

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6388581号
(P6388581)

(45) 発行日 平成30年9月12日(2018.9.12)

(24) 登録日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	Z N A C
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	C 1 2 N	15/24	
C 1 2 N	15/28	(2006.01)	C 1 2 N	15/28	
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	

請求項の数 19 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-524776 (P2015-524776)	(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2015-531591 (P2015-531591A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成27年11月5日(2015.11.5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/066096		T
(87) 国際公開番号	W02014/020069		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成26年2月6日(2014.2.6)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成28年7月12日(2016.7.12)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	12179021.6		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成24年8月2日(2012.8.2)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

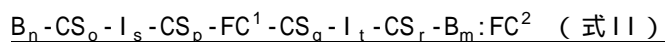
(54) 【発明の名称】 単量体および多量体分子を生産するための方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2量体または3量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための方法であって、

(a) 式II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：



式中、

Bは、2量体または3量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1であり、o=1ならばp=0であり、かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1であり、q=1ならばr=0であり、かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

FC¹およびFC²は、1つまたは複数のジスルフィド結合によって共有結合的に連結されてお

10

20

り、

FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない、

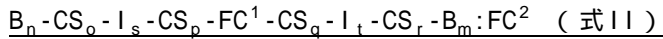
(b) 該細胞または培養培地から該融合ポリペプチドを回収する工程、

(c) 該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、2量体または3量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する、前記方法。

【請求項2】

式IIに記載の融合ポリペプチド：



式中、

Bは、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1であり、o=1ならばp=0であり、かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1であり、q=1ならばr=0であり、かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

第1のFCおよび第2のFCは、1つまたは複数のジスルフィド結合によって共有結合的に連結されており、

FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない。

【請求項3】

Bが、IL17、TWEAK、TNFおよび他のTNFファミリーメンバー、TL1a、IL18、IL18R、IL33、およびIL33Rの群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

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ことを特徴とする、請求項1または3に記載の方法。

【請求項5】

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、L235EおよびP329Gを有するヒトIgG4重鎖ポリペプチドから選択されることを特徴とする、請求項1、3または4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

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、請求項1、3、4または5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

Bが、IL17、TWEAK、TNFおよび他のTNFファミリーメンバー、TL1a、IL18、IL18R、IL33、およびIL33Rの群から選択されることを特徴とする、請求項2に記載の融合ポリペプチド

【請求項8】

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ことを特徴とする、請求項2または7に記載の融合ポリペ

10

20

30

40

50

プチド。

【請求項 9】

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、L235EおよびP329Gを有するヒトIgG4重鎖ポリペプチドから選択されることを特徴とする、請求項2、7または8のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 10】

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、請求項2、7、8または9のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 11】

アフィニティクロマトグラフィーリガンドとしての、固定化された、請求項2および7～10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 12】

イムノアッセイにおける、固定化された、請求項2および7～10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 13】

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11～12のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 14】

請求項2および7～10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。

【請求項 15】

医薬の製造における、請求項2および7～10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 16】

非ヒト実験動物における免疫原としての、請求項2および7～10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 17】

請求項2および7～10のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドを非ヒト実験動物に適用することによって疾患の動物モデルを得るための、請求項2および7～10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 18】

BまたはBの2量体もしくは3量体に特異的に結合する抗体を選択するための、請求項2および7～10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 19】

ジスルフィド連結されたBの2量体を生産するための、請求項2および7～10のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書では、免疫グロブリンFc領域との融合ポリペプチドとしての単量体および多量体分子の生産方法、および、治療剤、アッセイ、クロマトグラフィーカラム、または疾患動物モデルの作製などといった、その使用を報告する。

【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（Fc R）を持つ細胞（例えば食細

10

20

30

40

50

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。

【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Fc RI、Fc RII、Fc RIII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。

10

【0004】

免疫グロブリンベースのサイトカイン融合タンパク質は、(例えばBiomolから)いくつか市販されている。Fc領域融合物は「Therapeutic monoclonal antibodies - from bench to clinic」(Wiley、Zhiqiang An編、2009)(非特許文献2)に概説されている。

【0005】

WO 01/03737(特許文献1)には、免疫グロブリン融合タンパク質が報告されている。細胞内タンパク質分解の低減に基づく抗体-インターロイキン2イムノサイトカインの循環半減期と効力の改良が、Gillies, S.D.ら(Clin. Cancer Res. 8 (2002) 210-216(非特許文献3))によって報告されている。Dumont, J.A.ら(Biodrugs 20 (2006) 151-160(非特許文献4))は単量体型Fc融合物を報告している。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および分泌は、Lo, K-M.ら(Prot. Eng. 11 (1998) 495-500(非特許文献5))によって報告されている。WO 00/40615(特許文献2)には、Fc融合タンパク質としての抗肥満タンパク質の発現および送達が報告されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO 01/03737

【特許文献2】WO 00/40615

【非特許文献】

【0007】

【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】「Therapeutic monoclonal antibodies - from bench to clinic」(Wiley、Zhiqiang An編、2009)

【非特許文献3】Gillies, S.D.ら、Clin. Cancer Res. 8 (2002) 210-216

【非特許文献4】Dumont, J.A.ら、Biodrugs 20 (2006) 151-160

【非特許文献5】Lo, K-M.ら、Prot. Eng. 11 (1998) 495-500

【発明の概要】

【0008】

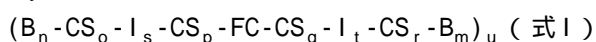
n量体として生物学的に活性であり、かつ発現時に不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを、Fc受容体に実質的に結合しないFc領域との融合ポリペプチドとして発現させることにより、これらのポリペプチドが可溶性の形態で得られることがわかった。ポリペプチドの発現に融合ポリペプチドを使用すると、融合ポリペプチドの形態でも、単離されたポリペプチドとしても、得られうる収量が増加する。さらに、当該ポリペプチドは、Fc領域の切断および除去後に明確なn量体型のままであることもわかった。

40

【0009】

本明細書において報告する一局面は、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための方法であって、

(a) 式I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：



50

式中、

Bは、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FCは、重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n = 1かつm = 0であるか、またはn = 0かつm = 1であって、

n = 1ならば、o = 0または1であって、o = 0ならばp = 0または1、o = 1ならばp = 0であり、かつs = 0または1であり、かつq = 0であり、かつt = 0であり、かつr = 0であり、

m = 1ならば、q = 0または1であって、q = 0ならばr = 0または1、q = 1ならばr = 0であり、かつt = 0または1であり、かつo = 0であり、かつs = 0であり、かつp = 0であり、

u = 1または2であり、

FCはFc受容体に実質的に結合しない、

(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

を含み、それによって、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する、前記方法である。

【0010】

本明細書において報告する一局面は、式Iに記載の融合ポリペプチドである：

$(B_n - CS_o - I_s - CS_p - FC - CS_q - I_t - CS_r - B_m)_u$ (式I)

式中、

Bは、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FCは、重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n = 1かつm = 0であるか、またはn = 0かつm = 1であって、

n = 1ならば、o = 0または1であって、o = 0ならばp = 0または1、o = 1ならばp = 0であり、かつs = 0または1であり、かつq = 0であり、かつt = 0であり、かつr = 0であり、

m = 1ならば、q = 0または1であって、q = 0ならばr = 0または1、q = 1ならばr = 0であり、かつt = 0または1であり、かつo = 0であり、かつs = 0であり、かつp = 0であり、

u = 1または2であり、

FCはFc受容体に実質的に結合しない。

【0011】

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方法による方法で得られる、本明細書において報告する融合ポリペプチドの切断によって得られる、n量体ポリペプチドである。

【0012】

一態様では、Bは、IL17、IL18およびIL33のようなサイトカイン、IL18RおよびIL33Rのようなサイトカイン受容体、TNF、TWEAKおよびTL1aのようなTNFファミリーメンバーの群から選択される。

【0013】

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。FCには、全ての天然に存在するアロタイプが含まれる。

【0014】

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

10

20

30

40

50

、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

【0015】

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。

【0016】

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

10

を有する。

【0017】

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。

【0018】

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。

【0019】

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。

20

【0020】

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。

【0021】

一態様では、ヒトIgG4重鎖ポリペプチドは、変異S228P、L235E、D265A、P329A、およびP329Gのうちの1つまたは複数

【0022】

を有する。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。

30

【0023】

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。

【0024】

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。

40

【0025】

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。

【0026】

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。

【0027】

一態様では、 $u = 2$ であり、第1のFCは、変異T366Wおよび任意で変異S354Cを含み、第2の

50

FCは、変異T366S、L368AおよびY407Vならびに任意で変異Y349Cを含む。

【0028】

一態様では、 $u=2$ であり、かつ

(a) $n=1$ かつ $m=0$ であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが同一であるか、または

(b) $n=1$ かつ $m=0$ であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが異なるか、または

(c) $n=0$ かつ $m=1$ であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが同一であるか、または

(d) $n=0$ かつ $m=1$ であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが異なる。

10

【0029】

一態様では、 $u=1$ であり、かつ融合ポリペプチドは、ジスルフィド連結された第2のFCを含む。

【0030】

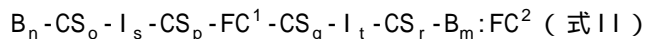
一態様では、 $u=1$ であり、かつ融合ポリペプチドは、ジスルフィド連結された第2のFCを含み、一方のFCは変異T366Wおよび任意で変異S354Cを含み、他方のFCは変異T366S、L368AおよびY407Vならびに任意で変異Y349Cを含む。

【0031】

一態様では、本明細書において報告する方法は、1量体（単量体）として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための方法であり、

20

(a) 式II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：



式中、

Bは、1量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC^1 は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC^2 は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

30

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

$n=1$ かつ $m=0$ であるか、または $n=0$ かつ $m=1$ であって、

$n=1$ ならば、 $o=0$ または1であって、 $o=0$ ならば $p=0$ または1、 $o=1$ ならば $p=0$ であり、かつ $s=0$ または1であり、かつ $q=0$ であり、かつ $t=0$ であり、かつ $r=0$ であり、

$m=1$ ならば、 $q=0$ または1であって、 $q=0$ ならば $r=0$ または1、 $q=1$ ならば $r=0$ であり、かつ $t=0$ または1であり、かつ $o=0$ であり、かつ $s=0$ であり、かつ $p=0$ であり、

FC^1 と FC^2 は、1つまたは複数のジスルフィド結合（:）によって共有結合的に連結されており、

FC^1 および FC^2 はFc受容体に実質的に結合しない、

(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、

40

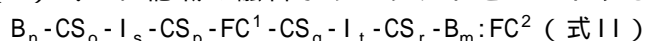
(c) 任意で、該融合ポリペプチドをプロテアーゼで切断する工程

を含み、それによって、1量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する。

【0032】

一態様では、本明細書において報告する方法は、2量体（二量体）として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための方法であり、

(a) 式II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：



式中、

50

Bは、2量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1、o=1ならばp=0であり、かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1、q=1ならばr=0であり、かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

FC¹とFC²は、1つまたは複数のジスルフィド結合(:)によって共有結合的に連結されており、

FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない、

(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、

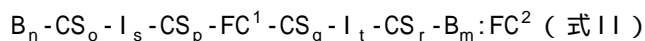
(c) 任意で、該融合ポリペプチドをプロテアーゼで切断する工程

を含み、それによって、2量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する。

【0033】

一態様では、本明細書において報告する方法は、3量体(三量体)として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための方法であり、

(a) 式II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：



式中、

Bは、3量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1、o=1ならばp=0であり、かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1、q=1ならばr=0であり、かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

FC¹とFC²は、1つまたは複数のジスルフィド結合(:)によって共有結合的に連結されており、

FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない、

(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

を含み、それによって、3量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する。

【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、(G₅S)₄およびそれらの任意の組み合わせを含む第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

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

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、トロンビン切断部位、第10a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（サッカロミセス・セレビシア（*Saccharomyces cerevisiae*）由来のUlp1（Ubl特異的プロテアーゼ1））切断部位から選択される。

【 0 0 3 6 】

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以外には、追加のプロテアーゼ切断部位を含まない。

10

【 0 0 3 7 】

一態様では、FC領域中のC末端リジン残基が欠失している。これにより、プロテアーゼ切断副産物の量が低減する（人為的プロテアーゼ切断部位の除去）。

【 0 0 3 8 】

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、固定化された、本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

【 0 0 3 9 】

本明細書において報告する一局面は、イムノアッセイにおける、固定化された、本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

20

【 0 0 4 0 】

一態様では、融合ポリペプチドまたはn量体ポリペプチドは固相に結合されている。

【 0 0 4 1 】

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または本明細書において報告するn量体ポリペプチドを含む医薬組成物である。

【 0 0 4 2 】

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または本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

【 0 0 4 3 】

本明細書において報告する一局面は、免疫原としての、本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

30

【 0 0 4 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または本明細書において報告するn量体ポリペプチドを実験動物に適用することによって疾患の動物モデルを得るための、本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

【 0 0 4 5 】

本明細書において報告する一局面は、BまたはBのn量体に特異的に結合する抗体を選択するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

40

【 0 0 4 6 】

本明細書において報告する一局面は、ジスルフィド連結されたBの2量体を生産するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告するn量体ポリペプチドの使用である。

[本発明1001]

n量体として生物学的に活性なポリペプチドを生産するための方法であって、
(a) 式I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：
 $(B_n - CS_o - I_s - CS_p - FC - CS_q - I_t - CS_r - B_m)_u$ (式I)

式中、

50

Bは、n量体として生物学的に活性なポリペプチドを表し、
FCは、重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、
CSは、切断部位を表し、かつ
lは、介在アミノ酸配列を表し、
n = 1かつm = 0であるか、またはn = 0かつm = 1であって、
n = 1ならば、o = 0または1であって、o = 0ならばp = 0または1、o = 1ならばp = 0であり、かつ
s = 0または1であり、かつq = 0であり、かつt = 0であり、かつr = 0であり、
m = 1ならば、q = 0または1であって、q = 0ならばr = 0または1、q = 1ならばr = 0であり、かつ
t = 0または1であり、かつo = 0であり、かつs = 0であり、かつp = 0であり、
u = 1または2であり、

10

FCはFc受容体に実質的に結合しない、
(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
を含み、それによって、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態
で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する、前記方法。

[本発明1002]

式Iに記載の融合ポリペプチド：

$(B_n - CS_o - l_s - CS_p - FC - CS_q - l_t - CS_r - B_m)_u$ (式I)

式中、

20

Bは、n量体として生物学的に活性なポリペプチドを表し、
FCは、重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、
CSは、切断部位を表し、かつ
lは、介在アミノ酸配列を表し、
n = 1かつm = 0であるか、またはn = 0かつm = 1であって、
n = 1ならば、o = 0または1であって、o = 0ならばp = 0または1、o = 1ならばp = 0であり、かつ
s = 0または1であり、かつq = 0であり、かつt = 0であり、かつr = 0であり、
m = 1ならば、q = 0または1であって、q = 0ならばr = 0または1、q = 1ならばr = 0であり、かつ
t = 0または1であり、かつo = 0であり、かつs = 0であり、かつp = 0であり、
u = 1または2であり、

30

FCはFc受容体に実質的に結合しない。

[本発明1003]

本発明1001の方法によって得られた融合ポリペプチドの切断によって得られる、n量体
ポリペプチド。

[本発明1004]

Bが、IL17、TWEAK、TNFおよび他のTNFファミリーメンバー、TL1a、IL18、IL18R、IL33
、およびIL33Rの群から選択されることを特徴とする、本発明1001の方法、または本発明1002
の融合ポリペプチド、または本発明1003のn量体ポリペプチド。

[本発明1005]

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
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ことを特徴とする、本発明1001もしくは1004の方法、ま
たは本発明1002もしくは1004の融合ポリペプチド。

40

[本発明1006]

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、
L235EおよびP329Gを有するヒトIgG4重鎖ポリペプチドから選択されることを特徴とする、
本発明1001、1004もしくは1005のいずれかの方法、または本発明1002、1004もしくは1005
のいずれかの融合ポリペプチド。

[本発明1007]

50

u = 2であり、かつ、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1001、1004、1005もしくは1006のいずれかの方法、または本発明1002、1004、1005もしくは1006のいずれかの融合ポリペプチド。

[本発明1008]

以下を特徴とする、本発明1007の方法または本発明1007の融合ポリペプチド：

(a) n = 1かつm = 0であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが同一である、

(b) n = 1かつm = 0であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが異なる、

(c) n = 0かつm = 1であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが同一である、

(d) n = 0かつm = 1であり、かつ第1のFCに融合されたBと第2のFCに融合されたBとが異なる。

10

[本発明1009]

アフィニティークロマトグラフィーリガンドとしての、固定化された、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

[本発明1010]

イムノアッセイにおける、固定化された、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

20

[本発明1011]

前記融合ポリペプチドまたは前記n量体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1009～1010のいずれかの使用。

[本発明1012]

本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドを含む、医薬組成物。

[本発明1013]

医薬の製造における、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

30

[本発明1014]

免疫原としての、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

[本発明1015]

本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドを実験動物に適用することによって疾患の動物モデルを得るための、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

[本発明1016]

BまたはBのn量体に特異的に結合する抗体を選択するための、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

40

[本発明1017]

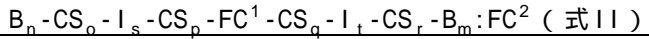
ジスルフィド連結されたBの2量体を生産するための、本発明1002および1004～1008のいずれかの融合ポリペプチドまたは本発明1003～1004のいずれかのn量体ポリペプチドの使用。

[本発明1018]

2量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための、本発明1001および1004～1008のいずれかの方法であって、

50

(a) 式II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：



式中、

Bは、2量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1、o=1ならばp=0であり、かつ

s=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1、q=1ならばr=0であり、かつ

t=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

第1のFCおよび第2のFCは、1つまたは複数のジスルフィド結合によって共有結合的に連結されており、

FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない、

(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

を含み、それによって、2量体として生物学的に活性なポリペプチドを生産する、前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】Fc受容体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】Fc受容体融合ポリペプチドのパパイン切断の分析用SDS-PAGEゲル。

【図3】12%ピストリスゲル±DTT。それぞれ、PreScissionプロテアーゼ(レーン4、8)、IgAプロテアーゼ(レーン3、7)による、Fc R111aV158-Avi-Fc LALA P239Gの切断。PPによる非特異的切断がわかる(レーン2、6)。

【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 R111aV158およびFcタグ付きFc R111aV158を用いたアフィニティカラムの比較。

【図6】Fc R111aV158-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、40RUであるFc R111aV158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。FcR111a V 158_008は非切断融合ポリペプチドを表し、FcR111a V 158_007はFcR111aの短縮型非機能的変異体(=対照)を表し、FcR111a V 158_jf323は、インタクトなHisAviタグを含むFcR111a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。

【図8】Fc-TWEAK融合ポリペプチド発現プラスミドのプラスミド地図。

【図9】Fc-IL17A融合ポリペプチド発現プラスミドのプラスミド地図。

【図10】ヒトTNF 変異体の滴定曲線。

【図11】二量体型Fc IL17融合ポリペプチドの異なる構成および状態の図解。

【図12】三量体型Fc領域-ヒトTWEAK融合ポリペプチド。

【図13】IL-33の全長型(1~270)と短縮型(112~270)はどちらも機能的に活性であり、IgG-FcをIL-33の残りの部分(1~112)の代わりに付加することで機能的に活性なIL-

10

20

30

40

50

33を得ることができ、これは単量体として作用する；単量体型IgG1-Fc_IL-33。

【図14】IgG1-Fc-KiH_Precisionプロテアーゼ部位_shTNFa融合ポリペプチドとしての三量体型ヒトTNF。

【図15】Fc-shTNF 融合ポリペプチド（ノブ（knob））発現プラスミドのプラスミド地図。

【図16】ヒトIgG1 Fc領域（ホール（hole））発現プラスミドのプラスミド地図。

【図17】二量体型IL18R-Fc融合ポリペプチドと比較した、本明細書において報告する単量体型IL18R-Fc融合ポリペプチドのBIAcoreデータ。

【発明を実施するための形態】

【0048】

10

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。

【0049】

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、ka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）、kd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（kd/ka）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同様に解離挙動に関して、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。

20

【0050】

「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

(APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAK)

30

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ると推測されている。Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206。

【0051】

「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
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG)

40

のアミノ酸配列を有する。

【0052】

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。

50

【 0 0 5 3 】

「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（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 4 】

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 5 】

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 6 】

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 5 7 】

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 5 8 】

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 5 9 】

「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 0 】

「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EU

10

20

30

40

50

319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)

10

のうちの1つまたは複数が改変されている。

【 0 0 6 1 】

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：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 03)

20

を有する。

【 0 0 6 2 】

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
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 04)

30

を有する。

【 0 0 6 3 】

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
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 05)

40

を有する。

【 0 0 6 4 】

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
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 06)

を有する。

【 0 0 6 5 】

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
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 07)

を有する。

【 0 0 6 6 】

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
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 08)

を有する。

【 0 0 6 7 】

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：

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

を有する。

【 0 0 6 8 】

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：

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

を有する。

【 0 0 6 9 】

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：

10

20

30

40

50

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

を有する。

【 0 0 7 0 】

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：

10

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

を有する。

【 0 0 7 1 】

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：

20

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

を有する。

【 0 0 7 2 】

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：

30

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

を有する。

【 0 0 7 3 】

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：

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)

40

を有する。

【 0 0 7 4 】

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：

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 16)

を有する。

【 0 0 7 5 】

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：

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 17)

を有する。

【 0 0 7 6 】

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)。

【 0 0 7 7 】

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;

N-末端-

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

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 (CD6

10

20

30

40

50

4)、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相互作用に關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

10

【0078】

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 -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 -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。關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)。

20

【0079】

種間で保存されているFcRn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うる。

30

【0080】

「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)。

40

【0081】

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型分子である。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 (例えばRoux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083参照)。

【0082】

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。

50

【 0 0 8 3 】

「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。

【 0 0 8 4 】

「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。

【 0 0 8 5 】

「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。

【 0 0 8 6 】

「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。

【 0 0 8 7 】

「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、

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 (KDHLIHNHVHKEFHAAHANK), 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 (KETAAAKFERQHMS), SEQ ID NO: 34 (KRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGAL), 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 (TNPQVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP 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。

【 0 0 8 8 】

「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

10

20

30

40

50

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10a因子、IdeSプロテアーゼ、またはエンテロキナーゼである。

【0089】

「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)	10
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)	20
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。

【0090】

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。

【0091】

本明細書において報告する融合ポリペプチド

ポリペプチドのFc領域融合ポリペプチドとしての発現は、組成が不明な多量体凝集体の形成をもたらすことが多い。また、Fc領域融合ポリペプチドを発現させることは、2本の鎖の間に立体障害があることから困難でもある。

【0092】

n量体として生物学的に活性であり、かつ発現時に不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを、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、これらのポリペプチドが可溶性の形態で得られることがわかった。ポリペプチド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も、単離されたポリペプチドとしても、得られうる収量が増加する。さらに、当該ポリペプチドは、Fc領域の切断および除去後に明確なn量体型のままであることもわかった。Fc受容体に実質的に結合しないFc領域はとりわけ好適である。

【0093】

「Fc受容体に実質的に結合しない」という用語は、融合ポリペプチドに含まれる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。

【0094】

ポリペプチドは、Fc領域に直接融合するか、ペプチドリinkerを介して融合するか、プロテアーゼ切断部位を介して融合するか、またはプロテアーゼ切断部位と組み合わせたペプチドリinkerを介して融合することができる。

【0095】

酵素切断部位を一方の融合ポリペプチドに含むが、第2の融合ポリペプチドは酵素切断部位を含まない、非対称二量体型融合ポリペプチドを得ることができるとわかった。したがって一態様において、二量体型融合ポリペプチドは、一方の融合ポリペプチドだけが生物学的活性ポリペプチドとFc領域との間に酵素切断部位を含むことを除けば、同一である2つの融合ポリペプチドを含む。

【0096】

生物学的活性ポリペプチドを本明細書において報告する融合ポリペプチドとして発現させることにより、得られうる発現収量を増加させるか、または生物学的活性ポリペプチドの大規模生産をとにかく達成することができる。

【0097】

同様に、本明細書において報告する融合ポリペプチドを使用することにより、生物学的活性ポリペプチドの薬物動態特性を改良することも可能である。

【0098】

同様に、本明細書において報告する融合ポリペプチドを使用することにより、可溶性のサイトカインおよびサイトカイン受容体を提供することも可能である。

【0099】

本明細書において報告する融合ポリペプチドを使用することにより、サイトカイン受容体を生物学的に活性な形態で提供することが可能である。これらのサイトカイン受容体は、切断された形態では生物学的に活性でない。

【0100】

本明細書において報告する融合ポリペプチドを使用することにより、機能的で生物学的に活性な可溶性の膜受容体および/またはドメインを提供することが可能である。

【0101】

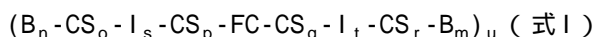
本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドを使用することにより、融合ポリペプチドの切断と二量体型サイトカインの遊離に先立って、サイトカインをジスルフィド結合に基づいて二量体化させることが可能である。

【0102】

同様に、本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドを使用することにより、強制ジスルフィド連結によってジスルフィド連結されたヘテロ二量体型サイトカインを提供することも可能である。

【0103】

本明細書において報告する一局面は、式Iに記載の融合ポリペプチドである：



式中、

Bは、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FCは、重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

10

20

30

40

50

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n = 1かつm = 0であるか、またはn = 0かつm = 1であって、

n = 1ならば、o = 0または1であって、o = 0ならばp = 0または1、o = 1ならばp = 0であり、かつs = 0または1であり、かつq = 0であり、かつt = 0であり、かつr = 0であり、

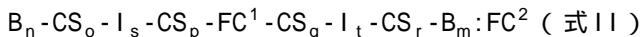
m = 1ならば、q = 0または1であって、q = 0ならばr = 0または1、q = 1ならばr = 0であり、かつt = 0または1であり、かつo = 0であり、かつs = 0であり、かつp = 0であり、

u = 1または2であり、

FCはFc受容体に実質的に結合しない。

【 0 1 0 4 】

本明細書において報告する一局面は、式IIに記載の融合ポリペプチドである：



式中、

Bは、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n = 1かつm = 0であるか、またはn = 0かつm = 1であって、

n = 1ならば、o = 0または1であって、o = 0ならばp = 0または1、o = 1ならばp = 0であり、かつs = 0または1であり、かつq = 0であり、かつt = 0であり、かつr = 0であり、

m = 1ならば、q = 0または1であって、q = 0ならばr = 0または1、q = 1ならばr = 0であり、かつt = 0または1であり、かつo = 0であり、かつs = 0であり、かつp = 0であり、

第1のFCおよび第2のFCは、1つまたは複数のジスルフィド結合によって共有結合的に連結されており、

FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない。

【 0 1 0 5 】

n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドは、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、任意の種に由来することができる。

【 0 1 0 6 】

一態様では、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチド(=式Iまたは式IIにおけるB)は、IL17、IL18、IL33、IL18R、IL33R、TNF、TWEAK、およびTL1aの群から選択される。

【 0 1 0 7 】

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。

【 0 1 0 8 】

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、実質的にFc受容体に結合しないものとする。

【 0 1 0 9 】

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

10

20

30

40

50

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)。

【0110】

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、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。

【0111】

一態様では、FCは、またはFC¹およびFC²は互いに独立して、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、またはFC¹およびFC²は互いに独立して、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、またはFC¹およびFC²は互いに独立して、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、またはFC¹およびFC²は互いに独立して、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、Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324、EP 0 307 434)。一態様では、FCは、またはFC¹およびFC²は互いに独立して、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、またはFC¹およびFC²は互いに独立して、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。

【0112】

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。

10

【0113】

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。

20

【0114】

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US 6,737,056号、WO 2004/056312、およびShields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604参照）。

【0115】

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。

【0116】

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。

30

【0117】

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つまたは複数にFc受容体である。

【0118】

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。

40

【0119】

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つまたは複数を含む。

【0120】

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。

【0121】

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、P329AまたはP329Gとを有する。

【0122】

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。

【0123】

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。

【0124】

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。

【0125】

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。

【0126】

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。

【0127】

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。

【0128】

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。

【0129】

融合ポリペプチドは、生物学的に活性なポリペプチドと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、生物学的に活性なポリペプチドと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。

【0130】

一態様では、リンカーポリペプチドは、 $(G_3S)_3$ 、 $(G_3S)_4$ 、 $(G_3S)_5$ 、 $(G_3S)_6$ 、 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_4$ 、 $(G_4S)_5$ 、 $(G_5S)_2$ 、 $(G_5S)_3$ 、 $(G_5S)_4$ 、およびそれらの任意の組み合わせを含む群から選択される。

【0131】

加えて、融合ポリペプチドは、生物学的に活性なポリペプチドと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。

【0132】

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。

【0133】

リンカーポリペプチドとタグとを合体させて、生物学的に活性なポリペプチドと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。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

一態様では、介在アミノ酸配列は、 $(G_3S)_3$ 、 $(G_3S)_4$ 、 $(G_3S)_5$ 、 $(G_3S)_6$ 、 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_4$ 、 $(G_4S)_5$ 、 $(G_5S)_2$ 、 $(G_5S)_3$ 、 $(G_5S)_4$ 、およびそれらの任意の組み合わせを含む第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、Strept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。

【 0 1 3 5 】

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。

10

【 0 1 3 6 】

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10a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（サッカロマイセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）に由来するUlp1（Ubl-specific protease 1））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。

【 0 1 3 7 】

一態様では、融合ポリペプチドは、プロテアーゼ・パ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。

20

【 0 1 3 8 】

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 9 】

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1つとFc領域とを含む、二量体型融合ポリペプチドである。

【 0 1 4 0 】

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的に連結する1つまたは複数のジスルフィド橋を含む。

30

【 0 1 4 1 】

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、二量体型ポリペプチドは、融合ポリペプチドをFc領域と共有結合的に連結する1つまたは複数のジスルフィド橋を含む。

【 0 1 4 2 】

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 4 3 】

本明細書において報告する一局面は、式Iに記載の融合ポリペプチドである：



式中、

Bは、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FCは、重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1、o=1ならばp=0であり、か

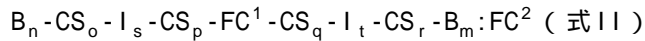
40

50

かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、
 m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1、q=1ならばr=0であり、
 かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、
 u=2であり、
 FcはFc受容体に実質的に結合しない。

【0144】

本明細書において報告する一局面は、式IIに記載の融合ポリペプチドを含む二量体型ポリペプチドである：



式中、

Bは、1量体、2量体、または3量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されて
 いない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1、o=1ならばp=0であり、
 かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1、q=1ならばr=0であり、
 かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

FC¹とFC²は、1つまたは複数のジスルフィド結合によって共有結合的に連結されており、
 FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない。

【0145】

二量体型ポリペプチドは、2つの異なるポリペプチドの組み合わせ、または1つのポリペ
 プチドと本明細書において報告する1つの融合ポリペプチドとの組み合わせ、または本明
 細書において報告する2つの異なる融合ポリペプチドの組み合わせによって形成させるこ
 とができるので、ヘテロ二量体化を保証するための機序を用いる必要がある。

【0146】

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T3
 66S、L368AおよびY407Vならびに任意で変異Y349Cを含む。

【0147】

一態様では、融合ポリペプチドは、

(a) 第1および第2の融合ポリペプチドのBが同一であること、または

(b) 第1の融合ポリペプチドのBと第2の融合ポリペプチドのBとが異なること

を特徴とする。

【0148】

一態様では、Fc領域中のC末端リジン残基が欠失している。これは、推定される酵素切
 断部位の欠失をもたらす。

【0149】

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または本明細書において報
 告する固定化された二量体型融合ポリペプチドの使用である。

【0150】

一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型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、融合ポリペプチドま
 たは二量体型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。

【0151】

10

20

30

40

50

一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドは、Fc受容体とFc領域との間に切断部位を含む。一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドは、ビオチン化の前に切断される。

【0152】

一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドは、生物学的活性ポリペプチド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タグまたはAviタグである。

【0153】

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または二量体型融合ポリペプチドを含むことを特徴とする、アフィニティークロマトグラフィーカラムも報告する。

10

【0154】

一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドは、生物学的活性ポリペプチドとFc領域との間に切断部位を含む。一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドは、ビオチン化の前に切断される。

【0155】

一態様では、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドは、生物学的活性ポリペプチド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タグまたはAviタグである。

20

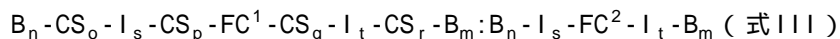
【0156】

本明細書において報告する一局面は、1量体型（単量体型）、2量体型（二量体型）、または3量体型（三量体型）の生物学的活性ポリペプチドを生産するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドの使用であり、ここでは、酵素による融合ポリペプチドの切断後に1量体型（単量体型）、2量体型（二量体型）、または3量体型（三量体型）の生物学的活性ポリペプチドが得られ、1量体型（単量体型）、2量体型（二量体型）、または3量体型（三量体型）の生物学的活性ポリペプチドは、切断後も、1量体型（単量体型）、2量体型（二量体型）、または3量体型（三量体型）のままである。

【0157】

本明細書において報告する一局面は、嵩高い（立体障害性の）二量体型サイトカインを生産するための、式IIIの二量体型融合ポリペプチドの使用である：

30



式中、

Bは、2量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成する、ポリペプチドを表し、

FC¹は、第1の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

FC²は、第2の重鎖Fc領域ポリペプチドを表し、

CSは、切断部位を表し、かつ

Iは、介在アミノ酸配列を表し、

n=1かつm=0であるか、またはn=0かつm=1であって、

40

n=1ならば、o=0または1であって、o=0ならばp=0または1、o=1ならばp=0であり、かつs=0または1であり、かつq=0であり、かつt=0であり、かつr=0であり、

m=1ならば、q=0または1であって、q=0ならばr=0または1、q=1ならばr=0であり、かつt=0または1であり、かつo=0であり、かつs=0であり、かつp=0であり、

FC¹とFC²は、1つまたは複数のジスルフィド結合によって共有結合的に連結されており、FC¹およびFC²はFc受容体に実質的に結合しない。

【0158】

一方の融合ポリペプチドには酵素切断部位を含むが、第2の融合ポリペプチドは酵素切断部位を含まない、非対称二量体型融合ポリペプチドを得ることができることがわかった。したがって一態様において、二量体型融合ポリペプチドは、一方の融合ポリペプチドだけが

50

生物学的活性ポリペプチドとFc領域との間に酵素切断部位を含むことを除いて同一である2つの融合ポリペプチドを含む。

【0159】

本明細書において報告する一局面は、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドのインビボでの半減期を増加させるための、本明細書において報告する融合ポリペプチドの使用である。

【0160】

本明細書において報告する一局面は、可溶性のサイトカインまたはサイトカイン受容体を提供するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドの使用である。

10

【0161】

本明細書において報告する融合ポリペプチドを使用することにより、サイトカイン受容体を生物学的に活性な形態で提供することが可能である。これらのサイトカイン受容体は切断された形態では生物学的に活性でない。

【0162】

本明細書において報告する一局面は、機能的で生物学的に活性な可溶性の膜受容体および/または膜受容体ドメインを提供するための、本明細書において報告する融合ポリペプチドの使用である。

【0163】

本明細書において報告する一局面は、ジスルフィド連結された二量体型サイトカインを提供するための、本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドの使用であり、ここでは融合ポリペプチドの酵素的切断の前にジスルフィド結合が形成される。

20

【0164】

本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドを使用することにより、融合ポリペプチドの切断と二量体型サイトカインの遊離に先立って、サイトカインをジスルフィド結合に基づいて二量体化させることが可能である。

【0165】

本明細書において報告する一局面は、ジスルフィド連結されたヘテロ二量体型サイトカインを生産するための、本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドの使用である。

30

【0166】

同様に、本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドを使用することにより、強制ジスルフィド連結によってジスルフィド連結されたヘテロ二量体型サイトカインを提供することも可能である。

【0167】

組換え法

本明細書において報告する一局面は、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産するための方法であって、

(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、

40

(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

を含み、それによって、n量体として生物学的に活性であり、かつFc領域が融合されていない状態で発現されると不定形の凝集体/多量体を形成するポリペプチドを生産する、前記方法である。

【0168】

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,

50

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されている。

【0169】

本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書において報告する二量体型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または二量体型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）およびミックスモ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（Vijayalaxmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102）。

10

【0170】

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/ポリアダ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、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。

20

【0171】

「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ー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ー、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。

30

【0172】

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または本明細書に記載する二量体型融合ポリペプチド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のベクターと、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のベクターとを含む（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

40

50

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、融合ポリペプチドまたは二量体型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または二量体型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または二量体型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または二量体型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。

【0173】

本明細書において報告する融合ポリペプチドまたは本明細書に記載する二量体型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または二量体型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。

10

【0174】

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必要ない場合は、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、融合ポリペプチドまたは二量体型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。

20

【0175】

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」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）。

30

【0176】

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（無脊椎動物および脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例には、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。

【0177】

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）。

40

【0178】

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（HE

50

LA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、バッフアローラット肝臓細胞(BRL3A)、ヒト肺細胞(W138)、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などの骨髓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, NJ (2004), pp. 255-268を参照されたい。

【0179】

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、本明細書において提供する融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドのいずれかは、生物学的試料中のサイトカインまたはサイトカイン受容体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。

【0180】

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または本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドが提供される。さらなる局面では、生物学的試料中のサイトカインまたはサイトカイン受容体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または本明細書において報告する二量体型融合ポリペプチドと、サイトカインまたはサイトカイン受容体への融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドの結合を許容する条件下で接触させ、融合ポリペプチドまたは二量体型融合ポリペプチドとサイトカインまたはサイトカイン受容体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。

【0181】

特定の態様では、標識化された融合ポリペプチドまたは標識化された二量体型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)、ピオチン/アビジン、スピンラベル、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。

【0182】

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または本明細書において報告する二量体型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の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

10

20

30

40

50

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rh uPH20（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、US 2005/0260186ならびにUS 2006/0104968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。

10

20

【0183】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、US 6,267,958に記載されている。水性抗体製剤には、US 6,171,586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。

【0184】

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。

【0185】

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。

30

【0186】

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。

40

【0187】

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。

【0188】

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または本明細書に報告する二量体型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。

【0189】

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または二量体型融合ポリペプチドが提供される。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

50

または二量体型融合ポリペプチドが提供される。そのような態様の一つにおいて、本方法は、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さらに含む。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。

【0190】

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または二量体型融合ポリペプチドの使用を提供する。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。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。

【0191】

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。

10

【0192】

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投与することができる。

【0193】

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。

20

【0194】

本発明の融合ポリペプチドまたは本発明の二量体型融合ポリペプチド（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、ポーラス投与、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。

30

【0195】

本発明の融合ポリペプチドまたは本発明の二量体型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。融合ポリペプチドまたは二量体型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または二量体型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。

40

【0196】

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または本発明の二量体型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、融合ポリペプチドまたは二

50

量体型融合ポリペプチドのタイプ、疾患の重症度および経過、融合ポリペプチドまたは二量体型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または二量体型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。融合ポリペプチドまたは二量体型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または二量体型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またはそれより多くまで及ぶ。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まで維持されるであろう。融合ポリペプチドまたは二量体型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または二量体型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。

【0197】

上記の製剤または治療方法はいずれも、融合ポリペプチドもしくは二量体型融合ポリペプチドの代わりに、または融合ポリペプチドもしくは二量体型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。

【0198】

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、および容器上の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または本発明の二量体型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または本発明の二量体型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(BWFI)、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。

【0199】

上記の製造品はいずれも、融合ポリペプチドもしくは二量体型融合ポリペプチドの代わりに、または融合ポリペプチドもしくは二量体型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。

【0200】

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

10

20

30

40

50

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】

【0201】

実施例1

Fc受容体含有融合ポリペプチド発現用の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
(MGWSCILFLVATATGVHS; 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 RIIIaV158-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築した。

【0202】

HEK293細胞におけるFc RIIIaV158-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 RIIIaV158-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-lacタマーゼ遺伝子を含んだ。詳しく述べると、Fc RIIIaV158-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ダニル化配列(BGHポリAシグナル配列)。

【0203】

成熟Fc RIIIaV158-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

```
GMRTEDLPKA VVFLEPQWYR VLEKDSVTLK CQGAYSPEDN STQWFHNESL
ISSQASSYFI DAATVDDSGE YRCQTNLSTL SDPVQLEVHI GWLLLQAPRW
VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK GRKYFHHNSD FYIPKATLKD
SGSYFCRGLV GSKNVSETV NITITQGLAV STISSFFPPG YQGLNDIFEA
QKIEWHELTV APPAPEDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK
```

(SEQ ID NO: 56)

である。

【0204】

同様に以下融合ポリペプチドを得ることができる。

- Fc RIIa-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 ANNDSGEYTCQT CQTGQTSLSLSD PVHLTVLSEW LVLQTPHLEF
 QEGETIMLRC HSWKDKPLVK VTFQNGKSQ KFSHLDPTFS IPQANHSHSG
 DYHCTGNIGY TLFSSKPVTI TVQVPSMGSS SPMGIGLNDI FEAQKIEWHE
 LVVAPPAPED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
 VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKC KVS NKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

(SEQ ID NO: 57)

10

- Fc R11b-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 QKIEWHELTV APPAPEDKTH
 TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP
 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

20

(SEQ ID NO: 58)

- Fc R111b-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 DAATVNDSTGE YRCQTNLSTL SDPVQLEVHI GWLLLQAPRW
 VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK DRKYFHHNSD FHIPKATLKD
 SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFSPPG YQGLNDIFEA
 QKIEWHELTV 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: 59)

- 最小Fc R111a-Avi-Fc LALA P239G融合ポリペプチド (プロテアーゼ切断部位なし) :

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

40

(SEQ ID NO: 60)

【 0 2 0 5 】

(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

50

領域をコードする点で、当該ベクターとは異なる。

【0206】

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。

【0207】

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 -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：

- 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)。

【0208】

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

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日後に収集した。上清は精製まで低温で保存した。

【0209】

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

【0210】

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 で保存した。

【0211】

このプロトコールに従って4つの異なるFc R111a-Fc融合ポリペプチドを精製した：

- (a) Fc R111aV158-Avi-Fc LALA P239G(切断部位なし)
- (b) 最小Fc R111aV158-Avi-Fc LALA P239G(切断部位なし)
- (c) Fc R111aV158-Avi-PreScissionプロテアーゼ(PP)-Fc LALA P239G

10

20

30

40

50

(d) Fc R111aV158-Avi-IgAプロテアーゼ-Fc LALA P239G。

【0212】

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体含量を決定した。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、0-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、ナノエレクトロスプレー-QTOF質量分析によって検証した。

10

【0213】

実施例3

パパインによるFc受容体含有融合ポリペプチドの切断

酵素切断部位を含まないFc R111a-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℃で1時間加えることにより、Fc R111a-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。

【0214】

20

実施例4

IdeSプロテアーゼによるFc受容体含有融合ポリペプチドの切断

IdeSプロテアーゼによるFc R111aV158-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。

【0215】

実施例5

PreScissionプロテアーゼによるFc受容体含有融合ポリペプチドの切断

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)/100µg融合ポリペプチドを室温で終夜加えることにより、Fc R111a-(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。

30

【0216】

実施例6

IgAプロテアーゼによるFc受容体含有融合ポリペプチドの切断

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 R111a-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 R111a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 SuRe(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。

40

【0217】

(表1)さまざまなFc R111a 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	補捉後の収量	単量体含量 (SEC)	SEC後の収量	切断および さらなる 精製後の収量
	[kDa]	[mg/l 上清]	[%]	[mg/l 上清]	[mg/l 上清]
FcγRII Ia V158- HisAvi (20l)	25.4	3.5	70	1.4	-
FcγRII Ia V158-Avi- Fc LALA P329G (0.5l)	39	14	70	3 (活性なし)	
FcγRII Ia V158-Avi- Fc LALA P329G (0.5l)	49	80	95	78	21 (Aviタグなし)
FcγRII Ia V158-Avi- PP-Fc LALA P329G (0.5l)	50	24	50	未決定	未決定
FcγRII Ia V158-Avi- IgAP-Fc LALA P329G (9.2l)	50	46	90	36	16 (Aviタグあり)

【0218】

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。

【0219】

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。

【0220】

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。

【0221】

実施例8

10

20

30

40

50

Fc受容体含有融合ポリペプチドの発現によって得られるFc受容体を用いる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

サンプル量： 50 µg以上。

【0222】

フコシル化抗体と非フコシル化抗体の分離

Fc RIIIa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。

【0223】

図4に、Fc-Fc RIIIa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。

【0224】

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:下側の曲線：Fc RIIIaV158；上側の曲線：Fc RIIIaV158-Fc）。

【0225】

実施例9

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

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。

【0226】

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。

【0227】

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。

【0228】

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

10

20

30

40

50

RUのFc R111aV158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。

【0229】

実施例10

切断前後のFc R111aV158-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 R111aV158-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。

【0230】

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。

【0231】

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。

【0232】

捕捉されたFc R111aV158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）。

【0233】

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。

【0234】

実施例11

Fc-TWEAK融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

(a) Fc-TWEAK融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

(i) 切断型（最後の天然リジンアミノ酸残基が除去されている）であるヒトFc 1重鎖定常領域（ヒンジ-CH2-CH3; 例示的配列についてはSEQ ID NO:03~17を参照されたい）、(ii) Gly₃SerリピートおよびGly₄Serリピートからなるグリシン-セリンリンカー（重鎖のC末端-LSPG--GGSGGGGS--TWEAK）、(iii) PreScission（商標）プロテアーゼ切断部位（GLEVLFGQP; SEQ ID NO:61）、ならびに(iv) ヒトTWEAK野生型タンパク質のアミノ酸残基106~249であるTWEAKポリペプチド（すなわち、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび切断部位が除かれている）をコードする化学的に合成されたDNAフラグメントを融合することにより、Fc-TWEAK融合遺伝子を構築した。

【0235】

HEK293細胞におけるFc-TWEAK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-TWEAK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-TWEAK融合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、

10

20

30

40

50

- ヒトFc 1重鎖定常領域（ヒンジ-CH2-CH3）、
- 野生型TWEAKタンパク質のアミノ酸位置106～249であるTWEAKポリペプチド、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）。

【0236】

成熟Fc-TWEAK融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:62：

```
DKTHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTOKS LSLSPGGGGS GGGGSGLEVL FOGPAIAAHY
EVHPRPGQDG AQAGVDGTVS GWEEARINSS SPLRYNRQIG EFIVTRAGLY
YLYCQVHFDE GKAVYLKLDL LVDGVLALRC LEEFSATAAS SLGPQLRLCQ
VSGLLALRPG SSLRIRTLPW AHLKAAPFLT YFGLFQVH
```

10

に示す。

【0237】

(b) 二量体型Fc-TWEAK（ホール）/Fc（ノブ）融合ポリペプチドのための「ノブ・イントゥ・ホール」発現プラスミドの生成

HEK293細胞におけるFc（ホール）ポリペプチドの一過性発現のため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。これは、ヒト 1重鎖定常領域内のホール変異T366S、L368A、Y407V、Y349Cと、Fcエフェクター機能低減変異L234AおよびL235Aとにより、Fc領域をコードするDNA配列が変化したものである。

20

【0238】

成熟Fc（ホール）ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:63：

```
DKTHTCPCPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

に示す。

【0239】

HEK293細胞におけるFc-TWEAK（ノブ）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（ノブ）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-TWEAK（ノブ）融合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重鎖定常領域内のノブ変異T366WおよびS354CとFcエフェクター機能低減変異L234AおよびL235Aとを有するヒトFc 1重鎖定常領域（ヒンジ-CH2-CH3）、
- Gly₃Ser-Gly₄Serタイプのリンカー配列およびPreScission（商標）プロテアーゼ切断部位（GLEVLFGQP、SEQ ID NO:61）、
- 野生型TWEAKタンパク質のアミノ酸位置106～249であるTWEAKポリペプチド、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）。

40

【0240】

成熟Fc-TWEAK（ノブ）融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:64：

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGS GGGGSGLEVL FQGPAIAAHY
 EVHPRPGQDG AQAGVDGTVS GWEEARINSS SPLRYNRQIG EFIVTRAGLY
 YLYCQVHFDE GKAVYLKLDL LVDGVLALRC LEEFSATAAS SLGSQLRLCQ
 VSGLLALRPG SSLRIRTLPW AHLKAAPFLT YFGLFQVH

に示す。

【0241】

10

実施例12

Fc-IL17A融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

(a) Fc-IL17A融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

(i) 切断型(最後の天然リジンアミノ酸残基が除去されている)であるヒトFc 1重鎖定常領域(ヒンジ-CH2-CH3;例示的配列についてはSEQ ID NO:03~17を参照されたい)、
 (iia) 2つのGly₄Serリピートおよび2つのGly₃Serリピートからなるグリシン-セリンリンカー

(重鎖のC末端-LSP- GGGGSGGGGSGGGGSGGGS-IL17A)

または(iib) 2つのGly₄Serリピートからなるグリシン-セリンリンカーおよびIgAプロテアーゼ切断部位

20

(重鎖のC末端-LSP-GGGGSGGGGSGSVVAPPA-IL17A)

ならびに(iii) カニクイザルIL17A野生型タンパク質のアミノ酸残基24~155であるIL17Aポリペプチド(すなわち開始メチオンと相同シグナルペプチドが除かれている)をコードする化学的に合成されたDNAフラグメントを融合することによって、Fc-IL17A融合遺伝子を構築した。

【0242】

HEK293細胞におけるFc-IL17A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-IL17A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-IL17A融合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Fc 1重鎖定常領域(ヒンジ-CH2-CH3)、
- 2つのGly₄Serリピートおよび2つのGly₃Serリピートからなるグリシン-セリンリンカー、または2つのGly₄Serリピートからなるグリシン-セリンリンカーおよびIgAプロテアーゼ切断部位、
- 野生型IL17Aタンパク質のアミノ酸位置24~155であるIL17Aポリペプチド、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)。

40

【0243】

成熟Fc-IL17A融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:65:

DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGSGGGGS GGGSGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSSDYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRPRHC

50

またはSEQ ID NO:66 :

DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGSVV APPAGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC

に示す。

【0244】

10

(b) 二量体型Fc-IL17A(ノブ)/Fc-IL17A(ホール)融合ポリペプチド用の「ノブ・イン
 トゥ・ホール」発現プラスミドの生成

HEK293細胞におけるIL17A-Fc(ホール)融合ポリペプチドの一過性発現のための発現プ
 ラスミドを、上記(a)項で述べた発現ベクターから得た。これは、ヒト 1重鎖定常領域
 内のホール変異T366S、L368A、Y407V、Y349CとFcエフェクター機能低減変異L234AおよびL
 235Aとにより、Fc領域をコードするDNA配列が変化したものである。

【0245】

成熟IL17A-Fc(ホール)融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:67 :

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGSVV APPAGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC
 PNSFRLEKIL VSVGCTCVTP IVHHVA

20

に示す。

【0246】

HEK293細胞におけるFc-IL17A(ノブ)融合ポリペプチドの一過性発現のための発現プ
 ラスミドを、上記(a)項で述べた発現ベクターから得た。これは、ヒト 1重鎖定常領域内
 のノブ変異T366WおよびS354CとFcエフェクター機能低減変異L234AおよびL235Aとにより、
 Fc領域をコードするDNA配列が変化したものである。

30

【0247】

成熟Fc-IL17A(ノブ)融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:68 :

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGGGS GGGSGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC
 PNSFRLEKIL VSVGCTCVTP IVHHVA

40

に示す。

【0248】

実施例13

Fc融合ポリペプチドの一過性発現

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Fc融合ポリペプチドを生成させた。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
 フェクションに等モルのプラスミド比を使って、2つの異なるプラスミドから、ノブ・イ

50

ントウ・ホールFc融合ポリペプチドを発現させた。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。Fc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日後に収集した。上清を精製まで低温で保存した。

【0249】

例えばHEK293細胞などにおける、ヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は、Meissner, P., et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203に掲載されている。

【0250】

実施例14

三量体型TWEAK-Fc融合ポリペプチドの精製、プロセッシングおよび解析評価

Fc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。上清を50% v/v 2M グリシン、pH8.6、600mM NaClと混合し、1M グリシン、pH8.6、600mM NaClで平衡化したHiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって捕捉した。平衡化緩衝液による洗浄で、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0.1M クエン酸緩衝液、pH3.0で回収して、溶出直後に1M トリス塩基、pH8.5で、pH6.0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、2×PBS (2mM KH₂PO₄、20mM Na₂HPO₄、274mM NaCl、5.4mM KCl)、pH7.4中で行った。溶出したFc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 で保存した。

【0251】

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、Fc融合ポリペプチドのタンパク質濃度を決定した。Fc融合ポリペプチドの純度は、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。SEC-MALLS検出器 (Wyatt) に接続した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、Fc融合ポリペプチドの凝集体含量および適正な三量体形成を決定した。還元したFc融合ポリペプチドのアミノ酸主鎖の完全性は、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。

【0252】

Fc融合のない三量体型TWEAKを得るために、三量体型Fc融合ポリペプチドをPreScission (登録商標) プロテアーゼと共に終夜インキュベートした後、切断されていないFc融合ポリペプチドならびに遊離のFc部分を除去するために、MabSelectSuRe (GE Healthcare) カラムを使ったアフィニティクロマトグラフィーを、フロースルーモードで行なった。PreScission (登録商標) プロテアーゼを除去するために、フロースルー画分を、グルタチオンSepharose 4B (GE Healthcare) を使ったフロースルーモードのアフィニティクロマトグラフィーで、さらに精製した。三量体型TWEAKを含有するフロースルー画分を、Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。サイズ排除クロマトグラフィーは、2×PBS (2mM KH₂PO₄、20mM Na₂HPO₄、274mM NaCl、5.4mM KCl)、pH7.4中で行なった。溶出した三量体型TWEAK含有画分を、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 で保存した。

【0253】

タンパク質濃度、純度、凝集体含量、三量体形成およびアミノ酸主鎖の完全性の決定は、上述の方法で行なった。

【0254】

実施例15

二量体型Fc-IL17融合ポリペプチドの精製、プロセッシングおよび解析評価

Fc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 MabSelectSuRe (GE Healthcare) を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって、Fc融合ポリペプチドを捕捉した。平衡化緩衝液による洗浄で、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0.1M クエン酸緩衝液、pH2.8で回収して、溶出直後に1M トリス塩基、pH9.0で、pH6.0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、20mMヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl、pH6.0中で行なった。溶出したFc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 で保存した。

10

【0255】

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、Fc融合ポリペプチドのタンパク質濃度を決定した。Fc融合ポリペプチドの純度と適正な二量体形成を、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。Fc融合ポリペプチド調製物の凝集体含量は、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によって決定した。還元したFc融合ポリペプチドのアミノ酸主鎖の完全性は、ノイラミニダーゼ、0-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

【0256】

活性化のために、Fc融合ポリペプチドを1Mトリス、pH7.5に調合し、IgAプロテアーゼと共にインキュベートした。切断後に、Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーを使って、IgAプロテアーゼを除去した。サイズ排除クロマトグラフィーは、20mM ヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl、pH6.0中で行なった。溶出したFc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 で保存した。

【0257】

タンパク質濃度、純度、凝集体含量、切断効率およびアミノ酸主鎖の完全性の決定は、上述の方法で行なった。

30

【0258】

結果を以下の表および図11に示す。

【0259】

(表2)

	長いコネクター	短いコネクター	短いコネクター, 切断後
濃度	5.5 mg/ml	5.7 mg/ml	5.8 mg/ml
量	53.3 mg	68 mg (105.5 mg)	28.4 mg
単量体% (SEC)	>98	>98	>96%

40

【0260】

実施例16

IL18受容体含有融合ポリペプチドの発現のための発現プラスミドの生成

(a) IL18R-Fc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

(MGWSCILFLVATATGVHS: SEQ ID NO: 55)

、(ii) ヒトIL18R (開始メチオニンが除かれている)、および(iii) 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DNAフラグメントを融合することにより、IL18R-Fc融合ポリペプチドコード遺伝子を構築した。

50

【 0 2 6 1 】

HEK293細胞におけるIL18R-Fc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、IL18R-Fc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、IL18R-Fc融合ポリペプチドコード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、
- 可溶性ヒトIL18R-Fc、
- ヒトFc 1重鎖定常領域 (ヒンジ-CH2-CH3)、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 2 6 2 】

成熟IL18R-Fc融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:70：

```
SKSCIHRSQI HVVEGEPFYI KPCGISAPVH RNETATMRWF KGSASHEYRE
LNNRSSPRVT FHDHTLEFWP VEMEDEGTYYI SQVGNDRRNW TLNVTKRKNH
SCFSDKLVTS RDVEVNKSLH ITCKNPNYEE LIQDTWLYKN CKEISKTPRI
LKDAEFGDEG YYSVFSVHH NGTRYNITKT VNITVIEGRS KVTPAILGPK
CEKVGVELGK DVELNCSASL NKDDLFFYWSI RKEDSSDPNV QEDRKETTITW
ISEGKLHASK ILRFQKITEN YLNVLYNCTV ANEEAIDTKS FVLVRKEIPD
IPGHVFTGLE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGDSFFL
YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
```

20

に示す。

【 0 2 6 3 】

(c) 単量体型IL18R融合ポリペプチド用の「ノブ・イントゥ・ホール」発現プラスミドの生成

HEK293細胞におけるIL18R-Fc融合ポリペプチド(ノブ)の一過性発現のため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。これは、ヒト 1重鎖定常領域内のノブ変異T366WおよびS354Cにより、Fc領域をコードするDNA配列が変化したものである。

30

【 0 2 6 4 】

HEK293細胞におけるFc領域ポリペプチド(ホール)の一過性発現のため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。これは、ヒト 1重鎖定常領域内のホール変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cにより、Fc領域をコードするDNA配列が変化したものである。

【 0 2 6 5 】

HEK293におけるIL18R-Fc融合ポリペプチド(ノブ/ホール)の一過性発現のため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)コード遺伝子の転写単位は、以下の機能的要素を含む：

40

- 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

50

- 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)。

【0266】

実施例17

IL18R-Fc融合ポリペプチドの一過性発現、精製および解析評価

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に等モルのプラスミド比を使って、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日後に収集した。上清を精製まで低温で保存した。

10

【0267】

例えばHEK293細胞などにおける、ヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は、Meissner, P., et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203に掲載されている。

【0268】

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 MabSelectSuRe (GE Healthcare) を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって、融合ポリペプチドを捕捉した。平衡化緩衝液による洗浄で、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中で行なった。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 で保存した。

20

【0269】

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と適正な二量体形成を、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。融合ポリペプチド調製物の凝集体含量は、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は、ノイラミニダーゼ、0-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。

30

【0270】

各々のSPRセンサーグラムを図17に示す。この図は単量体と二量体の相違 (アビディティ効果) を示している。

【0271】

実施例18

Fc領域-Precisionプロテアーゼ切断部位-shTNF 融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

40

(a) Fc-shTNF 融合ポリペプチド用の発現プラスミドの生成

(i) 切断型 (最後の天然リジンアミノ酸残基が除去されている) であるヒトFc 1重鎖定常領域 (ヒンジ-CH₂-CH₃; 例示的配列についてはSEQ ID NO:03~17を参照されたい)、
(ii) Gly₃SerリピートおよびGly₄Serリピートからなるグリシン-セリンリンカー (重鎖のC末端-LSPG--GGGSGGGGS--TWEAK)

、(iii) PreScission (商標) プロテアーゼ切断部位 (GLEVLFGQP、SEQ ID NO:61) ならびに (iv) ヒトTNF 野生型タンパク質のshTNF ポリペプチド (細胞内ドメイン、膜貫通

50

ドメインおよび切断部位が除かれている)をコードする化学的に合成されたDNAフラグメントを融合することにより、Fc-PP-shTNF 融合遺伝子を構築した。

【0272】

HEK293細胞におけるFc-PP-shTNF 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-PP-shTNF 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-PP-shTNF 融合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、
- ヒトFc 1重鎖定常領域 (ヒンジ-CH2-CH3)、
- shTNF ポリペプチド、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

【0273】

成熟Fc-PP-shTNF 融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:71：

DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGS GGGGSGLEVL FQGPVRSR
TPSDKPVAVH VANPQAEQQL QWLNRRANAL LANGVELRDN QLVVPSEGLY
LIYSQVLFKG QGCPSTHVLL THTISRIVS YQTKVNLLSA IKSPCQRETP
EGAEAKPWYE PIYLGQVFQLEKGDRLSAEI NRPDYLDFAE SGQVYFGIIA
L

20

に示す。

【0274】

(b) 二量体型Fc (ホール) /Fc-PP-shTNF (ノブ) 融合ポリペプチド用の「ノブ・イントゥ・ホール」発現プラスミドの生成

30

HEK293細胞におけるFc領域ポリペプチド (ホール) の一過性発現のための発現プラスミドを、上述の発現ベクターから誘導した。これは、ヒト 1重鎖定常領域内のホール変異T366S、L368A、Y407V、Y349CとFcエフェクター機能低減変異L234AおよびL235Aとにより、Fc領域をコードするDNA配列が変化したものである。

【0275】

成熟Fc領域 (ホール) ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:69：

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

40

に示す。

【0276】

HEK293におけるFc-PP-shTNF (ノブ) 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 (ノブ) 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-PP-shTNF (ノブ) 融合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)、

50

- 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重鎖定常領域内にノブ変異T366WおよびS354CとFcエフェクター機能低減変異L234AおよびL235Aとを有するヒトFc 1重鎖定常領域 (ヒンジ-CH2-CH3)、
- Gly₃Ser-Gly₄Serタイプのリンカー配列とPreScission (商標) プロテアーゼ切断部位 (GLEVLFGQP)、
- PP-shTNF ポリペプチド、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 2 7 7 】

成熟Fc-PP-shTNF (ノブ) 融合ポリペプチドのアミノ酸配列をSEQ ID NO:72 :

10

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGS GGGGSGLEVL FQGPVRS SSR
 TPSDKPVAHV VANPQAEQQL QWLNRRANAL LANGVELRDN QLVVPSEGLY
 LIYSQVLFKG QGCPSTHVLL THTISRIVS YQTKVNLLSA IKSPCQRETP
 EGAEAKPWYE PIYLGGVFQL EKGDRLSAEI NRPDYLDFAE SGQVYFGIIA
 L

に示す。

【 0 2 7 8 】

20

実施例19

三量体型Fc-PP-shTNF 融合ポリペプチドの精製、プロセッシングおよび解析評価

Fc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。上清を50% v/v 2M グリシン、pH8.6、600mM NaClと混合し、1M グリシン、pH8.6、600mM NaClで平衡化したHiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって捕捉した。平衡化緩衝液による洗浄で、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0.1M クエン酸緩衝液、pH3.0で回収して、溶出直後に1M トリス塩基、pH8.5で、pH6.0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2×PBS (2mM KH₂PO₄、20mM Na₂HPO₄、274mM NaCl、5.4mM KCl)、pH7.4 30
 中で行った。溶出したFc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 で保存した。

【 0 2 7 9 】

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、Fc融合ポリペプチドのタンパク質濃度を決定した。Fc融合ポリペプチドの純度は、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。SEC-MALLS検出器 (Wyatt) に接続した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、Fc融合ポリペプチドの凝集体含量および適正な三量体形成を 40
 決定した。還元したFc融合ポリペプチドのアミノ酸主鎖の完全性は、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。

【 0 2 8 0 】

Fc融合のない三量体型PP-shTNF を得るために、三量体型Fc融合ポリペプチドをPreScission (登録商標) プロテアーゼと共に終夜インキュベートした後、切断されていないFc融合ポリペプチドならびに遊離のFc部分を除去するために、MabSelectSuRe (GE Healthcare) カラムを使ったアフィニティクロマトグラフィーを、フロースルーモードで行なった。PreScission (登録商標) プロテアーゼを除去するために、フロースルー画分を、グル 50

タチオンSepharose 4B (GE Healthcare) を使ったフロースルーモードのアフィニティークロマトグラフィーで、さらに精製した。三量体型shTNF を含有するフロースルー画分を、Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。サイズ排除クロマトグラフィーは、2 × PBS (2mM KH₂PO₄、20mM Na₂HPO₄、274mM NaCl、5.4mM KCl)、pH7.4中で行なった。溶出した三量体型shTNF 含有画分を、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 で保存した。

【0281】

タンパク質濃度、純度、凝集体含量、三量体形成およびアミノ酸主鎖の完全性の決定は、上述の方法で行なった。

10

【0282】

TNF は、IgG1-LALA-Fc-KiH_PreScissionプロテアーゼ部位_shTNFa融合ポリペプチドとして、HEK293細胞における一過性発現により、283mg/lの量で得られた。PreScissionプロテアーゼによる切断は、融合ポリペプチド100mgあたり15mgをもたらした (283mgからの合計 = 43mg)。A375アッセイにおける機能評価 (実施例20参照)。

【0283】

実施例20

ヒトTNF の滴定

A-375細胞を、96穴F細胞培養プレート (Costar 3596) の1ウェルあたり200 μlに、1ウェルあたり2 × 10⁴細胞ずつ播種した。細胞を37、5%CO₂で終夜培養してから、培地を除去した。

20

【0284】

以下のサイトカインを、1ウェルあたり100 μl (50 ~ 0nM) で滴定した：

- rhTNF-a (R&D Systems 210-TA/CF)、
- 本明細書において報告するhTNF -Fc融合ポリペプチド、および
- 切断されたhTNF -Fc融合ポリペプチド。

【0285】

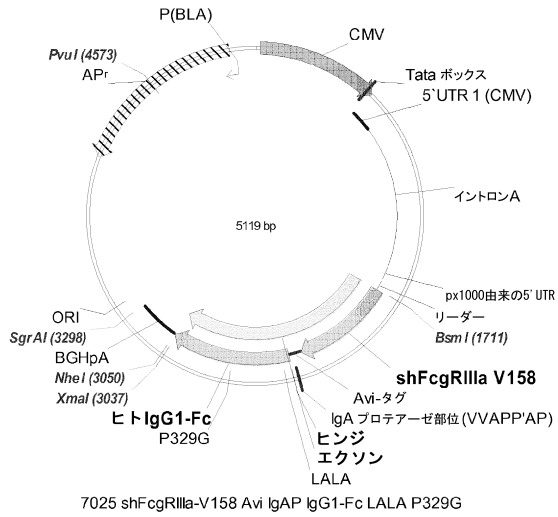
細胞を37、5%CO₂で24時間インキュベートした。上清を96穴RBプレートに移し、-20で保存した。hIL-8 (BD 558277) CBA Flexセットを使ってサイトカインプロファイル进行分析した。

30

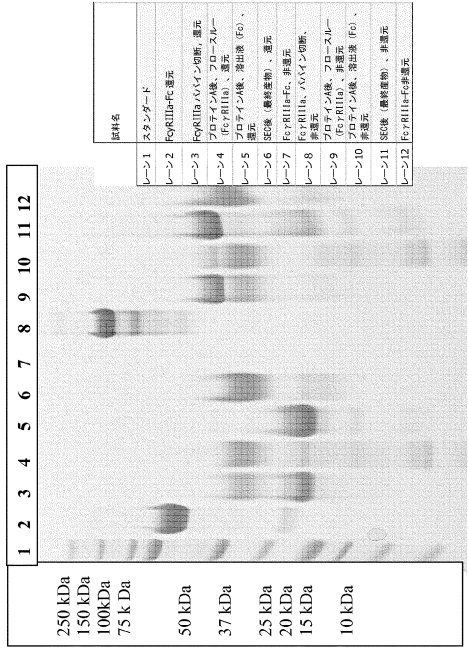
試料	EC50 [nM]
hTNF-a R&D	0.005
hTNF-a-hFc	0.078
切断後のhTNF-a	0.009

滴定曲線を図10に示す。

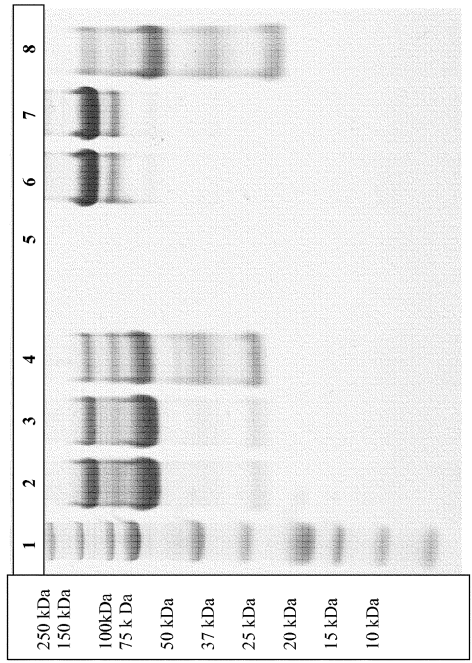
【 図 1 】



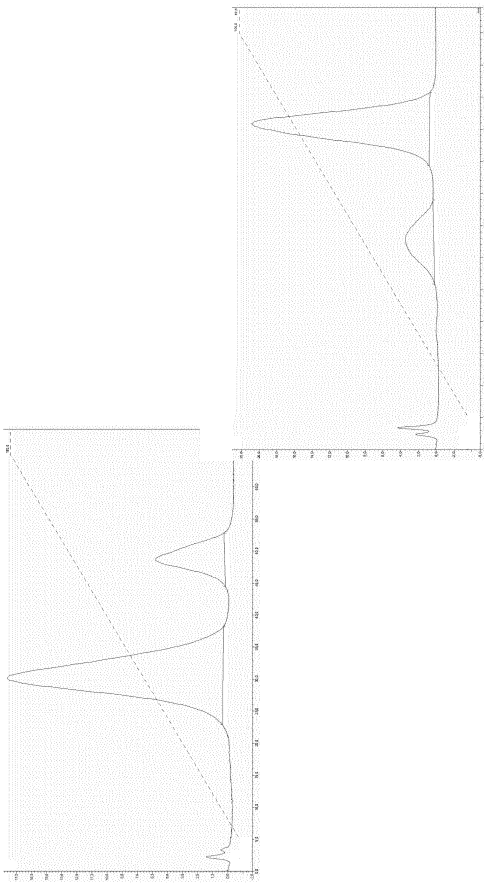
【 図 2 】



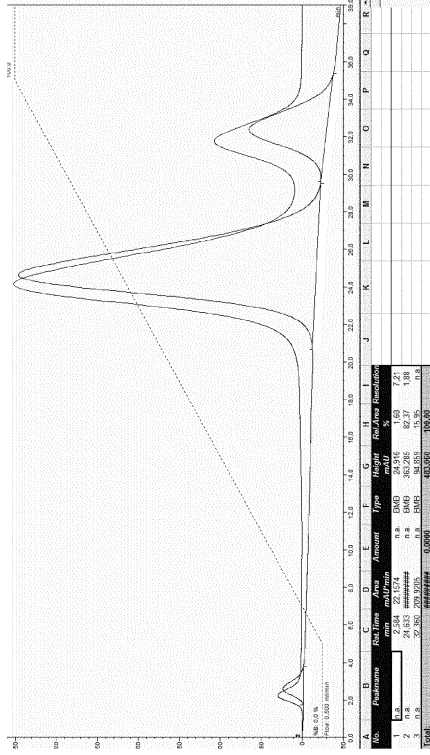
【 図 3 】



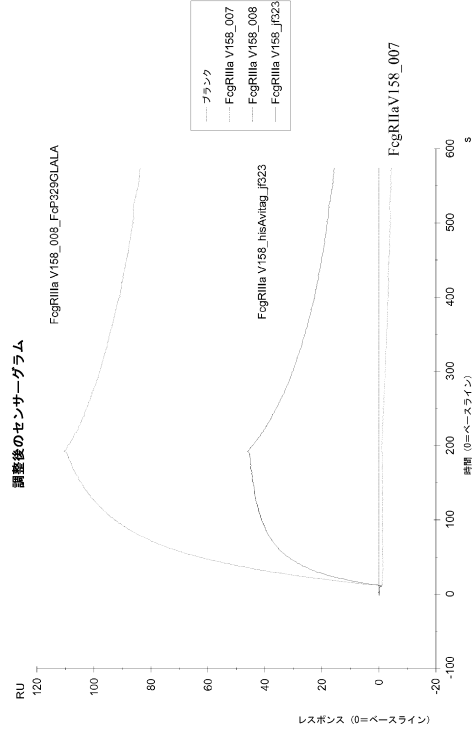
【 図 4 】



【 図 5 】

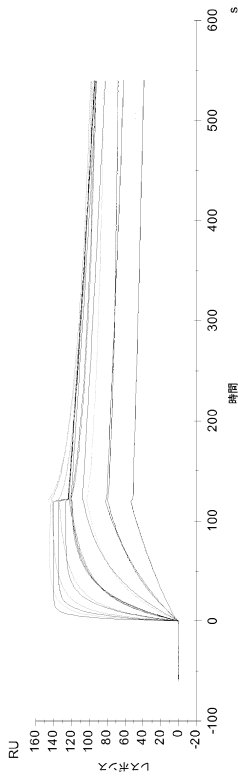


【 図 6 】



【 図 7 a 】

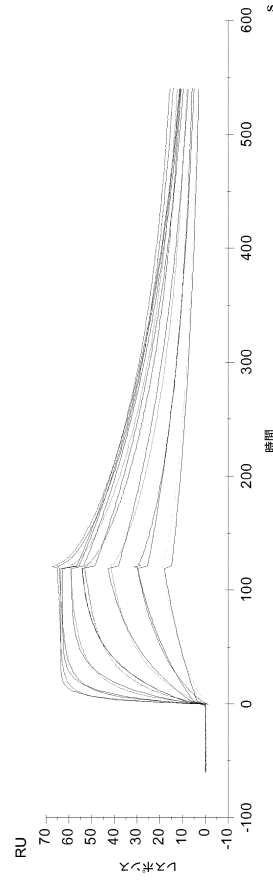
FcgRIIIa V158_008



k_a (1/Ms) k_d (1/s) KD (M)
 5.961E+5 6.535E-4 1.096E-9

【 図 7 b 】

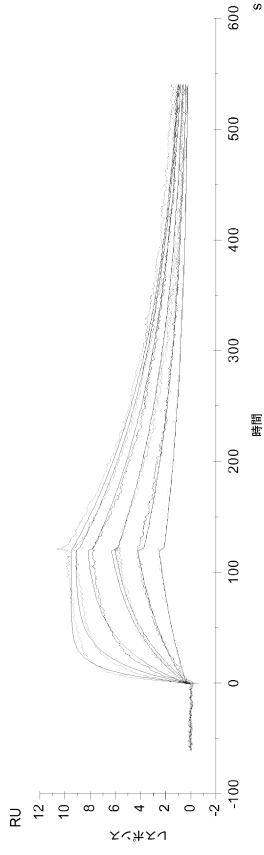
FcgRIIIa V158_jf323



k_a (1/Ms) k_d (1/s) KD (M)
 4.090E+5 0.003832 9.369E-9

【 図 7 c 】

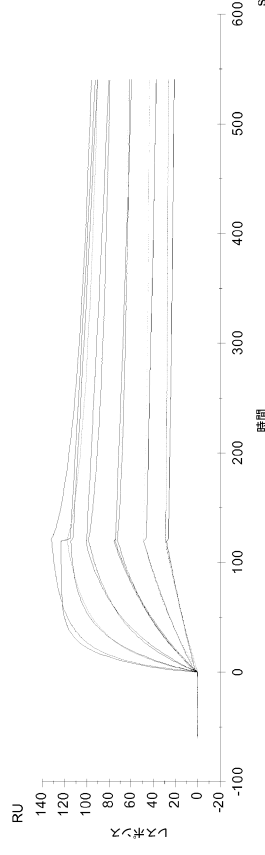
FcgRIIIa V158_008 消化後



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

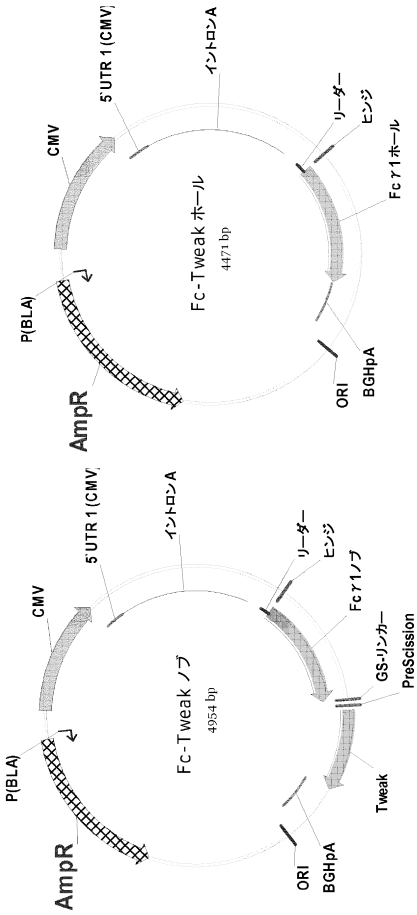
【 図 7 d 】

FcgRIIIa V158_008 未消化

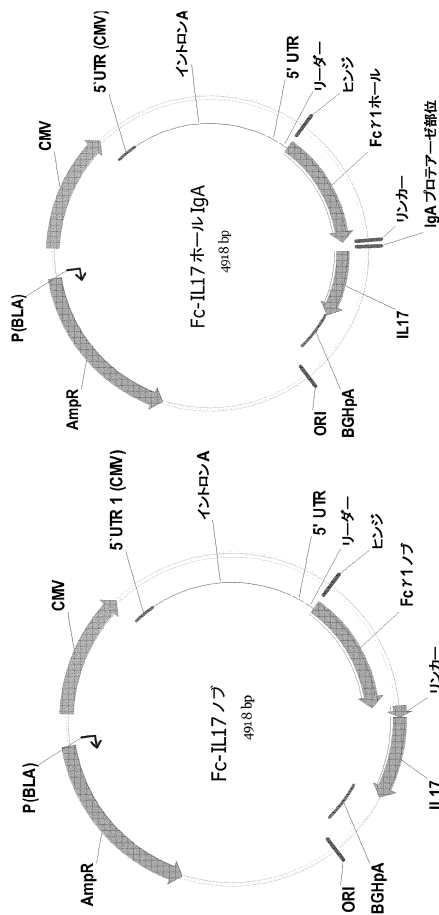


ka (1/Ms) 2.846E+5 kd (1/s) 5.276E-4 KD (M) 1.854E-9

【 図 8 】

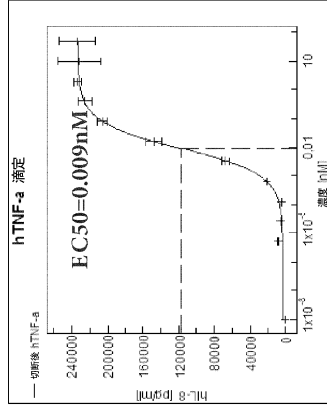


【 図 9 】

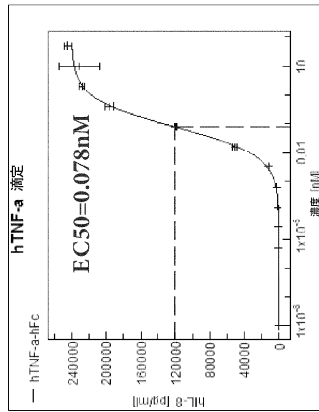


【 図 1 0 】

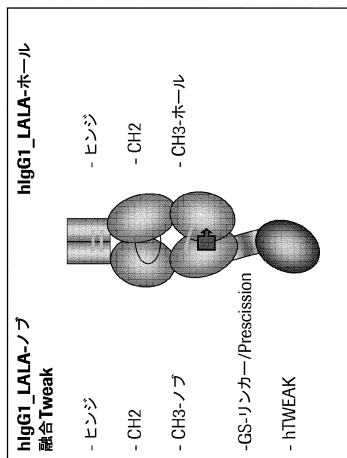
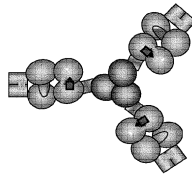
TNF α (切断後)



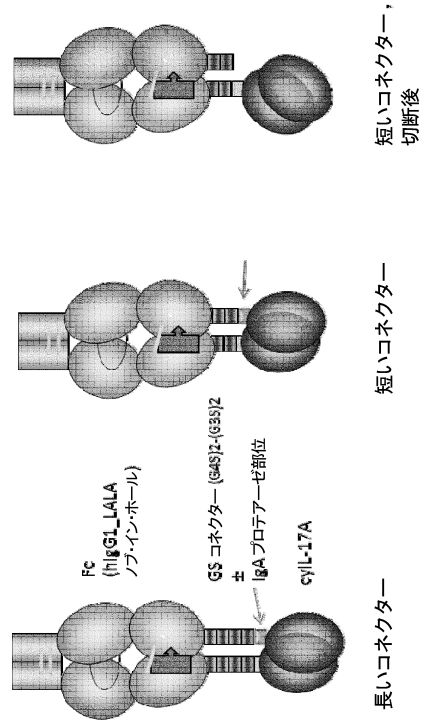
TNF α :Fc



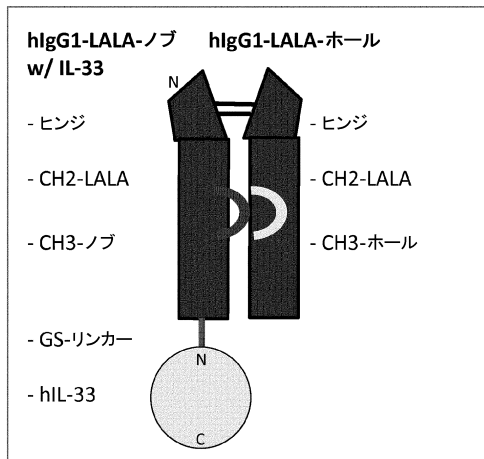
【 図 1 2 】



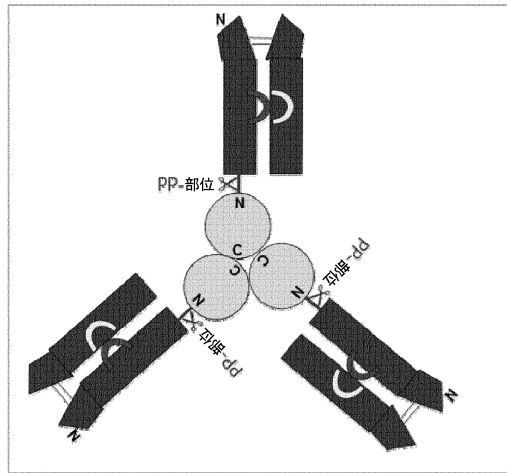
【 図 1 1 】



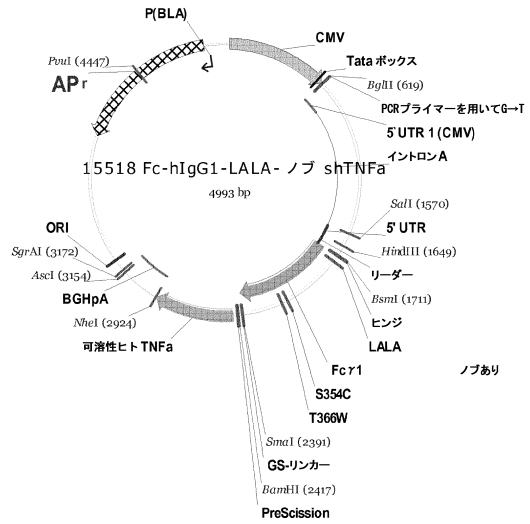
【 図 1 3 】



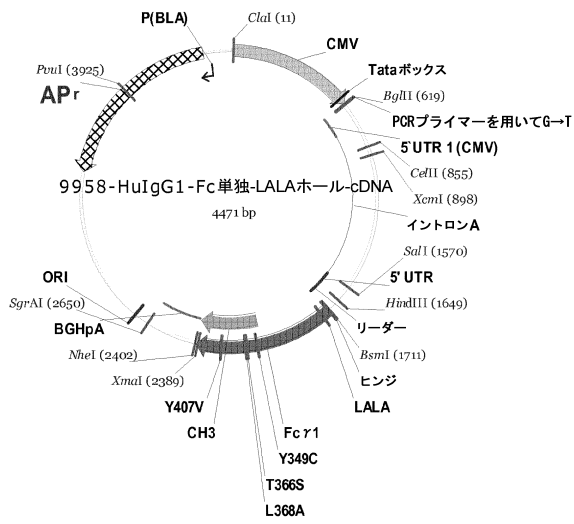
【 図 1 4 】



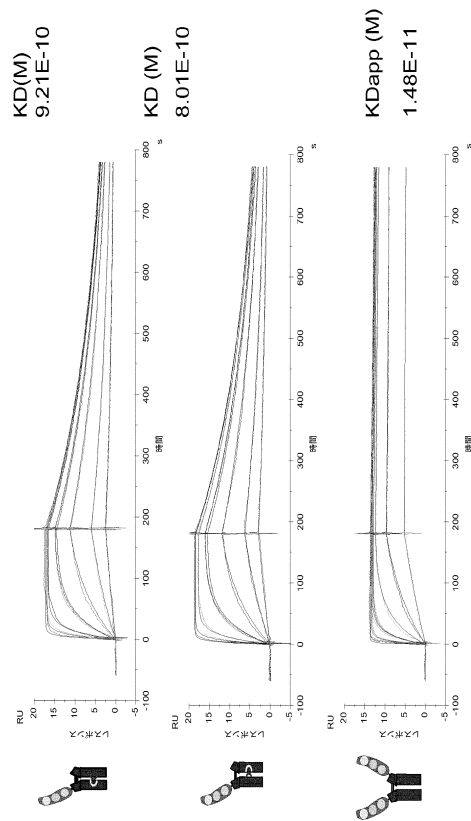
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【配列表】

0006388581000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/525 (2006.01)	C 0 7 K	14/525
C 0 7 K	17/00 (2006.01)	C 0 7 K	17/00
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00
C 0 7 K	14/715 (2006.01)	C 0 7 K	14/715
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/531 A
B 0 1 J	20/281 (2006.01)	B 0 1 J	20/281 R
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 G
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68

(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 アウアー ヨハネス

ドイツ連邦共和国 シュヴァイゲン アンガーシュトラッセ 7

(72)発明者 バーダー マーチン

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク シュペルバーヴェーク 17

(72)発明者 デングル シュテファン

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン シュライスハイマー シュトラッセ 44エー

(72)発明者 ロレンツ シュテファン

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク シュペーリングシュトラッセ 2

(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 金田 康平

(56)参考文献 特表2003-522200(JP, A)

特表2009-537145(JP, A)

特表2003-508023(JP, A)

国際公開第2012/130831(WO, A1)

RAにおけるTh17細胞とIL-17, *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology*, 2010年

8月10日, Vol.4, No.3, Pages 162-165

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P

C07K

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	生产单体和多模分子的方法及其用途		
公开(公告)号	JP6388581B2	公开(公告)日	2018-09-12
申请号	JP2015524776	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	アウアーヨハネス バーダーマーチン デングルシュテファン ロレンツシュテファン ゼーバーシュテファン		
发明人	アウアー ヨハネス バーダー マーチン デングル シュテファン ロレンツ シュテファン ゼーバー シュテファン		
IPC分类号	C12P21/02 C07K19/00 C12N15/24 C12N15/28 C07K14/54 C07K14/525 C07K17/00 C07K16/00 C07K14/715 G01N33/531 B01J20/281 A61K38/16 A61P43/00 A61K39/00 A61K47/68		
CPC分类号	A61P43/00 C07K16/00 C07K16/32 C07K2317/52 C07K2317/71 C07K2319/30 A61K49/0004 C07K14 /54 C07K14/7155 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/79 C07K14/52 C07K14/525		
FI分类号	C12P21/02.ZNA.C C07K19/00 C12N15/24 C12N15/28 C07K14/54 C07K14/525 C07K17/00 C07K16/00 C07K14/715 G01N33/531.A B01J20/281.R A61K38/16 A61P43/00 A61K39/00.G A61K47/68		
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		
审查员(译)	金田幸平		
优先权	2012179021 2012-08-02 EP		
其他公开文献	JP2015531591A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(Bn-CSo-Is-CSp-FC-CSq-lt-CSr-Bm) u , 其中B是选自自由以下组成的组中的成员 : 是生物活性如正聚体 , 和Fc区域表示形成聚集体/多聚体具有不规则在不融合 , FC重链Fc区的多肽的状态表达的多肽其中CS代表切割位点 , l代表插入的氨基酸序列 , FC基本上不与Fc受体结合 , 即编码融合多肽的核酸。回收多肽 , 任选地用蛋白酶切割融合多肽 , 由此将其表达为具有生物活性的n-mer并且在不存在Fc区的情况下融合和通过一种方法形成无定形聚集体/多聚体的多肽报道宰相。

(45) 発行日 平成30年9月12日 (2018. 9. 12)

(24) 登録日 平成30年8月24日 (2018. 8. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	Z N A C
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	C 1 2 N	15/24	
C 1 2 N	15/28	(2006.01)	C 1 2 N	15/28	
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	

請求項の数 19 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-524776 (P2015-524776)

(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2015-531591 (P2015-531591A)

F. HOFFMANN-LA ROCH

(43) 公表日 平成27年11月5日 (2015. 11. 5)

E AKTIENGESELLSCHAFT

(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/066096

T

(87) 国際公開番号 W02014/020069

スイス・シーエイチ・4070バーゼル・

(87) 国際公開日 平成26年2月6日 (2014. 2. 6)

グレンツァーヘルストラッセ124

(86) 審査請求日 平成28年7月12日 (2016. 7. 12)

(74) 代理人 100102978

(31) 優先権主張番号 12179021.6

弁理士 清水 初志

(32) 優先日 平成24年8月2日 (2012. 8. 2)

(74) 代理人 100102118

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

弁理士 香名 雅夫

(74) 代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74) 代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単量体および多量体分子を生産するための方法およびその使用