

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6307077号
(P6307077)

(45) 発行日 平成30年4月4日 (2018.4.4)

(24) 登録日 平成30年3月16日 (2018.3.16)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|---------------|-------------------------|-------------|------------------|
| C07K | 19/00 (2006.01) | C07K | 19/00 ZNA |
| C07K | 16/00 (2006.01) | C07K | 16/00 |
| C07K | 14/705 (2006.01) | C07K | 14/705 |
| C12N | 15/09 (2006.01) | C12N | 15/00 A |
| C12P | 21/02 (2006.01) | C12P | 21/02 C |

請求項の数 14 (全 43 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2015-524773 (P2015-524773) | (73) 特許権者 | 591003013 |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年7月31日 (2013.7.31) | | エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー |
| (65) 公表番号 | 特表2015-526429 (P2015-526429A) | | F. HOFFMANN-LA ROCH |
| (43) 公表日 | 平成27年9月10日 (2015.9.10) | | E AKTIENGESELLSCHAFT |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2013/066065 | | スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ |
| (87) 国際公開番号 | W02014/020056 | | グレンツァーヘルストラツセ124 |
| (87) 国際公開日 | 平成26年2月6日 (2014.2.6) | (74) 代理人 | 100102978 |
| 審査請求日 | 平成28年7月15日 (2016.7.15) | | 弁理士 清水 初志 |
| (31) 優先権主張番号 | 12179025.7 | (74) 代理人 | 100102118 |
| (32) 優先日 | 平成24年8月2日 (2012.8.2) | | 弁理士 春名 雅夫 |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | (74) 代理人 | 100160923 |
| | | | 弁理士 山口 裕孝 |
| | | (74) 代理人 | 100119507 |
| | | | 弁理士 刑部 俊 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不活性免疫グロブリンFc領域とのFc融合体としての可溶性FcRを生産するための方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式IIに記載の融合ポリペプチド:

R1-CS1-L1-CS2-FC-CS3-L2-CS4-R2 (式II)

式中、

R1は第1のFc受容体を表し、

R2は第2のFc受容体を表し、

FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CS1は第1の切断部位を表し、

CS2は第2の切断部位を表し、

CS3は第3の切断部位を表し、

CS4は第4の切断部位を表し、

L1は第1のリンカーを表し、かつ

L2は第2のリンカーを表し、

R1もしくはR2またはその両方が存在し、

CS1、CS2、CS3、CS4はいずれも、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、

L1およびL2は、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、

FCはR1および/またはR2に結合せず、

R1およびR2が、互いに独立して、ヒトFc受容体、ヒト新生児Fc受容体、マウスFc受容体

、およびウサギ新生仔Fc受容体からなる群から選択され、かつ

FCが、KabatのEUインデックスによるナンバリングで変異L234A、L235AおよびP329Gを有するヒトIgG1重鎖ポリペプチドである。

【請求項2】

請求項1記載の融合ポリペプチドを2つ含む、二量体型融合ポリペプチド。

【請求項3】

第1のFCが、KabatのEUインデックスによるナンバリングで変異T366Wを含み、かつ、第2のFCが、KabatのEUインデックスによるナンバリングで変異T366S、L368AおよびY407Vを含むことを特徴とする、請求項2に記載の融合ポリペプチド。

【請求項4】

第1のFCがKabatのEUインデックスによるナンバリングで変異S354Cをさらに含むことを特徴とする、請求項3に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項5】

第2のFCがKabatのEUインデックスによるナンバリングで変異Y349Cをさらに含むことを特徴とする、請求項3に記載の融合ポリペプチド。

【請求項6】

以下を特徴とする、請求項2~5のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド：

- (a) 第1および第2のポリペプチドのR1およびR2が同一である、
- (b) 第1の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であり、第2の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であるが第1の融合ポリペプチドのR1およびR2とは異なる、
- (c) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が同一であり、かつ、第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であるがR1とは異なる、
- (d) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が同一であり、かつ、R2はどちらも存在しない、
- (e) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が異なり、かつ、R2はどちらも存在しない、
- (f) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であり、かつ、R1はどちらも存在しない、
- (g) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が異なり、かつ、R1はどちらも存在しない、
または

20

(h) 第1の融合ポリペプチドのR1と第2のポリペプチドのR2とが異なり、かつ、第1の融合ポリペプチドのR2が存在せず、かつ、第2のポリペプチドのR1が存在しない。

30

【請求項7】

以下の工程を含み、それによって可溶性Fc受容体を生産する、可溶性Fc受容体を生産するための方法：

- (a) 請求項1~2のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を培養する工程、
- (b) 該細胞または培養培地から該融合ポリペプチドを回収する工程。

【請求項8】

(c)前記融合ポリペプチドをプロテアーゼで切断する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項7記載の方法。

【請求項9】

アフィニティクロマトグラフィーリガンドとしての、請求項1~6のいずれか一項に記載の固定化された融合ポリペプチドの使用。

40

【請求項10】

抗体のFc受容体結合を決定するための、請求項1~6のいずれか一項に記載の固定化された融合ポリペプチドの使用。

【請求項11】

前記融合ポリペプチドが固相に結合されていることを特徴とする、請求項9~10のいずれか一項に記載の使用。

【請求項12】

請求項1~6のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドを含む、医薬組成物。

50

【請求項13】

医薬の製造における、請求項1~6のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドの使用。

【請求項14】

前記医薬が炎症性疾患治療用であることを特徴とする、請求項13に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書では、自己凝集を防止する不活性免疫グロブリンFc領域との融合ポリペプチドとしての可溶性Fc受容体の生産方法、およびFcRクロマトグラフィーカラム、低アフィニティ抗体のFcR相互作用の決定などといった、その使用を報告する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

免疫グロブリンは、一般に、2本の軽ポリペプチド鎖と2本の重ポリペプチド鎖を含有する。重ポリペプチド鎖と軽ポリペプチド鎖は、それぞれが、抗原と相互作用することのできる結合ドメインを含有する可変領域（一般にポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含む。重ポリペプチド鎖と軽ポリペプチド鎖はそれぞれが定常領域（一般にカルボキシル末端部分）も含む。重鎖の定常領域は、例えばFc受容体（FcR）を持つ細胞（例えば食細胞）またはBrambell受容体としても公知である新生児Fc受容体（FcRn）を持つ細胞への免疫グロブリンの結合を媒介すると共に、補体（C1q）などの古典的補体系の因子を含むいくつかの因子への結合も媒介する。

20

【0003】

HulettとHogarth（Hulett, M.D. and Hogarth, P.M., *Adv. Immunol.* 57 (1994) 1-127（非特許文献1））は、Gクラスの免疫グロブリンのFc部分に対する細胞外受容体は、異なる結合特異性を有する3つの異なる受容体タイプ、すなわちFcRI、FcRII、FcRIIIを含む、膜貫通糖タンパク質のファミリーであることを報告した。タイプIの受容体が複合体を形成していないIgGと相互作用するのに対し、タイプIIおよびタイプIIIの受容体は複合体を形成したIgGと好ましく相互作用する。

【0004】

ヒトFcRIII（CD16）は2つのアイソフォームおよび2つの多型で存在する。第1のアイソフォームFcRIIIaは、GPIアンカー型膜タンパク質である第2のアイソフォームFcRIIIbとは異なる遺伝子によってコードされている膜貫通分子である。多型V159がアミノ酸配列の159位にバリン残基を有するのに対し、多型F159は159位にフェニルアラニン残基を有する。

30

【0005】

IgGクラスの免疫グロブリンの場合、ADCCとADCPは、Fc領域と、Fc（Fc）受容体（FcR）と呼ばれる受容体ファミリーとの会合によって支配される。ヒトでは、このタンパク質ファミリーに、FcRI（CD64）、アイソフォームFcRIIA、FcRIIB、およびFcRICを含むFcRII（CD32）、ならびにアイソフォームFcRIIIAおよびFcRIIIBを含むFcRIII（CD16）が含まれる（Raghavan and Bjorkman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996) 181-220（非特許文献2）、Abes, et al., *Expert Reviews* (2009) 735-747（非特許文献3））。FcRはさまざまな免疫細胞上に発現し、Fc/FcR複合体の形成は、抗原が結合している部位にこれらの細胞を動員して、典型的にはシグナル伝達および後続の免疫応答、例えば炎症媒介物質の放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、貪食、および細胞毒攻撃などをもたらす。さらにまた、FcRI、FcRIIA/C、およびFcRIIIAは、細胞内の免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）を特徴とする活性型受容体であるが、FcRIIIBは抑制モチーフ（ITIM）を有し、それゆえに抑制型である。FcRIは単量体IgGと高いアフィニティで結合するが、FcRIIIおよびFcRIIは、複合体化または凝集したIgGと相互作用する低アフィニティ受容体である。

40

【0006】

50

活性型Fc 受容体および抑制型Fc 受容体または補体の第1成分 (C1q) へのIgGの結合は、ヒンジ領域およびCH2ドメインにある残基に依存する。CH2ドメインの2つの領域がFc R結合および補体C1q結合にとって重大な意味を持ち、ユニークな配列を有する。ヒトIg G1およびIgG2の233 ~ 236位にある残基ならびにIgG4の327位、330位および331位にある残基の置換は、ADCCおよびCDCを著しく低減した (Armour, et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624 (非特許文献4)、Shields, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604 (非特許文献5))。Idusogieら (J. Immunol 166 (2000) 2571-2575 (非特許文献6)) は治療用抗体Rituxan (登録商標) についてC1q結合部位をマッピングし、Pro329Ala置換が、C1qと結合して補体を活性化するリツキシマブの能力を低減させることを示した。Pro329をAlaで置換するとFc RI、Fc RIIおよびFc RIIIA受容体への結合が低減すると報告されているが (Shields, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604 (非特許文献5))、この変異は、Fc RIおよびFc RIIには野生型様の結合を呈し、Fc RIIIA受容体への結合の減少はごくわずかに過ぎないとも記載されている (EP 1 068 241 (Genentech)) (特許文献1) の表1および表2)。

【0007】

WO 2010/048313 (特許文献2) には、Fc含有融合タンパク質を精製するための組換えFcRnとその変異体が報告されている。哺乳動物細胞におけるFc-X融合タンパク質の高レベル発現と分泌がLoらによって報告されている (Lo, K-M., et al., Prot. Eng. 11 (1998) 495-500 (非特許文献7))。Dumont, F.A.ら (Biodrugs 20 (2006) 151-160 (非特許文献8)) は、単量体型Fc融合体を報告している。Huang, C.によって、受容体-Fc融合体治療法、トラップ、およびMIMETIBODY (商標) 技術が報告されている (Curr. Opin. Biotechnol. 20 (2009) 592-599 (非特許文献9))。WO 01/03737 (特許文献3) には、免疫グロブリン融合タンパク質が報告されている。抗肥満タンパク質のFc融合タンパク質としての発現および送出が、WO 00/40615 (特許文献4) に報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】EP 1 068 241

【特許文献2】WO 2010/048313

【特許文献3】WO 01/03737

【特許文献4】WO 00/40615

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Hulett, M.D. and Hogarth, P.M., Adv. Immunol. 57 (1994) 1-127

【非特許文献2】Raghavan and Bjorkman, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12 (1996) 181-220

【非特許文献3】Abes, et al., Expert Reviews (2009) 735-747

【非特許文献4】Armour, et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624

【非特許文献5】Shields, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604

【非特許文献6】Idusogie, et al., J. Immunol 166 (2000) 2571-2575

【非特許文献7】Lo, K-M., et al., Prot. Eng. 11 (1998) 495-500

【非特許文献8】Dumont, F.A., et al., Biodrugs 20 (2006) 151-160

【非特許文献9】Huang, C., et al., Curr. Opin. Biotechnol. 20 (2009) 592-599

【発明の概要】

【0010】

Fc受容体を、融合されたFc受容体に実質的に結合しないFc領域との融合ポリペプチドとして発現させることにより、可溶性Fc受容体を生産することができることを見出した。Fc受容体の発現に融合ポリペプチドを使用すると、融合ポリペプチドの形態で、または単離された受容体として、取得可能なFc受容体の収量が増加する。加えて、本明細書において報告する融合ポリペプチドにより、例えばアビディティを増加させるために複数コピーの

10

20

30

40

50

Fc受容体を単一分子中で組み合わせる際の自由度、または（起源が異なる、もしくはタイプが異なる、またはその両方である）異なるFc受容体を単一分子中で組み合わせる際の自由度が増す。

【 0 0 1 1 】

本明細書において報告する一局面は、以下の式Iに記載の融合ポリペプチドである：

R1-FC-R2（式I）

式中、

R1は第1のFc受容体を表し、

R2は第2のFc受容体を表し、かつ

FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

R1もしくはR2またはその両方が存在し、

FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない。

【 0 0 1 2 】

一態様では、当該融合ポリペプチドは、以下の式IIを有する：

R1-CS1-L1-CS2-FC-CS3-L2-CS4-R2（式II）

式中、

R1は第1のFc受容体を表し、

R2は第2のFc受容体を表し、

FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CS1は第1の切断部位を表し、

CS2は第2の切断部位を表し、

CS3は第3の切断部位を表し、

CS4は第4の切断部位を表し、

L1は第1の介在アミノ酸配列を表し、かつ

L2は第2の介在アミノ酸配列を表し、

R1もしくはR2またはその両方が存在し、

CS1、CS2、CS3、CS4はいずれも、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、

L1およびL2は、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、

FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない。

【 0 0 1 3 】

一態様では、R1およびR2は、互いに独立して、ヒトFc受容体、ヒト新生児Fc受容体、マウスFc受容体、およびウサギ新生仔Fc受容体の群から選択される。

【 0 0 1 4 】

一態様では、ヒトFc受容体は、ヒトFc RI（CD64）、ヒトFc RII（CD32）、ヒトFc RIIA、ヒトFc RIIB、ヒトFc RIIC、ヒトFc RIII（CD16）、ヒトFc RIIIA、およびヒトFc RIIIBから選択される。

【 0 0 1 5 】

一態様では、ヒト新生児Fc受容体はヒトFcRnである。

【 0 0 1 6 】

一態様では、マウスFc受容体は、マウスFc RI（CD64）、マウスFc RII（CD32）、マウスFc RIIB、マウスFc RIII（CD16）、マウスFc RIII-2（CD16-2）、およびマウスFc RIVから選択される。

【 0 0 1 7 】

一態様では、FCは、ヒトIgG重鎖ポリペプチド、マウスIgG重鎖ポリペプチド、ウサギIgG重鎖ポリペプチドの群から選択される重鎖ポリペプチドの変異体である。

【 0 0 1 8 】

一態様では、FCは、ヒトIgG1重鎖ポリペプチド、ヒトIgG2重鎖ポリペプチド、ヒトIgG3重鎖ポリペプチド、ヒトIgG4重鎖ポリペプチド、マウスIgG1重鎖ポリペプチド、マウスIgG2重鎖ポリペプチド、マウスIgG2a重鎖ポリペプチド、マウスIgG3重鎖ポリペプチド、ウサギIgG重鎖ポリペプチドの群から選択される重鎖ポリペプチドの変異体である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

一態様では、重鎖Fc領域ポリペプチドは、234位、235位、236位、237位、238位、239位、253位、254位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、288位、297位、298位、299位、307位、311位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、434位、および435位のうちの1つまたは複数にアミノ酸変異を有する。

【 0 0 2 0 】

一態様では、Fc受容体の1つまたは複数がFc 受容体である。

【 0 0 2 1 】

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置233、234、235、236、265、297、329、および331のうちの1つまたは複数に変異を有する。

10

【 0 0 2 2 】

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異E233P、L234A、L235A、L235E、G236、D265A、N297A、N297D、P329A、P329G、およびP331Sのうちの1つまたは複数に有する。

【 0 0 2 3 】

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異L234AおよびL235Aと、E233P、L235E、G236、D265A、N297A、N297D、P329A、P329G、およびP331Sのうちの1つまたは複数とを有する。

【 0 0 2 4 】

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異L234AおよびL235Aと、P329AまたはP329Gとを有する。

20

【 0 0 2 5 】

一態様では、ヒトIgG2重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置233、234、235、236、265、および329のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【 0 0 2 6 】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置228、235、265、および329のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【 0 0 2 7 】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、変異S228P、L235E、P329A、およびP329Gのうちの1つまたは複数に有する。

30

【 0 0 2 8 】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、変異S228PおよびL235Eと、P329AまたはP329Gとを有する。

【 0 0 2 9 】

一態様では、重鎖Fc領域ポリペプチドは、248位、250位、251位、252位、253位、254位、255位、256位、257位、272位、285位、288位、290位、291位、308位、309位、310位、311位、314位、385位、386位、387位、428位、433位、434位、435位、および436位のうちの1つまたは複数にアミノ酸変異を有する。

【 0 0 3 0 】

一態様では、Fc受容体の1つまたは複数がFcRnである。

40

【 0 0 3 1 】

一態様では、ヒトIgG重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439、および/または447のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【 0 0 3 2 】

一態様では、FcRnへの結合が低減しているヒトIgG重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439、および/または447に1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。

【 0 0 3 3 】

50

一態様では、FcRnへの結合が低減しているヒトIgG重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異I253A、H310A、およびH435Aを有する。

【0034】

一態様では、介在アミノ酸配列は、(G3S)3、(G3S)4、(G3S)5、(G3S)6、(G4S)3、(G4S)4、(G4S)5、(G5S)2、(G5S)3、および(G5S)4を含む第1群から選択されるか、またはArgタグ、Aviタグ、His-Aviタグ、Hisタグ、Flagタグ、3×Flagタグ、Strepタグ、Nanoタグ、SBPタグ、c-mycタグ、Sタグ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、GSTタグ、もしくはMBPタグを含む第2群から選択されるか、またはこれらの群の2つの要素の組み合わせから選択される。

【0035】

一態様では、切断部位は、IgAプロテアーゼ切断部位、グランザイムBプロテアーゼ切断部位、TEVプロテアーゼ切断部位、PreScissionプロテアーゼ切断部位、トロンピン切断部位、第Xa因子プロテアーゼ部位、IdeSプロテアーゼ切断部位、エンテロキナーゼ切断部位、またはSUMOプロテアーゼ切断部位から選択される。

【0036】

一態様では、融合ポリペプチドは、固有のプロテアーゼ切断部位、例えばパパイン切断部位、ペプシン切断部位、またはIdeSプロテアーゼ切断部位など以外は、追加のプロテアーゼ切断部位を含まない。

【0037】

本明細書において報告する一局面は、本明細書において報告する融合ポリペプチドを2つ含む二量体型融合ポリペプチドである。

【0038】

一態様では、第1のFCは、変異T366Wおよび任意で変異S354Cを含み、第2のFCは、変異T366S、L368AおよびY407Vならびに任意で変異Y349Cを含む。

【0039】

一態様では、融合ポリペプチドは以下を特徴とする：

- (a) 第1および第2のポリペプチドのR1およびR2が同一である、
- (b) 第1の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であり、第2の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であるが第1の融合ポリペプチドのR1およびR2とは異なる、
- (c) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が同一であり、かつ、第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であるがR1とは異なる、
- (d) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1は同一であり、かつ、R2はどちらも存在しない、
- (e) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が異なり、かつ、R2はどちらも存在しない、
- (f) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であり、かつ、R1はどちらも存在しない、
- (g) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が異なり、かつ、R1はどちらも存在しない、
- (h) 第1の融合ポリペプチドのR1と第2のポリペプチドのR2とが異なり、かつ、第1の融合ポリペプチドのR2は存在せず、かつ、第2のポリペプチドのR1は存在しない。

【0040】

本明細書において報告する一局面は、

- (a) 本明細書において報告する融合ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を培養する工程、
 - (b) 細胞または培養培地から融合ポリペプチドを回収する工程、
 - (c) 任意で、融合ポリペプチドをプロテアーゼで切断する工程
- を含み、それによって可溶性Fc受容体を生産する、可溶性Fc受容体を生産するための方法である。

【0041】

本明細書において報告する一局面は、アフィニティクロマトグラフィーリガンドとしての、本明細書において報告する固定化された融合ポリペプチドまたは固定化された二量体

10

20

30

40

50

型融合ポリペプチドの使用である。

【0042】

本明細書において報告する一局面は、抗体のFc受容体結合を決定するための、本明細書において報告する固定化された融合ポリペプチドまたは固定化された二量体型融合ポリペプチドの使用である。

【0043】

一態様では、融合ポリペプチドは固相に結合されている。

【0044】

本明細書において報告する一局面は、本明細書において報告する融合ポリペプチドを含む医薬組成物である。

10

【0045】

本明細書において報告する一局面は、医薬の製造における、本明細書において報告する融合ポリペプチドの使用である。

【0046】

一態様では、当該医薬は炎症性疾患の治療用である。

【0047】

一態様では、当該疾患は、増加した抗体レベルを特徴とする疾患である。

【0048】

一態様では、当該疾患は、自己免疫疾患である。

【0049】

一態様では、当該疾患は、関節リウマチである。

20

[本発明1001]

以下の式Iに記載の融合ポリペプチド:

R1-FC-R2 (式I)

式中、

R1は第1のFc受容体を表し、

R2は第2のFc受容体を表し、かつ

FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

R1もしくはR2またはその両方が存在し、

FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない。

30

[本発明1002]

以下の式IIを有することを特徴とする、本発明1001の融合ポリペプチド:

R1-CS1-L1-CS2-FC-CS3-L2-CS4-R2 (式II)

式中、

R1は第1のFc受容体を表し、

R2は第2のFc受容体を表し、

FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CS1は第1の切断部位を表し、

CS2は第2の切断部位を表し、

CS3は第3の切断部位を表し、

CS4は第4の切断部位を表し、

L1は第1のリンカーを表し、かつ

L2は第2のリンカーを表し、

R1もしくはR2またはその両方が存在し、

CS1、CS2、CS3、CS4はいずれも、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、

L1およびL2は、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、

FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない。

40

[本発明1003]

R1およびR2が、互いに独立して、ヒトFc受容体、ヒト新生児Fc受容体、マウスFc受容体、およびウサギ新生仔Fc受容体の群から選択されることを特徴とする、前記本発明のい

50

ずれかの融合ポリペプチド。

[本発明1004]

FCが、ヒトIgG1重鎖ポリペプチド、ヒトIgG2重鎖ポリペプチド、ヒトIgG3重鎖ポリペプチド、ヒトIgG4重鎖ポリペプチド、マウスIgG1重鎖ポリペプチド、マウスIgG2重鎖ポリペプチド、マウスIgG2a重鎖ポリペプチド、マウスIgG3重鎖ポリペプチド、およびウサギIgG重鎖ポリペプチドの群から選択される重鎖ポリペプチドの変異体であることを特徴とする、前記本発明のいずれかの融合ポリペプチド。

[本発明1005]

FCが、変異L234A、L235AおよびP329Gを有するヒトIgG1重鎖ポリペプチド、変異S228PおよびL235Eを有するヒトIgG4重鎖ポリペプチド、変異I253A、H310AおよびA435Aを有するヒトIgG1重鎖ポリペプチドから選択されることを特徴とする、前記本発明のいずれかの融合ポリペプチド。

10

[本発明1006]

本発明1001～1005のいずれかの融合ポリペプチドを2つ含む、二量体型融合ポリペプチド。

[本発明1007]

第1のFCが、変異T366Wおよび任意で変異S354Cを含み、かつ、第2のFCが、変異T366S、L368AおよびY407Vならびに任意で変異Y349Cを含むことを特徴とする、本発明1006の融合ポリペプチド。

[本発明1008]

以下を特徴とする、本発明1006～1007のいずれかの融合ポリペプチド：

(a) 第1および第2のポリペプチドのR1およびR2が同一である、

(b) 第1の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であり、第2の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であるが第1の融合ポリペプチドのR1およびR2とは異なる、

(c) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が同一であり、かつ、第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であるがR1とは異なる、

(d) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が同一であり、かつ、R2はどちらも存在しない、

(e) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が異なり、かつ、R2はどちらも存在しない、

(f) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であり、かつ、R1はどちらも存在しない、

20

30

(g) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が異なり、かつ、R1はどちらも存在しない、

(h) 第1の融合ポリペプチドのR1と第2のポリペプチドのR2とが異なり、かつ、第1の融合ポリペプチドのR2が存在せず、かつ、第2のポリペプチドのR1が存在しない。

[本発明1009]

以下の工程を含み、それによって可溶性Fc受容体を生産する、可溶性Fc受容体を生産するための方法：

(a) 本発明1001～1006のいずれかの融合ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を培養する工程、

(b) 該細胞または培養培地から該融合ポリペプチドを回収する工程、

(c) 任意で、該融合ポリペプチドをプロテアーゼで切断する工程。

40

[本発明1010]

アフィニティークロマトグラフィーリガンドとしての、本発明1001～1008のいずれかの固定化された融合ポリペプチドの使用。

[本発明1011]

抗体のFc受容体結合を決定するための、本発明1001～1008のいずれかの固定化された融合ポリペプチドの使用。

[本発明1012]

前記融合ポリペプチドが固相に結合されていることを特徴とする、本発明1010～1011のいずれかの使用。

50

[本発明1013]

本発明1001～1008のいずれかの融合ポリペプチドを含む、医薬組成物。

[本発明1014]

医薬の製造における、本発明1001～1008のいずれかの融合ポリペプチドの使用。

[本発明1015]

前記医薬が炎症性疾患治療用であることを特徴とする、本発明1014の使用。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】融合ポリペプチド発現プラスミドのプラスミド地図。

【図2】バイン切断の分析用SDS-PAGEゲル。

【図3】12%ビストリスゲル±DTT。それぞれ、PreScissionプロテアーゼ（レーン3、8）、IgAプロテアーゼ（レーン2、7）による、Fc RIIIaV158-Avi-Fc LALA P239Gの切断。PPによる非特異的切断がわかる（レーン3、8）。

【図4】グリコシル化型の異なる抗Her抗体（野生型、上）および糖鎖工学的に操作された抗Her抗体の分離および定量。

【図5】Fc RIIIaV158およびFcタグ付きFc RIIIaV158を用いたアフィニティカラムの比較。

【図6】Fc RIIIaV158-Fc LALA P329G融合ポリペプチドのレスポンスのBIAcoreセンサーグラムは、40レスポンスユニットであるFc RIIIaV158と比較して、100RUを上回るレスポンスを示す。FcRIIIa V 158_008は非切断融合ポリペプチドを表し、FcRIIIa V 158_007はFcRIIIaの短縮型非機能的変異体（＝対照）を表し、FcRIIIa V 158_jf323は、インタクトなHisAviタグを含むFcRIIIa機能的変異体を表す。

【図7a】Fc 受容体V158-Fc LALA P329G融合ポリペプチドのセンサーグラム。

【図7b】Fc 受容体V158のセンサーグラム。

【図7c】切断されたFc 受容体V158-Fc LALA P329G融合ポリペプチドのセンサーグラム。

【図7d】非機能的Fc 受容体V158-Fc LALA P329G融合ポリペプチド（＝対照）のセンサーグラム。

【発明を実施するための形態】

【0051】

発明の詳細な説明定義

「Fc受容体への結合」という用語は、例えばBIAcore（登録商標）アッセイ（Pharmacia Biosensor AB、スウェーデン国ウプサラ）におけるFc受容体へのFc領域の結合を表す。

【0052】

BIAcore（登録商標）アッセイでは、Fc受容体を表面に結合させ、分析物、例えばFc領域を含む融合ポリペプチドまたは抗体の結合を、表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定する。結合のアフィニティは、 k_a 項（会合定数：Fc領域融合ポリペプチドまたはコンジュゲートの会合によるFc領域/Fc受容体複合体の形成に関する速度定数）、 k_d 項（解離定数：Fc領域/Fc受容体複合体からのFc領域融合ポリペプチドまたはコンジュゲートの解離に関する速度定数）、およびKD項（ k_d/k_a ）によって定義される。あるいは、SPRセンサーグラムの結合シグナルを、レゾナンスシグナル高さと解離挙動に関して、参照のレスポンスシグナルと直接比較することもできる。

【0053】

「CH2ドメイン」という用語は、およそEU231位からEU340位（KabatによるEUナンバリングシステム）までにわたる、抗体重鎖ポリペプチドの一部を表す。一態様では、CH2ドメインは、SEQ ID NO:01

10

20

30

40

(APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAK)

のアミノ酸配列を有する。CH2ドメインは、もう一方のドメインと密接には対形成しない点でユニークである。正確にいうと、インタクトな天然型Fc領域の2つのCH2ドメインの間に2つのN結合型分岐糖鎖が挿入されている。当該糖はドメイン-ドメイン対形成の代わりになってCH2ドメインの安定化を助けうると推測されている。Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206。

【 0 0 5 4 】

「CH3ドメイン」という用語は、およそEU341位からEU446位までにわたる、抗体重鎖ポリペプチドの一部を表す。一態様では、CH3ドメインは、SEQ ID NO:02

(GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG)

のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 5 5 】

抗体の「クラス」という用語は、その重鎖が持つ定常ドメインまたは定常領域のタイプを表す。抗体にはIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの5つの主要クラスがあり、これらのうちのいくつかは、さらにサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂に分割することができる。異なる免疫グロブリンクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、
、
、
、およびμと呼ばれる。

【 0 0 5 6 】

「Fc領域」という用語は、免疫グロブリンのC末端領域を表す。Fc領域は、ジスルフィドで連結された2つの抗体重鎖Fc領域ポリペプチド(Fc領域ポリペプチド鎖)を含む二量体型分子である。Fc領域は、インタクトな(完全長の)抗体のパパイン消化、またはIdeS消化、またはトリプシン消化によって生成させるか、組換え的に生産することができる。

【 0 0 5 7 】

完全長の抗体または免疫グロブリンから取得可能なFc領域は、残基226(Cys)から完全長重鎖のC末端までを含み、したがってヒンジ領域の一部と、2つまたは3つの定常ドメイン、すなわちCH2ドメイン、CH3ドメイン、および任意でCH4ドメインとを含む。Fc領域中の所定のアミノ酸残基の修飾が表現型効果をもたらすことは、US 5,648,260およびUS 5,624,821から公知である。

【 0 0 5 8 】

同一のまたは同一ではない2つの抗体重鎖断片を含む二量体型Fc領域の形成は、含まれているCH3ドメインの非共有結合的二量体化によって媒介される(関与するアミノ酸残基については、例えば Dall'Acqua, Biochem. 37 (1998) 9266-9273参照)。Fc領域はヒンジ領域におけるジスルフィド結合の形成によって共有結合的に安定化される(例えば Huber, et al., Nature 264 (1976) 415-420、Thies, et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 67-79参照)。CH3-CH3ドメイン二量体化に関与する残基の場所がCH3ドメインの内表面にあるのに対して、Fc領域-FcRn相互作用に関与する残基はCH2-CH3ドメインの外側にあるので、CH3-CH3ドメイン二量体化相互作用を破壊するためにCH3ドメイン内にアミノ酸残基変化を導入しても、FcRn結合には有害な影響を及ぼさない。

【 0 0 5 9 】

Fc領域に関連するエフェクター機能は、Fc領域とエフェクター機能特異的細胞表面受容体との相互作用によって惹起される。IgG1アイソタイプの抗体の大半が受容体の活性化を達成しうののに対し、IgG2およびIgG4アイソタイプの抗体はエフェクター機能を有さないか、または限られたエフェクター機能しか有さない。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

エフェクター機能を誘発する受容体は、Fc受容体タイプ（およびサブタイプ）Fc RI、Fc RIIおよびFc RIIIである。IgG1アイソタイプに関連するエフェクター機能は、Fc RおよびC1qとの結合に関与する下部ヒンジ領域に特異的なアミノ酸変化（例えばL234Aおよび/またはL235A）を導入することによって低減することができる。特定のアミノ酸残基（とりわけCH2および/またはCH3ドメインにあるもの）は、抗体分子またはFc領域融合ポリペプチドの血流中での循環半減期とも関連する。循環半減期は新生児Fc受容体（FcRn）へのFc領域の結合によって決まる。

【 0 0 6 1 】

抗体の定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングはKabatのEUインデックス（Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of immunological Interest, U.S. Department of Public Health、メリーランド州ベセスダ）に従って行う。

【 0 0 6 2 】

「ヒト起源のFc領域」という用語は、ヒンジ領域の少なくとも一部、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含有するヒト起源の免疫グロブリン重鎖のC末端領域を表す。一態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226またはPro230から重鎖のカルボキシル末端までにわたる。ただしFc領域のC末端リジン（Lys447）は存在してもしなくてもよい。本明細書に別段の明記がある場合を除き、Fc領域または定常領域内のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載のEUインデックスとも呼ばれるEUナンバリングシステムに従う。

【 0 0 6 3 】

「Fc領域のFcRn結合部分」という用語は、抗体重鎖ポリペプチドのうち、およそEU243位からEU261位まで、およびおよそEU275位からEU293位まで、およびおよそEU302位からEU319位まで、およびおよそEU336位からEU348位まで、およびおよそEU367位からEU393位まで、およびEU408位、およびおよそEU424位からEU440位までにわたる部分を表す。一態様では、KabatのEUナンバリングによるアミノ酸残基：

F243, P244, P245 P,

K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439, およびS440 (EUナンバリング)

のうちの1つまたは複数が改変されている。

【 0 0 6 4 】

IgG1アイソタイプの野生型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 03)

を有する。

【 0 0 6 5 】

変異L234A、L235Aを有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 04)

10

を有する。

【 0 0 6 6 】

T366S、L368AおよびY407V変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 05)

20

を有する。

【 0 0 6 7 】

T366W変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 06)

30

を有する。

【 0 0 6 8 】

L234A、L235AおよびT366S、L368AおよびY407V変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 07)

40

を有する。

【 0 0 6 9 】

L234A、L235AおよびT366W変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 08)

を有する。

【 0 0 7 0 】

P329G変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

10

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 09)

を有する。

【 0 0 7 1 】

L234A、L235AおよびP329G変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

20

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

を有する。

【 0 0 7 2 】

P239GおよびT366S、L368AおよびY407V変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

30

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

を有する。

【 0 0 7 3 】

P329GおよびT366W変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

40

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12)

を有する。

【 0 0 7 4 】

L234A、L235A、P329GおよびT366S、L368AおよびY407V変異を有するIgG1アイソタイプの
変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列： 10

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

を有する。

【 0 0 7 5 】

L234A、L235A、P329GおよびT366W変異を有するIgG1アイソタイプの変異ヒトFc領域のポ
リペプチド鎖は以下のアミノ酸配列： 20

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

を有する。

【 0 0 7 6 】

IgG4アイソタイプの野生型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 15) 30

を有する。

【 0 0 7 7 】

S228PおよびL235E変異を有するIgG4アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は
以下のアミノ酸配列： 40

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 16) 50

を有する。

【 0 0 7 8 】

S228P、L235EおよびP329G変異を有するIgG4アイソタイプの変異ヒトFc領域のポリペプチド鎖は以下のアミノ酸配列：

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 17)

10

を有する。

【 0 0 7 9 】

用語「Fc受容体」、略して「FcR」は、Fc領域に結合する受容体を表す。一態様では、FcRは天然型配列ヒトFcRである。さらにまた、一態様では、FcRは、IgG抗体と結合するFcR (Fc 受容体) であり、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIIサブクラスを受容体 (そのアレル変異体および選択的スプライス型を含む) を包含する。Fc RII受容体には、主としてその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有するFc RIIA (「活性型受容体」) およびFc RIIB (「抑制型受容体」) が含まれる。FcRについては、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9 (1991) 457-492、Capel, et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34、de Haas, et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341に総説がある。他のFcRも本明細書における用語「FcR」に包含される。この用語は、胎児への母体IgGの移行を担う新生児受容体FcRnも包含する (例えばGuyer, et al., *J. Immunol.* 117 (1976) 587、Kim, et al., *J. Immunol.* 24 (1994) 249参照)。

20

【 0 0 8 0 】

用語「Fc 受容体」、略して「Fc R」または「FcガンマR」は、IgG抗体Fc領域と結合しかつFc R遺伝子によってコードされるタンパク質のファミリーの任意のメンバーを表す。ヒトでは、このファミリーに、Fc RI (CD64) [アイソフォームFc RIA、Fc RIB、およびFc RICを含む]、Fc RII (CD32) [アイソフォームFc RIIA (アロタイプH131およびR131を含む)、Fc RIIB (Fc RIIB-1およびFc RIIB-2を含む)、およびFc RIICを含む]、およびFc RIII (CD16) [アイソフォームFc RIIIA (アロタイプV158およびF158; Swiss-ProtエントリP08637;

30

N- 末端 -

MRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCGAYSPEDNSTQWFHNESLI
SSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVF
KEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQ-C-末端; SEQ ID
NO: 18)

40

を含む) およびFc RIIIb (アロタイプFc RIIB-NA1およびFc RIIB-NA2を含む) を含む] (例えば参照により本明細書に全て組み込まれるJefferis et al., *Immunol. Lett.* 82 (2002) 57-65参照)、ならびにFc Rアイソフォームまたはアロタイプが含まれるが、それらに限定されるわけではない。Fc Rは、限定するわけではないがヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルなど、任意の生物に由来しうる。マウスFc Rには、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、Fc RIII (CD16)、およびFc RIII-2 (CD16-2)、ならびにFc Rアイソフォームまたはアロタイプが含まれるが、それらに限定されるわけではない。Fc 領域-Fc R相互作用に関与するアミノ酸残基は、234 ~ 239 (下部ヒンジ領域)、265 ~ 269 (B/Cループ)、297 ~ 299 (D/Eループ)、および327 ~ 332 (F/G) ループである (Sondermann, et al., *Nature* 406 (2000) 267-273)。Fc RI、Fc RIIA、Fc RIIB、および/ま

50

たはFc RIIIAに対する結合/アフィニティの低下をもたらすアミノ酸変異には、N297A (免疫原性の減少および半減期の延長と同時に結合/アフィニティの低下) (Routledge, et al., Transplantation 60 (1995) 847、Friend et al., Transplantation 68 (1999) 1632、Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (1995) 6591)、残基233~236 (Ward and Ghetie, Ther. Immunol. 2 (1995) 77、Armour et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613) などがある。いくつかの例示的アミノ酸置換が、US 7,355,008およびUS 7,381,408に記載されている。

【0081】

用語「新生児Fc受容体」、略して「FcRn」は、IgG抗体Fc領域と結合し、かつ少なくともその一部がFcRn遺伝子によってコードされているタンパク質を表す。FcRnは、限定するわけではないがヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルなど、任意の生物に由来する。当技術分野においては公知であるように、機能的FcRnタンパク質は2つのポリペプチドを含み、それらは重鎖および軽鎖と呼ばれることが多い。軽鎖は κ -2-ミクログロブリンであり、重鎖はFcRn遺伝子によってコードされている。本明細書において別段の注記がある場合を除き、FcRnまたはFcRnタンパク質とは、FcRn重鎖と κ -2-ミクログロブリンとの複合体を指す。FcRnと相互作用するFc領域のアミノ酸残基は、CH2ドメインとCH3ドメインの接合部近くにある。Fc領域-FcRn接触残基は全て単一のIgG重鎖内にある。関与するアミノ酸残基は248、250~257、272、285、288、290~291、308~311、および314 (全てCH2ドメイン中) およびアミノ酸残基385~387、428、および433~436 (全てCH3ドメイン中) である。FcRnに対する結合/アフィニティの向上をもたらすアミノ酸変異には、T256A、T307A、E380A、およびN434Aなどがある (Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591)。

【0082】

種間で保存されている新生児Fc受容体のアミノ酸残基は、Fc領域中の310位および435位にあるヒスチジン残基である。これらの残基はFc領域FcRn相互作用のpH依存性の原因である (例えばVictor, G., et al., Nature Biotechnol. 15 (1997) 637-640、Dall'Acqua, W. F., et al., J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180参照)。FcRnとの相互作用を弱めるFc領域変異は抗体半減期を短縮させる。

【0083】

「ヒンジ領域」という用語は、抗体重鎖ポリペプチドのうち、CH1ドメインとCH2ドメインとを接合している部分、例えば、KabatのEUナンバリングシステムで約216位から約230位までを表す。ヒンジ領域は通常、アミノ酸配列が同一である2つのポリペプチドからなる二量体分子である。ヒンジ領域は一般に約25個のアミノ酸残基を含み、フレキシブルであって、抗原結合領域が独立して動くことを可能にしている。ヒンジ領域は、3つのドメイン、すなわち上部、中央、および下部ヒンジドメインに細分化することができる (Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083)。

【0084】

Fc領域の「下部ヒンジ領域」という用語は、ヒンジ領域のすぐC末端側にある一続きのアミノ酸残基、すなわちKabatのEUナンバリングでFc領域の残基233~239を表す。

【0085】

「野生型Fc領域」という用語は、自然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を表す。野生型ヒトFc領域には、天然型ヒトIgG1Fc領域 (非AおよびAアロタイプ)、天然型ヒトIgG2Fc領域、天然型ヒトIgG3Fc領域、および天然型ヒトIgG4Fc領域、ならびにその天然変異体が含まれる。

【0086】

「医薬組成物」という用語は、そこに含有される有効成分の生物学的活性が有効でありうるような形態をしており、かつその製剤を投与される対象にとって許容できないほど毒性である追加の構成要素を含有しない調製物を指す。

【0087】

「薬学的に許容される担体」とは、有効成分以外の医薬組成物中の成分であって、対象

10

20

30

40

50

にとって非毒性の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0088】

「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸からなるポリマーを表し、天然に生産されたか、合成的に生産されたかは問わない。約20アミノ酸未満のポリペプチドを「ペプチド」という場合があり、一方、2つ以上のポリペプチドからなる分子または100アミノ酸残基を上回る1つのポリペプチドを含む分子を「タンパク質」という場合がある。ポリペプチドは非アミノ酸構成要素、例えば糖質基、金属イオン、またはカルボン酸エステルなども含む。非アミノ酸構成要素は、当該ポリペプチドを発現する細胞によって付加される場合があり、細胞のタイプによって異なりうる。本明細書では、ポリペプチドをそのアミノ酸主鎖構造またはそれをコードする核酸によって定義する。糖質基などの付加物は一般的には明記しないが、それでも存在しうる。

10

【0089】

「アミノ酸配列タグ」という用語は、特異的結合特性を有する、互いにペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基の配列を表す。一態様では、アミノ酸配列タグはアフィニティタグまたは精製タグである。一態様では、アミノ酸配列タグは、Argタグ、Hisタグ、Aviタグ、His-Aviタグ、Flagタグ、3×Flagタグ、Strepタグ、Nanoタグ、SBPタグ、c-mycタグ、Sタグ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、GSTタグ、およびMBPタグを含む群から選択される。一態様では、アミノ酸配列タグは、

20

SEQ ID NO: 19 (RRRRR), SEQ ID NO: 20 (RRRRRR), SEQ ID NO: 21 (Avi-タグ), SEQ ID NO: 22 (His-Avi-タグ), SEQ ID NO: 23 (HHHHHH), SEQ ID NO: 24 (KDHLIHNVHKEFHAAHANK), SEQ ID NO: 25 (DYKDDDDDK), SEQ ID NO: 26 (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDDK), SEQ ID NO: 27 (AWRHPQFGG), SEQ ID NO: 28 (WSHPQFEK), SEQ ID NO: 29 (MDVEAWLGAR), SEQ ID NO: 30 (MDVEAWLGARVPLVET), SEQ ID NO: 31 (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP), SEQ ID NO: 32 (EQKLISEEDL), SEQ ID NO: 33 (KETAAAKFERQHMDL), SEQ ID NO: 34 (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), SEQ ID NO: 35 (セルロース結合ドメイン), SEQ ID NO: 36 (セルロース結合ドメイン), SEQ ID NO: 37 (TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ), SEQ ID NO: 38 (GST-タグ), および SEQ ID NO: 39 (MBP-タグ) を含む群から選択される。

30

【0090】

「酵素切断部位」という用語は、プロテアーゼによって特異的に切断されうる、互いにペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基の配列を表す。一態様では、プロテアーゼは、IgAプロテアーゼ、グランザイムB、TEVプロテアーゼ、PreScissionプロテアーゼ、トロンピン、第Xa因子、IdeSプロテアーゼ、またはエンテロキナーゼである。

40

【0091】

「IgAプロテアーゼ」という用語は、認識部位が以下の配列：

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| Pro-Ala-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 40) |
| Pro-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 41) |
| Pro-Pro ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 42) |
| Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 43) |
| Pro-Pro ↓ Gly-Pro | (SEQ ID NO: 44) |
| Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 45) |
| Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 46) |
| Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 47) |
| Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 48) |
| Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Gly-Pro | (SEQ ID NO: 49) |
| Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 50) |
| Ala-Pro-Pro-Ala ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 51) |
| Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 52) |
| Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 53) |
| Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Gly-Pro | (SEQ ID NO: 54) |

(配列中の「 ↓ 」は切断される結合の位置を表す)のうちの一つを含む淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 由来のプロテアーゼを表す。 20

【 0 0 9 2 】

本願において使用する「リンカー」または「ペプチドリinker」という用語は、天然起源および/または合成起源のペプチドリinkerを表す。それらは、20の天然アミノ酸を単量体のビルディングブロックとする直鎖状アミノ酸鎖からなる。この鎖は1~50アミノ酸、好ましくは1~28アミノ酸、特に好ましくは3~25アミノ酸の長さを有する。リンカーは、反復アミノ酸配列または天然ポリペプチドの配列、例えばヒンジ機能を有するポリペプチドを含有しうる。リンカーは、抗CD4抗体にコンジュゲートされたペプチドが正しく折りたたまれ、適性に提示されることを可能にすることにより、ペプチドがその生物学的活性を発揮しうることを保証する機能を有する。好ましくは、リンカーは、グリシン、グルタミン、および/またはセリン残基に富むように設計された「合成ペプチドリinker」である。これらの残基は、GGGGS、QQQGG、またはSSSSGなど、5アミノ酸までの小さな反復単位として編成される。この小さな反復単位を2回~5回繰り返して、多量体単位を形成させることができる。多量体単位のアミノ末端および/またはカルボキシ末端には、さらに6個までの任意の天然アミノ酸を追加することができる。別の合成ペプチドリinkerは、一種のアミノ酸から構成されてそれが10回~20回繰り返され、アミノ末端および/またはカルボキシ末端には、さらに6個までの任意の天然アミノ酸を含むことができる。ペプチドリinkerは全て核酸分子でコードすることができ、それゆえに組換え発現させることができる。 30

【 0 0 9 3 】

本明細書において報告する融合ポリペプチド

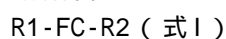
Fc受容体を、融合されるそのFc受容体に実質的に結合しないFc領域との融合ポリペプチドとして発現させることによって可溶性Fc受容体を生産できることがわかった。

【 0 0 9 4 】

「Fc受容体に実質的に結合しない」という用語は、Fc受容体と融合されるFc領域が、凝集体が形成される程にはFc受容体に結合しないことを表す。

【 0 0 9 5 】

本明細書において報告する一局面は、以下の式Iに記載の融合ポリペプチドである：



式中、

10

20

30

40

50

R1は第1のFc受容体を表し、
 R2は第2のFc受容体を表し、かつ
 FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、
 R1もしくはR2またはその両方が存在し、
 FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない。

【0096】

本明細書において報告する一局面は、以下の式IIに記載の融合ポリペプチドである：

R1-CS1-L1-CS2-FC-CS3-L2-CS4-R2 (式II)

式中、

R1は第1のFc受容体を表し、
 R2は第2のFc受容体を表し、
 FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、
 CS1は第1の切断部位を表し、
 CS2は第2の切断部位を表し、
 CS3は第3の切断部位を表し、
 CS4は第4の切断部位を表し、
 L1は第1の介在アミノ酸配列を表し、かつ
 L2は第2の介在アミノ酸配列を表し、
 R1もしくはR2またはその両方が存在し、
 CS1、CS2、CS3、CS4はいずれも、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、
 L1およびL2は、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、
 FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない。

【0097】

本明細書において報告する融合ポリペプチドに含有されるFc受容体は、例えば限定するわけではないがヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルなどといった任意の種に由来する任意のFc受容体であることができる。

【0098】

一態様では、Fc受容体は、Fc受容体および新生児Fc受容体を含む群から選択される。
 一態様では、Fc受容体は、ヒトFc受容体、ヒト新生児Fc受容体、マウスFc受容体、およびウサギ新生児Fc受容体である。

【0099】

一態様では、ヒトFc受容体は、ヒトFc RI (CD64)、ヒトFc RII (CD32)、ヒトFc RIIA、ヒトFc RIIB、ヒトFc RIIC、ヒトFc RIII (CD16)、ヒトFc RIIIA、およびヒトFc RIIIBから選択される。

【0100】

一態様では、ヒト新生児Fc受容体はヒトFcRnである。

【0101】

一態様では、マウスFc受容体は、マウスFc RI (CD64)、マウスFc RII (CD32)、マウスFc RIIB、マウスFc RIII (CD16)、マウスFc RIII-2 (CD16-2)、およびマウスFc RIVから選択される。

【0102】

一態様では、FCは、ヒトIgG重鎖ポリペプチド、マウスIgG重鎖ポリペプチド、ウサギIgG重鎖ポリペプチドの群から選択される重鎖ポリペプチドの変異体である。

【0103】

一態様では、FCは、ヒトIgG1重鎖ポリペプチド、ヒトIgG2重鎖ポリペプチド、ヒトIgG3重鎖ポリペプチド、ヒトIgG4重鎖ポリペプチド、マウスIgG1重鎖ポリペプチド、マウスIgG2重鎖ポリペプチド、マウスIgG2a重鎖ポリペプチド、マウスIgG3重鎖ポリペプチド、ウサギIgG重鎖ポリペプチドの群から選択される重鎖ポリペプチドの変異体である。

【0104】

本明細書において報告する融合ポリペプチドに含まれるFc領域は、それに融合されてい

10

20

30

40

50

るFc受容体のいずれにも実質的に結合しないものとする。

【0105】

一態様では、融合ポリペプチドはエフェクター機能を実質的に持たず、そのことが、その融合ポリペプチドを、一定のエフェクター機能が不必要または有害であるような用途にとって望ましい候補にする。エフェクター機能の低減/枯渇を確認するために、インビトロおよび/またはインビボ細胞毒性アッセイを行うことができる。例えば、融合ポリペプチドがFc R結合を欠くこと（それゆえにおそらくADCC活性を欠くこと）を保証するために、Fc受容体（FcR）結合アッセイを行うことができる。ADCCを媒介するための主要細胞であるNK細胞がFc RIIIだけを発現するのに対し、単球はFc RI、Fc RIIおよびFc RIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492の464ページの表3に要約されている。関心対象の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えばHellstrom, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063、およびHellstrom, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502参照）、米国特許第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361参照）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい（例えば、フローサイトメトリー用のACT1（商標）非放射性細胞毒性アッセイ（CellTechnology, Inc.、カリフォルニア州マウンテンビュー）、およびCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega、ウィスコンシン州マディソン）参照）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞がある。これに代えて、またはこれに加えて、関心対象の分子のADCC活性を、インビボで、例えばClynes, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656に開示されているような動物モデルにおいて、評価することもできる。FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定も、当技術分野において公知の方法を使って行うことができる（例えばPetkova, S.B. et al., *Int. Immunol.* 18 (2006) 1759-1769参照）。

【0106】

Fc領域のそのリガンドに対するアフィニティおよび結合特性は、Fc領域/FcR相互作用、すなわちFc Rに対するFc領域の特異的結合を決定するための、当技術分野において公知のさまざまなインビトロアッセイ法（生化学ベースのアッセイまたは免疫学ベースのアッセイ）、例えば限定するわけではないが平衡法（例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA））、または速度論（例えばBIAcore（登録商標）解析）、および他の方法、例えば間接的結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー（例えばゲル濾過）によって決定することができる。これらの方法および他の方法では、被検構成要素の1つまたは複数上のラベルを利用することができる。かつ/またはさまざまな検出方法、例えば限定するわけではないが、発色性、蛍光性、発光性、または同位体ラベルを使用しうる。結合アフィニティおよび速度論の詳細な説明は、Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見出すことができる。

【0107】

一態様では、FCは、サブクラスIgG4のヒト起源のFc領域であるか、またはFc受容体（例えばFc RIIIa）が結合しないように修飾されたサブクラスIgG1、IgG2、もしくはIgG3のヒト起源のFc領域である。一態様では、FCは、ヒト起源のFc領域、とりわけヒトIgG4サブクラスのものであるか、またはヒトIgG1サブクラスに由来する変異型Fc領域である。一態様では、FCは、変異L234AおよびL235Aを有するヒトIgG1サブクラスのものである。一態様では、FCは、変異S228Pを有するヒトIgG4サブクラスのものである。IgG4は低減したFc受容体（Fc RIIIa）結合を示すが、他のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。しかし、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297（Fc糖質の喪失）、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434、および/またはHis435は、改変すれば低減したFc受容体結合を与える残基である（Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604、Lund, J., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119

10

20

30

40

50

、Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0 307 434)。一態様では、Fcは、Fc 受容体結合に関して、IgG4サブクラスのものであるか、あるいは、L234、L235、および/もしくはD265に変異を伴いかつ/またはPVA236変異を含有するIgG1またはIgG2サブクラスのものである。一態様では、Fcは、変異S228P、L234A、L235A、L235E、および/またはPVA236のうちの1つまたは複数を含む（PVA236は、IgG1のアミノ酸位置233から236までのアミノ酸配列ELLG（一文字アミノ酸記号で記したもの）またはIgG4のEFLGがPVAで置き換えられていることを意味する）。一態様では、変異は、IgG4についてはS228Pであり、IgG1についてはL234AおよびL235Aである。

【0108】

Fc領域の結合部位は現在の当技術分野では公知であり、例えばLukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse, R. and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324、およびEP 0 307 434に記載されている。Fc領域の結合部位は、例えばアミノ酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、およびP329（KabatのEUインデックスによるナンバリング）を特徴とする。

【0109】

エフェクター機能が低減しているFc領域には、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327および329（米国特許第6,737,056号）のうちの1つまたは複数の置換を有するものが含まれる。そのようなFc変異体には、残基265の置換を有するいわゆる「DA」Fc変異体や、残基265および297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）など、アミノ酸位置265、269、270、297および327のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体が含まれる。

【0110】

FcRへの結合が改良または減弱されたFc領域変異体はいくつか記載されている（例えば米国特許第6,737,056号、WO 2004/056312、およびShields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604参照）。

【0111】

いくつかの態様では、例えば米国特許第6,194,551号、WO 99/51642、およびIdusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184に記載されているように、C1q結合および/または補体依存性細胞傷害（CDC）の改変（すなわち改良または減弱）をもたらす改変が、Fc領域に加えられている。

【0112】

Fc領域変異体の他の例に関して、Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740, US 5,648,260, US 5,624,821、およびWO 94/29351も参照されたい。

【0113】

一態様では、重鎖Fc領域ポリペプチドは、234位、235位、236位、237位、238位、239位、253位、254位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、288位、297位、298位、299位、307位、311位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、434位、および435位のうちの1つまたは複数にアミノ酸変異を有する。一態様では、Fc受容体の1つまたは複数

【0114】

はFc 受容体である。

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置233、234、235、236、265、297、329、および331のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【0115】

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異E233P、L234A、L235A、L235E、G236、D265A、N297A、N297D、P329A、P329G、およびP331Sのうちの1つまたは複数

【0116】

を有する。

10

20

30

40

50

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異L234AおよびL235Aと、E233P、L235E、G236、D265A、N297A、N297D、P329A、P329G、およびP331Sのうちの1つまたは複数とを有する。

【0117】

一態様では、ヒトIgG1重鎖ポリペプチドは、アミノ酸変異L234AおよびL235Aと、P329AまたはP329Gとを有する。

【0118】

一態様では、ヒトIgG2重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置233、234、235、236、265、および329のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【0119】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置228、235、265、および329のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【0120】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、変異S228P、L235E、P329A、およびP329Gのうちの1つまたは複数とを有する。

【0121】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、変異S228PおよびL235Eと、P329AまたはP329Gとを有する。

【0122】

一態様では、重鎖Fc領域ポリペプチドは、248位、250位、251位、252位、253位、254位、255位、256位、257位、272位、285位、288位、290位、291位、308位、309位、310位、311位、314位、385位、386位、387位、428位、433位、434位、435位、および436位のうちの1つまたは複数にアミノ酸変異を有する。一態様では、Fc受容体の1つまたは複数がFcRnである。

【0123】

一態様では、ヒトIgG重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439、および/または447のうちの1つまたは複数に変異を有する。

【0124】

一態様では、FcRnへの結合が低減しているヒトIgG重鎖ポリペプチドは、アミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439、および/または447に、1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。

【0125】

融合ポリペプチドは、Fc受容体とFc領域との間にリンカーポリペプチドを含むことができる。このリンカーポリペプチドは、Fc受容体とFc領域がどちらも意図したように機能することが可能になるように、両者の距離を調節するために使用することができる。

【0126】

一態様では、リンカーポリペプチドは、(G3S)3、(G3S)4、(G3S)5、(G3S)6、(G4S)3、(G4S)4、(G4S)5、(G5S)2、(G5S)3、および(G5S)4、ならびにそれらの任意の組み合わせを含む群から選択される。

【0127】

加えて、融合ポリペプチドは、Fc受容体とFc領域の間にタグ、例えばアフィニティ精製または固定化に適したタグを含むこともできる。

【0128】

一態様では、タグは、Argタグ、Aviタグ、His-Aviタグ、Hisタグ、Flagタグ、3×Flagタグ、Strepタグ、Nanoタグ、SBPタグ、c-mycタグ、Sタグ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、GSTタグ、MBPタグ、ストレプトアビジンまたはアビジン、ビオチン、レクチン、多糖、ステロイド、ステロイド結合タンパク質、ホルモン、およびホルモン受容体を含む群から選択される。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 9 】

リンカーポリペプチドとタグとを合体させて、Fc受容体とFc領域の間にある介在アミノ酸配列にすることもできる。

【 0 1 3 0 】

一態様では、介在アミノ酸配列は、(G3S)3、(G3S)4、(G3S)5、(G3S)6、(G4S)3、(G4S)4、(G4S)5、(G5S)2、(G5S)3、および(G5S)4を含む第1群から選択されるか、Argタグ、Aviタグ、His-Aviタグ、Hisタグ、Flagタグ、3×Flagタグ、Strepタグ、Nanoタグ、SBPタグ、c-mycタグ、Sタグ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、GSTタグ、またはMBPタグを含む第2群から選択されるか、またはこれらの群の2つの要素の組み合わせから選択される。

10

【 0 1 3 1 】

介在アミノ酸配列は、融合ポリペプチドの切断部位の前にも後にも位置することができる。

【 0 1 3 2 】

一態様では、切断部位は酵素切断部位である。一態様では、酵素切断部位は、IgAプロテアーゼ切断部位、グランザイムBプロテアーゼ切断部位、TEVプロテアーゼ切断部位、PreScissionプロテアーゼ切断部位、トロンピン切断部位、第Xa因子プロテアーゼ部位、IdeSプロテアーゼ切断部位、SUMOプロテアーゼ切断部位およびエンテロキナーゼ切断部位を含む群から選択される。一態様では、切断部位は、IgAプロテアーゼ切断部位、PreScissionプロテアーゼ切断部位、グランザイムB切断部位、およびIdeSプロテアーゼ切断部位の群から選択される。

20

【 0 1 3 3 】

一態様では、融合ポリペプチドは、プロテアーゼ・パインもしくはプロテアーゼ・ペプシン、またはIdeSプロテアーゼに対する固有の切断部位を含む。

【 0 1 3 4 】

本明細書において報告する一局面は、本明細書において報告する融合ポリペプチドを2つ含む、二量体型融合ポリペプチドである。

【 0 1 3 5 】

本明細書において報告する融合ポリペプチドはFc領域を含み、そしてそれが免疫グロブリンヒンジ領域を含むので、二量体型融合ポリペプチドは、第1の融合ポリペプチドを第2の融合ポリペプチドと共有結合で連結する1つまたは複数のジスルフィド橋を含む。

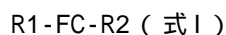
30

【 0 1 3 6 】

二量体型融合ポリペプチドは、ホモ二量体型融合ポリペプチドまたはヘテロ二量体型融合ポリペプチドであることができる。

【 0 1 3 7 】

加えて、二量体型融合ポリペプチドは、以下の式Iまたは式IIに記載の第1の融合ポリペプチドを含み、二量体型融合ポリペプチドの第1および第2の融合ポリペプチドは、互いに独立して、式Iおよび式IIから選択することができる：



[式中、
R1は第1のFc受容体を表し、
R2は第2のFc受容体を表し、かつ
FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、
R1もしくはR2またはその両方が存在し、
FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない]
または



[式中、
R1は第1のFc受容体を表し、
R2は第2のFc受容体を表し、

40

50

FCは重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、
 CS1は第1の切断部位を表し、
 CS2は第2の切断部位を表し、
 CS3は第3の切断部位を表し、
 CS4は第4の切断部位を表し、
 L1は第1の介在アミノ酸配列を表し、かつ
 L2は第2の介在アミノ酸配列を表し、
 R1もしくはR2またはその両方が存在し、
 CS1、CS2、CS3、CS4はいずれも、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、
 L1およびL2は、互いに独立して、存在しても存在しなくてもよく、
 FCはR1および/またはR2に実質的に結合しない]。

10

【0138】

二量体型融合ポリペプチドが2つの異なる融合ポリペプチドを含みうる場合は、ヘテロ二量体化を保證するための機序を使用する必要がある。

【0139】

一態様では、第1のFCは、変異T366Wおよび任意で変異S354Cを含み、第2のFCは、変異T366S、L368AおよびY407Vならびに任意で変異Y349Cを含む。

【0140】

一態様では、融合ポリペプチドは以下を特徴とする：

- (a) 第1および第2のポリペプチドのR1およびR2が同一である、
- (b) 第1の融合ポリペプチドのR1およびR2が同一であり、第2の融合ポリペプチドのR1およびR2は同一であるが第1の融合ポリペプチドのR1およびR2とは異なる、
- (c) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が同一であり、かつ、第1および第2の融合ポリペプチドのR2は同一であるがR1とは異なる、
- (d) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1は同一であり、かつ、R2はどちらも存在しない、
- (e) 第1および第2の融合ポリペプチドのR1が異なり、かつ、R2はどちらも存在しない、
- (f) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が同一であり、かつ、R1はどちらも存在しない、
- (g) 第1および第2の融合ポリペプチドのR2が異なり、かつ、R1はどちらも存在しない、
- (h) 第1の融合ポリペプチドのR1と第2のポリペプチドのR2とが異なり、かつ、第1の融合ポリペプチドのR2は存在せず、かつ、第2のポリペプチドのR1は存在しない。

20

30

【0141】

本明細書において報告する融合ポリペプチドの用途

本明細書において報告する一局面は、アフィニティークロマトグラフィーリガンドとしての、本明細書において報告する固定化された融合ポリペプチドの使用である。

【0142】

一態様では、融合ポリペプチドは固相に結合される。一態様では、固相はクロマトグラフィー材料である。一態様では、融合ポリペプチドはビオチン化され、固相はストレプトアビジンで誘導体化される。

40

【0143】

一態様では、融合ポリペプチドは、Fc受容体とFc領域の間に切断部位を含む。一態様では、融合ポリペプチドは、ビオチン化の前に切断される。

【0144】

一態様では、融合ポリペプチドは、Fc受容体と切断部位との間に固定化タグを含む。一態様では、固定化タグはHis-Aviタグである。

【0145】

また、マトリックスと、マトリックスに結合したクロマトグラフィー用官能基とを含むアフィニティークロマトグラフィーカラムであって、マトリックスに結合したクロマトグラフィー用官能基が、本明細書において報告する融合ポリペプチドを含むことを特徴とする

50

、アフィニティークロマトグラフィーカラムも報告する。

【0146】

一態様では、融合ポリペプチドは、Fc受容体とFc領域の間に切断部位を含む。一態様では、融合ポリペプチドは、ビオチン化の前に切断される。

【0147】

一態様では、融合ポリペプチドは、Fc受容体と切断部位との間に固定化タグを含む。一態様では、固定化タグはAviタグである。

【0148】

本明細書において報告する一局面は、抗体のFc受容体への結合を決定するための、本明細書において報告する固定化された融合ポリペプチドの使用である。

10

【0149】

一態様では、抗体は低アフィニティ抗体である。

【0150】

一態様では、決定は表面プラズモン共鳴による。一態様では、抗体は単量体Fc受容体によって捕捉される。一態様では、抗体は二量体抗体によって捕捉される。

【0151】

組換え法

本明細書において報告する一局面は、

(a) 本明細書において報告する融合ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を培養する工程、

20

(b) 細胞または培養培地から融合ポリペプチドを回収する工程、

(c) 任意で、融合ポリペプチドをプロテアーゼで切断する工程

を含み、それによって可溶性Fc受容体を生産する、可溶性Fc受容体の生産方法である。

【0152】

本発明を実施するのに役立つ当業者に公知の方法および技法は、例えばAusubel, F.M., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumes I to III (1997), Wiley and Sons, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されている。

【0153】

本明細書において報告する融合ポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞において発現させることができる。組換え発現後に、当業者に公知の方法によって融合ポリペプチドを精製することができる。これらの方法は、免疫グロブリン精製用に確立されて広く使用されており、単独でまたは組み合わせて使用される。そのような方法は、例えば、微生物由来のタンパク質を使ったアフィニティークロマトグラフィー（例えばプロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー（例えば陽イオン交換（カルボキシメチル樹脂）、陰イオン交換（アミノエチル樹脂）およびミックスマード交換クロマトグラフィー）、チオフィリック吸着（例えば -メルカプトエタノールおよび他のSHリガンドによるもの）、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー（例えばフェニル-セファロース、アザ-アレノフィリック樹脂、またはm-アミノフェニルボロン酸によるもの）、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー（例えばNi(II)-およびCu(II)-アフィニティ材料）、サイズ排除クロマトグラフィー、および分取用電気泳動法（例えばゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動）である（Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102）。クロマトグラフィー精製前またはクロマトグラフィー精製後に、Fc受容体を遊離させるために、融合ポリペプチドを酵素的に切断することができる。発現カセットは、プロモーター、分泌シグナル配列をコードするDNAセグメント、構造遺伝子、およびターミネーター/ポリアデニル化シグナルを含む。これらの要素を、必要とされる異なる融合ポリペプチドの全てをコードする1つのプラスミド上に、またはそれぞれが1つの融合ポリペプチドをコードする2つ以上のプラスミド上に、作動的に連結された形態で構築する。構造遺伝子を発現させるために、（1つまた

30

40

50

は複数の) プラスミドを適切な宿主細胞に導入する。タンパク質は、例えばCHO細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、HEK細胞、K562細胞、BHK細胞、PER.C6(登録商標)細胞などの哺乳動物細胞において生産される。一態様では、融合ポリペプチドを、CHO細胞、またはBHK細胞、またはHEK細胞中で発現させる。プラスミドの調節要素は、選択した宿主細胞中でそれらが機能するように、選択する必要がある。発現した融合ポリペプチドは、機能的に構築される。

【0154】

「発現プラスミド」とは、そこに含まれている構造遺伝子が宿主細胞中で発現するのに必要な要素を全て提供する核酸である。典型的には、発現プラスミドは、例えば大腸菌(E. coli)用の、複製起点および選択可能マーカを含む原核生物プラスミド増殖単位、真核生物選択マーカ、およびそれぞれがプロモーターと構造遺伝子とポリアダニル化シグナルを含む転写ターミネーターとを含む、関心対象の構造遺伝子を発現させるための1つまたは複数の発現カセットを含む。遺伝子発現は通常はプロモーターの制御を受け、そのような構造遺伝子はプロモーター「に機能的に連結されている」という。同様に、調節要素がコアプロモーターの活性を調整するのであれば、調節要素とコアプロモーターは機能的に連結されている。

【0155】

抗体は、例えば米国特許第4,816,567号に記載の方法および組成物を使って生産することができる。一態様では、本明細書に記載する融合ポリペプチド抗体をコードする単離された核酸が提供される。一態様では、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター(例えば発現ベクター)が提供される。さらなる態様では、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。そのような態様の一つでは、宿主細胞は、(1)第1の融合ポリペプチドを含むアミノ酸配列と第2の融合ポリペプチドを含むアミノ酸配列とをコードする核酸を含むベクター、または(2)第1の融合ポリペプチドを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクターと、第2の融合ポリペプチドを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2ベクターとを含む(例えばそれらのベクターで形質転換されている)。一態様では、宿主細胞は、真核生物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ球系細胞(例えばY0、NS0、Sp20細胞)である。一態様では、融合ポリペプチドを作成する方法であって、上に規定した融合ポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を融合ポリペプチドの発現に適した条件下で培養する工程、および任意で、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から融合ポリペプチドを回収する工程を含む方法が提供される。

【0156】

本明細書において報告する融合ポリペプチドの組換え生産のために、例えば上記の融合ポリペプチドをコードする核酸を単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のために1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手法を使って(例えば融合ポリペプチドをコードする遺伝子に特異的に結合する能力を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離し、配列決定することができる。

【0157】

融合ポリペプチドをコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が不要な場合は、融合ポリペプチドを細菌中で生産することができる。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えばUS 5,648,237、US 5,789,199、およびUS 5,840,523を参照されたい(大腸菌における抗体断片の発現を記載しているCharlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B. K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp.245-254も参照されたい)。発現後に、融合ポリペプチドを細菌細胞ペーストから可溶性画分において単離して、さらに精製することができる。

【0158】

原核生物だけでなく、糸状菌や酵母などの真核微生物も、グリコシル化経路が「ヒト化

10

20

30

40

50

」されていて部分的または完全にヒトのグリコシル化パターンを有する融合ポリペプチドの生産をもたらす真菌株および酵母株を含めて、融合ポリペプチドをコードするベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主である (Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414、およびLi, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215参照)。

【0159】

グリコシル化された融合ポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物 (無脊椎生物および脊椎動物) にも由来する。無脊椎生物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と一緒に使用することができる、特にスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞のトランスフェクションに使用することができるバキュロウイルス株が、数多く同定されている。

10

【0160】

植物細胞培養物を宿主として利用することもできる (例えば米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、および同第6,417,429号 (トランスジェニック植物中で抗体を生産するためのPLANTIBODIES (商標) 技術が記載されている) を参照されたい)。

【0161】

脊椎動物細胞も宿主として使用することができる。例えば、懸濁培養に適応した哺乳動物細胞株が役立つ。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7)、ヒト胎児腎臓株 (Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74に記載の293または293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスセルトリ細胞 (Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載のTM4細胞)、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞 (HELA)、イヌ腎臓細胞 (MDCK)、バッファローラット肝臓細胞 (BRL3A)、ヒト肺細胞 (W18)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2)、マウス乳房腫瘍 (MMT060562)、例えばMather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載のTRI細胞、MRC5細胞、およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR⁻ CHO細胞 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ならびにY0、NS0、およびSp2/0などの骨髄腫細胞株などがある。抗体生産に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の総説としては、例えばYazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, N J (2004), pp. 255-268を参照されたい。

20

30

【0162】

診断および検出のための方法および組成物

特定の態様では、本明細書に規定する融合ポリペプチドのいずれかは、生物学的試料中のFc領域含有分子の存在を検出するのに役立つ。本明細書において使用する用語「検出する」は、定量的検出または定性的検出を包含する。

【0163】

一態様では、診断方法または検出方法に使用するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドが提供される。さらなる局面では、生物学的試料中のFc領域含有分子の存在を検出する方法が提供される。特定の態様では、本方法は、生物学的試料を、本明細書において報告する融合ポリペプチドと、Fc領域含有分子への融合ポリペプチドの結合を許容する条件下で接触させ、融合ポリペプチドとFc領域含有分子の間に複合体が形成されるかどうかを検出する工程を含む。そのような方法は、インビトロ法またはインビボ法であることができる。

40

【0164】

特定の態様では、標識化された融合ポリペプチドが提供される。ラベルには、直接検出されるラベルまたは部分 (例えば蛍光ラベル、発色団ラベル、高電子密度ラベル、化学発光ラベル、および放射性ラベル)、ならびに例えば酵素反応または分子相互作用などによって間接的に検出される部分、例えば酵素またはリガンドが含まれるが、それらに限定さ

50

れるわけではない。例示的ラベルには、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および¹³¹I、発蛍光団、例えば希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ）、過酸化水素を使って色素前駆体を酸化する酵素（例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼ）と共役させた複素環オキシダーゼ（例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ）、ビオチン/アビジン、スピラベル、バクテリオファージラベル、安定フリーラジカルなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0165】

医薬組成物

本明細書において報告する融合ポリペプチドの医薬組成物は、望ましい純度を有するそのような融合ポリペプチドを、1つまたは複数の随意的薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)）と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度において受容者にとって一般に無毒性であり、これには、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベンまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリ(ビニルピロリドン)；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖、二糖、および他の糖質、例えばグルコース、マンノース、またはデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）などがあるが、それらに限定されるわけではない。本明細書における、例示的な薬学的に許容される担体には、さらに、組織内薬物分散剤、例えば可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrhuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）が含まれる。rhuPH20を含む特定の例示的sHASEGPおよびその使用方法は、米国特許公報第2005/0260186号ならびに同第2006/0104968号に記載されている。一局面では、sHASEGPが、1つまたは複数のさらなるグリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと併用される。

【0166】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤には、米国特許第6,171,586号およびWO 2006/044908に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0167】

本明細書における製剤は、治療される特定の適応症の必要に応じて、複数の有効成分、好ましくは互いに有害な影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含有しうる。そのような有効成分は、適宜、意図した目的に有効な量で組み合わせられて存在する。

【0168】

有効成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプ

10

20

30

40

50

セルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに封入するか、コロイド薬物送達系(例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)に封入するか、またはマクロエマルジョンに封入することができる。そのような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)に開示されている。

【0169】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例には、融合ポリペプチドを含有する固形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、マトリックスがフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態にあるものなどがある。

【0170】

インビボ投与に使用される製剤は一般に滅菌状態にある。滅菌性は例えば滅菌濾過膜による濾過などによって容易に達成することができる。

【0171】

治療方法および治療用組成物

本明細書に報告する融合ポリペプチドはいずれも治療方法に使用することができる。

【0172】

一局面では、医薬として使用するための融合ポリペプチドが提供される。さらなる局面では、抗体レベルの上昇を特徴とする疾患の治療において使用するための融合ポリペプチドが提供される。一態様では、疾患は自己免疫疾患である。特定の態様では、治療方法において使用するための融合ポリペプチドが提供される。特定の態様において、本発明は、個体に有効量の融合ポリペプチドを投与する工程を含む、抗体レベルの上昇を特徴とする疾患を有する個体を治療する方法において使用するための、融合ポリペプチドを提供する。そのような態様の一つにおいて、本方法はさらに、個体に有効量の少なくとも1種の追加の治療剤を投与する工程を含む。さらなる態様において、本発明は、抗体レベルを低下させる際に使用するための融合ポリペプチドを提供する。特定の態様において、本発明は、抗体レベルを低下させるために個体に有効量の融合ポリペプチドを投与する工程を含む、個体における抗体レベルを低下させる方法において使用するための、融合ポリペプチドを提供する。上記の態様のいずれにおいても「個体」は、好ましくはヒトである。

【0173】

さらなる局面において、本発明は、医薬の製造または調製における融合ポリペプチドの使用を提供する。一態様では、当該医薬は、抗体レベルの上昇を特徴とする疾患を治療するための医薬である。一態様では、当該疾患は自己免疫疾患である。さらなる態様では、当該医薬は、抗体レベルの上昇を特徴とする疾患を有する個体に有効量の医薬を投与する工程を含む、上昇した抗体レベルを治療する方法において使用するための、医薬である。そのような態様の一つにおいて、本方法はさらに、個体に、有効量の少なくとも1種の追加の治療剤を投与する工程を含む。さらなる態様では、当該医薬は、抗体レベルを低下させるための医薬である。さらなる態様では、当該医薬は、抗体レベルを低下させるために有効量の医薬を個体に投与する工程を含む、個体における抗体レベルを低下させる方法において使用するための、医薬である。上記の態様のいずれにおいても「個体」はヒトであることができる。

【0174】

さらなる局面において、本発明は、抗体レベルの上昇を特徴とする疾患を治療するための方法を提供する。一態様では、当該疾患は自己免疫疾患である。一態様では、本方法は、抗体レベルの上昇を特徴とするそのような疾患を有する個体に有効量の融合ポリペプチドを投与する工程を含む。そのような態様の一つでは、本方法はさらに、有効量の少なくとも1種の追加の治療剤を個体に投与する工程を含む。上記の態様のいずれにおいても「個体」はヒトであることができる。

【0175】

さらなる局面において、本発明は、個体における抗体レベルを低下させるための方法を提供する。一態様において、本方法は、抗体レベルを低下させるために有効量の融合ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを個体に投与する工程を含む。一態様では、「個体」はヒトである。

【0176】

さらなる局面において、本発明は、例えば上記の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドのいずれかを含む医薬組成物を提供する。一態様では、当該医薬組成物は、本明細書において報告する融合ポリペプチドのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む。別の態様では、当該医薬組成物は、本明細書において報告する融合ポリペプチドのいずれかと、少なくとも1種の追加の治療剤とを含む。

【0177】

本発明の融合ポリペプチドは、単独で、または他の作用物質と組み合わせて、治療に使用することができる。例えば本発明の融合ポリペプチドは、少なくとも1種の追加の治療剤と同時に投与することができる。

10

【0178】

そのような併用治療には、併用投与（この場合は2種以上の治療剤が同じ製剤または別々の製剤に含まれる）、および個別投与（この場合は、本発明の融合ポリペプチドの投与を、追加の治療剤および/またはアジュバントの投与の前に、同時に、および/または後に、行うことができる）が包含される。

【0179】

本発明の融合ポリペプチド（および任意の追加の治療剤）は、非経口投与、肺内投与、および鼻腔内投与、および、局所処置にとって望ましい場合は病巣内投与を含む、任意の適切な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、投与が短期間であるか慢性的であるかにも一部依存して、任意の適切な経路、例えば静脈内注射または皮下注射などの注射によることができる。限定するわけではないが、単回投与、またはさまざまな時点にわたる複数回投与、ボラス投与、およびパルス注入を含む、さまざまな投薬スケジュールが、本明細書では考えられる。

20

【0180】

本発明の融合ポリペプチドは、良質の医療のための原則（good medical practice）に合致する方法で、製剤化され、調合され、投与されるであろう。この文脈において考慮すべき因子には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与の方法、投与の日程計画、および医療従事者に公知の他の因子が含まれる。融合ポリペプチドは、問題の障害を予防または治療するために現在使用されている1種または複数種の作用物質と共に製剤化する必要はないが、任意でそのようにしてもよい。そのような他の作用物質の有効量は、製剤中に存在する融合ポリペプチドの量、障害または治療のタイプ、および上で述べた他の因子に依存する。これらは、一般に、上述したものと同一投薬量および投与経路で使用されるか、本明細書に記載の投薬量の約1~99%で、または実験的/臨床的に適当であると決定された任意の投薬量および任意の経路で使用される。

30

【0181】

疾患の予防または治療に関して、本発明の融合ポリペプチドの適当な投薬量（単独で使用する場合、または1種もしくは複数種の他の追加の治療剤と併用する場合）は、治療すべき疾患のタイプ、融合ポリペプチドのタイプ、疾患の重症度および経過、融合ポリペプチドを予防のために投与するか治療のために投与するか、治療歴、患者の病歴および融合ポリペプチドに対する応答、ならびに担当医の裁量に依存するであろう。融合ポリペプチドは、患者に1回で、または一連の処置で、適切に投与される。疾患のタイプおよび重症度に依存して、例えば1回または複数回の独立した投与によるか、持続注入によるかを問わず、約1 μ g/kg~15mg/kg（例えば0.5mg/kg~10mg/kg）の融合ポリペプチドを、患者への投与のための初回候補投薬量とすることができる。典型的な1日量は、上述の因子に依存して約1 μ g/kgから100mg/kgまで、またはそれ以上に及びうる。数日またはそれ以上にわたる反復投与の場合、状態に依存して、処置は一般に、疾患症状の所望の抑制が起こる

40

50

まで維持されるであろう。融合ポリペプチドの例示的投薬量の一つは約0.05mg/kg～約10mg/kgの範囲にあるだろう。したがって約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kgまたは10mg/kg（またはそれらの任意の組み合わせ）のうちの1つまたは複数の用量を患者に投与することができる。そのような用量は、（例えば、患者が融合ポリペプチドの投与を約2回から約20回、例えば約6回受けるように）間欠的に、例えば毎週または3週間ごとに投与することができる。最初に高用量の初回負荷量を投与した後、1つまたは複数の低用量を投与することができる。ただし他の投薬レジメンも有用でありうる。この治療の進行は、従来の技法およびアッセイで容易にモニターされる。

【0182】

上記の製剤または治療方法はいずれも、融合ポリペプチドの代わりに、または融合ポリペプチドに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを使って行うことができると理解される。

10

【0183】

製造品

本発明の別の局面では、上述の障害の治療、予防および/または診断に有用な材料が入っている製造品が提供される。製造品は、容器、および容器上または容器に付随するラベルまたは添付文書を含む。適切な容器には、例えば瓶、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどがある。容器は、ガラスまたはプラスチックなど、さまざまな素材で形成される。容器は、組成物を単独で、またはその状態を治療、予防および/または診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて保持し、滅菌アクセスポートを有しうる（例えば容器は静脈内溶液バッグであるか、皮下注射針で突き刺すことができる栓を有するバイアルであることができる）。組成物中の少なくとも1種の活性作用物質は本発明の融合ポリペプチドである。ラベルまたは添付文書は、その組成物が選択された状態の治療に使用されることを示す。さらにまた、製造品は、（a）本発明の融合ポリペプチドを含む組成物が入っている第1の容器と、（b）さらなる細胞毒性作用物質または他の治療剤を含む組成物が入っている第2の容器とを含みうる。本発明のこの態様の製造品は、さらに、特定の状態を治療するためにその組成物を使用できることを示す添付文書を含みうる。これに代えて、またはこれに加えて、製造品はさらに、薬学的に許容される緩衝液、例えば静菌性注射用水（BWF1）、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液を含む第2（または第3）の容器を含みうる。商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料、例えば緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジをさらに含みうる。

20

30

【0184】

上記の製造品はいずれも、融合ポリペプチドの代わりに、または融合ポリペプチドに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含みうると理解される。

【0185】

本発明の理解を助けるために以下に実施例、図面および配列を挙げるが、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載する。記載する手法には、本発明の本旨から逸脱することなく変更を加えることができると理解される。

【実施例】

【0186】

40

実施例1

発現プラスミドの生成

(a) Fc RIIIaV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

(i) マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列
(MGWSCIILFLVATATGVHS; SEQ ID NO: 55)

(ii) ヒトFc 受容体IIIa V158のアミノ酸残基2～193（すなわち開始メチオニンを除外）、および (iii) 変異L234A、L235AおよびP329Gを有するヒトFc 1重鎖定常領域（ヒンジ-CH2-CH3）をコードする化学的に合成された合成DNA断片を融合することにより、Fc R IIIaV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチドをコードする遺伝子を構

50

築した。

【 0 1 8 7 】

HEK293細胞におけるFc R111aV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチドの一過性発現のための発現プラスミドは、Fc R111aV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチド発現カセットの他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製起点、および大腸菌においてアンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼ遺伝子を含んだ。詳しく述べると、Fc R111aV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチドをコードする遺伝子の転写単位は、以下の機能的要素を含む：

- イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター（P-CMV）、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'-非翻訳領域（5'UTR）、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- 野生型ヒトFc 受容体III V158タンパク質のアミノ酸位置2～193である可溶性ヒトFc受容体III V158ポリペプチド、
- ヒトFc 1重鎖定常領域（ヒンジ-CH2-CH3,LALA P329G）および
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（BGHポリAシグナル配列）。

10

【 0 1 8 8 】

成熟Fc R111aV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチドのアミノ酸配列は

20

GMRTEDLPKA VVFLEPQWYR VLEKDSVTLK CQGAYSPEDN STQWFHNESL
 ISSQASSYFI DAATVDDSGE YRCQTNLSTL SDPVQLEVHI GWLLLLQAPRW
 VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK GRKYFHNSD FYIPKATLKD
 SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFFPPG YQGLNDIFEA
 QKIEWHELVV APPAPEDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

30

(SEQ ID NO: 56)

である。

【 0 1 8 9 】

同様に以下融合ポリペプチドを得ることができる。

- Fc R11a-LR(H131)-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチド：

QAAAPPKAVL KLEPPWINVL QEDSVTLTCQ GARSPESDSI QWFHNGNLIP
 THTQPSYRFK ANNNDSGEYT CQTGQTSLSL PVHLTVLSEW LVLQTPHLEF
 QEGETIMLRC HSWKDKPLVK VTFQNGKKSQ KFSHLDPTFS IPQANHSHSG
 DYHCTGNIGY TLFSSKPVTI TVQVPSMGSS SPMGIGLNDI FEAQKIEWHE
 LVVAPPAPED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
 VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKC KVS NKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
 QVSLTCLVKG FYP SDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

10

(SEQ ID NO: 57)

- Fc RIIB-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチド:

APPKAVLKLE PQWINVLQED SVTLTCRGTH SPESDSIQWF HNGNLIPHTHT
 QPSYRFKANN NDSGEYTCQT GQTSLSDPVH LTVLSEWLVL QTPHLEFQEG
 ETIVLRCHSW KDKPLVKVTF FQNGKSKKFS RSDPNFSIPQ ANHSHSGDYH
 CTGNIGYTLY SSKPVTITVQ APGLNDIFEA QKIEWHELVV APPAPEDKTH
 TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP
 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

20

(SEQ ID NO: 58)

- Fc RIIB-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチド:

GMRTEDLPKA VVFLEPQWYS VLEKDSVTLK CQGAYSPEDN STQWFHNESL
 ISSQASSYFI DAATVNDSGE YRCQTNLSTL SDPVQLEVHI GWLLLQAPRW
 VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK DRKYFHHNSD FHIPKATLKD
 SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFSPPG YQGLNDIFEA
 QKIEWHELVV APPAPEDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF
 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

30

40

(SEQ ID NO: 59)

- 最小Fc RIIBa-Avi-Fc LALA P239G融合ポリペプチド (プロテアーゼ切断部位):

GWLLLLQAPRW VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK GRKYFHHNSD
 FYIPKATLKD SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFFPPG
 YQGLNDIFEA QKIEWHELED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL
 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

10

(SEQ ID NO: 60)

【 0 1 9 0 】

(c) 二量体型Fc受容体融合ポリペプチド用の「ノブ・イントゥ・ホール (knob-into-hole)」発現プラスミドの生成

HEK293細胞におけるFc受容体Fc領域融合ポリペプチド(ホール)の一過性発現用の発現プラスミドを、上記(a)項で述べた発現ベクターから得た。当該プラスミドは、DNA配列が、ヒト 1重鎖定常領域内にホール変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを有するFc領域をコードする点で、当該ベクターとは異なる。

【 0 1 9 1 】

HEK293細胞におけるFc受容体Fc領域融合ポリペプチド(ノブ)の一過性発現用の発現プラスミドを、上記(a)項で述べた発現ベクターから得た。当該プラスミドは、DNA配列が、ヒト 1重鎖定常領域内にノブ変異T366WおよびS354Cを有するFc領域をコードする点で、当該ベクターとは異なる。

20

【 0 1 9 2 】

HEK293におけるFc受容体Fc領域融合ポリペプチド(ノブ/ホール)の一過性発現用の発現プラスミドは、融合ポリペプチド(ノブ/ホール)発現カセットの他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製起点、および大腸菌においてアンピシリン耐性を付与する-lラクタマーゼ遺伝子を含んだ。詳しく述べると、融合ポリペプチド(ノブ/ホール)をコードする遺伝子の転写単位は、以下の機能的要素を含む：

30

- イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター(P-CMV)、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'-非翻訳領域(5'UTR)、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- ヒト 1重鎖定常領域内にホール変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cまたはノブ変異T366WおよびS354Cを有するヒトFc 1重鎖定常領域(ヒンジ-CH2-CH3)、ならびに
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列(BGHポリAシグナル配列)。

【 0 1 9 3 】

実施例2

Fc R111aV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G融合ポリペプチドの一過性発現、精製および解析評価

40

F17培地(Invitrogen Corp.)中で培養したHEK293細胞(ヒト胎児腎臓細胞株293由来)の一過性トランスフェクションによって融合ポリペプチドを得た。トランスフェクションには「293-Free」トランスフェクション試薬(Novagen)を使用した。トランスフェクション時のプラスミド比を等モルとして、2つの異なるプラスミドからノブ・イントゥ・ホール融合ポリペプチド対を発現させた。トランスフェクションは、製造者の説明書に指定されているとおりに行った。融合ポリペプチドを含有する細胞培養上清をトランスフェクションの7日後に収穫した。上清は精製まで低温で保存した。

【 0 1 9 4 】

例えばHEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は、Meis

50

sner, P., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203に記載されている。

【 0 1 9 5 】

融合ポリペプチドを含有する培養上清を濾過し、2つのクロマトグラフィー工程で精製した。PBS (1mM KH₂PO₄、10mM Na₂HPO₄、137mM NaCl、2.7mM KCl) pH7.4で平衡化したHiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare) を用いるアフィニティークロマトグラフィーで、融合ポリペプチドを捕捉した。平衡化緩衝液による洗浄により、結合していないタンパク質を除去し、融合ポリペプチドを0.05Mクエン酸緩衝液 (pH3) で回収して、溶出直後に1Mトリス塩基 (pH9.0) でpH6.5に中和した。Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーを、第2精製工程として使用した。サイズ排除クロマトグラフィーは、2mM MOPS緩衝液、0.125M NaCl、pH7.2中で行った。溶出した融合ポリペプチドを、Biomax-SKメンブレンを装備したUltrafree-CL遠心分離フィルタユニット (Millipore、マサチューセッツ州ビルリカ) で濃縮し、-80 °C で保存した。

10

【 0 1 9 6 】

このプロトコールに従って4つの異なるFc RIIIa-Fc融合ポリペプチドを精製した:

- (a) Fc RIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G (切断部位なし)
- (b) 最小Fc RIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G (切断部位なし)
- (c) Fc RIIIaV158-Avi-PreScissionプロテアーゼ (PP) -Fc LALA P239G
- (d) Fc RIIIaV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G。

【 0 1 9 7 】

アミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光係数を使用し、280nmにおける光学密度 (OD) を測定することによって、融合ポリペプチドのタンパク質濃度を決定した。融合ポリペプチドの純度および適正な二量体形成は、還元剤 (5mM 1,4-ジチオスレイトール) の存在下および非存在下でのSDS-PAGEとクーマシーブリリアントブルーによる染色で分析した。Superdex 200 (商標) 分析用サイズ排除カラム (GE Healthcare) を用いる高性能SECによって、融合ポリペプチド調製物の凝集物含量を決定した。還元した融合ポリペプチドのアミノ酸主鎖の完全性を、ノイラミニダーゼ、O-グリカナーゼおよびペプチド-N-グリコシダーゼF (Roche Applied Science) の組み合わせによる酵素処理でN-グリカンを除去した後に、ナノエレクトロスプレー-QTOF質量分析によって検証した。

20

【 0 1 9 8 】

実施例3

パパインによる切断

酵素切断部位を含まないFc RIIIa-Fc 融合ポリペプチドは、パパインによって切断することができる。システインおよび0.1mU/mgの融合ポリペプチドのパパイン (パパイア (Carica papaya) 由来、Roche Diagnostics GmbH) を37 °C で1時間加えることにより、Fc RIIIa-Fc融合ポリペプチドを切断した。その後の精製は実施例2で述べたように行った。分析用SDS-PAGEゲルを図2に示す。

30

【 0 1 9 9 】

実施例4

IdeSプロテアーゼによる切断

IdeSプロテアーゼによるFc RIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G融合ポリペプチドの切断は極めて効率が悪く、したがってこの場合は有用でない。

40

【 0 2 0 0 】

実施例5

PreScissionプロテアーゼによる切断

50mMトリス、150 mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT pH7.4に対する透析後に、1~15U PreScissionプロテアーゼ (GE Healthcare) /100 µg融合ポリペプチドを室温で終夜加えることにより、Fc RIIIa-(PP)-Fc融合ポリペプチドを切断した。タンパク質の一部しか切断することができなかった。他方、PP切断部位を有さない受容体のPreScissionプロテアーゼによる非特異的切断が観察された。

【 0 2 0 1 】

50

実施例6

IgAプロテアーゼによる切断

Slide-A-lyzer透析カセットを使った50mMトリス pH8に対する透析後に、IgAプロテアーゼ (Roche Diagnostics GmbH) を、1:100のw(プロテアーゼ)/w(融合ポリペプチド)比で、21 において終夜加えることにより、Fc RIIIa-Fc融合ポリペプチドを切断した。切断を、分析用サイズ排除クロマトグラフィー (SEC、Superdex 75;GE Healthcare) で管理した。切断後に、Fc RIIIa受容体を、Superdex 75 (商標) (GE Healthcare) での分取用サイズ排除クロマトグラフィーによってIgAプロテアーゼから分離し、HiTrap MabSelect Su Re (GE Healthcare) カラムによってFcタグから分離した。分析用SDS-Pageゲルを図3に示す。

10

【0202】

(表) さまざまなFc RIIIa V158含有融合ポリペプチドの発酵および精製の収量

| 融合ポリペプチド | 分子量 [kDa] | 補捉後の収量 [mg/l 上清] | 単量体含量 (SEC) [%] | SEC後の収量 [mg/l 上清] | 切断およびさらなる精製後の収量 [mg/l 上清] |
|---|--------------|---------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|
| Fc γ RII Ia V158-HisAvi (20l) | 25.4 | 3.5 | 70 | 1.4 | - |
| Fc γ RII Ia V158-Avi-Fc LALA P329G (0.5l) | 39 | 14 | 70 | 3 (活性なし) | |
| Fc γ RII Ia V158-Avi-Fc LALA P329G (0.5l) | 49 | 80 | 95 | 78 | 21 (Aviタグなし) |
| Fc γ RII Ia V158-Avi-PP-Fc LALA P329G (0.5l) | 50 | 24 | 50 | 未決定 | 未決定 |
| Fc γ RII Ia V158-Avi-IgAP-Fc LALA P329G (9.2l) | 50 | 46 | 90 | 36 | 16 (Aviタグあり) |

20

30

【0203】

実施例7

Fc RIIIaV158アフィニティカラムの調製

Fc RIIIaV158を有するアフィニティカラムを、Aviタグのインビトロビオチン化と、それに続くストレプトアビジンセファロースへのカップリングによって調製した。これは、インタクトな融合ポリペプチドを使って行うことも、Fc領域を切り離れた後の受容体を使って行うこともできる。これは分析用および分取用のアフィニティカラムを調製するための極めて迅速で効率のよい方法である。

【0204】

受容体のビオチン化

HEK293細胞で発現させたAviタグを有するFc RIIIaV158の可溶性細胞外ドメインを、精製後に、以下のプロトコールに従ってビオチン化した。Avidity社のビオチン化キットを

40

50

製造者の説明書に従って使用することにより、PBS 3ml中の2mM MOPS、125mM NaCl pH7.2、0.02% Tween、およびCompleteプロテアーゼインヒビター (Roche) 1錠において、タグ付きのFc RIIIaV158 (1.2~12mg) またはFc RIIIaV158 Fc領域融合ポリペプチド (2.4~24mg) をビオチン化した。ビオチン化反応は室温で終夜行った。過剰なビオチンを除去するために、修飾されたポリペプチドを、20mM リン酸ナトリウム緩衝液、150mM NaCl pH 7.5に対して、4 で終夜透析した。

【0205】

ストレプトアビジンセファロースへのカップリング

ビオチン化し透析した受容体に1gのストレプトアビジンセファロース (GE Healthcare) を加え、振とうしながら2時間インキュベートし、最後に1mlのXKカラム (GE Healthcare) に充填した。

10

【0206】

実施例8

クロマトグラフィー法

一般条件:

平衡化緩衝液A: 20mMクエン酸/150mM NaCl pH6.0

溶出緩衝液B: 20mMクエン酸/150mM NaCl pH3.0

溶出: 100%Aで5分、
60分で100%Bに、
100%Bで0.1分、
100%Aで6分

20

サンプル量: 50 µg以上。

【0207】

フコシル化抗体と非フコシル化抗体の分離

FcgRIIIaカラムでの抗体のクロマトグラフィーにより、完全にフコシル化された抗体画分と非フコシル化抗体画分とを定量することが可能になる。非フコシル化抗体画分は、抗体調製物のADCCに関連する。

【0208】

図4に、Fc-FcgRIIIaカラムにおける、グリコシル化型の異なる抗Her抗体 (野生型、上) および糖鎖工学的に操作された抗Her抗体の分離および定量を示す。勾配を変更することにより、分解能を保ったまま、分析時間を短縮することができた。

30

【0209】

Fc RIIIaV158を用いたアフィニティカラムと、Fcタグ付きFc RIIIaV158を用いたアフィニティカラムとの比較

等モル量の両受容体コンストラクトをカップリングすると、アフィニティカラムは、完全にフコシル化された抗体と非フコシル化抗体の分離に際して、同じ挙動をする (図5: 黒: Fc RIIIaV158; 青: Fc RIIIaV158-Fc)。

【0210】

実施例9

Fc RIIIaV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P329G-IgG相互作用測定

40

BIAcore (登録商標) システムは、分子相互作用の研究のための確立されたシステムである。これは、リガンド/分析物結合の連続的なリアルタイムのモニタリングを可能にし、よって会合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、および平衡定数 (K_D) の決定を可能にする。屈折率の変化は、固定化されたリガンドと、溶解した状態で注入された分析物との相互作用が引き起こす表面上の質量変化を示す。分子が表面上の固定化されたリガンドと結合すると質量が増加し、解離すれば質量が減少する。

【0211】

Fc RIIIaV158-Fc LALA P329G融合ポリペプチドの活性決定のために、直接結合アッセイを使用した。

【0212】

50

GEが供給するアミンカップリングキットを使って、400レゾナンスユニット（RU）前後の捕捉系（20 µg/ml ヒトFab捕捉キット、GE Healthcare、28-9583-25）を、CM5チップ（GE Healthcare BR1005-30）上に、pH5.0でカップリングした。試料およびシステム用の緩衝液は、HBS-P+ pH7.4（10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、0.05%（v/v）サーファクタントP20）とした。フローセルを25 に設定し、試料ブロックを12 に設定した。50nM 溶液を流速10 µl/分で360秒間注入することによって抗体を捕捉した。会合については50nMのFc RIIIa融合ポリペプチドを流速50 µl/分で180秒間注入することによって結合を測定し、解離については360秒間測定した。グリシンpH2.1溶液による流速20 µl/分での60秒間の洗浄により表面を再生した。コンストラクトの活性評価のために、シグナル高さと同解離挙動を比較した。

10

【0213】

図6に示すように、Fc RIIIaV158-Fc LALA P329G融合ポリペプチドのレスポンスは、40 RUのFc RIIIaV158と比較して、100レスポンスユニットを上回るレスポンスを示す。

【0214】

実施例10

切断前夜のFc RIIIaV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P329G融合ポリペプチドとIgGの速度論的相互作用測定

切断されたFc RIIIaV158-Fc LALA P329G融合ポリペプチドの活性決定のために、直接結合アッセイを使用した。

【0215】

20

GEが供給するアミンカップリングキットを使って、400レゾナンスユニット（RU）前後の捕捉系（20 µg/ml ヒトFab捕捉キット、GE Healthcare、28-9583-25）を、CM5チップ（GE Healthcare BR1005-30）上に、pH5.0でカップリングした。試料およびシステム用の緩衝液は、HBS-P+ pH7.4（10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、0.05%（v/v）サーファクタントP20）とした。フローセルを25 に設定し、試料ブロックを12 に設定した。50nM 溶液を流速10 µl/分で80秒間注入することによって抗体を捕捉した。

【0216】

0nMから250nMまでの範囲のさまざまな濃度の抗体（1:2希釈液）を流速30 µl/分でフローセルに通すことで、25 において120秒間、会合を測定した。試料溶液をランニング緩衝液に切り替えることにより、解離相を420秒間モニターした。グリシンpH2.1溶液による流速20 µl/分での60秒間の洗浄により表面を再生した。

30

【0217】

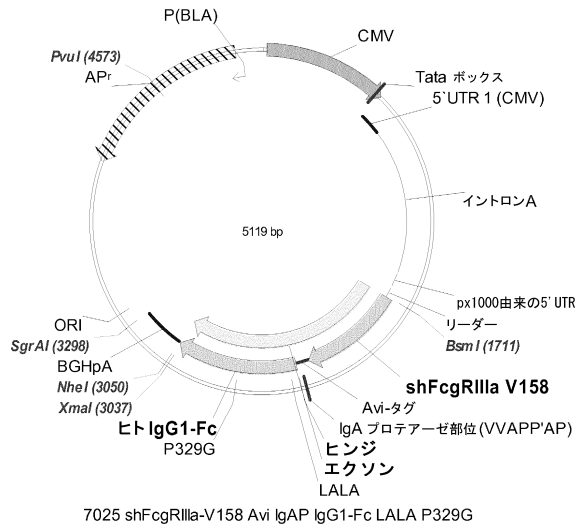
捕捉されたFc RIIIaV158を有さない表面から得られたレスポンスを差し引くことによってバルク屈折率差を補正した。ブランク注入も差し引く（=二重参照）。

【0218】

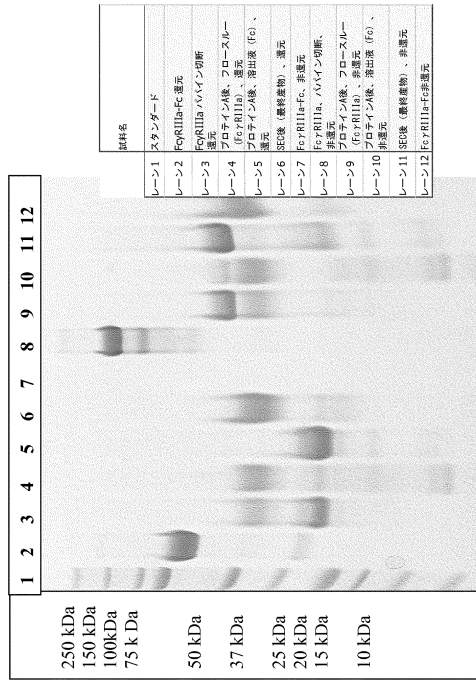
BIAevaluationソフトウェアパッケージを使って、数個の異なる濃度で得られたセンサーグラム曲線を解析することによって、 k_a/k_d と定義される平衡解離定数（ K_D ）を決定した。データのフィッティングは適切な結合モデルに従った。図7に、Fc 受容体V158-Fc LALA P329G融合ポリペプチド（図7a）、Fc 受容体V158（図7b）、切断されたFc 受容体V158-Fc LALA P329G融合ポリペプチド（図7c）のセンサーグラムを示す。

40

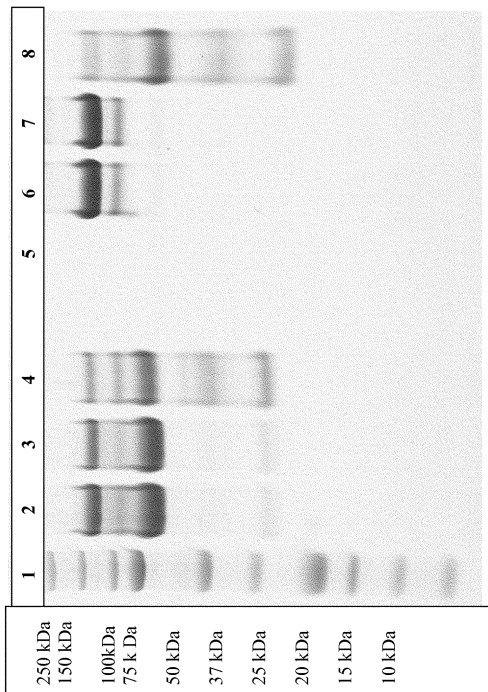
【 図 1 】



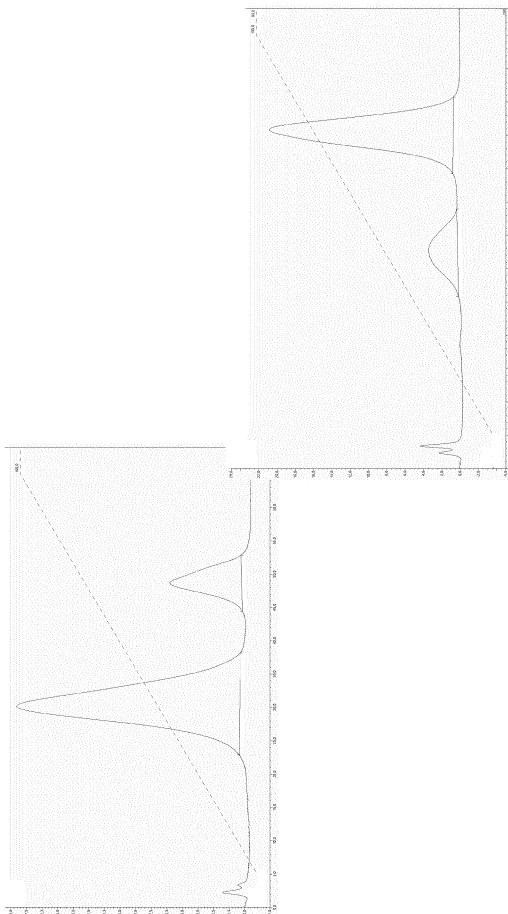
【 図 2 】



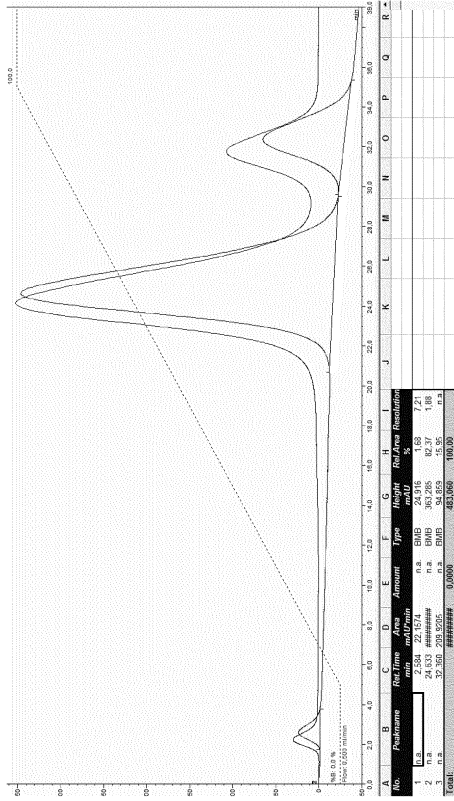
【 図 3 】



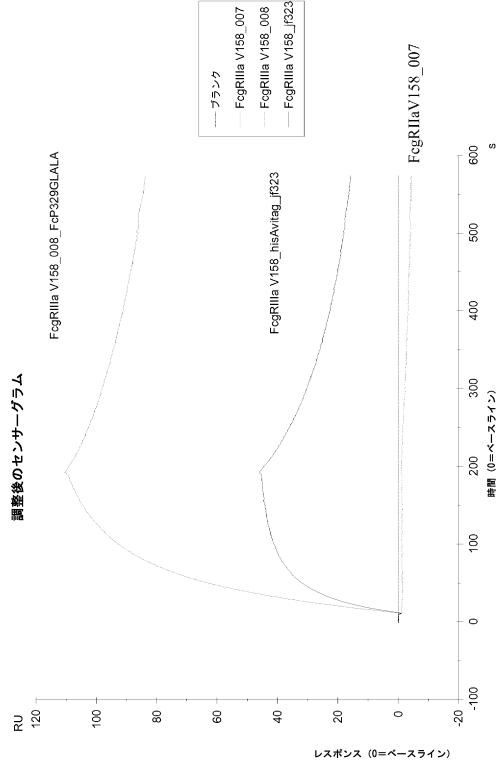
【 図 4 】



【 図 5 】

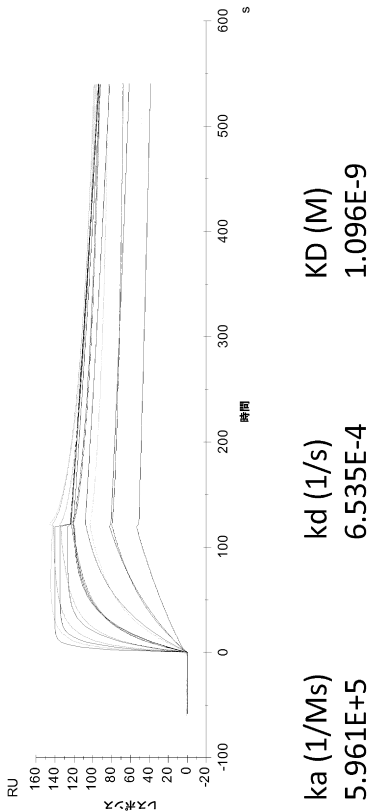


【 図 6 】



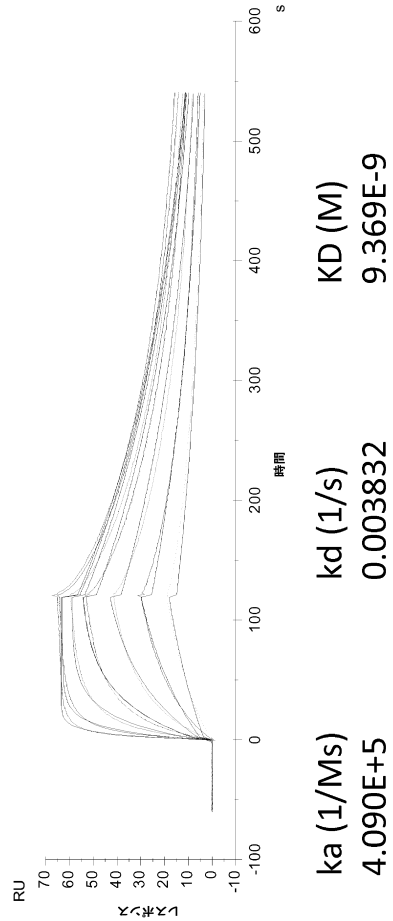
【 図 7 a 】

FcgRIIIa V158_008



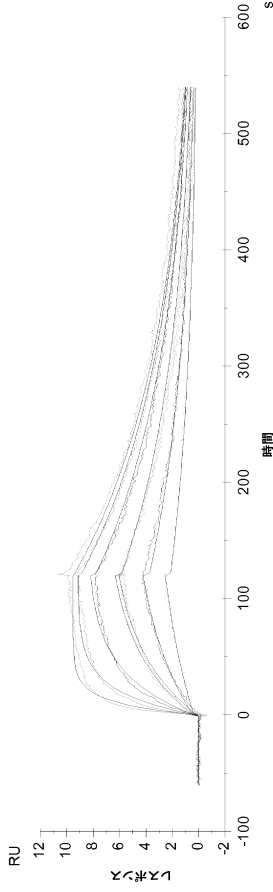
【 図 7 b 】

FcgRIIIa V158_jf323



【 図 7 c 】

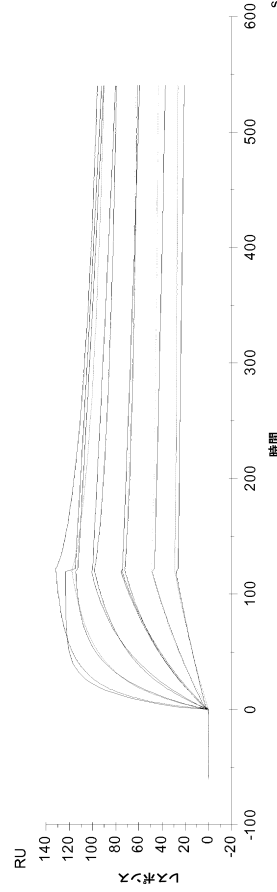
FcgRIIIa V158_008 消化後



k_a (1/Ms) k_d (1/s) KD (M)
 3.595E+5 0.005281 1.469E-8

【 図 7 d 】

FcgRIIIa V158_008 未消化



k_a (1/Ms) k_d (1/s) KD (M)
 2.846E+5 5.276E-4 1.854E-9

【 配列表 】

[0006307077000001.app](#)

フロントページの続き

| | | | |
|--------------|-----------------|---------|---------|
| (51) Int.Cl. | | F I | |
| C 0 7 K | 1/22 (2006.01) | C 0 7 K | 1/22 |
| C 0 7 K | 17/00 (2006.01) | C 0 7 K | 17/00 |
| G 0 1 N | 33/53 (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 D |
| A 6 1 K | 38/00 (2006.01) | A 6 1 K | 38/00 |
| A 6 1 P | 29/00 (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 |

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ルーガー ペトラ
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク アウフ デア ライテン 4
- (72)発明者 シュロタオアー ティルマン
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク ゴマーシュトラッセ 3エー
- (72)発明者 ゼーバー シュテファン
ドイツ連邦共和国 ジンデルスドルフ ミッターヴェーク 2

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 特表2007-525149(JP,A)
特表2011-526154(JP,A)
特表2010-516769(JP,A)
特表2008-504002(JP,A)
国際公開第2011/117329(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90
C 0 7 K 1/00 - 19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)
Google Scholar
PubMed

| | | | |
|---------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 产生与无活性免疫球蛋白Fc区Fc融合的可溶性FcR的方法及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP6307077B2 | 公开(公告)日 | 2018-04-04 |
| 申请号 | JP2015524773 | 申请日 | 2013-07-31 |
| 申请(专利权)人(译) | F.霍夫曼 - 罗氏公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | F.霍夫曼 - 罗氏公司 | | |
| [标]发明人 | ルーガーペトラ シュロタオアーティルマン ゼーバーシュテファン | | |
| 发明人 | ルーガー ペトラ シュロタオアー テイルマン ゼーバー シュテファン | | |
| IPC分类号 | C07K19/00 C07K16/00 C07K14/705 C12N15/09 C12P21/02 C07K1/22 C07K17/00 G01N33/53 A61K38/00 A61P29/00 | | |
| CPC分类号 | A61P29/00 C07K14/70535 C07K2319/30 A61K38/00 A61K47/6811 G01N33/6854 G01N2333/70535 C07K14/705 | | |
| FI分类号 | C07K19/00.ZNA C07K16/00 C07K14/705 C12N15/00.A C12P21/02.C C07K1/22 C07K17/00 G01N33/53.D A61K38/00 A61P29/00 | | |
| 代理人(译) | 清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘 | | |
| 优先权 | 2012179025 2012-08-02 EP | | |
| 其他公开文献 | JP2015526429A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本文提供了式R1-FC-R2的化合物，其中R1代表第一Fc受体，R2代表第二Fc受体，FC代表重链Fc区多肽，存在R1或R2或两者，并且FC基本上不与R1和/或R2结合，以及其用途。

| | | |
|---|---------------------------------|--|
| (19) 日本国特許庁 (JP) | (12) 特許公報 (B2) | (11) 特許番号 特許第6307077号 (P6307077) |
| (45) 発行日 平成30年4月4日 (2018.4.4) | (24) 登録日 平成30年3月16日 (2018.3.16) | |
| (51) Int. Cl. | F 1 | |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 18/00 (2006.01) | C 0 7 K 16/00 (2006.01) |
| C 0 7 K 16/00 (2006.01) | C 0 7 K 14/705 (2006.01) | C 0 7 K 14/705 (2006.01) |
| C 0 7 K 14/705 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 (2006.01) |
| C 1 2 N 15/00 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 (2006.01) |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | | C |
| 請求項の数 14 (全 43 頁) 最終頁に続く | | |
| (21) 出願番号 特願2015-524773 (P2015-524773) | (73) 特許権者 591003013 | |
| (86) (22) 出願日 平成25年7月31日 (2013.7.31) | エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー | |
| (65) 公表番号 特表2015-526429 (P2015-526429A) | F. HOFFMANN-LA ROCH | |
| (43) 公表日 平成27年9月10日 (2015.9.10) | E AKTIENGESELLSCHAFT | |
| (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/066065 | スイス・シーエイチ-4 O 7 O パーゼル・ | |
| (87) 国際公開番号 W02014/020056 | グレンツァーヘルストラッセ 12 4 | |
| (87) 国際公開日 平成26年2月6日 (2014.2.6) | (74) 代理人 100102978 | |
| 審査請求日 平成28年7月15日 (2016.7.15) | 弁理士 清水 初志 | |
| (31) 優先権主張番号 12179025.7 | 100102118 | |
| (32) 優先日 平成24年8月2日 (2012.8.2) | 弁理士 春名 雅夫 | |
| (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) | 100160923 | |
| | 弁理士 山口 裕孝 | |
| | 100119507 | |
| | 弁理士 刑部 俊 | |
| | 最終頁に続く | |
| (54) 【発明の名称】 不活性免疫グロブリンFc領域とのFc融合体としての可溶性FcRを生産するための方法およびその使用 | | |