

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-522092

(P2024-522092A)

(43)公表日 令和6年6月11日(2024.6.11)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	Z N A 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全99頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-572758(P2023-572758)	(71)出願人	504456798
(86)(22)出願日	令和4年5月27日(2022.5.27)		サノファイ
(85)翻訳文提出日	令和5年12月21日(2023.12.21)		S A N O F I
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/055019		フランス国75017パリ・アヴェニ
(87)国際公開番号	WO2022/249146		ユ・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ46
(87)国際公開日	令和4年12月1日(2022.12.1)	(74)代理人	100127926
(31)優先権主張番号	63/193,665		弁理士 結田 純次
(32)優先日	令和3年5月27日(2021.5.27)	(74)代理人	100140132
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 竹林 則幸
(31)優先権主張番号	21315127.7	(74)代理人	100216105
(32)優先日	令和3年7月15日(2021.7.15)		弁理士 守安 智
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(72)発明者	ヨーヘン・ベニンガ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		ドイツ連邦共和国65926フランクフ
	最終頁に続く		ルト・アム・マイン・サノフィ・アベン
			ティス・ドイチュラント・ゲー・エム・
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 F c 受容体に対する親和性の増強および熱安定性の改善を伴うF c バリエント

(57)【要約】

本開示は、エフェクター能のあるF c ドメインバリエントを含むF c ドメインバリエントを提供する。本開示はさらに、F c ドメインバリエントをコードする核酸、およびF c ドメインバリエントを生成する宿主細胞を提供する。F c ドメインバリエントの収量を増加させる方法、および疾患を処置するためにF c ドメインバリエントを使用する方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の重鎖と第 2 の重鎖とを含むグリコシル化 F c ドメインを含む、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドであって、

少なくとも 1 つの重鎖が、

(i) アミノ酸 2 4 2 位のロイシン (L) およびアミノ酸 3 3 4 位のリジン (K) ;

または

(i i i) アミノ酸 2 9 2 位のアルギニン (R) およびアミノ酸 3 0 2 位のバリン (V)

を置換する一対のシステイン (C) により仲介される、操作された鎖内ジスルフィド結合を含み、

前記アミノ酸位置は、E U ナンバリングに従い ;

前記グリコシル化 F c ドメインは、抗体エフェクター分子と相互作用でき ;

前記エフェクター能のあるポリペプチドは、前記操作された鎖内ジスルフィド結合を含まない抗体エフェクター分子と相互作用可能なグリコシル化 F c ドメインを有するエフェクター能のあるポリペプチドと比べて増強された熱安定性を有する、前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 2】

前記グリコシル化 F c ドメインが、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 9 7 位において天然グリカンを含む、請求項 1 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 3】

前記グリコシル化 F c ドメインが、操作されたまたは非天然のグリカンを含む、請求項 1 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 4】

前記操作されたまたは非天然のグリカンが、治療用分子に結合し得る修飾グリカンである、請求項 3 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5】

N - グリコシル化されている、請求項 1 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 6】

前記第 1 の重鎖が、前記一対のシステインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 7】

前記第 1 および前記第 2 の重鎖の各々が、前記一対のシステインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 8】

前記 F c ドメインが、I g G 1 の F c ドメインである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 9】

前記 I g G 1 の F c ドメインが、ヒト I g G 1 の F c ドメインである、請求項 8 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 10】

前記抗体エフェクター分子が F c R n である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 11】

野生型 F c ドメインと比べて増強された前記 F c R n に対する結合親和性を有する、請求項 10 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 12】

前記抗体エフェクター分子が F c R I I I a である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

野生型 Fcドメインを含むポリペプチドと比べて増強された前記 Fc R I I I a に対する結合親和性を有する、請求項 12 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 14】

野生型 Fcドメインと比べて変化した血清半減期を有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 15】

野生型 Fcドメインと比べて向上した血清半減期を有する、請求項 14 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

10

【請求項 16】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 332 位において置換を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 17】

アミノ酸 332 位での前記置換がグルタミン酸 (E) である、請求項 16 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 18】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236、239、または 330 位において 1 つまたはそれ以上の置換を含む、請求項 16 または 17 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

20

【請求項 19】

アミノ酸 236 位での前記置換がアラニン (A) である、請求項 18 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 20】

アミノ酸 239 位での前記置換がアスパラギン酸 (D) である、請求項 18 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 21】

アミノ酸 330 位での前記置換がロイシン (L) である、請求項 18 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

30

【請求項 22】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 23】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 24】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

40

【請求項 25】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 256 および / または 307 位において置換を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 26】

アミノ酸 256 位での前記置換がアスパラギン酸 (D) である、請求項 25 に記載の単

50

離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 27】

アミノ酸 307 位での前記置換がグルタミン (Q) である、請求項 25 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 28】

前記 Fc ドメインがさらに、EU ナンバリングに従うアミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 29】

前記 Fc ドメインがさらに、EU ナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

10

【請求項 30】

前記 Fc ドメインがさらに、EU ナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 31】

20

前記 Fc ドメインがさらに、EU ナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 32】

単離されたエフェクター能のあるポリペプチドであって、

少なくとも 1 つの重鎖が、

(i) アミノ酸 242 位のロイシン (L) およびアミノ酸 334 位のリジン (K) ;

または

30

(iii) アミノ酸 292 位のアルギニン (R) およびアミノ酸 302 位のバリン (V)

を置換する一対のシステイン (C) により仲介される、操作された鎖内ジスルフィド結合を含む、第 1 の重鎖と第 2 の重鎖とを含むグリコシル化 Fc ドメイン

を含み、

前記グリコシル化 Fc ドメインは、抗体エフェクター分子と相互作用でき、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む ;

前記エフェクター能のあるポリペプチドは、抗体エフェクター分子と相互作用でき、アミノ酸 332 位にグルタミン酸 (E) を含む、前記操作された鎖内ジスルフィド結合を含まないグリコシル化 Fc ドメインを有する、エフェクター能のあるポリペプチドと比べて増強された熱安定性を有し ;

40

前記アミノ酸位置は、EU ナンバリングに従う、前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 33】

前記グリコシル化 Fc ドメインが、EU ナンバリングに従うアミノ酸 297 位において天然グリカンを含む、請求項 32 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド

【請求項 34】

前記グリコシル化 Fc ドメインが、操作されたまたは非天然のグリカンを含む、請求項 32 または 33 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

50

【請求項 35】

前記操作されたまたは非天然のグリカンが、治療用分子に結合し得る修飾グリカンである、請求項 34 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 36】

N - グリコシル化されている、請求項 32 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 37】

前記第 1 の重鎖が、前記一对のシステインを含む、請求項 32 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 38】

前記第 1 および前記第 2 の重鎖の各々が、前記一对のシステインを含む、請求項 32 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

10

【請求項 39】

前記修飾 Fc ドメインが、ヒトの修飾 Fc ドメインである、請求項 32 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 40】

前記修飾 Fc ドメインが、ヒト IgG1 の修飾 Fc ドメインである、請求項 39 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 41】

前記抗体エフェクター分子が FcRn である、請求項 32 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

20

【請求項 42】

野生型 Fc ドメインと比べて増強された前記 FcRn に対する結合親和性を有する、請求項 41 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 43】

前記抗体エフェクター分子が FcRIIIa である、請求項 32 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 44】

野生型 Fc ドメインを含むポリペプチドと比べて増強された前記 FcRIIIa に対する結合親和性を有する、請求項 43 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

30

【請求項 45】

野生型 Fc ドメインと比べて変化した血清半減期を有する、請求項 32 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 46】

野生型 Fc ドメインと比べて向上した血清半減期を有する、請求項 45 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 47】

(i) アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D) ;

(ii) アミノ酸 236 位においてアラニン (A) ;

(iii) アミノ酸 330 位においてロイシン (L) ;

(iv) アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D) ; および / または

(v) アミノ酸 307 位においてグルタミン (Q)

40

をさらに含む、請求項 32 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 48】

前記 Fc ドメインがさらに、EU ナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D) 、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 47 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 49】

50

前記 F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 3 6 位においてアラニン (A)、アミノ酸 2 3 9 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 3 2 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 4 7 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 0】

前記 F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 3 6 位においてアラニン (A)、アミノ酸 2 3 9 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 3 3 0 位においてロイシン (L)、およびアミノ酸 3 3 2 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 4 7 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 1】

前記 F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 5 6 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 0 7 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 4 7 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 2】

前記 1 つまたはそれ以上の置換が、前記操作されたジスルフィド結合と同じ重鎖上にある、請求項 4 7 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 3】

前記 1 つまたはそれ以上の置換が、前記操作されたジスルフィド結合とは異なる重鎖上にある、請求項 4 7 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 4】

さらに結合ドメインを含む、請求項 3 2 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 5】

前記結合ドメインが、1 つまたはそれ以上の抗原結合ドメインを含む、請求項 5 4 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 6】

前記 1 つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、腫瘍抗原に特異的に結合する、請求項 5 5 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 7】

前記 1 つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、免疫細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項 5 5 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 8】

前記ポリペプチドが抗体である、請求項 3 2 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 5 9】

前記ポリペプチドがモノクローナル抗体である、請求項 5 8 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 6 0】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 5 8 または 5 9 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 6 1】

前記抗体が全長抗体である、請求項 5 8 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 6 2】

前記ポリペプチドが単一ドメイン抗体である、請求項 3 2 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 6 3】

前記単一ドメイン抗体が V H H 抗体である、請求項 6 2 に記載の単離されたエフェクタ

10

20

30

40

50

一能のあるポリペプチド。

【請求項 64】

前記抗体が多重特異性抗体である、請求項 32 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 65】

前記多重特異性抗体が、DVD-Ig、CODV-Ig である CODV ベースフォーマット、CrossMab、CrossMab-Fab、またはタンデム Fab からなる群から選択されるフォーマットである、請求項 64 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 66】

前記多重特異性抗体が、T細胞エンゲージャーである、請求項 64 または 65 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 67】

前記多重特異性抗体が、NK細胞エンゲージャーである、請求項 64 または 65 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 68】

前記結合ポリペプチドが、治療用ポリペプチドを含む、請求項 54 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 69】

前記治療用ポリペプチドが、受容体、リガンド、または酵素であり得る、請求項 68 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 70】

前記結合ポリペプチドが、前記 Fc ドメインの N 末端および / または C 末端に連結している、請求項 54 ~ 59 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 71】

抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) および / または補体依存性細胞傷害性 (CDC) により、標的細胞を除去できる、請求項 32 ~ 70 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 72】

前記標的細胞ががん細胞である、請求項 71 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 73】

前記標的細胞が免疫細胞である、請求項 71 に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 74】

前記ポリペプチドが Fc 融合ポリペプチドである、請求項 32 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチド。

【請求項 75】

請求項 1 ~ 74 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチドをコードする核酸を含む、単離された核酸分子。

【請求項 76】

請求項 75 に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

【請求項 77】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項 76 に記載のベクター。

【請求項 78】

請求項 76 または 77 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 79】

真核生物起源または原核生物起源である、請求項 78 に記載の宿主細胞。

【請求項 80】

10

20

30

40

50

哺乳類起源である、請求項 7 8 または 7 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 1】

細菌起源である、請求項 7 8 または 7 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 2】

請求項 1 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたエフェクター能のあるポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 8 3】

単離されたエフェクター能のあるポリペプチドの収量を増加させる方法であって、

前記方法は、第 1 の重鎖と第 2 の重鎖とを含むグリコシル化 F c ドメインを発現させることを含み、ここで、少なくとも 1 つの重鎖が、

10

(i) アミノ酸 2 4 2 位のロイシン (L) およびアミノ酸 3 3 4 位のリジン (K) ;

または

(i i i) アミノ酸 2 9 2 位のアルギニン (R) およびアミノ酸 3 0 2 位のバリン (V)

を置換する一対のシステイン (C) により仲介される、操作された鎖内ジスルフィド結合を含み、

前記アミノ酸位置は、E U ナンバリングに従い ;

前記グリコシル化 F c ドメインは、抗体エフェクター分子と相互作用でき ;

前記エフェクター能のあるポリペプチドは、前記操作された鎖内ジスルフィド結合を含まない、抗体エフェクター分子と相互作用できるグリコシル化 F c ドメインを有するエフェクター能のあるポリペプチドと比べて増強された熱安定性を有し ; さらに、

20

前記方法は、前記エフェクター能のあるポリペプチドを精製することを含み、ここで、野生型グリコシル化 F c ドメインを含むポリペプチドと比べてその収量が増加している、方法。

【請求項 8 4】

前記グリコシル化 F c ドメインが、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 9 7 位において天然グリカンを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記グリコシル化 F c ドメインが、場合により、治療用分子に結合し得る修飾グリカンである、操作されたまたは非天然のグリカンを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

30

【請求項 8 6】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、N - グリコシル化されている、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記第 1 の重鎖が、前記一対のシステインを含む、請求項 8 3 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記第 1 および前記第 2 の重鎖の各々が、前記一対のシステインを含む、請求項 8 3 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 9】

40

前記 F c ドメインがヒト F c ドメインである、請求項 8 3 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記 F c ドメインが、I g G 1 の F c ドメインである、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記抗体エフェクター分子が F c R n である、請求項 8 3 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 F c ドメインと比べて増強された前記 F c R n に対する結合親和性を有する、請求項 9 1 に記載の方法。

50

【請求項 93】

前記抗体エフェクター分子が Fc R I I I a である、請求項 83 ~ 90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 94】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fc ドメインを含むポリペプチドと比べて増強された前記 Fc R I I I a に対する結合親和性を有する、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fc ドメインと比べて変化した血清半減期を有する、請求項 83 ~ 94 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 96】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fc ドメインと比べて向上した血清半減期を有する、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記単離されたポリペプチドがさらに、1つまたはそれ以上の、エフェクター機能を増強するアミノ酸置換、場合により、EUナンバリングに従うアミノ酸 332 位における置換を含む、請求項 83 ~ 96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 98】

アミノ酸 332 位での前記置換がグルタミン酸 (E) である、請求項 97 に記載の方法

20

【請求項 99】

前記 Fc ドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236、239、または 330 位において1つまたはそれ以上の置換を含む、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

アミノ酸 236 位での前記置換がアラニン (A) である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

アミノ酸 239 位での前記置換がアスパラギン酸 (D) である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 102】

アミノ酸 330 位での前記置換がロイシン (L) である、請求項 99 に記載の方法。

30

【請求項 103】

前記 Fc ドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 104】

前記 Fc ドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 105】

前記 Fc ドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 106】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 256 および / または 307 位において置換を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

アミノ酸 256 位での前記置換がアスパラギン酸 (D) である、請求項 106 に記載の方法。

50

【請求項 108】

アミノ酸 307 位での前記置換がグルタミン (Q) である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 109】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 83 ~ 108 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 110】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 111】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 112】

前記 Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む、請求項 83 ~ 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 113】

前記 1 つまたはそれ以上の置換が、前記操作されたジスルフィド結合と同じ重鎖上にある、請求項 97 ~ 112 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 114】

前記 1 つまたはそれ以上の置換が、前記操作されたジスルフィド結合とは異なる重鎖上にある、請求項 97 ~ 112 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 115】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがさらに、結合ポリペプチドを含む、請求項 83 ~ 114 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 116】

前記結合ポリペプチドが、1 つまたはそれ以上の抗原結合ドメインを含む、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

前記 1 つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、腫瘍抗原に特異的に結合する、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

前記 1 つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、免疫細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項 117 に記載の方法。

40

【請求項 119】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが抗体である、請求項 83 ~ 118 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 120】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、モノクローナル抗体である、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 119 または 1

50

20に記載の方法。

【請求項122】

前記抗体が全長抗体である、請求項119～121のいずれか1項に記載の方法。

【請求項123】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、単一ドメイン抗体である、請求項83～118のいずれか1項に記載の方法。

【請求項124】

前記単一ドメイン抗体がVHH抗体である、請求項123に記載の方法。

【請求項125】

前記抗体が多重特異性抗体である、請求項119～124のいずれか1項に記載の方法 10

【請求項126】

前記多重特異性抗体が、DVD-Ig、場合によりCODV-IgであるCODVベースフォーマット、CrossMab、CrossMab-Fab、またはタンデムFabからなる群から選択されるフォーマットである、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

前記多重特異性抗体が、T細胞エンゲージャーである、請求項125または126に記載の方法。

【請求項128】

前記多重特異性抗体が、NK細胞エンゲージャーである、請求項125または126に記載の方法。 20

【請求項129】

前記結合ポリペプチドが、治療用ポリペプチドを含む、請求項115に記載の方法。

【請求項130】

前記治療用ポリペプチドが、受容体、リガンド、または酵素であり得る、請求項129に記載の方法。

【請求項131】

前記結合ポリペプチドが、前記FcドメインのN末端および/またはC末端に連結している、請求項115～130のいずれか1項に記載の方法。

【請求項132】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)により、標的細胞を除去できる、請求項83～131のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項133】

前記標的細胞ががん細胞である、請求項132に記載の方法。

【請求項134】

前記標的細胞が免疫細胞である、請求項132に記載の方法。

【請求項135】

前記単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがFc融合ポリペプチドである、請求項83～118のいずれか1項に記載の方法。 40

【請求項136】

請求項1～74のいずれか1項に記載のエフェクター能のあるポリペプチドの有効量を対象に投与することを含む、処置を必要とする前記対象において疾患または障害を処置する方法。

【請求項137】

前記疾患または障害ががんである、請求項136に記載の方法。

【請求項138】

前記疾患または障害が炎症性疾患である、請求項136に記載の方法。

【請求項139】

前記疾患または障害が自己免疫疾患である、請求項136に記載の方法。 50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本特許出願は、参照によってその開示の全体が本明細書に組み入れられる、2021年5月27日に出願した米国仮特許出願第63/193665号、および2021年7月15日に出願した欧州特許出願第21315127.7号の優先権を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

抗体のフラグメント結晶化可能(Fc)領域とFcガンマ受容体(FcR)との間の特異性エンゲージメントは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害性(ADCC)のようなエフェクター機能における初期段階である(Arnoldら、2007年)。ヒトでは、活性化FcRIIIaは、ナチュラルキラー細胞の表面上で発現する。FcRIIIaは、低親和性受容体であり、抗体抗原免疫複合体中のクラスター化したFc領域のエンゲージメントと同時に起こる、この表面受容体の架橋が、細胞の活性化を引き起こす。Fc領域は、胎児性Fc受容体(FcRn)とも相互作用する。この相互作用は、内皮細胞でのリソソーム分解を低下させて、IgGの半減期を延長させることが示された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

Fc受容体に対する親和性を増強する、したがって、ADCC活性および/または血清半減期を向上させるFcドメインバリエーションを同定するために、Fc操作が広く追求された。新規Fcドメインバリエーションが必要である。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は部分的に、変化したエフェクター機能を有するFcドメインバリエーションは、野生型Fcドメインと比べて低下した熱安定性を有するという発見を対象とする。したがって、本開示はさらに部分的に、上昇した熱安定性および意外なことに上昇したin vivo安定性を有する新規Fcドメインバリエーションの発見を対象とする。

【0005】

一態様では、第1の重鎖と第2の重鎖とを含むグリコシル化Fcドメインを含む、単離されたエフェクター能のあるポリペプチド(effector-competent polypeptide)を提供し、ただし、少なくとも1つの重鎖は、(i)アミノ酸242位のロイシン(L)およびアミノ酸334位のリジン(K);(ii)アミノ酸287位のアラニン(A)およびアミノ酸306位のロイシン(L);または(iii)アミノ酸292位のアルギニン(R)およびアミノ酸302位のバリン(V)を置換する一対のシステイン(C)により仲介される、操作された鎖内ジスルフィド結合を含み;該アミノ酸位置は、EUナンバリングに従い;該グリコシル化Fcドメインは、抗体エフェクター分子と相互作用でき;該エフェクター能のあるポリペプチドは、操作された鎖内ジスルフィド結合を含まない、抗体エフェクター分子と相互作用できるグリコシル化Fcドメインを有するエフェクター能のあるポリペプチドと比べて増強された熱安定性を有する。

【0006】

特定の例示的实施形態では、グリコシル化Fcドメインが、EUナンバリングに従うアミノ酸297位において天然グリカンを含む。

【0007】

特定の例示的实施形態では、グリコシル化Fcドメインが、アミノ酸297位において、操作されたまたは非天然のグリカンを含む。特定の例示的实施形態では、操作されたまたは非天然のグリカンが、修飾グリカンである。

【0008】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、N-グ

リコシル化されている。

【0009】

特定の例示的实施形態では、グリコシル化Fcドメインが、治療用分子に結合した修飾グリカンを含む。

【0010】

特定の例示的实施形態では、第1の重鎖が、一对のシステインを含む。特定の例示的实施形態では、第1および第2の重鎖の各々が、一对のシステインを含む。

【0011】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインが、IgG1のFcドメインである。特定の例示的实施形態では、IgG1のFcドメインが、ヒトIgG1のFcドメインである。

10

【0012】

特定の例示的实施形態では、抗体エフェクター分子がFcRnである。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて増強されたFcRnに対する結合親和性を有する。

【0013】

特定の例示的实施形態では、抗体エフェクター分子がFcRIIIaである。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインを含むポリペプチドと比べて増強されたFcRIIIaに対する結合親和性を有する。

【0014】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて変化した血中半減期を有する。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて向上した血清半減期を有する。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて改善したin vivo安定性を有する。

20

【0015】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸332位において置換を含む。特定の例示的实施形態では、アミノ酸332位での置換がグルタミン酸(E)である。特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸236位、239位、または330位において1つまたはそれ以上の置換を含む。特定の例示的实施形態では、アミノ酸236位での置換がアラニン(A)である。特定の例示的实施形態では、アミノ酸239位での置換がアスパラギン酸(D)である。特定の例示的实施形態では、アミノ酸330位での置換がロイシン(L)である。

30

【0016】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸239位においてアスパラギン酸(D)、およびアミノ酸332位においてグルタミン酸(E)を含む。

【0017】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸236位においてアラニン(A)、アミノ酸239位においてアスパラギン酸(D)、およびアミノ酸332位においてグルタミン酸(E)を含む。

40

【0018】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸236位においてアラニン(A)、アミノ酸239位においてアスパラギン酸(D)、アミノ酸330位においてロイシン(L)、およびアミノ酸332位においてグルタミン酸(E)を含む。

【0019】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸256位および/または307位において置換を含む。

50

特定の例示的实施形態では、アミノ酸 2 5 6 位での置換がアスパラギン酸 (D) である。

特定の例示的实施形態では、アミノ酸 3 0 7 位での置換がグルタミン (Q) である。

【 0 0 2 0 】

特定の例示的实施形態では、F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 5 6 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 0 7 位においてグルタミン (Q) を含む。

【 0 0 2 1 】

特定の例示的实施形態では、F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 3 9 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 3 3 2 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 2 5 6 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 0 7 位においてグルタミン (Q) を含む。

10

【 0 0 2 2 】

特定の例示的实施形態では、F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 3 6 位においてアラニン (A)、アミノ酸 2 3 9 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 3 3 2 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 2 5 6 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 0 7 位においてグルタミン (Q) を含む。

【 0 0 2 3 】

特定の例示的实施形態では、F c ドメインがさらに、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 3 6 位においてアラニン (A)、アミノ酸 2 3 9 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 3 3 0 位においてロイシン (L)、アミノ酸 3 3 2 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 2 5 6 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 0 7 位においてグルタミン (Q) を含む。

20

【 0 0 2 4 】

他の態様では、第 1 の重鎖と第 2 の重鎖とを含むグリコシル化 F c ドメインを含む、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドを提供し、ただし、少なくとも 1 つの重鎖は、(i) アミノ酸 2 4 2 位のロイシン (L) およびアミノ酸 3 3 4 位のリジン (K)；(i i) アミノ酸 2 8 7 位のアラニン (A) およびアミノ酸 3 0 6 位のロイシン (L)；または (i i i) アミノ酸 2 9 2 位のアルギニン (R) およびアミノ酸 3 0 2 位のバリン (V) を置換する一対のシステイン (C) により仲介される、操作された鎖内ジスルフィド結合を含み；該グリコシル化 F c ドメインは、抗体エフェクター分子と相互作用でき、アミノ酸 3 3 2 位においてグルタミン酸 (E) を含み；該エフェクター能のあるポリペプチドは、抗体エフェクター分子と相互作用でき、アミノ酸 3 3 2 位にグルタミン酸 (E) を含む、操作された鎖内ジスルフィド結合を含まないグリコシル化 F c ドメインを有するエフェクター能のあるポリペプチドと比べて増強された熱安定性を有し、アミノ酸位置は、E U ナンバリングに従う。

30

【 0 0 2 5 】

特定の例示的实施形態では、グリコシル化 F c ドメインが、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 9 7 位において天然グリカンを含む。

【 0 0 2 6 】

特定の例示的实施形態では、グリコシル化 F c ドメインが、E U ナンバリングに従うアミノ酸 2 9 7 位において天然グリカンを含む。特定の例示的实施形態では、操作されたまたは非天然のグリカンが、修飾グリカンである。

40

【 0 0 2 7 】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、N - グリコシル化されている。特定の例示的实施形態では、修飾グリカンが、治療用分子に結合している。

【 0 0 2 8 】

特定の例示的实施形態では、第 1 の重鎖が、一対のシステインを含む。特定の例示的实施形態では、第 1 および第 2 の重鎖の各々が、一対のシステインを含む。

【 0 0 2 9 】

50

特定の例示的实施形態では、修飾 Fcドメインが、ヒトの修飾 Fcドメインである。特定の例示的实施形態では、修飾 Fcドメインが、ヒト IgG1 の修飾 Fcドメインである。

【0030】

特定の例示的实施形態では、抗体エフェクター分子が FcRn である。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fcドメインと比べて増強された FcRn に対する結合親和性を有する。

【0031】

特定の例示的实施形態では、抗体エフェクター分子が FcRIIIa である。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fcドメインを含むポリペプチドと比べて増強された FcRIIIa に対する結合親和性を有する。

10

【0032】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fcドメインと比べて変化した血清半減期を有する。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fcドメインと比べて向上した血清半減期を有する。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型 Fcドメインと比べて改善した *in vivo* 安定性を有する。

【0033】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがさらに、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、および/またはアミノ酸 30 位においてグルタミン (Q) を含む。

20

【0034】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む。

【0035】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む。

30

【0036】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む。

【0037】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む。

40

【0038】

特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の置換が、操作されたジスルフィド結合と同じ重鎖上にある。

【0039】

特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の置換が、操作されたジスルフィド結合とは異なる重鎖上にある。

【0040】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがさらに、結合ドメインを含む。特定の例示的实施形態では、結合ドメインが、1つまたはそれ以上の抗原結合ドメインを含む。特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の抗原結合

50

ドメインが、腫瘍抗原に特異的に結合する。特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、免疫細胞上の抗原に特異的に結合する。特定の例示的实施形態では、結合ポリペプチドが、治療用ポリペプチドを含む。特定の例示的实施形態では、治療用ポリペプチドが、受容体、リガンド、または酵素であり得る。

【0041】

特定の例示的实施形態では、ポリペプチドが抗体である。特定の例示的实施形態では、ポリペプチドがモノクローナル抗体である。特定の例示的实施形態では、抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。特定の例示的实施形態では、抗体が全長抗体である。

【0042】

特定の例示的实施形態では、ポリペプチドが単ドメイン抗体である。特定の例示的实施形態では、単ドメイン抗体がVHH抗体である。

【0043】

特定の例示的实施形態では、抗体が多重特異性抗体である。特定の例示的实施形態では、多重特異性抗体が、DVD-Ig、CODV-IgのようなCODVベースフォーマット、CrossMab、CrossMab-Fab、およびタンデムFabからなる群から選択されるフォーマットである。CROSSODILES（登録商標）CODVプラットフォームに基づく多重特異性抗体は、特に、国際公開第2012135345号、国際公開第2016116626号、国際公開第2017180913号に記載される。CROSSODILES（登録商標）は、Sanofi社の登録商標である。特定の例示的实施形態では、多重特異性抗体が、T細胞エンゲージャーである。特定の例示的实施形態では、多重特異性抗体が、NK細胞エンゲージャーである。

【0044】

特定の例示的实施形態では、結合ポリペプチドが、FcドメインのN末端および/またはC末端に連結している。

【0045】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)により、標的細胞を除去できる。

【0046】

特定の例示的实施形態では、標的細胞ががん細胞である。

【0047】

特定の例示的实施形態では、標的細胞が免疫細胞である。

【0048】

特定の例示的实施形態では、ポリペプチドがFc融合ポリペプチドである。

【0049】

他の態様では、前記の単離されたエフェクター能のあるポリペプチドをコードする核酸を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0050】

特定の例示的实施形態では、ベクターが、単離された核酸分子を含む。特定の例示的实施形態では、ベクターが発現ベクターである。

【0051】

他の態様では、ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0052】

特定の例示的实施形態では、宿主細胞が、真核生物起源または原核生物起源である。特定の例示的实施形態では、宿主細胞が哺乳類起源である。特定の例示的实施形態では、宿主細胞は細菌起源である。

【0053】

他の態様では、前記の単離されたエフェクター能のあるポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0054】

他の態様では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドの収量を増加させる方法であって、本方法は、第1の重鎖と第2の重鎖とを含むグリコシル化Fcドメインを発現させることを含み、ここで、少なくとも1つの重鎖は、(i)アミノ酸242位のロイシン(L)およびアミノ酸334位のリジン(K)；(ii)アミノ酸287位のアラニン(A)およびアミノ酸306位のロイシン(L)；または(iii)アミノ酸292位のアルギニン(R)およびアミノ酸302位のバリン(V)を置換する一対のシステイン(C)により仲介される、操作された鎖内ジスルフィド結合を含み；該アミノ酸位置は、EUナンバリングに従い；該グリコシル化Fcドメインは、抗体エフェクター分子と相互作用でき；該エフェクター能のあるポリペプチドは、操作された鎖内ジスルフィド結合を含まない、抗体エフェクター分子と相互作用できるグリコシル化Fcドメインを有するエフェクター能のあるポリペプチドと比べて増強された熱安定性を有し、さらに、本方法は、エフェクター能のあるポリペプチドを精製することを含み、ここで、前記ポリペプチドの収量は、野生型グリコシル化Fcドメインを含むポリペプチドと比べて増加する、方法を提供する。

10

【0055】

特定の例示的实施形態では、グリコシル化Fcドメインが、EUナンバリングに従うアミノ酸297位において天然グリカンを含む。特定の例示的实施形態では、グリコシル化Fcドメインが、アミノ酸297位において、場合により修飾グリカンである、操作されたまたは非天然のグリカンを含む。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、N-グリコシル化されている。特定の例示的实施形態では、修飾グリカンが、治療用分子に結合し得る。

20

【0056】

特定の例示的实施形態では、第1の重鎖が、一対のシステインを含む。

【0057】

特定の例示的实施形態では、第1および第2の重鎖の各々が、一対のシステインを含む。

【0058】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインが、ヒトのFcドメインである。特定の例示的实施形態では、Fcドメインが、IgG1のFcドメインである。

30

【0059】

特定の例示的实施形態では、抗体エフェクター分子がFcRnである。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて増強されたFcRnに対する結合親和性を有する。

【0060】

特定の例示的实施形態では、抗体エフェクター分子がFcRIIIaである。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインを含むポリペプチドと比べて増強されたFcRIIIaに対する結合親和性を有する。

【0061】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて変化した血清半減期を有する。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて向上した血清半減期を有する。

40

【0062】

特定の例示的实施形態では、単離されたポリペプチドがさらに、1つまたはそれ以上の、エフェクター機能を増強するアミノ酸置換、場合により、EUナンバリングに従うアミノ酸332位における置換を含む。特定の例示的实施形態では、アミノ酸332位での置換がグルタミン酸(E)である。特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸236位、239位、または330位において1つまたは

50

それ以上の置換を含む。特定の例示的实施形態では、アミノ酸 236 位での置換がアラニン (A) である。特定の例示的实施形態では、アミノ酸 239 位での置換がアスパラギン酸 (D) である。特定の例示的实施形態では、アミノ酸 330 位での置換がロイシン (L) である。

【0063】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む。

【0064】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む。

10

【0065】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、およびアミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E) を含む。

【0066】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 256 位および / または 307 位において置換を含む。特定の例示的实施形態では、アミノ酸 256 位での置換がアスパラギン酸 (D) である。特定の例示的实施形態では、アミノ酸 307 位での置換がグルタミン (Q) である。

20

【0067】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む。

【0068】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む。

30

【0069】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む。

【0070】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸 236 位においてアラニン (A)、アミノ酸 239 位においてアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 330 位においてロイシン (L)、アミノ酸 332 位においてグルタミン酸 (E)、アミノ酸 256 位においてアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 307 位においてグルタミン (Q) を含む。特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の置換が、操作されたジスルフィド結合と同じ重鎖上にある。特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の置換が、操作されたジスルフィド結合とは異なる重鎖上にある。

40

【0071】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがさらに、結合ポリペプチドを含む。特定の例示的实施形態では、結合ポリペプチドが、1つまたはそれ以上の抗原結合ドメインを含む。特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、腫瘍抗原に特異的に結合する。特定の例示的实施形態では、1つまたはそれ以上の抗原結合ドメインが、免疫細胞上の抗原に特異的に結合する。

50

【 0 0 7 2 】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが抗体である。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、モノクローナル抗体である。特定の例示的实施形態では、抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。特定の例示的实施形態では、抗体が全長抗体である。

【 0 0 7 3 】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、単一ドメイン抗体である。特定の例示的实施形態では、単一ドメイン抗体がVHH抗体である。特定の例示的实施形態では、抗体が多重特異性抗体である。特定の例示的实施形態では、多重特異性抗体が、DVD-Ig、CODV-IgのようなCODVベースフォーマット、CrossMab、CrossMab-Fb、およびタンデムFabからなる群から選択されるフォーマットである。特定の例示的实施形態では、多重特異性抗体が、T細胞エンゲージャーである。特定の例示的实施形態では、多重特異性抗体が、NK細胞エンゲージャーである。

10

【 0 0 7 4 】

特定の例示的实施形態では、結合ポリペプチドが、治療用ポリペプチドを含む。特定の例示的实施形態では、治療用ポリペプチドが、受容体、リガンド、または酵素であり得る。

【 0 0 7 5 】

特定の例示的实施形態では、結合ポリペプチドが、FcドメインのN末端および/またはC末端に連結している。

20

【 0 0 7 6 】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)により、標的細胞を除去できる。特定の例示的实施形態では、標的細胞ががん細胞である。特定の例示的实施形態では、標的細胞が免疫細胞である。

【 0 0 7 7 】

特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドがFc融合ポリペプチドである。

【 0 0 7 8 】

他の態様では、前記の、エフェクター能のあるポリペプチドの有効量を対象に投与することを含む、処置を必要とする対象において疾患または障害を処置する方法を提供する。

30

【 0 0 7 9 】

特定の例示的实施形態では、疾患または障害ががんである。特定の例示的实施形態では、疾患または障害が炎症性疾患である。特定の例示的实施形態では、疾患または障害が自己免疫疾患である。

【 0 0 8 0 】

本発明の前記および他の特徴および利点は、添付図面と合わせた例示的实施形態の以下の詳細な説明から、より十分に理解される。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 8 1 】

【 図 1 A 】 3 0 0 K および 3 7 0 K での疎水性接触頻度の平均を示す。図 1 A は、アミノ酸 3 3 2 位におけるグルタミン酸 (E) の疎水性接触の平均頻度を示す。図 1 B は、3 0 0 K でのアルファ炭素の根平均二乗揺らぎ (オングストローム) を示す。

【 図 1 B 】 3 0 0 K および 3 7 0 K での疎水性接触頻度の平均を示す。図 1 A は、アミノ酸 3 3 2 位におけるグルタミン酸 (E) の疎水性接触の平均頻度を示す。図 1 B は、3 0 0 K でのアルファ炭素の根平均二乗揺らぎ (オングストローム) を示す。

【 図 2 】 I 3 3 2 E (緑色 C P K レンダリング)、および構造的に近接する、L 2 4 2 C + K 3 3 4 C 操作されたジスルフィド結合 (オレンジ色 C P K レンダリング) による、Fc CH2 ドメイン上のDSBグラフティングの一例 (線 - リボン) を示す。

50

【図3】非共有結合ネットワークの一例を、I332（左パネル、疎水性接触を点線で強調）およびI332E（右パネル、静電接触（electrostatic contact）を点線で強調）に関して示す。

【図4】DSB変異用に使われた位置の一例を示す。左パネルのL242+K334（円内の棒）。右パネルのR292およびV302（円内の棒）。

【図5】陰性対照として選ばれたA287およびL306（下方の黄色棒）の位置を示す。この2つの残基はFcRn結合表面に近接し、IgGのCH2ドメインの境界にあり、2つの先行するDSBスキームよりも予測される構造的な衝撃は低い。

【図6-1】mAb1 ADLEおよびDSB変異体によるジスルフィド結合の抽出イオンクロマトグラム（XIC）ペプチド定量プロファイルを示す。ADLEでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、8つのジスルフィド結合が検出された。ADLE__DQ__R292C__V302Cでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、9つのジスルフィド結合が検出された。ADLE__DQ__L242C__K334Cでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、8つのジスルフィド結合が、1つの共通ペプチド（変異およびヒンジに対して同じ）と共に検出された。

10

【図6-2】図6-1の続き。

【図6-3】図6-2の続き。

【図7A-1】mAb1 DEおよびDSB変異体（図7A）ならびにmAb1 ADEおよびDSB変異体（図7B）によるジスルフィド結合のXICペプチド定量プロファイルを示す。DEでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、8つのジスルフィド結合が検出された。DE__DQ__R292C__V302Cでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、9つのジスルフィド結合が検出された。DE__DQ__L242C__K334Cでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、9つのジスルフィド結合が、1つの共通ペプチド（変異およびヒンジに対して同じ）と共に検出された。

20

【図7A-2】図7A-1の続き。

【図7A-3】図7A-2の続き。

【図7B-1】mAb1 DEおよびDSB変異体（図7A）ならびにmAb1 ADEおよびDSB変異体（図7B）によるジスルフィド結合のXICペプチド定量プロファイルを示す。DEでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、8つのジスルフィド結合が検出された。DE__DQ__R292C__V302Cでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、9つのジスルフィド結合が検出された。DE__DQ__L242C__K334Cでは、デッドボリューム中に溶出した218LC-223HCを除き、9つのジスルフィド結合が、1つの共通ペプチド（変異およびヒンジに対して同じ）と共に検出された。

30

【図7B-2】図7B-1の続き。

【図7B-3】図7B-2の続き。

【図8】ナノ示差走査蛍光定量法（ナノDSF）により決定した、mAb1 ADLEバリエーションに関するジスルフィド安定化の熱安定性効果を示す。

40

【図9A】ナノDSFにより決定した、mAb1 DEバリエーション（図9A）およびADEバリエーション（図9B）に関するジスルフィド安定化の熱安定性効果を示す。

【図9B】ナノDSFにより決定した、mAb1 DEバリエーション（図9A）およびADEバリエーション（図9B）に関するジスルフィド安定化の熱安定性効果を示す。

【図10-1】ナノ示差走査蛍光定量法（ナノDSF）により決定した、mAb3ならびにmAb4のDE、ADE、DE+DSB（R292C-V302C）、およびADE+DSB（R292C-V302C）バリエーションに関するジスルフィド安定化の熱安定性効果を示す。左パネルはmAb3バリエーションを示し、右パネルはmAb4バリエーションを示し、カラーコードは以下のとおり：DE（緑色）、ADE（赤色）、DE+DSB（紫色）、ADE DSB（青色）、WT（黒色）。

50

【図10-2】図10-1の続き。

【図11-1】ADLEバリエント、DEバリエント、およびADEバリエントのCDC活性を、mAb1+/-ADLE、DE、またはADE+/-DSB(L242C_K334C)もしくはR292C_V302C)に関して、IgG1野生型と比べて示す。

【図11-2】図11-1の続き。

【図12-1】ADLEバリエント、DEバリエント、およびADEバリエントのCDC活性を、mAb1+/-ADLE、DE、またはADE-/+DQ+/-R292C_V302C)に関して、IgG1野生型と比べて示す。

【図12-2】図12-1の続き。

【図13-1】ADLEバリエント、DEバリエント、およびADEバリエントのCDC活性を、mAb1+ADLE、DE、またはADE-/+DQ+/-L242C_K334C)に関して、IgG1野生型と比べて示す。

【図13-2】図13-1の続き。

【図14-1】ADLEバリエント、DEバリエント、およびADEバリエントのADC活性を、mAb1+/-ADLE、DE、またはADE+/-L242C_K334C)もしくはR294C_V304C)に関して、IgG1野生型と比べて示す。

【図14-2】図14-1の続き。

【図15-1】ADLEバリエント、DEバリエント、およびADEバリエントのADC活性を、mAb1+/-ADLE、DE、またはADE-/+DQ+/-R292C_V302C)に関して、IgG1野生型と比べて示す。

【図15-2】図15-1の続き。

【図16-1】ADLEバリエント、DEバリエント、およびADEバリエントのADC活性を、mAb1+/-ADLE、DE、またはADE-/+DQ+/-DSB L242C_K334C)に関して、IgG1野生型と比べて示す。

【図16-2】図16-1の続き。

【図17】R292C-V302C DSB置換の有無での、ADEバリエントおよびDEバリエントの細胞毒性活性を示す。y軸が特異的溶解率であり、x軸がnMで示すmAb3濃度である。

【図18-1】Tg32マウスにおけるmAb1抗体の平均PKプロファイルを示す(対数スケール)。

【図18-2】図18-1の続き。

【図18-3】図18-2の続き。

【図19-1】Tg32マウスにおけるさらなるmAb1抗体の平均PKプロファイルを示す(対数スケール)。

【図19-2】図19-1の続き。

【図19-3】図19-2の続き。

【図20】Tg32マウスにおけるmAb3抗体の平均PKプロファイルを示す(対数スケール)。

【発明を実施するための形態】

【0082】

本開示は、改善された熱安定性を有する新規Fcドメインバリエント(例えば、Fcドメインバリエントを含む新規結合ポリペプチド)を提供する。本開示はさらに、Fc受容体に対する改善された結合を有する新規Fcドメインバリエント(例えば、Fcドメインバリエントを含む新規結合ポリペプチド)を提供する。本開示はさらに、野生型(例えば、非修飾)Fcドメインと比べて、抗体エフェクター分子との相互作用を増強させるグリコシル化Fcドメインを含む新規Fcドメインバリエント(例えば、Fcドメインバリエントを含む結合ポリペプチド)を提供する。本開示はさらに、Fcドメインバリエント(例えば、Fcドメインバリエントを含む新規結合ポリペプチド)をコードする核酸、Fcドメインバリエント(例えば、Fcドメインバリエントを含む新規結合ポリペプチド)を生成する組換え発現ベクターおよび宿主細胞、ならびに単離されたFcドメインバリエン

10

20

30

40

50

ト（例えば、Fcドメインバリエーションを含む新規結合ポリペプチド）を含む医薬組成物を提供する。1つまたはそれ以上の疾患または障害を処置するために、本開示のFcドメインバリエーション（例えば、Fcドメインバリエーションを含む新規結合ポリペプチド）を使用する方法が、さらに提供される。

【0083】

本開示に記載される方法は、本明細書に開示される特定の方法及び実験条件に限定されず、それ自体、方法及び条件は変わり得ると理解されるものである。同じく、本明細書で使用する術語は、単に特定の実施形態を記載する目的のためであり、限定することは意図しないと理解されるべきである。

【0084】

さらに、本明細書に記載される実験は、異なる指定がない限り、当該分野の技術範囲内にある従来の分子細胞生物学および免疫学的な技術を使用する。そのような技術は、熟練作業員には周知であり、文献中で十分に説明されている。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Inc.、NY、N.Y.（1987～2008年）（すべての補遺を含む）、MR GreenおよびJ. SambrookによるMolecular Cloning: A Laboratory Manual（第4版）、ならびにHarlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、第14章、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor（2013年、第2版）を参照。

【0085】

異なる定義がない限り、本明細書で使用する科学用語および技術用語は、当業者が一般的に理解する意味を有する。万一の潜在的な多義性の場合、本明細書で提供する定義が、辞書の定義または外的定義に優先する。文脈上他の解釈が要求される場合を除き、単数表現は複数を含み、複数表現は単数を含むものとする。「または（or）」の使用は、異なる指定がない限り、「および/または（and/or）」を意味する。用語「含む（including）」、ならびに「含む（includes）」および「含まれる（included）」のような他の形の使用は、限定的ではない。

【0086】

一般的に、本明細書に記載される、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションとの関連で使用する専門用語は、周知であり、当該分野では一般的に使用される。本明細書で提供される方法及び技術は、異なる指定がない限り、当該分野で周知の従来の方法に従って、本明細書を通じて引用および考察される様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載されるように一般的に行われる。酵素反応および精製技術は、メーカー仕様書に従って、当該分野で一般的に実現されるように、または本明細書に記載されるように行う。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、および創薬化学（medicinal and pharmaceutical chemistry）との関連で使用する専門用語、ならびに検査方法ならびに実験技術は、周知のものであり、当該分野では一般的に使用される。化学合成、化学分析、医薬調製、調合、および送達、ならびに患者の処置には、標準的技術を使用する。

【0087】

本開示がより容易に理解されるよう、選択用語を以下で定義する。

【0088】

用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のいずれかの高分子鎖に関し、文脈により矛盾しない限り、天然タンパク質または人工タンパク質、ポリペプチド類似体、またはタンパク質配列のバリエーション、またはそれらの断片を含む。ポリペプチドは、単量体または重合体であり得る。ポリペプチド断片は、例えば、少なくとも約5個の連続アミノ酸、少なくとも約10個の連続アミノ酸、少なくとも約15個の連続アミノ酸、または少なくとも約20個の連続アミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0089】

用語「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」は、その起源または派生元により、その天然状態では付随する天然関連成分を伴わない；同じ種に由来する他のタンパク質を実質的に含まない；異なる種に由来する細胞によって発現される；または自然界に存在しないタンパク質またはポリペプチドに関する。したがって、化学合成されるか、または天然での由来元である細胞とは異なる細胞系で合成されるタンパク質またはポリペプチドは、その天然関連成分から「単離状態」である。タンパク質またはポリペプチドは同じく、当該分野で周知のタンパク質精製技術を使用した単離により、天然関連成分を実質的に含まなくさせ得る。

【0090】

本明細書で使用する用語「結合タンパク質」または「結合ポリペプチド」は、目的の標的抗原（例えば、ヒト標的抗原）に対する選択的な結合を担う少なくとも1つの結合部位を含有するタンパク質またはポリペプチド（例えば、抗体またはイムノアドヘシン）に関するものとする。例示的結合部位は、抗体可変ドメイン、受容体のリガンド結合部位、またはリガンドの受容体結合部位を含む。特定の態様では、結合タンパク質または結合ポリペプチドが、複数（例えば、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上）の結合部位を含む。特定の態様では、結合タンパク質または結合ポリペプチドが、治療用酵素である。

【0091】

用語「リガンド」は、他の物質に結合できるか、または結合されるいずれかの物質に関する。同様に、用語「抗原」は、それに対して抗体が生成されるいずれかの物質に関する。「抗原」は一般的に、抗体結合物質に関して使用され、「リガンド」は、受容体結合物質に関する場合に頻繁に使用されるものの、これらの用語は、両者を区別せず、広範囲の重複する化学実体を含む。誤解を避けるために、抗原およびリガンドは、本明細書を通じて交換可能に使用する。抗原/リガンドは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、アプター、多糖、糖分子、炭水化物、脂質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、合成分子、無機分子、有機分子、およびそれらの任意の組合せであり得る。

【0092】

結合タンパク質の解離定数 (K_D) は、例えば、表面プラズモン共鳴により決定できる。一般的に、表面プラズモン共鳴分析は、BIAcoreシステム (Pharmacia Biosensor社; Piscataway, NJ) を使用した表面プラズモン共鳴 (SPR) により、リガンド (バイオセンサマトリクス上の標的抗原) と分析物 (溶液中の結合タンパク質) との間のリアルタイム結合相互作用を測定する。表面プラズモン分析はさらに、分析物 (バイオセンサマトリクス上の結合タンパク質) の固定化およびリガンド (標的抗原) の提示により行える。本明細書で使用する用語「 K_D 」は、特定の結合タンパク質と標的抗原との間の相互作用の解離定数に関する。

【0093】

本明細書で使用する用語「特異的に結合する」は、抗体またはイムノアドヘシンが、最高で約 1×10^{-6} M、約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-12} M 以下の解離定数 (K_D) で標的 (例えば、抗原) に結合する能力、および/または非特異的抗原に対するその親和性よりも少なくとも2倍高い親和性で抗原に結合する能力に関する。抗体の特異的結合は、CDR配列を介して、標的抗原に対し得る。抗体はさらに、Fc領域を介して、FcRnまたはFcRIIIaのようなFcRに特異的に結合できる。

【0094】

本明細書で使用する用語「抗体」は、目的の抗原 (例えば、腫瘍関連抗原) に対する公知の著しい特異的免疫反応活性を有するようなアセンブリ (例えば、インタクト抗体分子、イムノアドヘシン、またはそれらのパリアント) に関する。抗体および免疫グロブリンは、軽鎖および重鎖を含み、それらの間に鎖間共有結合を含む、または含まない。脊椎動物系での基本免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。

【0095】

10

20

30

40

50

下記でより詳細に考察するように、総称「抗体」は、生化学的に区別できる、5つの異なるクラスの抗体を含む。5クラスすべての抗体が、明らかに本開示の範囲内である一方、以下の考察は、一般的に、免疫グロブリン分子のIgGクラスを対象とする。IgGに関して、免疫グロブリンは、分子量およそ23,000ダルトンの2つの同一軽鎖、および分子量53,000~70,000の2つの同一重鎖を含む。4つの鎖は、ジスルフィド結合により「Y」形状に結合されており、軽鎖が、重鎖を、「Y」の口状部を起点として可変領域を通し継続して取り囲む。

【0096】

免疫グロブリンの軽鎖は、カッパ()またはラムダ()のいずれか一方に分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダの軽鎖のいずれか一方に結合し得る。一般的に、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子操作された宿主細胞のいずれかにより生成される場合、軽鎖と重鎖とは互いに共有結合されており、2つの重鎖の「尾」部分は、共有ジスルフィド結合または非共有結合により、互いに結合している。重鎖では、アミノ酸配列が、Y形状のフォーク端のN末端から各鎖の底部のC末端へと及ぶ。当業者は、重鎖が、ガンマ()、ミュー(μ)、アルファ()、デルタ()、またはエプシロン()として分類され、それらの中にいくつかのサブクラス(例えば、1~4)を含むことを理解する。この鎖の性質が、抗体の「クラス」を、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEと決定する。免疫グロブリンアイソタイプサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等)は、よく特徴づけられており、機能特化を与えることが公知である。これらのクラスおよびアイソタイプの各々の修飾型は、本開示を考慮して当業者は容易に認識でき、したがって、本開示の範囲内である。

10

20

【0097】

軽鎖および重鎖の両方とも、構造的および機能的相同性の領域に分割される。用語「領域」は、免疫グロブリンまたは抗体鎖の一部または部分に関し、定常領域または可変領域、ならびに前記領域のより個別的な一部または部分を含む。例えば、軽鎖可変領域は、本明細書に定義されるように、「フレームワーク領域」または「FR」の間に散在する「相補性決定領域」または「CDR」を含む。

【0098】

免疫グロブリン重鎖または軽鎖の領域は、「定常」(C)領域または「可変」(V)領域と定義され、「定常領域」の場合は、様々なクラスメンバーの領域内での配列の変動の相対的欠如に基づき、「可変領域」の場合は、様々なクラスメンバーの領域内での著しい変動に基づく。用語「定常領域」および「可変領域」は、機能的にも使用できる。これに関して、免疫グロブリンまたは抗体の可変領域は、抗原の認識および特異性を決定すると理解される。逆に、免疫グロブリンまたは抗体の定常領域は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合等などの重要なエフェクター機能、を与える。様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および三次元コンフィギュレーションは周知である。

30

【0099】

免疫グロブリン重鎖および軽鎖の定常および可変領域は、ドメインへと折り畳まれている。用語「ドメイン」は、例えば、ひだ折れシートおよび/または鎖内ジスルフィド結合により安定化されたペプチドループを含む(例えば、3~4つのペプチドループを含む)、重鎖または軽鎖の球状領域に関する。免疫グロブリンの軽鎖上の定常領域ドメインは、交換可能に「軽鎖定常領域ドメイン」、「CL領域」、または「CLドメイン」と呼ばれる。重鎖上の定常領域(例えば、ヒンジ、CH1、CH2、またはCH3ドメイン)は、交換可能に「重鎖定常領域ドメイン」、「CH領域ドメイン」、または「CHドメイン」と呼ばれる。軽鎖上の可変ドメインは、交換可能に「軽鎖可変領域ドメイン」、「VL領域ドメイン」、または「VLドメイン」と呼ばれる。重鎖上の可変ドメインは、交換可能に「重鎖可変領域ドメイン」、「VH領域ドメイン」、または「VHドメイン」と呼ばれる。

40

50

【0100】

慣例では、可変定常領域ドメインのアミノ酸のナンバリングは、免疫グロブリンまたは抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠位になるほど増加する。各免疫グロブリン重鎖および軽鎖のN末端は可変領域であり、C末端は定常領域である。CH3およびCLドメインは、それぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。したがって、軽鎖免疫グロブリンのドメインは、VL-CL配向で配置されており、重鎖のドメインは、VH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3配向で配置されている。

【0101】

各可変領域ドメインに対するアミノ酸の割当ては、Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD、1987年および1991年)の定義に従う。Kabataはさらに、異なる重鎖可変領域間または異なる軽鎖可変領域間での対応する残基に同じ番号を割り当てる、広く使用されているナンバリング慣習(Kabataナンバリング)を提供する。VLドメインのCDR1、2、および3は同じく、本明細書では、それぞれ、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と呼ばれる。VHドメインのCDR1、2、および3は同じく、本明細書では、それぞれ、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と呼ばれる。そのように承知する場合、CDRの割当ては、Kabataの代わりに、IMGT(登録商標)(Lefrancら、Developmental & Comparative Immunology 27:55~77頁;2003年)に従い得る。重鎖定常領域のナンバリングは、Kabata(Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD、1987年および1991年)に記載されるようにEUインデックスを介する。

【0102】

本明細書で使用する用語「VHドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、用語「VLドメイン」は、免疫グロブリン軽鎖のアミノ末端可変ドメインを含む。

【0103】

本明細書で使用する用語「CH1ドメイン」は、例えば、Kabataナンバリングシステムでの約114~223位(EU位の118~215位)に及ぶ、免疫グロブリン重鎖の最初の(アミノ最末端)定常領域ドメインを含む。CH1ドメインは、VHドメインに、および免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域のアミノ末端に隣接し、免疫グロブリン重鎖のFc領域の一部を形成しない。

【0104】

本明細書で使用する用語「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに結合する、重鎖分子の部分を含む。ヒンジ領域は、およそ25残基を含み、柔軟性であるため、2つのN末端抗原結合領域を独立に動かせる。ヒンジ領域は、3つの別個のドメイン:上部、中央、下部ヒンジドメインに細分できる(Rouxら、J. Immunol. 1998年、161:4083)。

【0105】

本明細書で使用する用語「CH2ドメイン」は、例えば、Kabataナンバリングシステムでの約244~360位(EU位の231~340位)に及ぶ、重鎖免疫グロブリン分子の部分を含む。CH2ドメインは、他のドメインと密接に対になっていないという点で独特である。むしろ、2つのN-結合型分岐炭水化物鎖が、インタクト天然IgG分子の2つのCH2ドメイン間に挟まれている。一実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、IgG1分子(例えば、ヒトIgG1分子)に由来するCH2ドメインを含む。

【0106】

本明細書で使用する用語「CH3ドメイン」は、CH2ドメインのN末端からおよそ110残基、例えば、Kabataナンバリングシステムでの約361~476位(EU位の

10

20

30

40

50

341～445位)に及び、重鎖免疫グロブリン分子の部分を含む。CH3ドメインは、典型的に、抗体のC末端を形成する。しかしながら、一部の免疫グロブリンでは、さらなるドメインが、CH3ドメインから延びて、分子のC末端部分を形成する(例えば、IgMのμ鎖およびIgEのε鎖におけるCH4ドメイン)。一実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、IgG1分子(例えば、ヒトIgG1分子)に由来するCH3ドメインを含む。

【0107】

本明細書で使用する用語「CLドメイン」は、例えば、Kabattの約107A位からKabattの約216位に及び、免疫グロブリン軽鎖の定常領域ドメインを含む。CLドメインは、VLドメインに隣接する。一実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、カップ軽鎖(例えば、ヒトカップ軽鎖)に由来するCLドメインを含む。

10

【0108】

抗体の変領域は、抗体が、抗原上のエピトープを選択的に認識して特異的に結合することを可能にする。すなわち、抗体のVLドメインおよびVHドメインは合体して、三次元抗原結合部位を定義する変領域(Fv)を形成する。この抗体四次構造が、「Y」形状の各アームの末端に提示される抗原結合部位を形成する。特に、抗原結合部位は、各々の重鎖および軽鎖変領域上にある3つの相補性決定領域(CDR)により定義される。本明細書で使用する用語「抗原結合部位」は、抗原(例えば、細胞表面または可溶性抗原)に特異的に結合する部位を含む。抗原結合部位は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖変領域を含み、それらの変領域により形成される結合部位が、抗体の特異性を決定する。抗原結合部位は、抗体ごとに異なる変領域により形成される。本開示の変化した抗体は、少なくとも1つの抗原結合部位を含む。

20

【0109】

特定の実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、選択された抗原と結合ポリペプチドの会合を実現する、少なくとも2つの抗原結合ドメインを含む。その抗原結合ドメインは、同じ免疫グロブリン分子に由来する必要はない。これに関して、変領域は、体液性応答の準備および所望の抗原に対する免疫グロブリンの生成が誘導可能である任意の種類動物に由来し得る、あるいは、由来する。そういうものとして、結合ポリペプチドの変領域は、例えば、哺乳類起源、例えば、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、非ヒト霊長類(例えばカニクイザル、マカク等)、オオカミ、またはラクダ類(例えば、ラクダ、ラマ、および近縁種)であり得る。

30

【0110】

抗体は、水性環境中でその三次元コンフィギュレーションをとることから、天然型抗体中では、各単量体抗体上に存在する6つのCDRは、抗原結合部位を形成するために特異的に配置された、アミノ酸の短い非連続配列である。重鎖および軽鎖変領域の残部は、アミノ酸配列における低い分子間多様性を示し、フレームワーク領域と呼ばれる。フレームワーク領域は、主としてシート立体配座を採用し、CDRは、シート構造を連結する、およびいくつかの場合はシート構造の一部を形成する、ループを形成する。したがって、それらのフレームワーク領域は、鎖間非共有相互作用により、6つのCDRの正しい配向での配置を実現する足場を形成するように作用する。配置されたCDRにより形成される抗原結合ドメインが、免疫反応抗原上のエピトープに対して相補的である表面を定義する。この相補的表面が、免疫反応抗原エピトープに対する、抗体の非共有結合を促進する。

40

【0111】

例示的結合ポリペプチドは、抗体バリエーションを含む。本明細書で使用する用語「抗体バリエーション」は、天然起源でないように変化している、合成型および操作型の抗体、例えば、少なくとも2つの重鎖部分を含むものの、2つの完全な重鎖は含まない抗体(例えばドメインを欠く抗体またはミニボディ); 2つもしくはそれ以上の異なる抗原、または単一抗原上の異なるエピトープに結合するように変化させた多重特異性型の抗体(例えば、二重特異性、三重特異性等); scFv分子に結合した重鎖分子等を含む。さらに、用語「

50

抗体バリエーション」は、多価型の抗体（例えば、三価、四価等、同じ抗原の3つ、4つ、またはそれ以上のコピーに結合する抗体）を含む。

【0112】

本明細書で使用する用語「結合価」は、ポリペプチド中にある潜在的な標的結合部位の数に関する。各標的結合部位は、1つの標的分子、または標的分子上の特異的部位に特異的に結合する。ポリペプチドが、2つ以上の標的結合部位を含む場合、各標的結合部位は、同じまたは異なる分子に特異的に結合し得る（例えば、異なるリガンドまたは異なる抗原、または同じ抗原上の異なるエピトープに結合し得る）。対象結合ポリペプチドは、典型的に、ヒト抗原分子に対して特異的な少なくとも1つの結合部位を有する。例えば、典型的IgG1モノクローナル抗体は、1つの標的抗原に対して特異的である。二価抗体は、2つの異なる抗原を標的とする抗原結合ドメイン、または1つの抗原を標的とする2つの抗原結合ドメインを含む抗体である。同様に、三価抗体は、単一抗体に対する3つの標的化ドメインを含む単一特異性抗体であり得る。三価抗体は、2つの結合ドメインにより第1の抗原に結合し、他の結合ドメインにより第2の抗原に結合する場合、二重特異性であり得る。三価抗体は、三重特異性であり得て、3つの異なる標的に結合し得る。

10

【0113】

用語「特異性」は、所定の標的抗原（例えば、ヒト標的抗原）と特異的に結合する（例えば、免疫反応する）能力に関する。結合ポリペプチドは、単一特異性であり得て、1つの標的に特異的に結合する1つもしくはそれ以上の結合部位を含有し得るか、またはポリペプチドは、多重特異性であり得て、同じもしくは異なる標的に特異的に結合する2つもしくはそれ以上の結合部位を含有し得る。特定の実施形態では、結合ポリペプチドが、同じ標的の2つの異なる（例えば、非重複）部分に対して特異的である。特定の実施形態では、結合ポリペプチドが、2つ以上の標的に対して特異的である。腫瘍細胞上で発現する抗原に結合する抗原結合部位を含む例示的結合ポリペプチド（例えば、抗体）が当該分野で公知であり、そのような抗体に由来する1つまたはそれ以上のCDRが、本明細書に記載される抗体に含まれる。

20

【0114】

本明細書で使用する用語「抗原」または「標的抗原」は、結合ポリペプチドの結合部位が結合できる、分子または分子の部分に関する。標的抗原は、1つまたはそれ以上のエピトープを有し得る。

30

【0115】

用語「約」または「およそ」は、所定の値または範囲の約20%以内、例えば、約10%以内、約5%以内、または約1%以下以内を意味する。

【0116】

本明細書で使用する「投与する」または「投与」は、体外に存在する物質（例えば、本明細書で提供される、単離された結合ポリペプチド）を、患者に注入する、または他のやり方で物理的に送達する行為に関し、例えば、肺（例えば、吸入）、粘膜（例えば、鼻腔内）、皮内、静脈内、筋肉内送達、および/または本明細書に記載されるまたは当該分野で公知の任意の他の物理的送達の方法によるが、それらに限定されない。疾患またはその症状を管理または処置する場合、物質の投与は、典型的に、疾患またはその症状の発現後に行われる。疾患またはその症状を予防する場合、物質の投与は、典型的に、疾患またはその症状の発現前に行われ、疾患関連症状の出現または規模を延期するまたは低下させるために、慢性的に継続し得る。

40

【0117】

本明細書で使用する用語「組成物」は、指定成分（例えば、本明細書で提供される、単離された結合ポリペプチド）を、場合により、指定量で含有する製品、ならびに指定成分の、場合により、指定量での組合せから直接的または間接的に生じる任意の製品を含むと意図される。

【0118】

「有効量」は、薬剤を必要とする個体における所望の生理的帰結をもたらすために十分

50

な、活性薬剤（例えば、本開示の単離された結合ポリペプチド）の量を意味する。有効量は、処置されるべき個体の健康状態および体調、処置されるべき個体の分類群、組成物の調合、個体の医学的状態の評価、および他の関連因子に応じて、個体間で変わり得る。

【0119】

本明細書で使用する用語「対象」および「患者」は、交換可能に使用される。本明細書で使用する対象は、哺乳類、例えば、非霊長類（例えばウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット等）、または霊長類（例えば、サルおよびヒト）であり得る。特定の実施形態では、本明細書で使用する用語「対象」が、哺乳類などの脊椎動物に関する。哺乳類は、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、野生動物、野生化した動物、家畜、スポーツ動物、ペットを含む。

10

【0120】

本明細書で使用する用語「療法」は、疾患またはそれに関連する症状の予防、管理、処置、および/または改善において使用できる任意のプロトコル、方法、および/または薬剤に関する。いくつかの実施形態では、用語「療法」は、対象における感染またはそれに関連する症状に対する免疫応答の調節において使用できる任意のプロトコル、方法、および/または薬剤に関する。いくつかの実施形態では、用語「療法」は、生物学的療法、支持療法、ならびに/または、医療関係者などの当業者には公知の、疾患またはそれに関連する症状の予防、管理、処置、および/もしくは改善において有用である他の療法に関する。他の実施形態では、用語「療法」は、生物学的療法、支持療法、ならびに/または、医療関係者などの当業者には公知の、対象における感染またはそれに関連する症状に対する免疫応答の調節において有用である他の療法に関する。

20

【0121】

本明細書で使用する用語「処置する (treat)」、「処置 (treatment)」および「処置する (treating)」は、1つまたはそれ以上の療法の適用（1つもしくはそれ以上の、本明細書で提供される、単離された結合ポリペプチドなどの予防剤または治療剤の投与を含むがそれらに限定されない）がもたらす、疾患またはそれに関連する症状の進行、重症度、および/または持続期間の短縮または改善に関する。本明細書で使用する用語「処置する (treating)」はさらに、処置される対象の疾患経過の変化に関し得る。処置の治療効果は、限定されないが、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の軽減、疾患の進行速度の低下、病態の改善または緩和、および寛解または予後の改善を含む。

30

【0122】

Fcドメイン

本開示の特定の態様では、Fcドメイン、例えば、Fcドメインバリエーションが提供される。本明細書で使用する用語「Fc領域」または「Fcドメイン」は、パパイン切断部位のすぐ上流のヒンジ領域（すなわち、重鎖定常領域の第1残基が114であると見なすと、IgGの216残基）で始まり抗体のC末端で終わる、重鎖定常領域の部分に関する。したがって、完全なFc領域は、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む。

【0123】

抗体のFc領域は、非抗原結合に関与し、Fc受容体への結合によりエフェクター機能を仲介できる。いくつかの異なる種類のFc受容体が存在し、それらの受容体が認識する抗体の種類に基づいて分類される。例えば、Fcガンマ受容体 (FcγR) は、IgGクラス抗体に結合し、Fcアルファ受容体 (FcαR) はIgAクラス抗体に結合し、Fcエプシロン受容体 (FcεR) は、IgEクラス抗体に結合する。胎児性Fc受容体 (FcRn) は、抗体のFc領域と相互作用して、正常のリソソーム分解からの救助を介して抗体のリサイクルを促進する。FcγRIは、いくつかのメンバー、例えば、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、およびFcγRIIIbを含むファミリーに属する。

40

【0124】

50

本明細書で使用する用語「天然Fc」または「野生型Fc」は、単量体型であろうと多量体型であろうと、抗体の分解から生じるか、または他の手段により産生される非抗原結合断片の配列に対応する分子に関し、ヒンジ領域を含有し得る。天然Fcの免疫グロブリン提供源は、典型的にヒト起源であり、IgG1およびIgG2などの免疫グロブリンのいずれかであり得る。天然Fc分子は、共有結合性会合（すなわちジスルフィド結合）および非共有結合性会合により、二量体型または多量体型へと連結される単量体ポリペプチドからなる。天然Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、およびIgE）またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、およびIgGA2）に応じて、1～4つに及ぶ。天然Fcの一例は、IgGのパライン分解から生じる、ジスルフィド結合された二量体である。

10

【0125】

本明細書で使用する用語「Fcドメインバリエーション」、「Fcバリエーション」または「修飾Fc」は、天然/野生型Fcから修飾されたものの、FcRに対する結合部位を依然として含む、分子または配列に関する。したがって、用語「Fcバリエーション」は、非ヒト天然Fcからヒト化させた、分子または配列を含み得る。さらに、天然Fcは、本明細書に記載される抗体様結合ポリペプチドには必要とされない、構造特徴または生物学的活性を提供するため除去できる領域を含む。したがって、用語「Fcバリエーション」は、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択された宿主細胞との非適合性、(3)選択された宿主細胞中での発現時のN末端不均一性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、もしくは(7)抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、に影響を与えるか、もしくは関与する、1つもしくはそれ以上の天然Fc部位もしくは残基を欠くか、または1つもしくはそれ以上のFc部位もしくは残基が修飾されている、分子または配列を含む。

20

【0126】

本明細書で使用する「エフェクター能のあるFcバリエーション」または「エフェクター能のあるポリペプチド」は、本明細書にさらに記載される1つまたはそれ以上のFcエフェクター機能を有するFcドメインに関する。

【0127】

特定の例示的实施形態では、本明細書で特徴づけられるFcバリエーションが、野生型Fcと比べて、血清半減期の延長、FcRn結合親和性の増強、酸性pHでのFcRn結合親和性の増強、FcRIIIa結合親和性の増強、および/または同様の熱安定性の1つまたはそれ以上を有する。

30

【0128】

FcRIIIaV158、またはヒトCD16a-V受容体、またはCD16a^Vは、自然抗体のFc領域に結合するCD16ヒト受容体の断片を含む、抗体依存性細胞傷害性を仲介する、158位にバリン(V)を担持するポリペプチド構築物に関し、アロタイプCD16aV158として、同じく文献中で報告されている。

【0129】

FcRIIIaF158、またはヒトCD16a-F受容体、またはCD16a^Fは、自然抗体のFc領域に結合するCD16ヒト受容体の断片を含む、抗体依存性細胞傷害性を仲介する、158位にフェニルアラニン(F)を担持するポリペプチド構築物に関し、アロタイプCD16aF158として、同じく文献中で報告されている。

40

【0130】

本明細書で使用する用語「Fcドメイン」は、本明細書に定義される、天然/野生型FcおよびFcバリエーションならびに配列を含む。Fcバリエーションおよび天然Fc分子と同様に、用語「Fcドメイン」は、全抗体から分解されようと他の手段により産生されようと、単量体型または多量体型の分子を含む。

【0131】

50

特定の例示的实施形態では、本明細書に記載されるFcドメインが、熱安定化されている。

【0132】

特定の例示的实施形態では、本明細書に記載されるFcドメインが、グリコシル化されている（例えば、N-結合型グリコシル化により）。特定の例示的实施形態では、Fcドメインが、N-結合型グリコシル化、例えば、アミノ酸配列NXTまたはNXS（Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸残基）を含有するN-結合型グリコシル化モチーフを含む。特定の例示的实施形態では、Fcドメインが、EUナンバリングに従うアミノ酸297位においてグリコシル化されている。

【0133】

特定の例示的实施形態では、本明細書に記載されるFcドメインが、エフェクター能を有する。

【0134】

特定の例示的实施形態では、本明細書に記載されるFcドメインが、熱安定化、グリコシル化、およびエフェクター能の任意の組合せである。

【0135】

熱安定化されたFcドメインバリエーション

抗体定常ドメインの構造は、ループおよび短いヘリックスで連結されたストランドからなる可変ドメインの構造に類似する。重鎖定常領域のCH2ドメインは、他のドメインで示される広範囲な鎖間相互作用とは対照的に、炭水化物が仲介する弱い鎖間タンパク質間相互作用を示す。単離されたマウスCH2ドメインは、生理的温度において比較的不安定であるが（Feigera, 2004年, J. Mol. Biol. 344: 107~118頁）、以前の取組みは、鎖内ジスルフィド結合の付加により、CH2ドメインの熱安定性が高まり得ること、およびそれが、バインダの足場として使用可能であることを実証する（Gongら, 2009年, J. Biol. Chem. 284: 14203~210頁）。

【0136】

野生型Fcドメインに対して熱不安定性が上昇した（すなわち、熱安定性が低下した）エフェクターを増強するFcドメインバリエーションが公知である。例えば、S239D/I332EおよびS239D/I332E/A330Lバリエーションは、示差走査熱量測定（DSC）分析における融解温度（ T_m ）の低下により示されるように、CH2ドメインの安定性の低下をもたらす。G236A/S239D/A330L/I332Eは、野生型と比べて低下したタンパク質サーマルシフト測定を有し、hFc Rトランスジェニックマウスにおいて、相当に短縮した半減期を有する（Liura (2014) J. Biol. Chem. 289(6): 3571頁、および概説にはLiura (2020) Antibodies 9(4): 64頁を参照）。

【0137】

野生型と比べて安定性が著しくは低下していない、改善されたFc R結合を有するエフェクターを増強するFcドメインバリエーションが公知である（例えば、Igawaraら、欧州特許出願公開第2940135号明細書、例えば、実施例10を参照）。

【0138】

さらに、熱安定化されたFcドメインバリエーションは、Fcドメインにおける、1つまたはそれ以上のジスルフィド結合の導入により産生できることが発見された。したがって、一態様では、本開示は、1つまたはそれ以上の操作された（例えば非天然の）ジスルフィド結合、例えば、1つまたはそれ以上の対のシステインにより仲介される、例えば、鎖内ジスルフィド結合を含むFcドメインバリエーションを提供する。

【0139】

特定の例示的实施形態では、ジスルフィド結合が、Fcドメインの2つのCH2領域間の鎖内ジスルフィド結合である。特定の例示的实施形態では、ジスルフィド結合が、Fcドメインの2つのCH3領域間の鎖内ジスルフィド結合である。特定の例示的实施形態で

10

20

30

40

50

は、2つもしくはそれ以上の鎖内ジスルフィド結合が、Fcドメインの2つのCH₂領域の間に、および/またはFcドメインの2つのCH₂領域の間に存在する。

【0140】

Fcドメイン（例えば、結合ポリペプチドを含む、または含まないFcドメイン）の熱安定性またはアンフォールド傾向は、当該分野で公知の様々な方法を使用して決定できる。例えば、アンフォールディングまたは変性温度は、ナノ型示差走査熱量測定（ナノDSC）またはナノ型示差走査蛍光定量法（ナノDSF）により測定できる（Wenら、2020年、*Anal. Biochem.* 593:113581頁）。タンパク質のアンフォールディング開始が検出可能な温度が変性開始温度（*T_{onset}*）である。本明細書で使用する用語「*T_m*」は、分子の融解温度に関する。本明細書で使用する用語「*T_{m1}*」は、本開示のFcドメインのアンフォールディング温度、特に、CH₂ドメインのアンフォールディング温度に関する。

10

【0141】

特定の例示的实施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーション（例えば、1つまたはそれ以上の操作されたジスルフィド結合を有する）の変性開始温度が、熱安定化されていないFcドメインバリエーションに対して上昇している。特定の例示的实施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションの変性開始温度が、熱安定化されていないFcドメインバリエーションに対して、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5、約10.0、約10.5、約11.0、約11.5、約12.0、約12.5、約13.0、約13.5、約14.0、約14.5、約15.0、約15.5、約16.0、約16.5、約17.0、約17.5、約18.0、約18.5、約19.0、約19.5、約20.0、約20.5、約21.0、約21.5、約22.0、約22.5、約23.0、約23.5、約24.0、約24.5、または約25.0だけ上昇している。

20

【0142】

特定の例示的实施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、EUナンバリングに従う：アミノ酸242位および334位；アミノ酸240位および334位；アミノ酸287位および306位；アミノ酸292位および302位；アミノ酸323位および332位；アミノ酸259位および306位；アミノ酸350位および441位；アミノ酸343位および431位；アミノ酸375位および404位；アミノ酸375位および396位；ならびにアミノ酸348位および439位でのシステイン置換からなる群から選択される、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換対を有する（概説には、Wozniak-Knoppら、2012年、*PLoS One* 7: e30083；Jacobsenら、2017年、*J. Biol. Chem.* 202: 1865~75頁；国際公開第2014153063号を参照）。

30

【0143】

特定の例示的实施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、EUナンバリングに従う（i）アミノ酸242位のロイシン（L）およびアミノ酸334位のリジン（K）；（ii）アミノ酸287位のアラニン（A）およびアミノ酸306位のロイシン（L）；または（iii）アミノ酸292位のアルギニン（R）およびアミノ酸302位のバリン（V）を置換する一対のシステインにより仲介される、操作された（例えば非天然の）鎖内ジスルフィド結合を含む。

40

【0144】

特定の例示的实施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、アミノ酸242位のロイシン（L）およびアミノ酸334位のリジン（K）を置換する一対のシステインにより仲介される、操作された（例えば非天然の）鎖内ジスルフィド結合を含む。特定の例示的实施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、アミノ酸287位のアラニン（A）およびアミノ酸306位のロイシン（L）を置換する一対のシステインに

50

より仲介される、操作された（例えば非天然の）鎖内ジスルフィド結合を含む。特定の例示の実施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、アミノ酸292位のアルギニン（R）およびアミノ酸302位のバリン（V）を置換する一对のシステインにより仲介される、操作された（例えば非天然の）鎖内ジスルフィド結合を含む。特定の例示の実施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、少なくとも1つの操作された鎖内ジスルフィド結合を含み得る。特定の例示の実施形態では、熱安定化されたFcドメインバリエーションが、2つ以上の操作された鎖内ジスルフィド結合を含み得る。

【0145】

エフェクターを増強するFcドメインバリエーション

一態様では、本開示が、エフェクターを増強するアミノ酸置換を含むFcドメインバリエーションを提供する。 10

【0146】

一実施形態では、FcRIIIa結合を変化させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、FcRIIIa結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有する。一実施形態では、FcRIIIa結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される2つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、FcRIIIa結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、FcRIIIa結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される4つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。 20

【0147】

一実施形態では、FcRn結合を変化させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。一実施形態では、FcRn結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。一実施形態では、FcRn結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される2つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。一実施形態では、FcRn結合親和性を増強させたFcドメインバリエーションが、本明細書に開示される3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。 30

【0148】

いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、種特異的なFcRn結合親和性を示し得る。一実施形態では、Fcドメインバリエーションが、ヒトFcRn結合親和性を示し得る。一実施形態では、Fcドメインバリエーションが、cyto（カニクイザル）FcRn結合親和性を示し得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、異種間FcRn結合親和性を示し得る。そのようなFcドメインバリエーションは、1つまたはそれ以上の異なる種にわたり交差反応性であると言われる。一実施形態では、Fcドメインバリエーションが、ヒトおよびカニクイザルのFcRn結合親和性の両方を示し得る。

【0149】

胎児性Fc受容体（FcRn）は、抗体のFc領域と相互作用して、正常のリソソーム分解からの救助を介してリサイクルを促進する。このプロセスは、酸性pHのエンドソーム中（例えば、pH6.5未満）では起こるが、生理学的pH条件下の血流中（例えば、非酸性pH）では起こらないpH依存性プロセスである。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、酸性pHにおいて、野生型Fcドメインと比べて増強されたFcRn結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、pH7未満、例えば、pH約6.5、pH約6.0、pH約5.5、pH約5.0において、野生型Fcドメインと比べて増強されたFcRn結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、pH7未満、例えば、pH約6.5、pH約6.0、pH約5.5、pH約5.0において、野生型Fcドメインの、高い非酸性pHでのFcRn結合親和性と比べて増強されたFcRn結合親和性を有する。高い非酸性pHは、例 40 50

例えば、pH 7 超、pH 約 7、pH 約 7.4、pH 約 7.6、pH 約 7.8、pH 約 8.0、pH 約 8.5、pH 約 9.0 であり得る。

【0150】

特定の実施形態では、Fcドメインバリエーションが、非酸性 pH において、野生型 Fcドメインとおよそ同じ FcRn 結合親和性を示すことが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、非酸性 pH において、EU ナンバリングに従う二重アミノ酸置換 M428L/N434S を有する修飾 Fcドメインを含む結合ポリペプチドよりも低い FcRn 結合親和性を示すことが望ましい場合がある（米国特許第 8,088,376 号明細書を参照）。したがって、Fcドメインバリエーションが、pH 依存性の FcRn 結合に対する最低限の攪乱（*perturbation*）を示すことが望ましい場合がある。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、酸性 pH において増強された FcRn 結合親和性を有する Fcドメインバリエーションが、野生型 Fcドメインと比べて低下した（すなわち低速の）FcRn の off 速度を有する。いくつかの実施形態では、高い非酸性 pH における、結合ポリペプチドの FcRn 結合親和性と比べて、酸性 pH において増強された FcRn 結合親和性を有する Fcドメインバリエーションが、高い非酸性 pH での野生型 Fcドメインの FcRn の off 速度と比べて遅い、酸性 pH での FcRn の off 速度を有する。

【0152】

特定の実施形態は、およそ同じ免疫原性の未変化の全抗体と比べて、エフェクター機能の低下または増強、非共有結合的に二量化する能力、腫瘍の部位に局在する能力の上昇、血清半減期の短縮、または血清半減期の延長などの所望の生化学的特徴を提供するように、定常領域ドメインのうちの 1 つまたはそれ以上において少なくとも 1 つのアミノ酸を、欠失または他のやり方で変化させた Fcドメインバリエーションを含む。

20

【0153】

特定の他の実施形態では、Fcドメインバリエーションが、異なる抗体アイソタイプ（例えば、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 の 2 つまたはそれ以上に由来する定常領域）に由来する定常領域を含む。他の実施形態では、Fcドメインバリエーションが、キメラヒンジ（すなわち、異なる抗体アイソタイプのヒンジドメインに由来するヒンジ部分、例えば、IgG4 分子からの上部ヒンジドメインおよび IgG1 中央ヒンジドメインを含むヒンジ）を含む。特定の実施形態では、当該分野で公知の技術を使用して、エフェクター機能を上昇または低下させるために、Fcドメインを変異させてもよい。

30

【0154】

いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、Fc 受容体に対する変化した結合親和性を有する。いくつかの異なる種類の Fc 受容体が存在し、それらの受容体が認識する抗体の種類に基づいて分類される。例えば、Fc ガンマ受容体（Fc γ R）は、IgG クラス抗体に結合し、Fc アルファ受容体（Fc α R）は IgA クラス抗体に結合し、Fc エプシロン受容体（Fc ϵ R）は、IgE クラス抗体に結合する。Fc γ R は、いくつかのメンバー、例えば、Fc γ R1、Fc γ R1a、Fc γ R1b、Fc γ R1c、および Fc γ R1d を含むファミリーに属する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、野生型 Fcドメインと比べて変化した Fc γ R1c 結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、野生型 Fcドメインと比べて低下した Fc γ R1c 結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、野生型 Fcドメインと比べて増強された Fc γ R1c 結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーション修飾 Fcドメインが、野生型 Fcドメインと比べておよそ同じ Fc γ R1c 結合親和性を有する。

40

【0155】

特定の実施形態では、Fcドメインバリエーションが、1 つまたはそれ以上のエフェクター機能を仲介する抗体定常領域（例えば、IgG 定常領域、例えば、ヒト IgG 定常領域、例えば、ヒト IgG1 定常領域）を含む。例えば、抗体定常領域への、C1 複合体の結合

50

が、補体系を活性化し得る。補体系の活性化は、オプソニン化および細胞病原体の溶解において重要である。補体系の活性化はさらに、炎症反応を刺激し、自己免疫過敏症に関与し得る。さらに、抗体は、Fcドメインを介して、様々な細胞上の受容体に結合する（抗体Fc領域上のFc受容体結合部位が、細胞上のFc受容体（FcR）に結合する）。IgG（ガンマ受容体）、IgE（エプシロン受容体）、IgA（アルファ受容体）、およびIgM（ミュー受容体）を含む、異なるクラスの抗体に対して特異的である複数のFc受容体が存在する。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体被覆粒子の貪食および破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解（抗体依存性細胞介在性細胞傷害性、またはADCCと呼ばれる）、炎症性メディエータの放出、胎盤通過、ならびに免疫グロブリン産生の管理を含む、複数の重要かつ多様な生体応答を誘発する。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーション、例えば、結合ポリペプチド（例えば、抗体またはイムノアドヘンシ）が、Fcガンマ受容体に結合する。代替的实施形態では、Fcドメインバリエーションが、1つまたはそれ以上のエフェクター機能（例えば、ADCC活性）を欠いた、および/またはFc受容体に結合できない定常領域を含んだ。

10

【0156】

特定の例示的实施形態では、エフェクターを増強するFcドメインバリエーションが、EUナンバリングに従う：アミノ酸221位でのアスパラギン酸（D）；アミノ酸222位でのシステイン（C）；アミノ酸234位でのチロシン（Y）；アミノ酸236位でのアラニン（A）；アミノ酸236位でのトリプトファン（W）；アミノ酸239位でのアスパラギン酸（D）；アミノ酸243位でのロイシン（L）；アミノ酸267位でのグルタミン酸（E）；アミノ酸268位でのフェニルアラニン（F）；アミノ酸292位でのプロリン（P）；アミノ酸298位でのアラニン（A）；アミノ酸300位でのロイシン（L）；アミノ酸305位でのイソロイシン（I）；アミノ酸324位でのスレオニン（T）；アミノ酸326位でのトリプトファン（W）；アミノ酸326位でのアラニン（A）；アミノ酸330位でのロイシン（L）；アミノ酸332位でのグルタミン酸（E）；アミノ酸333位でのアラニン（A）；アミノ酸333位でのセリン（S）；アミノ酸334位でのアラニン（A）；アミノ酸336位でのアラニン（A）；アミノ酸345位でのアルギニン（R）；およびアミノ酸396位でのロイシン（L）からなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有する（概説にはSaunders、2009年、Front. Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2019.01296を参照）。

20

30

【0157】

いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、EUナンバリングに従うアミノ酸236位、239位、330位、および332位から選択される位置でのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、置換が、EUナンバリングに従うアミノ酸236位でのアラニン（A）、アミノ酸239位でのアスパラギン酸（D）、アミノ酸330位でのロイシン（L）、およびアミノ酸332位でのグルタミン酸（E）を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、アミノ酸236位でのアラニン（A）、アミノ酸239位でのアスパラギン酸（D）、アミノ酸330位でのロイシン（L）、およびアミノ酸332位でのグルタミン酸（E）から選択されるいずれか2つのアミノ酸位置での二重アミノ酸置換を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、アミノ酸236位でのアラニン（A）、アミノ酸239位でのアスパラギン酸（D）、アミノ酸330位でのロイシン（L）、およびアミノ酸332位でのグルタミン酸（E）から選択されるいずれか3つのアミノ酸位置での三重アミノ酸置換を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、アミノ酸236位でのアラニン（A）、アミノ酸239位でのアスパラギン酸（D）、アミノ酸330位でのロイシン（L）、およびアミノ酸332位でのグルタミン酸（E）から選択されるいずれか4つのアミノ酸位置での四重アミノ酸置換を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、アミノ酸239位でのアスパラギン酸（D）およびアミノ酸332位でのグルタミン酸

40

50

(E)を含む、アミノ酸置換の組合せを含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、アミノ酸236位でのアラニン(A)、アミノ酸位置でのアスパラギン酸(D)およびアミノ酸332位でのグルタミン酸を含む、アミノ酸置換の組合せを含み得る。

【0158】

いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションがさらに、EUナンバリングに従うアミノ酸256位および/または307位でのアミノ酸置換を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションが、アミノ酸256位でのアスパラギン酸(D)およびアミノ酸307位でのグルタミン(Q)を含む、アミノ酸置換の組合せを含み得る(参照によってその全体が本明細書に組み入れられるMacKnessら、2019年、MAbs 11:1276~88頁;国際公開第2019147973号を参照)。

【0159】

グリコシル化Fcドメインバリエーション

特定の例示的实施形態では、Fcドメインバリエーションがグリコシル化されている。抗体の定常領域中の保存された位置でのグリコシル化は、抗体機能、特に、前記したようなエフェクター機能に対する重大な効果を有することが公知である、例えば、Boydら(Mol. Immunol. 32:1311~1318頁、1996年)を参照。1つまたはそれ以上の炭水化物部分が、付加、置換、欠失、または修飾された、本発明のFcドメインバリエーションのグリコシル化が予定される。いくつかの実施形態では、Fcドメインのグリコシル化が、N-結合型グリコシル化である。アスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-スレオニンモチーフの導入は、炭水化物部分の酵素的付着に適した潜在的部位を創出し、したがって、Fcドメインバリエーションのグリコシル化を操作されるために使用し得る。Rajuら(Biochemistry 40:8868~8876頁、2001年)では、TNFR-IgGイムノアドヘシンの末端シアリル化が、-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼおよび/またはアルファ,2,3シアリルトランスフェラーゼを使用した、再ガラクトシル化および/または再シアリル化のプロセスにより上昇した。末端シアリル化の上昇は、免疫グロブリンの半減期を延長すると見られている。

【0160】

たいていの糖タンパク質と同じように、抗体は、典型的に、グリコ型の混合物として産生される。その混合物は、真核細胞、特に哺乳類細胞中で抗体が産生される場合に特に明らかである。定められたグリコ型を製造するために、様々な方法が開発された(Zhangら、2004年、Science 303:371頁;Searsら、2001年、Science 291:2344頁;Wackerら、2002年、Science 298:1790頁;Davisら、2002年、Chem. Rev. 102:579頁;Hangら、2001年、Acc. Chem. Res. 34:727頁を参照)。いくつかの実施形態では、グリコシル化Fcドメインが、EUナンバリングに従うアミノ酸297位において天然グリカンを含む。IgG1のCH2ドメイン中のアミノ酸297位におけるアスパラギンのグリコシル化は、FcドメインとFcRとの間の相互作用を促進することが公知である。このグリコシル化部位の除去は、エフェクター機能を除去する(Leabmanら、2013年、MAbs 5:896~903頁)。特定の例示的实施形態では、Fcドメインが、EUナンバリングに従うアミノ酸297位での、野生型レベル、またはほぼ野生型レベルのグリコシル化を含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、グリコシル化Fcドメインバリエーションが、操作されたまたは非天然のグリカンを含む。いくつかの実施形態では、操作されたまたは非天然のグリカンが、治療用分子(例えば、抗体薬物複合体)に結合可能である修飾グリカンである。

【0162】

In Vivo安定性が向上したFcドメインバリエーション

一態様では、本開示が、向上したin vivo安定性(例えば、向上した血清半減期または低下したクリアランス)を含む、単離されたFcドメインバリエーションを提供する。

本明細書で使用する用語「*in vivo*安定性」は、本開示のエフェクター能のあるポリペプチドが無傷（例えば、限られた分解および/またはアンフォールディング）、機能性（例えば、結合活性を保持）であり続けるため、測定可能な活性（例えば、標的腫瘍細胞の殺滅）の誘発に十分な血清中濃度を保持するための安定性に関する。特定の実施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて改善した*in vivo*安定性を有する。特定の実施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて低下した*in vivo*クリアランスを有する。

【0163】

本明細書で使用する用語「血清半減期」は、物質（例えば、単離されたFcドメインバリエーション）が、最高血清中濃度からその最高血清中濃度の半分になるために要する時間に関する。血清半減期は、FcRnの結合親和性の増強により、部分的に向上し得る。特定の例示的实施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、野生型Fcドメインと比べて増強されたFcRnに対する結合親和性を有する。

10

【0164】

*In vivo*安定性、血清半減期、およびクリアランスは、当該分野で公知の任意の方法により決定できる（Valenteら、2020 MAb 12:13頁、<https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1829337>を参照）。例として、薬物動態（PK）分析を行う実施例7で記載する方法が利用可能である。

20

【0165】

Fc含有結合ポリペプチド

一態様では、本開示が、少なくとも1つの結合ドメイン（例えば、少なくとも1つの結合ポリペプチド）を含むか、または少なくとも1つの結合ドメイン（例えば、少なくとも1つの結合ポリペプチド）と複合体形成した（例えば、融合した）、単離されたFcドメインバリエーションを提供する。特定の実施形態では、結合ドメインが、1つまたはそれ以上の抗原結合ドメインを含む。その抗原結合ドメインは、親Fcドメインと同じ分子に由来する必要はない。特定の実施形態では、Fcドメインバリエーションが、抗体中に存在する。

【0166】

一実施形態では、Fcドメインバリエーションが、抗体中に存在するか、または抗体と複合体形成している。いずれかの起源または種からの任意の抗体が、本明細書に開示されるFcドメインバリエーションと共に利用可能である。適切な抗体は、限定されないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体を含む。適切な抗体は、限定されないが、全長抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはVHH抗体などの単ドメイン抗体を含む。

30

【0167】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインバリエーションが、抗体の抗原結合断片に結合しているか、または抗体の抗原結合断片と複合体形成している。用語「抗原結合断片」は、抗原に結合するか、またはインタクト抗体（すなわち、由来元のインタクト抗体）と抗原結合（すなわち、特異的結合）を競合する、免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド断片に関する。抗原結合断片は、当該分野で周知の組換え方法または生化学的方法により産生可能である。例示的な抗原結合断片は、Fv、Fab、Fab'、および（Fab'）₂を含む。特定の例示的实施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、少なくとも1つの抗原結合断片およびFcドメインバリエーションを含む。

40

【0168】

いくつかの実施形態では、結合ポリペプチドが、単鎖可変領域配列（SCFv）を含む。単鎖可変領域配列は、1つまたはそれ以上の抗原結合部位を有する単一ポリペプチド、例えば、フレキシブルリンカーによりVHドメインに連結されたVLドメインを含む。SCFv分子は、VH-リンカー-VL配向またはVL-リンカー-VH配向で構築可能である。抗原結合部位を構成するVLおよびVHドメインを連結するフレキシブルヒンジは

50

、約10個～約50個のアミノ酸残基を含む。連結ペプチドは、当該分野で公知である。結合ポリペプチドは、少なくとも1つのs c F vおよび/または少なくとも1つの定常領域を含み得る。一実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、Fcドメインバリエーションに連結または融合した少なくとも1つのs c F vを含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、S c F v分子（例えば、変化させたS c F v分子）を含む抗体をコードするDNA配列の融合により産生される多価（例えば、四価）抗体である。例えば、一実施形態では、S c F v分子（例えば、変化させたS c F v分子）が、そのN末端またはC末端で、フレキシブルリンカー（例えば、g l y / s e r リンカー）を介してFcドメインバリエーションに連結されるように、それらの配列が組み合わされている。他の実施形態では、本開示の四価抗体が、連結ペプチドに融合させたS c F v分子を、Fcドメインバリエーションに融合させてS c F v - F a b四価分子を構築することにより作製可能である。

10

【0170】

他の実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、変化させたミニボディである。本開示の、変化させたミニボディは、各々が、連結ペプチドを介してFcドメインバリエーションに融合したS c F v分子を含む、2つのポリペプチド鎖からなる二量体分子である。ミニボディは、当該分野で記載される方法（例えば、米国特許第5,837,821号明細書または国際公開第94/09817号を参照）を使用して、S c F v成分および連結ペプチド成分を構築することにより作製できる。他の実施形態では、四価ミニボディが構築可能である。四価ミニボディは、フレキシブルリンカーを使用して2つのS c F v分子が連結されること以外は、ミニボディと同じやり方で構築できる。次いで、連結したs c F v - s c F v構築物を、Fcドメインバリエーションに結合する。

20

【0171】

他の実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、ダイアボディを含む。ダイアボディは、二量体四価分子であり、各々が、s c F v分子と類似するポリペプチドを有するものの、通常は、両可変ドメインを連結する短い（10未満、例えば、約1つ～約5つの）アミノ酸残基リンカーを有するため、同じポリペプチド鎖上のV LおよびV Hドメインが相互作用できない。その代わりに、1つのポリペプチド鎖のV LおよびV Hドメインが、第2のポリペプチド鎖上の（それぞれ）V HおよびV Lドメインと相互作用する（例えば、国際公開第02/02781号を参照）。本開示のダイアボディは、Fcドメインバリエーションと融合させたs c F v様分子を含む。

30

【0172】

他の実施形態では、本開示の結合ポリペプチドが、V H Hまたはナノボディとも呼ばれる単ドメイン抗体（s d A b）を含む。N a n o b o d y（登録商標）は、A b l y n x社の登録商標である。V H Hは、軽鎖を欠いた可変重鎖ドメインを含む。従来のV Hドメインと同様に、V H Hは、4つのF Rおよび3つのC D Rを含有する。V H Hは、従来の抗体に勝る利点を有する。V H Hは、I g G分子よりも約10倍小さいため、適切に折り畳まれた機能性V H Hを、i n v i t r o発現により、高収量を達成しつつ産生できる。さらに、V H Hは、非常に安定であり、プロテアーゼの作用に対して耐性である。V H Hの特性および産生は、H a r m s e nおよびD e H a a r d H J（A p p l . M i c r o b i o l . B i o t e c h n o l . 2007年11月；77（1）：13～22頁）により概説されている。

40

【0173】

特定の例示的实施形態では、Fcドメインを、1つまたはそれ以上のV H Hと融合させる。

【0174】

他の実施形態では、結合ポリペプチドが、同じポリペプチド鎖上に直列する1つまたはそれ以上の可変ドメイン、例えば、タンデム可変ドメイン（T V D）ポリペプチドを含む、多重特異性または多価の抗体を含む。例示的T V Dポリペプチドは、米国特許第5,9

50

89, 830号明細書に記載される「ダブルヘッド」または「二重Fv」コンフィギュレーションを含む。二重Fvコンフィギュレーションでは、2つの異なる抗体の可変ドメインが、2つの別個の鎖（1つの重鎖および1つの軽鎖）上にタンデム配向で発現され、一方のポリペプチド鎖は、ペプチドリンカーによって分離された2つのVHドメインを直列に有し（VH1-リンカー-VH2）、他方のポリペプチド鎖は、ペプチドリンカーにより直列に連結された相補的VLドメインからなる（VL1-リンカー-VL2）。交差ダブルヘッドコンフィギュレーションでは、2つの異なる抗体の可変ドメインが、2つの別個のポリペプチド鎖（1つの重鎖および1つの軽鎖）上にタンデム配向で発現され、一方のポリペプチド鎖は、ペプチドリンカーによって分離された2つのVHドメインを直列に有し（VH1-リンカー-VH2）、他方のポリペプチド鎖は、ペプチドリンカーにより逆配向に直列に連結された相補的VLドメインからなる（VL2-リンカー-VL1）。「二重Fv」フォーマットに基づくさらなる抗体バリエーションは、二重可変ドメインIgG（DVD-IgG）二重特異性抗体を含む（米国特許第7,612,181号明細書を参照、およびTBTIフォーマット（米国特許出願公開第2010/0226923号明細書を参照）。いくつかの実施形態では、結合ポリペプチドが、Fcドメインバリエーションに融合させた同じポリペプチド鎖上に直列する1つまたはそれ以上の可変ドメインを含む、多重特異性または多価の抗体を含む。

10

【0175】

他の実施形態では、結合ポリペプチドが、「ダブルヘッド」コンフィギュレーションに基づく交差二重可変ドメインIgG（CODV-IgG）二重特異性抗体を含む（参照によってその開示の全体が本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20120251541号明細書を参照）。

20

【0176】

他の実施形態では、結合ポリペプチドが、CrossMabまたはCrossMab-Fab多重特異性フォーマットを含む（国際公開第2009080253号およびSchaeferら、PNAS（2011）、108:11187~1191頁を参照）。CrossMabフォーマットに基づく抗体バリエーションは、二重特異性IgG抗体のワンアーム内に抗体ドメインの交差を有し、正しい鎖会合を可能にする。

【0177】

他の実施形態では、グリコシル化されたエフェクター能のあるポリペプチドが、T細胞エンゲージャーフォーマットの多重特異性抗体を含む。「T細胞エンゲージャー」は、宿主の免疫系、特に、T細胞の細胞毒性活性を対象とした、ならびに腫瘍標的タンパク質を対象とした結合タンパク質に関する。いくつかの実施形態では、単離されたエフェクター能のあるポリペプチドが、NK細胞エンゲージャーフォーマットの多重特異性抗体を含む。「NK細胞エンゲージャー」は、活性化NK細胞受容体、抗原特異的標的化領域、およびFc領域を標的とするモノクローナル抗体断片を含む結合タンパク質に関する（Gauthierら、Cell（2019）、177:1701~13頁）。

30

【0178】

本明細書に記載されるFcドメインバリエーションを含む本開示の結合ポリペプチドは、公知の「親」抗体のCDR配列または可変ドメイン配列を含み得る。いくつかの実施形態では、親抗体および本開示の抗体が、本明細書に開示される、Fcドメインに対する修飾以外は同様または同一の配列を共有し得る。

40

【0179】

他の実施形態では、結合ポリペプチドが、治療用ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドが、受容体、リガンド、または酵素であり得る。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドが、凝固因子であり得る。いくつかの実施形態では、凝固因子が、FI、FII、FIII、FIV、FV、FVI、FVII、FVIII、FIX、FX、FXI、FXII、FXIII、VWF、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロンクチン、抗トロンピンIII、ヘパリンコファクターII、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（ZP

50

I)、プラスミノゲン、アルファ2抗プラスミン因子、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、ウロキナーゼ、プラスミノゲン活性化因子阻害剤-1(PAI-1)、プラスミノゲン活性化因子阻害剤-2(PAI2)、それらのいずれかの酵素前駆体、それらのいずれかの活性型、およびそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドが、成長因子であり得る。成長因子は、当該分野で公知の任意の成長因子から選択可能である。いくつかの実施形態では、成長因子がホルモンであり、他の実施形態では、成長因子がサイトカインである。いくつかの実施形態では、成長因子がケモカインである。いくつかの実施形態では、結合ポリペプチドが、本発明のFcドメインのN末端および/またはC末端に連結された治療用分子または治療用ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドがFc融合ポリペプチドである。

10

【0180】

核酸およびベクター

一態様では、本明細書に開示されるFcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。それらのポリヌクレオチドを発現させることを含む、Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドの作製方法も提供される。

【0181】

本明細書に開示されるFcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、典型的に、特許請求の抗体、治療用ポリペプチド、およびFc融合タンパク質の所望の量を産生するために使用できる、宿主細胞への導入用の発現ベクターに挿入される。したがって、特定の態様では、本発明が、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを含む発現ベクター、ならびにそれらのベクターおよびポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。

20

【0182】

用語「ベクター」または「発現ベクター」は、明細書および特許請求の範囲の目的で、所望の遺伝子を細胞内に導入して発現するために使用するベクターを意味するために本明細書で使用する。当業者には公知であるように、そのようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス、およびレトロウイルスからなる群から容易に選択可能である。一般的に、ベクターは、選択マーカ、所望の遺伝子のクローニングを容易にするために適切な制限部位、ならびに真核細胞または原核細胞に侵入および/または複製する能力を含む。

30

【0183】

多数の発現ベクター系が利用可能である。例えば、ベクターの一種は、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス(RSV、MMTV、もしくはMOMLV)などの動物ウイルス、またはSV40ウイルスに由来するDNA要素を利用する。他のものは、内部リボソーム結合部位を含むポリシストロン系の使用を含む。さらに、自身の染色体内にDNAを組み込んだ細胞は、トランスフェクト宿主細胞の選択を可能にする1つまたはそれ以上のマーカの導入により選択できる。マーカは、栄養要求性の宿主に原栄養性、殺生物剤耐性(例えば、抗生物質)、または銅などの重金属に対する耐性を供与し得る。選択マーカ遺伝子は、発現されるべきDNA配列に直接に連結されるか、または共形質転換により、同じ細胞内に導入されるかのいずれか一方である。mRNAの最適な合成には、さらなる要素が、同じく必要であり得る。それらの要素は、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモータ、エンハンサ、および終結シグナルを含み得る。いくつかの実施形態では、クローニングした可変領域遺伝子を、前記で考察したように合成した、重鎖および軽鎖定常領域遺伝子(例えばヒト遺伝子)と共に、発現ベクター内に挿入する。

40

【0184】

他の実施形態では、ポリシストロン構築物を使用して、本明細書に記載される、グリコシル化されたエフェクター能のあるポリペプチドを発現できる。そのような発現系では、目的の、抗体の重鎖および軽鎖などの複数遺伝子産物を、単一ポリシストロン構築物から

50

産生できる。この系は、有利には、内部リボソーム進入部位 (IRES) を使用して、真核宿主細胞中において比較的高レベルのポリペプチドをもたらす。適合性の IRES 配列は、参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第 6,193,980 号明細書において開示される。当業者は、そのような発現系が、本出願に開示されるポリペプチドの全範囲を効果的に産生するために使用できることを理解する。

【0185】

より一般的に、本開示の Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドをコードするベクターまたは DNA 配列が準備できたら、その発現ベクターを、適切な宿主細胞内に導入できる。すなわち、宿主細胞を形質転換できる。宿主細胞内へのプラスミドの導入は、当業者に周知の様々な技術により実現可能である。それらの技術は、トランスフェクション (電気泳動およびエレクトロポレーションを含む)、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープ DNA による細胞融合、マイクロインジェクション、およびインタクトなウイルスによる感染を含むがそれらに限定されない。例えば、Ridgway, A. A. G. 「Mammalian Expression Vectors」、第 24.2 章、470~472 頁 Vectors, Rodriguez および Denhardt 編 (Butterworths, Boston, MA 1988 年を参照。形質転換細胞を、軽鎖および重鎖の産生に適切な条件下で増殖させて、重鎖および/または軽鎖のタンパク質合成をアッセイする。例示的アッセイ技術は、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、または蛍光活性化セルソータ分析 (FACS)、免疫組織化学等を含む。

10

20

【0186】

本明細書で使用する用語「形質転換」は、遺伝子型を変化させて結果的にレシピエント細胞での変化をもたらす、レシピエント宿主細胞内への DNA の導入に関する、広い意味で使用するものとする。

【0187】

同様に、「宿主細胞」は、組換え DNA 技術を使用して構築された、少なくとも 1 つの異種遺伝子をコードするベクターで形質転換させた細胞に関する。組換え宿主からポリペプチドを単離する工程の記載では、用語「細胞」および「細胞培養」は、明らかに特に指定しない限り、抗体の起源を示すために交換可能に使用する。言い換えると、「細胞」からのポリペプチドの回収は、遠心沈殿全細胞からか、または培地および懸濁細胞の両方を含有する細胞培養からのいずれか一方を意味し得る。

30

【0188】

一実施形態では、Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドの発現に使用する宿主細胞株が、真核生物起源または原核生物起源である。一実施形態では、Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドの発現に使用する宿主細胞株が、細菌起源である。一実施形態では、Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドの発現に使用する宿主細胞株が、哺乳類起源である。当業者は、所望の遺伝子産物をその中で発現させるために最も適切である特定の宿主細胞株を決定できる。例示的宿主細胞株は、DG44 および DUXB11 (チャイニーズハムスター卵巣系統、DHFRLマイナス)、HELA (ヒト子宮頸癌)、CVI (サル腎系統)、COS (SV40 T 抗原を含む CVI の派生体)、R1610 (チャイニーズハムスター線維芽細胞) BALBC/3T3 (マウス線維芽細胞)、HAK (ハムスター腎系統)、SP2/O (マウス骨髄腫)、BFA-1c1BPT (ウシ内皮細胞)、RAJI (ヒトリンパ球)、293 (ヒト腎臓) を含むがそれらに限定されない。一実施形態では、細胞株が、自身が発現する抗体の、変化したグリコシル化、例えば、アフコシル化を実現する (例えば、PER.C6.RTM. (CruCell 社) または FUT8 ノックアウト CHO 細胞株 (POTELLI GENTTM 細胞) (Biowa 社、Princeton, NJ))。一実施形態では、NS0 細胞を使用し得る。宿主細胞株は、典型的に、商用サービス、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (American Tissue Culture Collection) または公開された文献から入手可能である。

40

50

【0189】

In vitro 産生は、多量の所望の Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドをもたらすスケールアップを可能にする。組織培養条件下での哺乳類細胞培養の技術は、当該分野で公知であり、例えば、エアリフトリアクタもしくは連続スターラリアクタ内での均一懸濁培養、または例えば、中空繊維、マイクロカプセル内、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上での固定化細胞培養もしくは包括細胞培養を含む。必要であれば、および/または望ましければ、ポリペプチドの溶液を、通例のクロマトグラフィ法、例えば、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィ、DEAEセルロースクロマトグラフィ、および/または(イムノ)アフィニティクロマトグラフィにより精製できる。

10

【0190】

グリコシル化された Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドをコードする1つまたはそれ以上の遺伝子はさらに、細菌または酵母細胞または植物細胞などの非哺乳類細胞中で発現させてもよい。これに関して、様々な単細胞非哺乳類微生物、例えば、細菌、すなわち、培養または発酵において増殖できるものも形質転換できると理解される。形質転換されやすい細菌は、大腸菌 (*Escherichia coli*) またはサルモネラ (*Salmonella*) などの腸内細菌科の一員、の株; 枯草菌 (*Bacillus subtilis*); 肺炎球菌 (*Pneumococcus*) などのバチルス科; 連鎖状球菌 (*Streptococcus*)、およびインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) を含む。さらに、細菌中で発現させた場合、Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドは、封入体の一部になり得ると理解される。Fcドメインバリエーションおよび/または結合ポリペプチドは、単離し、精製してから、機能分子へとアセンブリさせる必要がある。

20

【0191】

原核生物に加えて、真核微生物も使用可能である。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) または広く知られたパン酵母が、真核微生物の中では最も一般的に使用されるが、複数の他の株が一般的に利用可能である。サッカロマイセスでの発現には、例えば、プラスミド YRp7 (*Stinchcomb*ら、*Nature*、282:39頁(1979); *Kingsman*ら、*Gene*、7:141頁(1979); *Tschemper*ら、*Gene*、10:157頁(1980)) が、一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファン上で増殖する能力を欠く、酵母の変異株、例えば、ATCC 番号 44076 または PEP4-1 (*Jones*、*Genetics*、85:12(1977)) に対する選択マーカーを与える TRP1 遺伝子をすでに含有する。その場合、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての trp1 損傷の存在が、トリプトファンの不在下での増殖により、形質転換の検出用の効果的な環境を提供する。

30

【0192】

使用/処置の方法

一態様では、本発明が、本明細書に開示される Fcドメインバリエーションの有効量を対象に投与することを含む、処置を必要とする対象において疾患または障害を処置する方法を提供する。特定の実施形態では、本開示が、そのような処置を必要とする哺乳類対象において、疾患または障害、例えば、がんを処置するためのキットおよび方法を提供する。

40

【0193】

本開示の Fcドメインバリエーションは、複数の異なる適用において有用である。例えば、一実施形態では、主題の Fcドメインバリエーションが、Fcドメインバリエーションの結合ドメインにより認識されるエピトープを有する細胞の減少または除去にとって有用である。他の実施形態では、主題の Fcドメインバリエーションが、循環中の可溶性抗原の、濃度の低下または除去において効果的である。他の実施形態では、主題の Fcドメインバリエーションが、T細胞エンゲージャーとして効果的である。一実施形態では、Fcドメインバリエーションが、腫瘍サイズを低下させ、腫瘍増殖を阻害し、および/または担腫瘍動物の生存期間を延長し得る。したがって、本開示はさらに、ヒトまたは他の動物において、Fcドメイン

50

バリエーションの無毒性有効量をそのようなヒトまたは動物に投与することにより腫瘍を処置する方法に関する。

【0194】

他の実施形態では、主題のFcドメインバリエーションが、限定されないが、感染症、自己免疫障害、炎症性障害、肺疾患、神経疾患または神経変性疾患、肝疾患、脊椎の疾患、子宮の疾患、うつ病性障害等を含む他の障害の処置に有用である。感染症の非限定的例は、RNAウイルス（例えばオルソミクソウイルス（例えばインフルエンザ）、パラミクソウイルス（例えば、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、メタニューモウイルス）、ラドウイルス（例えば狂犬病ウイルス）、コロナウイルス（例えばSARS-CoV）、アルファウイルス（例えばチクングニアウイルス）、レンチウイルス（例えばHIV）等）、またはDNAウイルスに起因するものを含む。感染症の例はさらに、限定されないが、例えば、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、腸球菌（*Enterococcus*）、連鎖球菌（*Streptococcus*）、大腸菌（*Escherichia coli*）に起因する細菌感染症、および例えば、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）に起因するものを含む他の感染症を含む。他の感染症は、限定されないが、マラリア、SARS、黄熱病、ライムボレリア症、リーシュマニア症、炭疽、および髄膜炎を含む。例示的な自己免疫障害は、乾癬およびループスを含むがそれらに限定されない。したがって、本開示は、例えば、向上した半減期を有する主題のエフェクター能のあるポリペプチドの使用から利益を得る様々な状態を処置する方法に関する。

10

20

【0195】

当業者は、日常の実験により、悪性腫瘍を処置する目的のためのFcドメインバリエーションの無毒性有効量がどれほどであるかを決定できる。例えば、本開示のFcドメインバリエーションの治療上活性量は、対象の病期（例えば、ステージIに対するステージIV）、年齢、性別、医学的合併症（例えば、免疫抑制の状態または疾患）、および体重、ならびに修飾抗体が、対象において所望の応答を誘発するような要因に従って変わり得る。投与レジメンは、最適治療応答をもたらすために調整可能である。例えば、いくつかの分割用量を毎日投与してもよく、または治療状況の要件によって指示されるように、用量を比例的に低下させてもよい。

30

【0196】

一般的に、本開示で提供される組成物は、Fcドメインバリエーションによる、癌細胞の標的化を可能にする抗原マーカを含む任意の新生物を予防的または治療的に処置するために使用できる。

【0197】

医薬組成物およびその投与

本開示のFcドメインバリエーションを調製して、対象に投与する方法は、当業者に周知であり、当業者によって容易に決定される。本開示の結合ポリペプチドの投与経路は、経口、非経口、吸入または局所であり得る。本明細書で使用する用語の非経口は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸、または腔内投与を含む。これらすべて投与形態が、明らかに本開示の範囲内であると予定されるが、投与の一形態は、注射用、特に静脈内注射もしくは動脈内注射用の溶液または点滴である。通常、適切な注射用医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸、リン酸、またはクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えばポリソルベート）、場合により安定剤（例えばヒトアルブミン）等を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインバリエーションを、有害細胞集団の部位に直接に送達してもよく、その際に、治療剤に対する疾患組織の曝露が高まる。

40

【0198】

非経口投与用の調製物は、無菌、水性もしくは非水性の溶液、懸濁液および乳液を含む。水性キャリアは、水、アルコール溶液/水溶液、乳液、または懸濁液を含み、塩水および緩衝培地を含む。本開示の組成物および方法では、薬学的に許容可能なキャリアが、0

50

． 0 1 ~ 0 . 1 M、例えば 0 . 0 5 M のリン酸緩衝液、または 0 . 8 % 塩水を含むがそれらに限定されない。他の一般的な非経口ビヒクルは、リン酸ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース (R i n g e r ' s d e x t r o s e)、ブドウ糖・塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または不揮発性油を含む。静脈内ビヒクルは、流体・栄養補液、電解質補液 (例えばリンゲルデキストロースベースのもの) 等を含む。防腐剤および他の添加物も存在し得て、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガス等である。特に、注射用に適切な医薬組成物は、無菌、水性の溶液 (水溶性) または分散液、および無菌注射溶液または分散液の即時調製用の無菌粉末を含む。そのような場合、組成物は無菌である必要があり、容易なシリンジ通過性が存在する程度に流動性である。医薬組成物は、製造および貯蔵の条件下に安定であり、典型的に、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されている。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等)、ならびにそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合は、必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持できる。

10

【 0 1 9 9 】

多くの場合、糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコール、または塩化ナトリウムなどの等張剤が、組成物中に含まれる。注射組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることにより起こり得る。

20

【 0 2 0 0 】

いずれにせよ、無菌注射溶液は、本明細書で列挙した一成分または成分の組合せを含む適切な溶媒中に、活性化化合物 (例えば、Fcドメインバリエーション単独または他の活性剤との組合せ) を必要量で組み込み、必要に応じて、続いて過滅菌することにより調製可能である。一般的に、分散液は、塩基性分散媒、および前記で列挙したものからの、他の必要な成分を含有する無菌ビヒクル中に、活性化化合物を組み込むことにより調製される。無菌注射溶液の調製用の無菌粉末の場合、例示的な調製方法は、任意の所望の付加的成分を加えた活性成分の、予め滅菌した溶液から、その粉末をもたらす、真空乾燥および凍結乾燥を含む。注射用調製物は、当該分野で公知方法に従って、処理し、アンプル、バッグ、ボトル、シリンジまたはバイアルのようなコンテナに充填して、無菌条件下で密封する。さらに、調製物は、包装して、キットの形で販売してもよい。そのような製品は、典型的には、関連組成物が、自己免疫または新生物性障害を患うか、またはかかりやすい対象の処置に有用であることを示す、ラベルまたは添付文書を有する。

30

【 0 2 0 1 】

前記の状態の処置に対する、本開示の組成物の有効用量は、投与の手段、標的部位、患者の生理状態、患者がヒトであるか動物であるか、他の投薬、および処置が予防的であるか治療的であるかを含む、多くの異なる要因に応じて変わる。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む非ヒト哺乳類も処置可能である。安全性および効果を最適化するために、当業者に公知の日常的方法を使用して、処置用量を滴定できる。

【 0 2 0 2 】

本開示のFcドメインバリエーションは、複数回投与可能である。単一用量間の間隔は、1週間、1か月間、または1年間であり得る。間隔は、患者におけるFcドメインバリエーションまたは抗原の血中レベルの測定によって指示されるように変則的でもよい。いくつかの方法では、修飾された結合ポリペプチドの約 1 ~ 1 0 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の、いくつかの方法では約 2 5 ~ 3 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の血漿濃度を達成するために用量を調整する。代替的に、Fcドメインバリエーションは、徐放性製剤として投与してもよく、その場合は低頻度の投与が必要である。抗体の場合、患者における抗体の半減期に応じて、用量および頻度は変わる。一般的に、ヒト化抗体は、最長の半減期を示し、キメラ抗体および非ヒト抗体がそれに続く。

40

【 0 2 0 3 】

50

投与の用量および頻度は、処置が予防的または治療的であるかに応じて変わり得る。予防的適用では、患者の耐性を増強するために、本ポリペプチドまたはそれらのカクテルを含有する組成物を、まだ疾患状態にない患者に投与する。そのような量は、「予防上有効用量」と定義される。この使用では、正確な量は、再び、患者の健康状態および全身免疫に依存するが、一般的に、用量当たり約 0.1 ~ 約 25 mg、特に、用量当たり約 0.5 ~ 約 2.5 mg に及ぶ。比較的低用量が、長期にわたる比較のまれな間隔で投与される。一部の患者は、その先の生涯にわたり、処置を受け続ける。治療的適用では、疾患の進行が低減もしくは終結するまで、または患者が、疾患症状の部分的もしくは完全な改善を示すまで、比較的小間隔での比較的高用量（例えば、用量当たり約 1 ~ 400 mg / kg の抗体、放射性免疫複合体では約 5 ~ 25 mg の用量がより一般的に使用され、細胞毒性薬物修飾された抗体ではより高用量）が、必要とされることがある。その後は、患者に予防レジメを投与し得る。

10

【0204】

本開示の Fcドメインパリアントは、場合により、処置（例えば、予防的または治療的）を必要とする障害または状態の処置に効果的である他の薬剤と組み合わせて投与できる。本開示の ^{90}Y -標識修飾抗体の有効単回処置用量（すなわち、治療上有効量）は、約 5 ~ 約 75 mCi の間、例えば約 10 ~ 約 40 mCi の間に及ぶ。 ^{131}I -修飾抗体の有効単回処置非骨髄切除用量（non-marrow ablative dosage）は、約 5 ~ 約 70 mCi の間、または約 5 ~ 約 40 mCi の間に及ぶ。 ^{131}I -標識抗体の有効単回処置切除用量（すなわち、自家骨髄移植を必要とし得る）は、約 30 ~ 約 600 mCi の間、例えば約 50 ~ 約 500 mCi 未満の間に及ぶ。キメラ抗体と関連して、マウス抗体に対して長い循環半減期ゆえ、ヨウ素-131 標識キメラ抗体の有効単回処置非骨髄切除用量は、約 5 ~ 約 40 mCi の間に及び、例えば約 30 mCi 未満である。例えば、 ^{111}In 標識の画像基準は、典型的に、約 5 mCi 未満である。

20

【0205】

Fcドメインパリアントは、直前に記載のように投与できる一方、他の実施形態では、ポリペプチドを、他の点では健康な患者への第一選択治療として投与できることを強調する必要がある。そのような実施形態では、正常または平均的な赤色骨髄予備能を有する患者、および/または有さない患者、および処置を受けていない患者に、Fcドメインパリアントを投与してもよい。本明細書で使用する、補助療法と合わせたまたは組み合わせた、ポリペプチドの投与は、療法と開示される抗体との、連続、同時、同延（coextensive）、併用、付随、同時存在の投与または適用を意味する。当業者は、併用治療レジメンの様々な成分の投与または適用は、処置の全体的有効性を高めるためにタイミングを合わせられることを理解する。

30

【0206】

前記で考察したように、本開示の Fcドメインパリアント、抗体、治療用ポリペプチド、またはそれらの Fcドメインパリアント融合ポリペプチドは、哺乳類障害の *in vivo* 処置に関する薬学上有効量で投与し得る。これに関して、開示の Fcドメインパリアントは、投与を容易にするため、および活性剤の安定性を促進するために調合されると理解される。

40

【0207】

本開示に従う医薬組成物は、生理食塩水、無毒性緩衝液、防腐剤等などの薬学的に許容可能な無毒性無菌キャリアを含み得る。本出願の目的で、治療剤に結合したまたは非結合の Fcドメインパリアントの薬学上有効量は、抗体への効果的な結合を達成するため、および利益を獲得するため、例えば、疾患もしくは障害の症状を改善するため、または物質もしくは細胞を検出するために十分な量を意味すると見なされる。腫瘍細胞の場合、ポリペプチドは、新生細胞または免疫反応性細胞上の、選択された抗原と相互作用でき、それらの細胞の死亡の上昇をもたらす。当然のことながら、本開示の医薬組成物は、修飾された結合ポリペプチドの薬学上有効量を与えるために、単一用量または複数用量で投与可能である。

50

【0208】

本開示の範囲を踏まえて、本開示のFcドメインバリエーションは、前記の処置方法に従って、治療または予防の効果を生み出すために十分な量で、ヒトまたは他の動物に投与可能である。本開示のFcドメインバリエーションは、そのようなヒトまたは他の動物に、本開示の抗体を、薬学的に許容可能な従来のキャリアまたは希釈剤と、公知の技術に従って組み合わせることにより調製された従来の剤形で投与できる。当業者は、薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤の形態および特徴は、それが組み合わせられる活性成分の量、投与の経路、および他の周知の変数によって決まることを認識する。当業者はさらに、1つまたはそれ以上の種類の本開示に記載される結合ポリペプチドを含むカクテルが、特に効果的であると判明し得ることを理解する。

10

【0209】

本明細書で言及または引用した、論文、特許、および特許出願、および他のすべての文書、および電子的に入手可能な情報の内容は、個々の刊行物が、具体的かつ個別に、参照によって組み入れられると示されるのと同程度に、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。出願人は、そのような任意の論文、特許、特許出願、または他の物理文書および電子文書からのあらゆる材料および情報を本出願に物理的に組み入れる権利を留保する。

【0210】

本発明を、その具体的な実施形態に関連して記載したが、当業者は、本発明の本来の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことができ、等価物を置換できることを理解する。当業者には、本明細書に開示される実施形態の範囲から逸脱することなく、適切な等価物を使用して、本明細書に記載される方法の他の適切な修正および適合を行えることが容易に明らかである。さらに、特定の状況、材料、組成物、工程、工程段階を、本発明の目的、趣旨および範囲に適合させるために、多くの修正を行い得る。そのような修正すべてが、本明細書に添付の特許請求の範囲内である意図される。特定の実施形態を詳細に記載したところで、同じことが、単に説明する目的でのみ含まれて限定的であるとは意図されない以下の実施例に関連させてより明らかに理解される。

20

【実施例】

【0211】

本発明を、さらなる限定と解釈されるべきでない次の実施例によりさらに説明する。

30

【実施例1】

【0212】

In Silicoモデルおよび安定性を上昇させるジスルフィド結合の同定

FcドメインのCH2領域内にある操作されたジスルフィド結合の潜在的な安定化効果の特徴づけるために、PDB構造1HZHから獲得したFcドメインに対して、分子動力学(MD)シミュレーションを行った。熱ショックがドメインに与える影響を見積もり、ドメイン上での潜在的な弱い相互作用を決定するために、すべての系は、300Kおよび370Kにおいてシミュレートした。次のFcバリエーション: WT IgG1 Fcドメイン、DE + DQ、ADLE + DQ、DE + DQ + L242C / K334C、DE + DQ + R292C / V302C、ADLE + DQ + L242C / K334C、およびADLE + DQ + R292C / V302Cに対してシミュレーションを行った。結果は、300Kまたは370Kのいずれか一方の温度での、残基I332Eに関する疎水性接触の平均頻度(図1A)、ならびに対応する炭素アルファの根平均二乗揺らぎ(RMSF)指数により表される、変異を含有する領域の柔軟性(図1B)として報告した。

40

【0213】

結果

CH2ドメイン内での負電荷(I332E)の導入は、ドメインの疎水性コアの潜在的な破壊により、疎水性接触平均頻度の損失をもたらす(例えば、DQ + DE系およびDQ + ADLE系 - 図1A)。R292C + V302C変異またはL242C + K334C変異の導入は、この接触を部分的に回復または改善する。

50

【0214】

すべてのバリエーションでの半減期延長に与える潜在的な影響を見積もるために、DQ変異の柔軟性指数(RMSF - 図1B)を、すべての系に関して監視した。DQ変異の背景でI332E変異を含有する系は、256位および307位において、WTに対してより高い柔軟性を示すようである。DSB安定化の導入は、WT挙動に対して、柔軟性指数を部分的に改善するようである(例えば、DQ DE L242C + K334C - 図1B)。

【0215】

図2は、I332E(緑色CPKレンダリング)、および構造的に近接する、L242C + K334C操作されたジスルフィド結合(オレンジ色CPKレンダリング)による、Fc CH2ドメイン上のDSBグラフティングの一例(線-リボン)を示す。

10

【0216】

図3は、非共有結合ネットワークの一例を、I332(左パネル、疎水性接触を点線で強調)およびI332E(右パネル、静電接触を点線で強調)に関して示す。

【0217】

図3中の2つの画像間の構造比較は、I332E変異が、CH2ドメインの疎水性コア内に負電荷を導入したことを指摘する。この変異は、疎水性コア内の疎水性接触の損失をもたらすため、不十分な熱安定性に関する潜在的な駆動現象であると同定された。

【0218】

In silico試験の理論的根拠は、疎水性ネットワーク破壊に起因するエンタルピー損失を回復して、正常にN-グリコシル化されたCH2ドメインフォールドの根底にある疎水性ネットワークを救助するために、新規共有結合イオウ-イオウ接触を創出するジスルフィド安定化の可能な位置を見出すことであった。アグリコシル化IgG1を安定化させるために、いくつかのジスルフィド結合が以前に試験された(Gongら、2009年、J. Biol. Chem. 284、14203~14210頁; Jacobsonら、2017年、J. Biol. Chem. 292、1865~1875頁を参照)。それらの中で、2つのジスルフィドスキームが、前記の仮説に適合し、その位置および変異は、L242C + K334CおよびR292C + V302Cであった(図4を参照)。

20

【0219】

陰性対照として、ジスルフィド結合を導入するために、332位から遠く離れて2つの残基を選び、その位置および変異は、A287C + L306Cであった。このジスルフィド安定化は、疎水性コアに隣接し、IgG CH2ドメインを特徴づけるベータフォールドの境界に位置する(図5を参照)。共有結合性イオウ-イオウ結合の導入は、アグリコシル化IgG1足場を安定化させ得るとはいえ、I332E変異からの距離が、I332E変異を含有する増強されたエフェクター機能足場内では、このジスルフィド安定化を非効率的であると見なさせる。

30

【0220】

図4は、DSB変異用に選ばれた位置の一例を示す。左パネルのL242 + K334(円内の棒)。右パネルのR292およびV302(円内の棒)。

【0221】

図5は、陰性対照として選ばれたA287およびL306(下方の黄色棒)の位置を示す。この2つの残基はFcRn結合表面に近接し、IgGのCH2ドメインの境界にあり、先行する2つのDSBスキームよりも予測される構造的な衝撃は低い。

40

【0222】

In silicoモデルならびにC1q、Fc RIIIA、Fc RIIA、およびFcRnへの結合に及ぼすジスルフィド結合の影響

In silicoモデルを使用して、C1q、Fc RIIIA、Fc RIIA、およびFcRnへの結合に及ぼすジスルフィド結合の影響を決定した。

【0223】

材料および方法

50

この解析は、入手可能な結晶構造、PDB ID: 6FCZ - C1q、5D6D - GASDALIEFcとの複合体中のFcRIIIa、3RY6 - FcRIIIa、および4NOU - FcRnを用いて行った。構造のうちの2つの低分解能(6FCZ - C1qとの複合体中のFcのクライオEM構造に基づくモデル、および3RY6 - FcRIIIaとの複合体中のFcの、分解能が3.80のX線構造)を考慮する必要があり、結論は、不十分な分解能ゆえ、バイアスを有し得る。受容体から5以内のすべてのFc残基を選択することにより、相互作用する残基を決定し、エフェクター機能を増強する変異およびDSB変異と交差点検した。選んだ相互作用距離は、前記の2つの結晶構造の分解能よりも大きいため(それぞれ、5および3.80)、それはバイアスを低下させることになり、そのバイアスは、残基間直接相互作用の評価を決定する場合に限り決定的であり、本ケースの全相互作用表面を決定する場合には決定的でない。

10

【0224】

C1qとの接触残基

この解析は、2つのCH2ドメイン中に見出された最も近い残基は、Fc鎖1および鎖2に関して、それぞれ、次のとおりである。

【0225】

Fc鎖1: E233、L234、L235、G236、G237、K322、S324、N325、K326、A327、L328、P329、A330、P331、E333。残基G236およびA330は、ADLEおよびADEスキームにおいて、それぞれ、変異G236AおよびA330Lを有する。A330(ADLE中のL)は、C1q受容体と直接接触しており、ロイシンに変異させると、結合に直接与える影響を有し得る。さらに、P331は、C1qと直接接触しており、I332の直前である(ADE/DE/ADLE中のE)。

20

【0226】

Fc鎖2: H268、E269、E294、S298、Y300。これらの位置は、操作された変異の、エフェクター機能増強も安定化も、いずれも含有しない。

この解析に基づき、DE、ADE、およびADLE変異は、C1q受容体と接触するか、または近接する残基ゆえ、C1qへの結合に影響を与え得る。DSB位置は、C1qに最も近い残基内には見出されず、C1qへの結合に影響を与えないはずである。T256DおよびT307Q変異は、相互作用表面から遠く、したがって、C1qとの結合に影響を与えないはずである。

30

【0227】

FcRIIIaとの接触残基

この解析は、2つのCH2ドメイン中に見出された最も近い残基は、Fc鎖1および鎖2に関して、それぞれ、次のとおりである。

Fc鎖1: A236、G237、P238、D239、D265、V266、S267、H268、D270、Y296、N297、S298、T299、およびA327。

Fc鎖2: G236、G237、P238、S239、K326、A327、L328、P329、A330、I332。

【0228】

太字の残基は、DE、ADE、およびADLEエフェクター機能を増強する変異に属する。それが、FcRIIIaへの結合を上昇させることを説明し、報告された。ところが、前記の位置のいずれも、DSB変異のどちらも含有せず、FcRIIIaへの結合に影響を与えないはずである。T256DおよびT307Q変異は、相互作用表面から遠く、したがって、FcRIIIaとの結合に影響を与えないはずである。

40

【0229】

FcRIIIaとの接触残基

この解析は、2つのCH2ドメイン中に見出された最も近い残基は、Fc鎖1および鎖2に関して、それぞれ、次のとおりである。

Fc鎖1: L235、G236、G237、P238、K326、A327、L328、

50

P 3 2 9。残基 G 2 3 6 は、A D L E および A D E スキームにおける変異 G 2 3 6 A を有する。

F c 鎖 2 : L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 6、G 2 3 7、P 2 3 8、S 2 3 9、V 2 6 4、D 2 6 5、V 2 6 6、S 2 6 7、N 2 9 7、S 2 9 8、T 2 9 9。

【 0 2 3 0 】

残基 G 2 3 6 および S 2 3 9 は、A D L E、A D E および D E スキームにおいて、それぞれ、変異 G 2 3 6 A および S 2 3 9 D を有する。この解析に基づき、A D L E 変異は、F c R I I a への結合に影響を与え得る。一方、D S B 位置は、F c R I I a に最も近い残基内に見出されず、F c R I I a への結合に影響を与えないはずである。T 2 5 6 D および T 3 0 7 Q 変異は、相互作用表面から遠く、したがって、F c R I I a との結合に影響を与えないはずである。

10

【 0 2 3 1 】

F c R n との接触残基

構造解析に基づき、D S B 位置は、F c R n 結合表面に対する影響を有さないはずである。D S B 変異の位置は、F c R n 結合表面の一部でなく、結合表面が含有される C H 2 - C H 3 エルボの近傍に存在しない。

【 0 2 3 2 】

ノブ・イントゥ・ホール (K n o b - I n t o - H o l e (K I H)) および R F 変異に対する D S B の影響

構造解析に基づき、R F または K I H スキームは、F c 鎖の異なる I g G ドメインに属するため、それらに対して D S B は、いかなる影響も与えないはずである (D S B に対する C H 2 ドメイン、ならびに K I H および R F 変異に対する C H 3 ドメイン) 。

20

【 実施例 2 】

【 0 2 3 3 】

安定化バリエーションの構築および特徴づけ

点変異の導入により、増強されたエフェクター能のある F c 骨格を有するモノクローナル抗体 (m A b s) をフォーマットした (L a z a r ら、P N A S、1 0 3 : 4 0 0 5 ~ 1 0 頁 (2 0 0 6))。F c ドメインに導入された変異は、1) アミノ酸 2 3 9 位でのアスパラギン酸 (D) およびアミノ酸 3 3 2 位でのグルタミン酸 (E) (「 D E 」 バリエーション) ; 2) アミノ酸 2 3 6 位でのアラニン (A)、アミノ酸 2 3 9 位でのアスパラギン酸 (D)、およびアミノ酸 3 3 2 位でのグルタミン酸 (E) (「 A D E 」 バリエーション) ; または 3) アミノ酸 2 3 6 位でのアラニン (A)、アミノ酸 2 3 9 位でのアスパラギン酸 (D)、アミノ酸 3 3 0 位でのロイシン (L)、およびアミノ酸 3 3 2 位でのグルタミン酸 (E) (「 A D L E 」 バリエーション) であった (S m i t h ら、P N A S、1 0 9 : 6 1 8 1 ~ 8 6 頁 (2 0 1 2) を参照)。F c 担持ポリペプチドの半減期を延長するために、さらなる変異を導入した。アスパラギン酸 (D) を、アミノ酸 2 5 6 位において導入し、グルタミン (Q) を、アミノ酸 3 0 7 位において導入した。アミノ酸位置ナンバリングは、E U ナンバリングに基づいた。

30

【 0 2 3 4 】

より高い熱安定性を有する D E、A D E、および A D L E バリエーションを産生するために、システイン置換を導入して鎖内ジスルフィド結合を操作した。対のシステインが、次の位置 : 1) アミノ酸 2 4 2 位でのロイシン (L) およびアミノ酸 3 3 4 位でのリジン (K) ; ならびに 2) アミノ酸 2 9 2 位でのアルギニン (R) およびアミノ酸 3 0 2 位でのバリン (V) を置換した。アミノ酸位置ナンバリングは、E U ナンバリングに基づいた。

40

【 0 2 3 5 】

ヒト I g G 1 の F c ドメインをコードする核酸配列に点変異を導入した。次いで、その核酸配列を、m A b 1 (免疫細胞の表面に存在するタンパク質抗原に対する I g G 1 抗体) の可変ドメインのコード配列と融合し、サイトメガロウイルス (C M V) エンハンサー / プロモーターおよび S V 4 0 ポリ A シグナルを含有する哺乳類発現プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドを、メーカー説明書に従って、H E K 2 9 3 細胞内にトランス

50

フェクトした。

【 0 2 3 6 】

m A b 1 バリアントのヒト I g G 1 重鎖定常ドメインのアミノ酸配列

m A b 1

m A b 1 (w t) (I g G 1)

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 K 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 N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K 10
E Y K C K 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 D E
L 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

【 0 2 3 7 】

m A b 1 - D E (残基 D 2 3 9 および E 3 3 2 に下線)

【 化 1 】

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 K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P D 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 N 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 V S N K A L P A P E E E K T I S K A K G Q P R E P Q V
Y T L P P S R D E L 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 20

【 0 2 3 8 】

m A b 1 - D E - D Q (残基 D 2 3 9 、 E 3 3 2 、 D 2 5 6 、 Q 3 0 7 に下線)

【 化 2 】

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

【 0 2 3 9 】

m A b 1 - D E - D Q - L 2 4 2 C - K 3 3 4 C (残基 D 2 3 9 、 E 3 3 2 、 D 2 5 6 、
Q 3 0 7 、 C 2 4 2 、 および C 3 3 4 に下線)

【 化 3 】

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 K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P D V F C F P P K P K D T L M I S R D 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 N S T Y R V V S V L Q V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P E E E C T I S K A K G Q P R E P Q V
Y T L P P S R D E L 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 40

【 0 2 4 0 】

m A b 1 - D E - D Q - R 2 9 2 C - V 3 0 2 C (残基 D 2 3 9 、 E 3 3 2 、 D 2 5 6 、
Q 3 0 7 、 C 2 9 2 、 および C 3 0 2 に下線)

【 化 4 】

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 K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P D V F L F P P K P K D T L M I S R D 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 C E E Q Y N S T Y R C V S V L Q V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P E E E K T I S K A K G Q P R E P Q V
Y T L P P S R D E L 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 50

【 0 2 4 1 】

m A b 1 - D E - R 2 9 2 C - V 3 0 2 C (残基 D 2 3 9、E 3 3 2、C 2 9 2、および C 3 0 2 に下線)

【 化 5 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVT^{PS}SSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG^{DP}VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP^{CE}EQYNSTYRC^{CV}SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP^{EE}EKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT^{PP}VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ^{QG}NVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

【 0 2 4 2 】

m A b 1 - D E - L 2 4 2 C - K 3 3 4 C (残基 D 2 3 9、E 3 3 2、C 2 4 2、および C 3 3 4 に下線)

【 化 6 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVT^{PS}SSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG^{DP}VFC^{FP}PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP^{RE}EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP^{EE}ECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT^{PP}VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ^{QG}NVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

【 0 2 4 3 】

m A b 1 - A D E (残基 A 2 3 6、D 2 3 9、および E 3 3 2 に下線)

【 化 7 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVT^{PS}SSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL^{AG}DPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP^{RE}EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP^{EE}EKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT^{PP}VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ^{QG}NVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

【 0 2 4 4 】

m A b 1 - A D E - D Q (残基 A 2 3 6、D 2 3 9、E 3 3 2、D 2 5 6、および Q 3 0 7 に下線)

【 化 8 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVT^{PS}SSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL^{AG}DPVFLFPPKPKDTLMISR^DPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP^{RE}EQYNSTYRVVSVL^{QV}LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP^{EE}EKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT^{PP}VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

40

【 0 2 4 5 】

m A b 1 - A D E - D Q - R 2 9 2 C - V 3 0 2 C (残基 A 2 3 6、D 2 3 9、E 3 3 2、D 2 5 6、Q 3 0 7、C 2 9 2、および C 3 0 2 に下線)

【 化 9 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVT^{PS}SSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL^{AG}DPVFLFPPKPKDTLMISR^DPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP^{CE}EQYNSTYRC^{CV}SVL^{QV}LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP^{EE}EKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT^{PP}VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ^{QG}NVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

50

【 0 2 4 6 】

m A b 1 - A D E - D Q - L 2 4 2 C - K 3 3 4 C (残基 A 2 3 6、D 2 3 9、E 3 3 2

、 D 2 5 6 、 Q 3 0 7 、 C 2 4 2 、 および C 3 3 4 に下線)

【化 1 0】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFCFPPKPKDTLMISRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

【 0 2 4 7 】

m A b 1 - A D E - R 2 9 2 C - V 3 0 2 C (残基 A 2 3 6 、 D 2 3 9 、 E 3 3 2 、 C 2
9 2 、 および C 3 0 2 に下線)

10

【化 1 1】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 4 8 】

m A b 1 - A D E - L 2 4 2 C - K 3 3 4 C (残基 A 2 3 6 、 D 2 3 9 、 E 3 3 2 、 C 2
4 2 、 および C 3 3 4 に下線)

20

【化 1 2】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFCFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 4 9 】

m A b 1 - A D L E (残基 A 2 3 6 、 D 2 3 9 、 L 3 3 0 、 E 3 3 2 に下線)

30

【化 1 3】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 5 0 】

m A b 1 - A D L E - D Q (残基 A 2 3 6 、 D 2 3 9 、 L 3 3 0 、 E 3 3 2 、 D 2 5 6 、
Q 3 0 7 に下線)

【化 1 4】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

【 0 2 5 1 】

m A b 1 - A D L E - D Q - L 2 4 2 C - K 3 3 4 C (残基 A 2 3 6 、 D 2 3 9 、 L 3 3
0 、 E 3 3 2 、 D 2 5 6 、 Q 3 0 7 、 C 2 4 2 、 および C 3 3 4 に下線)

50

【化 1 5】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFCFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 5 2】

m A b 1 - A D L E - D Q - R 2 9 2 C - V 3 0 2 C (残 基 A 2 3 6、D 2 3 9、L 3 3
0、E 3 3 2、D 2 5 6、Q 3 0 7、C 2 9 2、お よ び C 3 0 2 に 下 線)

10

【化 1 6】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFCFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 5 3】

m A b 1 - A D L E - R 2 9 2 C - V 3 0 2 C (残 基 A 2 3 6、D 2 3 9、L 3 3 0、E
3 3 2、C 2 9 2、お よ び C 3 0 2 に 下 線)

20

【化 1 7】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFCFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 5 4】

m A b 1 - A D L E - L 2 4 2 C - K 3 3 4 C (残 基 A 2 3 6、D 2 3 9、L 3 3 0、E
3 3 2、C 2 4 2、お よ び C 3 3 4 に 下 線)

30

【化 1 8】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFCFPPKPKDTLMI SRDPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEECTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 2 5 5】

m A b 1 バリアントを、1.5リットルスケールで産生し、プロテインAアフィニティ
クロマトグラフィ(HI Screen MAb Select Sure protein A、Cytiva社)およびサイズ排除クロマトグラフィ(HI Load 26/
600 superdex 200 pg、Cytiva社)(PBSで平衡化)を含む
2ステップ工程により精製した。Sartorius Vivaspinn 10kDaを
使用して、画分のプールを、10mg/mLまで濃縮した。次いで、サンプルをろ過滅菌
して、使用まで4 において保管した。UV、LabChip GXII touch
HT(還元および非還元条件下のタンパク質)、SEC-HPLC、およびLC-MSに
より、定量、純度、および性質に関して、バッチを解析した。操作したジスルフィド結合
を、ペプチドマッピング用のLys-C、トリプシン、またはトリプシン+Glu-Cセ
リンプロテアーゼミックスによる酵素消化後、LC-MS(Q-ToF)を含む抽出イオ
ンクロマトグラフィ(XIC)を介して解析した。

40

50

【 0 2 5 6 】

結果

【 0 2 5 7 】

【 表 1 】

表 1.抗体産生

バッチ	説明	サンプル収量(mg/L) 1.5L スケールでの 系列 1	サンプル収量 (mg/L) 0.6L スケール での系列 2
VA2-21-262-1	MAb1-ADE-DQ-R292C_V302C		87
VA2-21-261-1	MAb1-ADE-DQ-L242C_K334C		68
VA2-21-266-1	MAb1-ADE-DQ		36
VA2-21-260-1	MAb1-ADE-R292C_V302C		76
VA2-21-259-1	MAb1-ADE-L242C_K334C		66
VA2-21-264-1	MAb1-ADE-A287C_L306C		6
VA2-19-943-1	MAb1-ADE	55	
VA2-20-953-1	MAb1-ADLE-DQ-R292C_V302C	47	
VA2-20-954-1	MAb1-ADLE-DQ-L242C_K334C	28	
VA2-20-952-1	MAb1-ADLE-DQ	27	
VA2-21-268-1	MAb1-ADLE-R292C_V302C		88
VA2-21-267-1	MAb1-ADLE-L242C_K334C		38
VA2-21-265-1	MAb1-ADLE-A287C_L306C		4
VA2-20-949-1	MAb1-ADLE	40	
VA2-20-956-1	MAb1-DE-DQ-R292C_V302C	46	
VA2-20-957-1	MAb1-DE-DQ-L242C_K334C	36	
VA2-20-955-1	MAb1-DE-DQ	37	
VA2-21-270-1	MAb1-DE-R292C_V302C		83
VA2-21-269-1	MAb1-DE-L242C_K334C		61
VA2-21-263-1	MAb1-DE-A287C_L306C		9
VA2-20-951-1	MAb1-DE	59	
VA2-20-950-1	Mab1-WT	40	

10

20

【 0 2 5 8 】

バッチを産生し、予想されるプロファイルで特徴づけた。A 2 8 7 C + L 3 0 6 C 構築物のサンプル収量は、他のいずれかの構築物と比べて非常に低かった。X I C により、ジスルフィド結合を決定し、図 6 (m A b 1 A D L E D Q & D S B 変異体によるジスルフィド結合の X I C プロファイル) ならびに図 7 A および図 7 B (m A b 1 _ D E & D S B 変異体および m A b 1 _ A D E & D S B 変異体によるジスルフィド結合の X I C プロファイル) により示され、予想されたように、さらなるジスルフィド結合が存在した。

30

【 0 2 5 9 】

F c バリエーションを有する m A b の熱安定性を試験するために、m A b を P B S 中に 1 0 m g / m L で希釈した。熱安定性は、標準キャピラリーを使用した P r o m e t h e u s N T 4 8 を用いて、ナノ型の示差走査蛍光定量法 (n a n o D S F) により決定し、1 分

40

【 0 2 6 0 】

ナノ D S F は、タンパク質の自家蛍光の変化を使用して、温度上昇に伴うタンパク質のアンフォールディングを監視する。2 6 6 n m の波長の光源を使用してタンパク質溶液を励起し、3 3 0 n m および 3 5 0 n m において、チロシンおよびトリプトファン残基の蛍光発光。チロシンおよびトリプトファン残基の発光極大および強度は、その直近の環境に著しく依存し、熱変性中にタンパク質がアンフォールドすると変化し得る。3 3 0 n m および 3 5 0 n m における蛍光強度比の変化の、温度の関数としてのモニタリングは、タンパク質のアンフォールディング遷移を表すシグモイド形曲線をもたらす。シグモイド曲線の中間点が、融解温度 (T m) を表す。タンパク質のアンフォールディング開始が検出可

50

能な温度が変性開始温度である。3つの変曲点 (I P) が存在し、2つは、F cドメインのC H 2およびC H 3に対応し、3つ目はF a bドメインに対応する。T a g gは、タンパク質が凝集傾向を示す温度である。

【 0 2 6 1 】

A D E、D E、およびA D L Eバリエーションの熱安定性試験の結果は、表2ならびに図8および図9 A ~ 図9 Bに見られる。ナノD S Fは、タンパク質の自家蛍光の変化を使用して、温度上昇に伴うタンパク質のアンフォールディングを監視する。330nmおよび350nmにおける蛍光強度比の変化の、温度の関数としてのモニタリングは、タンパク質のアンフォールディング遷移を表すシグモイド曲線をもたらす。シグモイド曲線の間接点が、融解温度 (T m) を表す。タンパク質のアンフォールディング開始が検出可能な温度が変性開始温度である。3つの変曲点 (I P) が記録される：2つは、F cドメインのC H 2およびC H 3に対応し、3つ目はF a bドメインに対応する。T a g gは、タンパク質が凝集し始める温度である。

【 0 2 6 2 】

【表2】

表2.野生型 IgG1 または増強した Fc ドメインを有する mAb1 の熱安定性

		mAb1							
ADE +/-	lgG1_ADE	lgG1_ADE	lgG1_ADE	lgG1_ADE	lgG1_ADE	lgG1_ADE	lgG1_ADE	lgG1	
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-	-	
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	A287C_L306C	-	-	
バッチ	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-21-264-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1	
変性開始温度°C	56	55	44	61	58	42	46	65	
IP Fc	65 (74)	64 (75)	50 (73)	69	66 (75)	51 (73)	51 (66)	71	
IP Fab	82	83	82	83	83	82	83	82	
Tagg	73	72	75	73	73	74	72	73	

		mAb1							
ADLE +/-	lgG1_ADLE	lgG1_ADLE	lgG1_ADLE	lgG1_ADLE	lgG1_ADLE	lgG1_ADLE	lgG1_ADLE	lgG1	
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-	-	
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	A287C_L306C	-	-	
バッチ	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-20-952-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-21-265-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1	
変性開始温度°C	58	54	39	60	57	41	45	65	
IP Fc	64	62	47 (66)	67	64 (75)	50 (73)	50 (65)	71	
IP Fab	82	83	82	82	83	82	83	82	
Tagg	74	73	74	73	72	75	72	73	

		mAb1							
DE +/-	lgG1_DE	lgG1_DE	lgG1_DE	lgG1_DE	lgG1_DE	lgG1_DE	lgG1_DE	lgG1	
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-	-	
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	A287C_L306C	-	-	
バッチ	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-21-263-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1	
変性開始温度°C	59	55	42	58	59	41	47	65	
IP Fc	66	65	49 (65)	69	67	52 (74)	53 (66)	71	
IP Fab	82	83	82	82	83	82	82	82	
Tagg	73	73	73	73	73	75	74	73	

【 0 2 6 3 】

すべてのF a bは、82 ~ 83 の間のT mを伴い非常に安定であった。W T I g G 1 (m A b 1) の変性開始温度は65 であり、D Q変異の有無にかかわらず、m A b 1 A D L E、A D E、およびD Eでは50 未満であった。他方、R 2 9 2 C _ V 3 0 2 CまたはL 2 4 2 C _ K 3 3 4 C D S Bを導入した場合、変性開始温度は、野生型I g G 1分子と同様に十分に50 を上回った。I P F cは、R 2 9 2 C _ V 3 0 2 CまたはL 2 4 2 C _ K 3 3 4 C D S Bを含有する分子では、野生型I g G 1と

同様に60 を上回る。R292C__V302CまたはL242C__K334C DSBの導入は、ADCCが増強されたFc ADLE、ADE、またはDEの背景で、半減期向上DQ変異の有無にかかわらず、熱安定性を回復した。

【0264】

A287C__L306C DSBは、半減期向上DQ変異を含まない、ADCCが増強されたFc ADLE、ADE、またはDEにおいて、熱安定性を回復しなかった。

【0265】

mAb2

以下のさらなるFcバリエーションを、mAb2（免疫細胞の表面にあるGタンパク質共役型受容体（GCLR）に対するIgG1モノクローナル抗体）：mAb2（wt）（野生型IgG1 Fc）、mAb2-DE（付加的な置換S239DおよびI332Eを有するmAb2に相当）、mAb2-DE-R292C/V302C（付加的な置換R292CおよびV302Cを有するmAb2-DEに相当）、ならびにmAb2-R292C/V302C（置換R292CおよびV302Cを有するmAb2 wtに相当）に基づいて作製した。

10

【0266】

mAb1に関して前記した方法と同じ方法により、mAb2 wt、mAb2-DE、mAb2-DE-R292C/V302C、およびmAb2-R292C/V302Cの熱安定性を試験し、結果を表3に提供する。

20

【0267】

【表3】

表3 野生型IgG1または増強したFcドメインを有する、ジスルフィド結合を含むかまたは含まないmAb2の熱安定性

クローン	TM1 (°C)
mAb2-R292C/V302C	73.0
mAb2 wt (対照)	71.9
mAb2-DE-R292C/V302C	67.9
mAb2-DE	51.0

30

【0268】

この結果は、mAb2中のDE変異は低い熱安定性をもたらすこと（mAb2 wtの71.9 のTmに対するmAb2-DEの51.0 のTm）、およびジスルフィド結合の導入は熱安定性を回復したこと（Tm 67.9）を示す。

【0269】

mAb3

以下のさらなるFcバリエーションを、mAb3（免疫細胞の表面に存在するタンパク質抗原、およびがん細胞の表面に存在するタンパク質抗原に対する二価二重特異性IgG1モノクローナルCODV-OL1抗体）：mAb3（wt）（野生型IgG1 Fc）、mAb3-DE（付加的な置換S239DおよびI332Eを有するmAb3に相当）、mAb3-DE-R292C/V302C（付加的な置換R292CおよびV302Cを有するmAb3-DEに相当）、mAb3-ADE（付加的な置換G236A、S239D、およびI332Eを有するmAb3に相当）、ならびにmAb3-ADE-R292C/V302C（付加的な置換R292CおよびV302Cを有するmAb3-ADEに相当）に基づいて作製した。

40

【0270】

mAb3抗体は、次のように産生した：

【0271】

対応する構築物の異なる鎖をコードする発現プラスミドを、大腸菌DH5a中で増殖さ

50

せた。トランスフェクションに使用するプラスミドは、EndoFree Plasmid Megaキット（Qiagen社）を使用して、大腸菌から調製した。ポリエチレンイミントランスフェクション試薬を使用して、F17無血清懸濁培養（Invitrogen社）中で増殖させたHEK293-F5細胞を、表示のプラスミドでトランスフェクトした。37℃、8%CO₂での6日間の培養後、遠心分離により細胞を除去し、0.22μmのフィルタを通して上清から粒子を除去した。MabSelect SuRe（Cytiva社）上にタンパク質を捕捉し、0.1Mクエン酸緩衝液pH3.0で抽出して、1MトリスpH9で中和した。タンパク質を、Superdex200 26/60（Cytiva社）を使用したサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）、0.22μmろ過、およびUV280濃度定量により仕上げた後、さらなる特徴づけに使用した。収量は、以下の表4中で報告する。

10

【0272】

【表4】

表4 野生型IgG1または増強したFcドメインを有する、ジスルフィド結合を含むかまたは含まないmAb3の収量

クローン	サンプル収量(mg/L)
mAb3-WT	>20
mAb3-DE	<10
mAb3-ADE	<10
mAb3-DE-R292C/V302C	>20
mAb3-ADE-R292C/V302C	>20

20

【0273】

正常なIgG1 Fc骨格を有する抗体は、20mg/L超のサンプル収量を実証し、一方、Fc骨格中にADEまたはDE変異を有する抗体は、10mg/L未満へのサンプル収量の低下を示す。ADEまたはDE変異に加えてジスルフィド結合を有するIgG1 Fcを有する抗体は、WTと同様のサンプル収量、およびサンプル収量の4~6倍の増加を実証し、mAb3-DE-R292C/V302CおよびmAb3-ADE-R292C/V302Cは、20mg/L超のサンプル収量を示した。

30

【0274】

mAb1に関して前記した方法と同じ方法により、mAb3の熱安定性を試験し、結果を表5に提供する。

【0275】

【表5】

表5 野生型IgG1または増強したFcドメインを有する、ジスルフィド結合を含むかまたは含まないmAb3の熱安定性

クローン	変性開始温度	Tm1
mAb3-WT	58.5	64.3
mAb3-DE	40.4	47.5
mAb3-ADE	41.2	46.8
mAb3-DE-R292C/V302C	57.8	65.9
mAb3-ADE-R292C/V302C	57.5	65.9

40

【0276】

正常なIgG1 Fc骨格を有するmAb3は、64.3のTm1および58.5の変性開始温度により、安定であった。IgG1 Fc中にADEまたはDE変異を有するmAb3分子は、50未満のTm1および変性開始温度を示す。ADEまたはDE変異に加えてジスルフィド結合を有するIgG1 Fcを有する分子は、熱安定性の上昇を

50

示す。mAb3-DE-DSB分子は、65.9 のTm1および57.8 の変性開始温度を示し、mAb3-ADE-DSBは、65.9 のTm1および57.5 の変性開始温度を示す。

【0277】

mAb3内のジスルフィド結合R292C/V302Cの化学的健全性

Fc CH2ドメイン上でのジスルフィド結合(DSB)の操作は、安定性を上昇させる。mAb3内の、操作されたDSBであるR292C_V302CおよびADE変異(G236A/S239D/I332E)が、DSB還元挙動に異常に影響を及ぼさないことを確保するために、DTTおよび続くトリプシンペプチドマッピングにより還元率を測定した。

10

【0278】

材料および方法

還元感受性アッセイ

PBS-E中でのDTTの段階希釈を行った(アッセイにおける最終DTT濃度: 20、10、5、2、1、0.5、0.2、および0.1mM)。還元中pH7.2が得られることを確保するために、スピン脱塩カラムを使用して、タンパク質バッチFF-20-819-1、FF-20-821-1、およびFF-21-170-5を、PBS-E緩衝液中に透析した。PBS-E中で、タンパク質サンプルを1.5mg/mLに正規化した。正規化したサンプルの2部を、PCRプレート内の各DTT希釈の1部へと添加し、添加後に混合した。このステップは、最低から最高の濃度のDTT濃度へと1分以内に行った。サーモスタットCサーモブロック上の25 °Cでの10分間のインキュベーションにより還元した。すべてのウェルにNEMストック溶液の3部を添加して、反応をクエンチした。アッセイ一貫性を確保するために、NEMの添加は、最低から最高のDTT濃度へと1分以内に行い、添加後に混合した。準備したプレートは、キャピラリーゲル電気泳動(cGE)および質量分析法(ペプチドマッピング)による測定まで、室温で保管した。

20

【0279】

以下の表6Aおよび表6Bは、それぞれ、還元感受性アッセイおよびキャピラリーゲル電気泳動用の試薬・材料リストを含む。

【0280】

30

40

50

【表 6】

表 6A - 還元感受性アッセイ用の試薬・材料リスト

試薬/材料	製造元	カタログ番号	ストック濃度
PBS 緩衝液 pH7.2	Gibco/Thermo-Fisher 社	20012043	1x
ジチオトレイトール(DTT)	Pierce/Thermo-Fisher 社	A39255	固体、PBS-E 中で 100mM へと溶解
N-エチルマレイミド(NEM)	Pierce/Thermo-Fisher 社	23030	固体、PBS-E 中で 200mM へと溶解
Invitrogen EDTA、pH8.0	Thermo-Fisher 社	AM9260G	0.5 M
Hard-shell 96 ウェルプレート	Bio-Rad 社	HSP9601	/
スピン脱塩カラム、7K MWCO	ZEBA 社	89883	/
装置	製造元	カタログ番号	
サーモスタット C サーモ ブロック	Eppendorf 社	5383000027	
アッセイ緩衝液	組成		
PBS-E	Gibco 1xPBS 緩衝液 pH7.2+1mM EDTA		

10

20

【 0 2 8 1 】

【表 7】

表 6B - キャピラリーゲル電気泳動(cGE)用の試薬・材料リスト

試薬/材料	製造元	カタログ番号	ストック濃度
MS グレード水	Thermo 社	#51140	/
ヨードアセトアミド(IAM)	Thermo-Fisher 社	#A39271	固体、水中で 250mM へと溶解
Hard-shell 96 ウェルプレート	Bio-Rad 社	#HSP9601	/
Protein Clear HR アッセイ キット	PerkinElmer 社	#CLS960014	/
Protein Clear HR チップ	PerkinElmer 社	#CLS148695	/
装置	製造元	カタログ番号	
LabChip GXII Touch	PerkinElmer 社	CLS138160	
サーモスタット C サーモ ブロック	Eppendorf 社	5383000027	
アッセイ緩衝液	組成/濃度		
非還元サンプル緩衝液	タンパク質発現サンプル緩衝液+8.75mM IAM		

40

【 0 2 8 2 】

還元感受性アッセイを行った後、Protein Clear HRアッセイの非還元プロトコルを使用して、メーカー説明書に従って、サンプルを測定した。

50

【0283】

チップを準備するために、すべてのアッセイ成分を室温へと平衡化させた。メーカー説明書に従って、Protein Clear HRゲルマトリクスを、Protein Clear HR色素溶液と混合し、ろ過してから、すすいだチップウェルに添加した。

【0284】

提供されたアッセイ対照VeriMAb標準を、メーカー説明書に従って、非還元サンプル緩衝液中に希釈し、70℃において10分間変性させてから、水と混合し、アッセイ較正のためにLabChip GXII Touch装置内に配置した。Protein Clear HRラダーを水中に1:10希釈後、指示される体積のラダー溶液およびProtein Clear HR洗浄緩衝液を、対応するチューブに移し、LabChip GXII Touch装置内に配置した。較正工程がうまく終了してから、サンプルを測定した。

10

【0285】

サンプルを調製するために、還元感受性アッセイに由来する各サンプル5µLを、PCRプレート中の非還元サンプル緩衝液18µLに添加して密封し、サーモスタットCサーモブロック上の70℃において10分間変性させた。変性後、サンプルを水35µLで希釈した。準備したアッセイプレートを、LabChip GXII Touch装置で測定するまで、室温で保管した。

【0286】

測定後、LabChipレビューソフトウェアを使用して解析した。相対ピーク面積の0.85%を有する全ピークを積分した。残りのインタクト分子の相対ピーク面積[%]を、DTT濃度に対してプロットし、4パラメータロジスティックモデル/シグモイド型用量反応モデル(XLfit、1部位用量反応(Dose Response One Site)、モデル205)により、曲線をフィットさせた。DTT添加を伴わないサンプルの面積を、標準化に使用し、100%に設定した。還元に対する分子の感受性を評価するために、インタクト分子の50%が残存している各サンプルのDTT濃度を、EC50値として使用した。

20

【0287】

還元アッセイ後の、トリプシンペプチドマッピング実験用の抗体サンプル調製

還元感受性アッセイを行った後、サンプルを消化法にさらした。0.2mol/Lの塩化ヒスチジン、5.6mmol/Lのグアニジウム塩酸塩pH6を使用して、Zebaspin脱塩カラム0.5mL(Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号89883)による緩衝液交換により、抗体サンプル当たり100µgを変性させた。NEMの完全除去を確保するために、緩衝液交換を一回繰り返した。次いで、10mmol/LのTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号T2556)の添加により、サンプルを、37℃において1h、還元した。続いて、Zebaspin脱塩カラム0.5mL(Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号89883)を用いて、緩衝液を、20mmol/Lの塩化ヒスチジン、0.5mmol/LのTCEP、pH6へと交換した。酵素と基質との比1:20で37℃において一晩、抗体をトリプシンで消化した。10%ギ酸溶液7µLの添加により、消化を停止させ、さらなる分析まで、サンプルを-80℃において凍結した。

30

40

【0288】

液体クロマトグラフィタンデム質量分析法による、修飾ペプチドの検出

EASY-ETDイオン源を装備した、orbitrap FUSION(商標)LUMOS(商標)TRIBRID(商標)質量分析計と連結されたVANQUISH(商標)Flex UHPLCシステム(Thermo Fisher Scientific社、San Jose, CA, USA)を使用して、ペプチドを分析した。

【0289】

ペプチド分離には、二元溶媒システム:(A)0.1%ギ酸、および(B)90%アセ

50

トニトリル、0.1%ギ酸を使用した。HYPER SIL GOLD (商標) C18 LCカラム(1.9 μmの粒子サイズを有する150mm x 2.1mm、Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号25003-152130-V)を用いて、50分間かけて溶媒Bの濃度を直線的に増加させた後、95%のBで5分間洗浄し、5%の溶媒Bへと5分間再平衡化する1hの勾配により、トリプシン消化サンプル2 μgを分離した。カラム上で分離したペプチドは、次の重要な設定により検出した：フルMSスペクトルは、375 ~ 2000に設定した質量範囲、自動ゲイン制御(AGC)ターゲット4.0e5、最大許容注入時間50ms、および1 μsスキャンにより、分解能120,000(200m/zにおいて確定)で取得した。データ依存性(MS/MS)スペクトルは、トップ5データ依存性モードにおいて、注入時間200ms以内に、AGCターゲット5.0e4の蓄積後、分解能15,000(200m/zにおいて確定)を使用して取得した。イオンを、1.6Th単離ウィンドウで単離して、30%の正規化衝突エネルギーでHCD、ETHCDまたはETCIDを使用して断片化した。ダイナミックエクスクルージョンは、10sに設定した。

【0290】

データ処理

取得したMSデータを、Expressionistソフトウェア(GeneDataバージョン13.5)を使用して処理し、手作業で検査して、正しい割当ておよび相対定量精度を確保した。マススペクトルを、サンプル分子のアミノ酸配列に対して検索した。重要な設定は、MSおよびMS/MSスペクトルの質量許容差であり、それぞれ、10ppmに設定した。検索パラメータ範囲内と見なされた翻訳後修飾は、システイン上のNEM修飾、およびExpressionistからのIgGN-グリカンライブラリを使用した一般的なN末端グリコシル化であった。

【0291】

結果

以下の表6C中に示すEC50値は、用量反応曲線から計算した。キャピラリー電気泳動(cGE)により測定した、非還元サンプルの主ピークのDDTによる還元は、mAb3 wt、mAb3 ADE、およびmAb3 ADE-DSBに関して同一であり、CH2ドメイン中のADE変異も操作されたジスルフィド結合も、タンパク質の還元感受性に対する影響を有さないことを示す。

【0292】

ペプチドマッピングにより解析した、還元感受性アッセイからのタンパク質、mAb3 wt、mAb3 ADE、およびmAb3 ADE-DSBは、還元に関与する分子間ジスルフィド結合(DSB)に関して同様の還元挙動を示す。用量反応曲線に基づき、EC50値は、3つのタンパク質に関して、1.2 ~ 1.5 mM DTTの範囲にあると見積もられ、操作されたDSBが、典型的分子間DSBと同様に還元安定性であることを示す。

【0293】

【表8】

表 6C - キャピラリー電気泳動(cGE)により測定した非還元サンプルの主ピークの DTT による還元の用量反応曲線から計算した EC50

タンパク質サンプル	EC50 [mM DTT]
Adapt_標準(mAb ctrl)	0.8
mAb3 wt	1.2
mAb3 ADE	1.2
mAb3 ADE-DSB	1.2

【0294】

mAb4

以下のさらなるFcバリエーションを、mAb4（免疫細胞の表面に存在するタンパク質抗原、およびがん細胞の表面に存在するタンパク質抗原に対する四価二重特異性IgG1モノクローナルCODV抗体）：mAb4（wt）（野生型IgG1 Fc）、mAb4-DE（付加的な置換S239DおよびI332Eを有するmAb4に相当）、mAb4-DE-R292C/V302C（付加的な置換R292CおよびV302Cを有するmAb4-DEに相当）、mAb4-R292C/V302C（置換R292CおよびV302Cを有するmAb4 wtに相当）、mAb4-ADE（付加的な置換G236A、S239D、およびI332Eを有するmAb4に相当）、ならびにmAb4-ADE-R292C/V302C（付加的な置換R292CおよびV302Cを有するmAb4-ADEに相当）に基づいて作製した。

10

【0295】

mAb4抗体は、次のように産生した：

【0296】

対応する構築物の異なる鎖をコードする発現プラスミドを、大腸菌DH5a中で増殖させた。トランスフェクションに使用するプラスミドは、EndoFree Plasmid Megaキット（Qiagen社）を使用して、大腸菌から調製した。ポリエチレンイミントランスフェクション試薬を使用して、F17無血清懸濁培養（Invitrogen社）中で増殖させたHEK293-FS細胞を、表示のプラスミドでトランスフェクトした。37℃、8%CO₂での6日間の培養後、遠心分離により細胞を除去し、0.22μmのフィルタを通して上清から粒子を除去した。MabSelect Sure（Cytiva社）上にタンパク質を捕捉し、0.1Mクエン酸緩衝液pH3.0で抽出して、1MトリスpH9で中和した。タンパク質を、Superdex200 26/60（Cytiva社）を使用したサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）、0.22μmろ過、およびUV280濃度定量により仕上げた後、さらなる特徴づけに使用した。収量は、以下の表7中で報告する。

20

【0297】

【表9】

表7:野生型IgG1 また増強したFcドメインを有する、ジスルフィド結合を含むかまたは含まないmAb4の収量

クローン	サンプル収量(mg/L)
mAb4-WT	30.6
mAb4-DE	2.7
mAb4-ADE	4.7
mAb4-DE-R292C/V302C	17.9
mAb4-ADE-R292C/V302C	19.4

30

【0298】

正常なIgG1 Fcを有するmAb4分子は、30.6 mg/Lのサンプル収量を実証し、一方、Fc部中にADEまたはDE変異を有するmAb4分子は、5 mg/L未満の値によりサンプル収量の著しい低下を示す。ADEまたはDE変異に加えてジスルフィド結合を有するIgG1 Fcを有するmAb4分子は、サンプル収量の増加を実証した。mAb4-DE-R292C/V302Cは、17.9 mg/Lのサンプル収量を示し、mAb4-ADE-R292C/V302Cは、19.4 mg/Lのサンプル収量を示す。

40

【0299】

mAb1に関して前記した方法と同じ方法により、mAb4の熱安定性を試験し、結果を表8に提供する。

【0300】

50

【表 10】

表 8:野生型 IgG1 また増強した Fc ドメインを有する、ジスルフィド結合を含むかまたは含まない mAb4 の熱安定性

クローン	変性開始温度	Tm1
mAb4-WT	59.0	66.4
mAb4-DE	45.3	50.3
mAb4-ADE	44.6	49.9
mAb4-DE-R292C/V302C	59.4	67.2
mAb4-ADE-R292C/V302C	58.2	66.6

10

【0301】

正常な IgG1 Fc を有する mAb4 は、66.4 の Tm1 および 59 の変性開始温度により、安定である。IgG1 Fc 中に ADE または DE 変異を有する mAb4 分子は、50 以下の Tm1 および変性開始温度を示す。ADE または DE 変異に加えてジスルフィド結合を有する IgG1 Fc を有する mAb4 分子は、熱安定性の上昇を示す。mAb4-DE-R292C/V302C 分子は、67.2 の Tm1 および 59.4 の変性開始温度を示し、mAb4-ADE-R292C/V302C は、66.6 の Tm1 および 58.2 の変性開始温度を示す。

【0302】

図 10 は、ナノ示差走査蛍光定量法 (ナノ D S F) により決定した、DE、ADE、DE + D S B、および ADE + D S B に対する、ジスルフィド安定化の熱安定性効果を示す。左パネルは mAb3 を示し、右パネルは mAb4 を示す。R292C/V302C による安定化は、約 10 だけ熱安定性の増加をもたらす。

20

【実施例 3】

【0303】

安定化 mAb1 バリエーションの結合パラメータ
方法および材料

フローサイトメトリを使用して、標的抗原を発現するいくつかの組換え細胞株：ヒトブレ B - 300 . 19 細胞、カニクイザルブレ B - 300 . 19 細胞、HEK293T - Fc R I I I a F 1 5 8、Fc R I I I a V 1 5 8、および CHO - ヒト Fc R n 発現細胞 (GenScript 社; M00603) に対する mAb1 の二価 EC50 結合を決定した。96 ウェルプレート中で、40,000 細胞/ウェルの密度に達するまで細胞を培養した。mAbs (100 μL/ウェル) を、4 で 45 分間にわたり添加した。インキュベーション後、ウェルを、PBS + 1% BSA で 3 回洗浄した。ヤギ抗ヒト IgG - Alexa488 抗体を、4 で 45 分間にわたり添加して、PBS + 1% BSA で 3 回洗浄した。抗体結合は、細胞を遠心分離して、200 μL/ウェルの PBS + 1% BSA の添加により細胞を再懸濁後に評価し、結合は、Guava easyCyte 8 HT フローサイトメトリシステムを使用して評価した。見かけの KD および EC50 値は、それぞれ、BIOST@T - BINDING および BIOST@T - SPEED ソフトウェアを使用して見積もった。

30

40

【0304】

huFc R I I I a タンパク質への抗体結合の動力学は、Biacore T200 装置を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイにより、HBS - EP + 緩衝液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、および 0.05% v/v の Surfactant P20、pH 7.4) 中、25 で測定した。ヒト Fc R I I I a _ _ H i s タンパク質 (huFc R I I I a _ _ V 1 5 8 ; huFc R I I I a _ _ F 1 5 8) は、抗 His 表面 (抗 His 抗体を固定化した CM5 センサチップ) 上に 0.05 μg/mL で捕捉された。2.5 μM を起点とする抗体濃度の系列を、1 分間にわたり注入し、3.5 分間にわたり解離を監視した (30 μL/分)。10 mM グリシン -

50

HCl pH 1.5 の 1 分パルスにより (10 μ L / 分)、抗 His 表面を再生させた。

【0305】

ヒト FcRn (huFcRn) タンパク質への抗体結合の動力学は、Biacore T200 装置を用いた SPR により、PBST 緩衝液 (1.5 mM KH₂PO₄、2.7 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O、300 mM NaCl、0.05% Tween-20、pH 6.0) 中、25 °C で測定した。huFcRn は、センサチップ__CAP-ストレプトアビジン上に捕捉された。2 μ M を起点とする抗体濃度の系列を、1 分間にわたり注入し 1.5 分間にわたり解離を監視した (30 μ L / 分)。6 M グアニジウム塩酸塩、0.25 M NaOH の 2 分パルスにより (10 μ L / 分)、表面を再生させた。

【0306】

抗体結合 (FACS)

ヒトおよびカニクイザルの両標的抗原に対する mAb 1 バリエーション結合の結果は、表 9 中に見られる。Fc ドメイン内に導入された変異と無関係に、標的抗原への結合は同様であった。EC₅₀ 値は、ヒト標的抗原に関しては 0.65 ~ 0.85 nM の間であり、EC₅₀ 値は、カニクイザル標的抗原に関しては 1.36 ~ 1.78 の間であった。操作されたジスルフィド結合の導入は、標的抗原への結合に影響を与えなかった。

【0307】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 9: FACS により測定した標的抗原への結合

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/- DQ +/-	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1 -
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
FACS による結合 EC50 (nM)アッセイ 1, n=3							
ヒト抗原	0.62 ± 0.05	0.59 ± 0.07	0.61 ± 0.04	0.60 ± 0.14	0.60 ± 0.12	0.55 ± 0.09	0.63 ± 0.11
カニクイザル抗原	1.52 ± 0.22	1.45 ± 0.24	1.52 ± 0.20	1.47 ± 0.19	1.51 ± 0.16	1.38 ± 0.10	1.49 ± 0.13

10

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB						
ADLE +/- DQ +/-	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1 -
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
FACS による、抗原への結合 EC50 (nM)アッセイ 1, n=3						
ヒト抗原			0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.07	0.60 ± 0.14	0.63 ± 0.11
カニクイザル抗原			1.54 ± 0.16	1.50 ± 0.20	1.48 ± 0.21	1.49 ± 0.13
FACS による、抗原への結合 EC50 (nM)アッセイ 2, n=1						
ヒト抗原	0.84	0.85			0.65	0.72
カニクイザル抗原	1.70	1.67			1.36	1.39

20

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB						
DE +/- DQ +/-	IgG1_DE DQ	IgG1_DE DQ	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1 -
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
FACS による、抗原への結合 EC50 (nM)アッセイ 1, n=3						
ヒト抗原			0.64 ± 0.09	0.62 ± 0.06	0.63 ± 0.11	0.63 ± 0.11
カニクイザル抗原			1.55 ± 0.28	1.49 ± 0.19	1.50 ± 0.19	1.49 ± 0.13
FACS による、抗原への結合 EC50 (nM)アッセイ 2, n=1						
ヒト抗原	0.86	0.75			0.79	0.72
カニクイザル抗原	1.78	1.62			1.45	1.39

30

【 0 3 0 8 】

h u F c R I I I a V / F 1 5 8 の 動 力 学 お よ び F A C S

ヒト F c R I I I a タンパク質への、m A b の結合を、S P R および F A C S により測定した。結果は、表 1 0 中に見られる。D E、A D E、および A D L E 変異を含む F c ドメインを有するすべてのバリエーションに関して、F c R I I I a V 1 5 8 または F 1 5 8 への結合は、F A C S および S P R により測定して、W T I g G 1 を有する抗体の、F c R I I I a V 1 5 8 または F 1 5 8 への結合と比べて著しく改善した。F A C S により測定して 1 0 ~ 1 0 0 倍の改善、および F c R I I I A V 1 5 8 (F c R I I I A F 1 5 8) に関して、S P R による、それぞれ、6 ~ 2 0 倍 (1 8 ~ 2 9 倍) の改善。操作されたジスルフィド結合、L 2 4 2 C / K 3 3 4 C または R 2 9 2 C / V 3 0 2 C のいずれかの導入は、F c R I I I a V 1 5 8 または F 1 5 8 への、m A b 1 結合に影響を与えなかった。

40

【 0 3 0 9 】

50

【表 1 2】

表 10: FACS および SPR により測定した FcγRIIIa V158 および F158 への結合

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/-	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1_ADE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 1、n=3							
V158	10 ± 3	7 ± 4	4 ± 1	12 ± 4	5 ± 2	3 ± 1	186 ± 70
F158	17 ± 1	19 ± 3	13 ± 4	19 ± 1	18 ± 4	9 ± 1	1064 ± 70
SPR による、FcγRIIIa への結合(KD nM)アッセイ 1、n=3							
V158	214 ± 25	191 ± 18	155 ± 5	172 ± 18	162 ± 4	107 ± 4	1623 ± 153
F158	202 ± 71	211 ± 47	183 ± 14	211 ± 16	193 ± 14	150 ± 6	3870 ± 397

10

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB							
ADLE +/-	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-20-952-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 1、n=3							
V158				12 ± 3	5 ± 2	3 ± 1 (2.71 ± 0.42)	186 ± 70
F158				25 ± 3	11 ± 4	4 ± 1 (4.37 ± 0.53)	1064 ± 70
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 2、n=1							
V158	26	9				5	244
F158	52	13				7	744
SPR による、FcγRIIIa への結合(KD nM)アッセイ 1、n=3							
V158			88 ± 4	258 ± 5	161 ± 21	77 ± 4	1623 ± 153
F158			105 ± 7	296 ± 16	148 ± 23	94 ± 3	3870 ± 397
SPR による、FcγRIIIa への結合(KD nM)アッセイ 2、n=3							
V158	56 ± 4	33 ± 1	28 ± 4			22 ± 2	386 ± 29
F158	70 ± 18	49 ± 2	38 ± 2			46 ± 27	1331 ± 111

20

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB							
DE +/-	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 1、n=3							
V158				4 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	186 ± 70
F158				11 ± 1	24 ± 12	11 ± 3	1064 ± 70
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 2、n=1							
V158	7	3				4	244
F158	20	27				18	744
SPR による、FcγRIIIa への結合(KD nM)アッセイ 1、n=3							
V158			60 ± 5	101 ± 26	109 ± 27	57 ± 5	1623 ± 153
F158			142 ± 11	88 ± 27	297 ± 43	141 ± 8	3870 ± 397
SPR による、FcγRIIIa への結合(KD nM)アッセイ 2、n=3							
V158	29 ± 2	18 ± 1	19 ± 1			17 ± 1	386 ± 29
F158	50 ± 1	72 ± 6	58 ± 4			48 ± 11	1331 ± 111

30

【 0 3 1 0】

40

h u F c R I I a H / R 1 3 1 の 動 力 学 お よ び F A C S

ヒト FcRIIIa タンパク質への、mAb の結合を、SPR および FACS により測定した。結果は、表 1 1 中に見られる。IgG1 と比べた、IgG1_ADE フォーマットでの FcγRIIIa への親和性の改善は、DQ 変異の存在の有無にかかわらず、DSB R292C_V302C または L242C_K334C 変異を導入した場合に消滅した。IgG1_ADLE または DE フォーマットでは、FcγRIIIa への親和性は、DSB 変異の有無の両方で低いままであった。

【 0 3 1 1】

50

【表 1 3】

表 11: FACS および SPR により測定した FcγRIIIa H131 および R131 への結合

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/- DQ +/-	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 1、n=3							
H131	101 ± 33	68 ± 27	14 ± 2	92 ± 12	102 ± 34	20 ± 2	341 ± 64
R131	45 ± 21	152 ± 56	18 ± 5	43 ± 12	142 ± 19	20 ± 1	303 ± 27

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB				
ADLE +/- DQ +/-	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 1、n=3				
H131	155 ± 28	145 ± 85	70 ± 12	341 ± 64
R131	144 ± 19	428 ± 170	85 ± 14	303 ± 27

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB				
DE +/- DQ +/-	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1_DE	IgG1
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
FcγRIIIa FACS による、FcγRIIIa への結合(EC50 nM)アッセイ 1、n=3				
H131	337 ± 142	319 ± 55	106 ± 29	341 ± 64
R131	254 ± 6	319 ± 8	198 ± 44	303 ± 27

10

20

30

40

50

【 0 3 1 2】

h u F c R n の 動 力 学 お よ び F A C S

h u F c R n 結 合 試 験 の 結 果 は、表 1 2 中 に 見 ら れ る。D Q 変 異 を 有 す る F c バ リ ア ン ト を 有 す る す べ て の m A b に 関 し て、h u F c R n へ の 結 合 は、D Q 変 異 を 有 さ ない F c と 比 べ て 改 善 し た。D S B の 導 入 は、F c が D Q 変 異 を 含 有 す る 場 合、こ の 改 善 を 維 持 し た。

【 0 3 1 3】

【表 1 4】

表 12: FACS および SPR により測定した huFcRn への結合

mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB							
ADE +/- DQ +/-	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE DQ	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1_ADE -	IgG1 -
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
SPR による、huFcRn への結合(KD nM)アッセイ 1、n=3							
	198 ± 3	161 ± 19	217 ± 2	1310 ± 221	829 ± 129	1040 ± 155	1210 ± 81

mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB							
ADLE +/- DQ +/-	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE DQ	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1_ADLE -	IgG1 -
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-20-953-1	VA2-20-954-1	VA2-20-952-1	VA2-21-268-1	VA2-21-267-1	VA2-20-949-1	VA2-20-950-1
SPR による、huFcRn への結合(KD nM)アッセイ 1、n=3							
			193 ± 15	1130 ± 111	965 ± 126	993 ± 153	1210 ± 81
SPR による、huFcRn への結合(KD nM)アッセイ 2、n=3							
	184 ± 11	156 ± 20	196 ± 27			811 ± 28	941 ± 130

mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB							
DE +/- DQ +/-	IgG1_DE DQ	IgG1_DE DQ	IgG1_DE DQ	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1_DE -	IgG1 -
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	-	R292C_V302C	L242C_K334C	-	-
バッチ	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
SPR による、huFcRn への結合(KD nM)アッセイ 1、n=3							
			199 ± 6	864 ± 271	798 ± 88	996 ± 104	1210 ± 81
SPR による、huFcRn への結合(KD nM)アッセイ 2、n=3							
	234 ± 41	169 ± 15	249 ± 41			761 ± 89	941 ± 130

10

20

【実施例 4】

【0314】

安定化 mAb 2 パリアントの結合パラメータ

方法および材料：

表面プラズモン共鳴アッセイ

表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用した Fc 受容体結合

組換えヒト Fc RIIIIa-V158 への抗体結合の分析は、Biacore T200 装置で抗 His キャプチャを使用して行った。抗テトラ His (Qiagen 社) を、PBS pH 7.2 (Gibco 社) へと緩衝液交換し、10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.0 中で 25 μg/mL へと希釈し、GE Healthcare 社が提供するアミンカップリングキットを使用して、シリーズ SCM5 チップに約 10,000 RU の表面密度へと直接固定化した。His タグ付き組換えヒト Fc RIIIIa-V158 (社内で産生) を、HBS-EP+ (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% surfactant P20) 中で 0.5 および 1 μg/mL へと希釈し、10 μL/分の流速で 30 秒間にわたり注入し、6 および 14 RU の捕捉レベルを得た。泳動用緩衝液中で mAb 2-wt 抗体を、3000 から 37 nM へと 3 倍段階希釈し、mAb 2-DE 抗体を、111、37、12、および 4 nM へと希釈し、二つ組で、捕捉した受容体上に 2 分間にわたり注入してから、緩衝液中で 2 分間解離した。表面は、30 秒間にわたる 10 mM グリシン pH 1.5 で再生させた。センソグラムは、BiaEvaluation ソフトウェア (GE Healthcare 社) を使用して処理し、1:1 結合モデルへとフィットさせて、動力学定数を得た。報告する KD は、両捕捉レベルから平均化した。

30

40

【0315】

表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用した FcRn 結合

組換えヒト、カニクイザル (cyno)、およびマウス FcRn への抗体結合の分析は

50

、Carterra LSA装置で抗Fab捕捉法を使用して行った。ヤギ抗ヒトIgG (F(ab')₂特異的)(Jackson Labs社)を、10mM酢酸ナトリウム pH4.5中で20µg/mLへと希釈し、Carterra社が提供するアミンカップリング試薬を使用して、25mM MES pH6.0、0.05% Tween-20 泳動用緩衝液中、HC200Mチップに約9,000RUの表面密度へと直接固定化した。mAb2抗体を、捕捉アレイフォーマット中の抗Fab表面に、PBSP+pH6.0 (20mM NaPi、2.7mM KCl、137mM NaCl、0.05% surfactant P20)中の6および15µg/mLで、別個の四分円へと二つ組でプリントした。FcRnの各種(社内で産生)を、PBSP+pH6.0中で2倍段階希釈し、捕捉したmAb2上に注入し、2分間または3分間会合させてから、5分間解離させて、pH6.0での親和性を測定した。各濃度系列は、計10種のFcRnの濃度を含

有し、最高濃度は、FcRn種特異的に：4000nM、2000nMのカニクイザル、および500nMのマウスFcRnであった。緩衝液注入は、適切なブランク引き算のために、受容体注入間に均等に分布させた。pH7.4でのFcRn結合を測定するために、mAb2抗体を、前記のように捕捉し、ヒトおよびカニクイザルFcRnをPBSP+pH7.4中で1000nMに希釈する一方で、マウスFcRnを500nMに希釈し、捕捉したmAb2上に注入し、2分間会合させてから、2分間解離させた。センソグラムは、Carterra K.I.T検査ツールで処理し、1:1結合モデルへとフィットさせて、pH6.0での動力学定数を得るか、またはpH7.4での会合相の終了時に定常状態応答を計算した。報告する結合親和性は、ヒトFcRnに関しては2つの別個のアッセイラン、ならびにカニクイザルおよびマウスFcRnに関しては単一アッセイランに由来するすべてのmAb2プリントから平均化した。

10

20

【0316】

結果：

【0317】

【表15】

表 13: huFcγRIIIa-V158 への結合親和性

mAb2 バリエーション	WT 対照	WT	_DE	_DE
		R292C_V302C		R292C_V302C
アッセイ				
huFcγRIIIa-V158 への結合(SPR)、KD(M)	3.97E-07	5.24E-07	1.33E-08	1.83E-08

30

【0318】

huFcγRIIIa-V158への結合に関するSPRの結果は、mAb2-wt、mAb2-R292C/V302Cに関して匹敵する親和性を示す。mAb2-DEおよびmAb2-DE-R292C/V302Cは、WTまたはWTバリエーションよりも22~39倍高い、huFcγRIIIa-V158への結合親和性を示し、互いに匹敵する親和性を有する。

40

【0319】

50

【表 1 6】

表 14: pH6.0 での FcRn への結合親和性

mAb2 (IgG1)	WT 対照	WT	_DE	_DE
		R292C_V302C		R292C_V302C
アッセイ				
huFcRn への 結合 (SPR) KD (nM)	103.23 ± 530.64	111.58 ± 551.15	83.83 ± 506.15	50.61 ± 509.15
cyFcRn への 結合 (SPR) KD (nM)	313.41 ± 35.52	324.54 ± 120.97	349.73 ± 70.81	325.91 ± 39.44
moFcRn への 結合 (SPR) KD (nM)	146.64 ± 21.77	147.51 ± 59.87	142.08 ± 40.41	142.09 ± 21.06

10

20

【 0 3 2 0】

結果は、mAb2 - wt 上または mAb2 - DE 上での R292_V302C 変異の付加が、ヒト、カニクイザル、またはマウス FcRn への結合親和性に対して著しい効果を有さないことを示す。親和性は、各種に対して、すべての分子で匹敵した。

【 0 3 2 1】

【表 1 7】

表 15: pH7.4 での FcRn への定常状態結合応答

mAb2 (IgG1)	WT 対照	WT	_DE	_DE
		R292C_V302C		R292C_V302C
バッチ				
huFcRn への結合 (SPR)定常状態応答 (RU)	0.06 ± 0.83	-0.03 ± 0.95	0.28 ± 0.18	0.08 ± 1.06
cyFcRn への結合 (SPR)定常状態応答 (RU)	0.32 ± 0.68	0.20 ± 0.77	0.36 ± 0.74	0.20 ± 0.83
moFcRn への結合 (SPR)定常状態応答 (RU)	0.87 ± 0.95	0.66 ± 1.14	0.54 ± 0.91	0.58 ± 0.19

30

40

【 0 3 2 2】

結果は、mAb2 分子のいずれも、試験した条件下の中性 pH では、ヒト、カニクイザル、またはマウス FcRn に結合しなかったことを示す。

50

【実施例 5】

【0323】

安定化 mAb3 バリエーションの、ヒト CD16a への結合パラメータ

mAb3 および mAb4 の両方とも、CD16a に結合できる Fc ドメインをもつ。DSB 置換 (R292C/V302C) が CD16a 結合を除去しないことを実証するために、CD16a への結合を測定した。表 16 に示すように、すべての DSB バリエーションは、DE または ADE バリエーション単独と比べて、両方の CD16a バリエーション (V158 または F158) への、同等あるいはそれ以上の結合を有した。

【0324】

【表 18】

10

表 16: ヒト CD16a への mAb3 および mAb4 結合パラメータ

抗体	huCD16a (V158) への結合 KD [nM]	huCD16a (F158) への結合 KD [nM]
mAb3 WT	705 ± 214	1265 ± 287
mAb3-DE	66 ± 25	67.2 ± 11
mAb3-ADE	113 ± 40	87.5 ± 6
mAb3-DE-DSB (R292C/V302C)	110	113
mAb3-ADE-DSB (R292C/V302C)	165	121
mAb4	618 ± 59	1376 ± 456
mAb4-DE	87 ± 48	63.5
mAb4-ADE	116 ± 37	86.9
mAb4-DE-DSB (R292C/V302C)	87	80.4 ± 9
mAb4-ADE-DSB (R292C/V302C)	155	114

20

【実施例 6】

【0325】

ジスルフィド結合安定化されたバリエーションの *in vitro* 特徴づけ

mAb1

30

A - バリエーションが *in vitro* 補体依存性細胞傷害性 (CDC) を誘導する能力の評価材料および方法:

mAb1 の CDC 能力は、標的を発現する DND41 細胞株 (T-ALL、T細胞急性リンパ芽球性白血病、Leukemia 8:425~434 頁 (1994)) を使用して評価した。細胞を、RHP 培地 (RPMI 1640 フェノールレッド不含、0.1% BSA、2mM HEPES、2mM グルタミン) 中に 3×10^6 個で懸濁する。

【0326】

細胞を、96 ウェルプレート中にウェル当たり 1.5×10^5 細胞でプレATINGし、25 μ l の抗体バリエーションと、167.5 nM を起点に 0.08 nM まで希釈率 2 の段階希釈濃度で、4 において 30 分間プレインキュベートした。

40

【0327】

第 2 ステップでは、ウェル当たり 25 μ l のヒト補体 (Sigma 社、Ref: S1764-1 mL、1 mL の H₂O + 4 mL の RHP 中に懸濁) を添加し、プレートを 2 時間、5.5% の CO₂ を含む 37 においてインキュベートした。WST-1 溶液 (Roche 社、Ref 11644807001; 10 μ l / ウェル) を添加し、プレートを再び 2 時間、5.5% の CO₂ を含む 37 においてインキュベートした。

【0328】

SpectraMax Plus 分光光度計 (Molecular Devices 社) を用いて 440 nm で、メーカーのプロトコルに従って、吸光度を測定した。各点を三つ組で行った。

50

【 0 3 2 9 】

生存率の%を次のように計算した：

%生存率 = ((O D _ サンプル - O D 培地) × 1 0 0) / (O D _ 抗体を含まない細胞 - O D 培地) 。

【 0 3 3 0 】

O D : 光学密度

データは、3つの独立した実験の要約である。

【 0 3 3 1 】

報告する結果は、I C 5 0 値の幾何平均、C V、および死亡率のデルタ(表17~表19)、ならびにA D Eフォーマット、A D L Eフォーマット、およびD EフォーマットのC D C活性の代表的な例である(図11、図12、および図13)。値は、B i o s t @ t - S P E E D v 2 . 4を使用して計算した。

10

【 0 3 3 2 】

結果：

【 0 3 3 3 】

【表19】

表 17: mAb1+/-ADLE、DE、または ADE+/-DSB(L242C_K334C もしくは R292C_V302C) に関する CDC 活性 IC50 値

可変領域	mAb1									
	iso ADLE	ADLE L242C_K334C	ADLE R 292C_V302C	iso DE	DE R292C_V302C	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE R292C_V302C	ADE L242C_K334C	WT 対照
バッチ	VA2-20-034.2	VA2-21-267-1	VA2-21-268-1	VA2-20-1117-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-19-943-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-2	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	3,03	1,89	3,11	3,49	3,33	4,13	2,10
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,63 ; 3,49]	[1,75 ; 2,04]	[2,56 ; 3,77]	[3,12 ; 3,92]	[3,06 ; 3,61]	[3,62 ; 4,71]	[1,88 ; 2,34]
IC50 CV %	NA	NA	NA	6,59	3,66	8,94	5,43	4,07	6,25	5,08
デルタ(トップ-ボトム)%	NA	NA	NA	79,56	88,63	72,93	68,29	70,16	59,99	87,19

20

NA: フィッティングは得られず

30

【 0 3 3 4 】

A D L Eフォーマット、およびA D L Eフォーマットを含有するすべての付加的な変異により、C D C活性は検出されない、表17および図11。一方、D EまたはA D Eフォーマットでは、C D C活性が測定され、D EまたはA D Eフォーマットに導入された付加的なジスルフィド結合変異により変化しない。

40

【 0 3 3 5 】

50

【表 2 0】

表 18: mAb1+/-ADLE、DE、または ADE-/-DQ+/-R292C_V302C に関する CDC 活性
IC50 値

可変領域	mAb1									
	igG1 iso ADLE	ADLE DQ	ADLE DQ_R292 C_V302C	iso DE	DE DQ	DE DQ_R292 C_V302C	iso ADE	ADE DQ	ADE DQ_R292 C_V302C	WT 対照
バッチ	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-953-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1*	VA2-20-956-1**	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-262-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	3,12	2,84	3,87	3,17	NA	NA	2,01
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,72 ; 3,58]	[2,31 ; 3,49]	[2,93 ; 5,12]	[2,82 ; 3,57]	NA	NA	[1,78 ; 2,27]
IC50 CV %	NA	NA	NA	6,38	10,17	13,56	5,58	NA	NA	5,85
デルタ (トップ-ボトム)%	NA	NA	NA	87,47	87,60	44,51	80,22	NA	NA	88,32

*3 アッセイのうち、1 アッセイでのみフィッティングが得られた

**3 アッセイのうち、2 アッセイでフィッティングが得られた

【0336】

ADLE フォーマット、ならびに付加的な DQ および R292C_V302C ジスルフィド結合変異により、CDC 活性は検出されなかった。一方、DE フォーマットおよび ADE フォーマットでは、CDC 活性が測定された。付加的な DQ および R292C_V302C ジスルフィド結合変異が DE フォーマット中に導入されると、活性は低下した。付加的な DQ および R292C_V302C ジスルフィド結合変異が ADE フォーマット中に導入されると、CDC 活性は消失した (表 18 および 図 12)。

【0337】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 19: mAb1+/-ADLE、DE、または ADE-/ +DQ+/-L242C_K334C に関する CDC 活性 IC50 値

可変領域	mAb1										
	IgG1	iso ADLE	ADLE	ADLE	iso DE	DE	DE	iso ADE	ADE	ADE	WT 対照
			DQ	DQ_L242C_K334C		DQ	DQ_L242C_K334C		DQ	DQ_L242C_K334C	
バッチ	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-954-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1*	VA2-20-957-1*	VA2-19-943-1**	VA2-21-266-1	VA2-21-261-1	VA2-20-950-1	
IC50 (nM)	NA	NA	NA	2,65	5,62	5,25	2,46	NA	NA	2,44	
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,34; 3,01]	[3,18; 9,95]	[3,12; 8,85]	[2,19; 2,76]	NA	NA	[2,14; 2,79]	
IC50 CV%	NA	NA	NA	5,98	28,57	26,06	5,18	NA	NA	6,46	
デルタ (トップ-ボトム)%	NA	NA	NA	89,47	29,77	25,36	82,94	NA	NA	76,02	

10

20

【0338】

A D L E フォーマット、ならびに付加的な D Q および L 2 4 2 C _ K 3 3 4 C ジスルフィド結合変異により、C D C 活性は検出されなかった。一方、D E フォーマットおよび A D E フォーマットでは、C D C 活性が測定された。付加的な D Q および L 2 4 2 C _ K 3 3 4 C ジスルフィド結合変異が D E フォーマット中に導入されると、活性は低下した。付加的な D Q および L 2 4 2 C _ K 3 3 4 C ジスルフィド結合変異が A D E フォーマット中に導入されると、C D C 活性は消失した (表 1 9 および 図 1 3)。

【0339】

B - バリエーションが i n v i t r o 抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) を誘導する能力の評価

30

材料および方法：

m A b 1 により認識される抗原を発現する L P 1 細胞株 (M M 、 ヒト多発性骨髄腫細胞、B l o o d . 1 9 8 9 年 3 月 ; 7 3 (4) : 1 0 2 0 ~ 7 頁) を 標 的 細胞として、およびナチュラルキラー細胞株 N K 9 2 F C G R 3 A 1 5 8 V (C o n k w e s t 社) をエフェクター細胞として、A D C C 能力を評価した。

【0340】

標的細胞を、カルセインアセトキシメチル (2 m M ; I n v i t r o g e n 社、R e f C 3 1 0 0 M P) で標識して、アッセイ培地 (R P M I 1 6 4 0 フェノールレッド不含、1 % S V F 、 0 . 7 7 m g / m L のプロベネシド、I n v i t r o g e n 社、P 3 6 4 0 0) 中に 2 x 1 0 5 個で再懸濁した。

40

【0341】

標的細胞 (T) を、9 6 ウェルプレート中にウェル当たり細胞 2 x 1 0 4 個で播種し、5 % の C O 2 を含む 3 7 において、I g G 野生型では 2 . 3 n M を起点に希釈率 3 の段階希釈濃度で、A D L E 、 A D E 、 および D E バリエーションでは 1 . 2 5 n M を起点に希釈率 7 の段階希釈濃度で、5 0 μ l の抗体バリエーションを加えて 3 0 分間プレインキュベートした。

【0342】

カルセイン放出最高レベルの陽性対照として、標的細胞を、0 . 5 % T r i t o n とインキュベートした。

50

【0343】

エフェクター細胞（E）を、アッセイ培地中に 6×10^5 個で再懸濁し、 $100 \mu\text{L}$ または 6×10^4 個のエフェクター細胞を、ウェル当たり標的細胞へと（T：E比は1：3）添加する。37、5%CO₂での3時間のインキュベーション後、 $100 \mu\text{L}$ の培養上清を、黒色96ウェルプレートに移し、EnVision 2104プレートリーダー（PerkinElmer社）を用いた492nmの励起および515nmの発光での蛍光により、カルセイン放出を測定した。各点を三つ組で行った。

【0344】

細胞毒性率の%を次のように計算した：

%細胞毒性率 = ((RLU_サンプル - RLU培地) × 100) / (RLU_陽性対照トリトン - RLU培地)。

RLU：相対発光量

【0345】

データは、少なくとも3つの独立した実験の要約である。各バリエーションおよび各実験に関して、IC50値、および死亡率のデルタを計算した。報告する結果は、IC50値の幾何平均、CV、および死亡率のデルタ（表20）、ならびにADLEフォーマット、ADEフォーマット、およびDEフォーマットのADCC活性の代表的な例である（図14～図16）。値は、BioStat-SPEED v2.4を使用して計算した。

【0346】

結果：

【0347】

【表22】

表 20: mAb1+/-ADLE、DE、または ADE+/-DSB(L242C_K334C もしくは R292C_V302C) に関する ADCC 活性 IC50 値

可変領域	mAb1										
	IgG1	iso ADLE	ADLE		iso DE	DE		iso ADE	ADE		WT 対照
			L242C_K334C	R292C_V302C		R292C_V302C	L242C_K334C		R292C_V302C	L242C_K334C	
バッチ	VA2-20-034.2	VA2-21-267-1	VA2-21-268-1	VA2-20-1117-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-19-943-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-2	VA2-20-950-1	
IC50 (nM)	2,51E-04	4,08E-04	4,86E-04	4,51E-04	3,56E-04	4,01E-04	1,67E-04	5,41E-04	5,45E-04	1,76E-02	
IC50 [95%CI]	[1,65E-04; 3,84E-04]	[2,66E-04; 6,27E-04]	[2,92E-04; 8,07E-04]	[2,59E-04; 7,86E-04]	[2,41E-04; 5,27E-04]	[2,65E-04; 6,07E-04]	[1,09E-04; 2,56E-04]	[2,77E-04; 1,06E-03]	[3,51E-04; 8,48E-04]	[1,19E-02; 2,60E-002]	
IC50 CV %	20,91	19,91	24,01	25,10	19,01	19,61	20,58	30,43	21,72	19,16	
デルタ (トップ-Bボトム)%	48,18	43,52	47,05	53,71	45,51	48,73	44,70	45,26	47,63	51,23	

NA: フィットिंगは得られず。

【0348】

ADLEフォーマットで測定されたADCC活性は、このフォーマット内にL242C_K334CまたはR292C_V302CのいずれかのDSB変異を導入した場合、同じ範囲に維持された。同様に、DEおよびADEフォーマットで測定されたADCC活性は、それらのフォーマット内に該DSB変異を導入した場合に維持された（表20および図14）。

【0349】

50

【表 2 3】

表 21: mAb1+/-ADLE、DE、または ADE-/ +DQ+/-R292C_V302C に関する ADCC 活性 IC50 値

可変領域	mAb1										
	igG1	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE R 292C_ V302C	iso DE	DE DQ	DE R292C_ V302C	iso ADE	ADE DQ	ADE R292C_ V302C	WT 対照
バッチ	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-953-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1	VA2-20-956-1	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-262-1	VA2-20-950-1	
IC50 (nM)	8,11E-05	1,03E-04	1,71E-04	1,08E-04	9,01E-05	1,16E-04	1,13E-04	1,44E-04	2,97E-04	1,60E-02	
IC50 [95%CI]	[4,83-05; 1,36E-04]	[6,58E-05; 1,63E-04]	[1,06E-04; 2,75E-04]	[6,54E-05; 1,79E-04]	[6,52E-05; 1,25E-04]	[7,21E-05; 1,86E-04]	[8,21E-05; 1,54E-04]	[9,12E-05; 2,28E-04]	[2,11E-04; 4,17E-04]	[9,58E-03; 2,67E-02]	
IC50 CV %	25,05	21,98	23,54	24,30	15,94	23,37	15,54	19,86	16,74	24,61	
デルタ (トップ-ボトム)%	46,26	43,43	42,02	43,22	45,12	41,80	42,15	42,10	39,71	46,07	

10

【 0 3 5 0】

A D L E フォーマットで測定された A D C C 活性は、このフォーマット内に、R 2 9 2 C _ V 3 0 2 C の有無にかかわらず、付加的な D Q 変異を導入した場合、同じ範囲に維持された。同様に、D E & A D E フォーマットで測定された A D C C 活性は、それらのフォーマット内に、R 2 9 2 C _ V 3 0 2 C の有無にかかわらず、付加的な D Q 変異を導入した場合、維持された (表 2 1 および図 1 5) 。

20

【 0 3 5 1】

【表 2 4】

表 22: mAb1+/-ADLE、DE、または ADE-/ +DQ+/-DSB L242C_K334C に関する ADCC 活性 IC50 値

可変領域	mAb1										
	igG1	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE L242C_ K334C	iso DE	DE DQ	DE L242C_ K334C	iso ADE	ADE DQ	ADE L242C_ K334C	WT 対照
バッチ	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-954-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1	VA2-20-957-1	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-261-1	VA2-20-950-1	
IC50 (nM)	8,11E-05	1,03E-04	1,54E-04	1,08E-04	9,01E-05	1,54E-04	1,13E-04	1,44E-04	1,62E-04	1,60E-02	
IC50 [95%CI]	[4,83-05; 1,36E-04]	[6,58E-05; 1,63E-04]	[1,00E-04; 2,37E-04]	[6,54E-05; 1,79E-04]	[6,52E-05; 1,25E-04]	[1,08E-04; 2,20E-04]	[8,21E-05; 1,54E-04]	[9,12E-05; 2,28E-04]	[1,07E-04; 2,46E-04]	[9,58E-03; 2,67E-02]	
IC50 CV %	25,05	21,98	20,60	24,30	15,94	17,45	15,54	19,86	19,53	24,61	
デルタ (トップ-ボトム)%	46,26	43,43	46,62	43,22	45,12	44,93	42,15	42,10	39,20	46,07	

30

40

【 0 3 5 2】

A D L E フォーマットで測定された A D C C 活性は、このフォーマット内に、L 2 4 2 C _ K 3 3 4 C の有無にかかわらず、付加的な D Q 変異を導入した場合、同じ範囲に維持された。同様に、D E & A D E フォーマットで測定された A D C C 活性は、それらのフォーマット内に、L 2 4 2 C _ K 3 3 4 C の有無にかかわらず、付加的な D Q 変異を導入した場合、維持された (表 2 2 および図 1 6) 。

【 0 3 5 3】

50

m A b 3

A D EまたはD E置換と組み合わせたD S B置換を有する抗体の力価が、消失しなかったことを実証するために、m A b 3を用いて細胞毒性アッセイを行った。

【0354】

図17に示すように、D S B置換(R 2 9 2 C __ V 3 0 2 C)の包含は、A D EまたはD Eバックグラウンドのどちらのm A b 3の活性にも影響を与えなかった。

【実施例7】

【0355】

ジスルフィド結合安定化されたバリアントのP K解析

この実施例は、D S B安定化バリアントが、P Kプロファイルに与える影響を記載する 10

【0356】

m A b 1

材料および方法：

マウス実験は、C 5 7 B L / 6マウスに由来し、The Jackson Laboratory社(Bar Harbor, Maine)から購入したホモ接合型トランスジェニックTg32(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FcGRT)32Dcr/DcrJ)マウスにおいて行った。FcRn-/-hFcRn(系統32)Tgマウスは、マウス遺伝子のヌル変異、およびhFcRn鎖導入遺伝子をその天然ヒトプロモータの制御下に発現する導入遺伝子を有する。 20

【0357】

すべてのマウスは、試験開始時に8~12週齢の間の年齢の処置未経験に雌性であった。投与には、抗体をD P B S 1x調合緩衝液中で調製し、1mg/kgの単一静脈内投与として、10mL/kgの投与容量で尾静脈に投与した。28日の試験期間にわたり、逐次サンプリングアプローチを使用して(0.08時間、4時間、24時間、72時間、168時間、240時間、336時間、504時間、および672時間)、各抗体につき、計3匹のレプリケートを評価した。サンプリング時間に従って、血液サンプル(およそ20μL)を採取した。血液サンプルを4において、1500gで10分間遠心分離し、6μLの血漿サンプルを、60μLのD P B S 1x中に希釈してから、分析まで-80で保管した。 30

【0358】

m A b 1 W T抗体に関して、次の一般的な方法を使用したボトムアップLC-MS/MSアッセイにより、各時点での各抗体の濃度を決定した。一定分量の血漿を沈殿後、血漿ペレットを、タンパク質変性、還元、アルキル化、トリプシン消化、および固相抽出してから、サロゲートペプチドを分析した。各抗体の定量のために、その選択性および応答因子に応じて、m A b 1の軽鎖に属する17アミノ酸残基の配列に対応するサロゲートペプチドを選択した。校正標準は、抗体を1、2、5、10、20、50、100、200、および400μg/mLで血漿に添加することにより調製した。ペプチド分離は、逆相X Bridge BEH C18カラム(2.1x150mm、3.5μM、300、Waters社)を用いたWaters Acquity UPLCシステムにより、水中の0.1%ギ酸とアセトニトリル中の0.1%ギ酸との階段状勾配において300μL/分の流速で行った。検出には、Sciex API6500+質量分析計を、陽イオンモードで、ソース温度700、イオンスプレー電圧5500V、カーテンガスおよびネブライザーガス40、衝突ガス(atmid)を使用した。各トランジションにつき、滞留時間は30msであり、エントランス電位は10Vであった。デクラスタリング電位は90Vであり、衝突エネルギーは26Vであった。標準および対照に対する濃度定量には、AnalystソフトウェアのMQIII積分アルゴリズムからのピーク面積を使用して、抗体のユニークなサロゲートペプチドの多重反応モニタリングトランジション(807.4m/zでの626.0)を使用した。 40

【0359】

50

mAb1バリエーション (ADE、DE、ADLE、DE-DQ、およびADLE-DQバリエーション) に関して、各時点での各抗体の濃度は、段階的サンドイッチフォーマットである Gyrolabプラットフォーム (Gyros社) を使用する一般的なイムノアッセイ法により決定した。サンプル (標準、品質管理、および試験サンプル) を、緩衝液中で100倍希釈し、96ウェルマイクロタイタープレートに分注した。捕捉試薬および検出試薬は、第2の96ウェルマイクロタイタープレートに分注した。次いで、96マイクロタイタープレートおよび bioaffy CD (CD200-112個の微細構造化セグメントを含有) を、Gyrolabプラットフォーム上にロードした。以下のステップ: Gyrolab Bioaffy ディスク (CD200) 内のストレプトアビジンビーズカラム上へのビオチン化ロバ抗 hu-IgG (捕捉) の添加; 次いで、標準、品質管理、および試験サンプルの分配; 次いで、AlexaFluor-ヤギ抗 hu-IgG (検出) の添加は、Gyrolabプラットフォームにより自動的に誘発された。オンカラム蛍光測定 (exc 633nm、emm 650nm) は、1%に設定した光電子増倍を使用して、各微細構造化セグメントにおいて行った。すべての分析は二つ組で行い、定量の範囲は100~200,000ng/mLであった。

【0360】

PKパラメータは、Phoenix WinNonlinバージョン8.1 (Certara L.P.社) のノンコンパートメント解析を使用して、個々の動物データから決定した。

【0361】

ADA干渉の典型である、濃度の急落を示した、mAb1-ADLE-DQ-L242C-K334Cを投与した1匹の動物からのPKプロファイルは、PK計算から除外した。mAb1-DE-DQ-R292C-V302Cを投与した1匹の動物も、投与上の問題ゆえ、PK解析から除外した。

【0362】

結果:

【0363】

【表25】

表 23: Tg32 マウスで試験した異なる抗体の PK パラメータの要約(平均(CV%))

mAb1 化合物	C0	AUC	CL	Vss	t1/2z
	(µg/mL)	(日*µg/mL)	(mL/日/kg)	(mL/kg)	(日)
ADLE-DQ	22.9	42.6	23.5	97.3	3
ADLE-DQ-L242C/K334C	19.0	219	4.59	119	19
ADLE-DQ-R292C/V302C	18.1	244	4.49	136	23
DE-DQ	15.5	60.3	16.9	180	9
DE-DQ-L242C/K334C	13.5	150	6.89	152	16
DE-DQ-R292C/V302C	14.7	157	6.51	145	16
WT	19.7	127	7.88	163	16

【0364】

DE-DQおよびADLE-DQに関して、2つのDSB位置 (L242C-K334CおよびR292C-V302C) により同様のPKプロファイル&パラメータが認められた。DSB位置は、DE-DQ&ADLE-DQ変異させた構築物のPK特性を、3~9倍だけ延長した消失半減期、および4~10倍だけ低下したクリアランスにより改善した。ADLE-DQ-DSBの消失半減期は、WTよりもわずかに長く、一方、DE-DQ-DSBのt1/2zは、WTと同様であった (図18)。

【0365】

DQ置換を有さないmAb1に関しても同様に、PKプロファイルを生成した。その結果を表24および図19に示す。

【0366】

どの変異であろうと (A D E、 D E、または A D L E)、 2つの D S B 位置 (L 2 4 2 C - K 3 3 4 C および R 2 9 2 C - V 3 0 2 C) により同様の P K プロファイル & パラメータが認められた。 D S B 位置は、 D E & A D L E 変異させた構築物と比べて、消失半減期を 2 . 5 ~ 3 倍だけ延長させ、クリアランスを 2 . 5 ~ 3 倍だけ低下させることにより、 D E & A D L E 変異させた構築物の P K 特性を明らかに改善した。 D S B の添加による P K 特性の改善は、 A D E 変異させた構築物ではあまり明らかでなかった。それにもかかわらず、 D S B を有する変異構築物の P K パラメータは、 W T 構築物と同様であり、 D S B は、変異構築物を *i n v i v o* で安定化させる。

【 0 3 6 7 】

【 表 2 6 】

10

表 24: Tg32 マウスで試験した異なる抗体の PK パラメータの要約(平均(CV%))

mAb1 化合物	C0	AUC	CL	Vss	t1/2z
	($\mu\text{g/mL}$)	($\text{日} \cdot \mu\text{g/mL}$)	(mL/日/kg)	(mL/kg)	(日)
ADE	20.9	98.8	10.5	135	10
ADE L242C K334C	17.5	125	8.86	180	15
ADE R292C V302C	14.3	129	7.82	156	14
ADLE	17.9	51.9	19.3	137	6
ADLE L242C K334C	14.2	127	7.89	157	14
ADLE R292C V302C	18.1	186	5.39	114	15
DE	16.7	53.5	18.7	132	6
DE L242C K334C	13.2	108	9.29	243	19
DE R292C V302C	14.2	95.9	10.5	188	13
WT	19.7	127	7.88	163	16

20

【 0 3 6 8 】

m A b 3

材料および方法：

m A b 3 A D E および A D E - D S B (R 2 9 2 C / V 3 0 2 C) バリエーションに関して、次の一般的な方法：一定分量の血漿を沈殿後、血漿ペレットを、タンパク質変性、還元、アルキル化、トリプシン消化、および固相抽出してから、サロゲートペプチドを分析した、を使用したボトムアップ LC - M S / M S アッセイにより、各時点での各抗体の濃度を決定した。各抗体の定量のために、その選択性および応答因子に応じて、 F a b 領域 (軽鎖) に属するサロゲートペプチド V Y A C E V T H Q G L S S P V T K を選択した。校正標準は、抗体を 1、 2 . 8、 7、 1 4、 4 0、 8 0 および 1 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ で血漿に添加することにより調製した。ペプチド分離は、逆相 X B r i d g e B E H C 1 8 カラム (2 . 1 x 1 5 0 mm、 3 . 5 μM 、 3 0 0、 W a t e r s 社) を用いた S h i m a d z u U H P L C システムにより、水中の 0 . 1 % ギ酸とアセトニトリル中の 0 . 1 % ギ酸との階段状勾配において 6 0 0 $\mu\text{L} / \text{分}$ の流速で行った。検出には、 S c i e x A P I 6 6 0 0 T r i p l e T O F 質量分析計を、陽イオンモードで、ソース温度 5 0 0、イオンスプレー電圧 5 5 0 0 V、カーテンガス 3 5、およびネブライザーガス 5 0 で使用した。各実験につき、滞留時間は 1 5 m s であった。デクラスタリング電位は 9 0 V であり、衝突エネルギーは 2 6 V であった。標準および対照に対する濃度定量には、 M u l t i Q u a n t ソフトウェアの M Q 4 積分アルゴリズムからのピーク面積を使用して、抗体のユニークなサロゲートペプチドの 6 2 6 . 0 m / z 親イオンの 8 0 7 . 4 0 9 8 m / z 断片を使用した。

30

40

【 0 3 6 9 】

m A b 3 D Q 抗体に関して、各時点での濃度は、段階的サンドイッチフォーマットである G y r o l a b プラットフォーム (G y r o s 社) を使用する一般的なイムノアッセイ法により決定した。サンプル (標準、品質管理、および試験サンプル) を、緩衝液中で 1 0 0 倍希釈し、 9 6 ウェルマイクロタイタープレートに分注する。捕捉試薬および検出試薬

50

は、第2の96ウェルマイクロタイタープレートに分注した。次いで、96マイクロタイタープレートおよびbioaffinity CD (CD200-112個の微細構造化セグメントを含有)を、Gyrolabプラットフォーム上にロードした。以下のステップ: Gyrolab Bioaffinity ディスク (CD200) 内のストレプトアビジンビーズカラム上へのビオチン化ロバ抗 hu-IgG (捕捉) の添加; 次いで、標準、品質管理、および試験サンプルの分配; 次いで、AlexaFluor-ヤギ抗 hu-IgG (検出) の添加は、Gyrolabプラットフォームにより自動的に誘発された。オンカラム蛍光測定 (exc 633nm、emm 650nm) は、1%に設定した光電子増倍を使用して、各微細構造化セグメントにおいて行った。すべての分析は二つ組で行い、定量の範囲は100~200,000 ng/mLであった。

10

【0370】

mAb3を用いて同様のPK試験を行った。表25および図20に示すように、mAb3上のADE変異は、mAb3-WTと比べて高いCLおよび短い消失半減期をもたらした。mAb3-ADE構築物上でのDSB (R292C/V302C) の付加は、化合物のPK特性を明らかに改善した。mAb3-WTおよびmAb3-ADE-DSB構築物は、同様のクリアランスおよび消失半減期を示した。

【0371】

【表27】

表 25: Tg32 マウスで試験した異なる mAb3 抗体の PK パラメータの要約(平均(CV%))

20

抗体	C0 (ug/mL)	AUC (日*ug/mL)	CL (mL/日/kg)	Vss (mL/kg)	t1/2z (日)
mAb3	66.8	491	5.15	99.9	14.1
mAb3-ADE	72.0 (18)	181 (15)	14.0 (17)	85.3 (18)	4.8
mAb3-ADE-DSB (R292C/V302C)	59.0 (4)	392 (8)	6.41 (9)	121 (8)	13.7

30

40

50

【 図 面 】
【 図 1 A 】

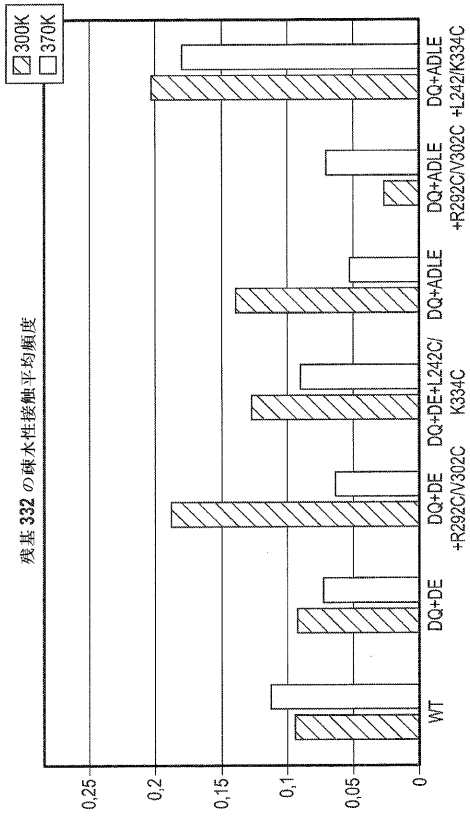


FIG. 1A

【 図 1 B 】

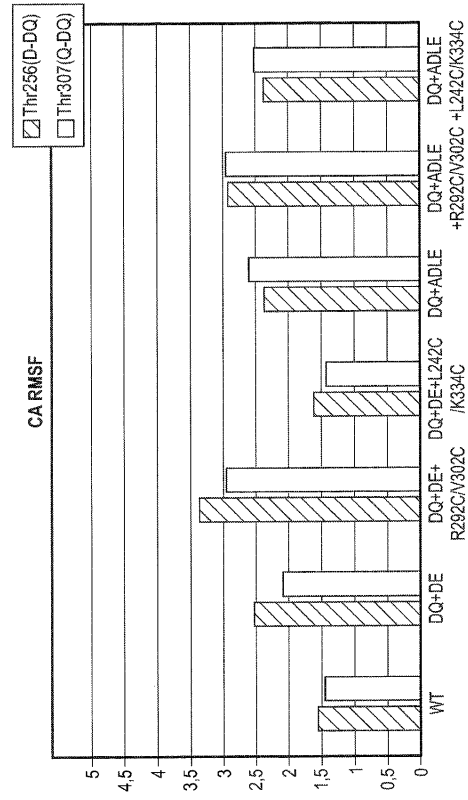


FIG. 1B

【 図 2 】

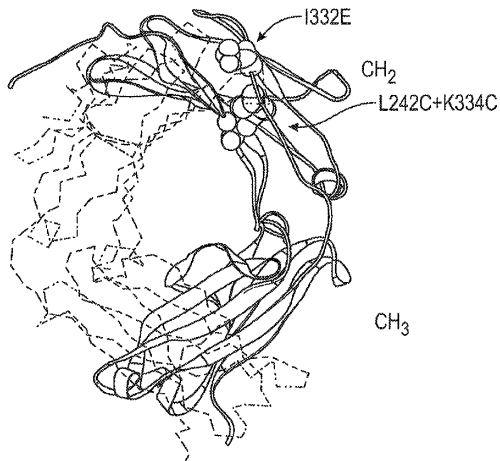


FIG. 2

【 図 3 】

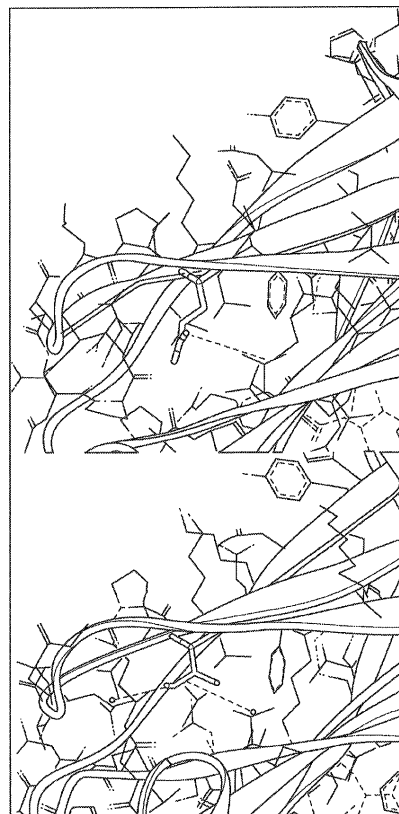


FIG. 3

10

20

30

40

50

【 図 4 】

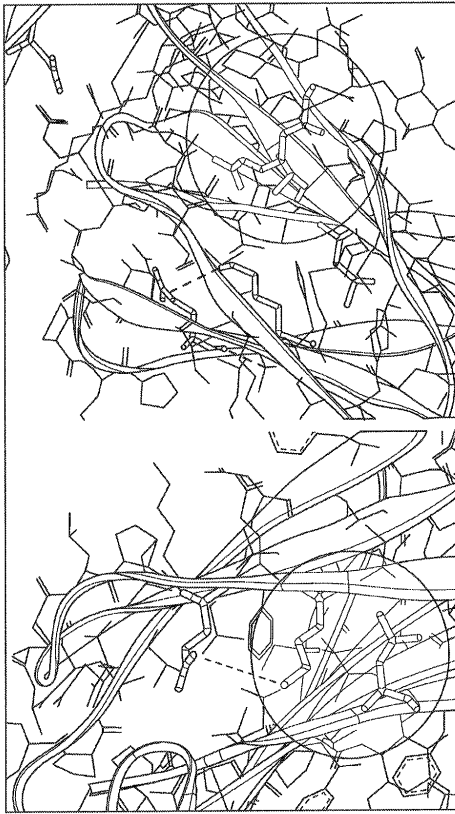


FIG. 4

【 図 5 】

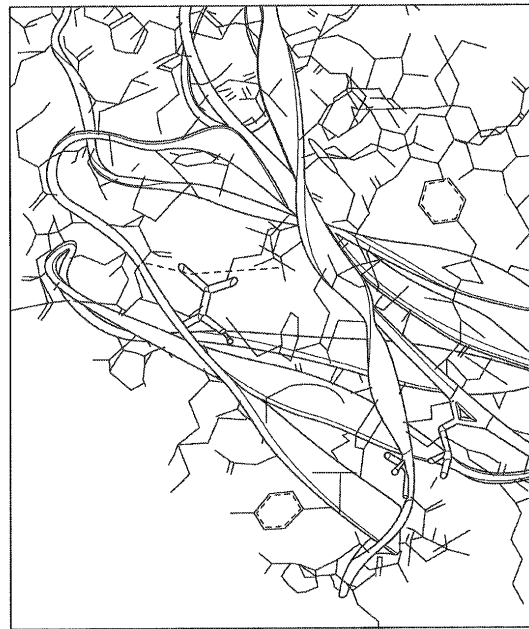


FIG. 5

10

20

【 図 6 - 1 】

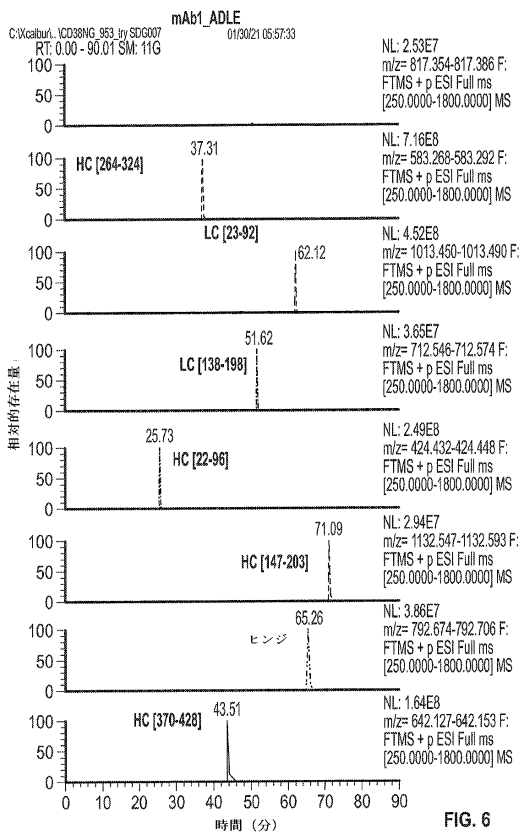


FIG. 6

【 図 6 - 2 】

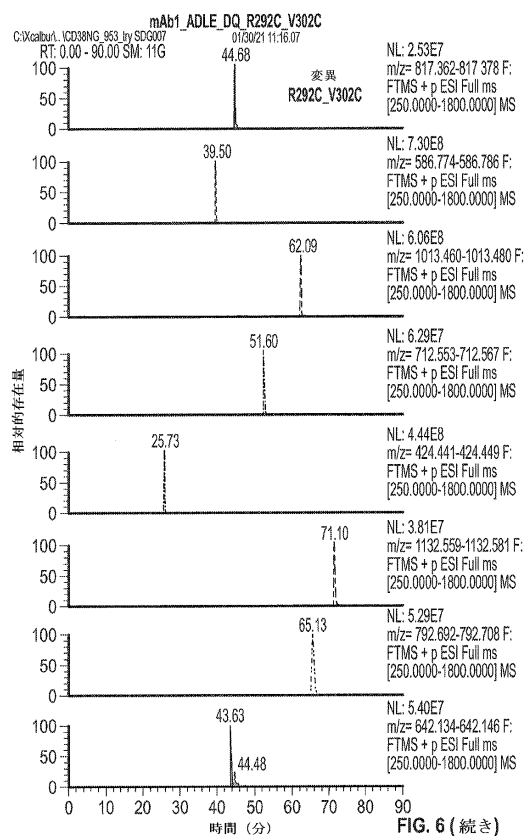


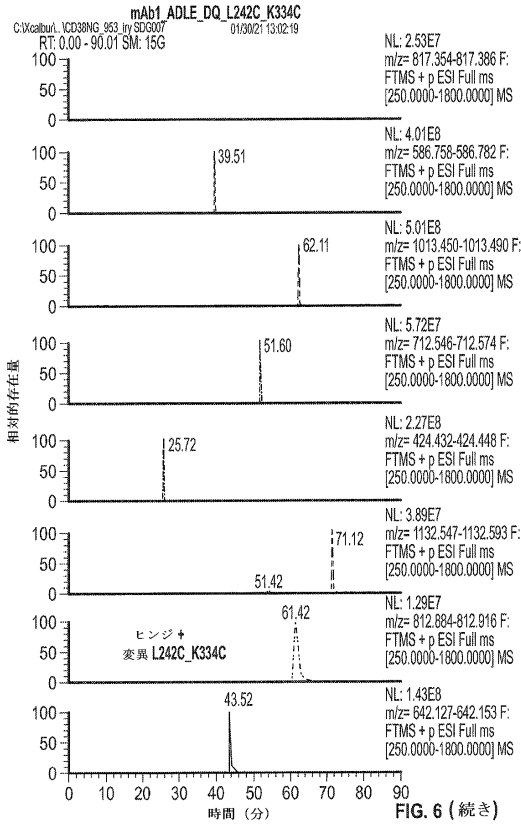
FIG. 6 (続き)

30

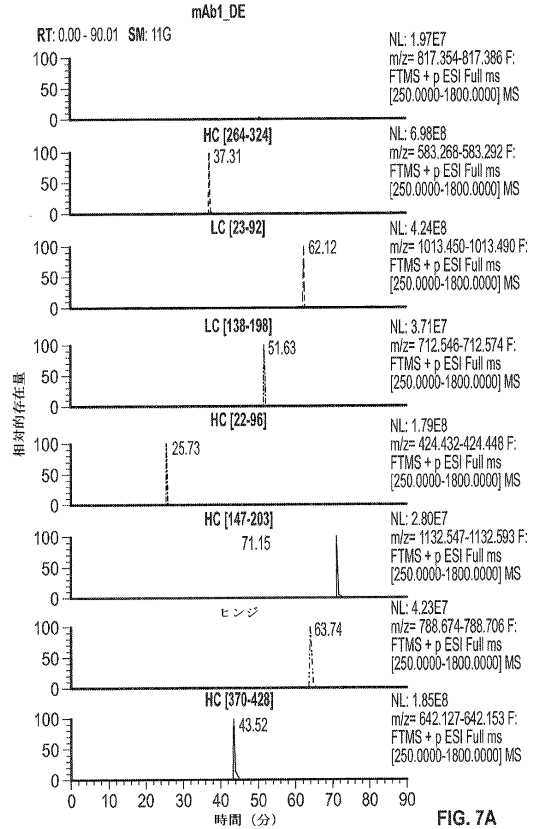
40

50

【 図 6 - 3 】



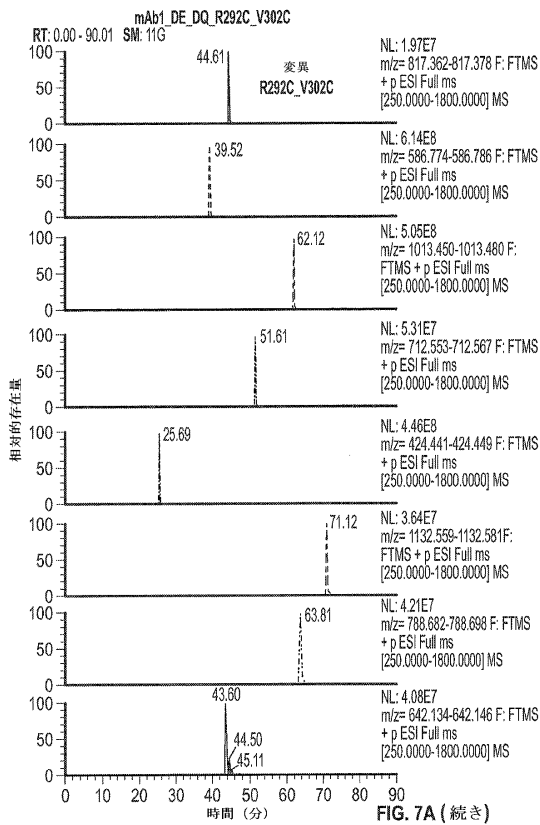
【 図 7 A - 1 】



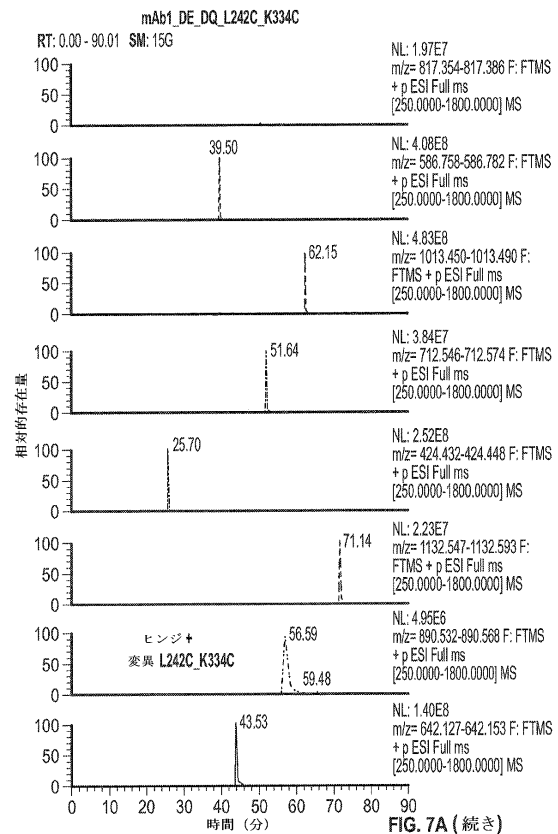
10

20

【 図 7 A - 2 】



【 図 7 A - 3 】

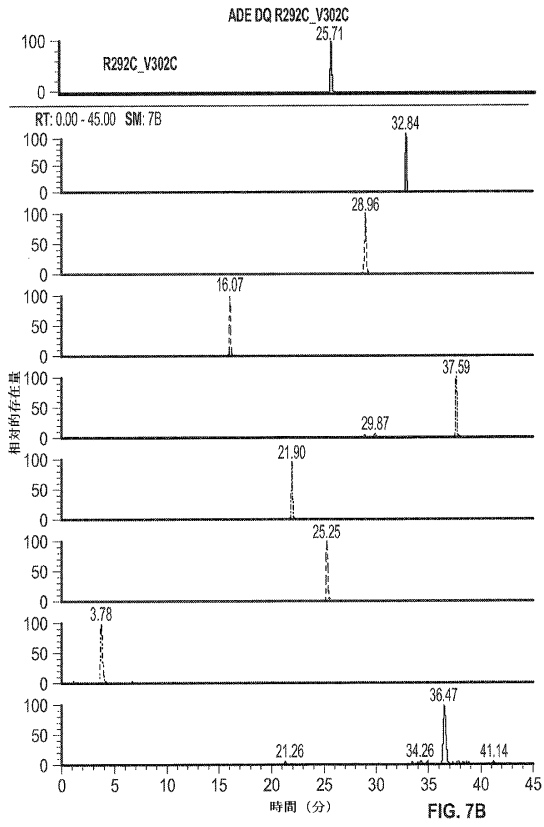


30

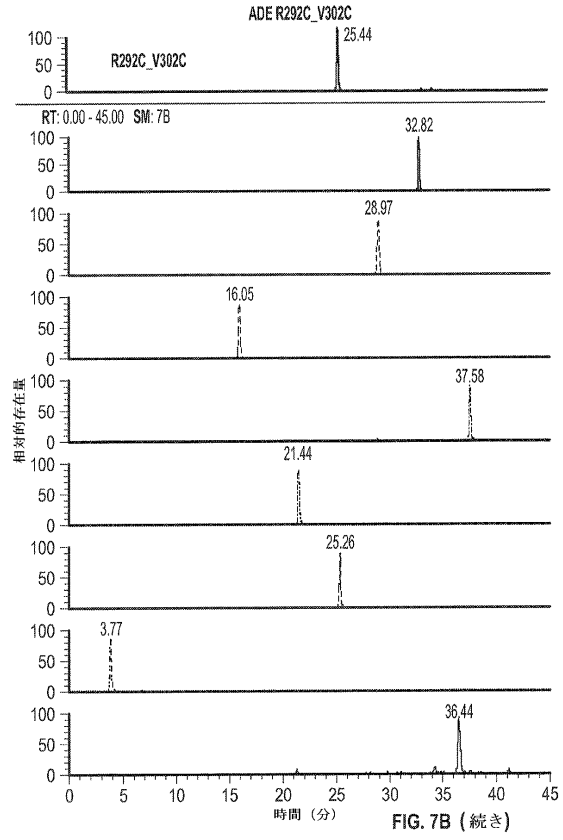
40

50

【 図 7 B - 1 】



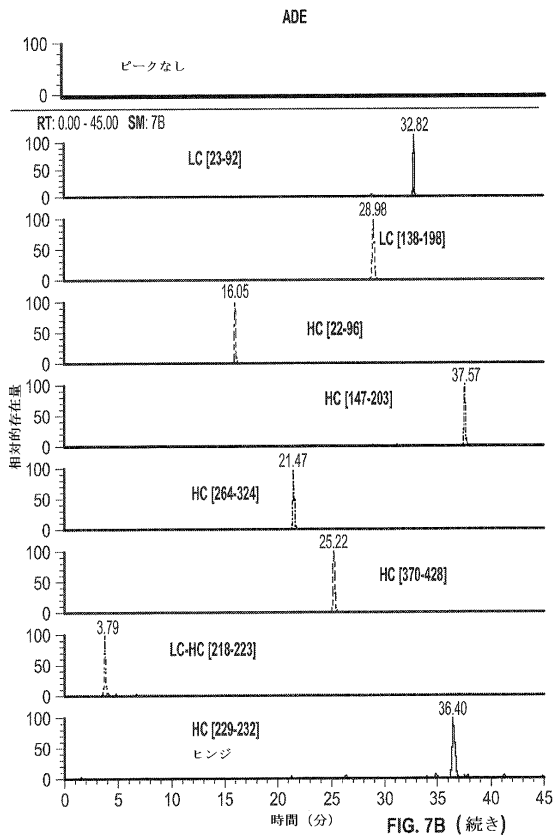
【 図 7 B - 2 】



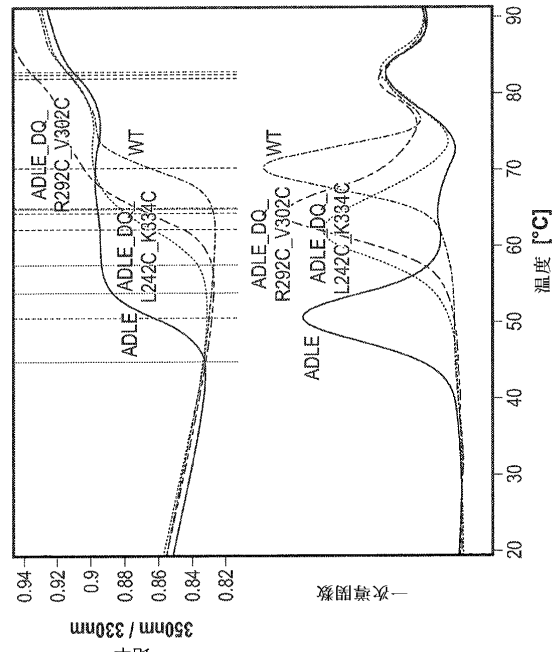
10

20

【 図 7 B - 3 】



【 図 8 】



30

40

50

【 図 9 A 】

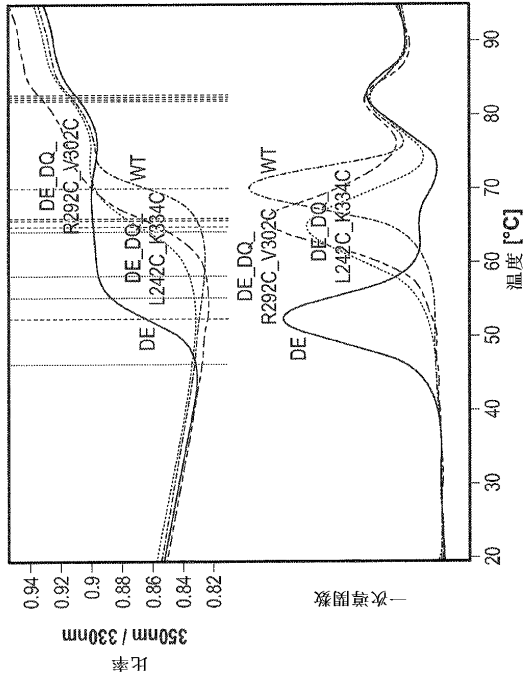


FIG. 9A

【 図 9 B 】

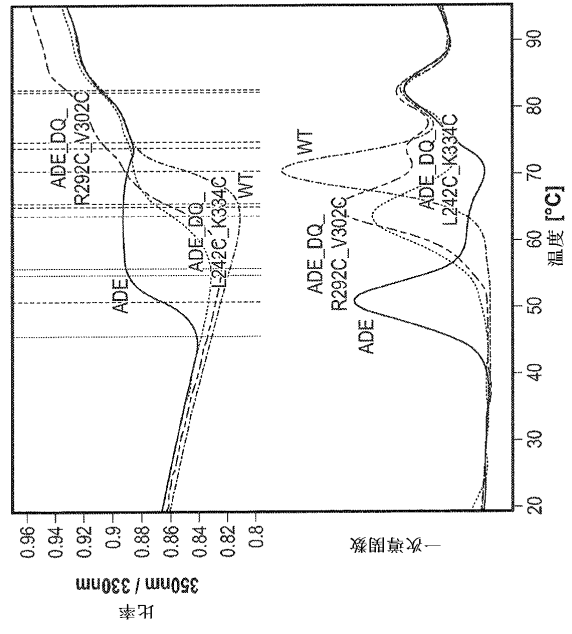


FIG. 9B

【 図 10 - 1 】

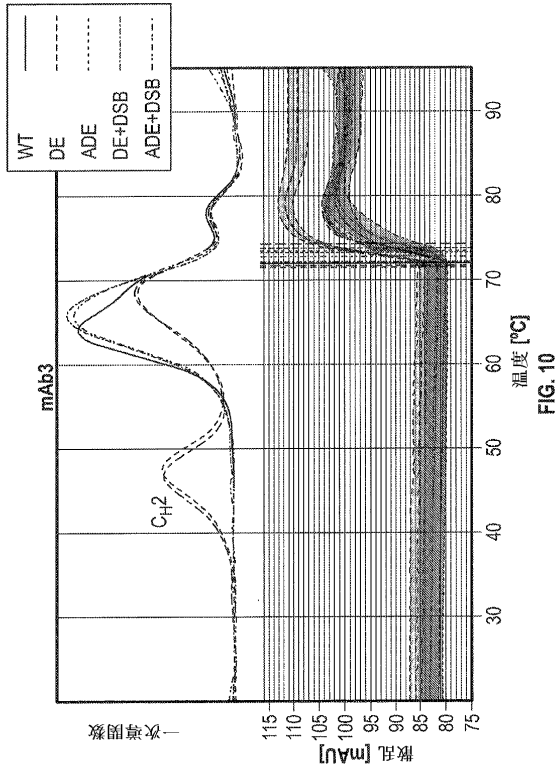


FIG. 10

【 図 10 - 2 】

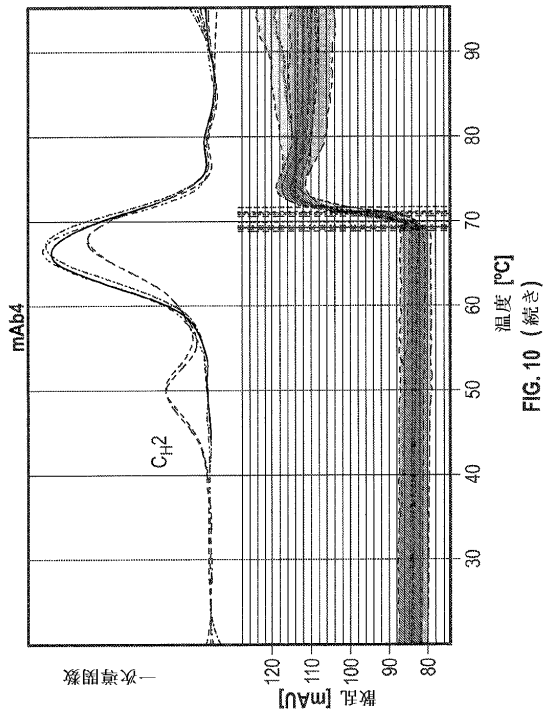


FIG. 10 (縦向き)

10

20

30

40

50

【 図 1 1 - 1 】

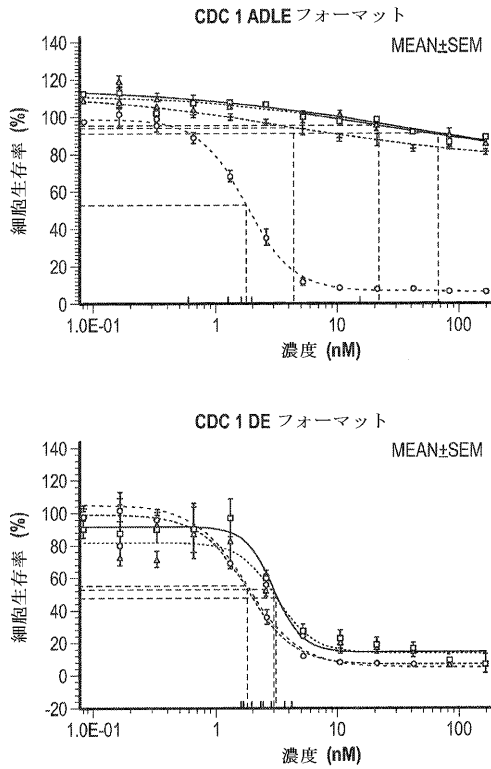
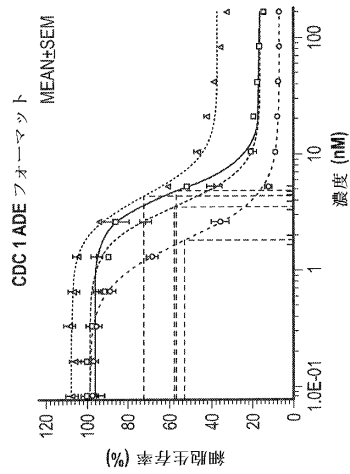


FIG. 11

【 図 1 1 - 2 】



	CDC ADLE フォーマット	CDC DE フォーマット	CDC ADE フォーマット
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-21-267-1 (IgG1 ADLE_L242C_K334C)	VA2-21-269-1 (IgG1 DE_L242C_K334C)	VA2-21-259-2 (IgG1 ADE_L242C_K334C)
+	VA2-21-268-1 (IgG1 ADLE_R292C_V302C)	VA2-21-270-1 (IgG1 DE_R292C_V302C)	VA2-21-260-1 (IgG1 ADE_R292C_V302C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

FIG. 11 (続き)

10

20

【 図 1 2 - 1 】

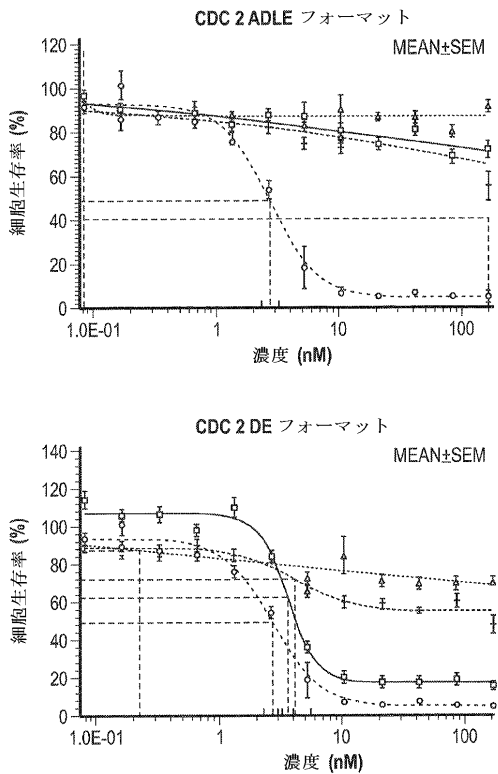
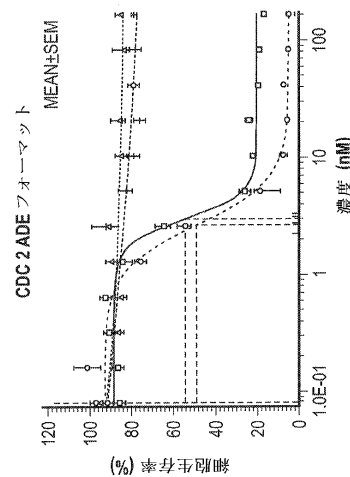


FIG. 12

【 図 1 2 - 2 】



	CDC ADLE フォーマット	CDC DE フォーマット	CDC ADE フォーマット
□	VA2-20-034.2 (IgG1 ADLE)	VA2-20-1117-1 (IgG1 DE)	VA2-19-943-1 (IgG1 ADE)
△	VA2-20-952-1 (ADLE_DQ)	VA2-20-955-1 (DE_DQ)	VA2-21-266-1 (ADE_DQ)
+	VA2-20-953-1 (ADLE_DQ_R292C_V302C)	VA2-20-956-1 (DE_DQ_R292C_V302C)	VA2-21-262-1 (ADE_DQ_R292C_V302C)
○	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)	VA2-20-950-1 (IgG1 WT)

FIG. 12 (続き)

30

40

50

【 図 1 3 - 1 】

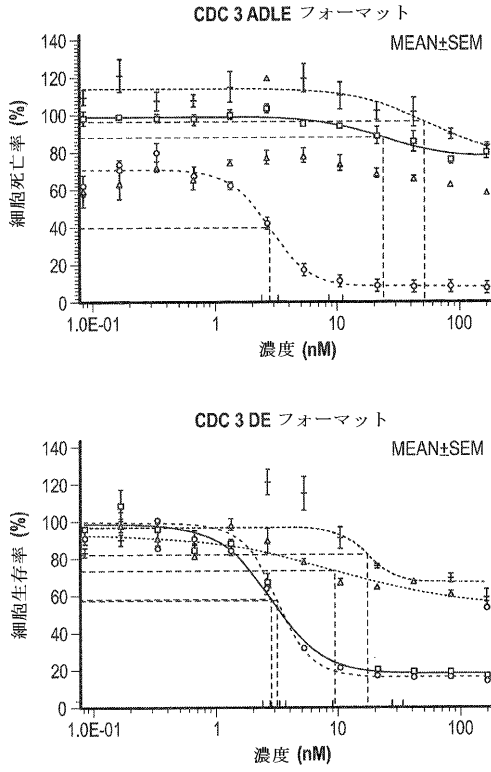


FIG. 13

【 図 1 3 - 2 】

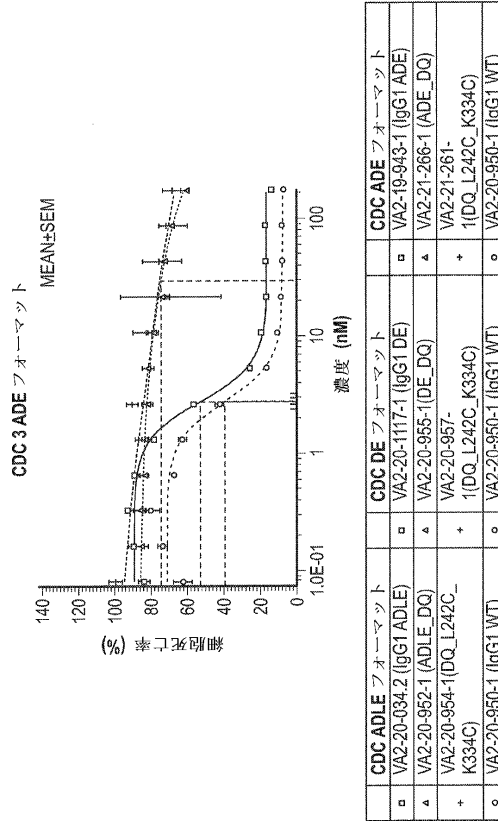


FIG. 13 (続き)

10

20

【 図 1 4 - 1 】

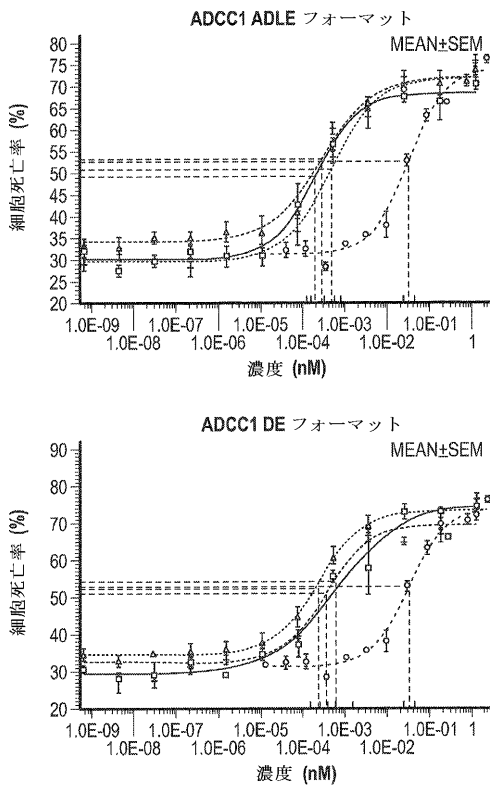


FIG. 14

【 図 1 4 - 2 】

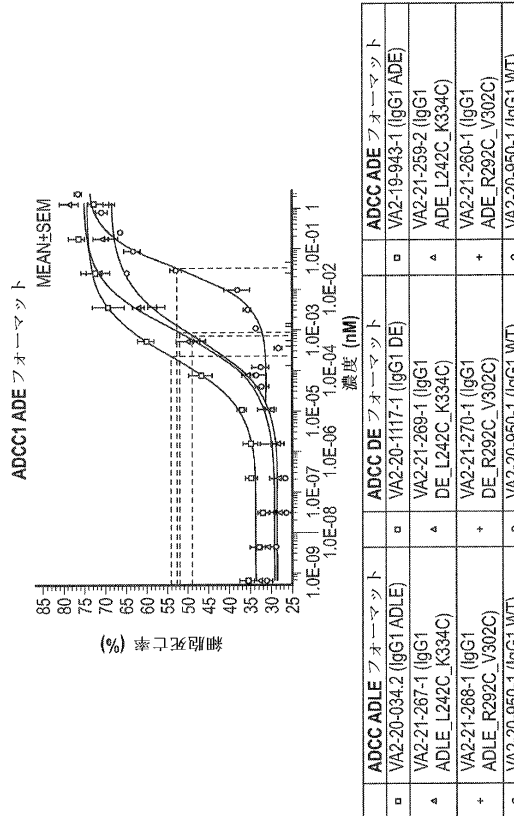


FIG. 14 (続き)

30

40

50

【 図 1 5 - 1 】

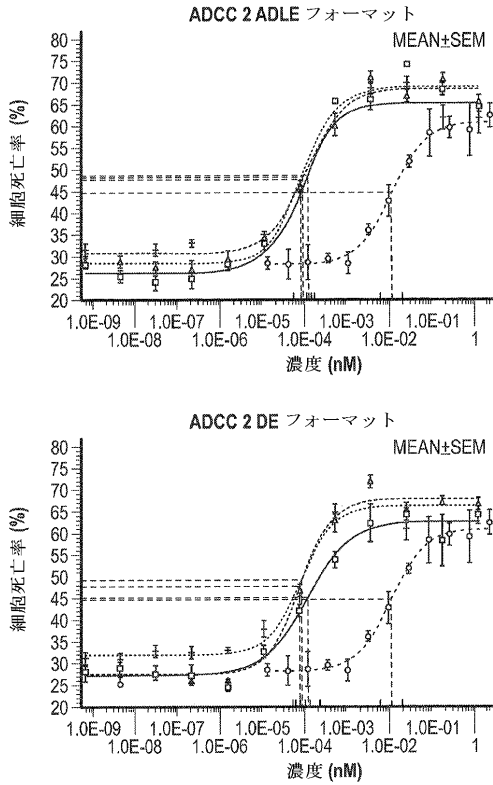


FIG. 15

【 図 1 5 - 2 】

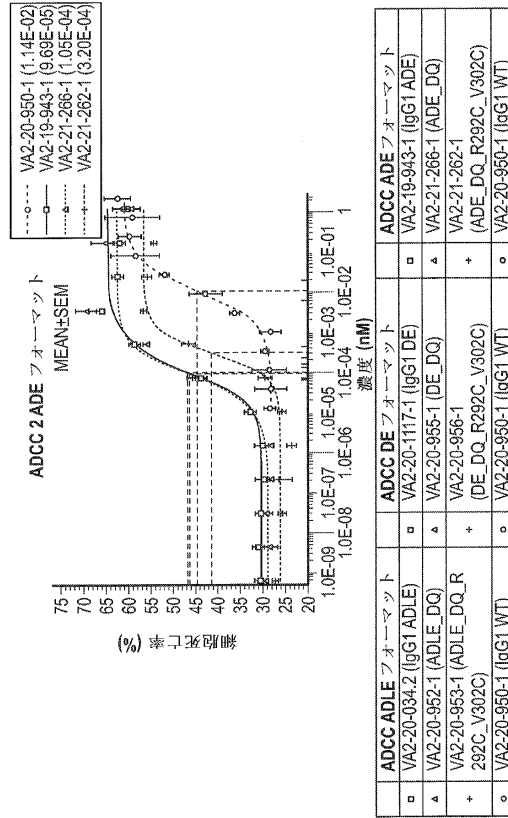


FIG. 15 (続き)

10

20

【 図 1 6 - 1 】

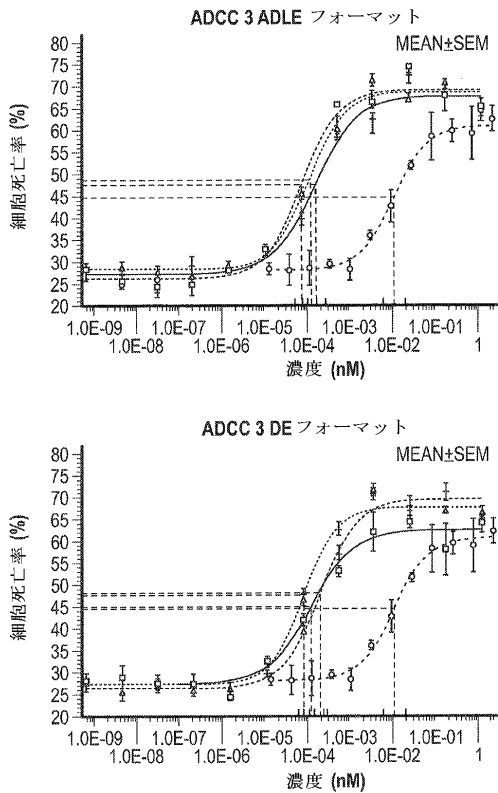


FIG. 16

【 図 1 6 - 2 】

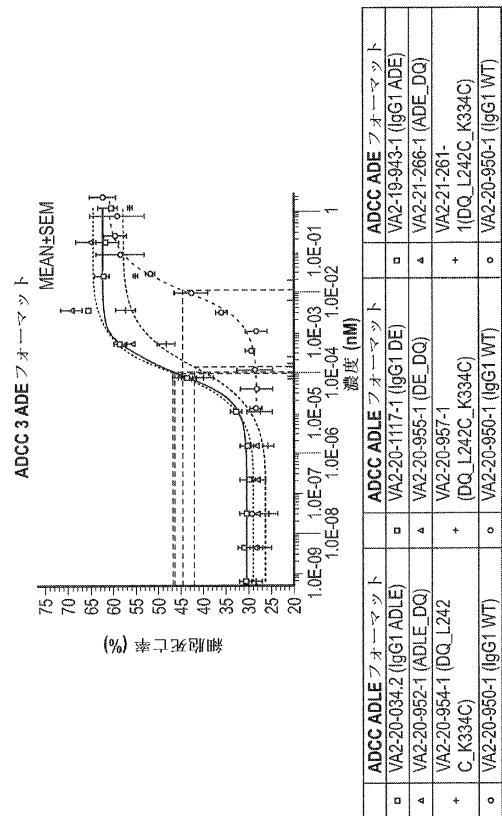


FIG. 16 (続き)

30

40

50

【 図 1 7 】

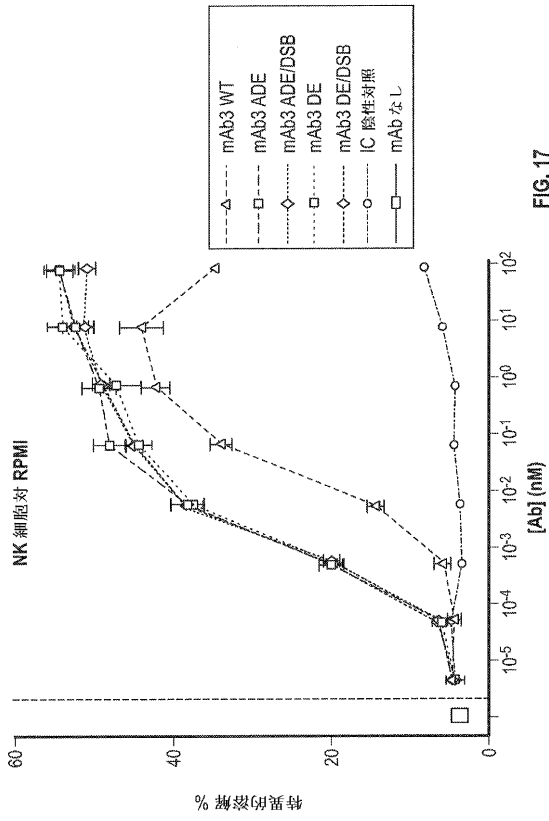


FIG. 17

【 図 1 8 - 1 】

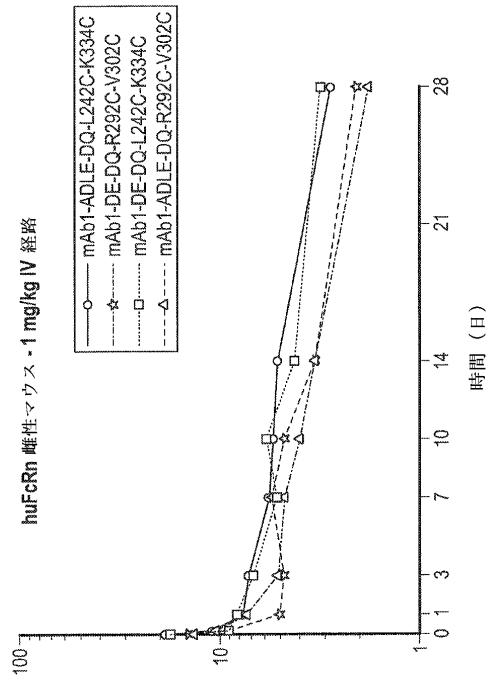


FIG. 18

10

20

【 図 1 8 - 2 】

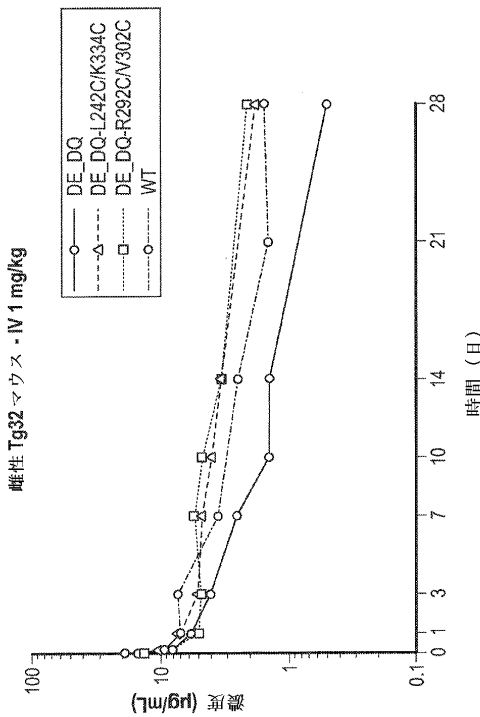


FIG. 18 (続き)

【 図 1 8 - 3 】

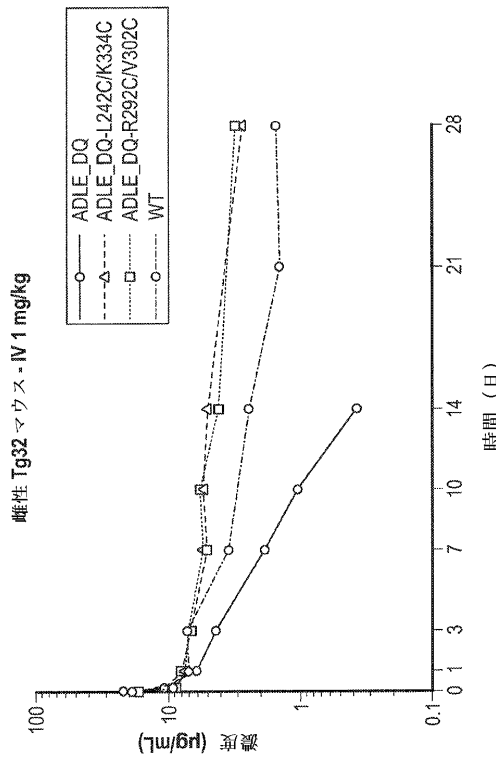


FIG. 18 (続き)

30

40

50

【 図 1 9 - 1 】

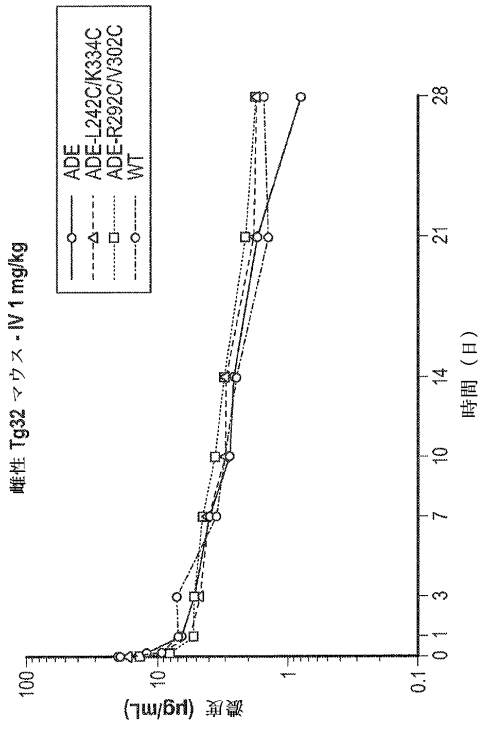


FIG. 19

【 図 1 9 - 2 】

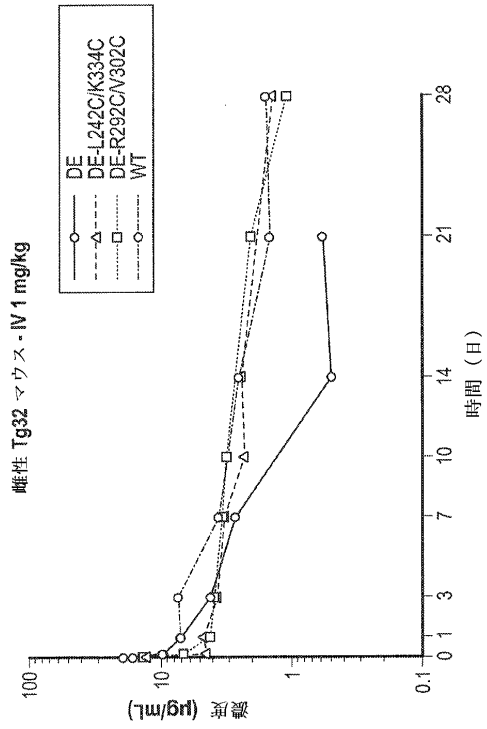


FIG. 19 (続き)

10

20

【 図 1 9 - 3 】

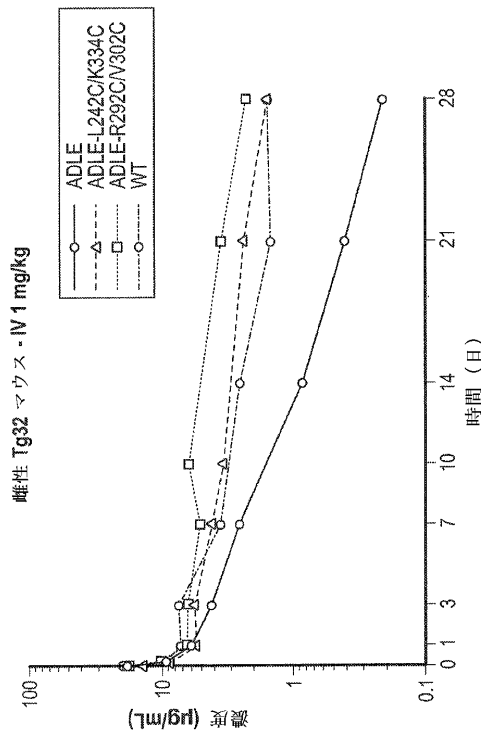


FIG. 19 (続き)

【 図 2 0 】

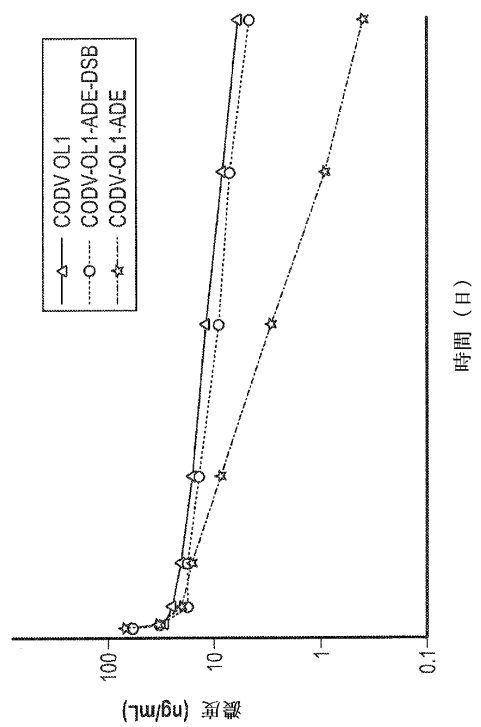


FIG. 20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2022/055019
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/00 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/185878 A1 (HUMMINGBIRD BIOSCIENCE HOLDINGS PTE LTD [SG]; CLEGG RICHARD IAN [GB]) 3 October 2019 (2019-10-03)	1-139
Y	abstract; claims 1-23; figures 11, 15-26, 33, 35-41, 46-47, 50-58, 60, 61, 63, 65; examples 3-9; compounds 1010D1F, 10D1F.FcB; sequences SEQ ID NOs: 225, 227, 228	1
	page 40, line 35 - page 50, line 11	

X	US 2017/218079 A1 (RAUM TOBIAS [DE] ET AL) 3 August 2017 (2017-08-03)	1, 32, 75, 76, 78, 82, 83, 137
	abstract; figures 1-5, 12-16, 20-22; table 38; sequence SEQ ID NO: 24	

	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 5 October 2022	Date of mailing of the international search report 20/10/2022	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schulz, Regine	

3

Form PCTISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/055019

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 2018/258178 A1 (TSUI PING [US] ET AL) 13 September 2018 (2018-09-13) abstract; table 1 page 2, paragraph [0022] - page 3, paragraph [0027] page 7, paragraph [0071] - page 8, paragraph [0072]</p> <p>-----</p>	1-139
A	<p>US 2018/208668 A1 (LAZAR GREGORY [US] ET AL) 26 July 2018 (2018-07-26) abstract; figures 1-4, 10, 33, 37, 39, 41; examples 2-12, 14, 15; tables 3-10 page 4, paragraph [0021] - page 5 page 6, paragraph [0026] - page 7, paragraph [0033] page 11, paragraph [0083] page 13, paragraph [0101] page 48, paragraph [0261] - page 50, paragraph [0270] page 52, paragraph [0277] - paragraph [0280]</p> <p>-----</p>	1-139
A	<p>S. J. PETERS ET AL: "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, no. 29, 13 July 2012 (2012-07-13), pages 24525-24533, XP055069090, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.369744 abstract; figures 1-5; tables 1-4</p> <p>-----</p>	1-139
T	<p>LABRIJN ARAN F ET AL: "Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 18, no. 8, 7 June 2019 (2019-06-07), pages 585-608, XP036850121, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/S41573-019-0028-1 [retrieved on 2019-06-07] abstract; figures 1-5; tables 1-4</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

10

20

30

40

3

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2022/055019

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHUNPENG YANG ET AL: "Engineering of Fc Fragments with Optimized Physicochemical Properties Implying Improvement of Clinical Potentials for Fc-Based Therapeutics", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 8, 8 January 2018 (2018-01-08), pages 1-14, XP055671009, DOI: 10.3389/fimmu.2017.01860 abstract; figures 1-5 page 4, right-hand column, last paragraph - page 6, right-hand column; table 1 page 8, right-hand column - page 10 -----</p>	1
T	<p>FREDERICK W. JACOBSEN ET AL: "Engineering an IgG Scaffold Lacking Effector Function with Optimized Developability", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 292, no. 5, 19 December 2016 (2016-12-19), pages 1865-1875, XP055604093, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M116.748525 abstract; figures 1-6; tables 1-6; compound SEFL2.2 page 1865, left-hand column, paragraph 4 - paragraph 10 page 1868 - page 1870; figures 7, 8 page 1873 -----</p>	20
T	<p>Estes Bram ET AL: "Next generation Fc scaffold for multispecific antibodies", iScience, 17 December 2021 (2021-12-17), pages 103447-103447, XP055932216, DOI: 10.1016/j.isci.2021.103447 Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004221014188/pdf?md5=6cd21d801ccad30cac9c9198b45d25b2&pid=1-s2.0-S2589004221014188-main.pdf [retrieved on 2022-06-16] -----</p>	30
		40

3

Form PCTISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/055019

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/055019

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 30

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.: 40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2022/055019

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-139(partially)

isolated effector-competent polypeptide comprising a glycosylated Fc domain comprising a first heavy chain and a second heavy chain, wherein at least one heavy chain comprises an engineered intrachain disulfide bond mediated by a pair of cysteines (C) that substitute for: (i) a leucine (L) at amino acid position 242 and a lysine (K) at amino acid position 334; ... wherein the glycosylated Fc domain is capable of interacting with an antibody effector molecule; and wherein the effector-competent polypeptide has enhanced thermal stability compared to an effector-competent polypeptide having a glycosylated Fc domain capable of interacting with an antibody effector molecule that does not comprise the engineered intrachain disulfide bond, as well as derived products and (medical uses thereof);

2. claims: 1-139(partially)

isolated effector-competent polypeptide comprising a glycosylated Fc domain comprising a first heavy chain and a second heavy chain, wherein at least one heavy chain comprises an engineered intrachain disulfide bond mediated by a pair of cysteines (C) that substitute for: . . . (iii) an arginine (R) at amino acid position 292 and a valine (V) at amino acid position 302; ... wherein the glycosylated Fc domain is capable of interacting with an antibody effector molecule; and wherein the effector-competent polypeptide has enhanced thermal stability compared to an effector-competent polypeptide having a glycosylated Fc domain capable of interacting with an antibody effector molecule that does not comprise the engineered intrachain disulfide bond, as well as derived products and (medical uses thereof).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/055019

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019185878	A1	03-10-2019	AU 2019240905	A1 19-11-2020
			CA 3094758	A1 03-10-2019
			CN 112513095	A 16-03-2021
			CN 114751983	A 15-07-2022
			DK 3645571	T3 22-02-2021
			EP 3645571	A1 06-05-2020
			EP 3851458	A1 21-07-2021
			ES 2864700	T3 14-10-2021
			JP 7118331	B2 16-08-2022
			JP 2021510535	A 30-04-2021
			JP 2022118731	A 15-08-2022
			KR 20200139725	A 14-12-2020
			PL 3645571	T3 05-07-2021
			PT 3645571	T 24-03-2021
			SG 11202009361P	A 29-10-2020
			TW 201942136	A 01-11-2019
			US 10662241	B1 26-05-2020
			US 2019300624	A1 03-10-2019
			US 2020308275	A1 01-10-2020
			US 2021024651	A1 28-01-2021
			WO 2019185164	A1 03-10-2019
			WO 2019185878	A1 03-10-2019
			US 2017218079	A1
AU 2017216237	A1 09-08-2018			
BR 112018015415	A2 18-12-2018			
CA 3011942	A1 10-08-2017			
CL 2018002063	A1 23-11-2018			
CN 109311979	A 05-02-2019			
CN 114716557	A 08-07-2022			
CO 2018008722	A2 31-08-2018			
CR 20180418	A 15-01-2019			
EA 201891753	A1 31-01-2019			
EP 3411404	A1 12-12-2018			
HK 1257749	A1 25-10-2019			
IL 260920	A 20-09-2018			
JP 6954744	B2 27-10-2021			
JP 2017184723	A 12-10-2017			
JP 2022020636	A 01-02-2022			
KR 20180101623	A 12-09-2018			
MA 43959	A 12-12-2018			
PH 12018501558	A1 20-05-2019			
SG 10202007331W	A 29-09-2020			
SG 11201806150R	A 30-08-2018			
TN 2018000266	A1 16-01-2020			
TW 201730215	A 01-09-2017			
US 2017218079	A1 03-08-2017			
US 2021070878	A1 11-03-2021			
UY 37105	A 29-09-2017			
WO 2017134158	A1 10-08-2017			
US 2018258178	A1	13-09-2018	AU 2013256802	A1 11-12-2014
			AU 2018201534	A1 22-03-2018
			CA 2871934	A1 07-11-2013
			EP 2844289	A1 11-03-2015
			ES 2746103	T3 04-03-2020
			JP 6391564	B2 19-09-2018
			JP 2015523320	A 13-08-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/055019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2018184399 A	22-11-2018
		US 2015125444 A1	07-05-2015
		US 2018258178 A1	13-09-2018
		WO 2013165690 A1	07-11-2013

US 2018208668 A1	26-07-2018	US 2008051563 A1	28-02-2008
		US 2008057056 A1	06-03-2008
		US 2008154025 A1	26-06-2008
		US 2008161541 A1	03-07-2008
		US 2009010920 A1	08-01-2009
		US 2009215991 A1	27-08-2009
		US 2011021755 A1	27-01-2011
		US 2013261289 A1	03-10-2013
		US 2013273043 A1	17-10-2013
		US 2014073768 A1	13-03-2014
		US 2015010543 A1	08-01-2015
		US 2015030592 A1	29-01-2015
		US 2015031862 A1	29-01-2015
		US 2015232567 A1	20-08-2015
		US 2018208668 A1	26-07-2018
		US 2019071512 A1	07-03-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/071(2010.01)	C 1 2 N 5/071	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
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 1 1
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395(2006.01)	A 6 1 K 39/395	A
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 39/395	U
	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 K 47/68	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,
LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,
RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,Z
A,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 . T R I T O N

ベア・ハー

(72)発明者 ベアトリス・カメロン

フランス国 7 5 0 1 7 パリ . アヴェニュー・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ 4 6 . サノフィ . パテント
・デパートメント

(72)発明者 インゴ・フォッケン

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン . サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ベア・ハー

(72)発明者 サーガル・カトゥリア

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 1 . ケンブリッジ . ウォーター・ストリート 4 5 0 .
サノフィ . パテント・デパートメント

(72)発明者 クリティアン・ランゲ

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン . サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ベア・ハー

(72)発明者 アレッサンドロ・マーシエロ

フランス国 7 5 0 1 7 パリ . アヴェニュー・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ 4 6 . サノフィ . パテント
・デパートメント

(72)発明者 サングヘー・パーク

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 1 . ケンブリッジ . ウォーター・ストリート 4 5 0 .

サノフィ・パテント・デパートメント

(72)発明者 ボードー・ティルマン

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ベー・ハー

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA05 DA08
4B065 AA01X AA90X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C076 AA95 CC03 CC04 EE41 EE59 FF70
4C084 AA02 AA13 AA14 BA01 CA53 DA53 DC01 NA05 NA13 NA14
ZB011 ZB012 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 AA33 AA34 BB41 BB42 CC22 CC23 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 BA53 DA76 EA20 EA22 EA28 FA74