

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4336498号
(P4336498)

(45) 発行日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月3日(2009.7.3)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	16/18 (2006.01)	C O 7 K	16/18
C O 7 K	16/46 (2006.01)	C O 7 K	16/46
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 26 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-561487 (P2002-561487)
(86) (22) 出願日	平成13年12月12日(2001.12.12)
(65) 公表番号	特表2005-501514 (P2005-501514A)
(43) 公表日	平成17年1月20日(2005.1.20)
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/048432
(87) 国際公開番号	W02002/060919
(87) 国際公開日	平成14年8月8日(2002.8.8)
審査請求日	平成16年12月10日(2004.12.10)
(31) 優先権主張番号	60/254,884
(32) 優先日	平成12年12月12日(2000.12.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/289,760
(32) 優先日	平成13年5月9日(2001.5.9)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	504333972 メディミュン, エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミュン ウェイ
(73) 特許権者	302014206 ザ ボード オブ レジェンツ-ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム アメリカ合衆国 78701 テキサス州 オースティン, ウェスト 7ティ-エイチ ストリート 201
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 延長した半減期を有する分子ならびにその組成物および用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型ヒトIgG定常ドメインに対して、KabatのEU番号付けに基づくアミノ酸残基252、254および256での置換を含む、ヒトIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントを含んでなる修飾されたIgGであって、該修飾IgGが、野生型ヒトIgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して増加した半減期を有し、前記アミノ酸残基252での置換がチロシンによる置換であり、前記アミノ酸残基254での置換がトレオニンでの置換であり、かつ前記アミノ酸残基256での置換がグルタミン酸での置換である、上記修飾IgG。

【請求項 2】

野生型ヒトIgG定常ドメインに対して、アミノ酸残基251、253、255、285-290、308-314、385-389または428-436のうち1以上での1以上のアミノ酸置換をさらに含む、請求項1に記載の修飾IgG。

【請求項 3】

野生型ヒトIgG定常ドメインに対して、アミノ酸残基309、311、314、428、433、434または436のうち1以上での1以上のアミノ酸置換をさらに含む、請求項1に記載の修飾IgG。

【請求項 4】

アミノ酸残基385、386、387および389のうち1以上での1以上のアミノ酸置換をさらに含む、請求項1または3に記載の修飾IgG。

【請求項 5】

アミノ酸残基309でのアミノ酸置換がプロリンによる置換であり、アミノ酸残基311での

10

20

アミノ酸置換がセリン、グルタミン酸またはロイシンによる置換であり、アミノ酸残基433でのアミノ酸置換がリシン、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリンまたはグルタミンによる置換であり、かつアミノ酸残基434でのアミノ酸置換がヒスチジン、フェニルアラニンまたはチロシンによる置換である、請求項2または3に記載の修飾IgG。

【請求項6】

アミノ酸残基433でのアミノ酸置換がリシンによる置換であり、アミノ酸残基434でのアミノ酸置換がフェニルアラニンによる置換であり、かつアミノ酸残基436でのアミノ酸置換がヒスチジン、アスパラギン、アルギニン、トレオニン、リシンまたはメチオニンによる置換である、請求項2または3に記載の修飾IgG。

【請求項7】

アミノ酸残基385でのアミノ酸置換がアルギニン、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、ヒスチジン、リシンまたはアラニンによる置換であり、アミノ酸残基386でのアミノ酸置換がトレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リシン、アルギニン、イソロイシンまたはメチオニンによる置換であり、アミノ酸残基387でのアミノ酸置換がアルギニン、ヒスチジン、セリン、トレオニンまたはアラニンによる置換であり、かつアミノ酸残基389でのアミノ酸置換がプロリンまたはセリンによる置換である、請求項4に記載の修飾IgG。

【請求項8】

アミノ酸残基428でのアミノ酸置換が、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはセリンによる置換である、請求項2または3に記載の修飾IgG。

【請求項9】

アミノ酸残基314でのアミノ酸置換がアラニンによる置換である、請求項2または3に記載の修飾IgG。

【請求項10】

アミノ酸残基251でのアミノ酸置換がロイシンまたはアルギニンによる置換であり、アミノ酸残基255でのアミノ酸置換がロイシン、グリシンまたはイソロイシンによる置換であり、アミノ酸残基308でのアミノ酸置換がトレオニンまたはイソロイシンによる置換であり、アミノ酸残基309でのアミノ酸置換がプロリンによる置換であり、アミノ酸残基311でのアミノ酸置換がセリン、グルタミン酸またはロイシンによる置換であり、アミノ酸残基312でのアミノ酸置換がアラニンによる置換であり、アミノ酸残基314でのアミノ酸置換がアラニンによる置換であり、アミノ酸残基385でのアミノ酸置換がアルギニン、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、ヒスチジン、リシンまたはアラニンによる置換であり、アミノ酸残基386でのアミノ酸置換がトレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リシン、アルギニン、イソロイシンまたはメチオニンによる置換であり、アミノ酸残基387でのアミノ酸置換がアルギニン、ヒスチジン、セリン、トレオニンまたはアラニンによる置換であり、アミノ酸残基389でのアミノ酸置換がプロリンまたはセリンによる置換であり、アミノ酸残基428でのアミノ酸置換がトレオニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはセリンによる置換であり、アミノ酸残基433でのアミノ酸置換がリシン、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリンまたはグルタミンによる置換であり、アミノ酸残基434でのアミノ酸置換がフェニルアラニン、チロシンまたはヒスチジンによる置換であり、かつアミノ酸残基436でのアミノ酸置換が、ヒスチジン、アスパラギン、アルギニン、トレオニン、リシンまたはメチオニンによる置換である、請求項2に記載の修飾IgG。

【請求項11】

前記修飾ヒトIgG定常ドメインまたはFcRn結合性フラグメントが、FcRnに対して、野生型ヒトIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントよりも高い親和性を有する、請求項1～10のいずれか1項に記載の修飾IgG。

【請求項12】

前記修飾ヒトIgG定常ドメインまたはFcRn結合性フラグメントが、FcRnに対して、pH 6.0においてpH 7.4におけるよりも高い親和性を有する、請求項11に記載の修飾IgG。

【請求項13】

10

20

30

40

50

ヒトIgGまたはヒト化IgGである、請求項1に記載の修飾IgG。

【請求項14】

前記ヒトIgG定常ドメインまたはFcRn結合性フラグメントが、IgG₁、IgG₂、IgG₃もしくはIgG₄定常ドメイン、またはそのFcRn結合性フラグメントである、請求項1～12のいずれか1項に記載の修飾IgG。

【請求項15】

前記ヒトIgG定常ドメインまたはFcRn結合性フラグメントが、IgG₁定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントである、請求項1～12のいずれか1項に記載の修飾IgG。

【請求項16】

前記ヒトIgGがIgG₁、IgG₂、IgG₃またはIgG₄である、請求項13に記載の修飾IgG。

10

【請求項17】

容器に入れられた請求項1～16のいずれか1項に記載の修飾IgGと使用説明書とを含んでなるキット。

【請求項18】

請求項1～16のいずれか1項に記載の修飾IgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸。

【請求項19】

請求項18に記載の核酸を含んでなる宿主細胞。

【請求項20】

被験者での疾患もしくは障害を予防または治療するための医薬の製造における、請求項1～16のいずれか1項に記載の修飾IgGの使用。

20

【請求項21】

被験者がヒトである、請求項20に記載の使用。

【請求項22】

*in vitro*で疾患または障害を検出するための方法であって、(a) 請求項1～16のいずれか1項に記載の修飾IgGを被験者由来のサンプルと接触させ、(b) 該修飾IgGと免疫特異的に結合する抗原のレベルを対照のレベルと比較し、該サンプル中の抗原のレベルが対照のレベルと比較して増加していれば疾患または障害を示すこととなることを含んでなる、上記方法。

【請求項23】

30

疾患または障害を診断するための医薬の製造における、請求項1～16のいずれか1項に記載の修飾IgGの使用であって、該医薬は、(a) 該医薬を被験者に投与し、(b) 投与後に該修飾IgGが免疫特異的に結合する抗原が発現されている被験者体内の部位へ該修飾IgGが優先的に濃縮されるまでの時間を待ち、(c) バックグラウンドレベルを測定し、(d) 被験者体内の該修飾IgGを検出して、バックグラウンドレベルを超える該修飾IgGが検出されれば、該被験者が疾患または障害を有していることが示されることを含んでなる方法において用いるためのものである、上記使用。

【請求項24】

前記修飾IgGが標識された形態の修飾IgGである、請求項23に記載の使用。

【請求項25】

40

被験者がヒトである、請求項23に記載の使用。

【請求項26】

請求項1～16のいずれか1項に記載の修飾IgGの製造方法であって、(a) 該修飾IgGをコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されたプロモーターを含んでなるベクターを宿主細胞に導入するステップ；および(b) 該宿主細胞を培養して該修飾IgGを産生させるステップを含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 緒言

50

本発明は、IgG定常ドメインまたはそのFcRn (Fc Receptor-neonate) 結合性ドメインの修飾により *in vivo* 半減期が増加した分子に関する。より詳しくは、これらの分子は、FcRn に対する該定常ドメインまたはそのフラグメント (断片) の親和性を増加させるアミノ酸修飾を有する。本発明を用いた治療用および診断用のIgGおよび他の生物活性分子の半減期の増加は、例えばワクチン、受動免疫療法ならびに他の治療および予防方法におけるこれらの分子の投与量および/または投与頻度の減少を含む多数の利点を有する。本発明は更に、これらのアミノ酸修飾の1以上を有するIgG定常ドメインの全部または一部 (FcRn 結合性部分) と、そのような修飾IgG定常ドメインに結合した非IgGタンパク質または非タンパク質分子とを含有する融合タンパク質に関する。ここで、修飾IgG定常ドメインの存在は非IgGタンパク質または分子の *in vivo* 半減期を増加させる。

10

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

治療剤としての免疫グロブリンの使用は近年劇的に増加しており、医学的治療の種々の領域に拡張されている。そのような使用は、無 グロブリン血症および低 グロブリン血症の治療、自己免疫疾患および移植片対宿主病を治療するための免疫抑制剤としての使用、リンパ性悪性疾患の治療、ならびに種々の全身性および感染性疾患を治療するための受動免疫療法を包含する。免疫グロブリンは、例えば診断イメージング法における *in vivo* 診断ツールとしても有用である。

【0003】

20

これらの療法における1つの重要な問題は、循環中の免疫グロブリンの持続性である。免疫グロブリンの消失速度は免疫グロブリンの投与量および投与頻度に直接的に影響を及ぼす。投与量および投与頻度の増加は患者に悪影響を及ぼすことがあり、医療コストを増加させうる。

【0004】

IgGは、ヒトおよび他の哺乳動物における最も一般的な免疫グロブリンクラスであり、種々のタイプの免疫療法および診断方法において利用される。循環中のIgGの異化のメカニズムは、胎盤もしくは卵黄嚢を介した又はげっ歯類における初乳を介した (IgGのトランスサイトーシスによる母児移行) 母親から胎児/新生児への受動免疫の移行に関連した研究により解明されている (Brambell, *Lancet*, ii: 1087-1093, 1966; Rodewald, *J. Cell Biol.*, 71: 666-670, 1976; Morrisら, *In: Antigen Absorption by the Gut*, pp. 3-22, 1978, University Park Press, Baltimore; Jonesら, *J. Clin. Invest.*, 51: 2916-2927, 1972)。

30

【0005】

母親IgGの母児移行における或る受容体の関与が、Brambellのグループにより、新生児ラットにおける摂取乳からの母親抗体の腸吸収に関する彼らの研究において最初に示唆された (Halliday, *Proc. R. Soc. B.*, 143: 408-413, 1955; Halliday, *Proc. R. Soc. B.*, 144: 427-430, 1955; Halliday, *Proc. R. Soc. B.*, 148: 92-103, 1957; Morris, *Proc. R. Soc. B.*, 148: 84-91, 1957; Brambellら, *Proc. R. Soc. B.*, 149: 1-11, 1958; Morris, *Proc. R. Soc. B.*, 160: 276-292, 1964)。Brambellらは、異種IgGが特定の抗体の移行を妨げたという観察に基づき、種々の生物種からのIgG分子が、共通受容体に結合するのに十分な程度に類似した構造または配列を有しうることを示唆した (Brambellら, *Proc. R. Soc. B.*, 149: 1-11, 1958)。

40

【0006】

この移行メカニズムには高親和性Fc受容体FcRnが関与している。FcRn受容体は乳飲みラットの十二指腸上皮刷子縁から単離されており (Rodewaldら, *J. Cell Biol.*, 99: 154s-164s, 1984; Simisterら, *Eur. J. Immunol.*, 15: 733-738, 1985)、対応する遺伝子がクローニングされている (Simisterら, *Nature*, 337: 184, 1989およびCold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., LIV, 571-580, 1989)。後にマウス (Ahouseら, *J. Immunol.*, 151: 6076-6088, 1993) およびヒト (Storyら, *J. Exp. Med.*, 180: 2377-2381, 1994) からFc

50

Rnコード化遺伝子がクローニングされ、これにより、ラットFcRnに対するこれらの配列の高い相同性が示された。このことは、FcRnが関与するIgGの母児移行のメカニズムが、これらの生物種において類似していることを示唆している。

【 0 0 0 7 】

一方、IgG異化のメカニズムもBrambellのグループにより提示されている (Brambellら, Nature, 203: 1352-1355,1964; Brambell, Lancet, ii : 1087-1093,1966)。飽和しうる或る細胞受容体が循環中のIgG分子の一部に結合し、それにより該IgGは分解から防御され最終的に循環中にリサイクルされ、一方、該受容体が結合していないIgGは分解される、と彼らは提示した。その提示されたメカニズムは、高 グロブリン血症または低 グロブリン血症の患者において観察されるIgG異化と符合した。さらに、彼の研究および他の研究者の研究 (例えば、Spiegelbergら, J. Exp. Med., 121: 323-338,1965; Edelmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 78-85,1969) に基づき、Brambellはまた、IgGの母児移行に関与するメカニズムとIgGの異化に関与するメカニズムとが同じであるか又は少なくとも非常に密接に関連している可能性があることを示唆した (Brambell, Lancet, ii : 1087-1093,1966)。実際のところ、後になって、Fc-ヒンジフラグメント中の突然変異が異化、母児移行、新生児トランスサイトーシス、そして特にFcRnへの結合における付随的变化を引きこすことが報告された (Ghetieら, Immunology Today, 18 (12): 592-598,1997)。

【 0 0 0 8 】

これらの観察は、IgG定常ドメインの一部が、FcRnとの相互作用により血清中のIgG分解の速度を含むIgG代謝を制御することを示唆した。実際のところ、FcRnへの結合親和性の増加は該分子の血清半減期を増加させた (Kimら, Eur. J. Immunol., 24: 2429-2434,1994; Popovら, Mol. Immunol., 33: 493-502,1996; Ghetieら, Eur. J. Immunol., 26: 690-696,1996; Junghansら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 5512-5516,1996; Israelら, Immunol., 89:573-578,1996)。

【 0 0 0 9 】

マウスIgGのFc領域における種々の部位特異的突然変異誘発実験は、IgGとFcRnとの相互作用に関与する或る重要なアミノ酸残基の同定をもたらした (Kimら, Eur. J. Immunol., 24: 2429-2434,1994; Medesanら, Eur. J. Immunol., 26: 2533,1996; Medesanら, J. Immunol., 158: 2211- 2217,1997)。これらの研究および配列比較研究は、253位のイソロイシン、310位のヒスチジンおよび435位のヒスチジン (Kabatの番号付けに基づく: Kabatら, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)) がヒトおよびげっ歯類IgGにおいて高度に保存されていることを見出した。これは、IgG-FcRn結合におけるそれらの重要性を示唆している。

【 0 0 1 0 】

また、種々の刊行物が、半減期が修飾された生理活性分子を入手するための方法を記載しており、これらの方法は、FcRn結合性ポリペプチドを該分子中に導入することにより (WO 97/43316; 米国特許第5,869,046号; 米国特許第5,747,035号; WO 96/32478; WO 91/14438)、またはFcRn結合親和性は維持されているが他のFc受容体に対する親和性は著しく減少した抗体に該分子を融合することにより (WO 99/43713)、または抗体のFcRn結合性ドメインに融合することにより行われた (WO 00/09560; 米国特許第4,703,039号)。しかし、これらの刊行物のいずれにおいても、半減期に影響を及ぼすIgG定常ドメイン中の特定の突然変異は開示されていない。

【 0 0 1 1 】

従来の研究は、或る定常ドメイン突然変異が実際にFcRnへの結合を減弱してIgGのin vivo半減期を減少させることを示している。PCT公開WO 93/22332 (Wardら) は、およそ残基253と残基434との間の突然変異によりin vivo半減期が減少した種々の組換えマウスIgGを開示している。特に、253位のイソロイシン、310位のヒスチジン、311位のグルタミン、433位のHisおよび434位のアスパラギンの置換がIgGの半減期を減少させることが判明した

10

20

30

40

50

。

【0012】

また、FcRnに対する親和性を増加または減少させるアミノ酸の置換、付加または欠失によるIgG分子のモジュレーションがWO 98/23289に開示されているが、該刊行物は、より長い又はより短いin vivo半減期を示す特定の突然変異体を何ら記載していない。

【0013】

実は、半減期の増加を実際に示したマウスIgG1の突然変異体(Thr252からAla、Thr254からSerおよびThr256からPheの三重突然変異)の1つが同定されているに過ぎない(WO 97/34631)。

【0014】

免疫グロブリンおよび他の生物活性分子のin vivo半減期の増加の医薬的重要性を考慮すると、免疫グロブリンおよび他の生物活性分子にin vivo半減期の増加をもたらす修飾IgGおよびそのFcRn結合性フラグメント(特に修飾ヒトIgG)を開発することが必要とされている。

【発明の開示】

【0015】

3. 発明の概要

本発明は、FcRnに対するIgG分子の親和性を増加させるヒトIgG分子の定常ドメイン中のいくつかの突然変異の本発明者らによる同定に基づく。特に、本発明者らは、該定常ドメインの特定の領域中に導入されたランダムなアミノ酸突然変異を有するヒトIgG1定常ドメインのライブラリーを、FcRnに対する親和性の増加に関してスクリーニングした。そのようなランダム突然変異は、ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域の残基251-256、285-290および308-314(これらのすべてはCH2ドメイン中に存在する)ならびに385-389および428-436(これらはCH3ドメイン中に存在する)の領域中に施された(残基は図2(配列番号83)に示すとおりであり、あるいは他のIgG分子のヒンジ-Fc領域中の類似残基は配列アライメントにより決定した)。本発明で用いるIgG定常ドメインの全残基はKabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1991(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする))に従い番号づけされており、図2(配列番号83)に記載されているとおりであり、配列アライメントにより決定された他のIgG定常ドメイン中の対応残基を含む。抗体および他の治療剤および他の生物活性分子のin vivo半減期または被験者の血清もしくは他の組織中での維持は、抗体(または任意の他の医薬分子)の投与量および投与頻度を決定する重要な臨床的パラメーターである。したがって、増加した半減期を有するそのような分子(抗体を含む)は医薬上極めて重要である。

【0016】

したがって、本発明は、FcRnに対する親和性を増加するようIgG定常ドメインまたはそのフラグメントが(例えば、アミノ酸の置換、欠失または挿入により)修飾された修飾IgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性部分(好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン)(好ましくはヒトIgG由来)の存在により増加したin vivo半減期を有する修飾分子(好ましくはタンパク質であるが、非タンパク質物質であってもよい)に関する。特定の実施形態においては、本発明は、FcRn受容体とのヒンジ-Fcドメインの相互作用に参与することが確認されたアミノ酸残基の修飾によりin vivo半減期が延長された修飾IgGに関する。好ましくは、該定常ドメインまたはそのフラグメントは、pH 6.0においては、pH 7.4におけるより高い親和性をFcRnに対して有する。また、そのような修飾は該分子のバイオアベイラビリティ(例えば、粘膜表面または他の標的組織への輸送)を改変(すなわち、増強または減弱)しうる。本発明はまた、1以上のそのようなアミノ酸修飾を有するIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントに融合または結合した或いはそれを含有するよう操作された他の型の免疫グロブリンまたはそのフラグメント(すなわち、非IgG免疫グロブリン)、非免疫グロブリンタンパク質および非タンパク質物質に関する。

【0017】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態においては、本発明は、FcRnに対する定常ドメインまたはそのフラグメントの親和性を増加させるアミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436の1以上の修飾を有するIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント（好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン）の存在によりin vivo半減期が延長された分子、特に免疫グロブリンを提供する。ある実施形態においては、好ましくは、これらの修飾は、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントがマウスのものである場合には特に、残基252、254および256以外のものである。特定の実施形態においては、該修飾は1以上の表面露出残基におけるものであり、該修飾は、置換される残基に類似した電荷、極性または疎水性の残基による置換である。好ましい実施形態においては、該修飾IgG定常ドメインまたはそのフラグメントは、pH 6.0においては、pH 7.4におけるより高い親和性でFcRnに結合する。好ましい実施形態においては、該定常ドメインまたはそのフラグメントは、FcRnに対する定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントの親和性を増加させるアミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436の1以上の置換により修飾される。ある実施形態においては、定常ドメインまたはそのフラグメントがマウスIgGに由来する場合には特に、ロイシンによる残基252の置換、セリンによる残基254の置換、および/またはフェニルアラニンによる残基256の置換は除かれる。

【0018】

特定の実施形態においては、本発明は、308、309、311、312および314位の1以上におけるアミノ酸修飾を有する、より詳しくは、それぞれトレオニン、プロリン、セリン、アスパラギン酸およびロイシンによる308、309、311、312および314位の1以上における置換を有するIgG1定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント（好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン）（好ましくはヒトのもの）を含有する免疫グロブリンおよび他の生物活性分子を提供する。もう1つの実施形態においては、308、309および311位の1以上における残基は、それぞれイソロイシン、プロリンおよびグルタミン酸により置換される。さらにもう1つの実施形態においては、308、309、311、312および314位の1以上における残基は、それぞれトレオニン、プロリン、セリン、アスパラギン酸およびロイシンにより置換される。本発明は更に、これらのアミノ酸置換の組合せに関する。

【0019】

さらに、本発明は、251、252、254、255および256位の1以上におけるアミノ酸修飾を有する、より詳しくは、これらの位置の1以上における置換を有するIgG1定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント（好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン）（好ましくはヒトのもの）を含有する免疫グロブリンおよび他の生物活性分子を提供する。特定の実施形態においては、残基251はロイシンまたはアルギニンにより置換され、残基252はチロシン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファンまたはトレオニンにより置換され、残基254はトレオニンまたはセリンにより置換され、残基255はロイシン、グリシン、イソロイシンまたはアルギニンにより置換され、および/または、残基256はセリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、アスパラギンまたはトレオニンにより置換される。より具体的な実施形態においては、残基251はロイシンにより置換され、残基252はチロシンにより置換され、残基254はトレオニンまたはセリンにより置換され、および/または残基255はアルギニンにより置換される。さらにもう1つの特定の実施形態においては、残基252はフェニルアラニンにより置換され、および/または、残基256はアスパラギン酸により置換される。好ましい実施形態においては、残基251はロイシンにより置換され、残基252はチロシンにより置換され、残基254はトレオニンまたはセリンにより置換され、および/または、残基255はアルギニンにより置換される。本発明は更に、これらの置換の任意の組合せに関する。

【0020】

さらに、本発明は、428、433、434および436位の1以上におけるアミノ酸修飾を有する、より詳しくは、これらの位置の1以上における置換を有するIgG1定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント（好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン）（好ましくはヒトのもの）を含有する免疫グロブリンおよび他の生物活性分子を提供する。特定の実施形態

10

20

30

40

50

においては、残基428はメチオニン、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはセリンにより置換され、残基433はリシン、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、グルタミンまたはヒスチジンにより置換され、残基434はフェニルアラニン、チロシンまたはヒスチジンにより置換され、および/または、残基436はヒスチジン、アスパラギン、アルギニン、トレオニン、リシン、メチオニンまたはトレオニンにより置換される。より具体的な実施形態においては、433、434および436位の1以上における残基が、それぞれリシン、フェニルアラニンおよびヒスチジンにより置換される。好ましい実施形態においては、残基428はメチオニンにより置換され、および/または、残基434はチロシンにより置換される。

【0021】

さらに、本発明は、385、386、387および389位の1以上におけるアミノ酸修飾を有する、より詳しくは、これらの位置の1以上における置換を有するIgG1定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント（好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン）（好ましくはヒトのもの）を含有する免疫グロブリンおよび他の生物活性分子を提供する。特定の実施形態においては、残基385はアルギニン、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、ヒスチジン、リシンまたはアラニンにより置換され、残基386はトレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リシン、アルギニン、イソロイシンまたはメチオニンにより置換され、残基387はアルギニン、ヒスチジン、セリン、トレオニン、アラニンまたはプロリンにより置換され、および/または、残基389はプロリンまたはセリンにより置換される。より具体的な実施形態においては、385、386、387および389位の1以上における残基は、それぞれアルギニン、トレオニン、アルギニンおよびプロリンにより置換される。さらにもう1つの特定の実施形態においては、385、386および389位の1以上における残基は、それぞれアスパラギン酸、プロリンおよびセリンにより置換される。

【0022】

本発明の分子は、残基251、252、254、255、256、308、309、311、312、385、386、387、389、428、433、434および/または436の1以上における前記置換の任意の組合せを含む。好ましい実施形態においては、本発明の分子は、以下の置換の1以上を有するFc領域またはそのFcRn結合性ドメインを含有する：残基251のロイシン、残基252のチロシン、残基254のトレオニンまたはセリン、残基255のアルギニン、残基308のトレオニン、残基309のプロリン、残基311のセリン、残基312のアスパラギン酸、残基314のロイシン、残基385のアルギニン、残基386のトレオニン、残基387のアルギニン、残基389のプロリン、残基428のメチオニン、および/または残基434のチロシン。

【0023】

本発明には、延長された半減期を有する本発明の修飾免疫グロブリン、タンパク質および他の生物活性分子を使用する医薬組成物ならびに予防および治療方法が含まれる。また、延長された半減期を有する本発明の修飾免疫グロブリン、タンパク質および他の生物活性分子を使用する診断方法が含まれる。特定の実施形態においては、本発明は、FcRnに対する抗体の親和性を増加させる定常ドメイン中の1以上のアミノ酸修飾を有する及び増加した*in vivo*半減期を有する、SYNAGIS（登録商標）（米国特許第5,824,307号およびJohns onら, J. Infectious Disease 176: 1215-1224, 1997を参照されたい（それらの両方の全体を参照により本明細書に組み入れることとする））のような呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染を治療または予防するのに有用な抗RSV抗体、およびSYNAGIS（登録商標）の変異体（2000年11月28日付け出願の米国特許出願第09/724,396号、2000年11月28日付け出願の米国特許出願第09/724,531号、2001年11月28日付け出願の米国特許出願第____号（代理人整理番号10271-047）および2001年11月28日付け出願の米国特許出願第____号（代理人整理番号10271-048）（発明の名称はすべて「予防および治療のための抗RSV抗体の投与/投薬方法(Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment)」であり、すべてYoungらによるものであり、それらの全体、特にそれに開示されている抗RSV抗体の重および軽鎖可変ドメインならびにCDRの配列を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）を含む他の抗RSV抗体を提供する（例えば、後

10

20

30

40

50

記第5.1節も参照されたい)。

【0024】

3.1 定義

本明細書で用いる「IgG Fc領域」なる語は、IgG分子のパパイン消化により得られる結晶性フラグメントと関連するIgG分子の部分の意味する。該Fc領域は、ジスルフィド結合により連結された2つのIgG分子重鎖のC末端半分よりなる。それは抗原結合活性を有しないが、FcRn受容体を含むFc受容体および補体に対する結合部位および炭水化物部分を含有する(後記を参照されたい)。Fcフラグメントは、全第2定常ドメインCH2(Kabatの番号付け系によれば、ヒトIgG1の残基231-340)(例えば、配列番号80)および第3定常ドメインCH3(残基341-447)(例えば、配列番号81)を含有する。

10

【0025】

本明細書で用いる「IgGヒンジ-Fc領域」または「ヒンジ-Fcフラグメント」なる語は、Fc領域(残基231-447)と、Fc領域のN末端から伸長するヒンジ領域(残基216-230、例えば配列番号82)とよりなるIgG分子の領域を意味する。ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域のアミノ酸配列の一例として、配列番号83が挙げられる。

【0026】

「定常ドメイン」なる語は、抗原結合部位を含有する免疫グロブリンの他の部分(すなわち、可変ドメイン)と比べて、より保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分の意味する。定常ドメインは、重鎖のCH1、CH2およびCH3ドメインと軽鎖のCHLドメインとを含有する。

20

【0027】

本明細書で用いる「FcRn受容体」または「FcRn」なる語は、ヒトもしくは霊長類の胎盤または卵黄嚢(ウサギ)を介した胎児への或いは小腸を介した初乳から新生児への母親IgGの移行に関与することが知られているFc受容体(「n」は新生児を示す)を意味する。また、FcRnは、該IgG分子に結合しそれを血清中にリサイクルすることにより、一定の血清IgGレベルの維持に関与することが公知である。IgG分子とFcRnとの結合は厳密なpH依存性であり、最適な結合はpH 6.0で達成される。FcRnは、分子量がそれぞれ約50kDおよび15kDである2つのポリペプチドのヘテロ二量体からなる。50kDポリペプチドの細胞外ドメインは主要組織適合性複合体(MHC)クラスI鎖に関連しており、15kDポリペプチドは非多形性 α_2 -ミクログロブリン(α_2 -m)であることが示された。FcRnは、胎盤および新生児腸に加えて、種を越えた種々の組織および種々の型の内皮細胞系においても発現される。それはヒト成人血管内皮、筋肉脈管系および肝シヌソイドにおいても発現され、内皮細胞はヒトおよびマウスの血清IgGレベルの維持において最も大きな役割を果たしうると示唆されている。ヒトFcRnおよびマウスFcRnのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号84および配列番号85により示される。FcRn活性を有するこれらの配列の類似体も含まれる。

30

【0028】

本明細書で用いる「in vivo半減期」なる語は、所与の動物の循環系中の特定の型のIgG分子またはそのFcRn結合部位含有フラグメントの生物学的半減期を意味し、該動物において投与された量の半分が該動物における循環系および/または他の組織から消失するのに要する時間により表される。所定のIgGの消失(クリアランス)曲線を時間の関数として作成すると、該曲線は、通常、二相性であり、血管腔の内外の注入IgG分子の平衡を表し、一部には分子のサイズにより決定される迅速な相と、血管腔内のIgG分子の異化を表す、より長い相とを有する。「in vivo半減期」なる語は、実際には、該相におけるIgG分子の半減期に相当する。

40

【0029】

「単離(された)」または「精製(された)」抗体または融合タンパク質は、該タンパク質が由来する細胞または組織源からの細胞物質または他の混入タンパク質を実質的に含有せず、あるいは化学合成された場合には、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しない。「細胞物質を実質的に含有しない」なる表現は、抗体または融合タンパク質の調製物であって、該抗体または該融合タンパク質が、それが単離または組換え的に製造

50

された細胞の細胞成分から分離されている調製物を包含する。したがって、細胞物質を実質的に含有しない抗体または融合タンパク質は、約30%、20%、10%または5%（乾燥重量比）未満の混入タンパク質を含有する抗体または融合タンパク質の調製物を包含する。また、該抗体または該融合タンパク質を組換え的に製造した場合には、それは、好ましくは、培地を実質的に含有しない。すなわち、培地は、該タンパク質調製物の体積の約20%、10%または5%未満に相当する。該抗体または該融合タンパク質を化学合成により製造した場合には、それは、好ましくは、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しない。すなわち、それは、該タンパク質の合成に關与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されている。したがって、該抗体または該融合タンパク質のそのような調製物は、約30%、20%、10%または5%（乾燥重量比）未満の、関心のある抗体または抗体フラグメント以外の化学的前駆体または化合物を含有する。本発明の好ましい実施形態においては、抗体は単離または精製されている。本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、融合タンパク質は単離または精製されている。

10

【0030】

「単離（された）」核酸分子は、該核酸分子の天然源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子である。さらに、cDNA分子のような「単離（された）」核酸分子は、他の細胞物質を、または組換え技術により製造された場合には培地を実質的に含有しないもの、あるいは化学合成された場合には化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しないものでありうる。「単離（された）」核酸分子は、DNAライブラリー中のcDNA分子を含まない。本発明の好ましい実施形態においては、抗体をコードする核酸分子は単離または精製されている。本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、融合タンパク質をコードする核酸分子は単離または精製されている。

20

【0031】

本明細書で用いる「宿主細胞」なる語は、核酸分子でトランスフェクトされる或いはファージミドまたはバクテリオファージに感染する特定の対象細胞およびそのような細胞の後代または潜在的後代を意味する。そのような細胞の後代は、後の世代において生じうる突然変異もしくは環境的影響または該宿主細胞ゲノム中への該核酸分子の組込みにより、該核酸分子でトランスフェクトされた親細胞と同一でなくてもよい。

【0032】

本明細書で言及するアミノ酸の名称は三文字表記または一文字表記で表される。

30

【0033】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性（%）を測定するためには、それらの配列を最適な比較のために整列させる（例えば、第2アミノ酸または核酸配列との最適なアライメントのために、第1アミノ酸または核酸配列の配列中にギャップを導入することができる）。ついで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1配列中の位置が、第2配列中の対応位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められた場合には、それらの分子はその位置において同一である。それらの2つの配列間の同一性（%）は、それらの配列により共有される同一位置の数の関数である（すなわち、同一性（%）= 同一重複位置の数 / 位置の総数 × 100%）。1つの実施形態においては、それらの2つの配列は同じ長さである。

40

【0034】

2つの配列間の同一性（%）の測定は、数学的アルゴリズムを使用しても達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な一例としては、KarlinおよびAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873-5877に記載のとおり修飾されたKarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 2264-2268のアルゴリズムが挙げられる。そのようなアルゴリズムは、Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTおよびXBLASTプログラム中に組込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために例えばスコア = 100、ワード長 = 12に設定されたNBLASTヌクレオチドプログラムパラメーターで行うことができる。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同

50

なアミノ酸配列を得るために例えばスコア = 5、ワード長 = 3に設定されたXBLASTプログラムパラメーターで行うことができる。比較のためのギャップ付きアライメントを得るためには、Altschulら, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402に記載のとおり、Gapped BLASTを利用することができる。あるいは、分子間の遠縁関係を検出する反復検索を行うために、PSI-BLASTを使用することができる(同上)。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI-BLASTプログラムを使用する場合には、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる(例えば、[.nslm.nih.gov](http://nslm.nih.gov)を参照されたい)。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムのもう1つの好ましい非限定的な一例としては、MyersおよびMiller, 1988, *CABIOS* 4: 11-17のアルゴリズムが挙げられる。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)中に組込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合には、PAM120重み残基表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用することができる。

10

【0035】

2つの配列間の同一性(%)は、ギャップを許容して又は許容することなく前記と同様の技術を用いて測定することができる。同一性(%)を計算する際には、典型的には、厳密なマッチのみを計数する。

【0036】

4. 図面の簡単な記載

図1は、FcRn受容体との相互作用に関与することが確認された残基の位置を示すIgGヒンジ-Fc領域の構造を示す(Ghetieら, *Immunology Today* 18(12): 592-598, 1997)。

20

【0037】

図2は、ヒンジ領域(配列番号82)、CH2ドメイン(配列番号80)およびCH3ドメイン(配列番号81)を含有するヒトIgG1ヒンジ-Fc領域のアミノ酸配列(配列番号83)を示す。

【0038】

図3(AおよびB)は、それぞれ(A)ヒトFcRn(配列番号84)および(B)マウスFcRn(配列番号85)のアミノ酸配列を示す。

【0039】

図4は、ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域(配列番号83)のアミノ酸配列を示す。ここで、アミノ酸置換により突然変異した野生型残基は下線付き太字で示されている。

30

【0040】

図5は、ファージにより提示された修飾ヒンジ-Fcライブラリーに関するパニング法の概略図である。

【0041】

図6は、スクリーニングしたライブラリー中の変異体位置における選択された突然変異残基の出現の概要を示す。

【0042】

図7(A~D)。(A)は、M252Y/S254T/T256E置換を有する固定化IgG1へのマウスFcRnの結合を示す。4000共鳴単位(RU)のIgG1が結合した表面上に、マウスFcRnを1nM~556nMの範囲の10の異なる濃度で注入した。平衡に達した後、残留結合タンパク質をPBS(pH 7.4)のパルスで溶出した。(B)は、固定化IgG1/M252Y/S254T/T256EへのヒトFcRnの結合を示す。1000RUのIgG1が結合した表面上に、マウスFcRnを71nM~2.86μMの範囲の8つの異なる濃度で注入した。平衡に達した後、残留結合タンパク質をPBS(pH 7.4)のパルスで溶出した。(C)および(D)は、非特異的結合に関する補正後のそれぞれ(A)および(B)におけるデータのスキッチャード解析を示す。 R_{eq} は、与えられた濃度Cにおける補正平衡応答である。それらのプロットは直線状であり、相関係数はそれぞれ0.97および0.998である。見掛け K_d は、それぞれ24nMおよび225nMである。

40

【0043】

図8(A~H)。(A)~(D)は、非特異的結合に関する補正後のそれぞれ(A)野生型ヒトIgG1、(B)M252Y/S254T/T256E、(C)H433K/N434F/Y436H、および(D)G385D/G386P/N

50

389SへのpH 6.0およびpH 7.4におけるマウスFcRnの結合のBIAcore分析からの結果を示す。1000RUの野生型IgG1、1000RUのM252Y/S254T/T256E、955RUのH433K/N434F/Y436H、および939RUのG385D/Q386P/N389Sが結合した表面上に、マウスFcRnを1.1 μmの濃度で注入した。(E) ~ (H)は、非特異的結合に関する補正後のそれぞれ(E)野生型ヒトIgG1、(F)M252Y/S254T/T256E、(G)H433K/N434F/Y436H、および(H)G385D/Q386P/N389SへのpH 6.0およびpH 7.4におけるヒトFcRnの結合のBIAcore分析からの結果を示す。1000RUの野生型IgG1、1000RUのM252Y/S254T/T256E、955RUのH433K/N434F/Y436H、および939RUのG385D/Q386P/N389Sが結合した表面上に、ヒトFcRnを1.4 μmの濃度で注入した。

【0044】

図9は、Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20: 2361-2370のヒトIgG1構造に基づくヒトIgG1のFcフラグメントの表面の空間充填型モデルを示す。残基は、Fc-FcRn複合体の安定化の自由エネルギーの獲得に応じて色付けされている：赤、これらの位置における置換は親和性をFc/ヒトFcRn相互作用においては少なくとも2.5倍およびFc/マウスFcRn相互作用においては少なくとも5倍増加させることが判明した；青、それらの位置における置換は親和性をFc-ヒトFcRnおよびFc-マウスFcRnの両方の相互作用において2倍未満の倍率で増加させることが判明した。この図は、Swiss pdb viewer (GuexおよびPeitsch, 1997, Electrophoresis 18: 2714-2723)を使用して作成した。

【0045】

図10は、野生型定常ドメインを有する抗体(SYNAGIS(登録商標))(白正方形)、または突然変異M252Y/S254T/T256E(白丸)、G385D/Q386P/N389S(黒正方形)およびH433K/N434F/Y436H(黒丸)を含有する定常ドメインを有する抗体の、時間(日単位)経過に対する血清濃度([Mab]ng/ml)における変化を示す。抗体濃度は、抗ヒトIgG ELISAを用いて測定した。

【0046】

5. 発明の詳細な記載

本発明は、野生型IgG定常ドメインに対して1以上のアミノ酸修飾(該修飾はFcRnに対する該IgG定常ドメインまたはそのフラグメントの親和性を増加させる)を含有するIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント(すなわち、FcRnに結合するそのフラグメント)(好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメイン)を含む増加したin vivo半減期を有する分子、特にタンパク質、より詳しくは免疫グロブリンに関する。好ましい実施形態においては、本発明は、特に、ヒトにおける治療、予防および診断において特に有用である、ヒトまたはヒト化IgGおよびヒトIgGのFcRn結合性部分を含有する他の生物活性分子の修飾に関する。

【0047】

5.1 増加したin vivo半減期を有する分子

本発明は、FcRnと相互作用するIgG定常ドメインの特定の部分におけるアミノ酸修飾(該修飾はFcRnに対するIgGまたはそのフラグメントの親和性を増加させる)の同定に基づくものである。したがって、本発明は、FcRnと相互作用する1以上の領域中に1以上のアミノ酸修飾(すなわち、置換、挿入または欠失)(該修飾はFcRnに対するIgGまたはそのフラグメントの親和性を増加させ、該分子のin vivo半減期をも増加させる)を含有するIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント(好ましくはFcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)を含む分子、好ましくはタンパク質、より好ましくは免疫グロブリンに関する。好ましい実施形態においては、前記の1以上のアミノ酸修飾は、IgG1ヒンジ-Fc領域の残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436(例えば、図4、配列番号83に記載のヒトIgG1ヒンジ-Fc領域におけるとおり)、または他のIgGヒンジ-Fc領域中の、アミノ酸配列アライメントにより決定されたそれらの類似残基の1以上において施される。好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は、ヒトIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性ドメイン中に施される。ある実施形態においては、該修飾は、IgG定常ドメインの残基252、254または256においては施されない(すなわち、すべては、残基251、253、255、285-290、308-314、385-389、または428-436の1以上において施される)。より好まし

10

20

30

40

50

い実施形態においては、該アミノ酸修飾は、残基252におけるロイシンによる置換、残基254におけるセリンによる置換、および/または256位におけるフェニルアラニンによる置換ではない。特に、好ましい実施形態においては、IgG定常ドメイン、ヒンジ-Fcドメイン、ヒンジ-Fcドメインまたは他のそのFcRn結合性フラグメントがマウスに由来する場合には、そのような修飾は施されない。

【0048】

前記のアミノ酸修飾は、IgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント（例えば、Fcまたはヒンジ-Fcドメイン）およびそれに結合した任意の分子の *in vivo* 半減期を増加させFcRnに対する該IgGまたはそのフラグメントの親和性を増加させる任意の修飾（好ましくは、残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436の1以上におけるもの）でありうる。好ましくは、前記の1以上の修飾はまた、pH 6.0において、pH 7.4におけるより高い、FcRnに対する該定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントの結合親和性を与える。他の実施形態においては、該修飾は、該分子のバイオアベイラビリティを改変（すなわち、増強または減弱）し、特に、（例えば肺の）粘膜表面または標的組織の他の部分への該分子の輸送（または濃度または半減期）を改変する（すなわち、増加または減少させる）。好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は、肺への該分子の輸送または濃度または半減期を改変する（好ましくは増加させる）。他の実施形態においては、該アミノ酸修飾は、心臓、膵臓、肝臓、腎臓、膀胱、胃、大腸、小腸、気道、リンパ節、神経組織（中枢および/または末梢神経組織）、筋肉、表皮、骨、軟骨、関節、血管、骨髄、前立腺、卵巣、子宮、腫瘍または癌組織などへの該分子の輸送（または濃度または半減期）を改変する（好ましくは増加させる）。好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は、該定常ドメインの他の免疫エフェクターまたは受容体結合機能（例えば、当技術分野において良く知られた常套的な方法により測定されうる補体結合、ADCC、およびFc RI、Fc RIIおよびFc RIIIへの結合が挙げられるが、これらに限定されるものではない）を阻止せず、より好ましくは、改変しない。もう1つの好ましい実施形態においては、該定常ドメインの修飾FcRn結合フラグメントは、免疫エフェクター機能または他の受容体結合を媒介する配列を含有しない。そのようなフラグメントは、非IgGまたは非免疫グロブリン分子に結合させてその *in vivo* 半減期を増加させるのに特に有用でありうる。さらにもう1つの実施形態においては、該エフェクター機能が選択的に改変される（例えば、エフェクター機能が減弱または増強される）。

【0049】

好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は、残基308、309、311、312および314の1以上における置換、特に、308位におけるトレオニン、309位におけるプロリン、311位におけるセリン、312位におけるアスパラギン酸および/または314位におけるロイシンによる置換である。あるいは、該修飾は、308位におけるイソロイシン、309位におけるプロリン、および/または311位におけるグルタミン酸による置換である。さらにもう1つの実施形態においては、308、309、311、312および314位の1以上における残基は、それぞれトレオニン、プロリン、ロイシン、アラニンおよびアラニンにより置換される。したがって、ある実施形態においては、308位の残基はトレオニンまたはイソロイシンにより置換され、309位の残基はプロリンにより置換され、311位の残基はセリン、グルタミン酸またはロイシンにより置換され、312位の残基はアラニンにより置換され、および/または、314位の残基はロイシンまたはアラニンにより置換される。好ましい実施形態においては、該置換は308位のトレオニン、309位のプロリン、311位のセリン、312位のアスパラギン酸および/または314位のロイシンである。

【0050】

好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は、残基251、252、254、255および256の1以上における置換である。特定の実施形態においては、残基251はロイシンまたはアルギニンにより置換され、残基252はチロシン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファンまたはトレオニンにより置換され、残基254はトレオニンまたはセリンにより置換され、残基255はアルギニン、ロイシン、グリシンまたはイソロイシンにより置換され、およ

10

20

30

40

50

び/または、残基256はセリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、アスパラギンまたはトレオニンにより置換される。より具体的な実施形態においては、残基251はロイシンにより置換され、残基252はチロシンにより置換され、残基254はトレオニンまたはセリンにより置換され、残基255はアルギニンにより置換され、および/または、残基256はグルタミン酸により置換される。

【0051】

好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は残基428、433、434および436の1以上における置換である。特定の実施形態においては、残基428はトレオニン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはセリンにより置換され、残基433はリシン、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、グルタミンまたはヒスチジンにより置換され、残基434はフェニルアラニン、チロシンまたはヒスチジンにより置換され、および/または、残基436はヒスチジン、アスパラギン、アルギニン、トレオニン、リシンまたはメチオニンにより置換される。より具体的な実施形態においては、428および/または434位の残基は、それぞれメチオニンおよび/またはヒスチジンにより置換される。

10

【0052】

好ましい実施形態においては、該アミノ酸修飾は残基385、386、387および389の1以上における置換であり、より詳しくは、これらの位置の1以上における置換を有する。特定の実施形態においては、残基385はアルギニン、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、ヒスチジン、リシン、アラニンまたはグリシンにより置換され、残基386はトレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リシン、アルギニン、イソロイシンまたはメチオニンにより置換され、残基387はアルギニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、トレオニンまたはアラニンにより置換され、および/または、残基389はプロリン、セリンまたはアスパラギンにより置換される。より具体的な実施形態においては、385、386、387および389位の1以上における残基は、それぞれアルギニン、トレオニン、アルギニンおよびプロリンにより置換される。さらにもう1つの特定の実施形態においては、385、386および389位の1以上における残基は、それぞれアスパラギン酸、プロリンおよびセリンにより置換される。

20

【0053】

特定の実施形態においては、アミノ酸修飾は残基251、252、254、255、256、308、309、311、312、314、385、386、387、389、428、433、434および/または436の1つ又はそれらの組合せにおいて施され、該修飾がこれらの残基に関して直前に記載したアミノ酸置換の1以上である場合には特にそうである。

30

【0054】

好ましい実施形態においては、本発明の分子は以下の置換の1以上を有するFc領域またはそのFcRn結合性ドメインを含有する：残基251のロイシン、残基252のチロシン、残基254のトレオニンまたはセリン、残基255のアルギニン、残基308のトレオニン、残基309のプロリン、残基311のセリン、残基312のアスパラギン酸、残基314のロイシン、残基385のアルギニン、残基386のトレオニン、残基387のアルギニン、残基389のプロリン、残基428のメチオニン、および/または残基434のチロシン。

【0055】

好ましい実施形態においては、該FcRn結合性ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または残基251、252、254、255、256、308、309、311、312、314、385、386、387、389、428、433、434および/または436の全18残基における置換を有する。

40

【0056】

アミノ酸修飾は、当技術分野で公知の任意の方法により行うことが可能であり、多数のそのような方法が当業者に良く知られており常套的なものである。例えば、限定的なものではないが、アミノ酸の置換、欠失および挿入は、任意の良く知られたPCRに基づく技術を用いて達成することができる。アミノ酸の置換は、部位特異的突然変異誘発（例えば、ZollerおよびSmith, Nucl. Acids Res. 10: 6487-6500, 1982; Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82: 488, 1985（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参

50

照されたい)。FcRnに対する親和性の増加およびin vivo半減期の増加をもたらす突然変異体は、後記5.11節に記載されているような良く知られた常套的アッセイを用いて容易にスクリーニングすることができる。好ましい実施形態においては、アミノ酸の置換を、IgG定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメント中の1以上の残基において導入し、該突然変異定常ドメインまたはフラグメントをバクテリオファージの表面上で発現させ、ついでそれを、増加したFcRn結合親和性に関してスクリーニングする（特に、後記第5.2節および第5.11節を参照されたい）。

【0057】

好ましくは、修飾されるアミノ酸残基は表面露出残基である。また、アミノ酸置換を行う場合には、好ましくは、置換されるアミノ酸残基は同類アミノ酸置換であり、例えば、極性残基は極性残基により置換され、親水性残基は親水性残基により置換され、疎水性残基は疎水性残基により置換され、正に荷電した残基は正に荷電した残基により置換され、あるいは負に荷電した残基は負に荷電した残基により置換される。さらに、好ましくは、修飾されるアミノ酸残基は、種間で高度には又は完全には保存されておらず、および/または、該定常ドメイン三次構造の維持またはFcRn結合に決定的に重要なものである。例えば、限定的なものではないが、310位におけるヒスチジンの修飾は好ましくない。

【0058】

FcRnに対して増加した親和性を有するFcドメインの特定の突然変異体を、残基308-314（310位のヒスチジンおよび313位のトリプトファンは固定されている）に突然変異を有する突然変異ヒトIgG1分子のライブラリーからの第3ラウンドのパニング（第6節に記載のとおり）の後に単離した。残基251-256（253位のイソロイシンは固定されている）に関するライブラリーの第5ラウンドのパニングの後に単離したもの、残基428-436（429位のヒスチジン、430位のグルタミン酸、431位のアラニン、432位のロイシンおよび435位のヒスチジンは固定されている）に関するライブラリーの第4ラウンドのパニングの後に単離したもの、および残基385-389（388位のグルタミン酸は固定されている）に関するライブラリーの第6ラウンドのパニングの後に単離したものを、表Iに示す。野生型ヒトIgG1は、308-314位に配列Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu（配列番号（SEQ ID NO:）86）、251-256位にLeu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr（配列番号87）、428-436位にMet-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr（配列番号88）、385-389位にGly-Gln-Pro-Glu-Asn（配列番号89）を有する。

10

20

【表 1】

表 I

パニングにより単離された突然変異体

ライブラリー	突然変異体*
251-256	<u>Leu Tyr Ile Thr Arg Glu</u> (SEQ ID NO:90)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:91)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Ser</i> (SEQ ID NO:92)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:93)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Gln</i> (SEQ ID NO:94)
	<i>Leu Trp Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:95)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Leu Gln</i> (SEQ ID NO:96)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Asp</i> (SEQ ID NO:97)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:98)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:99)
	<i>Leu Phe Ile Thr Gly Ala</i> (SEQ ID NO:100)
	<i>Leu Ser Ile Ser Arg Glu</i> (SEQ ID NO:101)
	<i>Arg Thr Ile Ser Ile Ser</i> (SEQ ID NO:102)
	308-314
<i>Ile Pro His Glu Asp Trp Leu</i> (SEQ ID NO:104)	
385-389	<u>Arg Thr Arg Glu Pro</u> (SEQ ID NO:105)
	<i>Asp Pro Pro Glu Ser</i> (SEQ ID NO:106)
	<i>Ser Asp Pro Glu Pro</i> (SEQ ID NO:107)
	<i>Thr Ser His Glu Asn</i> (SEQ ID NO:108)
	<i>Ser Lys Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:109)
	<i>His Arg Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:110)
	<i>Lys Ile Arg Glu Asn</i> (SEQ ID NO:111)

10

20

30

40

ライブラリー	突然変異体*
	Gly Ile Thr Glu Ser (SEQ ID NO:112)
	Ser Met Ala Glu Pro (SEQ ID NO:113)
428-436	Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His (SEQ ID NO:114)
	Met His Glu Ala Leu His Phe His His (SEQ ID NO:115)
	Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His (SEQ ID NO:116)
	Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg (SEQ ID NO:117)
	Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr (SEQ ID NO:118)
	Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr (SEQ ID NO:119)

* 置換残基は太字で示されている

【 0 0 5 9 】

表I中の下線付き配列は、最終ラウンドのパニングにおいて10~20回出現した配列に対応し、イタリック体の配列は、最終ラウンドのパニングにおいて2~5回出現した配列に対応する。下線も付されておらずイタリック体でもない配列は、最終ラウンドのパニングにおいて1回出現したものである。

【 0 0 6 0 】

1つの好ましい実施形態においては、本発明は、未修飾分子と比較して増加したin vivo半減期およびFcRnに対する親和性（そして、好ましい実施形態においては、改変されたバイオアベイラビリティ、例えば、粘膜表面または他の標的組織への増加または減少した輸送）を有する修飾された免疫グロブリン分子（例えば、種々の抗体）を提供する。そのような免疫グロブリン分子は、FcRn結合性ドメインを天然で含有するIgG分子、およびFcRn結合性フラグメントを含有するように操作された他の非IgG免疫グロブリン（例えば、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）または免疫グロブリンのフラグメント（すなわち、非IgG免疫グロブリンまたはその一部とFcRn結合性ドメインとを含む融合タンパク質）を包含する。どちらの場合も、該FcRn結合性ドメインは、FcRnに対する該定常ドメインフラグメントの親和性を増加させる1以上のアミノ酸修飾を有する。

【 0 0 6 1 】

該修飾免疫グロブリンは、（特異的抗原-抗体結合をアッセイするための当技術分野で良く知られたイムノアッセイにより測定した場合に、好ましくは免疫特異的に、すなわち、非特異的結合に優先して）抗原に結合する任意の免疫グロブリン分子を包含し、FcRn結合性フラグメントを含有する。そのような抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド結合Fvs、および抗原に特異的に結合する、VLもしくはVHドメインまたは更には相補性決定領域（CDR）を含有するフラグメントのうち、ある場合には、FcRn結合性ドメインを含有するよう又はそれに融合するよう操作されたものを包含するが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 6 2 】

本発明のIgG分子およびそのFcRn結合性フラグメントは、好ましくは、IgGのIgG1サブクラスであるが、与えられた動物の任意の他のIgGサブクラスであることも可能である。例えば、ヒトにおいては、該IgGクラスはIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を包含し、マウスIgGはIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cおよびIgG3を包含する。あるIgGサブクラス、例えばマウスIgG2bおよびIgG2cは、例えばIgG1より高い消失（クリアランス）速度を有することが公知である（Medesanら、Eur. J. Immunol., 28: 2092-2100, 1998）。したがって、IgG1以外のIgGサブクラスを使用する場合には、IgG1配列とは異なる残基（特に、CH2およびCH3ド

10

20

30

40

50

メイン中のもの)の1以上をIgG1の残基により置換してそのIgG1以外のタイプのIgGのin vivo半減期を増加させることが有利かもしれない。

【0063】

該免疫グロブリン(および本発明で使用する他のタンパク質)は、鳥類および哺乳類を含む任意の動物に由来しうる。好ましくは、該抗体はヒト、げっ歯類(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリの抗体でありうる。本発明で用いる「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を包含し、ヒト免疫グロブリンライブラリーから又は1以上のヒト免疫グロブリンに関してトランスジェニックであり内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体(後記のとおり、および例えば、Kucherlapatiらの米国特許第5,939,598号)を包含する。

10

【0064】

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性またはそれ以上の多特異性のものでありうる。多特異性抗体はポリペプチドの種々のエピトープに特異的でありうる。あるいは多特異性抗体は、異種エピトープ、例えば異種ポリペプチドまたは固体支持体物質に特異的でありうる。例えば、PCT公開WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tuttら, J. Immunol. 147: 60-69, 1991; 米国特許第4,474,893号; 第4,714,681号; 第4,925,648号; 第5,573,920号; 第5,601,819号; Kostelnyら, J. Immunol., 148: 1547-1553, 1992を参照されたい。

【0065】

本発明の抗体は、他のやり方で修飾された誘導体、すなわち、抗原への該抗体の結合および/または抗イディオタイプ応答の生成を共有結合が妨げないよう該抗体に任意のタイプの分子が共有結合することにより修飾された誘導体を包含する。例えば、抗体誘導体は、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾された抗体を包含するが、これらに限定されるものではない。多数の化学修飾はいずれも、特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成を含む公知技術により行うことができる。また、該誘導体は1以上の非古典的アミノ酸を含有しうる。

20

【0066】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え体およびファージディスプレイ技術またはそれらの組合せの使用を含む当技術分野で公知の多種多様な技術を用いて製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であり例えばHarlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerlingら, : Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)(それらの両方の全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に教示されているものを含むハイブリドーマ技術を使用して製造することができる。本発明で用いる「モノクローナル抗体」なる語は、ハイブリドーマ技術により製造された抗体には限定されない。「モノクローナル抗体」なる語は、任意の真核性、原核性またはファージクローンを含む単クローンに由来する抗体を意味し、それが製造された方法によらない。

30

【0067】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を製造しそれに関してスクリーニングするための方法は、常套的なものであり当技術分野において良く知られている。非限定的な一例においては、関心のある抗原またはそのような抗原を発現する細胞でマウスを免疫することができる。免疫応答を検出したら、例えば、該抗原に特異的な抗体が該マウス血清中で検出されたら、該マウス脾臓を集め、脾細胞を単離する。ついで該脾細胞を、良く知られた技術により、任意の適当な骨髄腫細胞に融合させる。ハイブリドーマを選択して限界希釈法によりクローニングする。ついで該ハイブリドーマを、該抗原に結合しうる抗体を分泌する細胞に関して、当技術分野で公知の方法によりアッセイする。高レベルの抗体を一般

40

50

には含有する腹水は、陽性ハイブリドーマクローンをマウスの腹腔内に接種することにより生成させることができる。

【0068】

特異的エピトープを認識する抗体フラグメントは、公知技術により製造することができる。例えば、FabおよびF(ab')₂フラグメントは、(Fabフラグメントを製造するための)パパインまたは(F(ab')₂フラグメントを製造するための)ペプシンのような酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により製造することができる。F(ab')₂フラグメントは完全な軽鎖ならびに重鎖の可変領域、CH1領域およびヒンジ領域を含有する。

【0069】

また、抗体は、例えば、当技術分野で公知の種々のファージディスプレイ法を用いて製造することも可能である。ファージディスプレイ法においては、機能的抗体ドメインが、それをコードするポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子の表面上に提示される。特定の実施形態においては、レパートリーまたは組合せ(combinatorial)抗体ライブラリー(例えばヒトまたはマウスのもの)から発現されたFabおよびFvまたはジスルフィド結合安定化Fvのような抗原結合ドメインを提示するために、そのようなファージを使用することができる。関心のある抗原に結合する抗原結合性ドメインを発現するファージは、抗原を使用して選択または同定することができる。すなわち、該ファージは、標識された抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して選択または同定することができる。これらの方法において使用するファージは、典型的には、fdおよびM13を含む繊維状ファージである。該抗原結合性ドメインは、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIタンパク質に組換え的に融合したタンパク質として発現される。あるいは、本発明の免疫グロブリンの修飾FcRn結合性部分もファージディスプレイ系において発現されうる。本発明の免疫グロブリンまたはそのフラグメントを製造するために使用しうるファージディスプレイ法の具体例は、Brinkmanら, J. Immunol. Methods, 182: 41-50, 1995; Amesら, J. Immunol. Methods, 184: 177-186, 1995; Kettleboroughら, Eur. J. Immunol., 24: 952-958, 1994; Persicら, Gene, 187: 9-18, 1997; Burtonら, Advances in Immunology, 57: 191-280, 1994; PCT出願番号PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743号および第5,969,108号(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されているものを包含する。

【0070】

前記参考文献に記載されているとおり、ファージ選択の後、該ファージからの抗体コード領域を単離し、それを使用して、ヒト抗体を含む全抗体または任意の他の所望のフラグメントを得、例えば後記で詳しく説明するとおり哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主中で発現させることができる。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを組換え的に製造するための技術も、PCT公開WO 92/22324; Mullinaxら, BioTechniques, 12 (6): 864-869, 1992; およびSawaiら, AJRI, 34: 26-34, 1995; およびBetterら, Science, 240: 1041-1043, 1988(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されているような当技術分野で公知の方法により用いることができる。一本鎖Fvおよび抗体を製造するために使用しうる技術の具体例は、米国特許第4,946,778号および第5,258,498号; Hustonら, Methods in Enzymology, 203: 46-88, 1991; Shuら, PNAS 90: 7995-7999, 1993; ならびにSkerraら, Science, 240: 1038-1040, 1988に記載されているものを包含する。

【0071】

ヒトにおける抗体のin vivoでの使用およびin vitro検出アッセイを含むいくつかの用途には、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体を使用するのが好ましいことがある。キ

10

20

30

40

50

メラ抗体は、該抗体の種々の部分が種々の動物種に由来する分子、例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域とヒト免疫グロブリン由来の定常領域とを有する抗体である。キメラ抗体の製造方法は当技術分野において公知である。例えば、Morrison, Science, 229: 1202, 1985; Oiら, BioTechniques, 4: 214 1986; Gilliesら, J. Immunol. Methods, 125: 191-202, 1989; 米国特許第5,807,715号; 第4,816,567号; および第4,816,397号(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1以上の相補性決定領域(CDR)とヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する、所望の抗原に結合する非ヒト種由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を改変(好ましくは改善)するためにCDR供与抗体由来の対応残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で良く知られた方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するための該CDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデル化、ならびに特定の位置における異常なフレームワークを同定するための配列比較により同定される。例えば、Queenら, 米国特許第5,585,089号; Riechmannら, Nature, 332: 323, 1988(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。抗体は、例えば、CDRグラフティング(EP 239,400; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 第5,530,101号および第5,585,089号)、ベニアリング(veneering)またはリサーフェシング(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology, 28 (4/5): 489-498, 1991; Studnickaら, Protein Engineering, 7 (6): 805-814, 1994; Roguskaら, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 91: 969-973, 1994)、および鎖シャフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)(それらのすべての全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を含む当技術分野で公知の種々の技術を用いてヒト化することができる。

10

20

【0072】

ヒト患者の治療には完全ヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを使用する前記のファージディスプレイ法を含む当技術分野で公知の種々の方法により製造することができる。米国特許第4,444,887号および第4,716,111号; ならびにPCT公開WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; および WO 91/10741(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。

30

【0073】

また、ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現し得ないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現しうるトランスジェニックマウスを使用することによっても製造することができる。ヒト抗体を製造するためのこの技術の総説としては、LonbergおよびHuszar, Int. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を製造するためのこの技術ならびにそのような抗体を製造するためのプロトコールの詳細な考察については、例えば、PCT公開WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 欧州特許第0 598 877号; 米国特許第5,413,923号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,569,825号; 第5,661,016号; 第5,545,806号; 第5,814,318号; 第5,885,793号; 第5,916,771号; および第5,939,598号(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。また、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)、Medarex (NJ)およびGenpharm (San Jose, CA)のような企業が、前記と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに関わることができる。

40

【0074】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイドッド・セレクション(guided selection)」と称される技術を用いて製造することができる。このアプローチにおいては、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を導く(Jespersら, Bio/technology, 12:899-903, 1988)。

【0075】

50

特定の実施形態においては、該修飾抗体はin vivoでの治療および/または予防用途を有する。そのように修飾されうる治療用および予防用抗体の具体例は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染の患者の治療用のヒト化RSVモノクローナル抗体であるSYNAGIS(登録商標)(MedImmune, MD)、転移性乳癌の患者の治療用のヒト化抗HER2モノクローナル抗体であるHERCEPTIN(登録商標)(Trastuzumab)(Genentech, CA)、クローン病の患者の治療のためのキメラ抗TNFモノクローナル抗体であるREMICADE(登録商標)(インフリキシマブ(infliximab))(Centocor, PA)、血餅形成の予防のための血小板上の抗糖タンパク質IIb/IIIaであるREOPRO(登録商標)(アブシキマブ(abciximab))(Centocor)、急性腎同種移植拒絶の予防のための免疫抑制性ヒト化抗CD25モノクローナル抗体であるZENAPAX(登録商標)(ダクリズマブ(daclizumab))(Roche Pharmaceuticals, Switzerland)を包含する。他の具体例としては以下のものが挙げられる: ヒト化抗CD18 F(ab')₂(Genentech)、ヒト化抗CD18 F(ab')₂(Celltech, UK)であるCDP860、CD4に融合した抗HIV gp120抗体であるPRO542(Progenics/Genzyme Transgenics)、ヒト抗B型肝炎ウイルス抗体であるOstavir(Protein Design Lab/Novartis)、ヒト化抗CMV IgG1抗体であるPROTOVIR(商標)(Protein Design Lab/Novartis)、マウス抗TNF F(ab')₂であるMAK-195(SEGARD)(Knoll Pharma/BASF)、抗CD14抗体であるIC14(ICOS Pharm)、ヒト化抗VEGF IgG1抗体(Genentech)、マウス抗CA 125抗体であるOVAREX(商標)(Altarex)、マウス抗17-1A細胞表面抗原IgG2a抗体であるPANOREX(商標)(Glaxo Wellcome/Centocor)、マウス抗イディオタイプ(GD3エピトープ)IgG抗体であるBEC2(ImClone System)、キメラ抗EGFR IgG抗体であるIMC-C225(ImClone System)、ヒト化抗-V 3インテグリン抗体であるVITAXIN(商標)(Applied Molecular Evolution/MedImmune)、ヒト化抗CD52 IgG1抗体であるCampath 1H/LDP-03(Leukosite)、ヒト化抗CD33 IgG抗体であるSmart M195(Protein Design Lab/Kanebo)、キメラ抗CD20 IgG1抗体であるRITUXAN(商標)(IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku)、ヒト化抗CD22 IgG抗体であるLYMPHOCIDE(商標)(Immunomedics)、ヒト化抗HLA抗体であるSmart ID 10(Protein Design Lab); ONCOLYM(商標)(Lym-1)は放射能標識マウス抗HLA DIAGNOSTIC REAGENT抗体である(Techniclone); ABX-IL8はヒト抗IL8抗体である(Abgenix); 抗CD11aはヒト化IgG1抗体である(Genentech/Xoma); ICM3はヒト化抗ICAM3抗体である(ICOS Pharm); IDEC-114は霊長類化抗CD80抗体である(IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN(商標)は放射能標識マウス抗CD20抗体である(IDEC/Schering AG); IDEC-131はヒト化抗CD40L抗体である(IDEC/Eisai); IDEC-151は霊長類化抗CD4抗体である(IDEC); IDEC-152は霊長類化抗CD23抗体である(IDEC/Seikagaku); SMART抗CD3はヒト化抗CD3 IgGである(Protein Design Lab); 5G1.1はヒト化抗補体因子5(C5)抗体である(Alexion Pharm); D2E7はヒト化抗TNF-抗体である(CAT/BASF); CDP870はヒト化抗TNF-Fabフラグメントである(Celltech); IDEC-151は霊長類化抗CD4 IgG1抗体である(IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4はヒト化抗CD4 IgG抗体である(Medarex/Eisai/Genmab); CDP571はヒト化抗TNF-IgG4抗体である(Celltech); LDP-02はヒト化抗 4 7抗体である(LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4Aはヒト化抗CD4 IgG抗体である(Ortho Biotech); ANTOVA(商標)はヒト化抗CD40L IgG抗体である(Biogen); ANTEGREN(商標)はヒト化抗VLA-4 IgG抗体である(Elan); MDX-33はヒト抗CD64(Fc R)抗体である(Medarex/Centecor); SCH55700はヒト化抗IL-5 IgG4抗体である(Celltech/Schering); SB-240563およびSB-240683はそれぞれヒト化抗IL-5およびIL-4抗体である(SmithKline Beecham); rhuMab-E25はヒト化抗IgE IgG1抗体である(Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); IDEC-152は霊長類化抗CD23抗体である(IDEC Pharm); ABX-CBLはマウス抗CD-147 IgM抗体である(Abgenix); BTI-322はラット抗CD2 IgG抗体である(Medimmune/Bio Transplant); Orthoclone/OKT3はマウス抗CD3 IgG2a抗体である(ortho Biotech); SIMULECT(商標)はキメラ抗CD25 IgG1抗体である(Novartis Pharm); LDP-01はヒト化抗 2インテグリンIgG抗体である(LeukoSite); 抗LFA-1はマウス抗CD18 F(ab')₂である(Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152はヒト抗TGF-₂抗体である(Cambridge Ab Tech); およびCorsevin Mはキメラ抗VII因子抗体である(Centocor)。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

特定の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載の突然変異の1以上を有しRSVに免疫特異的に結合する修飾された抗体（例えば、SYNAGIS（登録商標））を提供する。本発明はまた、表IIIに記載の任意の可変重鎖（VH）および/または可変軽鎖（VL）ドメインのアミノ酸配列を有するVHおよび/またはVLドメインを含み本明細書に記載の突然変異の1以上を有する修飾された抗体を提供する。本発明は更に、表IIに記載の相補性決定領域（CDR）の1以上または表IIIに記載の1以上のVH CDRおよび/またはVL CDRのアミノ酸配列を有する1以上のVH CDRおよび/または1以上のVL CDRを含む抗RSV抗体を含む（ここで、太字または下線で示した残基の1以上は、好ましくは、RSVに対する該抗体の親和性を増加させるアミノ酸置換を有する）。特定の実施形態においては、修飾される抗体は、AFFF、p12f2、p12f4、p11d4、A1e109、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L215B10、A13A11、A1H5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52Sである。

10

【表 2】

表 II

SYNAGIS(登録商標)の CDR 配列

CDR	配列	配列番号(SEQ ID NO):
VH1	TSGMSVG	1
VH2	DIWWDDK <u>KD</u> YNPSLKS	2
VH3	<u>SM</u> ITN <u>WY</u> FDV	3
VL1	<u>KCOL</u> SVGYMH	4
VL2	D <u>T</u> SKLAS	5
VL3	FQGS <u>GYP</u> ET	6

20

【 0 0 7 7 】

30

【表 3】

表 III
抗 RSV 抗体

抗体名称	VH ドメイン SEQ ID NO:7	VH CDR1 (SEQ ID NO:1)	VH CDR2 (SEQ ID NO:2)	VH CDR3 (SEQ ID NO:3)	VL ドメイン SEQ ID NO:8	VL CDR1 (SEQ ID NO:4)	VL CDR2 (SEQ ID NO:5)	VL CDR3 (SEQ ID NO:6)
SYNAGIS	SEQ ID NO:7	TSGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWWDKDKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	SMTTNYFDV (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:8	KCQLSVGYMH (SEQ ID NO:4)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:6)
AFF	SEQ ID NO:9	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDKDKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	SMTTNYFDV (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:13	SASSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTFKLAS (SEQ ID NO:15)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:16)
p12f2	SEQ ID NO:17	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWWDKDKDYNPSLKS (SEQ ID NO:19)	DMENYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:21	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTEVLSS (SEQ ID NO:23)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:24)
p12f4	SEQ ID NO:24	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWWDGKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:25)	DMENYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:26	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTFGLPS (SEQ ID NO:27)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:28)
p11d4	SEQ ID NO:28	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWWDGKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:25)	DMENYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:30	SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DTMRLAS (SEQ ID NO:32)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:33)
Ale109	SEQ ID NO:33	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDGKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:25)	DMENYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:34	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTFKLSS (SEQ ID NO:35)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:36)
A12a6	SEQ ID NO:36	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDGKKDYNPSLKD (SEQ ID NO:37)	DMENYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:38	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTFKLSS (SEQ ID NO:40)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:41)
A13c4	SEQ ID NO:40	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDGKKSYNPSLKD (SEQ ID NO:41)	DMENYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:42	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTMYQSS (SEQ ID NO:43)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:44)
A17d4	SEQ ID NO:44	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDKKS SYNPSLKD (SEQ ID NO:45)	DMENYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:46	LPSSRVGYMH (SEQ ID NO:47)	DTMYQSS (SEQ ID NO:48)	FQSGYPFT (SEQ ID NO:49)

10

20

30

40

抗体名称	VH ドメイン	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL ドメイン	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
A4B4	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K HYNPSL KD (SEQ ID NO:19)	DMITN F YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:49	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTEFLDS (SEQ ID NO:50)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
A8C7	SEQ ID NO:51	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K SYNPSL KD (SEQ ID NO:45)	DMITN W YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:52	SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DTRYQSS (SEQ ID NO:53)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
1X-493LJFR	SEQ ID NO:7	TSGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	SMITN W YFDV (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:54	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
H3-3F4	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN W YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:56	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
M3H9	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN W YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:56	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTRYQTS (SEQ ID NO:57)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
Y10H6	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN W YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:58	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTRYLSS (SEQ ID NO:59)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
DG	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN F YFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:56	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
APFF(1)	SEQ ID NO:9	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	SMITN F YFDV (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:60	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS F YPFT (SEQ ID NO:61)
6H8	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN F YFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:62	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEK L TS (SEQ ID NO:63)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
L1-7E5	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN F YFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:64	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
L215B10	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K DYNPSL KS (SEQ ID NO:2)	DMITN F YFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:65	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEFLAS (SEQ ID NO:66)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)
A13A11	SEQ ID NO:67	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWWDK K HYNPSL KD (SEQ ID NO:19)	DMITN W YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:68	SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DTRYRHSS (SEQ ID NO:69)	FQGS G YPFT (SEQ ID NO:6)

抗体名称	VH ドメイン SEQ ID NO:70	VH CDRI TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	VH CDR2 DIWWDGKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:25)	VH CDR3 DMINWYFDV (SEQ ID NO:29)	VL ドメイン SEQ ID NO:71	VL CDRI SLSSVGYMH (SEQ ID NO:72)	VL CDR2 DTFFHRS (SEQ ID NO:73)	VL CDR3 FQGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4(1)	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:19)	DMINWYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:74	SASSR V GYMH (SEQ ID NO:39)	DTLL L DS (SEQ ID NO:75)	FQGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4LIF R-S28R	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:19)	DMINWYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:11	SASSR V GYMH (SEQ ID NO:39)	DTSK L AS (SEQ ID NO:5)	FQGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4- F52S	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:19)	DMINWYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:76	SASSR V GYMH (SEQ ID NO:39)	DTSE L DS (SEQ ID NO:77)	FQGSGYPFT (SEQ ID NO:6)

10

20

30

40

【 0 0 7 8 】

他の実施形態においては、該抗体は、修飾された抗 v_3 抗体、好ましくは、Vitaxin

50

抗体（HuseらのPCT公開WO 98/33919およびWO 00/78815（それらの両方の全体を参照により本明細書に組み入れることとする）の両者を参照されたい）である。

【0079】

野生型より長い半減期を有する本発明の修飾IgGはまた、抗原結合部位、Fc-受容体結合部位または補体結合部位のような生物活性部位が、野生型と比較してそのような活性を増加または減少させるよう遺伝子工学により修飾されたIgGを包含しうる。

【0080】

in vivo半減期を増加させるためのこれら及び他の治療用抗体の修飾は、該治療用抗体の、より低い有効量および/またはより少ない頻度の投与を可能にする。in vivo半減期を増加させるためのそのような修飾は、診断用免疫グロブリンの改良に有用であり、十分な診断感度を達成する、より低い用量の投与を可能にしうる。

10

【0081】

本発明はまた、ヒンジ-Fc領域とFcRn受容体との相互作用に關与することが確認されたアミノ酸残基中の1以上の修飾（すなわち、置換、欠失または挿入）を有するヒンジ-Fc領域またはそのフラグメント（好ましくはヒトのもの）と生物活性分子とを含む融合タンパク質を提供する。特に、本発明は、アミノ酸残基251-256、285-290および/またはアミノ酸残基308-314中の1以上の修飾を有するCH2ドメインに及び/又はアミノ酸残基385-389および/または428-436中の1以上の修飾（特に、前記のアミノ酸置換の1以上）を有するCH3ドメインに組換え的に融合した又は化学的に結合（共有または非共有結合の両方）した生物活性分子を含む融合タンパク質を提供する。そのような修飾の1以上を有する定常ドメインまたはそのフラグメントへの生物活性分子の融合は、該生物活性分子のin vivo半減期を増加させる。

20

【0082】

好ましい実施形態においては、本発明の融合タンパク質は、アミノ酸残基251-256、285-290および/またはアミノ酸残基308-314中の1以上のアミノ酸残基の置換を有するCH2ドメインに及び/又はアミノ酸残基385-389および/または428-436中の1以上の修飾を有するCH3ドメインに組換え的に融合した又は化学的に結合した生物活性分子を含む。ある実施形態においては、融合タンパク質は、アミノ酸残基253、310および313が修飾されていないIgG分子のCH2ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、融合タンパク質は、アミノ酸残基388、429、430、431、432および435が修飾されていないIgG分子のCH3ドメインを含む。

30

【0083】

生物活性分子は、当業者に公知の任意のポリペプチドまたは合成薬物でありうる。好ましくは、生物活性分子は、少なくとも5、好ましくは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸残基よりなるポリペプチドである。生物活性ポリペプチドの具体例は、種々の型の抗体、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IFN- α 、IFN- β およびIFN- γ ）、細胞接着分子（例えば、CTLA4、CD2およびCD28）、リガンド（例えば、TNF- α 、TNF- β および抗血管新生因子、例えばエンドスタチン）、受容体、抗体および増殖因子（例えば、PDGF、EGF、NGFおよびKGF）を包含するが、これらに限定されるものではない。

40

【0084】

生物活性分子はまた、細胞毒素（例えば、静細胞剤または殺細胞剤）、治療剤または放射性元素（例えば、放射体、放射体など）のような治療用部分でありうる。静細胞剤または殺細胞剤の具体例は、バクリタクソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログを包含するが、これらに

50

限定されるものではない。治療剤は、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロルエタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧称ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン））、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC）および抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンプラスチン）を包含するが、これらに限定されるものではない。

10

【0085】

本発明はまた、増加した親和性を有する修飾されたFcRn結合部位を含有する本発明の修飾IgGまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、および該ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。さらに、本発明は、本発明の修飾IgGをコードするポリヌクレオチドに、ストリンジェントな又はより低いストリンジェントの条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0086】

修飾IgGのヌクレオチド配列およびそれをコードするポリヌクレオチドは、一般的なDNA配列決定法、例えばそれぞれジデオキシチェインターミネーション法（Sanger配列決定法）およびオリゴヌクレオチドプライミングとPCRとの組合せを含む当技術分野で公知の任意の方法により得ることができる。

20

【0087】

5.2 免疫グロブリン分子のヒンジ-Fc領域中の突然変異の同定

定常ドメインのアミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436中の1以上の修飾は、当業者に公知の任意の技術を用いて導入することができる。アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436中の1以上の修飾を有する定常ドメインまたはそのフラグメントは、例えば、FcRn受容体に対する増加した親和性を有する定常ドメインまたはそのフラグメントを同定するための結合アッセイによりスクリーニングすることができる（例えば、後記第5.11節に記載のとおり）。FcRn受容体に対する定常ドメインまたはそのフラグメントの親和性を増加させる該ヒンジ-Fcドメインまたはそのフラグメント中の修飾を抗体中に導入して、該抗体のin vivo半減期を増加させることが可能である。さらに、FcRnに対する定常ドメインまたはそのフラグメントの親和性を増加させる定常ドメインまたはそのフラグメント中の修飾を生物活性分子に融合して、該生物活性分子のin vivo半減期を増加させ、好ましくは、該分子のバイオアベイラビリティを改変（増強または減弱）する（例えば、粘膜表面（または他の標的組織）（例えば、肺）への輸送を増加または減少させる）ことができる。

30

【0088】

5.2.1. 突然変異誘発

突然変異誘発は、修飾される抗体の定常ドメインまたはそのフラグメント（例えば、CH2またはCH3ドメイン）の配列中の1以上の修飾を有するオリゴヌクレオチドの安定化を含む（これらに限定されるものではない）当技術分野で公知の技術のいずれかに従い行うことができる。部位特異的突然変異誘発は、所望の突然変異のDNA配列と、横断する欠失結合部の両側で安定な二本鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列複雑度のプライマー配列を与えるのに十分な数の隣接ヌクレオチドとをコードする特異的オリゴヌクレオチド配列の使用により、突然変異体の産生を可能にする。典型的には、改変される配列の結合部の両側に約10～約25以上の残基を有する約17～約75ヌクレオチド以上の長さのプライマーが好ましい。突然変異体のライブラリーを作製するために、1以上の位置に種々の異なる突然変異を導入する多数のそのようなプライマーを使用することができる。

40

【0089】

部位特異的突然変異誘発の技術は、種々の刊行物（Kunkelら、Methods Enzymol., 154:

50

367-82,1987 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)) に例示されているとおり当技術分野で良く知られている。一般には、部位特異的突然変異誘発は、まず、所望のペプチドをコードするDNA配列を配列中に含む一本鎖ベクターを得るか又は該配列を含む二本鎖ベクターの2つの鎖を融解解離させることにより行う。所望の突然変異配列を保持するオリゴヌクレオチドプライマーを、一般には合成的に製造する。ついでこのプライマーを一本鎖ベクターでアニーリングし、T7 DNAポリメラーゼのようなDNA重合酵素に付して、該突然変異保持鎖の合成を完成させる。このようにしてヘテロ二本鎖が形成され、ここで、一方の鎖は元の非突然変異配列をコードしており、もう一方の鎖は所望の突然変異を保持する。ついでこのヘテロ二本鎖ベクターを使用して大腸菌 (*E. coli*) 細胞のような適当な細胞を形質転換またはトランスフェクトし、該突然変異配列配置を保持する組換えベクターを含むクローンを選択する。理解されるとおり、該技術は、典型的には、一本鎖および二本鎖の両方の形態で存在するファージベクターを用いる。部位特異的突然変異誘発に有用な典型的なベクターは、M13ファージのようなベクターを包含する。これらのベクターは容易に商業的に入手可能であり、それらの使用は概ね当業者に良く知られている。また、関心のある遺伝子をプラスミドからファージへ導入する工程を省く部位特異的突然変異誘発においては、二本鎖プラスミドが常套的に使用される。

10

【0090】

あるいは、Taq DNAポリメラーゼのような商業的に入手可能な熱安定酵素と共にPCR (商標) を用いて、突然変異誘発性オリゴヌクレオチドプライマーを増幅DNA断片中に組込むことが可能であり、ついでそれを適当なクローニングまたは発現ベクター中にクローニングすることができ。例えば、PCR (商標) 媒介突然変異誘発法については、Tomicら, *Nucleic Acids Res.*, 18 (6):1656,1987およびUpenderら, *Biotechniques*, 18 (1): 29-30, 32,1995 (それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい。また、熱安定ポリメラーゼに加えて熱安定リガーゼを使用するPCR (商標) を用いてリン酸化突然変異誘発性オリゴヌクレオチドを増幅DNA断片中に組込み、ついでそれを適当なクローニングまたは発現ベクター中にクローニングすることができる (例えば、Michael, *Biotechniques*, 16 (3): 410-2,1994 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい)。

20

【0091】

抗体のFcドメインまたはそのフラグメントの配列変異体を製造するための当業者に公知の他の方法を用いることが可能である。例えば、抗体の定常ドメインまたはそのフラグメントのアミノ酸配列をコードする組換えベクターをヒドロキシルアミンのような突然変異誘発剤で処理して、配列変異体を得ることができる。

30

【0092】

5.2.2. パニング

アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および/または428-436中に1以上の修飾を有する定常ドメインまたはそのフラグメントを発現するベクター (特にファージ) をスクリーニングして、FcRnに対する増加した親和性を有する定常ドメインまたはそのフラグメントを同定して、ファージの集団から最高親和性結合体を選び出すことが可能である。アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および/または428-436中に1以上の修飾を有する定常ドメインまたはそのフラグメントの、FcRnへの結合を分析するために使用しうるイムノアッセイは、ラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素免疫検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイおよび蛍光イムノアッセイを包含するが、それらに限定されるものではない。そのようなアッセイは常套的なものであり、当技術分野で良く知られている (例えば、Ausubelら編, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい)。典型的なイムノアッセイは後記で簡潔に説明される (がそれらに限定されるものではない)。また、アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および/または428-436中に1以上の修飾を有する定常ドメインまたはそのフラグメントの、FcRnへの結合速度および解離速度を測定するために、BIAcore速度論的分析を用いる

40

50

ことができる。BIAcore速度論的分析は、アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および/または428-436中に1以上の修飾を有する定常ドメインまたはそのフラグメントの、チップからの結合および解離を、その表面上の固定化FcRnで分析することを含む(第5.1節および後記実施例を参照されたい)。

【0093】

5.2.3. 配列決定

アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および/または428-436中に1以上の修飾を有する定常ドメインまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を直接的に配列決定するためには、当技術分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを用いることができる。配列決定反応の具体例は、MaximおよびGilbert (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 560, 1977) またはSanger (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463, 1977) により開発された技術に基づくものを包含する。また、マスペクトロメトリー(例えば、PCT公開WO 94/16101, Cohenら, Adv. Chromatogr., 36:127-162, 1996およびGriffinら, Appl. Biochem. Biotechnol., 38:147-159, 1993を参照されたい)を含む種々の自動配列決定法のいずれかを用いることも意図される(Bio/Techniques, 19: 448, 1995)。

【0094】

5.3 抗体の組換え製造方法

本発明の抗体またはそのフラグメントは、抗体の合成のための当技術分野で公知の任意の方法、特に、化学合成または好ましくは組換え発現技術により製造することができる。

【0095】

抗体をコードするヌクレオチド配列は、当業者に入手可能な任意の情報(すなわち、Genbank、文献または常套的なクローニング)から得ることができる。特定の抗体またはそのエピトープ結合性フラグメントをコードする核酸を含有するクローンが入手可能でないが、該抗体分子またはそのエピトープ結合性フラグメントの配列が公知である場合には、免疫グロブリンをコードする核酸を化学的に合成したり、あるいは該配列の3'および5'末端にハイブリダイズしうる合成プライマーを使用するPCR増幅により、または例えば該抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングにより、適当な入手源(例えば、抗体を発現するよう選択されたハイブリドーマ細胞のような該抗体を発現する任意の組織または細胞から作製されたcDNAライブラリーまたは抗体cDNAライブラリー、あるいは該組織または細胞から単離された核酸、好ましくはポリA⁺ RNA)から得ることが可能である。ついで、PCRにより得られた増幅された核酸を、当技術分野で良く知られた任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクター中にクローニングすることができる。

【0096】

該抗体のヌクレオチド配列を決定したら、例えば、該抗体のエピトープ結合性ドメイン領域(好ましくは、FcRnとの相互作用に関与する該抗体のヒンジ-Fc領域)中にアミノ酸の置換、欠失および/または挿入を導入することにより、異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製するために、ヌクレオチド配列の操作のための当技術分野で良く知られた方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCRなど(例えば、Sambrookら, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; およびAusubelら編, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(それらの両方の全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載の技術を参照されたい)を用いて、該抗体のヌクレオチド配列を操作することができる。好ましい実施形態においては、アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および428-436中に1以上の修飾を有する抗体を作製する。

【0097】

抗体の組換え発現は、該抗体をコードするヌクレオチド配列を含有する発現ベクターの構築を要する。抗体分子または抗体の重もしくは軽鎖またはそれらの一部(好ましくは、重または軽鎖可変領域を含有するものであるが必ずしもそれが必要なわけではない)をコードするヌクレオチド配列を得たら、当技術分野で良く知られた技術を用いる組換えDNA

10

20

30

40

50

技術により、該抗体分子の製造のためのベクターを製造することができる。したがって、抗体コードヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによるタンパク質の製造方法が本明細書に記載されている。抗体コード配列と適当な転写および翻訳制御シグナルとを含有する発現ベクターを構築するためには、当業者に良く知られた方法を用いることができる。これらの方法は、例えば、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えを包含する。したがって、本発明は、FcRnとの相互作用に關与するアミノ酸残基中に1以上の修飾を有する抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでなる複製可能なベクターを提供する（例えば、PCT公開WO 86/05807；PCT公開WO 89/01036；および米国特許第5,122,464号を参照されたい）。重鎖可変領域、軽鎖可変領域、該重鎖および軽鎖の両方の可変領域、該重鎖および/または軽鎖可変領域のエピトープ結合性フラグメント、あるいは抗体の相補性決定領域（CDR）の1以上をコードするヌクレオチド配列を、そのような発現用ベクター中にクローニングすることができる。

【0098】

該発現ベクターを通常の技術により宿主細胞中に導入し、ついで該トランスフェクト化細胞を通常の技術により培養して、FcRnに対する増加した親和性および増加した*in vivo*半減期を有する抗体を得る。したがって、本発明は、アミノ酸残基251-256、285-290、308-314、385-389および/または428-436中に1以上の修飾を有する抗体、定常ドメインまたはそのFcRn結合性フラグメントをコードするポリヌクレオチド（好ましくは、これは、機能しうる形で異種プロモーターに連結されている）を含有する宿主細胞を含む。

【0099】

本発明の抗体分子を発現させるためには、種々の宿主-発現ベクター系を使用することができる。そのような宿主-発現系は、関心のあるコード配列が産生され次いで精製されるビヒクルを意味するだけでなく、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされた場合に本発明の抗体分子を*in situ*で発現しうる細胞をも意味する。これらは、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、*E. coli*および*B. subtilis*）、抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*および*Pichia*）のような微生物、抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、抗体コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された又は組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）およびタバコモザイクウイルス（TMV））に感染した植物細胞系、および哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター）又は哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を保持する哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3およびNSO細胞）を包含するが、それらに限定されるものではない。好ましくは、大腸菌のような細菌細胞、およびより好ましくは、特に全組換え抗体分子の発現には真核細胞を、組換え抗体分子の発現に使用する。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間（major intermediate）初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組合せたチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳類細胞は、抗体のための有効な発現系である（Foeckingら、*Gene*, 45: 101, 1986, およびCockettら、*Bio/Technology*, 8: 2, 1990）。

【0100】

細菌系においては、発現される抗体分子に意図される用途に応じて多数の発現ベクターが有利に選択されうる。例えば、抗体分子の医薬組成物の製造のために大量のそのようなタンパク質を製造したい場合には、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましいかもしれない。そのようなベクターは、大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpUR278（Rutherら、*EMBO*, 12: 1791, 1983）（この場合、融合タンパク質が産生されるよう、該抗体コード配列は個々に、*lacZ*コード領域とインフレームで該ベクター中に連結されうる）、およびpINベクター（Inouye および Inouye, *Nucleic Acids Res*

10

20

30

40

50

., 13: 3101-3109, 1985ならびにVan Heeke およびSchuster, J. Biol. Chem., 24: 5503-5509, 1989) を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0101】

昆虫細胞系においては、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして、*Autographa californica*核多角体病ウイルス (AcNPV) を使用する。該ウイルスは*Spodoptera frugiperda*中で増殖する。該抗体コード配列を該ウイルスの非必須領域 (例えば、多角体遺伝子) 中に個々にクローニングし、AcNPVプロモーター (例えば、多角体プロモーター) の制御下に配置することができる。

【0102】

哺乳類宿主細胞においては、本発明の抗体分子を発現させるために、ウイルスに基づく多数の発現系を使用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合には、関心のある抗体コード配列をアデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターおよびトリパーティトリガー配列) に連結しすることができる。ついでこのキメラ遺伝子を *in vitro* または *in vivo* 組換えによりアデノウイルスゲノム中に挿入することができる。該ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1またはE3) 中での挿入は、感染宿主中で該抗体分子を発現しうる生存可能な組換えウイルスを与える (例えば、Logan および Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 355-359, 1984 を参照されたい)。挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のためには、特異的開始シグナルも必要ながある。これらのシグナルはATG開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、該全インサートの翻訳が保証されるためには、該開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームと同調していなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然物および合成物の両方を含む種々の起源に由来しうる。発現の効率は、適当な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含有させることにより向上させることが可能である (例えば、Bitterら, Methods in Enzymol., 153: 516-544, 1987 を参照されたい)。

【0103】

また、該抗体配列の発現をモジュレーションし又は所望の特定の状態で該抗体を修飾しプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のそのような修飾 (例えば、グリコシル化) およびプロセッシング (例えば、切断) は該抗体の機能に重要でありうる。種々の宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。発現された抗体の適切な修飾およびプロセッシングが保証されるよう、適当な細胞系または宿主系を選択することができる。この目的には、該遺伝子産物の一次転写産物の適当なプロセッシング、グリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用することができる。そのような哺乳類宿主細胞は、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138 および特に骨髄腫細胞、例えばNS0細胞および関連細胞系を包含するが、これらに限定されるものではない。例えば、Morrisonら, 米国特許第5,807,715号 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい。

【0104】

組換え抗体の長期的な高収率の製造のためには、安定な発現が好ましい。例えば、該抗体分子を安定に発現する細胞系を操作することができる。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用する代わりに、適当な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) により制御されるDNAおよび選択マーカーで宿主細胞を形質転換することができる。該外来DNAの導入の後、操作された細胞を強化培地中で1~2日間増殖させ、ついで選択培地に交換することができる。該組換えプラスミド中の選択マーカーは該選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体中に該プラスミドを安定に組み込みフォーカスを形成するまで増殖するのを可能にし、そしてそれをクローニングし、細胞系にまで増殖させることができる。この方法は、該抗体分子を発現する細胞系を操作するために有利に用いられうる。そのような操作された細胞系は、該抗体分子と直接的または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評

10

20

30

40

50

価において特に有用であり得る。

【0105】

以下のものを含む（それらに限定されるものではない）多数の選択系を用いることが可能であり、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら, Cell, 11:223, 1977）、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（SzybalskaおよびSzybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202, 1992）およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら, Cell, 22:8-17, 1980）遺伝子は、それぞれ tk^{-} 、 $hgprt^{-}$ または $aprt^{-}$ 細胞において使用することができる。また、以下の遺伝子に関する選択の基礎として、代謝拮抗物質耐性を用いることができる： $dhfr$ 、これはメトトレキサートに対する耐性を付与する（Wiglerら, Natl. Acad. Sci. USA, 77:357, 1980およびO'Hareら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527,1981）； gpt 、これはミコフェノール酸に対する耐性を付与する（MulliganおよびBerg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072,1981）； neo 、これはアミノグリコシドG418に対する耐性を付与する（WuおよびWu, Biotherapy, 3: 87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596,1993; Mulligan, Science, 260: 926-932,1993; ならびにMorganおよびAnderson, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217,1993; ならびにMay, TIB TECH, 11 (5): 155-215,1993）、および $hygro$ 、これはハイグロマイシンに対する耐性を付与する（Santerreら, Gene, 30: 147,1984）。所望の組換えクローンを選択するためには、組換えDNA技術の当技術分野で一般に公知の方法を常套的に適用することが可能であり、そのような方法は、例えば、Ausubelら（編）、1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; 第12章および第13章, Dracopoliら（編）、1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; ならびにColberre-Garapinら, J. Mol. Biol., 150: 1,1981（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。

【0106】

抗体分子の発現レベルはベクターの増幅により増加させることができる（総説としては、BebbingtonおよびHentschel, 1987, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. Academic Press, New Yorkを参照されたい）。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能な場合には、宿主細胞の培養内に存在するインヒビターのレベルの増加が該マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。該増幅領域は該抗体遺伝子と結合しているため、該抗体の産生も増加する（Crouseら, Mol. Cell. Biol., 3: 257,1983）。

【0107】

該宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター（第1ベクターは重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2ベクターは軽鎖由来ポリペプチドをコードする）でコトランスフェクトすることができる。それらの2つのベクターは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同じ選択マーカー、または両方のプラスミドの維持を保證する異なる選択マーカーを含有しうる。あるいは、重鎖および軽鎖の両方のポリペプチドをコードしておりそれらが発現しうる単一のベクターを使用することができる。そのような場合には、過剰な毒性遊離重鎖を避けるために、該軽鎖は該重鎖の前に配置されるべきである（Proudfoot, Nature, 322: 52,1986; およびKohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 2197,1980）。該重鎖および軽鎖のコード配列はcDNAまたはゲノムDNAを含みうる。

【0108】

本発明の抗体分子が組換え発現により産生されたら、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、特に、プロテインA精製後の特異的抗原に関するアフィニティークロマトグラフィー、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術により、それを精製することができる。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を促進する本明細書に記載の又は当技術分野で公知の異種ポリペプチド配列に融

合させることができる。

【0109】

5.3.1. 抗体コンジュゲート

本発明は、融合タンパク質を生成するよう異種ポリペプチド（すなわち、無関係なポリペプチドまたはその一部、好ましくは、該ポリペプチドの少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸）に組換え的に融合した又は化学的に結合（コンジュゲーション）（共有結合および非共有結合の両方を含む）した抗体を含む。該融合は必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じうる。また、異種ポリペプチドに融合または結合した抗体は、当技術分野で公知の方法を用いる *in vitro* イムノアッセイおよび精製方法において使用することができる。例えば、PCT公開番号WO 93/21232; EP 439,095; Naramuraら, *Immunol. Lett.*, 39: 91-99, 1994; 米国特許第5,474,981号; Gilliesら, *PNAS*, 89: 1428-1432, 1992; および Fellら, *J. Immunol.*, 146: 2446-2452, 1991（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。

10

【0110】

抗体はマーカ配列、例えば精製を促進するペプチドに融合させることが可能である。好ましい実施形態においては、該マーカアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）において提供されるタグのようなヘキサヒスチジンペプチド（それらの多くは商業的に入手可能である）である。例えば Gentsら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 821-824, 1989に記載されているとおり、ヘキサヒスチジンは、該融合タンパク質の簡便な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する赤血球凝集素「HA」タグ（Wilsonら, *Cell*, 37: 767 1984）、および「flag」タグ（Knappikら, *Biotechniques*, 17 (4): 754-761, 1994）を包含するが、これらに限定されるものではない。

20

【0111】

本発明はまた、*in vivo*半減期を増加させたい診断もしくは治療剤または任意の他の分子に結合した抗体を含む。該抗体は、例えば、与えられた治療計画の有効性を判定するために、例えば、臨床試験法の一部として疾患、障害または感染の発生または進行をモニターするために診断的に使用することができる。検出は、検出可能な物質に該抗体を結合させることにより容易にすることができる。検出可能な物質の具体例は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、陽電子放射性金属、および非放射性常磁性金属イオンを包含する。検出可能な物質は、当技術分野で公知の技術を用いて該抗体に直接的に又は中間物（例えば、当技術分野で公知のリンカー）を介して間接的に結合または連結させることができる。本発明に従い診断用に使用する抗体に結合されうる金属イオンに関しては、例えば、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適当な酵素の具体例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを包含し、適当な補欠分子族複合体の具体例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを包含し、適当な蛍光物質の具体例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンを包含し、発光物質の具体例はルミノールを包含し、生物発光物質の具体例はルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを包含し、適当な放射性物質の具体例は ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を包含する。

30

【0112】

抗体は、細胞毒素（例えば、静細胞剤または殺細胞剤）、治療剤または放射性元素（例えば、放射体、放射体など）のような治療用部分に結合させることができる。細胞毒素または細胞傷害剤は、細胞に有害な任意の物質を包含する。具体例は、パクリタクソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エ

40

50

トポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログを包含する。治療剤は、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロルエタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（旧称ダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン））、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC）および抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）を包含するが、これらに限定されるものではない。

10

【0113】

さらに、抗体は、与えられた生物学的応答を修飾する治療剤または薬物部分に結合させることができる。治療剤または薬物部分は古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、該薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドでありうる。そのようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素またはジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン（IFN- α ）、 β -インターフェロン（IFN- β ）、神経成長因子（NGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）、アポトーシス剤（例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I（PCT公開番号WO 97/33899に開示されているとおり））、AIM II（PCT公開番号WO 97/34911を参照されたい）、Fasリガンド（Takahashiら、J. Immunol., 6: 1567-1574, 1994）およびVEGI（PCT公開番号WO 99/23105）、血栓剤または抗血管新生剤（例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン）のようなタンパク質；あるいは例えばリンホカイン（例えば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）および顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」））または増殖因子（例えば、成長ホルモン（「GH」））のような生物応答調節剤を包含しうる。

20

30

【0114】

そのような治療用部分を抗体に結合させるための技術は良く知られている。例えば、Arnonら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"（Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら（編）、1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.）；Hellstromら、"Antibodies For Drug Delivery"（Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinsonら（編）、1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.）；Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"（Monoclonal Antibodies'84 : Biological And Clinical Applications, Pincheraら（編）、1985, pp. 475-506）；"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"（Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら（編）、1985, pp. 303-16, Academic Press）；およびThorpeら、Immunol. Recombinant expression vector., 62: 119-58, 1982を参照されたい。

40

【0115】

単独で又は細胞傷害性（細胞毒性）因子および/またはサイトカインと共に投与される、治療用部分に結合した又は結合していない抗体またはそのフラグメントは、治療剤として使用することができる。

【0116】

あるいは、Segal, 米国特許第4,676,980号（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載のとおり抗体ヘテロコンジュゲートを形成させるために、抗体を二

50

次抗体に結合させることが可能である。

【0117】

また、抗体を固体支持体に結合させることが可能であり、それは標的抗原の精製またはイムノアッセイに特に有用である。そのような固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリビニルクロリドまたはポリプロピレンを包含するが、これらに限定されるものではない。

【0118】

5.4 融合タンパク質を生産する方法

融合タンパク質は標準的な組換えDNA技法または、例えばペプチド合成機の使用によるタンパク質合成技法によって生産することができる。例えば、ある融合タンパク質をコードする核酸分子は、自動DNA合成機を含む従来技法で合成することができる。あるいはまた、遺伝子断片のPCR増幅を、2つの連続的な遺伝子断片、それらは後にアニーリングされ再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成することができるが、それらの遺伝子断片の間に相補的なオーバーハングを生ずるアンカープライマーを用いて行うことができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons, 1992を参照せよ)。さらに、生物活性分子をコードする核酸を、Fcドメインまたはそのフラグメントを含んでいる発現ベクター中にクローン化してその生物活性分子が定常ドメインまたはそのフラグメントとインフレームで連結するようにすることができる。

【0119】

抗体の定常領域にポリペプチドを融合させるまたは結合させる方法は当業界では公知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号、第5,723,125号、第5,783,181号、第5,908,626号、第5,844,095号、および第5,112,946号；EP307,434；EP367,166；EP394,827；PCT公開WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631、およびWO 99/04813；Ashkenaziら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539, 1991；Trauneckerら, Nature, 331:84-86, 1988；Zhengら, J. Immunol., 154:5590-5600, 1995；およびVilら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341, 1992(これらはその全体を本明細書中に参照により組み入れる)を参照されたい。

【0120】

生物活性分子をコードするヌクレオチド配列は当業者であれば入手できる情報のいかなるものからでも得ることができ(例えば、Genbank、文献から、または日常行っているようなクローニングによって)、FcRnに対しての親和性を増大させた定常ドメインまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列は、本明細書に記載の技法を用いて産生させた突然変異体の配列分析によって決定することができ、またはGenbankもしくは文献から得ることができる。融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は適切な発現ベクター、すなわち、挿入された、タンパク質をコードする配列の転写と翻訳のために必要なエレメントを含んでいるベクター中に挿入することができる。タンパク質をコードする該配列を発現させるために、種々の宿主-ベクター系を本発明で用いることができる。そのような系としては限定はされないが、ウイルス(例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス、他)を感染させた哺乳類細胞系；ウイルス(例えばバキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系；酵母ベクターを含んでいる酵母などの微生物；またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換させた細菌が挙げられる。ベクターの発現エレメントはそれらの強度および特異性が様々である。用いる宿主-ベクター系に応じて、多数の好適な転写および翻訳エレメントのうちのいずれか1つを用いることができる。

【0121】

融合タンパク質の発現は当業界で既知のプロモーターまたはエンハンサーエレメントのいずれによっても制御することができる。融合タンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するために用いることのできるプロモーターとしては、限定はされないが、SV40初期プロモーター領域(BernoistとChambon, Nature, 290:304-310, 1981)、ラウス肉腫ウイルス

10

20

30

40

50

の3'の長い末端反復配列(long terminal repeat)中に含まれるプロモーター(Yamamotoら, Cell, 22:787-797, 1980)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:1441-1445, 1981)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら, Nature, 296:39-42, 1982)、テトラサイクリン(Tet)プロモーター(Gossenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1995); -ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroffら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-3731, 1978)またはtacプロモーター(DeBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25, 1983; また、「組換え細菌由来の有用なタンパク質(Useful proteins from recombinant bacteria)」, Scientific American, 242:74-94, 1980をも参照せよ)などの原核生物発現ベクター; ノパリンシクターゼプロモーター領域(Herrera-Estrellaら, Nature, 303:209-213, 1983)またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNA プロモーター(Gardnerら, Nucl. Acids Res., 9:2871, 1981)、および光合成酵素であるリブローズニリン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrellaら, Nature, 310:115-120, 1984)を含んでいる植物の発現ベクター; GAI 4 プロモーター、ADC(アルコール脱水素酵素)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターなどの酵母またはその他の真菌由来のプロモーターエレメント、ならびに下記の動物の転写制御領域(これらは組織特異性を示し、トランスジェニック動物で用いられてきたものである): 膵臓腺房細胞(pancreatic acinar cell)中で活性のあるエラストラーゼI遺伝子制御領域(Swiftら, Cell, 38:639-646, 1984; Ornitzら, 50:399-409, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986; MacDonald, Hepatology 7:425-515, 1987); 膵臓 細胞中で活性のあるインスリン遺伝子制御領域(Hanahan, Nature 315:115-122, 1985)、リンパ系細胞で活性のある免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedlら, Cell, 38:647-658, 1984; Adamesら, Nature, 318:533-538, 1985; Alexanderら, Mol. Cell. Biol., 7:1436-1444, 1987)、精巣、乳房、リンパ系および肥満細胞で活性のあるマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域(Lederら, Cell, 45:485-495, 1986)、肝臓で活性のあるアルブミン遺伝子制御領域(Pinkertら, Genes and Devel., 1: 268-276, 1987)、肝臓で活性のある α -フェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlaufら, Mol. Cell. Biol., 5:1639-1648, 1985; Hammerら, Science, 235:53-58, 1987)、肝臓で活性のある α -1-アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelseyら, Genes and Devel., 1:161-171, 1987)、骨髄性細胞で活性のある α -グロビン遺伝子制御領域(Moogramら, Nature, 315:338-340, 1985; Kolliasら, Cell, 46:89-94, 1986; 脳の希突起膠細胞で活性のあるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readheadら, Cell, 48:703-712, 1987); 骨格筋で活性のあるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani, Nature, 314:283-286, 1985); 神経細胞で活性のあるニューロン特異的エノラーゼ(NSE)(Morelliら, Gen. Virol., 80:571-83, 1999); 神経細胞で活性のある脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子制御領域(Tabuchiら, Biochem. Biophysic. Res. Comprising., 253:818-823, 1998); 星状細胞で活性のあるグリア線維酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein: GFAP)プロモーター(Gomesら, Braz. J. Med. Biol. Res., 32(5):619-631, 1999; Morelliら, Gen. Virol., 80:571-83, 1999)、ならびに視床下部で活性のあるゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域(Masonら, Science, 234:1372-1378, 1986)が挙げられる。

【 0 1 2 2 】

特定の1実施形態においては、融合タンパク質の発現は構成的プロモーターによって調節される。別の1実施形態においては、融合タンパク質の発現は誘導性プロモーターによって調節される。これらの実施形態に従えば、プロモーターは組織特異的プロモーターとすることができる。

【 0 1 2 3 】

特定の1実施形態においては、融合タンパク質をコードする核酸と機能的に連結されたプロモーター、1つ以上の複製起点、および任意で1つ以上の選択マーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)を含んでなるベクターが用いられる。

【 0 1 2 4 】

哺乳類の宿主細胞では、多数のウイルスに基づく発現系を用いることができる。アデノ

10

20

30

40

50

ウイルスが発現ベクターとして用いられる場合には、融合タンパク質をコードする配列はアデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび三部分からなる(tripartite)リーダー配列と連結することができる。次いでこのキメラ遺伝子を、*in vitro* または *in vivo* 組換えでアデノウイルスゲノム中に挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、E1またはE3領域)中へ挿入すると、感染した宿主中で生存可能で、かつ抗体分子を発現することができる組換えウイルスとなろう(LoganとShenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359, 1984を参照せよ)。挿入された融合タンパク質コード配列の効率的な翻訳には、特異的な開始シグナルも必要でありうる。そのようなシグナルには、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、インサート全体の翻訳を確実にを行うためには、該開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームと一致していなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源のものとすることができ、天然および合成のいずれのものとすることもできる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、その他を含ませることによって増強することができる(Bitterら, Methods in Enzymol., 153:516-544, 1987を参照されたい)。

【0125】

融合タンパク質をコードする遺伝子のインサート含んでいる発現ベクターは、次の3つの一般的なアプローチで同定することができる：(a)核酸ハイブリダイゼーション、(b)「マーカー」遺伝子機能の存在または不在、および(c)挿入された配列の発現。第1のアプローチでは、発現ベクター中の、融合タンパク質をコードする遺伝子の存在は、その融合タンパク質をコードする挿入された遺伝子と相同な配列を含んでなるプローブを用いて核酸ハイブリダイゼーションで検出することができる。第2のアプローチでは、ベクター中の、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の挿入によって起こる、特定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジinkinナーゼ活性、抗生物質耐性、形質転換表現型、バキュロウイルス封入体形成、その他)の存在または不在に基づいて、組換えベクター/宿主系を同定し、選択することができる。例えば、該融合タンパク質をコードしているヌクレオチド配列がそのベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入された場合には、該融合タンパク質をコードする遺伝子インサートを含んでいる組換え体はマーカー遺伝子機能の不在によって同定することができる。第3のアプローチでは、組換え発現ベクターはその組換え体によって発現された遺伝子産物(すなわち、融合タンパク質)をアッセイすることによって同定することができる。そのようなアッセイは例えば、*in vitro*アッセイ系でその融合タンパク質の物理的または機能的性質、例えば抗生物活性分子抗体との結合に基づいて行うことができる。

【0126】

さらに、挿入された配列の発現をモジュレートするか、または所望の特異的様式で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。特定のプロモーターからの発現を特定のインデューサーを存在させて増大させることができる；このように遺伝子工学的に産生させる融合タンパク質の発現を制御することができる。さらに、種々の宿主細胞は翻訳時および翻訳後のプロセッシングと修飾のための特徴的で特異的な機構を有している(例えば、糖鎖付加、タンパク質のリン酸化)。発現される外来タンパク質の所望の修飾とプロセッシングを確実にを行うために、適切な細胞系または宿主系を選択することができる。例えば、細菌系で発現させると糖鎖が付加されていない産物が産生されることとなり、酵母で発現させると糖鎖が付加された産物が産生されることとなろう。一次転写産物の適切なプロセッシング、遺伝子産物の糖鎖付加およびリン酸化のための細胞性機構を備えている真核生物の宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳類の宿主細胞としては、限定はされないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、および特に例えば、SK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZヒト神経芽細胞腫(Sugimotoら、J. Natl. Cancer Inst., 73:51-57, 1984)、SK-N-SHヒト神経芽細胞腫(Biochim. Biophys. Acta, 704:450-460, 1982)、Daoyヒト小脳髄芽腫(Heら、Cancer Res., 52:1144-1148, 1992)、DBT RG-05MG膠芽腫細胞(Kruseら、1992、In Vitro Cell. Dev. Biol., 28A:609-614, 1992)、

10

20

30

40

50

IMR-32ヒト神経芽細胞腫(Cancer Res., 30:2110-2118, 1970)、1321N1ヒト星状細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:4816, 1997)、MOG-G-CCMヒト星状細胞腫(Br. J. Cancer, 49:269, 1984)、U87MGヒト膠芽腫-星状細胞腫(Acta Pathol. Microbiol. Scand., 74:465-486, 1968)、A172ヒト膠芽腫(Olopadeら, Cancer Res., 52:2523-2529, 1992)、C6ラット神経膠腫細胞(Bendaら, Science, 161:370-371, 1968)、Neuro-2aマウス神経芽細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65:129-136, 1970)、NB41A3マウス神経芽細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:1184-1190, 1962)、SCPヒツジ脈絡叢(Bolinら, J. Virol. Methods, 48:211-221, 1994)、G355-5, PG-4ネコ正常星状細胞(Haapalaら, J. Virol., 53:27-833, 1985)、Mpfフェレット脳(Trowbridgeら, In Vitro, 18:952-960, 1982)、ならびに例えば, CRL7030およびHs578BstなどのCTX TNA2ラット正常大脳皮質(Radanyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6467-6471, 1992)などの正常細胞系などの神経細胞系が挙げられる。さらに、種々のベクター/宿主発現系が異なる程度でプロセッシング反応に影響を及ぼすことができる。

10

【0127】

長期にわたり高収率で組換えタンパク質を産生させるためには、安定な発現が好ましい。例えば、融合タンパク質を安定に発現する細胞系を操作することができる。ウイルス性の複製起点を含んでいる発現ベクターを用いるよりはむしろ、宿主細胞を適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位、その他)によって制御されているDNAと選択マーカーで形質転換することができる。外来DNAの導入後に、操作された細胞を1~2日間、富化培地で増殖させ、次いで選択培地に交換することができる。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、細胞がそのプラスミドを染色体中に安定に組み込み、増殖して細胞増殖巣を形成し、次いでそれがクローン化されて細胞系へと拡大させることができる。この方法は、区別して発現されるかまたは経路遺伝子タンパク質を発現する細胞系を操作するために有利に用いることができる。そのような操作された細胞系は、区別して発現された、または経路遺伝子タンパク質の内在性の活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニングおよび評価に特に有用でありうる。

20

【0128】

多数の選択系を用いることができ、そのようなものとしては、限定はされないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら, Cell, 11:223, 1997)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(SzybalskaとSzybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら, 1980, Cell, 22:817)遺伝子が挙げられ、それらの遺伝子はそれぞれtk-、hgrpt-、またはaprt-細胞で用いることができる。また、代謝拮抗物質耐性を次の遺伝子についての選択に基づいて用いることもできる: dhfr、これはメトトレキサートへの耐性を付与する(Wiglerら, Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980; O'Hareら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527, 1981); gpt、これはミコフェノール酸に対する耐性を付与する(MulliganとBerg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); neo、これはアミノグリコシドG-418に対する耐性を付与する(Colberre-Garapinら, J. Mol. Biol., 150:1, 1981); およびhygro、これはハイグロマイシンに対する耐性を付与する(Santerreら, Gene, 30:147, 1984)。

30

40

【0129】

本発明の融合タンパク質は組換え発現によって産生された場合には、タンパク質を精製する方法として当業界で知られている、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、とりわけプロテインAなどの特異的抗原に対するアフィニティー、およびサイズで分けるカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度、またはタンパク質を精製するためのその他の標準的な技法のいずれによっても精製することができる。

【0130】

5.5. 抗体の予防的および治療的使用

本発明は、疾患、障害、または感染に伴う症状を予防、治療、または改善するために、

50

抗体を動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与することを含む、抗体に基づく治療を包含する。本発明の予防用および治療用化合物は、限定はされないが、抗体、および抗体をコードする核酸を含む。抗体は当業界では公知の、または本明細書に記載の製薬上許容される組成物で提供することができる。

【0131】

疾患、障害、または感染のアンタゴニストとして機能する本発明の抗体は、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与することができる。例えば、ウイルス抗原とそれの宿主細胞受容体との間の相互作用を破壊する、または防止する抗体をウイルス感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために、動物、好ましくは哺乳類、および最も好ましくはヒトに投与することができる。

10

【0132】

特定の1実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、ウイルス抗原または細菌抗原がその宿主細胞受容体と結合することを、該抗体の不在下での抗原のその宿主細胞受容体との結合と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、防止する。別の1実施形態においては、抗体の組み合わせが、ウイルス抗原または細菌抗原がその宿主細胞受容体と結合することを、該抗体の不在下での抗原のその宿主細胞受容体との結合と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、防止する。好ましい1実施形態においては、該抗体はRSV感染を治療または予防するために用いられる。

20

【0133】

ウイルス抗原または細菌抗原がその宿主受容体と結合することを防止はしないが、ウイルスまたは細菌の複製を阻害またはダウンレギュレートする抗体はまた、ウイルス感染または細菌感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために投与することもできる。ウイルスまたは細菌の複製を阻害またはダウンレギュレートする抗体の能力は、本明細書に記載の技法またはその他の当業界では公知の技法によって測定することができる。例えば、ウイルスの複製の阻害またはダウンレギュレーションはその動物中のウイルス力価を検出することによって測定することができる。

30

【0134】

特定の1実施形態においては、抗体がウイルスの複製または細菌の複製を、該抗体の不在下でのウイルスの複製または細菌の複製と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、阻害またはダウンレギュレートする。別の1実施形態においては、抗体の組み合わせがウイルスの複製または細菌の複製を、該抗体の不在下でのウイルスの複製または細菌の複製と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、阻害またはダウンレギュレートする。

40

【0135】

抗体はまた、癌細胞の増殖または転移を防止、阻害、または低下させるためにも用いることができる。特定の1実施形態においては、抗体が癌細胞の増殖または転移を、該抗体の不在下での増殖または転移と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少

50

なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、阻害または低下させる。別の1実施形態においては、抗体の組み合わせが癌の増殖または転移を、該抗体の不在下での増殖または転移と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、阻害または低下させる。癌の例としては、限定はされないが、白血病(例えば、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病などの急性白血病)、新生物、腫瘍(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫)、重鎖病、転移、または制御されない細胞増殖を特徴とする任意の疾患または障害が挙げられる。

10

【0136】

抗体はまた、炎症性障害を有する動物、特に哺乳類が経験する炎症を低下させるために用いることができる。特定の1実施形態においては、抗体が動物の炎症を、該抗体が投与されないときの動物の炎症と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、低下させる。別の1実施形態においては、抗体の組み合わせが、動物の炎症を、該抗体が投与されないときの動物の炎症と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、低下させる。炎症性障害の例には、限定はされないが、関節リウマチ、脊椎関節症、炎症性腸疾患、および喘息が含まれる。

20

30

【0137】

特定の1実施形態においては、炎症(または癌)の治療に用いられる抗体は改変した抗₃抗体、好ましくはVitaxin抗体である(PCT公開WO 98/33919およびWO 00/78815(双方ともHuseらによる)を参照すればよく、これらの双方はその全体を本明細書中に参照により組み入れる)。

【0138】

抗体はまた、移植片の拒絶反応を防止するためにも用いることができる。抗体はまた、凝血塊形成を防止するために用いることもできる。さらに、免疫応答のアゴニストとして機能する抗体も、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与することができる。

40

【0139】

1種以上の抗原と免疫特異的に結合する1種以上の抗体を体内で局所的にまたは全身的に、治療剤として用いることができる。本発明の抗体はまた、他のモノクローナルもしくはキメラ抗体、またはリンホカインもしくは造血性成長因子(例えばIL-2、IL-3、およびIL-7など)と組み合わせることで有利に用いることができ、その組み合わせたものは、例えば、その抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増大させるのに役立つ。本発明の抗体はまた、他のモノクローナルもしくはキメラ抗体、またはリンホカインもしくは造血性成長因子(例えばIL-2、IL-3、およびIL-7など)と組み合わせることで有利に用いることができ、その組み合わせたものは、例えば、免疫応答を増大させるのに役立つ。本発明の抗体はまた、疾患、障害、または感染の治療のために使用される1種以上の薬剤、例えば抗癌剤

50

、抗炎症剤、または抗ウイルス剤などと組み合わせて有利に用いることができる。抗癌剤の例としては、限定はされないが、シスプラチン、イホスファミド、パクリタキセル、タキサン、トポイソメラーゼI阻害剤(例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211)、ゲムシタピン、ビノレルピン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、ビノレルピン、テモダール(temodal)、およびタキソールが挙げられる。抗ウイルス剤の例としては、限定はされないが、サイトカイン(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、逆転写酵素の阻害剤(例えば、AZT、3TC、D4T、ddC、ddI、d4T、3TC、アデフォビル、エファビレンツ、デラビルジン、ネビラピン、アバカビル、およびその他のジデオキシヌクレオシドまたはジデオキシフルオロヌクレオシド)、リバビリンなどのウイルスmRNA キャッピングの阻害剤、HIVプロテアーゼ阻害剤などのプロテアーゼの阻害剤(例えば、アンプレナビル、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、およびサキナビル)、アムホテリシンB、糖タンパクプロセシングの阻害剤としてのカスタノスペルミン、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害剤などのノイラミニダーゼの阻害剤(例えば、ザナミビルおよびオセルタミビル)、トポイソメラーゼI阻害剤(例えば、カンプトテシンおよびその類似体)、アマンタジン、およびリマンタジンが挙げられる。抗炎症剤の例としては、限定はされないが、COX-2阻害剤(例えば、メロキシカム、セレコキシブ、ロフェコキシブ、フロスリド(flosulide)、およびSC-58635、ならびにMK-966)、イブプロフェンおよびインドメタシンなどの非ステロイド抗炎症薬、ならびにステロイド(例えば、デフラザコート、デキサメタゾン、およびメチルプレドニゾロン)が挙げられる。

【0140】

特定の1実施形態においては、動物に投与される抗体はその動物と同一種の種起源のものまたは種反応性のものである。従って、好ましい1実施形態においては、ヒト抗体もしくはヒト化抗体、またはヒトもしくはヒト化抗体をコードする核酸は治療または予防のためにヒトの患者に投与される。

【0141】

好ましい1実施形態においては、in vivoでの半減期が延長された免疫グロブリンを受動免疫療法(治療または予防のいずれかの目的で)で用いることができる。半減期が延長されているので、受動免疫療法または予防は治療剤の投与をより低い投与量で、および/またはより少ない頻度で行うことができ、その結果副作用がより少なく、患者のコンプライアンスがより良好となり、治療/予防にかかる費用がより低くなるなどがもたらされる。好ましい1実施形態においては、該治療剤/予防剤はRSVと結合する抗体、例えばSYNAGIS(登録商標)またはその他の抗RSV抗体である。そのような抗RSV抗体および投与方法については米国特許出願第09/724,396号および第09/724,531号に開示されており、双方とも「抗RSV抗体を予防および治療のために投与/投薬する方法(Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies For Prophylaxis and Treatment)」と題されたもので、双方ともYoungらにより、2000年11月28日に出願され、これらの出願の一部継続出願はそれぞれSerial No. _____ および _____ (弁理士名簿番号はそれぞれ10271-048および10271-047)であり、これらも「抗RSV抗体を予防および治療のために投与/投薬する方法(Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies For Prophylaxis and Treatment)」と題され、Youngらによるものであり、これらの全てはその全体を本明細書中に参照により組み入れる。また、上記の第5.1節に記載の抗RSV抗体も含まれる。

【0142】

特定の1実施形態においては、動物に投与される融合タンパク質はその動物と同一種の種起源のものまたは種反応性のものである。従って、好ましい1実施形態においては、ヒト融合タンパク質またはヒト融合タンパク質をコードする核酸は治療または予防のためにヒトの被験者に投与される。

【0143】

5.6. 融合タンパク質およびコンジュゲート分子の予防的および治療的使用

本発明は融合タンパク質に基づくおよびコンジュゲート分子に基づく治療法を包含し、

10

20

30

40

50

その治療法は融合タンパク質またはコンジュゲート分子を疾患、障害、または感染に伴う症状を予防、治療、または改善するために、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与することを含むものである。本発明の予防用および治療用化合物には、限定はされないが、融合タンパク質および融合タンパク質をコードする核酸、ならびにコンジュゲート分子が含まれる。融合タンパク質およびコンジュゲート分子は、当業界では公知の、または本明細書に記載の製薬上許容される組成物で提供することができる。

【0144】

疾患、障害、または感染のアンタゴニストとして機能する本発明の融合タンパク質およびコンジュゲート分子は、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与することができる。さらに、免疫応答のアゴニストとして機能する本発明の融合タンパク質およびコンジュゲート分子は、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与することができる。

【0145】

1種以上の融合タンパク質とコンジュゲート分子を体内で局所的にまたは全身的に、治療剤として用いることができる。本発明の融合タンパク質とコンジュゲート分子はまた、モノクローナルもしくはキメラ抗体、またはリンホカインもしくは造血性成長因子(例えばIL-2、IL-3、およびIL-7など)と組み合わせると組み合わせて有利に用いることができ、その組み合わせたものは、例えば、その抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増大させるのに役立つ。本発明の融合タンパク質とコンジュゲート分子はまた、モノクローナルもしくはキメラ抗体、またはリンホカインもしくは造血性成長因子(例えばIL-2、IL-3、およびIL-7など)と組み合わせると組み合わせて有利に用いることができ、その組み合わせたものは、例えば、免疫応答を増大させるのに役立つ。本発明の融合タンパク質とコンジュゲート分子はまた、疾患、障害、または感染の治療のために用いられる1種以上の薬剤、例えば抗癌剤、抗炎症剤、または抗ウイルス剤と組み合わせると組み合わせて有利に用いることができる。抗癌剤の例としては、限定はされないが、シスプラチン、イホスファミド、パクリタキセル、タキサン、トポイソメラーゼI阻害剤(例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211)、ゲムシタピン、ピノレルピン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、ピノレルピン、テモダール、およびタキソールが挙げられる。抗ウイルス剤の例としては、限定はされないが、サイトカイン(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、逆転写酵素の阻害剤(例えば、AZT、3TC、D4T、ddC、ddI、d4T、3TC、アデフォビル、エファビレンツ、デラビルジン、ネビラピン、アバカビル、およびその他のジデオキシヌクレオシドまたはジデオキシフルオロヌクレオシド)、リバビリンなどのウイルスmRNAキャッピングの阻害剤、HIVプロテアーゼ阻害剤などのプロテアーゼの阻害剤(例えば、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、およびサキナビル)、アムホテリシンB、糖タンパクプロセシングの阻害剤としてのカスタノスペルミン、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害剤などのノイラミニダーゼの阻害剤(例えば、ザナミビルおよびオセルタミビル)、トポイソメラーゼI阻害剤(例えば、カンプトテシンおよびその類似体)、アマンタジン、およびリマンタジンが挙げられる。抗炎症剤の例としては、限定はされないが、COX-2阻害剤(例えば、メロキシカム、セレコキシブ、ロフェコキシブ、フロスリド、およびSC-58635、ならびにMK-966)、イブプロフェンおよびインドメタシンなどの非ステロイド抗炎症薬、ならびにステロイド(例えば、デフラザコート、デキサメタゾン、およびメチルプレドニゾロン)が挙げられる。

【0146】

5.7. 抗体または融合タンパク質の投与

本発明は、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む医薬組成物の有効量を被験者に投与することによる、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、および改善する方法を提供する。本発明はまた、本発明の融合タンパク質もしくはコンジュゲート分子、または本発明の融合タンパク質もしくはコンジュゲート分子を含む医薬組成物の

有効量を被験者に投与することによる、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、および改善する方法をも提供する。好ましい1態様においては、抗体または融合タンパク質もしくはコンジュゲート分子は実質的に精製されたものである(すなわち、その効果を制限する、または望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない)。特定の1実施形態においては、該被験者は動物、好ましくは、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、馬、猫、イヌ、ラット、その他)および霊長類(例えばカニクイザルなどのサル、およびヒト)などの哺乳類である。好ましい1実施形態においては、該被験者はヒトである。

【0147】

種々の送達系が公知であり、本発明の抗体または融合タンパク質もしくはコンジュゲート分子を投与するために用いることができ、そのようなものとしては、例えば、リポソーム中への被包、微粒子、マイクロカプセル、該抗体または融合タンパク質を発現することのできる組換え細胞、受容体介在性エンドサイトーシス(例えば、WuとWu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987を参照せよ)、レトロウイルスベクターまたはその他のベクターの一部としての核酸の構築、その他が挙げられる。抗体、融合タンパク質、もしくはコンジュゲート分子、または医薬組成物を投与する方法としては、限定はされないが、非経口投与(例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下)、硬膜外、および粘膜(例えば、鼻腔内、および経口経路)が挙げられる。特定の1実施形態においては、抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または医薬組成物は筋肉内、静脈内、または皮下に投与される。該組成物はいずれの都合のよい経路によっても、例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜皮膚の内腔(lining)(例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜、その他)を経由する吸収により投与することができ、および他の生物活性剤とともに投与することができる。投与は全身的または局所的に行うことができる。さらに、肺への投与も、例えば吸入器またはネブライザーを用いて、エアロゾル化剤とともに製剤化することによって使用することができる。例えば、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号、および第4,880,078号；ならびにPCT公開No. WO 92/19244；WO 97/32572；WO 97/44013；WO 98/31346；およびWO 99/66903を参照されたい(これらの各々はその全体を本明細書中に参照により組み入れる)。好ましい1実施形態においては、抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または医薬組成物は、Alkermes AIR™肺薬剤送達技法(Alkermes, Inc., Cambridge, MA)を用いて投与される。

【0148】

本発明はまた、抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子が、抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の量を表示したアンブルまたはサシェット(sachette)などの密封容器にパッケージングされることをも提供する。1実施形態においては、該抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子は、乾燥した、滅菌済の凍結乾燥粉末または水非含有濃縮物を含む密封容器として供給され、例えば水または生理食塩水を用いて被験者への投与に適した濃度となるように再構成することができる。好ましくは、該抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子は乾燥した滅菌済の凍結乾燥粉末として、密封容器中に入れた形で、少なくとも5mg、より好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位投与量で供給される。その凍結乾燥した抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子はその元の容器において2~8 の間で保存されるべきで、その抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子は再構成後12時間以内に、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内、または1時間以内に投与すべきである。また別の1実施形態においては、抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子は、液状の形態で抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の量および濃度を表示した密封容器で供給される。好ましくは、その抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の液状の形態は、密封容器において少なくとも1mg/mL、より好ましくは少なくとも2.5mg/mL、少なくとも5mg/mL、少なくとも8mg/mL、少なくとも10mg/mL、少なくとも15mg/kg、または少なくとも25mg/mLで供給される。

【 0 1 4 9 】

特定の1実施形態においては、本発明の医薬組成物を治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましい場合がある：このことは、例えば、限定するものではないが、局所注入により、注射により、またはインプラントにより達成することができ、そのインプラントはシアラスティック(sialastic)膜などの膜を含む多孔性、非多孔性、もしくはゼラチン状材料、または繊維である。好ましくは、抗体または融合タンパク質を投与する場合には、その抗体または融合タンパク質が吸収しない材料を用いることに気を配らなければならない。

【 0 1 5 0 】

別の1実施形態においては、該組成物は小胞中、とりわけリポソーム中に入れて送達することができる(Langer, Science, 249:1527-1533, 1990; Treatら, 「感染性疾患と癌の治療におけるリポソーム(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)」中, Lopez-BeresteinとFidler(編), Liss, New York, pp.353-365(1989); Lopez-Berestein, 同書, pp.317-327を参照せよ; 一般的には同書を参照せよ)。

10

【 0 1 5 1 】

また別の1実施形態においては、該組成物は制御放出または徐放性系で送達することができる。1種以上の抗体、または1種以上の融合タンパク質を含んでいる徐放性製剤を生産するために、当業者には公知のいずれの技法も用いることができる。例えば、米国特許第4,526,938号; PCT公開 WO 91/05548; PCT公開 WO 96/20698; Ningら, 「徐放性ゲルを用いるヒト結腸癌異種移植片の腫瘍内放射免疫療法(Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel)」, Radiotherapy & Oncology, 39:179-189, 1996; Songら, 「長期間循環するエマルジョンの抗体が介在する肺へのターゲティング(Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions)」, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 50:372-397, 1995; Cleckら, 「心臓血管系への適用のためのbFGF抗体用の生物分解性ポリマー担体(Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application)」, Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 24:853-854, 1997; およびLamら, 「局所への送達のための組換えヒト化モノクローナル抗体のマイクロカプセル化(Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery)」, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 24:759-760, 1997を参照されたい(これらの各々はその全体を本明細書中に参照により組み入れる)。1実施形態においては、制御放出系にポンプを用いることができる(Langer, 上述の文献; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:20, 1987; Buchwaldら, Surgery, 88:507, 1980; およびSaudekら, N. Engl. J. Med., 321:574, 1989を参照せよ)。別の1実施形態においては、抗体または融合タンパク質の制御放出を達成するためにポリマー材料を用いることができる(例えば、「制御放出の医学的応用(Medical Applications of Controlled Release)」, LangerとWise(編), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); 「制御された薬剤バイオアベイラビリティ、製剤のデザインと性能(Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)」, SmolenとBall(編), Wiley, New York(1984); RangerとPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61, 1983を参照されたい; また、Levyら, Science, 228:190, 1985; Duringら, Ann. Neurol., 25:351, 1989; Howardら, J. Neurosurg., 71:105, 1989); 米国特許第5,679,377号; 米国特許第5,916,597号; 米国特許第5,912,015号; 米国特許第5,989,463号; 米国特許第5,128,326号; PCT公開No. WO 99/15154; およびPCT公開No. WO 99/20253をも参照せよ)。また別の1実施形態においては、制御放出系を治療の標的(例えば肺)の近傍に置くことができ、そうすることによって全身投与量のごく一部しか必要としないこととなる(例えば、Goodson, 「制御放出の医学的応用(Medical Applications of Controlled Release)」中, 上述の文献, 第2巻, pp.115-138(1984)を参照せよ)。

20

30

40

【 0 1 5 2 】

その他の制御放出系についてはLangerによる総説(Science, 249:1527-1533, 1990)に述

50

べられている。

【0153】

本発明の組成物が抗体または融合タンパク質をコードする核酸である特定の1実施形態においては、その核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、それを細胞内に入るように、例えば、レトロウイルスベクター(米国特許第4,980,286号を参照せよ)によって、または直接注入によって、または微粒子ボンバードメント(microparticle bombardment)(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクト剤を用いたコーティングを用いて、または核内に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドと連結させて投与することによって(例えば、Joliotら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1864-1868, 1991)、その他で投与することによって、それがコードする抗体または融合タンパク質の発現を促進するためにin vivoで投与することができる。あるいはまた、核酸を細胞内に導入し、相同組換えによって発現のために宿主細胞のDNA中に組み込むことができる。

10

【0154】

本発明はまた、医薬組成物をも提供する。そのような組成物は抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の予防上または治療上有効な量および製薬上許容される担体を含んでなる。特定の1実施形態においては、「製薬上許容される」という用語は、連邦政府または州政府の薬事当局によって承認されていること、または米国薬局方、もしくは動物、より特にはヒトに用いるための一般的に認められた他の薬局方に挙げられていることを意味する。「担体」という用語は希釈剤、アジュバント(例えばフロイント完全および不完全アジュバント)、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、多価陰イオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに、BCG(カルメット-گران杆菌(Bacille Calmette-Guerin))およびコリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)などのヒトに有用なものとなりうるアジュバント、賦形剤、または該治療剤とともに投与されるビヒクル(vehicle)を意味する。そのような製薬上の担体は水および油などの無菌の液体とすることができる。その油には、落花生油、大豆油、鉱油、ごま油、および類似のものなどの、石油、動物、植物、または合成物起源のものが含まれる。該医薬組成物が静脈内に投与される場合には、水が好ましい担体である。生理食塩水溶液ならびに水性デキストロース、およびグリセロール溶液も、特に注射用溶液のための液状担体として用いることができる。好適な製薬用賦形剤には、デンプン、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、イネ、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール、および類似のものが含まれる。所望により、また該組成物は少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むことができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末、徐放性製剤、および類似のものの形態を取ることができる。経口製剤には、医薬品等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウム

20

30

などの標準的な担体を含ませることができる。好適な製薬用担体の例については「レミンTONの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」(E. W. Martinによる)中に記載されている。このような組成物は、抗体もしくはそのフラグメント、または融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の予防上または治療上有効な量を、好ましくは精製された形態で、好適な量の担体と共に含有させて、患者への適切な投与のための形態が提供されることとなる。その製剤は投与様式に適したものでなければならない。

40

【0155】

好ましい1実施形態においては、該組成物はヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物として慣例の方法に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は無菌で等張の水性バッファー中の溶液である。必要に応じて、該組成物はまた、可溶化剤およびリグノカインなどの局所麻酔剤を注射部位の疼痛を軽減するために含むことができる。

50

【0156】

通常は、本発明の組成物の成分は別々にまたは一緒に混合して単位剤形で、例えば、乾燥した凍結乾燥粉末、または無水の濃縮物として活性物質の量を表示したアンプルまたはサシットなどの密封容器で供給される。該組成物が注入で投与される場合には、組成物を無菌の医薬品等級の水または生理食塩水を含有している注入ボトルに調剤することができる。該組成物が注射によって投与される場合には、無菌の注射用水または生理食塩水のアンプルを提供して、その成分が投与前に混合されるようにすることができる。

【0157】

本発明の組成物は中性のまたは塩の形態として製剤化することができる。製薬上許容される塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸、その他に由来する陰イオンとともに形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン、その他に由来する陽イオンとともに形成されるものを含む。

【0158】

疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために有効なものとなる本発明の組成物の量は標準的な臨床技法によって決定することができる。その製剤で用いられる正確な投与量は、投与経路、被験者の年齢、および疾患、障害、または感染の重篤度に依存し、開業医の判断および各患者の状況に従って定められるべきである。有効量はin vitroまたは動物モデル(例えば、コトンラットまたはカニクイザル)での試験系から導かれた用量-応答曲線を外挿して得ることができる。

【0159】

融合タンパク質については、被験者に投与される、治療上または予防上有効な投与量は、体重1kgあたり約0.001~50mg、好ましくは約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは約0.1~20mg/kg体重、およびさらにより好ましくは約1~10mg/kg体重、2~9mg/kg体重、3~8mg/kg体重、4~7mg/kg体重、または5~6mg/kg体重の範囲である。抗体については、被験者に投与される、治療上または予防上有効な投与量は、典型的には被験者の体重1kgあたり0.1~200mgである。好ましくは、被験者に投与される投与量は、被験者の体重1kgあたり0.1mg~20mgであり、より好ましくは、被験者に投与される投与量は、被験者の体重1kgあたり1mg~10mgである。しかし、その投与量は、その分子のin vivoでの半減期がどの程度増大されているかに依存するだろう。通常は、ヒト抗体およびヒト融合タンパク質は、他種から得た融合タンパク質の抗体よりも外来ポリペプチドへの免疫応答のためにヒトの体内での半減期がより長い。従って、ヒト抗体またはヒト融合タンパク質ではより少ない投与量で投与頻度をより少なくすることが可能であることがしばしばある。さらに、抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の投与の投与量と頻度はまた、例えば脂質化などの改変によって、抗体または融合タンパク質の取り込みと組織への浸透(例えば肺への)を増大させることによって、低減することができる。

【0160】

抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の治療上または予防上有効な量を用いる被験者の治療には、単一治療、または好ましくは、一連の治療を含むことができる。好ましい1例においては、被験者は、約0.1~30mg/kg体重の範囲の抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子を用いて、1週間に1回で約1~10週間、好ましくは2~8週間、より好ましくは約3~7週間、さらにより好ましくは約4、5、または6週間治療される。他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、1日1回、1日2回、または1日3回投与される。他の実施形態においては、本発明の医薬組成物は、週1回、週2回、2週間に1回、月に1回、6週間毎に1回、2ヶ月毎に1回、年に2回、または年1回投与される。また治療に用いる抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の有効投与量は特定の治療経過にわたって増加または減少させることができることは理解されよう。

【0161】

5.7.1. 遺伝子治療

特定の1実施形態においては、抗体または融合タンパク質をコードする配列を含んでい

10

20

30

40

50

る核酸は、疾患、障害、または感染に伴う1種以上の症状を治療、予防、または改善するために遺伝子治療によって投与することができる。遺伝子治療とは、被験者に発現された、または発現しうる核酸を投与することによって行われる治療法を意味する。本発明のこの実施形態においては、該核酸はそれがコードする、治療または予防効果を介在する抗体または融合タンパク質を産生する。

【0162】

当業界で利用可能な遺伝子治療の方法のいずれも本発明に従って用いることができる。代表的な方法を下記で説明する。

【0163】

遺伝子治療の方法に関しての一般的な概説は、Goldspielら, *Clinical Pharmacy*, 12:488-505, 1993; WuとWu, *Biotherapy*, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596, 1993; Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993; およびMorganとAnderson, *Ann. Rev. biochem.*, 62:191-217, 1993; TIBTECH 11(5):155-215, 1993を参照せよ。用いることのできる、組換えDNA技術の当業界で一般的に知られている方法については、Ausubelら(編), 「分子生物学の今日のプロトコル(*Current Protocols in Molecular Biology*)」, John Wiley & Sons, NY(1993); およびKriegler, 「遺伝子導入と発現、実験室マニュアル(*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*)」, Stockton Press, NY(1990)に述べられている。

10

【0164】

好ましい1態様においては、本発明の組成物は、抗体をコードする核酸を含んでなり、その核酸は好適な宿主中で該抗体を発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸はプロモーターを有しており、そのプロモーターは好ましくは異種プロモーターで、機能的に抗体をコードする領域と連結され、そのプロモーターは誘導性または構成的なものであり、また、任意で、組織特異的なものである。別の特定の1実施形態においては、抗体をコードする配列およびその他の所望の配列をゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域と隣接させた核酸分子が用いられて、従って、その抗体をコードする核酸の染色体内での発現が提供される(KollerとSmithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8932-8935, 1989; およびZijlstraら, *Nature*, 342:435-438, 1989)。

20

【0165】

別の好ましい1態様においては、本発明の組成物は、融合タンパク質をコードする核酸を含んでなり、その核酸は好適な宿主中でその融合タンパク質を発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸はプロモーターを有しており、そのプロモーターは好ましくは異種プロモーターで、機能的に融合タンパク質をコードする領域と連結され、そのプロモーターは誘導性または構成的なものであり、また、任意で、組織特異的なものである。別の特定の1実施形態においては、融合タンパク質をコードする配列およびその他の所望の配列をゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域と隣接させた核酸分子が用いられて、従って、その融合タンパク質をコードする核酸の染色体内での発現が提供される。

30

【0166】

被験者へのその核酸の送達は、直接的に、その場合には被験者はその核酸または核酸担持ベクターに直接的に暴露されることとなるが、または間接的に、その場合には細胞はまずその核酸でin vitroで形質転換され、次いで被験者内に移植されることとなる。これらの2種類のアプローチはそれぞれ、in vivo、またはex vivo遺伝子治療法として知られている。

40

【0167】

特定の1実施形態においては、該核酸配列は直接的に、in vivoで、それがコードする産物を産生するために発現するところへ投与される。このことは当業界で公知の多数の方法のいずれによっても達成することができ、例えば、その核酸配列を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、それらが細胞内となるように投与することにより、その投与は例えば、欠陥のある、または弱毒化したレトロウイルスまたはその他のウイルスベクターを

50

用いた感染(米国特許第4,980,286号を参照せよ)、または裸のDNAの直接注射、または微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクト剤を用いたコーティング、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル中への被包、または核内に入ることが知られているペプチドと連結させて投与することによって、受容体介在性エンドサイトーシス(例えば、WuとWu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987を参照せよ)(この方法は受容体を特異的に発現している細胞のタイプを標的とするために用いることができる)に対するリガンド対象物と連結して投与することによるなどである。別の1実施形態においては、核酸-リガンド複合体を形成させることができ、その複合体中ではリガンドはエンドソームを破壊するための膜融合性ウイルスペプチドを含み、それによって該核酸がリソソームによる分解を避けることができる。別の1実施形態においては、*in vivo*での細胞特異的取り込み及び発現のために、特異的受容体を標的とすることによって、その核酸をターゲティングすることができる(例えば、PCT公開WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221を参照せよ)。あるいはまた、該核酸を細胞内に導入し、宿主細胞のDNA内に発現のために相同組換えによって組み込ませることができる(KollerとSmithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8932-8935, 1989; およびZijlstraら, *Nature*, 342:435-438, 1989)。

【0168】

特定の1実施形態においては、抗体または融合タンパク質をコードしている核酸配列を含んでいるウイルスベクターが用いられる。例えば、レトロウイルスベクターを用いることができる(Millerら, *Meth. Enzymol.*, 217:581-599, 1993を参照せよ)。これらのレトロウイルスベクターはウイルスゲノムの正しいパッケージングと宿主細胞DNA中への組み込みのために必要なコンポーネントを含んでいる。遺伝子治療に用いられる抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列は1種以上のベクター中にクローン化することができ、それによってそのヌクレオチド配列の被験者内への送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するより詳細な説明はBoesenら, *Biotherapy*, 6:291-302, 1994に見つけることができ、この文献は、造血幹細胞を化学療法に対してより耐性なものとするためにmdr1遺伝子を造血幹細胞に送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載する。遺伝子治療でのレトロウイルスベクターの使用について説明している他の参照文献としては、次のものがある: Clowesら, *J. Clin. Invest.*, 93:644-651, 1994; Kleinら, *Blood* 83:1467-1473, 1994; SalmonsとGunzberg, *Human Gene Therapy*, 4:129-141, 1993; およびGrossmanとWilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 3:110-114, 1993。

【0169】

アデノウイルスは遺伝子治療に用いることのできる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは呼吸上皮への遺伝子の送達のためには特に魅力的なピヒクルである。アデノウイルスは自然状態で呼吸上皮に感染し、そこで軽度の疾患を引き起こす。アデノウイルスに基づく送達系の他の標的としては、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉がある。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。KozarskyとWilson, *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:499-503, 1993は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療についての概説を示す。Boutら, *Human Gene Therapy*, 5:3-10, 1994はアカゲザルの呼吸上皮への遺伝子の導入のためのアデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例については、次の文献中に見ることができる: Rosenfeldら, *Science*, 252:431-434, 1991; Rosenfeldら, *Cell*, 68:143-155, 1992; Mastrangeliら, *J. Clin. Invest.*, 91:225-234, 1993; PCT公開WO 94/12649; およびWangら, *Gene Therapy*, 2:775-783, 1995。好ましい1実施形態においては、アデノウイルスベクターが用いられる。

【0170】

またアデノ関連ウイルス(AAV)は、遺伝子治療での使用が提案されている(例えば、Walshら, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 204:289-300, 1993、および米国特許第5,436,146号を参照せよ)。

10

20

30

40

50

【0171】

遺伝子治療の別のアプローチには、電気穿孔法、リポフェクション、リン酸カルシウム介在トランスフェクション、またはウイルス感染などの方法による組織培養中の細胞への遺伝子の導入が含まれる。通常は、その導入方法には、その細胞への選択マーカーの導入が含まれる。次いで、その細胞を選択下に置き、導入された遺伝子を取り込み、かつ発現している細胞を単離する。それらの細胞が次いで被験者へ送達される。

【0172】

この実施形態においては、該核酸は得られた組換え細胞のin vivo投与前に細胞に導入される。そのような導入は当業界では公知のいずれの方法によっても行うことができ、そのような方法としては限定はされないが、トランスフェクション、電気穿孔法、マイクロインジェクション、該核酸配列を含んでいるウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターを用いた感染、細胞融合、染色体介在遺伝子導入、マイクロセル介在(microcell mediated)遺伝子導入、スフェロプラスト融合、その他が挙げられる。外来遺伝子の細胞内への導入には当業界で公知の多数の技法があり(例えば、LoefflerとBehr, Meth. Enzymol., 217:599-618, 1993; Cohenら, Meth. Enzymol., 217:618-644, 1993; およびClin. Pharma. Ther., 29:69-92, 1985を参照せよ)、レシピエントの細胞の発達上および生理学的に必要な機能が混乱されない限りは、本発明に従って用いることができる。そのような技法は該核酸の細胞への安定な導入を提供するものであるべきであり、それによってその核酸が細胞で発現可能となり、好ましくはその子孫の細胞に遺伝可能であり、かつ発現可能である。

【0173】

上記の結果得られた組換え細胞を被験者に、当業界では公知の種々の方法で送達することができる。組換え血液細胞(例えば、造血幹細胞、または前駆細胞)は静脈内に投与することが好ましい。用いようとする細胞の量は所望の効果、患者の状態、その他に依存し、当業者であれば決定することができる。

【0174】

遺伝子治療の目的で核酸を導入できる細胞は、所望の、利用可能な細胞タイプであればいずれも包含されるが、そのような細胞としては限定はされないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞; 種々の幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓、その他から得られるような細胞が挙げられる。

【0175】

好ましい1実施形態においては、遺伝子治療に用いられる細胞は被験者にとって自己のものである。

【0176】

遺伝子治療に組換え細胞が用いられる1実施形態においては、抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列は、それらが組換え細胞またはその子孫によって発現可能なものとなるように細胞中に導入され、次いでその組換え細胞は治療効果を求めてin vivoに投与される。特定の1実施形態においては、幹細胞または前駆細胞が用いられる。単離が可能でin vitroで維持できるいずれの幹細胞および/または前駆細胞も本発明のこの実施形態に従って用いる可能性がある(例えば、PCT公開 WO 94/08598; StempleとAnderson, Cell, 71:973-985, 1992; Rheinwald, Meth. Cell Bio., 21A:229, 1980; およびPittelkowとScott, Mayo Clinic Proc., 61:771, 1986を参照せよ)。

【0177】

特定の1実施形態においては、遺伝子治療の目的で導入されることとなる核酸はそのコード領域と機能的に連結された誘導性プロモーターを含んでなり、適切な転写インデューサーの存在または不在を制御することによってその核酸の発現が制御可能となる。

【0178】

5.8. 治療上または予防上の有用性の特徴とその実証

本発明の抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子は種々の方法で特徴を調べることができる。特に、本発明の抗体はある抗原に対しての免疫特異的な結合能をアッセイすることができる。そのようアッセイは、溶液中で(例えば、Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992)、ビーズ上で(Lam, Nature, 354:82-84, 1991)、チップ上で(Fodor, Nature, 364:555-556, 1993)、細菌で(米国特許第5,223,409号)、胞子で(米国特許第5,71,698号、第5,403,484号、および第5,223,409号)、プラスミドで(Cullら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869, 1992)、またはファージで(ScottとSmith, Science, 249:386-390, 1990; Devlin, Science, 249:404-406, 1990; Cwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382, 1990; およびFelici, J. Mol. Biol., 222:301-310, 1991)(これらの参照文献の各々はその全体を本明細書中に参照により組み入れる)行うことができる。ある抗原またはその断片と免疫特異的に結合することが判明している抗体については、その抗原に対する特異的親和性の程度をアッセイすることができる。

【0179】

本発明の抗体またはそのフラグメントはある抗原に対する免疫特異的結合およびその他の抗原との交差反応性について当業界で既知のどの方法を用いてもアッセイすることができる。免疫特異的結合および交差反応性を分析するために用いることのできるイムノアッセイとしては、限定はされないが、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素免疫測定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、などの技法を使用する競合的または非競合的アッセイを多数あるうちの少数であるが挙げることができる。そのようなアッセイは当業界ではよく知られており、日常的に行われている(例えば、Ausbelら(編), 1994, 「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照すればよく、これはその全体を本明細書中に参照により組み入れる)。代表的なイムノアッセイについて下記に簡潔に記載する(しかし限定することは意図していない)。

【0180】

免疫沈降反応のプロトコールは通常は、細胞の集団をタンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム)を添加したRIPAバッファー(1% NP-40またはTriton X-100, 1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウムpH7.2、1%トラジロール)などの溶解バッファー中で溶解させ、対象の抗体を細胞溶解物に添加し、一定時間(例えば1から4時間)40℃でインキュベートし、プロテインAおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加し、40℃で約1時間以上インキュベートし、溶解バッファー中でそのビーズを洗って、それをSDS/サンプルバッファー中に再懸濁する、ことを含んでなる。対象の抗体が特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えばウエスタンブロット分析などによって評価することができる。当業者であれば、抗体の抗原との結合を増大させ、バックグラウンドを低減させるために改変しうるパラメーターに関して(例えば、セファロースビーズで細胞溶解物をプレクリーニングすることなど)知っているであろう。免疫沈降法のプロトコールについてさらに知るためには、例えば、Ausbelら(編), 1994, 「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの10.16.1項を参照せよ。

【0181】

ウエスタンブロット分析は通常は、タンパク質サンプルを調製し、そのタンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ(例えば、抗原の分子量の如何によって8%-20% SDS-PAGE)、そのタンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルから、ニトロセルロース、PVDF、またはナイロンの膜へ移し、その膜をブロッキング液(例えば、3% BSAまたは脱脂乳を添加したPBS)中でブロックし、洗浄バッファー(例えばPBS-Tween 20)中でその膜を洗い、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体(対象の抗体)で膜をブロックし、その膜を洗浄バッファーで洗い、ブロッキングバッファーで希釈した酵素(例えば西洋ワ

10

20

30

40

50

サビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)または放射性分子(例えば、 ^{32}P または ^{125}I)を結合させた二次抗体(この二次抗体は一次抗体を認識するもので、例えば抗ヒト抗体である)でその膜をブロックし、その膜を洗浄バッファーで洗い、該抗原の存在を検出する、ことを含んでなる。当業者であれば、検出されるシグナルを増強させ、バックグラウンドノイズを低減させるために改変しうるパラメーターに関して知っているであろう。ウエスタンブロットのプロトコールについてさらに知るためには、例えば、Ausbelら(編), 1994, 「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの10.8.1項を参照せよ。

【0182】

ELISAは、抗原を調製し、96ウエルのマイクロタイタープレートのウエルをその抗原でコーティングし、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)などの検出可能な化合物を結合させた対象の抗体をウエルに添加し、一定時間インキュベートし、抗原の存在を検出する、ことを含んでなる。ELISAでは対象の抗体は検出可能な化合物と結合させる必要はない; その代わりに、検出可能な化合物と結合させた二次抗体(これは対象の抗体を認識する)をウエルに添加することができる。さらに、ウエルを抗原でコーティングする代わりに、該抗体をウエルにコーティングすることができる。その場合には、検出可能な化合物と結合させた二次抗体を、そのコーティングされたウエルへの抗原の添加後に、添加することができる。当業者であれば、検出されるシグナルを増強させ、当業界で既知であるELISAの他の変動要素を改変しうるパラメーターに関して知っているであろう。ELISAについてさらに知るためには、例えば、Ausbelら(編), 1994, 「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの11.2.1項を参照せよ。

【0183】

該抗体の抗原への結合の親和性、および抗体-抗原相互作用の脱離速度は競合的結合アッセイによって測定することができる。競合的結合アッセイの1例はラジオイムノアッセイで、標識抗原(例えば、 ^3H または ^{125}I)を対象の抗体と、標識していない抗原の量を増加させつつ共存させてインキュベートし、標識抗原に結合した抗体を検出する、ことを含んでなる。本発明の抗体、またはそのフラグメントのその抗原に対する親和性および結合の脱離速度はスクヤッチャード分析による飽和度のデータから測定することができる。二次抗体との競合は、また、ラジオイムノアッセイを用いても測定することができる。その場合には、該抗原を、標識化合物(例えば、 ^3H または ^{125}I)を結合させた本発明の抗体またはそのフラグメントと、標識していない二次抗体の量を増加させつつ共存させてインキュベートする。

【0184】

好ましい1実施形態においては、BIAcore反応速度分析は抗体の抗原に対する結合の結合速度および脱離速度を測定するために用いられる。BIAcore反応速度分析は、固定化抗体をその表面に有するチップへの抗原の結合とそれからの抗原の解離を分析することを含んでなる(後述の実施例の節を参照せよ)。

【0185】

本発明の抗体、および融合タンパク質とコンジュゲート分子はまた、抗原のその宿主細胞レセプターへの結合を阻害する能力を当業者には既知の技法を用いてアッセイすることができる。例えば、あるウイルス抗原と結合するレセプターを発現している細胞は、抗体の存在下または不在下でウイルスと接触させて、ウイルス抗原の結合を阻害するその抗体の能力を、例えば、フローサイトメトリーまたはシンチレーションカウンターによって測定することができる。抗原とその宿主細胞レセプターとの間の相互作用の検出を行うために、抗原または抗体を、放射性標識(例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、および ^{125}I)または蛍光標識(例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレサミン)などの検出可能な化合物を用いて標識することができる。あるいはまた、抗原がそのレセプターと結合することを抗体が阻害する能力はセルフリーアッセイで測定することができる。例えば

、ウイルスまたはウイルス抗原(例えば、RSV F糖タンパク質)はセルフリーアッセイで抗体と接触させ、ウイルスまたはウイルス抗原がその宿主細胞レセプターと結合することをその抗体が阻害する能力を測定することができる。好ましくは、その抗体は固相担体上に固定化され、その抗原は検出可能な化合物で標識されたものである。あるいはまた、該抗原を固相担体上に固定化し、該抗体を検出可能な化合物で標識されたものとする事もできる。該抗原は部分的にまたは完全に精製されたもの(例えば、他のポリペプチドが部分的にまたは完全に存在しないもの)、または細胞溶解物の一部とすることができる。さらに、該抗原は、ウイルス抗原およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのドメインを含んでなる融合タンパク質とすることができる。あるいはまた、抗原を当業者に周知の技法を用いてビオチン化することができる(例えば、ビオチン化キット, Pierce Chemicals; Rockford, IL)。

10

【0186】

本発明の抗体、融合タンパク質、およびコンジュゲート分子はまた、当業者には既知の技法を用いて、ウイルスまたは細菌の複製を阻害またはダウンレギュレートする能力をアッセイすることができる。例えば、ウイルスの複製は、例えば、Johnsonら, Journal of Infectious Disease, 176:1215-1224, 1997などに述べられているブランクアッセイを用いてアッセイすることができる。本発明の抗体、融合タンパク質、およびコンジュゲート分子はまた、ウイルスまたは細菌のポリペプチドの発現を阻害またはダウンレギュレートする能力をアッセイすることができる。当業者に既知の技法としては、限定はされないが、ウエスタンブロット分析、ノーザンブロット分析、およびRT-PCRが含まれ、それらはウイルスまたは細菌のポリペプチドの発現を測定するために用いることができる。さらに、本発明の抗体、融合タンパク質、およびコンジュゲート分子は合胞体形成を阻害する能力についてアッセイすることができる。

20

【0187】

本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、および組成物はヒトに用いる前に、好ましくはin vitroでまず試験し、次いでin vivoで所望の治療または予防活性を試験する。例えば、本発明の特定の抗体、特定の融合タンパク質、特定のコンジュゲート分子、または特定の組成物の投与を行うかどうかを決めるために用いることのできるin vitroアッセイには、in vitro細胞培養アッセイが含まれ、そのアッセイ法は、被験者の組織サンプルを培養液中で増殖させ、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物に暴露するか、またはそれらを投与し、その組織サンプルに及ぼす本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の影響を観察するものである。種々の特別な実施形態においては、in vitroアッセイは、ある疾患または障害に關与する細胞型の代表的な細胞を用いて行うことができ、その細胞型に本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物が所望の効果を及ぼすか否かを調べることができる。好ましくは、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物は、ヒトへ投与する前に、in vitroアッセイおよび動物モデル系でも試験される。

30

【0188】

治療に用いるための本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物は、それらの毒性について適切な動物モデル系で試験することができ、そのような動物としては、限定はされないが、ラット、マウス、ウシ、サル、およびウサギが含まれる。抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の毒性をin vivoで試験するためには、当業界で既知の動物モデル系のどれでも用いることができる。

40

【0189】

ウイルス感染の治療または予防における有効性は、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物のウイルスの複製を阻害する能力、ウイルスの伝播を阻害する能力、またはウイルスがその宿主中にそのウイルス自体を確立することを妨げる能力、またはウイルス感染に伴う1種以上の症状を防止する、改善する、または緩和する能力を検出することによって示すことができる。その処置は、例えば、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の投与後にウイルスロードの低減、1種

50

以上の症状の改善、または死亡率および/もしくは疾病率の減少があれば、治療的なものと考えられる。本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物は、ウイルスの複製を阻害する能力、またはウイルスロードを低減させる能力について *in vitro* および *in vivo* アッセイで試験することもできる。

【0190】

細菌感染の治療または予防における有効性は、本発明の抗体、融合タンパク質、または組成物の細菌の複製を阻害する能力、または細菌感染に伴う1種以上の症状を防止する、改善する、または緩和する能力を検出することによって示すことができる。その処置は、例えば、本発明の抗体、融合タンパク質、または組成物の投与後に、細菌数の低減、1種以上の症状の改善、または死亡率および/もしくは疾病率の減少があれば、治療的なもの

10

【0191】

癌の治療における有効性は、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の癌細胞の増殖もしくは転移を阻害もしくは低減する能力、または癌に伴う1種以上の症状を、改善する、または緩和する能力を検出することによって示すことができる。その処置は、例えば、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の投与後に、癌細胞の増殖もしくは転移の低減、癌に伴う1種以上の症状の改善、または死亡率および/もしくは疾病率の減少があれば、治療的なものと考えられる。本発明の抗体、融合タンパク質、または組成物は、腫瘍形成を低減させる能力について、*in vitro*、*ex vivo*、および *in vivo* のアッセイで試験することができる。

20

【0192】

炎症性障害の治療における有効性は、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の、動物における炎症を低減もしくは阻害する能力、または炎症性障害に伴う1種以上の症状を改善する、もしくは緩和する能力を検出することによって示すことができる。その処置は、例えば、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の投与後に、1種以上の症状の改善があれば、治療的なものと考えられる。

【0193】

本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物は、*in vitro* または *in vivo* でサイトカイン(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、およびIL-15)ならびに活性化マーカー(例えば、CD28、ICOS、およびSLAM)の発現を誘導する能力を試験することができる。サイトカインおよび活性化マーカーの発現レベルを測定するために、当業者には既知の技法を用いることができる。例えば、サイトカインの発現レベルは、サイトカインのRNAのレベルを、例えば、RT-PCRおよびノーザンブロット分析を用いて分析することによって、および、例えば免疫沈降反応を行った後にウエスタンブロット分析もしくはELISAを用いてサイトカインのレベルを分析することによって、測定することができる。

30

【0194】

本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物は、免疫細胞、好ましくはヒトの免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細胞)の生物活性を変調させる能力について、*in vitro* および *in vivo* で試験することができる。本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物の、免疫細胞の生物活性を変調させる能力は、抗原の発現の検出、免疫細胞の増殖の検出、シグナル分子の活性化の検出、免疫細胞のエフェクター機能の検出、または免疫細胞の分化の検出によって評価することができる。これらの活性を測定するために当業者には既知の技法を用いることができる。例えば、細胞増殖は ^3H -チミジン取り込みアッセイおよびトリパブルーを用いた細胞数の計数によってアッセイすることができる。例えば、抗原の発現はイムノアッセイで調べることができ、そのアッセイには、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素免疫測定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッ

40

50

セイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、およびFACS分析などの技法を用いた競合的および非競合的アッセイ系が含まれる。シグナル分子の活性化は、例えば、キナーゼアッセイおよび電気泳動シフトアッセイ(EMSA)によってアッセイすることができる。

【0195】

本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物はまた、疾患、障害、または感染に罹患している動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトの生存期間を、少なくとも25%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%、延長させる能力について試験することもできる。さらに、本発明の抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子、または組成物はまた、疾患、障害、または感染に罹患している動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトの入院期間を、少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%、短縮させる能力について試験することもできる。本発明の抗体または組成物のin vivoにおける機能を分析するために当業者には既知の技法を用いることができる。

10

【0196】

5.9. 抗体および融合タンパク質の診断的用途

本発明の標識した抗体、融合タンパク質、およびコンジュゲート分子は、疾患、障害、または感染の検出、診断、またはモニターのための診断用途で用いることができる。本発明は、疾患、障害、または感染の検出または診断法であって、(a)被験者の細胞または組織サンプル中での抗原の発現を、その抗原と免疫特異的に結合する1種以上の抗体を用いてアッセイし、(b)その抗原のレベルを対照のレベル、例えば正常な組織サンプル中のレベルと比較し、アッセイした抗原のレベルが対照のレベルと比較して増加していれば疾患、障害、または感染を示すこととなることを含んでなる方法、を提供する。本発明はまた、疾患、障害、または感染の検出または診断法であって、(a)被験者の細胞または組織サンプル中での抗原の発現を、その抗原と結合する本発明の1種以上の融合タンパク質またはコンジュゲート分子を用いてアッセイし、(b)その抗原のレベルを対照のレベル、例えば正常な組織サンプル中のレベルと比較し、アッセイした抗原のレベルが対照のレベルと比較して増加していれば疾患、障害、または感染を示すこととなることを含んでなる方法、も提供する。従って、該融合タンパク質またはコンジュゲート分子は、リガンド、サイトカイン、もしくは増殖因子などの生物活性分子、およびヒンジ-Fc領域もしくはそのフラグメントを含んでなり、そのような融合タンパク質またはコンジュゲート分子は検出される抗原と結合することができる。

20

30

【0197】

本発明の抗体は、生物学的サンプル中の抗原のレベルを古典的な免疫組織学的方法を用いてアッセイするために用いることができ、そのような方法は本明細書中に記載されているか、または当業者には既知のものである(例えば、Jalkanenら, J. Cell. Biol., 101:976-985, 1985; Jalkanenら, J. Cell. Biol., 105:3087-3096, 1987)。タンパク質の遺伝子からの発現を検出するのに有用な他の抗体をベースとする方法としては、酵素免疫測定法(ELISA)およびラジオイムノアッセイ(RIA)などのイムノアッセイが含まれる。抗体を用いるアッセイでの適切な標識については当業界では既知であり、そのようなものとしては、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識; ヨウ素(¹²⁵I、¹³¹I)、炭素(¹⁴C)、イオウ(³⁵S)、トリチウム(³H)、インジウム(¹²¹In)、およびテクネチウム(^{99m}Tc)などのラジオアイソトープ; ルミノールなどの発光物質による標識; フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識が含まれる。

40

【0198】

融合タンパク質は生物学的サンプル中の抗原レベルを、例えば、当業者には既知のSDS-PAGEおよびイムノアッセイを用いてアッセイすることができる。

【0199】

本発明の1態様は、ヒトの疾患、障害、または感染の検出および診断である。1実施形態

50

においては、診断法は、a) 抗原と免疫特異的に結合する標識抗体の有効量を被験者に投与し(例えば、非経口、皮下、または腹腔内に)、b) 投与後、抗原が発現されている被験者体内の部位へ標識抗体が優先的に濃縮されるまでの時間(および結合しなかった標識分子がバックグラウンドレベルまで除去されるまでの時間)を待ち、c) バックグラウンドレベルを測定し、d) 被験者体内の標識抗体を検出して、バックグラウンドレベルを超える標識抗体が検出されれば、その被験者が疾患、障害、または感染を有していることが示される、ことを含んでなる。この実施形態では、該抗体は、当業者には既知のイメージングシステムを用いて検出するイメージング成分を用いて標識される。バックグラウンドレベルは種々の方法で測定することができ、そのような方法では、特定のシステムであらかじめ測定して定められた標準値と、検出された標識分子の量を比較することを含む。

10

【0200】

別の1実施形態においては、診断法は、a) 抗原またはその他の分子と結合する標識融合タンパク質またはコンジュゲート分子の有効量を被験者に投与し(例えば、非経口、皮下、または腹腔内に)、b) 投与後、該抗原またはその他の該分子が発現されている被験者体内の部位へ標識融合タンパク質またはコンジュゲート分子が優先的に濃縮されるまでの時間(および結合しなかった標識分子がバックグラウンドレベルまで除去されるまでの時間)を待ち、c) バックグラウンドレベルを測定し、d) 被験者体内の標識融合タンパク質またはコンジュゲート分子を検出して、バックグラウンドレベルを超える標識融合タンパク質が検出されれば、その被験者が疾患、障害、または感染を有していることが示される、ことを含んでなる。この実施形態では、該融合タンパク質またはコンジュゲート分子は、リガンド、サイトカイン、または増殖因子などの生物活性物質、およびヒンジ-Fc領域もしくはそのフラグメントを含んでなり、そのような癒合タンパク質またはコンジュゲート分子はイメージング成分を用いて標識して、検出しようとする抗原と結合することができる。

20

【0201】

被験者の身体の大きさおよび用いるイメージングシステムによって診断用イメージを作り出すために必要なイメージング成分の量が定められることは当業界では理解されよう。放射性同位元素成分の場合、ヒト被験者に対して、注射される放射能の量は通常は約5から20ミリキュリー(mCi)の ^{99m}Tc である。次いで、該標識抗体は、特定のタンパク質を含有している細胞の位置へ優先的に蓄積される。in vivoでの腫瘍イメージングについては、「腫瘍イメージング：癌の放射線化学的検出」"Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer", S. W. BurchielとB. A. Rhodes編, Masson Publishing Inc.(1982)中のS.W.Burchielら、「放射性標識抗体およびそのフラグメントの免疫薬物動態学」"Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their fragments", 第13章に述べられている。

30

【0202】

いくつかの変動要因(そのような要因としては、用いる標識のタイプおよび投与方法が含まれる)に応じて、被験者体内の部位へ標識分子が優先的に濃縮され、結合しなかった標識分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために投与後必要な時間は、6から48時間、または6から24時間、または6から12時間である。別の1実施形態においては、その時間は投与後5から20日間または5から10日間である。

40

【0203】

1実施形態においては、疾患、障害、または感染のモニタリングは、疾患、障害、または感染を診断する方法を繰り返すこと、例えば、最初の診断の1ヶ月後、最初の診断の6ヶ月後、最初の診断の1年後などに繰り返すことによって行われる。

【0204】

被験者体内の標識分子の存在は、in vivoスキヤニングのための方法として当業界で既知の方法を用いて検出することができる。それらの方法は、用いる標識のタイプによって変わる。当業者であれば、特定の標識を検出するために適切な方法を決定することができる。本発明の診断方法に用いることのできる方法と装置としては、限定はされ

50

ないが、コンピューター断層撮影法(CT)、陽電子放射断層撮影法(PET)、核磁気共鳴映像法(MRI)、および超音波検査法などの全身スキャンが含まれる。

【0205】

特定の1実施形態においては、該分子は放射性同位元素で標識され、患者体内での検出は放射能に応答性の手術器具を用いて行われる(Thurstonら, 米国特許第5,441,050号)。別の1実施形態においては、該分子は蛍光化合物で標識され、患者体内での検出は蛍光に応答性のスキャンニング装置を用いて行われる。別の1実施形態においては、該分子は陽電子放射性金属で標識され、患者体内での検出は陽電子放射断層撮影法を用いて行われる。また別の1実施形態においては、該分子は常磁性標識され、患者体内での検出は核磁気共鳴映像法(MRI)で行われる。

10

【0206】

5.10. キット

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1種以上の成分で満たされた1つ以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットをも提供する。任意でそのような容器には、一般医薬品または生物学的製剤の製造、使用、または販売を規制する薬事当局によって指定された形式の通知を添付することができ、その通知はヒトへの投与のための製造、使用、または販売のその薬事当局による承認内容を反映したものである。

【0207】

本発明は上述の方法を用いることのできるキットを提供する。1実施形態においては、キットは、本発明の抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子を、好ましくは精製された形で、1つ以上の容器に入れたものを含んでなる。特定の1実施形態においては、本発明のキットは対照として実質的に単離された抗原を含んでなる。好ましくは、本発明のキットはさらに、キット中に含まれる抗原と反応しない対照の抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子を含んでなる。別の特定の1実施形態においては、本発明のキットは、抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子の抗原との結合を検出するための手段を含んでいる(例えば、該抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲート分子は、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物、もしくは発光化合物などの検出可能な物質と結合させることができ、または一次抗体を認識する二次抗体を検出可能な物質と結合させることができる)。特定の1実施形態においては、該キットには組換えで産生させた、または化学的に合成した抗原を含むことができる。該キット中に提供される抗原はまた、固相担体に付着させることもできる。より特定の1実施形態においては、上述のキットの検出手段としては、抗原を付着させる固相担体が含まれる。そのようなキットはまた、付着させていない、レポーターで標識した抗ヒト抗体を含むこともできる。その実施形態においては、該抗体の該抗原への結合はそのレポーターを標識した抗体の結合によって検出することができる。

20

30

【0208】

5.11. 修飾したIgGヒンジ-Fcフラグメントの半減期が延長されているか調べるためのin vitroおよびin vivoアッセイ

修飾IgGおよびそのFcRnフラグメントのIgG定常ドメインのFcRnとの結合能は、種々のin vitroアッセイで特徴を調べることができる。WardによるPCT公開WO 97/34631は、種々の方法を詳細に開示しており、その全体を本明細書中に参照により組み入れる。

40

【0209】

例えば、修飾IgGまたはそのフラグメントのFcRnとの結合の能力を、野生型IgG、修飾IgG、またはそのフラグメントの結合の能力と比較するために、野生型IgGを放射性標識して、in vitroでFcRnを発現している細胞と反応させることができる。次いでその細胞に結合した画分の放射能を測定し、比較することができる。このアッセイに用いられるFcRnを発現している細胞は、好ましくは、B10.DBA/2マウスの肺由来のマウス肺末梢血管内皮細胞(B10, D2.PCE)およびC3H/HeJマウス由来のSV40で形質転換させた内皮細胞(SVEC)(Kimら, J. Immunol., 40:457-465, 1994)などの内皮細胞系である。しかし、その他のタイプの細胞(例えば生後10日~14日目の乳児マウスから単離した腸刷子縁であり、これは十分な

50

数のFcRnを発現している)を用いることもできる。あるいはまた、対象としている種の組換えFcRnを発現している哺乳類細胞を用いることもできる。修飾IgGの結合した画分、または野生型の結合した画分の放射能を計数した後、その結合した分子を界面活性剤で抽出し、細胞のユニット数あたりの放出されたものの比率を計算し、比較することができる。

【0210】

修飾IgGのFcRnに対する親和性は表面プラスモン共鳴(SPR)測定を、例えば前述のBIAcore 2000(BIAcore Inc.)を用いて測定することができる(Popovら, Mol. Immunol., 33:493-502, 1996; Karlssonら, J. Immunol. Methods, 145:229-240, 1991、これらは双方ともその全体を本明細書中に参照により組み入れる)。この方法では、FcRn分子はBIAcoreセンサーチップ(例えば、PharmaciaのCM5チップ)と結合され、修飾IgGの固定化FcRnへの結合は、特定の流速でBIA evaluation 2.1ソフトウェアを用いてセンサーグラムを得て、それに基づいてその修飾IgG、定常ドメイン、またはそれらのフラグメントのFcRnとの結合速度および脱離速度を計算することができる。

【0211】

修飾IgGまたはそのフラグメント、および野生型IgGのFcRnに対する相対親和性は単純競合結合アッセイで測定することもできる。FcRnが固定化されている96ウエルのプレートのウェルに種々の量の非標識修飾IgGまたは野生型IgGを添加する。次いで、一定量の放射標識野生型IgGを各ウェルに添加する。結合した画分の放射能百分率を非標識修飾IgGまたは野生型IgGの量に対してプロットし、その曲線の勾配から修飾ヒンジ-Fcの相対的親和性を計算することができる。

【0212】

さらに、修飾IgGまたはそのフラグメント、および野生型IgGのFcRnに対する親和性は、飽和試験およびスキッチャード分析によっても測定することができる。

【0213】

FcRnによる修飾IgGまたはそのフラグメントの細胞を横切る移送は、放射性標識IgGまたはそのフラグメントおよびFcRnを発現している細胞を用いたin vitro移送アッセイにより、細胞単層の一方の側の放射能をもう一方の側の放射能と比較することによって測定することができる。あるいはまた、そのような移送はin vivoで生後10日から14日後の乳児マウスに放射性標識した修飾IgGを与え、定期的に血液中の放射能を計測することによって測定することができ、それは腸を通過するIgGの循環系(またはその他の標的組織のいずれかのもの、例えば肺)への移送を示している。腸を通過する用量依存性のIgG移送の阻害を試験するために、放射性標識および非標識のIgGの一定比率の混合物をマウスに与え、血漿中の放射能を定期的に測定することができる(Kimら, Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994)。

【0214】

修飾IgGまたはそのフラグメントの半減期はKimら(Eur. J. Immunol., 24:542, 1994)によって報告されている方法に従って薬物動態学的実験によって測定することができ、この文献はその全体を本明細書中に参照により組み入れる。この方法では、放射性標識した修飾IgGまたはそのフラグメントは、マウスに静脈内注射され、その血漿中濃度は、例えば注射後3分から72時間の時点などにおける時間の関数として定期的に測定される。そのようにして得られたクリアランス曲線は2相性、すなわち -相および -相、となるはずである。該修飾IgGまたはそのフラグメントのin vivoでの半減期の決定のために、-相のクリアランス速度が計算され、野生型IgGのクリアランス速度と比較する。

【0215】

6. 実施例

下記の実施例はin vivoでの半減期が延長されている修飾ヒンジ-Fcフラグメントの作成、単離、および特性決定を説明するものである。

【0216】

6.1. ライブラリーの構築

6.1.1. 試薬

化学物質は全て分析用グレードのものを用いた。制限酵素およびDNA修飾酵素はNew England Biolabs, Inc.(Beverly, MA)から購入した。オリゴヌクレオチドはNWG Biotech, Inc.(High Point, NC)で合成されたものである。pCANTAB5Eファージミドベクター、抗E-tag-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート、TG1大腸菌(*E.coli*)株、IgG Sepharose 6 Fast FlowおよびHiTrap プロテインAカラムはAPBiotech, Inc.(Piscataway, NJ)から購入した。VCSM 13ヘルパーファージおよびQuick change mutagenesis kitはStratagene(La Jolla, CA)から入手した。CJ236大腸菌株はBio-Rad(Richmond, CA)から購入した。BCA Protein Assay Reagent KitはPierce(Rockford, IL)から入手した。Lipofectamine 2000はInvitrogen, Inc.(Carlsbad, CA)から購入した。

【0217】

10

6.1.2. マウスとヒトのFcRnの発現と精製

ヒトおよびマウスのFcRnのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号84および85である(Firanら, Intern. Immunol., 13:993-1002, 2001およびPopovら, Mol. Immunol., 33:521-530, 1996も参照されたい、これら双方の文献はその全体を本明細書中に参照により組み入れる)。ヒトFcRnはまた、標準的なPCRプロトコルを用いてヒト胎盤cDNA(Clonetech, Palo Alto, CA)からのヒト 2-ミクログロブリン(Kabatら, 1991, 「免疫学的興味深いタンパク質の配列」"Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S.Public Health Service, National Institute of Health, Washington, DC)とヒト 鎖のコドン23から267(Soryら, J. Exp. Med., 180:2377-2381, 1994)の単離後、得ることができる。軽鎖と重鎖はそれらの天然のシグナル配列(Kabatら, 1991, 上述の文献; Storyら, 上述の文献)とともにpFastBac DUALおよびpFastBac1 バクミド中にそれぞれクローン化し、ウイルスストックをSpodoptera frugiperda細胞(Sf9)中に製造者(Invitrogen, Carlsbad, CA)の使用説明書に従って作成した。High-Five細胞は感染多重度を3として、市販のプロトコルを用いて(Invitrogen)、 鎖および 2鎖をコードするバキュロウイルスで感染させた。組換えヒトFcRnは下記のとおり精製した: 感染させた昆虫細胞の上清を50mM MES(2-N-[モルホリノ]エタンスルホン酸)pH 6.0に対して透析し、10mLのヒトIgG Sepharose 6 Fast Flowカラム(APBiotech, Piscataway, NJ)にアプライした。樹脂を200mLの50mM MES pH6.0で洗い、FcRnを0.1M Tris-Cl pH8.0で溶出した。精製FcRnを50mM MES pH6.0に対して透析し、急速凍結し、-70 で保存した。タンパク質の純度はSDS-PAGEおよびHPLCによって調べた。

20

30

【0218】

6.1.3. TAAを含有するssDNAウラシル鑄型の調製

ライブラリーの構築はKunkel法(Kunkelら, Methods Enzymol., 154:367-382, 1987)に由来する部位特異的突然変異誘発法に基づいて行った。MEDI-493 ヒトIgG1(Johnsonら, J. Infect. Disease, 176:1215-1224, 1997)由来のヒトヒンジ-Fc遺伝子のアミノ酸残基226-478(Kabatの番号付けによる、Kabatら, 1991, 上述の文献)をpCANTAB5Eファージミドベクター中にSfiI/NotI断片としてクローン化した。4種類のライブラリーは、251, 252, 254, 255, 256(ライブラリー1)、308, 309, 311, 312, 314(ライブラリー2)、385, 386, 387, 389(ライブラリー3)、および428, 433, 434, 436(ライブラリー4)の位置にランダムな変異を導入することによって作成した。簡潔に述べれば、4つの別々のヒンジ-Fc鑄型をオーバーラップ伸長法(Hoら, Gene, 15:51-59, 1989)によってPCRを用いて作成し、その各々には252(ライブラリー1)、310(ライブラリー2)、384(ライブラリー3)、および429(ライブラリー4)の位置に1個の停止コドンTAAを含んでおり、そのため、突然変異したファージミドのみがFcをディスプレイするファージを生ずる。

40

【0219】

次いで、TAA含有の一本鎖DNA(TAAssDNA)の各々を次のとおり調製した: 4種類のTAA含有ファージミドのうちの1つを含んでいる1個のCJ236大腸菌コロニーを、10 μg/mLのクロラムフェニコールおよび100 μg/mLのアンピシリンを添加した10mLの2 x YT培地中で増殖させた。OD600 = 1となったところでVCSM 13ヘルパーファージを終濃度が10¹⁰ pfu/mLとなるように添加した。2時間後、その培養液を0.25 μg/mLのウリジン、10 μg/mLのクロラムフ

50

エニコール、30 µg/mLのカナマイシン、および100 µg/mLのアンピシリンを添加した500mLの2 x YT培地に移し、37 °Cで一晩増殖させた。標準的なプロトコール(Sambrookら, 1989, 「分子クローニング、実験室マニュアル」"Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 第1-3巻)に従ってファージをPEG6000で沈殿させ、Qiaprep Spin M13 Kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて製造者の使用説明書に従って精製した。ウラシルを含有するTAAssDNA鋳型の各々を10から30 µg、0.6 µgの下記のリン酸化オリゴヌクレオチド(ランダムイズした部分は下線を付した)と、50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH7.5中で最終容量を250 µLとして結合させた:

ライブラリー-1:

5' -CATGTGACCTCAGGSNNNSNNNGATSNNNSNNGGTGCCTTGGGTTTTGGGGG-3' (配列番号120)

10

ライブラリー-2:

5' -GCACTTGACTCCTTGCCATTSNCCASNNSNNGTGSNNNSNNGGTGAGGACGC-3' (配列番号121)

ライブラリー-3:

5' -GGTCTTGATGTTSNNCTCSNNNSNNSNATTGCTCTCCC-3' (配列番号122)

ライブラリー-4:

5' -GGCTCTTCTGCGTSNNGTGSNNNSNNCAGAGCCTCATGSNNCACGGAGCATGAG-3' (配列番号122)

上記でN=A、C、T、またはG、 S=GまたはCである。

【0220】

6.1.4 ヘテロ二本鎖DNAの合成

適切な縮重オリゴヌクレオチドを、標準的なプロトコールを用いてT4ポリヌクレオチドキナーゼの存在下でリン酸化した。10から30 µgのssDNA U鋳型および0.6 µgのリン酸化オリゴヌクレオチドを、10mM MgCl₂, pH7.5を含有する50mM Tris-HClで最終容量を250 µLとしてその中で結合させ、90 °Cで2分間、50 °Cで3分間、および20 °Cで5分間インキュベートした。ヘテロ二本鎖DNAの合成は、0.4mM ATP、1mM dNTP、および6mM DTTの存在下でT4 DNAリガーゼおよびT7 DNAポリメラーゼの双方を30ユニット添加して行い、その混合物を20 °Cで4時間インキュベートした。次いで、このようにして作成したヘテロ二本鎖DNAをQiagen Qiaquick DNA purification Kit(Qiagen, CA)を用いて精製および脱塩した。

20

【0221】

6.1.5 電気穿孔法

電気穿孔法で取り込み可能な300 µLのTG1大腸菌細胞を、1から5 µgのヘテロ二本鎖DNAとともに、2.5kVの電場で200 pFと25 µFキャパシタンスを用いて、ライブラリーのサイズが1 x 10⁸(ライブラリー-1および2)、または1 x 10⁷(ライブラリー-3および4)となるまで、電氣的に穿孔させた。その細胞を2mLのSOC培地中に再懸濁し、この方法を6から10回反復した。多様性については組換え大腸菌の滴定によって評価した。電気パルスをあてた細胞を50mLのSOC培地中で37 °Cで30分間振盪しつつインキュベートし、遠心し、100 µg/mLのアンピシリンおよび10¹⁰ pfu/mLのVCSM 13ヘルパーファージを含んでいる500mLの2xYT中に再懸濁した。その培養物を37 °Cで一晩インキュベートし、細胞を遠心してペレットとした。変異したヒンジ-Fc部分をGIIIコートタンパク質上に発現している、上清中のファージを既に報告されているとおり(Sambrookら, 1989, 上述の文献)PEG6000で沈澱させ、5mLの20 mM MES, pH6.0中に再懸濁した。

30

40

【0222】

6.2 ライブラリーのパニング

ファージをELISAをベースとするアプローチを用いてパニングした。96ウエルのELISAプレート、炭酸ナトリウムバッファーpH9.0中に0.01mg/mLのマウスFcRnを含む液100 µL/ウエルで、4 °Cで一晩コーティングし、次いで、4%脱脂粉乳で37 °Cで2時間ブロックした。そのコーティングしたプレートの各ウエルに、5%の粉乳および0.05%のTween 20含有の20mM MES, pH6.0中にファージを懸濁させた液(総計約10¹³個のファージ)の100-150 µLを入れ、37 °Cで2~3時間、振盪しつつインキュベートした。

【0223】

インキュベーション後、ウエルを0.2%のTween 20および0.3M NaCl含有の20mM MES, pH6

50

.0で、室温で約30回洗った。結合したファージを、100 μ L/ウエルのPBS, pH7.4で37 にて30分間溶出させた。

【0224】

次いで、溶出したファージを、対数増殖期の大腸菌細胞培養液に添加し、100 μ g/mLのアンピシリンおよび 10^{10} pfu/mLのVCSM 13ヘルパーファージを添加した250mLの2xYT中で37で一晩増殖させた。増殖したファージを遠心して集めた後、PEGで沈殿させ、パニングプロセスは総計6回まで反復した。

【0225】

308-314の位置の残基(H310およびW313を固定)に変異を含んでいるファージライブラリーで、FcRnに対する親和性がより高いヒンジ-Fc領域を発現しているファージを表IVに示す各パニングプロセスによって濃厚化した。251-256の位置の残基(1253を固定)に変異のあるライブラリー、および428-436の位置の残基(H429, E430, A431, L432, およびH435を固定)に変異のあるライブラリーのパニング結果は表VおよびVIにそれぞれ示している。さらに、385-389の位置の残基(E388を固定)に変異のあるライブラリーのパニング結果は表VIIに示している。

【表4】

表IV

ライブラリー(残基 308-314; H310 および W313 固定)のパニング
pCANTAB5E-KUNKEL- μ FcRn(マウス FcRn)

パニング	アウトプット		濃厚化比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	1.1×10^5	0.5×10^5	2
第2ラウンド	1×10^4	0.2×10^4	5
第3ラウンド	9×10^4	0.3×10^4	30
第4ラウンド	3×10^5	2×10^4	15

【0226】

【表5】

表V

ライブラリー(残基 251-256; 1253 固定)のパニング
pCANTAB5E-KUNKEL- μ FcRn

パニング	アウトプット		濃厚化比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	2.5×10^5	1×10^5	2.5
第2ラウンド	6×10^4	2×10^4	3.0
第3ラウンド	8×10^5	4×10^4	20
第4ラウンド	1.2×10^6	5×10^4	24
第5ラウンド	3.0×10^6	6×10^4	50

【0227】

【表6】

表VI

ライブラリー(残基 428-436; H429、E430、A431、L432、および H435 固定)のパニング
pCANTAB5E-KUNKEL- μ FcRn

パニング	アウトプット		濃厚化比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	2.3×10^5	0.9×10^5	2.5
第2ラウンド	3×10^4	1×10^4	3
第3ラウンド	2×10^5	2×10^4	10
第4ラウンド	8×10^5	5×10^4	16

10

【0228】

【表7】

表VII

ライブラリー(残基 385-389; E388 固定)のパニング
pCANTAB5E-KUNKEL- μ FcRn

パニング	アウトプット		濃厚化比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	4.2×10^5	3.8×10^5	1.1
第2ラウンド	5×10^4	0.3×10^4	17
第3ラウンド	3.5×10^5	1×10^4	35
第4ラウンド	5.5×10^5	4×10^4	14
第5ラウンド	7.5×10^5	5×10^4	15
第6ラウンド	2×10^6	1×10^5	20

20

30

【0229】

6.3 パニングで単離されたクローンの同定

各パニングプロセスの後、ファージを単離し、FcRnと結合した発現されたペプチドをコードする核酸を、ABI3000ゲノム分析機(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いるジデオキシヌクレオチド配列決定法(Sangerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467, 1977)などの標準的な配列決定法で配列を調べた。

40

【0230】

パニングの結果、308-314の位置の残基(H310およびW313を固定)に変異を含んでいるファージライブラリーから2個の変異体が単離され、251-256の位置の残基(I253を固定)に変異のあるライブラリーからは13個の変異体、428-436の位置の残基(H429, E430, A431, L432, およびH435を固定)に変異のあるライブラリーからは6個の変異体、385-389の位置の残基(E388を固定)に変異のあるライブラリーからは9個の変異体が単離された。ライブラリーから単離された変異体は表VIIIに列挙している。

【表 8】

表 VIII

パニングによって単離された変異体

ライブラリー	変異体*
251-256	<u>Leu Tyr Ile Thr Arg Glu</u> (配列番号 90)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Thr</i> (配列番号 91)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Ser</i> (配列番号 92)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Arg</i> (配列番号 93)

ライブラリー	変異体*	
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Gln</i> (配列番号 94)	10
	<i>Leu Trp Ile Ser Arg Thr</i> (配列番号 95)	
	<i>Leu Tyr Ile Ser Leu Gln</i> (配列番号 96)	
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Asp</i> (配列番号 97)	
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Thr</i> (配列番号 98)	
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Arg</i> (配列番号 99)	
	<i>Leu Phe Ile Thr Gly Ala</i> (配列番号 100)	
	<i>Leu Ser Ile Ser Arg Glu</i> (配列番号 101)	
	<i>Arg Thr Ile Ser Ile Ser</i> (配列番号 102)	
308-314	<i>Thr Pro His Ser Asp Trp Leu</i> (配列番号 103)	20
	<i>Ile Pro His Glu Asp Trp Leu</i> (配列番号 104)	
385-389	<i>Arg Thr Arg Glu Pro</i> (配列番号 105)	30
	<i>Asp Pro Pro Glu Ser</i> (配列番号 106)	
	<i>Ser Asp Pro Glu Pro</i> (配列番号 107)	
	<i>Thr Ser His Glu Asn</i> (配列番号 108)	
	<i>Ser Lys Ser Glu Asn</i> (配列番号 109)	
	<i>His Arg Ser Glu Asn</i> (配列番号 110)	
	<i>Lys Ile Arg Glu Asn</i> (配列番号 111)	
	<i>Gly Ile Thr Glu Ser</i> (配列番号 112)	
	<i>Ser Met Ala Glu Pro</i> (配列番号 113)	
428-436	<i>Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His</i> (配列番号 114)	40
	<i>Met His Glu Ala Leu His Phe His His</i> (配列番号 115)	
	<i>Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His</i> (配列番号 116)	
	<i>Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg</i> (配列番号 117)	
	<i>Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr</i> (配列番号 118)	
	<i>Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr</i> (配列番号 119)	

*置換されている残基は太字で示している。

【 0 2 3 1 】

表VIIIで下線を付した配列はパニングの最終ラウンドで10から20回生じた配列に対応しており、イタリックで示した配列はパニングの最終ラウンドで2から5回生じた配列に対応している。下線付きでもイタリックでもない配列はパニングの最終ラウンドで1回生じたものである。

【 0 2 3 2 】

6.4 可溶性変異型ヒンジ-Fc領域の発現と精製

変異型のヒンジ-Fcフラグメントをコードする遺伝子を適切な制限酵素で切断し、発現ベクター、例えばV_{pelB}his(Ward, J. Mol. Biol., 224:885-890, 1992)中に再クローン化した。その他のいずれかのタイプのタグ配列、例えばc-mycタグ、デカペプチドタグ(Huseら, Science, 246:1275-1281, 1989)、FlagTM(ImmuneX)タグなどを含むベクターを用いることができる。大腸菌などの組換えクローンを増殖させて、可溶性ヒンジ-Fcフラグメントの発現を誘導し、それは培地からまたは細胞溶解物に浸透圧ショックを与えた後該細胞溶解物から、用いたタグに基づいて単離することができ、または当業者にはよく知られた他の精製方法のいずれかで単離することができ、下記に列挙する方法によって特徴を調べることができる。

【0233】

10

6.5 IgG1変異体の構築、産生、および精製

代表的なFc変異、例えばI253A、M252Y/S254T/T256E、M252W、M252Y、M252Y/T256Q、M252F/T256D、V308T/L309P/Q311S、G385D/Q386P/N389S、G385R/Q386T/P387R/N389P、H433K/N434F/Y436H、およびN434F/Y436HなどをヒトIgG1 MEDI-493(SYNAGIS(登録商標))(Johnsonら, 1997, 上述の文献)中に組み入れた。Quick Change Mutagenesis kit(Stratagene, La Jolla, CA)を製造者の使用説明書に従って用いて重鎖を部位特異的突然変異誘発にかけ、配列をABI3000(Applied Biosystems, Foster City, CA)シーケンサーを用いてジデオキシヌクレオチド配列決定法によって確認した。IgG1/V_HがIgG1/V_Lと同時分泌されるヒト胎児腎細胞293でCMV前初期プロモーターおよびジシストロニックオペロンを用いて種々の構築物が一過性に発現された(Johnsonら, 1997, 上述の文献)。トランスフェクションはLipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)と標準的なプロトコルを用いて行った。IgGはならし培地から直接的に1mLのHiTrapプロテインAカラムで製造者(APBiotech)の説明書に従って精製した。

20

【0234】

6.6 変異させたヒンジ-Fc領域の特徴の検討

6.6.1 in vitroでのHPLCおよびSDS-PAGEでの特徴の検討

精製後、修飾ヒンジ-Fcフラグメントの分子量および結合特性などの一般的な特徴については、SDS-PAGEおよびHPLCを含む当業者にはよく知られた方法で検討することができる。

【0235】

30

FcRn結合アッセイ

修飾ヒンジ-Fcフラグメントの結合活性は、放射性標識した野生型ヒンジ-Fcまたは修飾ヒンジ-FcをマウスまたはヒトのFcRnを発現している細胞とインキュベートすることによって測定することができる。典型的には、SV40で形質転換させた内皮細胞(SVEC)(Kimら, J. Immunol., 40:457-465, 1994)などの内皮細胞系が用いられる。ヒンジ-Fcフラグメントと37℃で16-18時間インキュベートした後、細胞を培地で洗い、次いで50mM リン酸バッファー、pH7.5中に5mM Na₂EDTAを含む液と5分間インキュベートして引き離す。10⁷個の細胞あたりの放射能を測定する。

【0236】

次いで、細胞を、0.3mg/mL PMSF、25mg/mLペプスタチン、および0.1mg/mLアプロチニンを含む2mLの2.5mg/mL CHAPS、0.1M Tris-HCl、pH8.0中に再懸濁し、室温で30分間インキュベートする。次いで、その細胞懸濁液を遠心し、上清を分離する。その上清の放射能を測定し、10⁷個の細胞あたりの抽出されたヒンジ-Fcフラグメントの量を計算するために用いる。

40

【0237】

野生型ヒトIgG1とマウスおよびヒトFcRnとの相互作用のK_d(それぞれ269および2527nM)は他の研究者らによって測定された値とよく一致する(それぞれ265および2350nM、Firanら, 2001, 上述の文献)。I253Aの変異は他の研究者らが報告しているとおり(Kimら, Eur. J. Immunol., 29:2819-2825, 1991; Shieldsら, J. Biol. Chem., 276:6591-6604, 2001)事実上ヒトおよびマウスFcRnと結合しない。この変異体はマイクロ中和アッセイにおい

50

て野生型分子(SYNAGIS(登録商標))と同じ比活性を保持している(Johnsonら, 1997, 上述の文献; データはここには示していない)、このことは抗体の折り畳みの誤りの結果ではない。

【0238】

マウスおよびヒトのFcRnに対しての結合親和性が増大しているヒトIgG1変異体を作成した(表VIII)。複合体の安定性の改善は、全体としてヒトIgG1-ヒトFcRnペアは、ヒトIgG1-マウスFcRnよりも低く、野生型IgG1と比較すると、それぞれ30-(N434F/Y436Hで $G = 2.0 \text{ kcal/モル}$)倍、および11-(M252Y/S254Y/S254T/T256Eで $G = 1.4 \text{ kcal/モル}$)倍であった。しかし、ヒトおよびマウスFcRnと比較すると最も重要な位置が変化しておらず、IgG1-マウスFcRn複合体の安定性が最も増加していたのは($G > 1.3 \text{ kcal/モル}$)、252、254、256の位置での変異(M252Y/S254T/T256EおよびM252W)、ならびに433、434、436の位置での変異(H433K/N434F/Y436HおよびN434F/Y436H)であった。同様にして、これらと同じ変異がIgG1-ヒトFcRn相互作用に最も強い影響を与えることが見出され、複合体の安定性も最も大きな増大をもたらした($G > 1.0 \text{ kcal/モル}$)。308、309、311、385、386、387、および389の位置での置換は、ヒトまたはマウスのFcRnの関与する複合体の安定性にほとんどまたは全く影響を及ぼさなかった($G < 0.5 \text{ kcal/モル}$)。Fc-FcRn結合部位の中央に位置する残基は周辺部分に位置する残基に比べ複合体の安定性の改善に有意に大きな寄与をする(図9)。

10

【0239】

ヒトFcのマウスFcRnへの効率的な結合にはいくつかの野生型Fcの残基を必要とすることは明らかである。例えば、ロイシンは251の位置で、アルギニンは255で、アスパラギン酸は310で、ロイシンは314で、メチオニンは428で非常によく保存されている(図6)。別の特異性の傾向は、308、309、および311の位置でありそれぞれトレオニン、プロリン、およびセリンは対応する野生型の残基よりも非常に好都合である(図6)。しかし、この強いコンセンサスを有する配列が生ずることは親和性の増大の程度とは相関しないが、それはV308T/L309P/Q311Sは、ヒトおよびマウスのFcRnの双方との結合に対して野生型IgG1とよりは良好だがその程度が2倍未満だからである(表IX)。

20

【0240】

親和性の増大は1箇所の「ホットスポット」の位置の残基の置換に強く依存している。例えば、M252Yでの単一の変異はマウスFcRnとの結合を9倍増大させるが、さらに変異箇所を追加してもほとんど(M252Y/S254T/T256Eの場合)または全く(M252Y/T256Qの場合)追加効果はない。同様の傾向がヒトのレセプターでも程度は低いながら観察される。M252Y/S254T/T256EはM252Yと比較すると2.5倍という顕著な親和性の改善を示す。このことはおそらく、ヒトとマウスのFcRnの結合部位の相異を反映しているのであろう(WestとBjorkman, *Biochemistry*, 39:9698-9708, 2000)。

30

【0241】

マウスFcRnに対しての親和性の著しい増加($G > 1.3 \text{ kcal/モル}$)を示しているファージ由来IgG1変異体は、野生型IgG1と比較するとpH7.2でレセプターへの著しく強い結合活性を示した(図8A-H)。親和性が中等度に増大している($G < 0.3 \text{ kcal/モル}$)IgG1変異体は、pH7.2では結合は非常に弱い(データはここには示していない)。これに対して、ヒトFcRnに対する親和性が大きく増大している($G > 1.0 \text{ kcal/モル}$)IgG1変異体では、野生型IgG1と比較するとpH7.4での結合はごくわずかであった(図8A-H)。

40

【表9】

表 IX

IgG1/Fc 変異体のマウスおよびヒト FcRn への結合の解離定数と相対的自由エネルギー変化*

変異体	解離定数 Fc/マウス FcRn (nM)	$\Delta \Delta G$ (nM) (kcal/モル)	解離定数 Fc/ヒト FcRn (nM)	$\Delta \Delta G$ (kcal/モル)
野生型	269 ± 1		2527 ± 117	
I253A	NB	NA	NB	NA
M252Y/S254T/T256E	27 ± 6	1.4	225 ± 10	1.4
M252W	30 ± 1	1.3	408 ± 24	1.1
M252Y	41 ± 7	1.1	532 ± 37	0.9
M252Y/T256Q	39 ± 8	1.1	560 ± 102	0.9
M252F/T256D	52 ± 9	1.0	933 ± 170	0.6
V308T/L309P/Q311S	153 ± 23	0.3	1964 ± 84	0.1
G385D/Q386P/N389S	187 ± 10	0.2	2164 ± 331	0.1
G385R/Q386T/P387R/N389P	147 ± 24	0.4	1620 ± 61	0.3
H433K/N434F/Y436H	14 ± 2	1.8	399 ± 47	1.1
N434F/Y436H	9 ± 1	2.0	493 ± 7	1.0

*アフィニティー測定は上述のとおり BIAcore で行った。残基の番号は EU にしたがった (Kabat ら, 1991, 上述の文献)。自由エネルギー変化の差は野生型の ΔG と変異型の反応の ΔG との差として計算した ($\Delta \Delta G = \Delta G_{野生型} - \Delta G_{変異体}$)。NB: 結合なし, NA: 適用なし。

【0242】

FcRn 介在型移送アッセイ

このアッセイは PCT 公開 WO 97/34631 で開示されているプロトコールに従ったものである。放射性標識した、修飾ヒンジ-Fcフラグメントの種々の濃度のも (1 μ g/mL ~ 1mg/mL) をトランスウエルの片側に添加し、FcRn を発現している細胞単層が介在するそのフラグメントの移送を、そのトランスウエルのもう一方の側の放射能を測定することによって定量

【0243】

6.6.2 in vivo 薬物動態研究

修飾 IgG ヒンジ-Fc の半減期を測定するために、修飾ヒンジ-Fc フラグメントを 125 I で放射性標識し (比活性は約 10^7 cpm/ μ g)、食塩水 (pH7.2) 中に溶解する。その溶液を BALB/C マウス (Harlan, Indianapolis, IN)、このマウスはあらかじめ胸腺をブロックするために NaI 含有の水を与えておいたものであるが、そのマウスに液量を 150 μ L 以下で放射能は $10 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ cpm のものを静脈内注射する。種々の時点、例えば注射後 3 分から 72 時間までマウスの後眼窩洞から採血して血液をヘパリンを添加した毛細管に入れ、各サンプルから採取した血漿の放射能を計測する。

【 0 2 4 4 】

図10に示すデータを得るために、アッセイする各分子について10匹のマウスを用い、1匹あたり2.5 µgの抗体を注射した。血清中の抗体のレベルは抗ヒトIgGELISAを用いて測定した(図10)。マウスFcRnに対する親和性と血清中の持続性には逆相関があるものと思われる。このことはおそらく、pH7.2で観察された変異体の著しい量の結合によって、その分子の隔離(すなわち、血清中への放出の欠如)がもたらされたことによるものと思われる。予備的データでは(ここには示していない)それらの変異体の肺への輸送が増大していることが示唆されている。さらに、これらの変異体のヒトFcRnに対する結合はマウスFcRnに対するものよりも低いので(図8A-H参照)、血清中の抗体レベルは霊長類およびヒトではより高いものと予測される。

10

【 0 2 4 5 】

6.6.3 表面プラスモン共鳴分析

可溶性のマウスおよびヒトFcRnと固定化ヒトIgG1変異体との相互作用を、BIAcore 3000装置(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden)を用いて表面プラスモン共鳴の検出によってモニターした。ゲルろ過では親和性測定を妨害するような凝集物(van der Merweら, E MBO J., 12:4945-4954, 1993; van der Merweら, Biochemistry, 33:10149-10160, 1994)は検出されなかった。タンパク質濃度はヒトおよびマウスFcRnの双方についてはビシンコニン酸(BCA)法で計算し、IgG1の野生型および変異型については280nmでの1%減衰係数1.5を用いて計算した。IgG1は、Amine Coupling Kitを報告されているとおり用いて(Johnsonら, 上述の文献)、CM5センサーチップのデキストランマトリクス(Pharmacia Biosensor)に結合させた。10mM酢酸ナトリウム, pH5.0中でタンパク質濃度の範囲は3~5 µg/mLであった。活性化時間は流速を10 µL/分として7分間とし、固定化時間は流速を10 µL/分として10分間から20分間の間とした。過剰の反応性エステルは70 µLの1.0 塩酸メタノールアミン, pH8.5を注射してクエンチした。このことによって、典型的には、500から4000共鳴ユニット(RU)の固定化がもたらされた。ヒトおよびマウスFcRnはバッファーを0.05% Tween20含有の50mM PBSバッファー, pH6.0に交換した。希釈はその同じバッファー中で行った。結合実験は全て25 °Cで濃度範囲を120から1 µg/mLとし流速を5から10 µL/分として行った; データは25から50分間収集し、表面を再生させるためにPBSバッファーpH7.2の1分間のパルスを行なった。FcRnもコーティングされていない細胞上を流し、これらのブランクのランでのセンサーグラムをIgG1を結合させたチップで得られたものから差し引いた。各ランはソフトウェアBIAevaluation 3.1(Pharmacia)を用いて分析した。会合定数(K_A)は、非特異的結合を補正した後、有利の反応体と複合体の平衡状態での濃度を測定することによるスキャッチャード分析から求めた。結合の平衡状態を見るBIAcore実験で(Karlssonら, 1991, 上述の文献; van der Merweら, 1993, 上述の文献; van der Merweら, 1994, 上述の文献; Raghavanら, Immunity, 1:303-315, 1994; Malchiodiら, J. Exp. Med., 182:1833-1845, 1995)、複合体の濃度は定常状態応答として直接測定することができる。遊離のアナライト(ヒトまたはマウスFcRn)の濃度はアナライト全体の濃度に等しいが、それはアナライトがサンプルの注入の際に常に補給されるからである。センサーチップ上の遊離のリガンドの濃度は複合体の濃度から、および表面の総結合能から $K_A = R_{eq}/C(R_{max} - R_{eq})$ として得ることができるが、この式でCは遊離アナライトの濃度、 R_{eq} は定常状態応答、 R_{max} は表面の総結合能である。式を整理し直すと $R_{eq}/C = K_A R_{max} - K_A R_{eq}$ となる。

20

30

40

【 0 2 4 6 】

従って種々のアナライト濃度での R_{eq}/C 対 R_{eq} のプロットは直線となり、その直線から、 K_A を計算することができる(表IX参照)。誤差は2または3回の測定の標準偏差として推定し、それは<20%であった。

【 0 2 4 7 】

ライブラリー1から4のパニング後(図6、表VIII)に同定された代表的な変異をヒトIgG1のFc部分に導入した。種々の濃度のヒトまたはマウスFcRnを固定化IgG1変異体上に注入すると、濃度依存性の結合が認められた。変異体M252Y/S254T/T256EのマウスおよびヒトFcRnへの平衡結合の典型的な共鳴プロフィールを図7AおよびBに示す。見かけの K_A を推定する

50

ために、FcRnの濃度範囲として120から1 $\mu\text{g/mL}$ を用いた。全例で平衡(または近似的平衡)結合レベルに50分間以内に到達した。タンパク質の総屈折率に及ぼす非特異的影響の結果生ずるRUの増加を推定するために、FcRnのコーティングされていない細胞への結合を測定し、これらのブランクのランからのセンサーグラムをIgG1結合チップで得られたものから差し引いた。変異体M252Y/S254T/T256EのマウスおよびヒトFcRnへの結合のスキッチャードプロットは図7CおよびDに示す。それらのプロットは全て直線であり、見かけの K_A は傾きから計算した。測定は2回または3回重複して行い、固定化IgGがそのもともとの結合活性を保持していることを確認した。

【0248】

マウスIgG1上にはマウスFcRnのための2箇所の等価でない結合部位、それらの親和性は< 130nMおよび6 μM であるが(Sanchezら, Biochemistry, 38:9471-9476, 1999; Schuckら, Mol. Immunol., 36:1117-1125, 1999; GhetieとWard, Ann. Rev. Immunol., 18:739-766, 2000)、それらの結合部位があるので、IgG1が固定化FcRnと結合する際に生ずる親和性効果を避けるためにレセプターを溶液中で用いた。このことと一致して、IgGではなくFcRnをバイオセンサーチップ上に固定化した場合には、常に高い親和性が観察されている(Popovら, 1996, 上述の文献; VaughnとBjorkman, Biochemistry, 36:9374-9380, 1997; MartinとBjorkman, Biochemistry, 38:12639-12647, 1999; WestとBjorkman, Biochemistry, 39:9698-9708, 2000)。本発明者らの実験でのBIAcoreの条件下では、より高い親和性の会合(すなわち、単一のリガンド-レセプター)に対応する相互作用が主として測定され、それはスキッチャードプロットの直線性と一致している(図7CおよびD)。

【0249】

BIAcore分析はまた、野生型IgG1とIgG1変異体の親和性を比較するためにも用いた。マウスFcRnに対してpH6.0で親和性の著しい増加($\Delta G = 1.0\text{kcal/モル}$)を示すファージ由来のIgG1変異体はマウスレセプターとpH7.2で著しい結合をも示し、そのSPRシグナル $_{\text{pH}7.4}/\text{SPRシグナル}_{\text{pH}6.0}$ は飽和状態で>0.6であった。マウスFcRnに対してのpH6.0での親和性の増大が中程度である($\Delta G < 0.4\text{kcal/モル}$)IgG1変異体は、pH7.2でマウスのレセプターへの結合は非常に弱かった。これに対して、ヒトFcRnに対してのpH6.0での親和性の増大が大きい($\Delta G = 1.0\text{kcal/モル}$)IgG1変異体ではヒトレセプターとpH7.4ではごくわずかな結合しか示さず、そのSPRシグナル $_{\text{pH}7.4}/\text{SPRシグナル}_{\text{pH}6.0}$ は飽和状態で<0.15であった。

【0250】

当業者であれば、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対して等価な多数のものを理解し、日常的な実験をさらに行うことなく確認することができよう。そのような等価物は添付の特許請求の範囲によって包含されることを意図している。

【0251】

本明細書中で言及した刊行物、特許、および特許出願はその全てを、個々の刊行物、特許、および特許出願を特定してかつ個別に本明細書中に参照により組み入れることを指示した場合と同程度に、本明細書中に参照により組み入れる。

【図面の簡単な説明】

【0252】

【図1】FcRn受容体との相互作用に関与することが確認された残基の位置を示すIgGヒンジ-Fc領域の構造を示す。

【図2】ヒンジ領域(配列番号82)、CH2ドメイン(配列番号80)およびCH3ドメイン(配列番号81)を含有するヒトIgG1ヒンジ-Fc領域のアミノ酸配列(配列番号83)を示す。

【図3A】ヒトFcRn(配列番号84)のアミノ酸配列を示す。

【図3B】マウスFcRn(配列番号85)のアミノ酸配列を示す。

【図4】ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域(配列番号83)のアミノ酸配列を示す。ここで、アミノ酸置換により突然変異した野生型残基は下線付き太字で示されている。

【図5】ファージ提示修飾ヒンジ-Fcライブラリーに関するパニング法の概要図である。

【図6】スクリーニングしたライブラリー中の変異体位置における選択された突然変異残基の出現の概要を示す。

10

20

30

40

50

【図7】(A)は、M252Y/S254T/T256E置換を有する固定化IgG1へのマウスFcRnの結合を示す。(B)は、固定化IgG1/M252Y/S254T/T256EへのヒトFcRnの結合を示す。(C)および(D)は、非特異的結合に関する補正後のそれぞれ(A)および(B)におけるデータのスキッチャード解析を示す。

【図8】(A)～(D)は、非特異的結合に関する補正後のそれぞれ(A)野生型ヒトIgG1、(B)M252Y/S254T/T256E、(C)H433K/N434F/Y436H、および(D)G385D/G386P/N389SへのpH 6.0およびpH 7.4におけるマウスFcRnの結合のBIAcore分析からの結果を示す。(E)～(H)は、非特異的結合に関する補正後のそれぞれ(E)野生型ヒトIgG1、(F)M252Y/S254T/T256E、(G)H433K/N434F/Y436H、および(H)G385D/Q386P/N389SへのpH 6.0およびpH 7.4におけるヒトFcRnの結合のBIAcore分析からの結果を示す。

10

【図9】図9は、Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20: 2361-2370のヒトIgG1構造に基づくヒトIgG1のFcフラグメントの表面の空間充填型モデルを示す。

【図10】野生型定常ドメインを有する抗体(SYNAGIS(登録商標))(白正方形)、または突然変異M252Y/S254T/T256E(白丸)、G385D/Q386P/N389S(黒正方形)およびH433K/N434F/Y436H(黒丸)を含有する定常ドメインを有する抗体の、時間(日単位)経過に対する血清濃度([Mab]ng/ml)における変化を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE, INC.
 <120> MOLECULES WITH EXTENDED HALF-LIVES, COMPOSITIONS AND USES THEREOF
 <130> 10271-027-228
 <140>
 <141>
 <150> 60/254,884
 <151> 2000-12-12
 <150> 60/238,760
 <151> 2001-05-09 10
 <160> 118
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
 1 5
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT 20
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 4 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL Domain

30

<400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> misc feature
 <223> VH Domain

<400> 9
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 10
 Thr Ala Gly Met Ser Val Gly
 1 5

<210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

20

30

<400> 14
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 16
 Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30

20

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

30

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Thr Pro Gly Met Ser Val Gly
 1 5

<210> 19

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10

10

<210> 21
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> VL Domain

<400> 21
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

20

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

30

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
 Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VH Domain

<400> 24
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

20

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 26
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 27
 Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser
 1 5

<210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30

20

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 30
 <211> 106

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Met Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
 Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

20

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
 Asp Thr Met Arg Leu Ala Ser
 1 5

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

30

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 35
 Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser
 1 5

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 36
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 37
 Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

20

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

30

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

<210> 40
 <211> 120

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 41
 Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 <210> 42
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

30

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser
1 5

<210> 44
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 44
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

20

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

30

<210> 46
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Met Tyr Gln Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 47
 Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

<210> 48
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

20

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

30

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 51
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

30

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Arg Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Asp Thr Arg Tyr Gln Ser Ser
 1 5

<210> 54
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL Domain

<400> 54
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

30

<210> 55
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
20 25 30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<220>
<221> misc_feature
<223> VL Domain

<400> 56
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

30

<210> 57

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL Domain

<400> 57
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 58
 Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser
 1 5

<210> 59
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL Domain

<400> 59
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

30

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 60
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

20

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Phe Gln Gly Ser Phe Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 62
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL Domain

<400> 62
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 63
 Asp Thr Phe Lys Leu Thr Ser
 1 5

<210> 64
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL Domain

20

<400> 64
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 65
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 65
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Asp Thr Phe Arg Leu Ala Ser
 1 5

<210> 67
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 67
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 68

<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Tyr Arg His Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
Asp Thr Tyr Arg His Ser Ser
1 5

20

<210> 70
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

30

<210> 71
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Phe Phe His Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Ser Leu Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

20

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 Asp Thr Phe Phe His Arg Ser
 1 5

<210> 74
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 74
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Leu Leu Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Asp Thr Leu Leu Leu Asp Ser
1 5

10

<210> 76
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

20

Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 77
Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser
1 5

<210> 78
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 Asp Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 80
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 80
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 100 105

30

<210> 81
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 20 25 30
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 35 40 45
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 50 55 60
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 85 90 95
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

10

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

20

<210> 83
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

30

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

10

<210> 84
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30

His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
 35 40 45

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
 65 70 75 80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85 90 95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
 100 105 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
 115 120 125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
 130 135 140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
 145 150 155 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
 165 170 175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
 180 185 190

20

30

Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
 275 280 285
 Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
 290 295 300
 Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335
 Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350
 Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365
 <210> 85
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 85
 Met Gly Met Pro Leu Pro Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Gln Thr Trp Gly Ser Glu Thr Arg Pro Pro Leu Met Tyr His Leu
 20 25 30
 Thr Ala Val Ser Asn Pro Ser Thr Gly Leu Pro Ser Phe Trp Ala Thr
 35 40 45
 Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Gln
 50 55 60
 Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp
 65 70 75 80
 Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Glu Ala Leu Lys Thr Leu Glu Lys Ile Leu Asn Gly Thr Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Ser Asp Asn Ser Ser Val
 115 120 125

10

20

30

Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asn
 130 135 140
 Pro Arg Ile Gly Asn Trp Thr Gly Glu Trp Pro Glu Thr Glu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Asp Ala Ala Arg Lys Glu Ser Glu
 165 170 175
 Phe Leu Leu Asn Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg
 180 185 190
 Gly Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val
 290 295 300
 Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu Leu
 305 310 315 320
 Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser
 325 330 335
 Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu
 340 345 350
 Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
 355 360 365

10

20

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 86
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 1 5

<210> 87
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87
 Leu Met Ile Ser Arg Thr
 1 5

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 1 5

<210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 Gly Gln Pro Glu Asn
 1 5

10

<210> 90
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90
 Leu Tyr Ile Thr Arg Glu
 1 5

<210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91
 Leu Tyr Ile Ser Arg Thr
 1 5

20

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92
 Leu Tyr Ile Ser Arg Ser
 1 5

<210> 93
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 93
 Leu Tyr Ile Ser Arg Arg
 1 5

<210> 94
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94
 Leu Tyr Ile Ser Arg Gln
 1 5

<210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 Leu Trp Ile Ser Arg Thr
 1 5

<210> 96
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Leu Tyr Ile Ser Leu Gln
 1 5

10

<210> 97
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 Leu Phe Ile Ser Arg Asp
 1 5

<210> 98
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Leu Phe Ile Ser Arg Thr
 1 5

20

<210> 99
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 Leu Phe Ile Ser Arg Arg
 1 5

<210> 100
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 100
 Leu Phe Ile Thr Gly Ala
 1 5

<210> 101
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Leu Ser Ile Ser Arg Glu
 1 5

<210> 102
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 Arg Thr Ile Ser Ile Ser
 1 5

<210> 103
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 Thr Pro His Ser Asp Trp Leu
 1 5

10

<210> 104
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 Ile Pro His Glu Asp Trp Leu
 1 5

<210> 105
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 Arg Thr Arg Glu Pro
 1 5

20

<210> 106
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 Asp Pro Pro Glu Ser
 1 5

<210> 107
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 107
 Ser Asp Pro Glu Pro
 1 5

<210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 108
 Thr Ser His Glu Asn
 1 5

<210> 109
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 Ser Lys Ser Glu Asn
 1 5

<210> 110
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 His Arg Ser Glu Asn
 1 5

10

<210> 111
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 Lys Ile Arg Glu Asn
 1 5

<210> 112
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Gly Ile Thr Glu Ser
 1 5

20

<210> 113
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 113
 Ser Met Ala Glu Pro
 1 5

<210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 114
 Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His
 1 5

<210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115
 Met His Glu Ala Leu His Phe His His
 1 5

<210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

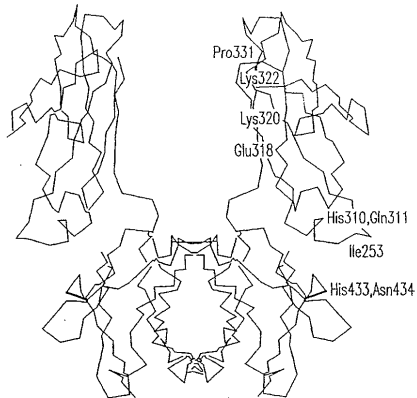
<400> 117
 Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr
 1 5

10

【 図 1 】



【 図 2 】

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1      5          10      15
|-----Hinge-----|
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20          25          30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35          40          45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50          55          60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65          70          75          80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85          90          95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100         105         110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115         120         125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130         135         140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145         150         155         160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165         170         175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180         185         190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195         200         205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210         215         220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225         230
|-----|

```

【 図 3 A 】

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30
 His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
 35 40 45
 Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60
 Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85 90 95
 Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
 115 120 125
 Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
 130 135 140
 Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
 145 150 155 160
 Ser Gln Arg Trp Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
 165 170 175
 Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
 180 185 190
 Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Atg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
 275 280 285
 Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
 290 295 300
 Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335
 Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350
 Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365

A

【 図 3 B 】

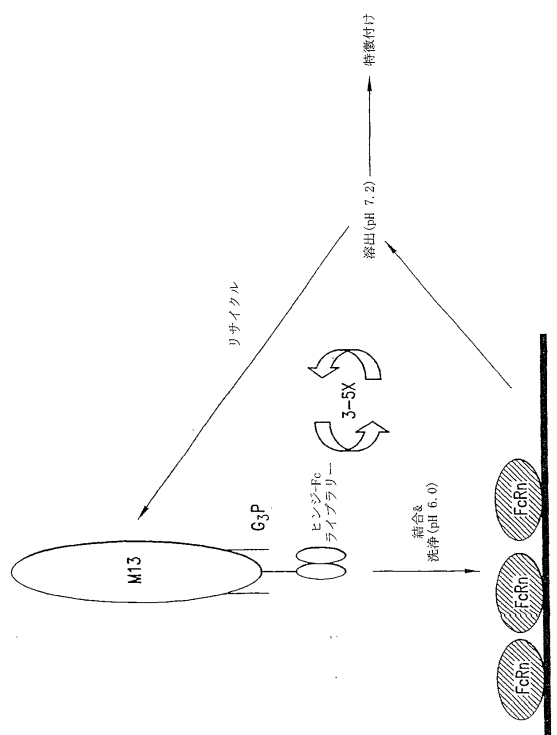
Met Gly Met Pro Leu Pro Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Gln Thr Trp Gly Ser Glu Thr Arg Pro Pro Leu Met Tyr His Leu
 20 25 30
 Thr Ala Val Ser Asn Pro Ser Thr Gly Leu Pro Ser Phe Trp Ala Thr
 35 40 45
 Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Gln
 50 55 60
 Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp
 65 70 75 80
 Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Glu Ala Leu Lys Thr Leu Glu Lys Ile Leu Asn Gly Thr Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Ser Asp Asn Ser Ser Val
 115 120 125
 Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asn
 130 135 140
 Pro Arg Ile Gly Asn Trp Thr Gly Glu Trp Pro Glu Thr Glu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Asp Ala Ala Arg Lys Glu Ser Glu
 165 170 175
 Phe Leu Leu Asn Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg
 180 185 190
 Gly Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val
 290 295 300
 Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu Leu
 305 310 315 320
 Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser
 325 330 335
 Gly Asp Asp Thr Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu
 340 345 350
 Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
 355 360 365

B

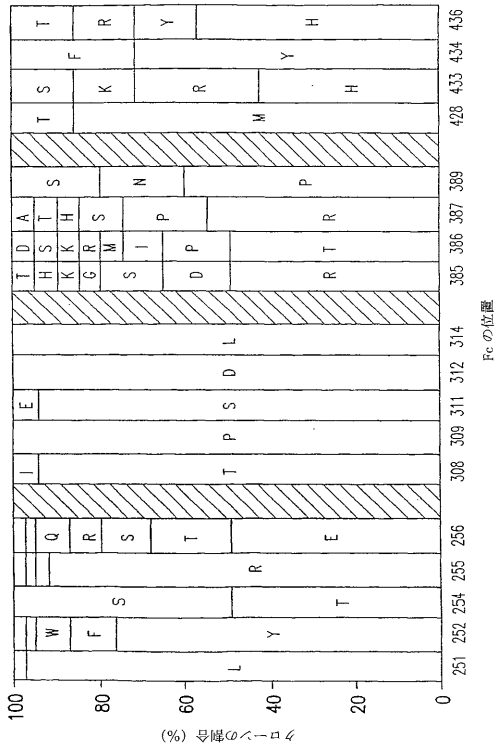
【 図 4 】

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 -----Hinge-----
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 40 45 50
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 -----CH2-----
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 -----CH3-----
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

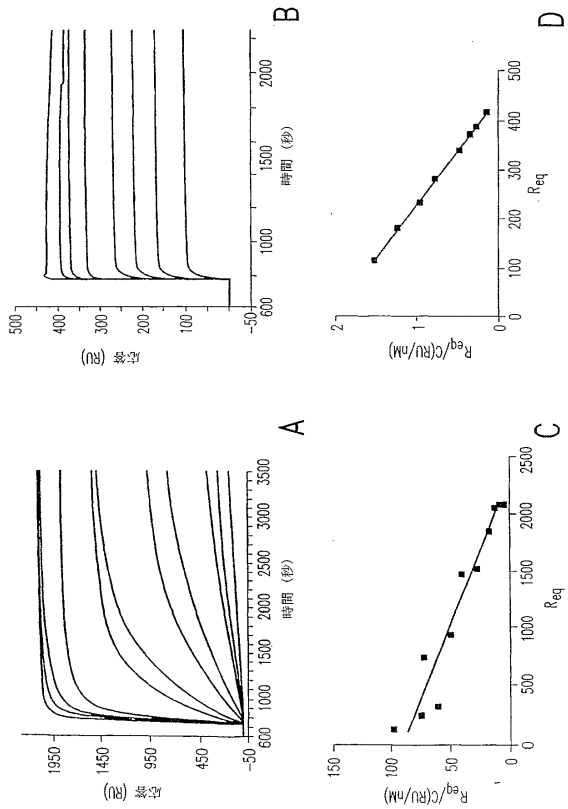
【 図 5 】



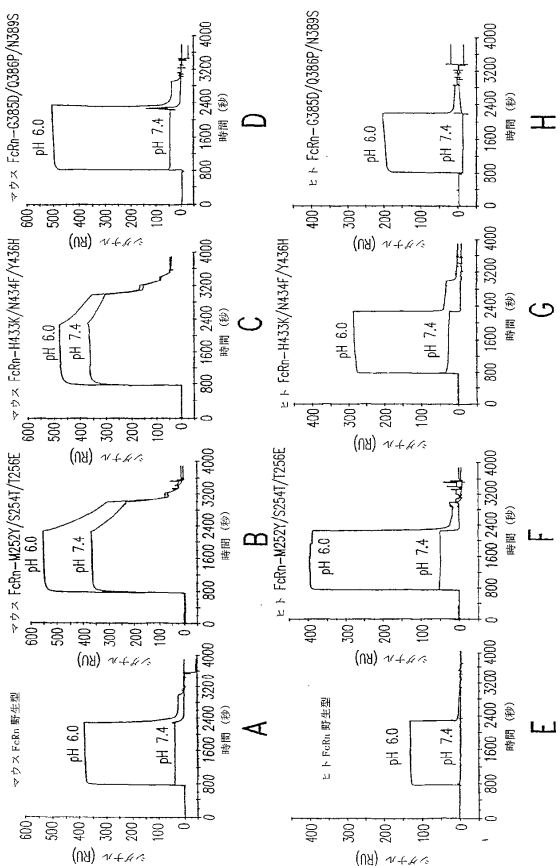
【図6】



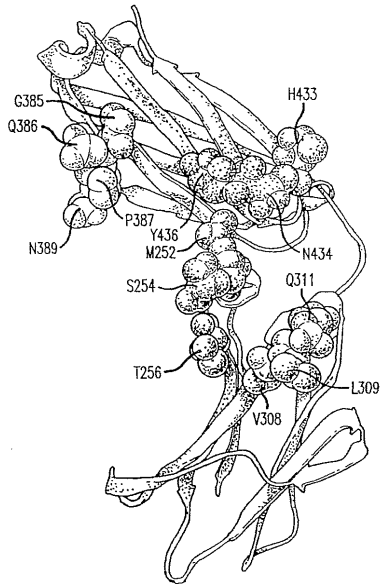
【図7】



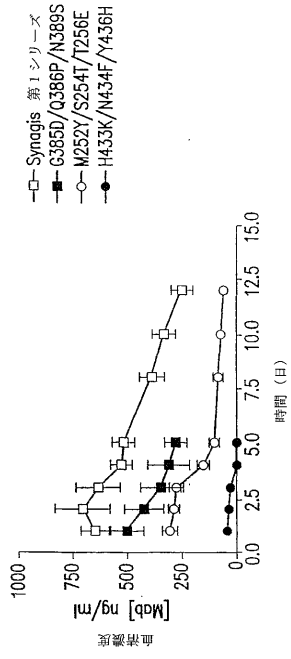
【図8】



【図9】



【図10】



—□— Synagis 第1シリーズ
—■— G385D/Q386P/N389S
—○— M252Y/S254F/T256E
—●— H433K/N434F/Y436H

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 V
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/16
G 0 1 N	33/534	(2006.01)	A 6 1 P 37/00
			G 0 1 N 33/534

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(72)発明者 ダルアクア, ウイリアム

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイザースバーグ, シェルバーン テラス ナンバー 2 0 8, 9 9 2 6

(72)発明者 ジョンソン, レズリー, エス.

アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州, ジャーマンタウン, ローレル ヒル ウェイ, 2 0 1 4 7

(72)発明者 ワード, エリザベス, サリー

アメリカ合衆国 7 5 2 3 0 テキサス州, ダラス, セダー スプリングス 4 6 0 6, アpartment 2 0 1 7

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 4 3 7 1 3 (WO, A 1)

国際公開第 9 8 / 0 2 3 2 8 9 (WO, A 1)

国際公開第 9 7 / 0 3 4 6 3 1 (WO, A 1)

J. Immunol., Vol. 169(2002), p. 5171-5180

J. Biol. Chem., Vol. 276, No. 9(2001) (Epub: Nov. 2000), p. 6591-6604

Eur. J. Immunol., Vol. 29, No. 9(1999), p. 2819-2825

Biochemistry, Vol. 39, No. 32(Aug. 2000), p. 9698-9708

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-14/825

C07K 16/00-16/46

PubMed

专利名称(译)	具有延长的半衰期的分子及其组合物和用途		
公开(公告)号	JP4336498B2	公开(公告)日	2009-09-30
申请号	JP2002561487	申请日	2001-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 公司		
当前申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司 Rejentsu董事会 - 得克萨斯大学系统		
[标]发明人	ダルアクアウイリアム ジョンソンレズリーエス ワードエリザベスサリー		
发明人	ダルアクア,ウイリアム ジョンソン,レズリー,エス. ワード,エリザベス,サリー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P31/16 A61P37/00 G01N33/534 A61K38/00 A61K39/00 A61K47/48 A61K49/00 C07K14/705 C07K16/00 C07K16/08 C07K19/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K47/6835 A61K49/0002 A61K2039/505 A61P11/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P37/00 A61P37/04 C07K14/70503 C07K16/00 C07K2317/52 C07K2317/53 C07K2319 /00 C07K2319/30 Y10S435/81 A61K49/0004 C07K2/00 C07K16/283 C07K2317/14 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/94		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K39/395.V A61K39/395.Y A61P31/16 A61P37/00 G01N33/534		
代理人(译)	荒井英一		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	60/254884 2000-12-12 US 60/289760 2001-05-09 US		
其他公开文献	JP2005501514A JP2005501514A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供分子, 包括IgG, 非IgG免疫球蛋白, 蛋白质和非蛋白质试剂, 其由于存在IgG恒定结构域或其结合FcRn的部分而具有增加的体内半衰期, 具有一个或更多的氨基酸修饰增加恒定结构域或片段对FcRn的亲和力。具有增加的半衰期的此类蛋白质和分子具有以下优点: 在这些分子的治疗, 预防或诊断用途中需要较少量或较少频率的给药。

ライブラリー	突然変異体*
251-256	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu (SEQ ID NO:90)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:91)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Ser (SEQ ID NO:92)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:93)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Glu (SEQ ID NO:94)
	Leu Trp Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:95)
	Leu Tyr Ile Ser Leu Glu (SEQ ID NO:96)
	Leu Phe Ile Ser Arg Asp (SEQ ID NO:97)
	Leu Phe Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:98)
	Leu Phe Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:99)
	Leu Phe Ile Thr Gly Ala (SEQ ID NO:100)
	Leu Ser Ile Ser Arg Glu (SEQ ID NO:101)
	Arg Thr Ile Ser Ile Ser (SEQ ID NO:102)
	308-314
Ile Pro His Glu Asp Trp Leu (SEQ ID NO:104)	
385-389	Arg Thr Arg Glu Pro (SEQ ID NO:105)
	Asp Pro Pro Glu Ser (SEQ ID NO:106)
	Ser Asp Pro Glu Pro (SEQ ID NO:107)
	Thr Ser His Glu Asn (SEQ ID NO:108)
	Ser Lys Ser Glu Asn (SEQ ID NO:109)
	His Arg Ser Glu Asn (SEQ ID NO:110)
	Lys Ile Arg Glu Asn (SEQ ID NO:111)