶液の溶液条件は、第1の溶液の溶液条件と同一である。第2の溶液の画分を時間順に回収して、早い画分と遅い画分とを区別する。遅い画分は、早い画分中の生体分子よりも遅い速度で標的から解離する生体分子を含む。

20

【0122】

さらに、長時間のインキュベーション後も標的と結合したままのディスプレイライブラリーメンバーを回収することもできる。これらのメンバーは、カオトロピック条件を用いて解離させることも、標的に結合させたままで増幅することもできる。例えば、標的に結合したファージを菌細胞に接触させることができる。

【0123】

特異性の選択またはスクリーニング：本明細書に記載されているディスプレイライブラリースクリーニング法は、非標的分子に結合するディスプレイライブラリーメンバーを除く選択またはスクリーニングプロセスを含むことができる。非標的分子の例としては、磁気ビーズ上のストレプトアビジン、ブロッキング剤（ウシ血清アルブミン、無脂肪ウシミルク、いずれかの捕捉用もしくは標的固定化モノクローナル抗体など）、またはヒトFcRn標的を発現しない非トランスフェクト細胞が挙げられる。

30

【0124】

1つの実施態様では、いわゆる「陰性選択」工程を用いて、標的と、関連する非標的分子と、関連するが別個の非標的分子とを区別する。ディスプレイライブラリーまたはそのプールを非標的分子と接触させる。非標的に結合しない試料のメンバーを回収して、その後に行う、標的分子との結合についての選択で用いるか、またはその後に行う、陰性選択でも使用する。陰性選択工程は、標的分子に結合するライブラリーメンバーを選択する前または後で行うことができる。

40

【0125】

別の実施態様では、スクリーニング工程を用いる。標的分子に結合するディスプレイライブラリーメンバーを単離した後、単離した各ライブラリーメンバーの、非標的分子（例えば、上に列挙した非標的）に結合する能力について試験する。例えば、高スループットELISAスクリーンを用いて、このデータを得ることができる。ELISAスクリーンを用いて、各ライブラリーメンバーの標的への結合と、関連する標的もしくは標的のサブユニット（例えばラットFcRn、2マイクログロブリン）に対する種間反応性に関する、pH6またはpH7.5などの異なる条件下における定量的データを得ることもできる。（例えばコンピュータおよびソフトウェアを用いて）非標的および標的の結合データを比較して、標的に特異的に結合するライブラリーメンバーを同定する。

50

## 【0126】

他の発現ライブラリー

例えば抗体のタンパク質アレイ（例えば De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18: 989 - 994 を参照されたい）、gt11 ライブラリー、ツーハイブリッドライブラリーなどを含む他のタイプのタンパク質の集合（例えば発現ライブラリー）を用いて、特定の特性（例えば FcRn に結合する能力および / または FcRn を調節する能力）を有するタンパク質を同定することができる。

## 【0127】

抗体ライブラリー

1つの実施形態では、ライブラリーはポリペプチドの多様なプールを提示し、そのそれぞれは、免疫グロブリンドメイン、例えば免疫グロブリン可変ドメインを含む。ディスプレイライブラリーは、例えば、ヒト抗原を認識するヒトまたは「ヒト化」抗体を同定するのに特に有用である。自己免疫障害のようなヒトの障害を治療する治療薬として、このような抗体を用いることができる。抗体の定常およびフレームワーク領域がヒトのものであるので、これらの治療抗体は、それ自体を抗原として認識および標的化するのを回避できる。定常領域を最適化して、ヒト免疫系のエフェクター機能を動員することもできる。このインビトロディスプレイ選択プロセスにより、正常なヒト免疫系が自己抗原に対する抗体を産生できない点が克服される。

10

## 【0128】

典型的な抗体ディスプレイライブラリーは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインを含むポリペプチドを提示する。「免疫グロブリンドメイン」は、免疫グロブリン分子の可変または定常ドメインに由来するドメインを指す。免疫グロブリンドメインは典型的には、約7本のストランドで形成された2つのシートと、保存ジスルフィド結合を含む（例えば、A. F. Williams and A. N. Barclay, 1988, Ann. Rev. Immunol. 6: 381 - 405 を参照されたい）。ディスプレイライブラリーは、（例えば2本のポリペプチド鎖を用いて）Fab断片として、または（例えば1本のポリペプチド鎖を用いて）一本鎖Fvとして抗体を提示することができる。他のフォーマットも用いることができる。

20

## 【0129】

Fabおよび他のフォーマットの場合のように、提示された抗体は、軽鎖および / または重鎖の一部として、1つ以上の定常領域を含むことができる。1つの実施形態では、各鎖は、例えばFabの場合のように、1つの定常領域を含む。別の実施形態では、追加の定常領域が提示される。

30

## 【0130】

抗体ライブラリーは、数多くのプロセスによって構築できる（例えば、de Haard et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 18218 - 30、Hoogenboom et al., 1998, Immunotechnology 4: 1 - 20、およびHoogenboom et al., 2000, Immunol. Today 21: 371 - 378 を参照されたい）。さらに、各プロセスの要素を他のプロセスの要素と組み合わせることができる。単一の免疫グロブリンドメイン（例えばV<sub>H</sub>もしくはV<sub>L</sub>）、または複数の免疫グロブリンドメイン（例えばV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>）に変異を導入するように、これらのプロセスを用いることができる。変異は、免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、およびFR4の領域（重鎖および軽鎖可変ドメインのいずれかおよび両方の領域を指す）の1つ以上の領域に導入できる。1つの実施形態では、変異は、所定の可変ドメインの3つのすべてのCDRに導入する。別の実施形態では、変異は、例えば重鎖可変ドメインのCDR1およびCDR2に導入する。いずれの組み合わせも実現可能である。1つのプロセスでは、抗体ライブラリーは、核酸の対応する領域に、CDRをコードする多様なオリゴヌクレオチドを挿入することによって構築する。オリゴヌクレオチドは、単量体のヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを用いて合成できる。例えば、Knappik et al

40

50

、2000、J. Mol. Biol. 296: 57-86には、トリヌクレオチド合成と、オリゴヌクレオチドを受容するための人工付加制限酵素認識部位を持つ鋳型を用いて、オリゴヌクレオチドをコードするCDRを構築するための方法が記載されている。

【0131】

別のプロセスでは、動物、例えばげっ歯類をFcRnで免疫する。この動物は任意により抗原でブーストして、さらに応答を刺激する。続いて、脾臓細胞をこの動物から単離し、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>ドメインをコードする核酸を増幅し、ディスプレイライブラリーで発現させるためにクローニングする。

【0132】

さらに別のプロセスでは、ナイーブ生殖系列免疫グロブリン遺伝子から増幅した核酸から抗体ライブラリーを構築する。増幅した核酸は、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>ドメインをコードする核酸を含む。免疫グロブリンをコードする核酸の供給源は後述されている。増幅としては、例えば保存定常領域にアニールするプライマーを用いるPCR、または別の増幅法を挙げることができる。

10

【0133】

免疫グロブリンドメインをコードする核酸は、例えばヒト、霊長類、マウス、ウサギ、ラクダ、ラマ、またはげっ歯類の免疫細胞から得ることができる。1つの例では、免疫細胞は、特定の特性について選択する。さまざまな成熟段階のB細胞を選択できる。別の例では、B細胞はナイーブである。

【0134】

1つの実施形態では、蛍光活性化細胞選別(FACS)を用いて、表面結合IgM、IgD、またIgG分子を発現するB細胞を選別する。さらに、IgGの異なるアイソタイプを発現するB細胞を単離できる。別の実施形態では、BまたはT細胞をインビトロで培養する。この細胞は、インビトロで、例えば、フィーダー細胞とともに培養するか、マイトジェンまたは他の調節試薬(CD40、CD40リガンド、もしくはCD20に対する抗体、ホルボールミリステートアセテート、細菌由来リポ多糖類、コンカナバリンA、フィトヘムグルチニン、またはアメリカヤマゴボウマイトジェンなど)を添加することによって刺激することができる。

20

【0135】

1つのさらなる実施形態では、上記のB細胞は、自己免疫障害、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、脈管炎、シェーグレン症候群、全身性硬化症、または抗リン脂質症候群を有する被検者から単離する。この被検者は、ヒトまたは動物、例えば、ヒト疾患の動物モデル、または類似の障害を有する動物であることができる。1つのさらなる実施形態では、上記のB細胞は、ヒト免疫グロブリン座を含むヒト以外のトランスジェニック動物から単離する。

30

【0136】

1つの実施形態では、上記のB細胞は、体細胞超変異のプログラムを活性化した。上記のB細胞は、例えば、抗免疫グロブリン、抗CD40、および抗CD38抗体で処理することによって、免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異誘発をもたらすように刺激することができる(例えばBergthorsdottir et al., 2001, J. Immunol. 166: 2228を参照されたい)。1つの実施形態では、B細胞はナイーブである。

40

【0137】

免疫グロブリン可変ドメインをコードする核酸は、下記の例示的な方法によって、天然のレパートリーから単離できる。まず、RNAを免疫細胞から単離する。(例えば、キャップ構造を有さないRNAを仔ウシ腸ホスファターゼで分解することによって)完全長(すなわちキャップ構造を有する)mRNAを分離する。続いて、タバコ酸ピロホスファターゼによってキャップ構造を除去し、逆転写を用いてcDNAを生成する。

【0138】

第1の(アンチセンス)鎖の逆転写は、いずれかの方法で、いずれかの好適なプライマ

50

ーにより行うことができる。例えば、de Haard et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 18218-30を参照されたい。プライマー結合領域は、例えば、免疫グロブリンの異なるアイソタイプを逆転写するために、異なる免疫グロブリン間で一定であることができる。プライマー結合領域はまた、免疫グロブリンの特定のアイソタイプに特異的であることもできる。典型的には、プライマーは、少なくとも1つのCDRをコードする配列の3'側である領域に対して特異的である。1つの実施形態では、ポリdTプライマーを用いてよい(重鎖遺伝子に対しては、ポリdTプライマーを用いるのが好ましい可能性がある)。

#### 【0139】

逆転写した鎖の3'末端に合成配列をライゲーションできる。この合成配列は、逆転写後、PCR増幅の中にフォワードプライマーを結合させるプライマー結合部位として用いることができる。合成配列の使用により、利用可能な多様性を完全に得るために異なるフォワードプライマーのプールを用いる必要性を排除できる。

#### 【0140】

続いて、例えば1回以上のラウンドを用いて、可変ドメインをコードする遺伝子を増幅する。複数のラウンドを用いる場合、忠実度の向上のために、ネステッドプライマーを用いることができる。続いて、増幅した核酸をディスプレイライブラリーベクターにクローニングする。

#### 【0141】

##### 2次スクリーニング法

標的に結合する候補ライブラリーメンバーを選択した後、各候補ライブラリーメンバーをさらに解析して、例えば、標的に対するその結合特性をさらに特徴付けることができる。各候補ライブラリーメンバーに対して、1つ以上の2次スクリーニングアッセイを行うことができる。このアッセイは、結合特性、触媒特性、阻害特性、生理学的特性(例えば、細胞障害性、腎クリアランス、免疫原性)、構造的特性(例えば、安定性、コンホメーション、オリゴマー形成状態)、または別の機能的特性に関するアッセイであることができる。同じアッセイを、繰り返し、ただし条件を変えて用いて、例えばpH感受性、イオン感受性、または温度感受性を割り出すことができる。

#### 【0142】

必要に応じて、アッセイでは、ディスプレイライブラリーメンバーを直接か、所定のポリペプチドをコードする核酸から生成した組換えポリペプチドか、または所定のポリペプチドの配列に基づき合成した合成ペプチドを用いることができる。結合特性に関する例示的なアッセイとしては、以下のものが挙げられる。

#### 【0143】

ELISA: 発現ライブラリーから選択した抗体の結合特性についても、ELISAを用いて評価することができる。例えば、底面を標的(例えば限定量の標的)でコーティングしたマイクロタイタープレートに、各抗体を接触させる。そのプレートを緩衝液で洗浄し、非特異的に結合したポリペプチドを除去する。続いて、被験抗体、例えば、その抗体のタグまたは定常部分を認識できる抗体でプレートをプローブすることによって、プレートに結合した抗体の量を割り出す。適切な基質が与えられると、発色生成物を生じさせるアルカリホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素に、検出抗体を結合させる。

#### 【0144】

ディスプレイライブラリーに由来する抗体のケースでは、抗体は細胞から精製することも、例えば繊維状バクテリオファージコートへの融合体として、ディスプレイライブラリーフォーマットでアッセイすることもできる。別のタイプのELISAでは、発現ライブラリーから選択した各抗体を用いて、マイクロタイタープレートの異なるウェルをコーティングする。続いて、定常標的分子を用いてELISAを行って、各ウェルにクエリーを行う。

#### 【0145】

10

20

30

40

50

ホモジニアス結合アッセイ：ホモジニアスアッセイ、すなわち、アッセイのすべての構成成分を加えた後に、追加の流体操作を必要としないアッセイを用いて、候補抗体の標的との結合相互作用を解析することができる。例えば、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) をホモジニアスアッセイとして用いることができる (例えば、Lakowiczらの米国特許第5,631,169号、Stavrianoopoulosらの米国特許第4,868,103号を参照されたい)。第2の分子が第1の分子に近接している場合、第2の分子 (例えば標的) 上の蛍光標識が放出蛍光エネルギーを吸収できるように、第1の分子上のフルオロフォア標識 (例えば画分中で同定された分子) を選択する。第2の分子上の蛍光標識は、移行したエネルギーに吸収される時に、蛍光を発する。標識間のエネルギー移行効率は、分子を隔てる距離と関係しているため、分子間の空間的關係を評価できる。分子間で結合が起こる状況において、アッセイでの「アクセプター」分子標識の蛍光発光は最大であるべきである。FRETによってモニタリングするように構成された結合イベントは好都合なことに、当該技術分野において周知の標準的な蛍光検出法によって (例えば蛍光光度計を用いて) 測定することができる。第1または第2の結合分子の量を滴定することによって結合曲線を作成して、平衡結合定数を推定することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0146】

ホモジニアスアッセイの別の例は、ALPHASCREEN (商標) (コネティカット州メリディアンのパックードバイオサイエンス) である。ALPHASCREEN (商標) は、2つの標識ビーズを使用する。一方のビーズは、レーザーによって励起すると、一重項酸素を生成させる。もう一方のビーズは、一重項酸素が第1のビーズから発散され、第2のビーズに衝突すると、光シグナルを生成させる。このシグナルは、2つのビーズが近接している場合にのみ発生する。一方のビーズは、ディスプレイライブラリーメンバーに付着させることができ、もう一方は標的に付着させることができる。シグナルを測定して、結合度を割り出す。

#### 【0147】

ホモジニアスアッセイは、候補ポリペプチドが、ディスプレイライブラリービヒクル、例えばバクテリオファージに付着している間に行うことができる。

#### 【0148】

表面プラズモン共鳴 (SPR)：発現ライブラリーから単離した分子と標的との結合相互作用は、SPRを用いて解析することができる。SPRまたは生体分子相互作用解析 (BIA) は、いずれの相互作用体も標識することなく、生体特異的相互作用をリアルタイムで検出する。BIAチップの結合表面での質量の変化 (結合イベントを示す) により、その表面に近い光の屈折率が変化する (表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学現象)。屈折率の変化により、検出可能なシグナルが生成され、そのシグナルを生体分子間のリアルタイム反応の指標として測定する。SPRの使用法は、例えば、米国特許第5,641,640号、Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag, Sjolander and Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63: 2338-2345、Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705、およびBIAcore International AB (スウェーデン、ウプサラ) の提供するオンライン情報に記載されている。

#### 【0149】

SPRからの情報を用いて、平衡解離定数 ( $K_d$ )、および生体分子が標的に結合する速度論的パラメーター ( $K_{on}$  および  $K_{off}$  を含む) の正確な定量的測定値を得ることができる。このようなデータを用いて、さまざまな生体分子を比較することができる。例えば、発現ライブラリーに由来する所定のタンパク質を比較して、標的に対して高い親和性を有するか、または  $K_{off}$  が遅いタンパク質を同定することができる。この情報を用いて、構造活性相関関係 (SAR) を明らかにすることもできる。例えば、成熟型の親タンパク質の速度論的パラメーターおよび平衡結合パラメーターを親タンパク質のパラメーターと比較することができる。特定の結合パラメーター、例えば高親和性および遅い  $K_{off}$

$f_f$  と関連する所定の位置の変異アミノ酸を同定することができる。この情報は、構造モデリング（例えば、相同性モデリング、エネルギー最小化、またはX線結晶回折もしくはNMRによる構造決定）と組み合わせることもできる。その結果、タンパク質とその標的との物理的相互作用を理解することができ、これを用いて、他の設計プロセスの指針とすることができる。

#### 【0150】

細胞アッセイ：候補抗体のライブラリー（例えばディスプレイライブラリーなどにより既に同定されている）は、細胞表面上の目的の標的を一過的にまたは安定して発現および提示する、細胞上の標的結合についてスクリーニングすることができる。例えば、キメラ標的ポリペプチドが細胞内で産生されるか、細胞から分泌されるか、または例えばFcのような膜アンカー型タンパク質と融合しているアンカーを通じて細胞表面に付着されるように、標的は、ポリペプチドの細胞外部分のみをコードする断片を含むベクター核酸配列を含むことができる。FcRnに結合して、IgGとFcの結合をブロックする抗体をスクリーニングするのに、細胞表面で発現する標的を用いることができる。例えば、非特異的なヒトIgG-Fcを蛍光標識することができ、フローサイトメトリー、例えばFACS装置を用いて、蛍光強度の変化によって、拮抗性抗体の存在または非存在下におけるFcRnへの結合を検出することができる。

10

#### 【0151】

##### FcRn結合抗体を得るための他の方法

ディスプレイライブラリーを用いるのに加えて、他の方法を用いて、FcRn結合抗体を得ることができる。例えば、FcRnタンパク質またはその領域をヒト以外の動物、例えばげっ歯類における抗原として用いることができる。

20

#### 【0152】

1つの実施形態では、上記のヒト以外の動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、ヒトIg遺伝子座の大きな断片を用いて、マウス抗体を産生できないマウスシステムを作ることができる。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する遺伝子由来の抗原特異的モノクローナル抗体(Mab)を生成および選択してよい。例えば、XENOMOUSE(商標)、Green et al., 1994, Nat. Gen. 7: 13-21、米国特許出願公開第2003-0070185号、国際公開第96/34096号(1996年10月31日公開)、および国際出願第PCT/US96/05928号(1996年4月29日提出)を参照されたい。

30

#### 【0153】

1つの実施形態では、モノクローナル抗体をヒト以外の動物から得てから、改変、例えばヒト化または脱免疫化する。Winterは、ヒト化抗体を調製するのに用いてよいCDR移植法を説明している(英国特許出願第2188638A号(1987年3月26日提出)、米国特許第5,225,539号)。特定のヒト抗体のすべてのCDRを非ヒトCDRの少なくとも一部で置換しても、CDRの一部のみを非ヒトCDRで置換してもよい。ヒト化抗体を所定の抗原に結合させるのに必要な数のCDRを置換すれば、それでよい。

40

#### 【0154】

抗原結合に直接関与しないFv可変領域の配列を、ヒトFv可変領域由来の対応する配列で置換することによって、ヒト化抗体を生成することができる。ヒト化抗体を生成する一般的な方法は、Morrisson, S.L., 1985, Science 229: 1202-1207 by Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214、ならびに、Queenらの米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号、および米国特許第5,693,762号によって示されている。これらの方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも1つに由来する免疫グロブリンFv可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離、操作、および発現させることを含む。このような核酸の供給源は当業者に周知であり、例えば、上記のような所定の標的に対する抗体を産生するハイブリドーマから得てよい。続いて、ヒト化抗体またはその断片を

50

コードする組換えDNAを適切な発現ベクターにクローニングできる。

【0155】

FcRn結合抗体は、国際公開第98/52976号および国際公開第00/34317号(これらの内容は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる)に開示されている方法によって、ヒトT細胞エピトープを特異的に欠失または「脱免疫化」することによっても変更してもよい。簡単に説明すると、抗体の重鎖および軽鎖可変領域を、MHCクラスIIに結合するペプチドについて解析できる。これらのペプチドは、(国際公開第98/52976号および国際公開第00/34317号に定義されているように、)潜在的T細胞エピトープを示す。潜在的T細胞エピトープの検出のために、「ペプチドスレッディング」と呼ばれるコンピュータモデリングアプローチを適用でき、加えて、国際公開第98/52976号および国際公開第00/34317号に記載されているように、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースで、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列に存在するモチーフを検索することができる。これらのモチーフは、18種類の主なMHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合するので、潜在的T細胞エピトープを構成する。可変領域中の少数のアミノ酸残基を置換するか、または単一アミノ酸置換によって、検出された潜在的T細胞エピトープを除去できる。可能な保存的置換が行なわれる限り、ヒト生殖系列抗体配列中のこの位置に共通するアミノ酸を用いてよいことが多いが、これに限らない。ヒト生殖系列配列は、Tomlinson, L.A. et al., 1992, J. Mol. Biol. 227: 776-798、Cook, G.P. et al., 1995, Immunol. Today Vol. 16(5): 237-242、Chothia, D. et al., 1992, J. Mol. Biol. 227: 799-817に開示されている。V<sub>H</sub>BASEディレクトリーによって、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的ディレクトリーが提供されている(英国ケンブリッジのMRC Centre for Protein EngineeringのTomlinson, L.A.らが作成)。脱免疫変化を同定した後、変異誘発または他の合成法(例えば、デノボ合成、カセット式置換など)によって、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>をコードする核酸を構築できる。変異誘発させた可変配列は任意により、ヒト定常領域、例えば、ヒトIgG1または定常領域に融合させることができる。

10

20

【0156】

場合によっては、潜在的T細胞エピトープは、抗体機能にとって重要であることが知られているか、またはそのように予測されている残基を含むことになる。例えば、潜在的T細胞エピトープは通常、CDRの方に偏っている。加えて、潜在的T細胞エピトープは、抗体の構造および結合にとって重要なフレームワーク残基に生じ得る。これらの潜在的エピトープを除去する変化には、場合によっては、例えば、変化を有するかまたは有さない鎖を作製して試験することによって、さらに厳密な精査を行う必要がある。可能な場合には、CDR外での置換によって、CDRと重複する潜在的T細胞エピトープを除去した。場合によっては、CDR内での改変しか選択肢がないので、この置換を有する変異体および有さない変異体について試験すべきである。別のケースでは、潜在的T細胞エピトープを除去するのに必要な置換は、抗体結合にとって重要な場合があるフレームワーク内の残基位置での置換である。これらのケースでは、この置換を有する変異体および有さない変異体を試験すべきである。したがって、場合によっては、最適な脱免疫化抗体を同定するために、複数の変異体脱免疫化重鎖および軽鎖可変領域を設計し、さまざまな重鎖と軽鎖の組み合わせを試験した。続いて、異なる変異体の結合親和性を、脱免疫化の程度、すなわち可変領域に残る潜在的T細胞エピトープの数とともに考慮することにより、最終的な脱免疫化抗体の選択を行うことができる。脱免疫化を用いて、いずれの抗体、例えば非ヒト配列を含む抗体、例えば、合成抗体、マウス抗体、他の非ヒトモノクローナル抗体、またはディスプレイライブラリーから単離した抗体も変更できる。

30

40

【0157】

抗体の生殖系列化

IgG媒介性自己免疫疾患を治療するために用いる抗体は、複数回投与に用いることが

50

できる。治療抗体の免疫原性を低下させる予防策としては、抗体（特にF a b）のフレームワーク領域の1つ以上の非生殖系列アミノ酸を、対応する生殖系列アミノ酸（例えば結合特性が実質的に保持されている限り）に戻すことが挙げられる。

#### 【0158】

F c R nに結合する抗体、例えば本明細書中に記載されている抗体の可変領域を1つ以上の生殖系列配列にさらに類似させるために、その抗体を改変できる。例えば、基準生殖細胞系配列にさらに類似させるために、抗体は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を、例えばフレームワーク、C D R、または定常領域中に含むことができる。1つの例示的な生殖系列化法は、単離抗体の配列と類似する（例えば、特定のデータベースにおいて最も類似する）1つ以上の生殖系列配列を同定することを含むことができる。続いて、付加的に、または他の変異と組み合わせ、単離抗体中に、（アミノ酸レベルでの）変異をもたらすことができる。例えば、一部またはすべての考え得る生殖系列変異をコードする配列を含む核酸ライブラリーを作製する。続いて、変異抗体を評価して、例えば、単離抗体と比べて1つ以上の追加の生殖系列残基を有するとともに、有用なままである（例えば機能活性を有する）抗体を同定する。1つの実施形態では、できるだけ多くの生殖系列残基を単離抗体に導入する。

10

#### 【0159】

1つの実施形態では、変異誘発を用いて、1つ以上の生殖系列残基を置換するか、または、フレームワーク領域および/もしくは定常領域に挿入する。例えば、生殖系列フレームワークおよび/または定常領域残基は、改変される非可変領域と類似する（例えば、最も類似する）生殖系列配列に由来できる。変異誘発後、抗体の活性（例えば、結合または他の機能活性）を評価して、生殖系列残基（単数または複数）が許容されるか（すなわち、活性を無効にしないか）を判断できる。類似の変異誘発をこのフレームワーク領域内で行うことができる。

20

#### 【0160】

生殖系列配列の選択はさまざまな方法で行うことができる。例えば、生殖細胞系配列が、選択性または類似性についての所定の基準、例えば、少なくともある程度の同一性（％）、例えば少なくとも75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、または99.5％の同一性を満たす場合、その生殖細胞系配列を選択できる。少なくとも2個、3個、5個、または10個の生殖系列配列を用いて、選択を行うことができる。C D R 1およびC D R 2の場合、類似の生殖系列配列の同定は、そのような配列の1つを選択することを含むことができる。C D R 3の場合、類似の生殖系列配列の同定は、そのような配列の1つを選択することを含むことができるが、アミノ末端部分およびカルボキシ末端部分に別々に寄与する2つの生殖系列配列を使用することを含んでよい。別の実施態様では、2つまたは3つ以上の生殖系列配列を用いて、例えばコンセンサス配列を形成する。

30

#### 【0161】

1つの実施形態では、特定の基準可変ドメイン配列、例えば本明細書に記載されている配列に対して、関連する可変ドメイン配列は、基準C D R配列中の残基（ヒト生殖細胞系配列（すなわち、ヒト生殖系列核酸によりコードされるアミノ酸配列）中の対応する位置の残基と同一である残基）と同一でないC D Rアミノ酸位置の少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、または100％を有する。

40

#### 【0162】

1つの実施形態では、特定の基準可変ドメイン配列、例えば本明細書に記載されている配列に対して、関連する可変ドメイン配列が、ヒト生殖系列配列、例えば、基準可変ドメイン配列に関連する生殖系列配列のF R配列と同一であるF R領域の少なくとも30％、50％、60％、70％、80％、90％、または100％を有する。

#### 【0163】

したがって、目的の所定の抗体と類似する活性を有するが、1つ以上の生殖系列配列、特に1つ以上のヒト生殖系列配列とさらに類似する抗体を単離できる。例えば、抗体は、

50



C D R (例えばフレームワーク領域)外の領域中の生殖系列配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一であることができる。さらに、抗体は、C D R領域中に、少なくとも1個、2個、3個、4個、または5個の生殖系列残基(この生殖系列残基は、改変される可変領域と類似する(例えば、最も類似する)生殖系列配列に由来する)を含むことができる。主な目的の生殖系列配列はヒト生殖系列配列である。抗体の活性(例えば結合活性)は、元の抗体の100倍、10倍、5倍、2倍、0.5倍、0.1倍、および0.001倍以内であることができる。

#### 【0164】

V<sub>kappa</sub>の例示的な生殖系列基準配列としては、O12/O2、O18/O8、A20、A30、L14、L1、L15、L4/18a、L5/L19、L8、L23、L9、L24、L11、L12、O11/O1、A17、A1、A18、A2、A19/A3、A23、A27、A11、L2/L16、L6、L20、L25、B3、B2、A26/A10、およびA14が挙げられる。例えば、Tomlinson et al., 1995, EMBO J. 14(18):4628-3を参照されたい。

10

#### 【0165】

H C可変ドメインについての生殖系列基準配列は、特定の標準構造、例えば、H1およびH2超可変ループ中の1~3構造を有する配列に基づくことができる。免疫グロブリン可変ドメインの超可変ループの標準構造は、Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:799-817、Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798)、およびTomlinson et al., 1995, EMBO J. 14(18):4628-38に記載されているように、その配列から推測できる。1~3構造を有する例示的な配列としては、DP-1、DP-8、DP-12、DP-2、DP-25、DP-15、DP-7、DP-4、DP-31、DP-32、DP-33、DP-35、DP-40、7-2、hv3005、hv3005f3、DP-46、DP-47、DP-58、DP-49、DP-50、DP-51、DP-53、およびDP-54が挙げられる。

20

#### 【0166】

##### リガンドの作製

標準的な組換え核酸法を用いて、FcRnに結合する抗体を発現させることができる。一般には、この抗体をコードする核酸配列を核酸発現ベクターにクローニングする。当然ながら、その抗体が複数のポリペプチド鎖を含む場合、各鎖を発現ベクター、例えば同じまたは異なる細胞で発現される同じまたは異なるベクターにクローニングできる。

30

#### 【0167】

抗体の産生：いくつかの抗体、例えばFabは、菌細胞、例えば、大腸菌細胞中で産生させることができる。例えば、Fabが、ディスプレイ実体とバクテリオファージタンパク質(またはその断片)との間に抑制可能な終止コドンを含むファージディスプレイベクター中の配列によってコードされる場合、終止コドンを抑制できない菌細胞中にベクター核酸を移すことができる。このケースでは、Fabは、遺伝子IIIタンパク質に融合せず、ペリプラズムおよび/または培地中に分泌される。

40

#### 【0168】

抗体は、真核細胞中で産生させることもできる。1つの実施形態では、これらの抗体(例えば、scFv)は、Pichia(例えば、Powers et al., 2001, J. Immunol. Methods. 251:123-35を参照されたい)、Hansenula、またはSaccharomycesのような酵母細胞中で発現させる。

#### 【0169】

1つの実施形態では、抗体は哺乳類細胞で産生させる。クローン抗体またはその抗原結合性断片を発現させるための哺乳類宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されているdhfr-CHO

50

細胞を含み、例えば Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159: 602-621 に記載されているように、DHFR 選択マーカーとともに用いる)、リンパ球細胞株、例えば NS0 骨髄腫細胞および SP2 細胞、COS 細胞、ならびに、トランスジェニック動物、例えばトランスジェニック哺乳類由来の細胞が挙げられる。例えば、上記の細胞は乳腺上皮細胞である。

#### 【0170】

組換え発現ベクターは、多様な免疫グロブリンドメインをコードする核酸配列に加えて、宿主細胞でのベクターの複製を調節する配列(例えば複製開始点)および選択マーカー遺伝子のような追加の配列を有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第 4,399,216 号、米国特許第 4,634,665 号、および米国特許第 5,179,017 号を参照されたい)。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートのような医薬に対する耐性を付与する。選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(メトトレキサートの選択/増幅による dhfr<sup>r</sup> 宿主細胞での使用用)および neo 遺伝子(G418 選択用)が挙げられる。

10

#### 【0171】

抗体またはその抗原結合部分を組換え発現させる例示的な系では、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによって、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを dhfr<sup>r</sup> CHO 細胞に導入する。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖遺伝子を、エンハンサー/プロモーター調節要素(例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来するもの、例えば CMV エンハンサー/A d M L P プロモーター調節要素または SV40 エンハンサー/A d M L P プロモーター調節要素)にそれぞれ機能可能に連結して、遺伝子の高レベルの転写を駆動する。組換え発現ベクターは DHFR 遺伝子も有し、この遺伝子により、メトトレキサートによる選択/増幅を用いて、そのベクターをトランスフェクションした CHO 細胞を選択できるようになる。選択された形質転換宿主細胞を培養して、抗体重鎖および軽鎖を発現させ、完全抗体を培地から回収する。標準的な分子生物学的技法を用いて、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクションし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、抗体を培地から回収する。例えば、一部の抗体は、プロテイン A またはプロテイン G 結合マトリックスを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって単離できる。

20

30

#### 【0172】

Fc ドメインを含む抗体では、抗体産生系は、Fc 領域がグリコシル化されている抗体を産生できる。例えば、IgG 分子の Fc ドメインは、CH2 ドメイン中のアスパラギン 297 でグリコシル化されている。このアスパラギンは、2本鎖型オリゴ糖による修飾部位である。このグリコシル化は、Fcγ レセプターおよび補体 C1q が媒介するエフェクター機能に必要であることが示されている(Burton and Woof, 1992, Adv. Immunol. 51: 1-84, Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163: 59-76)。1つの実施形態では、Fc ドメインは、アスパラギン 297 に対応する残基を適切にグリコシル化する哺乳類発現系で生成される。Fc ドメインは、他の真核細胞の翻訳後修飾も含むことができる。

40

#### 【0173】

抗体は、トランスジェニック動物によって産生させることもできる。例えば、米国特許第 5,849,992 号には、トランスジェニック哺乳類の乳腺で抗体を発現させる方法が記載されている。乳特異的プロモーター、ならびに、目的の抗体および分泌のためのシグナル配列をコードする核酸を含む導入遺伝子を構築する。このようなトランスジェニック哺乳類の雌が産生する乳は、その乳に分泌された目的の抗体を含む。この抗体は、乳から精製することも、一部の用途においては直接用いることもできる。

#### 【0174】

トランスジェニックマウスを作製する方法の 1 つは、以下の通りである。簡潔に述べる

50

と、抗体をコードする標的コンストラクトを受精卵母細胞の雄性前核にマイクロインジェクションする。生存可能な産仔を得るために、この卵母細胞を偽妊娠仮親の子宮に注入する。一部の子孫に導入遺伝子が組み込まれる。

【0175】

FcRn 候補抗体のアッセイ系

インビトロまたはインビボにおける FcRn またはその断片に対する FcRn 候補抗体の調節活性を測定するアッセイで、FcRn 候補抗体をさらに特徴付けることができる。例えば、FcRn は、FcRn と基質（非特異的 IgG もしくは IgG の Fc 部分またはアルブミンなど）との反応を可能にするアッセイ条件下で、前記のような基質と組み合わせることができる。アッセイは、FcRn 候補抗体の非存在下、および漸増濃度の FcRn 候補抗体の存在下で実施する。FcRn 活性（例えば基質への結合）の 50% が候補抗体によって阻害される場合の候補抗体の濃度が、その抗体の IC<sub>50</sub> 値（50% 阻害濃度）または EC<sub>50</sub>（50% 効果濃度）である。一連の候補抗体または候補抗体群の中で、IC<sub>50</sub> または EC<sub>50</sub> 値が低い抗体は、IC<sub>50</sub> または EC<sub>50</sub> が高い抗体よりも、より強力な FcRn インヒビターであるとみなす。いくつかの実施形態では、抗体の IC<sub>50</sub> 値は、FcRn 活性の阻害に関するインビトロアッセイで測定した場合、800 nM、400 nM、100 nM、25 nM、5 nM、1 nM、またはそれ未満である。

10

【0176】

候補抗体は、FcRn に対する選択性についても評価することができる。例えば、FcRn 候補抗体は、FcRn および細胞表面レセプター（2 Mドメインも利用するレセプターなど）のパネルに対する効力についてアッセイすることができ、各レセプタータンパク質について、IC<sub>50</sub> 値または EC<sub>50</sub> 値を割り出すことができる。1つの実施形態では、FcRn に対する IC<sub>50</sub> 値または EC<sub>50</sub> 値が低く、試験パネル（例えば MHC クラス I 分子）内の他のレセプターに対する IC<sub>50</sub> 値または EC<sub>50</sub> 値が高い化合物は、FcRn に対して選択的であるとみなす。

20

【0177】

エキソビボで内因性 FcRn を発現している内皮細胞または上皮細胞を用いて、さまざまな pH および温度条件下で、候補抗体のエンドサイトーシスまたはトランスサイトーシスを追跡することができる。IgG のトランスサイトーシスまたは FcRn によるリサイクルは、さまざまな化学物質の存在下または非存在下、かつ、細胞内輸送経路に影響を及ぼすか、または作用することが知られているさまざまな条件下で、標識抗体を追跡することにより測定できる。

30

【0178】

血清中の半減期を測定するために、pH 依存的 FcRn 結合抗体および pH 非依存的 FcRn 結合抗体によって、ラット、マウス、またはサルにおける薬物動態調査を実施することができる。同様に抗体の保護効果は、標識 IgG または IgG の標識 Fc 部分の存在下または非存在下で抗体を注入することによって、免疫調節療法で利用できる可能性、またはサルベージ免疫療法として利用できる可能性について、インビボで評価することができる。候補抗体の存在下における標識 IgG / Fc の半減期の短縮は、その抗体の治療効力の指標である。

40

【0179】

医薬組成物

別の態様では、本開示は、FcRn 結合抗体を含む組成物、例えば製薬学的に許容可能な組成物または医薬組成物を提供する。FcRn 結合抗体は、製薬学的に許容可能な担体とともに配合できる。医薬組成物は、治療用組成物と診断用組成物、例えばインビボ撮像用の標識 FcRn 結合抗体を含む組成物を含む。

【0180】

製薬学的に許容可能な担体としては、生理学的に適合可能なありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤などが挙げられる。好ましくは、担体は、（例えば注射または注入による）静脈内投与、筋内投与、皮下投与、非経口

50

投与、脊髄投与、または表皮投与に適するものである。投与経路に応じて、FcRn結合抗体をある物質中でコーティングして、その化合物を不活性化する場合のある酸の作用および他の天然の条件からその化合物を保護しよよい。

#### 【0181】

製薬学的に許容可能な塩は、親化合物の所望の生物学的活性を保持しているが、望ましくないいずれかの毒性効果を与えない塩である（例えばBerger, S. M., et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい）。このような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、無毒無機酸（塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸など）に由来するもの、および、無毒有機酸に由来するもの（脂肪族モノカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸、芳香族スルホン酸など）が挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ土類金属（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど）に由来するもの、および、無毒有機アミン（N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなど）に由来するものが挙げられる。

10

#### 【0182】

上記の組成物は、さまざまな形態であってよい。その形態としては、例えば、溶液（例えば注射剤および注入剤）、分散液、懸濁液、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム、および座剤といった液体、半固体、固体の剤形が挙げられる。この形態は、意図する投与方法および治療への応用によって決めることができる。多くの組成物は、ヒトの投与のために抗体とともに使用されるものと類似の組成物のような注射剤または注入剤の形態である。例示的な投与方法は、非経口投与（例えば、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、筋内投与）である。1つの実施形態では、本開示のFcRn結合抗体は、静脈内注入または注射によって投与する。別の実施形態では、本開示のFcRn結合抗体は、筋内または皮下注射によって投与する。

20

#### 【0183】

上記の組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高い薬物濃度に適する他の規則構造体として調合できる。無菌注射剤は、活性化化合物（すなわちリガンド）を必要な量で、上に列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせとともに、適切な溶媒に組み込んでから、必要に応じて過滅菌することによって調製できる。一般に、分散液は、塩基性分散媒と、上に列挙したうちの必要な他の成分を含む無菌ビヒクルに活性化化合物を組み込むことによって調製する。無菌注射剤調製用の無菌粉末のケースでは、調製方法は、活性成分と、滅菌ろ過済み溶液から作製したいずれかの所望の追加成分との粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングを用いることによって、分散液のケースでは、所要粒径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持することができる。注射用組成物の持続的な吸収は、その組成物に、吸収を遅らせる作用剤、例えばモノステアレート塩とゼラチンを含めることによってもたすことができる。

30

#### 【0184】

FcRn結合抗体は、当該技術分野において既知のさまざまな方法によって投与できるが、多くの用途では、投与経路/方法は静脈内注射または注入である。例えば、治療用途では、FcRn結合抗体は、30 mg/分、20 mg/分、10 mg/分、5 mg/分、または1 mg/分未満の速度での静脈内注入によって投与して、約1~100 mg/m<sup>2</sup>または7~25 mg/m<sup>2</sup>の用量に達するようにできる。投与経路および/または方法は、所望の成果によって変えることになる。特定の実施形態では、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む放出制御型製剤のように、化合物を急速な放出から保護する担体とともに活性化化合物を調製してよい。エチレンビニルアセテート、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような生物分解性・生体適合性ポリマーを用いることができる。このような製剤を調製するための

40

50

方法は数多く特許出願されており、一般的に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New Yorkを参照されたい。

【0185】

特定の実施形態では、上記の抗体は、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体とともに経口投与してよい。上記の化合物（および所望の場合、他の成分）は、硬または軟カプセル剤に封入しても、錠剤に圧縮しても、被検者の食事に直接組み込んでよい。経口治療投与用に、上記の化合物を賦形剤とともに組み込み、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ、オブラートなどの形態で用いてもよい。本明細書に開示されている化合物を非経口投与以外によって投与するには、その化合物の不活性化を予防する物質で化合物をコーティングするか、または不活性化を予防する物質と化合物を併用投与する必要がある場合がある。

10

【0186】

医薬組成物は、当該技術分野において既知の医療用具で投与できる。例えば、1つの実施形態では、本明細書に開示されている医薬組成物は、例えば無針皮下注射器、ポンプ、またはインプラントのような用具で投与できる。

【0187】

特定の実施形態では、FcRn結合抗体は、インピボで適切に分布されるように配合できる。例えば、血液脳関門(BBB)は親水性の高い多くの化合物を排除する。本明細書に開示されている治療用化合物は、(所望の場合に)BBBを通過するように、例えばリポソームに配合できる。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号、同第5,374,548号、および同第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送されることにより、標的指向型の薬物送達を高める1つ以上の部分を含んでよい(例えば、V. V. Rana, J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい)。

20

【0188】

投与レジメンを調節して、最適な所望の反応(例えば治療反応)をもたらす。例えば、単回ボラス投与を行っても、時間をかけて数回の分割投与を行っても、治療状況の要件によって示されたのに応じて、用量を比例減少または比例増加させてもよい。投与のしやすさと用量の均一性のために、非経口用組成物を投与単位形態で配合するのは特に有益である。投与単位形態は、本明細書で使用する場合、治療すべき被検者に対する単位投与量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な製剤用担体とともに所望の治療効果をもたらすように計算された所定の量の活性化化合物を含む。投与単位形態の詳細は、(a)活性化化合物の独自の特性、および達成される特定の治療効果、ならびに(b)個人における感受性の治療用のこのような活性化化合物を化合する技術分野に固有の制限によって決定できるとともに、これらに直接依存し得る。

30

【0189】

本明細書に開示されている抗体の治療または予防に有効な量の例示的かつ非限定的な範囲は、0.1~20mg/kg、または1~10mg/kgである。抗FcRn抗体は、例えば静脈内注入によって、例えば30mg/分、20mg/分、10mg/分、5mg/分、または1mg/分未満の速度で投与して、約1~100mg/m<sup>2</sup>、または約5~30mg/m<sup>2</sup>の用量に達するようにできる。用量の値は、緩和させる状態の種類および重症度によって変化させてよい。特定の被検者に対して、個人のニーズ、およびその組成物を投与しているか、または組成物の投与を管理している人物の専門的判断に従って、特有の投与レジメンを経時的に調節できる。

40

【0190】

本明細書に開示されている医薬組成物は、本明細書に開示されているFcRn結合抗体を治療上有効な量または予防に有効な量含んでよい。「治療上有効な量」は、必要な用量および期間で、所望の治療結果を得るのに有効な量を指す。本発明の組成物の治療上有効

50

な量は、病状、その人の年齢、性別、および体重のような因子、ならびに、抗体が個体において所望の応答を誘発する能力により変化し得る。治療上有効な量は、その組成物のいずれかの毒性または有害な作用よりも治療的に有益な作用が上回る場合の量でもある。

#### 【0191】

##### 安定化および滞留性

1つの実施形態では、FcRn結合抗体の循環中、例えば血中、血清中、リンパ中、または他の組織中における安定性および/または滞留性を例えば少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、または50倍向上させる部分とFcRn結合抗体を物理的に結合させる。例えば、ポリマー、例えば、実質的に非抗原性のポリマー（ポリオキシアルキレンオキシドまたはポリエチレンオキシドなど）とFcRn結合抗体を結合できる。好適なポリマーは実質的に重量によって変化することになる。数平均分子量が約200～約35,000（または約1,000～約15,000、および2,000～約12,500）の範囲であるポリマーを用いることができる。例えば、水溶性ポリマー、例えば親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンにFcRn結合抗体をコンジュゲートできる。このようなポリマーの非限定的なリストは、ポリアルキレンオキシドホモポリマー（ポリエチレングリコール（PEG）、またはポリプロピレングリコールなど）、ポリオキシエチレン化ポリオール、それらのコポリマーおよびそれらのブロックコポリマーを含む（ただし、そのブロックコポリマーの水溶性が維持されることを条件とする）。

10

#### 【0192】

##### キット

本明細書に記載されているFcRn結合抗体は、キットで、例えばキットの構成要素として提供することができる。例えばこのキットは、(a) FcRn結合抗体、例えば、FcRn結合抗体を含む組成物と、任意により、(b) 情報資料を含む。この情報資料は、本明細書に記載されている方法、および/または、本明細書に記載されている方法のためにFcRn結合抗体を使用することに関する説明、取扱、マーケティング、またはその他のための資料であることができる。

20

#### 【0193】

キットの情報資料の形態は限定されない。1つの実施形態では、情報資料は、化合物の製造、化合物の分子量、濃度、使用期限、バッチ、または製造場所の情報などについての情報を含むことができる。1つの実施形態では、情報資料は、本発明の抗体を用いて、本明細書に記載されている障害、例えば自己免疫障害を治療、予防、または診断することに関する。

30

#### 【0194】

1つの実施形態では、情報資料は、本明細書に記載されている方法を行うのに適する方法で、例えば、好適な用量、剤形、または投与方法（例えば、本明細書に記載されている用量、剤形、または投与方法）でFcRn結合抗体を投与するための説明を含むことができる。1つの実施形態では、情報資料は、好適な被検者、例えばヒト、例えば自己免疫障害（例えば関節リウマチまたは全身性エリテマトーデス）を有するか、またはそのリスクがあるヒトにFcRn結合抗体を投与するための説明を含むことができる。例えば、この資料は、狼瘡患者、または別の自己免疫障害患者にFcRn結合抗体を投与するための説明を含むことができる。

40

#### 【0195】

キットの情報資料の形態は限定されない。多くの場合、情報資料、例えば使用説明書は、印刷物として、例えば印刷したテキスト、図面、および/または写真として、例えばラベルまたは印刷シートとして提供する。しかし、情報資料は、コンピュータ読み取り可能媒体、録画映像、または録音音声などの他の形式で提供してもよい。1つの実施形態では、キットの情報資料は、問い合わせ先情報、例えば実際の住所、eメールアドレス、ウェブサイト、または電話番号を含むことができ、この場合、キットのユーザは、FcRn結合抗体、および/または本明細書に記載されている方法でのその抗体を使用することに関

50

する実質的な情報を得ることができる。当然ながら、情報資料は、いずれかの形式を組み合わせた形で提供することもできる。

【0196】

キットの組成物は、FcRn結合抗体に加えて、溶媒もしくは緩衝液、安定剤、保存剤、矯味矯臭剤（例えば苦味遮断剤または甘味剤）、香料、もしくは他の化粧品成分、および/または本明細書に記載されている自己免疫障害、例えば関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスを治療するための第2の薬剤といった他の成分を含むこともできる。あるいは、他の成分は、キット（ただし、FcRn結合抗体とは異なる組成物または容器）に含めることができる。このような実施形態では、キットは、FcRn結合抗体と他の成分を添加混合するか、またはFcRn結合抗体を他の成分とともに用いるための説明書を含むことができる。

10

【0197】

FcRn結合抗体はいずれかの形態、例えば液体形態、乾燥形態、または凍結乾燥形態で提供できる。FcRn結合抗体は実質的に純粋および/または無菌であることが好ましい。FcRn結合抗体を溶液で提供する場合、その溶液は好ましくは水溶液であり、無菌水溶液が好ましい。FcRn結合抗体を乾燥形態として提供する場合には、再構成は一般に、好適な溶媒を加えることによって行う。キットに、溶媒、例えば無菌水または緩衝液を任意により提供することができる。

【0198】

キットは、FcRn結合抗体を含む組成物用の容器を1つ以上含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、組成物用と情報資料用の別個の容器、仕切り、または区画を含む。例えば、組成物を瓶、バイアル、または注射器に入れることができ、情報資料をプラスチックスリーブまたはパケットに入れることができる。別の実施形態では、キットの別個の要素を、分割されていない単一の容器に入れる。例えば、情報資料がラベルの形で貼られている瓶、バイアル、またはシリンジに組成物を入れる。いくつかの実施形態では、キットは個々の容器を複数（例えば1パック）含み、その各容器は、1つ以上の単位剤形（例えば、本明細書に記載されている剤形）のFcRn結合抗体を含む。例えば、キットは複数の注射器、アンプル、フォイルパケット、またはプリスターパックを含み、そのそれぞれが単回用量のFcRn結合抗体を含む。キットの容器は、気密性、耐水性（例えば、水分の変化もしくは蒸発に対して不透過性）、および/または耐光性であることができる。

20

30

【0199】

キットは任意により、組成物の投与に適する用具、例えば注射器、吸入器、ピペット、鉗子、計量スプーン、点滴注入器（例えば点眼器）、スワブ（例えばコットンスワブもしくは綿棒）、または同様のいずれかの送達用具を含む。1つの実施形態では、この用具は、定量の抗体を分配する埋め込み型用具である。本開示は、例えば本明細書に記載されている構成成分を組み合わせることによって、キットを提供する方法も特色とする。

【0200】

治療

FcRnに結合するとともに、本明細書に記載されているか、および/または本明細書に詳述されている方法によって同定される抗体は、治療上および予防上の有用性を有する。これらの抗体を被検者に投与して、自己免疫障害を含むさまざまな障害を治療、予防、および/もしくは診断することも、または、例えばインビトロもしくはエキソビボで、培養液中の細胞に投与することもできる。

40

【0201】

「治療する」という用語は、統計的に有意な程度、または当業者が検出可能な程度に、障害と関連する状態、症状、もしくはパラメーターを改善するか、または障害の進行を防ぐのに有効な量、様式、および/または方法で療法を施すことを指す。有効な量、様式、および/または方法は、被検者によって変化し得るとともに、被検者に合わせて調整してよい。被検者は、ヒトまたはヒト以外の動物、例えばヒト以外の哺乳類であってよい。

50

## 【0202】

FcRn結合抗体は、治療上有効な量、例えば、被検者に単回投与量または複数回投与量を投与したときに、被検者が障害、例えば自己免疫障害（例えば関節リウマチまたは全身性エリテマトーデス）の症状の改善、または、その障害の存在もしくはリスクの指標となるパラメーターの改善を示すような量で投与することができる。

## 【0203】

体内の多くの器官または局所器官に影響を及ぼす例示的な障害としては、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患（IBD）、狼瘡、および強直性脊椎炎が挙げられる。これらの障害のいくつかについて以下で論じる。1つの態様では、本発明は癌の治療方法を提供する。FcRn結合抗体を用いて治療できるさらに別の障害としては、強皮症、シェーグレン症候群、グッドパスチャー症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎/巨細胞動脈炎、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖性症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労症候群免疫不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、CREST症候群、クローン病、ドゴー病、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、円板状エリテマトーデス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症、線維筋炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病（I型）、若年性関節炎、メニエール病、混合性結合組織病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、サルコイドーシス、スティッフマン症候群、高安動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎、白斑が挙げられる。

10

20

## 【0204】

いくつかの実施形態では、抗FcRn結合抗体を投与して、無用の治療抗体を血流から除去する。

## 【0205】

いくつかの実施形態では、抗FcRn結合抗体を投与して、抗HLA抗体のレベルを抑える。いくつかの実施形態では、臓器移植との関連で、抗HLA抗体のレベルを抑える。

30

## 【0206】

FcRn結合抗体の投与方法は、「医薬組成物」に記載されている。用いる分子の好適な用量は、被検者の年齢および体重、ならびに、用いる具体的な医薬によって決まることになる。FcRn結合抗体を競合剤として用いて、望ましくない相互作用、例えば天然または病理学的な作用剤とFcRnとの相互作用を阻害または低減できる。

## 【0207】

FcRn結合抗体を用いて、巨大分子または微小分子を、例えば遺伝子治療の目的で遺伝子を細胞に、内皮または上皮に送達できるとともに、FcRnを発現する組織のみを標的にできる。FcRn結合抗体を用いて、治療薬、放射線放射化合物、植物由来分子、真菌由来分子、細菌由来分子、生物学的タンパク質、およびこれらの混合物を含むさまざまな細胞毒性薬を送達できる。細胞毒性薬は、短距離放射線放射体（例えば、本明細書に記載されているような短距離高エネルギー放射体を含む）のように、細胞内で作用する細胞毒性薬であることができる。

40

## 【0208】

ポリペプチド毒素の場合、組換え核酸技法を用いて、FcRn結合抗体と細胞毒素（またはそのポリペプチド構成成分）をコードする核酸を翻訳融合物として構築できる。続いて、この組換え核酸を例えば細胞内で発現させ、コードされた融合ポリペプチドを単離する。

## 【0209】

50



あるいは、FcRn結合抗体は、高エネルギー放射線放射体、例えば、放射体である $^{131}\text{I}$ のような放射線同位体にカップリングすることができ、ある部位に局在化すると、いくらかの細胞直径の範囲の殺傷をもたらす。例えば、S. E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R. W. Baldwin et al. (eds.), pp303-316 (Academic Press 1985)を参照されたい。その他の好適な放射性同位体としては、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、および $^{211}\text{At}$ のような $\alpha$ 放射体、ならびに、 $^{186}\text{Re}$ および $^{90}\text{Y}$ のような $\beta$ 放射体が挙げられる。さらに、 $^{177}\text{Lu}$ は、造影剤および細胞傷害剤のいずれとしても用いてよい。

10

20

30

40

50

#### 【0210】

$^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、および $^{177}\text{Lu}$ で標識した抗体を用いる放射免疫療法(RIT)については、活発に臨床試験が行われている。これら3つの核種の物理特性は有意に異なるので、目的の組織に最大限の放射線量を送達するには、放射線核種の選択はきわめて重要である。 $^{90}\text{Y}$ の高エネルギーの粒子は、巨大な腫瘍に効果的である場合がある。 $^{131}\text{I}$ の相対的に低エネルギーの粒子は理想的であるが、放射ヨウ化分子のインビボでの脱ハロゲン化は、抗体のインターナリゼーションにとって重大な短所である。これに対し、 $^{177}\text{Lu}$ は、0.2~0.3mmの範囲に過ぎない低エネルギーの粒子を有し、 $^{90}\text{Y}$ と比べてかなり低い放射線量を骨髄へ送達する。加えて、( $^{90}\text{Y}$ と比べて)物理半減期が長いので、滞留時間が長い。その結果、活性が高い(mCi量が多い) $^{177}\text{Lu}$ 標識剤を比較的少ない放射線量で骨髄に投与することができる。さまざまな癌の治療に $^{177}\text{Lu}$ 標識抗体を用いることについて検討した臨床試験がいくつか存在する(Mulligan T et al., 1995, Clin Canc. Res. 1:1447-1454、Meredith RF, et al., 1996, J Nucl Med. 37:1491-1496、Alvarez RD, et al., 1997, Gynecol. Oncol. 65:94-101)。

#### 【0211】

自己免疫を治療するための治療法の使用には、多くの利点がある。本発明の抗体はFcRnを特異的に認識するので、他の組織が除外され、治療を必要とする部位へ高レベルの薬剤が直接送達される。治療は、臨床パラメーターによって有効にモニタリングできる。あるいは、これらのパラメーターを用いて、上記の治療をいつ用いるべきか示すことができる。

#### 【0212】

FcRn結合抗体は、自己免疫障害を治療するための1つ以上の既存のモダリティと併せて投与でき、このモダリティとしては、静脈内Ig療法、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、およびコルチコステロイド、ならびに、抗炎症治療(シクロスポリン、ラパマイシン、もしくはアスコマイシン、またはこれらの免疫抑制性類似体、例えばシクロスポリンA、シクロスポリンG、FK-506、ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシンなど)、シクロホスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、プレキナル、FTY720、レフルノミド、ミゾリピン、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、15-デオキシスペルグアリン、免疫抑制モノクローナル抗体、例えば白血球レセプター(例えば、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、CD58)、もしくはそのリガンドに対するモノクローナル抗体、あるいは、他の免疫調節化合物、例えばCTLA4Ig、または他の接着分子インヒビター、例えばセレクトリンアンタゴニストおよびVLA-4アンタゴニストを含むmAbまたは低分子量インヒビターが挙げられるが、これらに限らない。これらの併用療法は、免疫調節レジメンの一部であっても、同種もしくは異種移植片に対する急性もしくは慢性拒絶反応、炎症性障害、または自己免疫障害の治療または予防のためのレジメンの

一部であってもよい。

【0213】

多発性硬化症

多発性硬化症 (MS) は、ミエリン鞘の炎症および喪失によって特徴付けられる中枢神経系疾患である。

【0214】

MS 診断に関するワークショップによって定義されているように、臨床的に明確な MS の診断を確立する基準によって、MS を有する患者を特定してよい (Poser et al., Ann. Neurol. 13: 227, 1983)。MS は、2 回の発作のエビデンスおよび脳脊髄液中の IgG のオリゴクローナルバンドによって、または、発作と、2 つの病巣の臨床的エビデンスと、脳脊髄液中のオリゴクローナルバンドとの組み合わせによっても診断してもよい。また McDonald の基準を用いて MS を診断することもできる (McDonald et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis, Ann Neurol 50: 121-127)。McDonald の基準は、複数回の臨床的発作の非存在下で、MS の診断に用いられる経時的 CNS 障害の MRI によるエビデンスを用いることを含む。

10

【0215】

多発性硬化症に有効な治療は、いくつかの異なる方式で評価してもよい。下記のパラメーターを用いて、治療の有効性を評価できる。2 つの例示的な基準としては、EDSS (総合障害度評価尺度)、および MRI (磁気共鳴画像法) における再燃の出現が挙げられる。EDSS は、MS による臨床的障害を等級分けする手段である (Kurtzke, Neurology 33: 1444, 1983)。神経学的障害の種類および重症度に関して、8 つの機能系を評価する。簡潔に述べると、治療前に、錐体、小脳、脳幹、感覚、腸および膀胱、視覚、大脳、ならびにその他の系の機能障害に関して患者を評価する。所定の間隔で追跡調査を行う。尺度は 0 (正常) から 10 (MS による死亡) の範囲である。完全に 1 段階低下することによって、治療が有効であることを示すことができる (Kurtzke, Ann. Neurol. 36: 573-79, 1994)。

20

30

【0216】

本明細書に記載されている方法で治療することができる、多発性硬化症と関連する例示的な症状としては、視神経炎、複視、眼振、眼ディスメトリア、核間性眼筋麻痺、運動および音の眼内閃光、求心性瞳孔障害、不全麻痺、単不全麻痺、不全対麻痺、片側不全麻痺、四肢不全麻痺、麻痺、対麻痺、片麻痺、四肢麻痺、痙縮、講話障害、筋萎縮、攣縮、痙攣、低血圧、クローヌス、筋クローヌス、筋波動症、下肢不安症候群、垂足、機能不全反射、錯感覚症、無感覚症、神経痛、神経障害性および神経原性の痛み、レルミット徴候、固有受容機能不全、三叉神経痛、運動失調症、企図振戦、測定障害、前庭性運動失調、めまい、言語行動失調、筋緊張異常、拮抗運動反復不全、頻尿、膀胱痙縮、膀胱弛緩、排尿筋-膀胱括約筋協調障害、勃起機能障害、性感異常症、冷感症、便秘、便意逼迫、糞便失禁、抑うつ症、認知機能障害、痴呆、躁鬱、感情的不安定性、多幸症、二極性症候群、不安症、失語症、神経性不全失語症、易疲労、ウトホフ症状、胃食道逆流、ならびに睡眠障害が挙げられる。

40

【0217】

ヒトでの実験に加えて、またはヒトでの実験の前に、動物モデルを用いて 2 つの薬剤を用いる効能を評価することができる。多発性硬化症に対する例示的な動物モデルは、例えば (Tuohy et al. (J. Immunol., 1988, 141: 1126-1130), Sobel et al. (J. Immunol., 1984, 132: 2393-2401)、および Traugott (Cell Immunol., 1989, 119: 114-129) に記載されているような実験的自己免疫性脳炎 (EAE) マ

50

ウスモデルである。マウスには、EAE誘導前に、本明細書に記載されている第1および第2の薬剤を投与することができる。続いて、特徴的な基準についてマウスを評価して、そのモデルにおいて2つの薬剤を用いる効能を割り出す。

#### 【0218】

##### 炎症性腸疾患

炎症性腸疾患（IBD）は一般に、慢性、再発性腸炎を含む。IBDは、クローン病と潰瘍性大腸炎（UC）という二つの別個の障害を指す。IBDの臨床症状は、間欠性の直腸出血、痙攣性の腹痛、体重減少、および下痢を含む。Clinical Activity Index for Ulcerative Colitisのような臨床指標を用いて、IBDをモニタリングすることもできる。Walmsley et al. Gut. 1998 Jul; 43(1): 29-32、およびJowett et al. (2003) Scand J Gastroenterol. 38(2): 164-71も参照されたい。FcRn結合抗体を用いて、IBDの少なくとも1つの症状を改善させるか、またはIBDの臨床指標を改善させることができる。

10

#### 【0219】

##### 関節リウマチ

関節リウマチは、関節の痛み、腫れ、こわばり、および機能喪失を引き起こす自己免疫炎症性疾患である。関節リウマチは左右対称的なパターンで現れることが多い。この疾患は、手根関節、および手に最も近い指の関節に影響を及ぼすことがある。この疾患は、関節に加えて、身体の他の部分にも影響を及ぼすことがある。加えて、関節リウマチ罹患者は、疲労、時折の発熱、および全身倦怠感を有する場合がある。関節リウマチを診断するための陽性因子としては、「リウマチ因子」という血中抗体、およびシトルリン抗体が挙げられる。FcRn結合抗体は、関節リウマチまたは関節リウマチの1つ以上の症状を治療、予防、または緩和するのに有用であり得る。

20

#### 【0220】

##### 狼瘡

全身性エリテマトーデス（SLE）は、さまざまな生体組織に炎症および損傷をもたらす自己免疫障害である。SLEは、自身のDNAに対する自己抗体によって媒介されることがある。狼瘡は、関節、皮膚、腎臓、心臓、肺、血管、および脳を含む身体の多くの部分に影響を及ぼし得る。さまざまな症状が現れる場合があるが、最も一般的な症状のいくつかとして、極度の疲労、関節の痛みまたは腫れ（関節炎）、原因不明の発熱、発疹、および腎臓の問題が挙げられる。狼瘡の例示的な症状としては、関節の痛みまたは腫れ、原因不明の発熱、および極度の疲労が挙げられる。特徴的な赤い発疹が鼻および頬の全体に現れる場合がある。発疹は、顔および耳、上腕、肩、胸、ならびに手にも生じる場合がある。狼瘡の他の症状としては、胸の痛み、脱毛、貧血、口内炎、ならびに、寒さおよびストレスから生じる指およびつま先の蒼白化または紫色への変色が挙げられる。人によっては、頭痛、めまい感、抑うつ症状、錯乱状態、または痙攣も経験する。SLEの診断のための陽性因子としては、循環抗核抗体、抗DNA抗体、および抗Sm抗体が挙げられる。FcRn結合抗体は、SLEまたはSLEの1つ以上の症状を治療、予防、または緩和するのに有用であり得る。狼瘡は、本明細書で使用する場合、皮膚狼瘡およびループス腎炎を含む。

30

40

#### 【0221】

##### 免疫性血小板減少症（ITP）

ITPは、末梢血小板の破壊を増大させる疾患であり、その患者は、特定の血小板膜タンパク質に結合する抗体を産生する。その抗血小板抗体は、血小板をオプソニン化し、マクロファージによる破壊をもたらす。ITPを治療する試みは一般に、血小板レベルを向上させる免疫系の抑制を含む。FcRn結合抗体は、ITPまたはその1つ以上の症状を治療、予防、または緩和するのに有用であり得る。

#### 【0222】

##### 強直性脊椎炎

50

強直性脊椎炎は、脊椎に影響を及ぼすのみならず、骨および関節周辺の腱および靭帯が炎症し、その結果、痛みとこわばりを生じさせるので、股関節、肩、および膝にも影響を及ぼす場合のある自己免疫障害である。強直性脊椎炎は、後期青年期または成人初期の人に影響を及ぼす傾向がある。FcRn結合抗体は、強直性脊椎炎またはその1つ以上の症状を治療、予防、または緩和するのに有用であり得る。

#### 【0223】

##### 天疱瘡

天疱瘡は、粘膜および皮膚に影響を及ぼす自己免疫障害である。この障害は、デスモグレインに対する自己抗体の産生によって特徴付けられる。デスモグレインは、カドヘリンファミリーのタンパク質であり、細胞同士を結合させるデスモソームの形成に参与する。天疱瘡は、3つのタイプのうちの1つとして分類することができる。尋常性天疱瘡は、この障害の最も一般的な形態であり、自己抗体がデスモグレイン3を標的とする。落葉状天疱瘡では、デスモグレイン1に対する自己抗体が産生される。第3のタイプかつ最もまれな障害は腫瘍随伴性天疱瘡であり、自己抗体はデスモブラキンを標的とし、リンパ腫のような癌と関連する。この障害は一般に、皮膚の外観によって皮膚科医が診断を行い、デスモグレインに対する自己抗体の検出によって確認を行う。治療法としては、ステロイドの投与、および/またはRituximab (Rituxan) のようなCD20抗体の投与が挙げられる。

#### 【0224】

##### 癌

「癌」は、本明細書で使用する場合、身体の器官および系の正常な機能を妨げる細胞が無制御に増殖することを指す。その元々の位置から移動して、重要器官に播種する癌は、罹患器官の機能低下を介して、最終的に患者を死に至らしめることもある。癌腫は、上皮細胞から生じる悪性癌であり、腺癌および扁平上皮癌が挙げられる。肉腫は、結合組織または支持組織の癌であり、骨肉腫、軟骨肉腫、および消化管間質腫瘍が挙げられる。白血病のような造血器癌は、患者の正常な造血区画に勝ることができ、それによって造血不全（貧血、血小板減少、および好中球減少の形態）をもたらし、最終的に死に至らしめる。当業者であれば、癌を肉腫、癌腫、または造血器癌に分類することができる。

#### 【0225】

本明細書で使用する場合、癌としては、乳癌、胆道癌、膀胱癌、神経膠芽腫および髄芽腫を含む脳癌、頸癌、絨毛腫、結腸癌、子宮体癌、食道癌、胃癌、急性リンパ性白血病および骨髄性白血病を含む血液腫瘍、T細胞急性リンパ性白血病/リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、AIDS関連白血病および成人T細胞白血病リンパ腫、ポーエン病およびパジェット病を含む上皮内新生物、肝臓癌、肺癌、ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫を含むリンパ腫、神経芽細胞腫、扁平上皮癌を含む口腔癌、上皮細胞、間質細胞、生殖細胞、および間葉細胞に起因する癌を含む卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および骨肉腫を含む肉腫、黒色腫、カボジ肉腫、基底細胞癌、および扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌、精上皮腫、非精上皮腫（奇形腫、絨毛腫）、間質腫瘍、および生殖細胞腫瘍等の胚腫瘍を含む精巣癌、甲状腺癌および髄様癌を含む甲状腺癌、ならびに、腺癌およびウィルムス腫瘍を含む腎臓癌という種類の癌が挙げられる。その他の癌も当業者に知られることになるであろう。

#### 【0226】

##### 胎児の治療

FcRnは、母性IgGの上皮細胞バリアを横切る胎児への輸送を媒介する。本明細書に記載されている抗体を用いて、子宮内の胎児に巨大分子薬、例えば抗生物質、および/または小分子を送達できる。胎児は、治療を必要とする状態または障害（例えば腸管感染症または代謝障害）に罹患している場合がある。その状態または障害を治療するための薬剤または分子をFcRn結合抗体にコンジュゲートさせ、子宮内に治療の必要な胎児のいる妊婦に投与することができる。コンジュゲートしたFcRn結合抗体はFcRnに結合し、それによって、胎盤を介して胎児に輸送される。胎児は薬物治療または分子治療を受

10

20

30

40

50

ける。

【0227】

免疫吸着

いくつかの実施形態では、本発明は、無用の治療抗体を個体から除去する方法を提供する。いくつかの実施形態では、無用の治療抗体はIgG抗体である。いくつかの実施形態では、無用の治療抗体は、ナタリズマブ(Biogen Idec/ElanのTysabri)、エファリズマブ(GenentechのRaptiva)、ペバシズマブ(GenentechのAvastin)のような抗VLA4抗体、およびエタネルセプト(Amgen/WyethのEnbrel)のようなFc融合タンパク質である。ナタリズマブモノクローナル抗体療法は、進行性多病巣性白質脳障害(PML)と関連している。血流および/または身体の他の部分から治療抗体を除去すると、PMLの進行が変化する場合がある。

10

【0228】

いくつかの実施形態では、本明細書に示されている治療方法は、被検者の血流から治療抗体を除去するか、または部分的に除去する方法と組み合わせてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に示されている抗FcRn抗体は、治療抗体に結合できる捕捉タンパク質と組み合わせてもよく、この組み合わせにより、血流からの治療抗体のクリアランスが増大する。いくつかの実施形態では、被検者の血流から治療抗体を除去するか、または部分的に除去する上記の方法は、血漿交換(PLEX)である。いくつかの実施形態では、抗FcRn抗体は、血漿交換を行っている被検者に投与することができる。いくつかの実施形態では、抗FcRn抗体は、血漿交換プロセスにおけるFcRnの免疫吸着剤として用いることができる。

20

【0229】

血漿交換(アフェレーシスまたはプラズマフェレーシスとも呼ばれる)では、血液を身体から取り出し、細胞分離装置によって、コレステロールまたは治療抗体のような無用の作用物質を含む血漿を血液から除去する。血液は、バッチで身体から取り出すことも、連続フローモード(処理した血液を体内に再導入可能にする)で取り出すこともできる。無用の作用剤を含む、取り出した血漿は廃棄でき、患者は、代わりにドナーの血漿またはタンパク質の添加された生理食塩水の注入を受けることができる。いくつかの実施形態では、血液から無用の作用物質を除去するか、または無用の作用物質の血中レベルを許容可能なレベルまで低下させるために、複数ラウンドの血漿交換を必要とする場合がある。いくつかの実施形態では、血液を「ろ過し」、無用の作用物質を除去してから、その血液を患者に戻す。血漿交換の方法は当該技術分野において既知であり、例えば米国特許第6,960,178号に記載されている。

30

【0230】

血漿交換は、被検者の血中における治療抗体のレベルを低下させ、恒常性を回復させることが示されている(例えばKhatrilet al; 2009; Neurology 72: 402-409を参照されたい)。

【0231】

IgGに基づく治療抗体(ナタリズマブなど)は、捕捉タンパク質のブドウ球菌プロテインA(IgGのFc領域と結合し、血流からIgG抗体を除去する)と血液を接触させることによって、血液、血漿、または血清から除去することができる。異なるアイソタイプ抗体に他の捕捉タンパク質を用いることができる。いくつかの実施形態では、抗FcRn抗体は、血漿交換プロセスにおいて捕捉タンパク質として用いることができ、その結果、血流からFcRnを除去することによって、「遊離」治療抗体の量を増加させる。得られる「遊離」治療抗体は、治療前に存在する抗体よりも半減期が短くなり、および/または、異なる捕捉タンパク質(プロテインAなど)を用いて、さらに容易に血液から除去することができる。いくつかの実施形態では、抗FcRn抗体は、血漿交換中または血漿交換前に、患者に投与する。いくつかの実施形態では、抗FcRn抗体を固定化し、カラム中で用いて、FcRnに結合させることができる。いくつかの実施形態では、治療抗体を

40

50

含む患者の血液を固定化抗FcRn抗体および固定化プロテインAの両方と接触させる。

【0232】

いくつかの実施形態では、本明細書に示されている抗FcRn抗体は、既に投与され、副作用を示している治療抗体に対する「救援」療法で用いることができる。いくつかの実施形態では、抗FcRn抗体は、血漿交換の代替策として用いることができる。抗FcRnの投与により、血管アクセス、クエン酸塩療法、およびドナー血漿の調達のような、プラズマフェレシスおよび血漿交換に関連するリスクなしに、治療抗体を枯渇させることができる。

【0233】

ヒト白血球抗原

ヒト白血球抗原(HLA)は、細胞の外側上にペプチドおよび抗原を提示し、続いて、これらがT細胞によって認識され、その結果、T細胞がB細胞を活性化することができる。利用可能なHLA遺伝子のパネルは、人によって異なる。「非自己」であるHLAを提示するいずれの細胞も、免疫応答を誘導する。一般に、自己HLAと「非自己」HLAが異なるほど、免疫応答は強くなる。例えば、臓器移植のケースでは、免疫応答を最低限に抑えるためには、類似のHLA遺伝子を有する被検者が好ましい。ドナー特異的HLA抗体は、腎臓、心臓、および肝臓移植における移植不全と関連することが分かっている。

【0234】

いくつかの実施形態では、本発明は、個体における「非自己」HLA抗体のレベルを低下させる方法を提供する。「非自己」HLA抗体のレベルの低下により、例えば臓器移植中の免疫応答を抑制することができる。いくつかの実施形態では、臓器移植を受ける予定の人に、抗FcRn抗体を投与する。いくつかの実施形態では、臓器移植を受けている人に、抗FcRn抗体を投与する。いくつかの実施形態では、臓器移植を既に受けた人に、抗FcRn抗体を投与する。HLA抗体のレベルを測定するためのアッセイは、当該技術分野において周知である。

【0235】

診断での使用

FcRnに結合し、本明細書に記載されているか、および/または本明細書に詳述されている方法によって同定される抗体は、インビトロおよびインビボ診断における有用性を有する。

【0236】

1つの態様では、本開示は、インビトロまたはインビボ(例えば被検者におけるインビボ撮像)で、FcRnの存在を検出する診断方法を提供する。この方法は、ある細胞内部位、例えばエンドソームにFcRnを局在させることを含むことができる。この方法は、(i)試料をFcRn結合抗体と接触させ、(ii)FcRn結合抗体と試料間の複合体の形成を検出することを含むことができる。この方法はまた、対照試料(例えばコントロール試料)をFcRn結合抗体と接触させ、対照試料における抗体と試料間の複合体の形成と比較して、抗体と試料間の複合体の形成の程度を割り出すことを含むことができる。コントロール試料または被検者との比較における、試料または被検者における複合体の形成の変化、例えば統計学的に有意な変化により、試料にFcRnが存在することを示すことができる。

【0237】

別の例示的な方法は、(i)FcRn結合抗体を被検者に投与し、(iii)FcRn結合抗体と被検者間の複合体の形成を検出することを含む。この検出は、複合体の形成の位置または時間を割り出すことを含むことができる。

【0238】

FcRn結合抗体を検出可能物質で直接または間接的に標識して、結合した抗体、または結合していない抗体の検出を容易にすることができる。好適な検出可能物質としては、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射性物質が挙げられる。

【0239】

10

20

30

40

50

FcRn 結合抗体と FcRn 間の複合体形成は、FcRn に結合した抗体または結合していない抗体のいずれかを測定または可視化することによって検出できる。従来の検出アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、放射性免疫測定法 (RIA)、または組織免疫組織化学法を用いることができる。FcRn 結合抗体を標識することに加えて、FcRn の存在は、検出可能物質で標識した標準および非標識 FcRn 結合抗体を用いる競合免疫測定法によって、試料においてアッセイできる。このアッセイの 1 つの例では、生体試料、標識標準、および FcRn 結合抗体を混合して、非標識抗体に結合した標識標準の量を割り出す。この試料における FcRn の量は、FcRn 結合抗体に結合した標識標準の量に反比例する。

#### 【0240】

フルオロフォアおよび発色団標識抗体を調製することができる。抗体およびその他のタンパク質は、波長が約 310 nm までの光を吸収するので、蛍光部分は、310 nm 超、好ましくは 400 nm 超の波長において実質的な吸収作用を有するように選択すべきである。さまざまな好適な蛍光剤および発色団は、Stryer, 1968, Science 162:526、および Brand, L. et al., 1972, Annu. Rev. Biochem. 41:843-868 に記載されている。FcRn 結合抗体は、米国特許第 3,940,475 号、同第 4,289,747 号、および同第 4,376,110 号に開示されているような従来の手順によって、蛍光発色団で標識できる。上記の多数の所望の特性を有する蛍光剤群の 1 つはキサンテン色素であり、キサンテン色素としては、フルオレセインおよびローダミンが挙げられる。蛍光化合物の別の群はナフチルアミンである。フルオロフォアまたは発色団で標識したら、その抗体を用いて、例えば蛍光顕微鏡 (共焦点またはデコンボリューション顕微鏡など) によって、試料における FcRn の存在または位置を検出できる。

#### 【0241】

組織学的解析：本明細書に記載されている抗体を用いて、免疫組織化学的解析を行うことができる。例えば、本開示の抗体は、標識 (精製用タグまたはエピトープタグなど) と合成することも、または、例えば、標識もしくは標識結合基をコンジュゲートさせることにより、検出可能に標識することもできる。例えば、キレーターを抗体に結合できる。続いて、その抗体を組織学的調製物、例えば、顕微鏡スライド上にある組織の固定切片に接触させる。結合させるためにインキュベートした後、その調製物を洗浄して、非結合抗体を除去する。続いて、例えば顕微鏡法を用いて、この調製物を解析して、抗体が調製物に結合したか確認する。

#### 【0242】

当然ながら、抗体は、結合時点に標識されていないことも可能である。結合および洗浄後、抗体を検出可能にするために、抗体を標識する。

#### 【0243】

タンパク質アレイ：FcRn 結合抗体は、タンパク質アレイ上に固定化することもできる。タンパク質アレイを診断ツールとして用いて、例えば、医学的試料 (単離細胞、血液、血清、生検など) をスクリーニングできる。当然ながら、タンパク質アレイは、例えば、FcRn またはその他の標的分子に結合するその他のリガンドも含むことができる。

#### 【0244】

ポリペプチドアレイを作製する方法は、例えば、De Wildt et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18:989-994、Lueking et al., 1999, Anal. Biochem. 270:103-111、Ge, 2000, Nucleic Acids Res. 28,e3,I-VII、MacBeath and Schreiber, 2000, Science 289:1760-1763、国際公開第 01/40803 号、および国際公開第 99/51773 A 1 号に記載されている。アレイのポリペプチドは、例えば市販の、例えば Genetic Microsystems または BioRobotics のロボット装置を用いて、高速でスポットできる。アレイの基材は、例えばニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば表

10

20

30

40

50

面改質ガラスであることができる。アレイは、多孔性マトリックス、例えば、アクリルアミド、アガロース、または別のポリマーも含むことができる。

【0245】

例えば、アレイは、例えば、上記の De Wildt の文献に記載されているような抗体アレイであることができる。その抗体を産生する細胞は、アレイ形式のフィルター上で増殖できる。抗体産生を誘発し、発現したポリペプチドを、その細胞の位置でフィルターに固定化する。抗体アレイを標識標的と接触させて、標的の各固定化抗体への結合の程度を割り出すことができる。アレイの各アドレスにおける結合の程度に関する情報は、例えばコンピュータデータベース内にプロファイルとして保存できる。抗体アレイは、複製物として作製して、例えば標的および非標的の結合プロファイルを比較する目的で用いること

10

【0246】

FACS (蛍光活性化細胞選別) : 本開示の FcRn 結合抗体を用いて、細胞、例えば試料 (患者の試料) 中の細胞を標識することができる。この抗体も、蛍光化合物に結合させる (または結合可能である)。続いて、蛍光活性化細胞選別装置を用いて (例えば、カリフォルニア州サンノゼの Becton Dickinson Immunocytometry Systems から入手可能な選別装置を用いて)、細胞を選別することができる (米国特許第 5,627,037 号、同第 5,030,002 号、および同第 5,137,809 号も参照されたい)。細胞が選別装置を通過すると、レーザー光が蛍光化合物を励起する一方で、通過する細胞を検出機が計数し、蛍光を検出することによって、蛍光化合物が細胞に結合しているか割り出す。各細胞に結合した標識の量を定量および解析して、試料を特徴付けることができる。

20

【0247】

選別装置は細胞を偏向させ、抗体が結合していない細胞から抗体が結合している細胞を分離することもできる。分離された細胞は、培養および / または特徴付けすることができる。

【0248】

インビボ撮像 : インビボで FcRn 発現組織の存在を検出する方法も特色とする。この方法は、(i) 検出可能なマーカーにコンジュゲートした抗 FcRn 抗体を被検者 (例えば自己免疫障害を有する患者) に投与することと、(ii) FcRn 発現組織または細胞に対する前記検出可能なマーカーを検出するための手段を被検者に対して行うこととを含む。例えば、被検者を例えば NMR またはその他の断層撮像手段によって撮像する。

30

【0249】

画像診断に有用な標識の例としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、および  $^{188}\text{Rh}$  のような放射線標識、フルオレセインおよびローダミンのような蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子断層撮影 (PET) スキャナーによって検出可能な陽電子放出同位体、ルシフェリンのような化学発光物質、ならびに、ペルオキシダーゼまたはホスファターゼのような酵素マーカーが挙げられる。近距離検出プローブによって検出可能な同位体のような近距離放射線放射体も用いることができる。抗体は、既知の技法を用いて、上記のような試薬で標識できる。例えば、抗体を放射線標識する技術に関する Wensel and Meares, 1983, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York, および D. Colcher et al., 1986, Meth. Enzymol. 121: 802-816 を参照されたい。

40

【0250】

放射線標識抗体も、インビトロでの診断検査に用いることができる。同位体標識抗体の比活性は、半減期、放射性標識の同位体純度、および、その標識が抗体にどの程度取り込まれるかに依存する。

【0251】

ポリペプチドを放射性同位体 ( $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$  な

50



ど)で標識する手順は、一般に知られている。例えば、トリチウム標識手順は、米国特許第4,302,438号に記載されている。ヨウ素化、トリチウム標識、および $^{35}\text{S}$ 標識の手順(例えば、マウスモノクローナル抗体に適応されるようなもの)は、例えば、Goding, J.W. (Monoclonal Antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 2nd ed. London, Orlando: Academic Press, 1986, pp124-126)、およびこの文献で引用されている参考文献に記載されている。抗体のようなポリペプチドをヨウ素化するための他の手順は、Hunter and Greenwood, 1962, Nature 144:945、David et al., 1974, Biochemistry 13:1014-1021、ならびに、米国特許第3,867,517号および同第4,376,110号に記載されている。撮像において有用である放射性標識元素としては、例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ が挙げられる。抗体をヨウ素化する手順は、Greenwood, F. et al., 1963, Biochem. J. 89:114-123、Marchalonis, J., 1969, Biochem. J. 113:299-305、およびMorrisson, M. et al., 1971, Immunochimistry 8:289-297に記載されている。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識の手順は、Burchiel, S. et al. (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-123, 1982においてRhodes, B. et al.によって、およびこの文献で引用されている参考文献に記載されている。 $^{111}\text{In}$ 標識抗体に適する手順は、Hnatowich, D.J. et al., 1983, J. Immunol. Methods, 65:147-157、Hnatowich, D. et al., 1984, J. Applied Radiation, 35:554-557、およびBuckley, R.G. et al., 1984, F.E.B.S. 66:202-204に記載されている。

#### 【0252】

放射線標識抗体のケースでは、抗体を患者に投与して、その抗体が反応する抗原を有する細胞に局在化させ、例えばカメラまたは放出断層撮影法を用いる放射性核種スキャンのような既知の技術を用いて、インビボで検出または「撮像」する。例えばA.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp65-85 (Academic Press 1985)を参照されたい。あるいは、放射線標識が陽電子を放出する場合(例えば、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、および $^{13}\text{N}$ )、陽電子放出断層撮影スキャナー(Brookhaven National Laboratoryに設置されたPet VIというスキャナーなど)を用いることができる。

#### 【0253】

MRI造影剤:磁気共鳴画像法(MRI)は、NMRを用いて生存被検者の体内特徴を可視化するものであり、予後、診断、治療、および手術に有用である。MRIは、明らかな利点として、放射性トレーサー化合物なしに用いることができる。いくつかのMRI技法は、欧州特許出願公開第EP-A-0502814号に要約されている。一般に、異なる環境における水陽子の緩和時定数T1およびT2に関する差を用いて、画像を生成させる。しかしながら、これらの差は、鮮鋭な高解像度画像をもたらすには不十分であることがある。

#### 【0254】

これらの緩和時定数の差は、造影剤によって大きくできる。このような造影剤の例とし

ては、数多くの磁性剤、常磁性剤（主にT1を変化させる）、および強磁性体または超常磁性体（主にT2応答を変化させる）が挙げられる。キレート（例えば、EDTA、DTPA、およびNTAキレート）を用いて、いくつかの常磁性物質（例えば、Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Gd<sup>3+</sup>）を付着できる（かつ毒性を低減できる）。他の造影剤は、粒子、例えば直径が10nm未満～約100nmの粒子の形態であることができる。粒子は、強磁性、反強磁性、または超常磁性を有することができる。粒子は、例えば、磁性（Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>）、γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、フェライト、および遷移元素の他の磁性無機化合物を含むことができる。磁性粒子は、非磁性物質を有する磁性結晶、および有しない磁性結晶を1つ以上含んでもよい。非磁性物質としては、（セファロース、デキストラン、デキストリン、デンプンなどのような合成または天然ポリマーを挙げることができる。

10

【0255】

(i)自然界に豊富に存在するフッ素原子の実質的にすべてが<sup>19</sup>F同位体であるので、実質的にすべてのフッ素含有化合物がNMR活性を有し、(ii)無水トリフルオロ酢酸のような化学的活性のある多くのポリフッ化化合物が比較的安価で市販されており、(iii)ヘモグロビンの代替物として酸素を運ぶために用いられるポリフッ化ポリエーテルのような多くのフッ化化合物が、ヒトに用いるものとして医学的に許容可能であることが分かっているので、FcRn結合抗体は、NMR活性<sup>19</sup>F原子、またはこのような原子を複数含む指標基で標識することもできる。インキュベーションする時間を置いた後、Pykett, 1982, Sci. Am. 246: 78-88に記載されているような装置を用いて、全身のMRIを行って、FcRn発現組織の位置を割り出し、画像化する。

20

【0256】

本開示は、FcRnに結合する抗体、および診断的使用、例えば、FcRn結合抗体またはその抗原結合性断片を用いて、インビトロで、例えば試料、例えば自己免疫障害を有する患者から採取した生検もしくは細胞において、またはインビボで、例えば被検者を撮像することによって、FcRnを検出することについての説明書を含むキットも特色とする。このキットは、標識または追加の診断剤のような少なくとも1つの追加の試薬をさらに含むことができる。インビボで用いるために、抗体を医薬組成物として調合できる。

【0257】

本発明を下記の実施例によってさらに例示するが、これらの実施例は、いかなる場合も、さらに限定するものとして解釈すべきではない。本願全体を通じて引用されている参考文献（参考文献、発行済特許、公開済特許出願、および同時係属特許出願を含む）のすべての内容は、参照により、特に、上で参照した教示について、本明細書に明示的に組み込まれる。

30

【実施例】

【0258】

実施例1：DX2504およびそのシステイン変異体

抗FcRn抗体DX-2504の軽鎖は、CDR3の最初の位置に不對システインを有する。このシステインは、軽鎖のFR1内のシステインと対をなすFR3内のシステインに隣接している。本発明者らは、CDR3内のシステインをセリンまたはアラニンのいずれかに置換する2つの変異体を構築した（下記および図9を参照されたい）。

40

【0259】

変異体

1) 532A-X53-C02: cysをserに置換した変異体

2) 532A-X54-B03: cysをalaに置換した変異体

DX-2504の軽鎖（配列番号8）、532A-X53-C02の軽鎖（配列番号10）、および532A-X54-B03の軽鎖（配列番号11）の配列アラインメント  
FR1-L

DX-2504: Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C  
532A-X53-C02: Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C  
532A-X54-B03: Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C

50

CDR 1 - L  
 DX - 2504 : TGTGSDVGSYNLVS  
 532A - X53 - C02 : TGTGSDVGSYNLVS  
 532A - X54 - B03 : TGTGSDVGSYNLVS

FR 2 - L CDR 2 - L  
 DX - 2504 : WYQQHPGKAPKLM IY GDSQRPS 532A  
 - X53 - C02 : WYQQHPGKAPKLM IY GDSQRPS 532A - X54  
 - B03 : WYQQHPGKAPKLM IY GDSQRPS

10

FR 3 - L  
 DX - 2504 : GVS N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E  
 532A - X53 - C02 : GVS N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E  
 532A - X54 - B03 : GVS N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E

FR 3 - L CDR 3 - L  
 DX - 2504 : A D Y Y C C S Y A G S G I Y V 532A - X53 - C0  
 2 : A D Y Y C S S Y A G S G I Y V 532A - X54 - B03 : A D Y Y C A S Y  
 A G S G I Y V

20

FR 4 - L  
 DX - 2504 : F G T G T K V T V L  
 532A - X53 - C02 : F G T G T K V T V L  
 532A - X54 - B03 : F G T G T K V T V L

【0260】

DX - 2504、532A - X53 - C02、および532 - X54 - B03のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）解析

0.2Mのリン酸ナトリウムで平衡化したTosoh G3000 SWXLカラム、pH6.9、Waters 2695 HPLCシステム（UV検出）において、50μgのタンパク質を注入することによって抗体純度をアッセイした。表1において（図1も参照されたい）、ピークの積分面積をモノマー率（すなわち完全抗体率）（%）、高分子量集合体率（HMW率）（%）、および低分子量種率（LMW率）（%）として表した。

30

【表1】

表1：SEC結果の概要

単離体	HMWA (%)	モノマー (%)	LMW (%)
DX-2504	2.71	96.8	0.5
532A-X53-C02	1.23	98.8	NA
532A-X54-B03	1.62	98.4	NA

40

【0261】

DX - 2504、532A - X53 - C02、および532 - X54 - B03のSDS - PAGE解析

抗体を50mMのN - エチルマレイミドで処理してから、SDS - PAGEサンプル緩衝液で処理し、10分間、72℃で加熱して、ゲルアーチファクトを発生させる場合のある遊離チオールをブロックした。抗体（4μg）を4～12%グラジエントNuPAGEゲル上に充填し、Simply Blue Safe Stainで染色してから、UV Pシステムを用いてデンシトメトリ解析を行った（表2）。（図2も参照されたい。）

50

## 【表 2】

表 2：デンシトメトリー解析の概要

非還元 mAb 試料でのデンシトメトリー解析			
バンド ID	DX-2504	532A-X54-B03	532A-X53-C02
2H/2L (モノマー)	81.6%	92.8%	92.4%
2H/1L	13.8%	6.5%	6.8%
2H	4.5%	0.7%	0.9%

## 【0262】

10

DX-2504、532A-X53-C02、および532-X54-B03の温度安定性

DX-2504、532A-X53-C02、および532-X54-B03の試料を37で1カ月間インキュベートした。解析用SECを用いた解析の際には、さまざまな時点で試料を採取した。DX-2504およびシステイン変異体の温度安定性は、モノマー率(%)の変化に基づき示されている。(図3を参照されたい。)

## 【0263】

DX-2504、532A-X53-C02、および532-X54-B03のpH安定性

DX-2504、532A-X53-C02、および532-X54-B03の試料をさまざまなpH条件で、室温にて1カ月間インキュベートした。解析用SECを用いた解析の際には、さまざまな時点で試料を採取した。DX-2504およびシステイン変異体のpH安定性は、モノマー率(%)の変化に基づき示されている。(図4を参照されたい。)

20

## 【0264】

DX-2504、532A-X53-C02、および532-X54-B03のpH8.3における安定性

表1の上の段落に記載されているようにSECを用いて、安定性を評価した。pH8.3における抗体のSEC解析が示されており、これにより、試験したpH条件において、システイン変異体の方がDX-2504よりも安定性が高いことが示されている。(図5を参照されたい。)

30

## 【0265】

DTNBによるチオール滴定

変性試薬である6Mのグアニジン塩酸塩の存在下または非存在下で、0.5時間、37で、10μの抗体を10mMのDTNB(エルマン試薬、すなわち5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸))と反応させてから、その反応物の412nmにおける吸光度を読み取る(=14,100M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)ことによって、精製抗体溶液中の遊離システインチオールの存在を評価した。チオールの濃度を抗体の濃度で除して、チオールのモル/mAbのモルを得た。(下記の表3を参照されたい。)

## 【表 3】

40

表 3：チオール滴定データの概要

DTNBアッセイ-10μMのmAb		
試料 ID	遊離チオールのモル/未変性mAbのモル	遊離チオールのモル/変性mAbのモル
DX-2504	0.06	0.62
532-X54-B03	0.05	0.31
532A-X53-C02	0.05	0.25

## 【0266】

DX-2504、532A-X53-C02、および532-X54-B03の化学変

50

## 性に対する安定性

化学変性剤グアニジン塩酸塩 (GuHCl) の濃度の関数として、自家蛍光をモニタリングすることによって、DX-2504 およびシステイン変異体のタンパク質安定性を測定した。1~8 M のさまざまな濃度の GuHCl で、1 mg/ml の各抗体産物を調製した。蛍光度を測定し、GuHCl 濃度の関数としての 360/330 の強度比をプロットする。システイン変異体の方が、変性試薬に対する構造的コンホメーション変化に関する安定性が高い。(図6を参照されたい。)

## 【0267】

hFcRn と固定化 DX-2504、532A-X53-C02、および 532-X54-B03 との相互作用の表面プラズモン共鳴 (SPR または Biacore) による速度論的解析

Biacore 3000 を用いて SPR 測定を行った。CM5 センサーチップに固定化密度約 220 RU でアミンカップリングさせることによって、DX-2504、532A-X53-C02、および 532-X54-B03 を固定化した。DX-2504 の FcRn アナライトとの相互作用の速度論的パラメータを測定するために、100 nM の FcRn から調製した 2 倍段階希釈液を 2 連で、5 分間、50 l/分 で注入した (解離相 15 分)。30 秒パルスの 10 mM のグリシン (pH 1.5、流速 75 l/分) に続いて、15 秒パルスの緩衝液によってセンサーチップ表面を再生した。HBS-P をランニング緩衝液として用いて、25 で測定を行った。対照フローセルを活性化して、モックアミンカップリング反応でブロックした。ソフトウェア Biaevaluation v. 4.1 を用いて、データを 1:1 結合モデルに適合させた。(表4、図7、および図8を参照されたい。)

## 【表4】

表4: SPRの結果の概要

	試料	$K_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>1)</sup>	$K_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
pH 6.0	532-X54-B03	$1.7 \times 10^5$	$3.1 \times 10^{-4}$	1.8
	532A-X53-C02	$3.1 \times 10^5$	$4.3 \times 10^{-4}$	1.4
	DX-2504 ロット040709	$2.4 \times 10^5$	$3.5 \times 10^{-4}$	1.5
pH 7.5	532-X54-B03	$1.1 \times 10^5$	$2.2 \times 10^{-4}$	2.0
	532A-X53-C02	$1.9 \times 10^5$	$3.2 \times 10^{-4}$	1.7
	DX-2504 ロット040709	$1.5 \times 10^5$	$2.8 \times 10^{-4}$	1.9

## 【0268】

## 実施例 2: DX-2504 の欠失変異体

抗 FcRn 抗体 DX-2504 の重鎖は、その重鎖の最後の位置 (C 末端) にリジンを含む。変異体 DX-2507 (軽鎖配列番号 18、重鎖配列番号 19) は、DX-2504 と同じ軽鎖と、DX-2504 の重鎖の C 末端リジン残基を欠損させることによって構築した変異重鎖とを含む。DX-2504 重鎖の C 末端断片 (配列番号 20) と DX-2507 重鎖の C 末端断片 (配列番号 21) との配列アラインメントを以下に示す。

DX-2504: SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMHE  
A

10

20

30

40

50

DX - 2507 : SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMHEA

DX - 2504 : LHNHYTQKSLSLSPGK

DX - 2507 : LHNHYTQKSLSLSPG

【0269】

DX - 2504 および DX - 2507 のカニクイザルにおける薬理的プロファイルおよびトキシコキネティクスプロファイル

6匹のナীব雌カニクイザルを2つの用量グループ（各グループは3匹からなる）に割り当てた。表5に、実験設計の概要を示す。実験0日目および実験7日目に、すべてのカニクイザルに20mg/kgの被験抗体を1回皮下（SC）注射した。グループ1のカニクイザルにはDX - 2504を投与し、グループ2のカニクイザルにはDX - 2507を投与した。0日目（投与前、ならびに、投与から2時間後および12時間後）、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目（投与前、ならびに、投与から2時間後および12時間後）、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、17日目、21日目、24日目、28日目、31日目、および35日目に、すべてのカニクイザルから血液を採取した。条件付きELISA法（DRD - 910 - 029）を用いて、血清試料のDX - 2504およびDX - 2507のトキシコキネティクスを解析した。条件付きELISA法（DRD - 910 - 033）を用いて、カニクイザルの総IgGレベルを解析した。

【表5】

表5：実験設計

グループ	動物数	被験Ab	投与レベル (mg/kg/回)	経路	投与濃度 (mg/mL)	投与体積 (mL/kg)
1	3	DX - 2504	20	SC	18.2	1.10
2	3	DX - 2507	20	SC	35.6	0.56

【0270】

2匹において0日目の投与から2時間後から11日目まで、1匹において0日目の投与から2時間後から13日目まで、DX - 2504の血清中濃度を検出した。個々のカニクイザルにおいて、0日目の2時間後から11日目、12日目、および17日目まで、DX - 2507の血清中濃度を検出した。したがって、得られた結果から、被験動物において、DX - 2507の血清中濃度の方がDX - 2504の濃度よりもかなり高かったことが明らかとなり、これにより、インピボではDX - 2507の方がDX - 2504よりも安定していたことが示されている。図13。

【0271】

DX - 2504の投与後、DX - 2507の投与後いずれも、カニクイザルのIgGレベルが低下した（図14）。0日目の投与後、平均総IgGレベルは、投与前のベースラインレベルの42%（DX - 2504投与グループ）および33%（DX - 2507グループ）に低下した。7日目の投与前に、平均総IgGレベルは、投与前のベースラインレベルの45%（DX - 2504投与グループ）および37%（DX - 2507グループ）に上昇した。7日目の投与後、平均総IgGレベルは、DX - 2504グループでは投与前のベースライン値の42%に、DX - 2507グループでは投与前のベースライン値の30%に低下した。総IgGレベルは、DX - 2504で処置した動物では13日目に、DX - 2507で処置した動物では21日目に、投与前のベースライン値に戻った。

【0272】

DX - 2504 および DX - 2507 のトキシコキネティクスパラメーターの平均は表

6 にまとめられている。

【表 6】

表 6 : トキシコキネティクスパラメーターの平均 (SD)

被験 A b	実験日	$C_{max}$ ( $\mu g / mL$ )	$AUC_{1ast}$ ( $d * \mu g / mL$ )	$CL / F$ ( $mL / d / kg$ )	$Vz / F$ ( $mL / kg$ )	$t_{1/2}$ (d)
DX - 2 504	0	51.9 (25.8)	70.8 (32.2)	341.0 (204.5)	879.1 (407.0)	1.9 (0.2)
	7*	32.0 (15.7)	47.5 (20.0)	492.3 (264.0)	312.4 (252.0)	0.4 (0.1)
DX - 2 507	0	75.3 (19.7)	135.6 (29.4)	152.0 (31.8)	74.1 (35.0)	0.3 (0.1)
	7*	71.6 (4.7)	120.3 (3.2)	166.3 (4.3)	73.6 (24.8)	0.3 (0.1)

\* 血清濃度プロファイルは、投与前 (7日目) のベースライン濃度に対して補正した。

10

【0273】

DX - 2504 および DX - 2507 のいずれのトキシコキネティクスパラメーターも、0日目および7日目において、実質的に一致していた。DX - 2507 の全暴露量は、DX - 2504 で観察された暴露量よりも大きかった。0日目または7日目のいずれかにおける DX - 2507 の平均最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) および血漿 / 血清中濃度 - 時間曲線 ( $AUC_{1ast}$ ) の値は、DX - 2504 に関して算出した対応する値よりも、2 ~ 3 倍大きかった。加えて、DX - 2504 の、対応する平均見かけクリアランス ( $CL / F$ )、および分布容積 ( $Vz / F$ ) の値は、DX - 2507 よりも 2 ~ 12 倍大きかった。

20

【0274】

均等物

当業者が本発明を実施できるようになるには、上記の明細で十分であると考えられる。実施例は、本発明の1つの態様の例示の1つとして意図されているので、本発明の範囲は、示されている実施例によって限定されないとともに、その他の機能的に同等の実施形態が本発明の範囲に含まれる。本明細書に記載および説明されている形態に加えて、本発明のさまざまな修正形態は、上記の説明から当業者には明らかであり、そのような修正形態は、添付の特許請求の範囲内に含まれる。本発明の利点および目的は必ずしも、本発明の各実施形態に包含されていない。

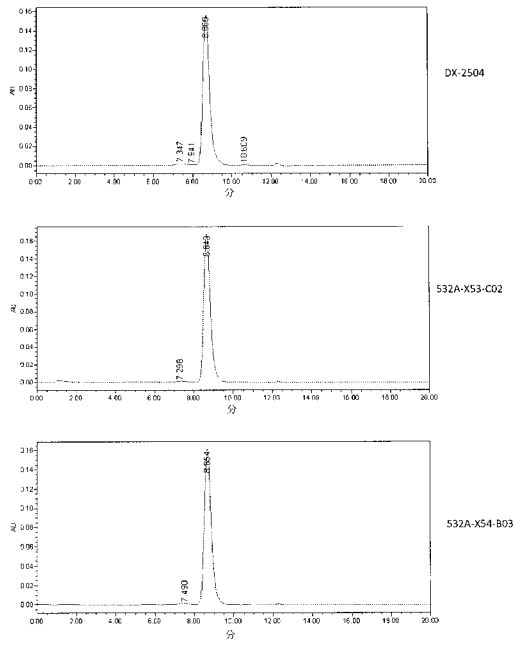
30

【0275】

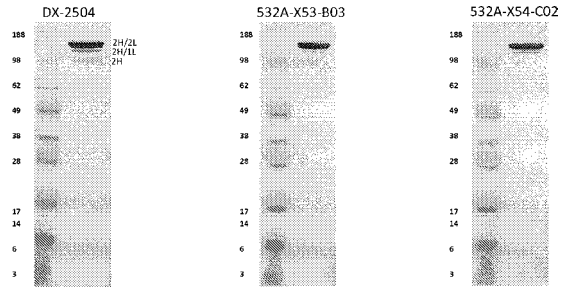
本願全体を通じて引用されているいずれの参考文献、特許、および公開済特許出願の内容は、参照により、特に本明細書で参照した用途および主題について、その全体が本明細書に組み込まれる。

40

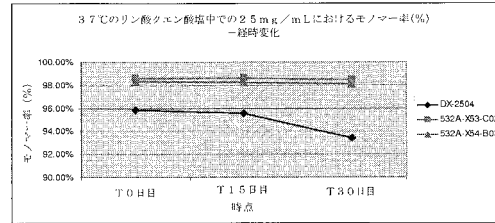
【 図 1 】



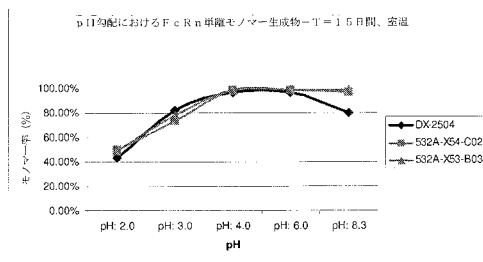
【 図 2 】



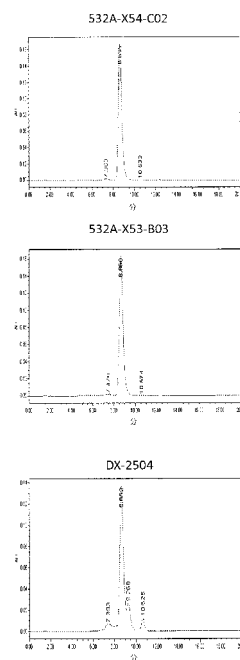
【 図 3 】



【 図 4 】

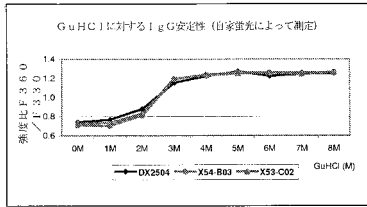


【 図 5 】

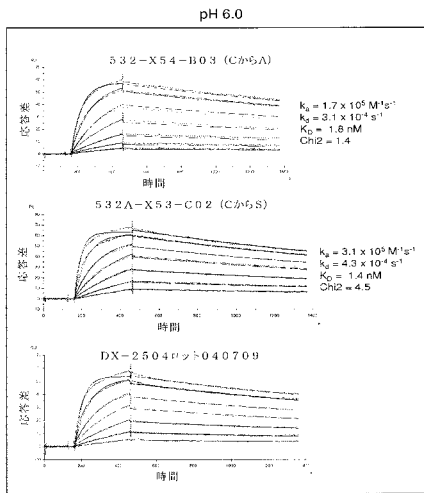




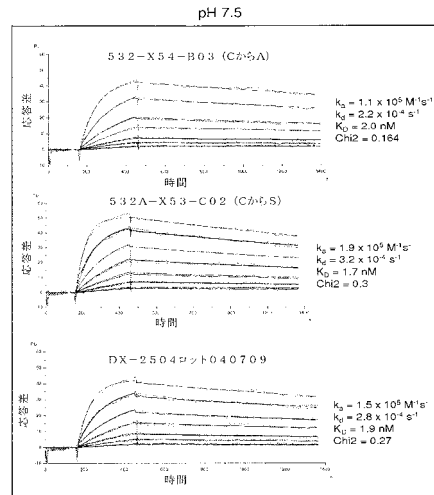
【 図 6 】



【 図 7 】



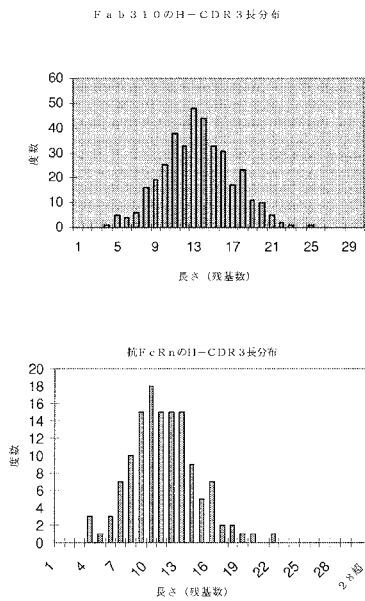
【 図 8 】



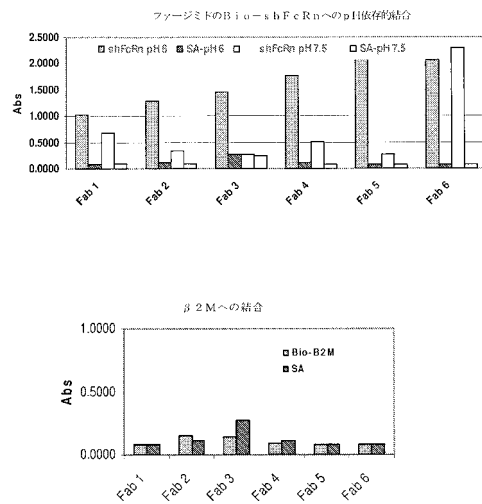
【 図 9 】

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSITIS	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIIY	GDSQRPS
532A-X53-C02	QSALTQPASVSGSPGQSITIS	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIIY	GDSQRPS
532A-X54-B03	QSALTQPASVSGSPGQSITIS	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIIY	GDSQRPS
	FR3-L	CDR3-L	FR4-L	
DX-2504:	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYC	CSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL	
532A-X53-C02	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYC	SSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL	
532A-X54-B03	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYC	ASVYAGSGIYV	FGTGTKVTVL	

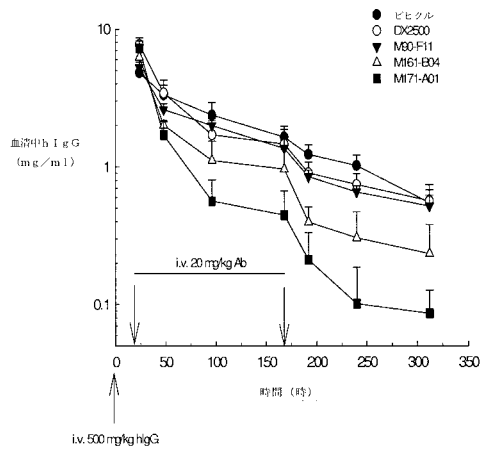
【 図 10 】



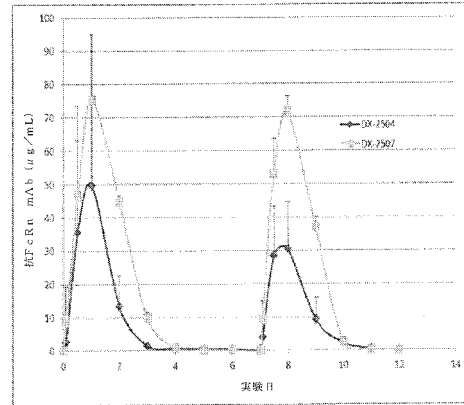
【 図 11 】



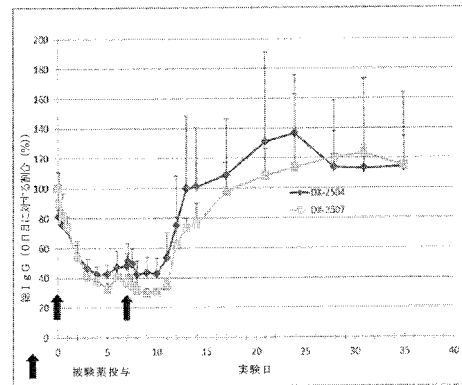
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2018121657000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 30 年 5 月 25 日 (2018.5.25)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

ヒトFcRnと結合する単離抗体であって、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2、およびV<sub>L</sub> CDR3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)を含み、  
 V<sub>L</sub> CDR3が、SSYAGSGIYV(配列番号12)またはASYAGSGIYV(配列番号13)の配列と少なくとも85%の相同性を有し、  
 少なくとも1つのCDR3領域の最初の位置にシステインを有さない単離抗体。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 セックストン, ダニエル・ジェー.

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 7 6, メルローズ 5 9 マーヴィン ロード

(72)発明者 テンハワー, クリストファー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 4 8, ホプキントン, 1 0 ウェッジウッド ドライブ

(72)発明者 ヴィスワナータン, マリーニ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 2 0, アクトン, 1 2 ファームステッド ウェイ

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 BA02  
CA25 CA44 CA464C085 AA14 AA16 BB41 BB43 BB44 CC02 CC03 CC04 CC05 CC07  
CC08 CC23 DD23 DD62 DD63 EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA22 FA74