

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-522578
(P2018-522578A)

(43) 公表日 平成30年8月16日(2018.8.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B O 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-511346 (P2018-511346)
 (86) (22) 出願日 平成28年5月12日 (2016.5.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月12日 (2018.1.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/032168
 (87) 国際公開番号 W02016/183352
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016.11.17)
 (31) 優先権主張番号 62/160, 423
 (32) 優先日 平成27年5月12日 (2015.5.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/217, 490
 (32) 優先日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517396386
 シンティミューン, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 1001
 O, ニューヨーク, パーク アベニュー サ
 ウス 257, フィフティーンス フロア
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝
 (74) 代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化型親和性成熟抗 F c R n 抗体

(57) 【要約】

本明細書では、F c R n に結合すること及び、F c R n の I g G F c への結合を遮断することに有用な、組換え型抗体及びその抗原結合部分が提供される。F c R n 結合タンパク質は、自己免疫性障害を含めた様々な障害の治療に使用することができる。

【選択図】 図 1

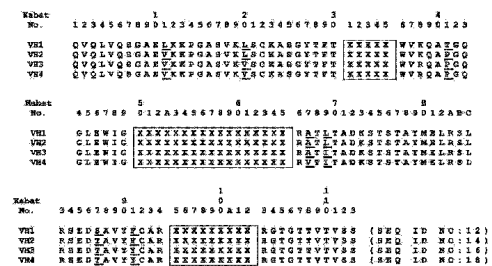


Fig. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

重鎖可変領域を含む F c R n に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖可変領域が C D R 1、C D R 2 及び、C D R 3 を含み、

C D R 1 の配列が配列番号 2 であり、

C D R 2 の配列が配列番号 4 であり、

C D R 3 の配列が配列番号 7 8 である、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

C D R 3 の配列が配列番号 7 6 である、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 3】

C D R 3 の配列が配列番号 7 4 である、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 4】

C D R 3 の配列が、配列番号 2 7、配列番号 2 9、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 9、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5、及び配列番号 5 7 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 5】

C D R 3 の配列が配列番号 4 9 または配列番号 5 5 である、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 6】

前記重鎖可変領域の K a b a t 1 0 3 位のアミノ酸がトリプトファンである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 7】

軽鎖可変領域を含む F c R n に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記軽鎖可変領域が、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含み、

C D R 1 の配列が配列番号 6 であり、

C D R 2 の配列が配列番号 8 であり、

C D R 3 の配列が、配列番号 5 9、配列番号 6 2、配列番号 6 5、及び配列番号 6 8 からなる群から選択される、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む F c R n に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域のそれぞれが、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み、

前記重鎖の C D R 1 の配列が配列番号 2 であり、

前記重鎖の C D R 2 の配列が配列番号 4 であり、

前記重鎖の C D R 3 の配列が、配列番号 2 7、配列番号 2 9、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 9、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 7 4、配列番号 7 6、及び配列番号 7 8 からなる群から選択され、

前記軽鎖の C D R 1 の配列が配列番号 6 であり、

前記軽鎖の C D R 2 の配列が配列番号 8 であり、

前記軽鎖の C D R 3 の配列が、配列番号 1 0、配列番号 5 9、配列番号 6 2、配列番号 6 5、及び配列番号 6 8 からなる群から選択される、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記重鎖の C D R 3 の配列が配列番号 4 9 または配列番号 5 5 であり、前記軽鎖の C D R 3 の配列が配列番号 1 0 である、請求項 8 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 10】

前記重鎖の C D R 3 の配列が配列番号 5 5 であり、前記軽鎖の C D R 3 の配列が配列番号 1 0 である、請求項 9 に記載の抗体または抗原結合断片。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記抗体または抗原結合断片が、キメラ型抗体もしくは抗原結合断片、またはヒト化型抗体もしくは抗原結合断片である、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 1 2】

前記抗体または抗原結合断片が、ヒト化型抗体または抗原結合断片である、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 1 3】

重鎖可変領域を含む F c R n に結合する抗体または抗原結合断片であって、前記重鎖可変領域の配列が、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 2、配列番号 5 4、配列番号 5 6、もしくは配列番号 5 8 である、または前記重鎖可変領域の配列が、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 2、配列番号 5 4、配列番号 5 6、もしくは配列番号 5 8 の前記重鎖可変領域アミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % 同一である、前記抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 1 4】

軽鎖可変領域をさらに含み、前記軽鎖可変領域の配列が配列番号 2 0 または配列番号 2 2 である、請求項 1 3 に記載の抗体または抗原結合断片。

20

【請求項 1 5】

前記重鎖可変領域の配列が配列番号 5 0 または配列番号 5 6 である、請求項 1 3 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 1 6】

前記重鎖可変領域の配列が配列番号 5 6 であり、軽鎖可変領域をさらに含み、前記軽鎖可変領域の配列が配列番号 2 2 である、請求項 1 5 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 1 7】

軽鎖可変領域をさらに含み、前記軽鎖可変領域の配列が、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 である、または前記軽鎖可変領域の配列が、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % 同一である、請求項 1 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 1 8】

軽鎖可変領域をさらに含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 0 または配列番号 2 2 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、請求項 1 5 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 1 9】

軽鎖可変領域をさらに含み、前記重鎖可変領域が配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有し、前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 2 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、請求項 1 5 に記載の抗体または抗原結合断片。

40

【請求項 2 0】

F c R n に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域の配列が、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 である、または前記軽鎖可変領域の配列が、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % 同一である、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

前記軽鎖可変領域の配列が配列番号 6 7 である、請求項 2 0 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 2 2】

50

重鎖可変領域をさらに含み、前記重鎖可変領域が配列番号 1 2 のフレームワーク領域を含む、請求項 2 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 2 3】

重鎖可変領域をさらに含み、前記重鎖可変領域の配列が配列番号 1 2 である、請求項 2 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 2 4】

F c R n に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、もしくは配列番号 1 8 の前記重鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、または配列番号 1 8 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 2 5】

前記重鎖可変領域が、配列番号 1 2 の前記重鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 1 2 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、請求項 2 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 6】

F c R n に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、もしくは配列番号 2 6 の軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、または配列番号 2 6 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 2 7】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 2 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 2 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、請求項 2 6 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 8】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 2 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 2 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、請求項 2 7 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 2 9】

軽鎖可変領域をさらに含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、もしくは配列番号 2 6 の前記軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、または配列番号 2 6 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、請求項 2 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3 0】

アイソタイプの I g G 4 を有する、請求項 1 から 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 3 1】

前記重鎖中に S 2 4 1 P 修飾を含有する、請求項 3 0 に記載の抗体。

40

【請求項 3 2】

前記重鎖中に C 末端リジンが欠如している、請求項 3 0 に記載の抗体。

【請求項 3 3】

前記重鎖中に S 2 4 1 P 修飾を含有し、かつ前記重鎖中に C 末端リジンが欠如している、請求項 3 0 に記載の抗体。

【請求項 3 4】

s c F v、F v、F a b'、F a b、F (a b')₂、または二重特異性抗体である、請求項 1 から 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 3 5】

請求項 1 から 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に対し競合または交

50

差遮断する、抗体。

【請求項 36】

請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の FcRn 抗体または抗原結合断片をコードする、単離核酸。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の単離核酸を含む、核酸ベクター。

【請求項 38】

請求項 36 に記載の単離核酸を含む、原核宿主細胞または真核宿主細胞。

【請求項 39】

請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の FcRn 抗体または抗原結合断片と薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

10

【請求項 40】

FcRn と IgG Fc との間の相互作用を調節する方法であって、FcRn を、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 41】

細胞による抗体分解を促進する方法であって、FcRn を、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 42】

対象における抗体分解を促進する方法であって、前記対象に、有効量の、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 43】

前記分解される抗体が自己抗体である、請求項 41 または 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記分解される抗体が治療抗体である、請求項 41 または 42 に記載の方法。

【請求項 45】

対象における IgG 媒介疾患を緩和する方法であって、前記対象に、前記 IgG 媒介疾患の緩和に有効な量の、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片を投与することを含む、前記方法。

【請求項 46】

FcRn による免疫複合体の結合を阻害する、または FcRn - 免疫複合体相互作用を阻害することにより免疫複合体の循環を減少させる方法であって、FcRn を、有効量の、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

30

【請求項 47】

抗原提示細胞 (APC) による免疫複合体抗原の提示を阻害する方法であって、前記 APC を、前記抗原の提示の阻害に有効な量の、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 48】

抗原提示細胞 (APC) による免疫複合体抗原の交差提示を阻害する方法であって、前記 APC を、前記抗原の交差提示の阻害に有効な量の、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

40

【請求項 49】

抗原提示細胞 (APC) による炎症性サイトカインの分泌を阻害する方法であって、前記 APC を、前記炎症性サイトカインの分泌の阻害に有効な量の、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 50】

前記炎症性サイトカインが、インターロイキン - 6 (IL - 6)、インターフェロン - (IFN -)、インターロイキン - 12 (IL - 12)、または腫瘍壊死因子 - (TNF) である、請求項 49 に記載の方法。

50

【請求項 5 1】

抗原提示細胞による T 細胞活性化を阻害する方法であって、前記抗原提示細胞を、請求項 1 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 5 2】

自己免疫性疾患を治療する、阻害する、またはその重症度を低減することを、それを必要としている対象において行う方法であって、有効量の、請求項 1 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片を投与することを含む、前記方法。

【請求項 5 3】

前記自己免疫性疾患が、以下からなる群から選択される、請求項 5 2 に記載の方法：尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴天疱瘡、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、特発性血小板減少性紫斑 (ITP)、ヘパリン誘発性血小板減少症 (HIT)、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)、自己免疫性溶血性貧血 (AIHA)、重症筋無力症 (MG)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP)、多巣性運動ニューロパチー、視神経脊髄炎、自己免疫性血小板減少症、免疫性好中球減少症、抗血友病 FVIIII インヒビター、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、ANCA 関連疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、水胞性類天疱瘡、多発性硬化症 (MS)、ギラン・バレー症候群、慢性多発ニューロパチー、潰瘍性大腸炎、糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス眼症、自己免疫性蕁麻疹、血管炎及びラスマッセン脳炎。

10

【請求項 5 4】

酸性 pH 及び生理的 pH の両方で FcRn と結合する抗体を同定する方法であって、pH 5.8 ~ 6.4 で行われる 2 つ以上のスクリーニングステップを含む、前記方法。

20

【請求項 5 5】

請求項 5 4 に記載の方法であって、

(a) 候補抗体の集合を、pH 5.8 ~ 6.4 で FcRn またはその一部に接触させ、FcRn またはその一部に結合する前記抗体を単離することと、

(b) ステップ (a) の前記単離抗体を、pH 5.8 ~ 7.6 で FcRn またはその一部に接触させ、FcRn またはその一部に結合する前記抗体を単離することと、

(c) ステップ (b) の前記単離抗体を、pH 5.8 ~ 6.4 で FcRn またはその一部に接触させ、FcRn またはその一部に結合する前記抗体を単離することと、

30

を含む、前記方法。

【請求項 5 6】

胎盤を介した病原性抗体の伝播を遮断する方法であって、治療有効量の FcRn 抗体またはその抗原結合部分を、必要としている妊娠中の哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項 5 7】

対象からの IC のクリアランスを増加させる方法であって、FcRn 抗体またはその抗原結合部分を、それを必要としている対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 5 8】

前記対象が免疫複合体媒介血管炎を有する、請求項 5 7 に記載の方法。

40

【請求項 5 9】

試験抗体またはその抗原結合断片が、FcRn と免疫複合体との間の相互作用を遮断するかどうか、または減らすかどうかを決定する方法であって、

(a) 哺乳動物から全血を得ることと、

(b) 免疫複合体を、前記全血の第 1 の部分に添加することと、

(c) 前記免疫複合体の前記添加後に、前記全血中のサイトカインの量を測定して、第 1 の量の前記サイトカインを得ることと、

(d) 試験抗体またはその抗原結合断片を、前記全血の第 2 の部分に添加することと、

(e) 前記試験抗体またはその抗原結合断片の前記添加後にまたは前記添加と同時に、前記免疫複合体を、前記全血の前記第 2 の部分に添加することと、

50

(f) 前記免疫複合体の前記添加後に、前記全血の前記第2の部分中のサイトカインの量を測定して、第2の量の前記サイトカインを得ることと、を含む、前記方法。

【請求項60】

抗FcRn療法に対する患者の応答性の期待レベルを決定する方法であって、

(a) 前記抗FcRn療法の開始前に、前記患者から全血を得ることと、

(b) 免疫複合体を、前記全血の第1の部分に添加することと、

(c) 前記免疫複合体の前記添加後に、前記全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量の前記サイトカインを得ることと、

(d) FcRnと免疫複合体との間の相互作用を遮断するまたは減らすことが知られている抗体またはその抗原結合断片を、前記全血の第2の部分に添加することと、

(e) 前記抗体またはその抗原結合断片の前記添加後にまたは前記添加と同時に、前記免疫複合体を、前記全血の前記第2の部分に添加することと、

(f) 前記免疫複合体の前記添加後に、前記全血の前記第2の部分中のサイトカインの量を測定して、第2の量の前記サイトカインを得ることと、

(g) 前記第1の量の前記サイトカインと前記第2の量の前記サイトカインとの間の差を決定することと、を含む、前記方法。

10

【請求項61】

抗FcRn療法に対する患者の応答をモニターする方法であって、

(a) 抗FcRn療法の開始前に、前記患者から全血を得ることと、

(b) 免疫複合体を、前記全血に添加することと、

(c) 前記免疫複合体の前記添加後に、前記全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量の前記サイトカインを得ることと、

(d) 抗FcRn療法の開始後に、前記患者から全血を得ることと、

(e) 免疫複合体を、ステップ(d)の前記全血に添加することと、

(f) ステップ(e)の前記免疫複合体の前記添加後に、前記全血中のサイトカインの量を測定して、第2の量の前記サイトカインを得ることと、

(g) 前記第1の量の前記サイトカインと前記第2の量の前記サイトカインとの間の差を決定することと、を含む、前記方法。

20

30

【請求項62】

前記哺乳動物がヒトである、請求項59に記載の方法。

【請求項63】

前記患者がヒトである、請求項60または61に記載の方法。

【請求項64】

前記抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化型、キメラ型、または非天然存在の完全ヒト型である、請求項59に記載の方法。

【請求項65】

前記抗体またはその抗原結合断片が、IgG、Fab、F(ab')₂、二重特異性抗体、FV、scFV、遮断ペプチド、またはこれらの断片である、請求項59または60に記載の方法。

40

【請求項66】

前記抗体またはその抗原結合断片が、F(ab')₂である、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号56を有する重鎖可変領域及び配列番号22を有する軽鎖可変領域を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項68】

前記抗FcRn療法が、

50

(a) 配列番号 4 9 もしくは配列番号 5 5 の配列を有する重鎖 C D R 3 ;
 (b) 配列番号 5 0 もしくは配列番号 5 6 の重鎖可変領域アミノ酸配列 ;
 (c) 配列番号 5 0 の重鎖可変領域アミノ酸配列及び、配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 2 の軽鎖可変領域配列 ; または
 (d) 配列番号 5 6 の重鎖可変領域アミノ酸配列及び、配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 2 の軽鎖可変領域アミノ酸配列 ;
 を含む抗体の投与である、請求項 6 0 または 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抗 F c R n 療法が、配列番号 5 6 の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 2 2 の軽鎖可変領域配列を含む抗体の投与である、請求項 6 8 に記載の方法。

10

【請求項 7 0】

前記抗体が、I g G、F a b、F (a b ')₂、二重特異性抗体、F V、s c F V、遮断ペプチド、またはこれらの断片である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記抗体が F (a b ')₂ である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記サイトカインが、腫瘍壊死因子 (T N F -)、インターフェロン - (I F N -)、インターロイキン - 6 (I L - 6)、インターロイキン - 1 0 (I L - 1 0)、またはインターロイキン - 1 2 (I L - 1 2) である、請求項 5 9 から 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 3】

前記免疫複合体が人工免疫複合体である、請求項 5 9 から 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記免疫複合体が、4 - ヒドロキシ - 5 - ヨード - 3 - ニトロフェニルアセチル基 (N I P) とニワトリオボアルブミン (O V A) と抗 N I P 抗体との多量体複合体である、請求項 5 9 から 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

ステップ (g) で決定される前記差が対照値と比較される、請求項 6 0 または 6 1 に記載の方法。

30

【請求項 7 6】

ステップ (g) で決定される前記差が、F c ドメイン中に F c R n との結合を無効にする 3 点突然変異 (I 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A) を伴う抗体を含む免疫複合体を用いて前記方法が行われる場合に得られる差と比較される、請求項 6 0 または 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記抗 F c R n 療法が、ステップ (g) で決定される、前記第 1 の量の前記サイトカインと前記第 2 の量の前記サイトカインとの間の差に基づいて調整される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

治療抗体の投与前に内在性抗体の分解を促進する方法であって、前記治療抗体を投与する前に、F c R n の I g G 結合部位に対し特異的な抗 F c R n 抗体またはその断片を、前記治療抗体を用いた治療を必要としている患者に投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 7 9】

前記治療抗体を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記治療抗体の薬物動態または薬物力学が増強される、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記抗 F c R n 抗体またはその断片が、配列番号 5 6 の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 2 2 の軽鎖可変領域配列を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

50

【請求項 8 2】

対象に投与された内在性治療抗体の分解を促進する方法であって、有効量の抗 F c R n 抗体またはその断片を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 8 3】

前記抗 F c R n 抗体またはその断片が、配列番号 5 6 の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 2 2 の軽鎖可変領域配列を含む、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

抗 F c R n 抗体の投与後の対象における抗 F c R n 抗体のレベルを測定する方法であって、

(a) 抗 F c R n 抗体が投与された後に、前記対象から単球を含む全血を得ることと、

(b) 前記単球の細胞表面の F c R n 発現レベルを測定することと、

を含む、前記方法。

10

【請求項 8 5】

前記対象が哺乳動物である、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 8 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年5月12日に提出された米国出願第62/160,423号及び2015年9月11日に提出された米国出願第62/217,490号の優先権を主張する。これらの出願はいずれも、その全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

発明の分野

本発明は、F c R n に結合する抗体及び抗体の抗原結合部分、ならびに F c R n と抗体 F c 領域との相互作用を調節及び阻害するためのこれらの使用に関する。当該抗体は、自己免疫性障害及び他の障害を治療するための治療薬として有用である。

配列表

【0003】

配列表

本出願は、E F S - W e b を介してアスキー形式で提出された配列表を含み、この配列表は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。配列表は2015年8月7日に作成され、Sequence Listing . t x t という名称であり、サイズが 8 7 , 2 4 6 バイトである。

30

【背景技術】

【0004】

新生児 F c 受容体 (F c R n) は、I g G に対する細胞内輸送の複合膜 F c 受容体である。当初、F c R n は新生児期に機能する受容体として同定された。F c R n は、げっ歯類の内臓から 1 2 k D a のタンパク質と 4 0 ~ 5 0 k D a のタンパク質との間にあるヘテロ二量体として初めて単離され (R o d e w a l d & K r a e h e n b u h l 1 9 8 4 , J . C e l l . B i o l . 9 9 (1 P t 2) : 1 5 9 s - 1 5 4 s ; S i m i s t e r & R e e s , 1 9 8 5 , E u r . J . I m m u n o l . 1 5 : 7 3 3 - 7 3 8) 、 1 9 8 9 年 に ク ロ ー ニ ング され た (S i m i s t e r & M o s t o v , 1 9 8 9 , N a t u r e 3 3 7 : 1 8 4 - 1 8 7) 。 F c R n を ク ロ ー ニ ング し、次に結晶化することにより、F c R n が、1 2 k D a の 2 - ミ ク ロ グ ロ ブ リ ン 軽 鎖 と 非 共 有 会 合 し た 約 5 0 k D a の 主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 様重鎖を有することが明らかになった。F c R n は、当初は胎児及び新生児期との関連で認識されていたが、現在では成体期を通じて機能し続けることが知られている。F c R n は主として初期の酸性エンドソーム中に存在し、p H 依存的に I g G の F c 領域に結合する。F c R n は、p H 6 . 5 ではマイクロ~ナノ分子親和性で結合するのに対し、生理的 p H では F c への結合は無視でき

40

50

る程度にわずかである。FcRnの大部分は、ほとんどの細胞ではエンドソーム中に存在し、その酸性環境内でFcRnとそのIgG Fcリガンドとの相互作用が発生する。造血細胞などの一部の細胞では、細胞内の発現に加えて、細胞表面上で顕著なレベルのFcRnを検出することができる(Zhu et al., 2001, J. Immunol. 166: 3266 - 3276)。この場合、腫瘍状態または感染状態におけるように細胞外環境が酸性であるとき、FcRnがこうした細胞タイプの細胞表面上のIgGに結合し得る可能性がある。FcRnは、貪食された単量体IgGに結合し、それをリソソーム区画における分解から保護し、そしてIgGを細胞表面に運搬して細胞外の中性pHにて放出することにより、血清IgG濃度を調節する。FcRnが結合しないIgGはリソソーム経路に入って分解されるため、FcRnは、この機構を通してIgGの血清半減期を長くする役割を担っている。

10

【0005】

FcRnは、生命の最初の段階の間、胎盤または新生児の腸壁でのIgGの移行を媒介することにより、出生前後の子孫に受動免疫を与える。FcRnは成体期を通じて機能し続け、例えば肺及び肝臓の上皮、血管内皮といった様々な組織中で発現され、さらに単球、マクロファージ、及び樹状細胞中でも発現される。

【0006】

FcRn欠損マウスは、病原性血清IgGを高濃度で維持することができないため、病原性IgG自己抗体が原因となる自己免疫性疾患に対する抵抗性がより高い(Christianson et al., 1996, J. Immunol. 156: 4932 - 4939; Ghetie et al., 1996, Eur. J. Immunol. 26: 690 - 696; Israel et al., 1996, Immunol. 89: 573 - 578)。より高い親和性でFcRnに結合する修飾Fc領域を有するよう遺伝子操作された抗体を投与することにより、マウス関節炎モデルの疾患が緩和されることが見いだされた(Patel et al., 2011, J. Immunol. 187: 1015 - 1022)。IgGの高用量投与は、複数の自己免疫性疾患において対症療法的効果を有するが、これは少なくとも部分的には、FcRnによって媒介されるIgG保護が飽和することにより説明することができる(Jin & Balthasar, 2005, Hum. Immunol. 66: 403 - 410; Akilesh et al., 2004, J. Clin. Invest. 113: 1328 - 1333; Li et al., 2005, J. Clin. Invest. 115: 3440 - 3450)。したがって、FcRn-IgG相互作用の特異的遮断は、病原性IgG抗体の分解促進に使用することができ、例えば、IgGによって媒介される自己免疫性疾患の治療、及び投与後血清からの治療抗体の除去に使用することができる。例えば、実験的誘発による自己免疫性重症筋無力症のラットモデルでは、FcRn重鎖特異的モノクローナル抗体を用いた処置により、血清IgG濃度の低減及び疾患の重症度の減少がもたらされた(Liu et al., 2007, J. Immunol. 178: 5390 - 5398)。

20

30

【0007】

造血細胞中にFcRnが存在しないことと、血液からIgG含有免疫複合体をより急速に除去することとは関連性がある(Qiao et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 9337 - 9342)。このことは、FcRn-IgG相互作用の特異的遮断により、IgG含有免疫複合体の循環からの除去も促進されることを示すものである。

40

【0008】

FcRnは、身体の種々の区画間のIgG及び任意の結合カーゴの移動を、極性細胞を横断する経細胞輸送を介して調節する。このプロセスは、感染からの粘膜保護において、例えば消化管において、重要な役割を果たしている。FcRnは、腸の上皮細胞バリアを横断して内腔にIgGを運搬する。IgGが内腔の抗原に結合した後、IgG/抗原複合体はFcRnによりバリアを通過して粘膜固有層に戻され、樹状細胞によるIgG/抗原複合体の処理及び、所属リンパ節のCD4⁺T細胞に対する抗原提示を可能にする。

50

【0009】

また、FcRnは、IgG複合化抗原のMHCクラスII抗原提示及びMHCクラスI交差提示においても重要な役割を果たしている。抗原がIgG含有免疫複合体(IC)として提示されると、CD8⁻CD11b⁺CD11c⁺である樹状細胞(炎症性樹状細胞)は、FcRn発現に高度に依存する経路において、低い抗原用量で顕著な交差提示を示す。この経路は、Fc受容体によるICの酸性エンドソーム内への内部移行を伴う。次に起こる抗原提示細胞(APC)内でのFcRnによるICの結合により、特定の機序が開始され、その結果、抗原を有するICはコンパートメントに輸送され、このコンパートメントで、抗原はMHCへのロードに適合性のペプチドエピトープに加工される(Baker et al., 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:9927-9932; Christianson et al., 2012, mAbs vol. 4, page 208, Introduction)。したがって、DCにおけるFcRnは、MHC II抗原提示を増強し、かつ抗原特異的なCD4⁺T細胞の増殖を誘発し、さらにCD8⁺T細胞(細胞傷害性T細胞)に対する抗原提示において根幹的な役割を示している。この後者のCD8⁺T細胞経路は交差提示と呼ばれ、細胞外抗原をMHCクラスI依存経路に乗り換えさせることを伴う。

10

【0010】

FcRn-Ig IC相互作用の遮断は、ICの抗原提示と、次に起こる免疫関連抗原提示によって刺激されるT細胞活性化とを阻害する。DCなどのAPCにおけるIgG ICとの相互作用は、IL-12、IFN、及びTNFなどの炎症性サイトカインの分泌も促進する。したがって、FcRn-Ig IC相互作用の遮断は、自然免疫細胞及び抗原活性化T細胞による炎症性サイトカインの産生を阻害する上で有用である。

20

【0011】

FcRnは、血清アルブミンのための結合部位を含有するが、FcRn重鎖の向かい合った面でのFcRnとIgGまたはアルブミンとのイオン相互作用があることにより、この結合部位は、IgGのFcドメインのための結合部位とは異なる。FcRnのアルブミンへの結合は、IgGへの結合のように、強度にpH依存的であり、酸性pH(通常はpH6未満、最適にはpH5)で起こり、中性pHでは起こらない。FcRnのIgGを分解から保護する役割と同様、FcRnのアルブミンとの結合は、アルブミンを分解から保護し、アルブミンの血清半減期の延長をもたらす。

30

【発明の概要】

【0012】

本発明は、FcRnに結合する抗体及びその抗原結合部分を提供する。こういった抗体は、IgGのFcドメインのための結合部位に重複するFcRnのエピトープに結合し、IgG及び免疫複合体としてのIgGに対するFcRnの結合を、低減または阻害する。

【0013】

本明細書では、重鎖可変領域を含むFcRnに結合する抗体またはその抗原結合断片であって、重鎖可変領域がCDR1、CDR2及び、CDR3を含み、

CDR1の配列が配列番号2であり、

CDR2の配列が配列番号4であり、

CDR3の配列が配列番号78である、抗体またはその抗原結合断片が提供される。

40

【0014】

一実施形態では、CDR3の配列は配列番号76である。別の実施形態では、CDR3の配列は配列番号74である。

【0015】

別の実施形態では、CDR3の配列は、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号74、配列番号76、及び配列番号78からなる群から選択される。一実施形態では、CDR3の配列は、配列番号49または配列番号55であ

50

る。

【0016】

抗体または抗原結合断片の一部の実施形態では、重鎖可変領域のK a b a t 1 0 3 位のアミノ酸は、トリプトファンである。一部の実施形態では、重鎖可変領域のK a b a t 1 0 3 位のアミノ酸は、アルギニンである。

【0017】

また、本明細書では、軽鎖可変領域を含むF c R nに結合する抗体またはその抗原結合断片であって、軽鎖可変領域がC D R 1、C D R 2及び、C D R 3を含み、

C D R 1の配列が配列番号6であり、

C D R 2の配列が配列番号8であり、

C D R 3の配列が、配列番号59、配列番号62、配列番号65、及び配列番号68からなる群から選択される、抗体またはその抗原結合断片も提供される。

【0018】

また、本明細書では、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むF c R nに結合する抗体またはその抗原結合断片であって、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のそれぞれが、C D R 1、C D R 2及びC D R 3を含み、

重鎖のC D R 1の配列が配列番号2であり、

重鎖のC D R 2の配列が配列番号4であり、

重鎖のC D R 3の配列が、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、及び配列番号57からなる群から選択され、

軽鎖のC D R 1の配列が配列番号6であり、

軽鎖のC D R 2の配列が配列番号8であり、

軽鎖のC D R 3の配列が、配列番号10、配列番号59、配列番号62、配列番号65、及び配列番号68からなる群から選択される、抗体またはその抗原結合断片も提供される。

【0019】

一部の実施形態では、重鎖のC D R 3の配列は配列番号49または配列番号55であり、軽鎖のC D R 3の配列は配列番号10である。一部の実施形態では、重鎖のC D R 3の配列は配列番号55であり、軽鎖のC D R 3の配列は配列番号10である。

【0020】

一部の実施形態では、本明細書における抗体または抗原結合断片は、キメラ型またはヒト化型の抗体または抗原結合断片である。

【0021】

また、本明細書では、重鎖可変領域を含むF c R nに結合する抗体または抗原結合断片であって、重鎖可変領域の配列が、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、もしくは配列番号58である、または重鎖可変領域の配列が、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、もしくは配列番号58の重鎖可変領域アミノ酸配列に対し少なくとも95%同一である、抗体またはその抗原結合断片も提供される。

【0022】

一部の実施形態では、当該抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域をさらに含み、軽鎖可変領域の配列は配列番号20または配列番号22である。一部の実施形態では、重鎖可変領域の配列は、配列番号50または配列番号56である。一部の実施形態では、重鎖可変領域の配列は配列番号56であり、軽鎖可変領域の配列は配列番号22である。

【0023】

一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域をさらに含み、軽鎖可変領域の配列は、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 である、または軽鎖可変領域の配列は、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 の軽鎖可変領域アミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % 同一である。

【0024】

一部の実施形態では、重鎖可変領域の配列は配列番号 5 0 または配列番号 5 6 であり、軽鎖可変領域の配列は配列番号 2 0 または配列番号 2 2 である。一部の実施形態では、重鎖可変領域の配列は配列番号 5 6 であり、軽鎖可変領域は、配列番号 2 2 の軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む。

【0025】

また、FcRn に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域の配列が、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 である、または軽鎖可変領域の配列が、配列番号 6 1、配列番号 6 4、配列番号 6 7、もしくは配列番号 7 0 の軽鎖可変領域アミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % 同一である、抗体またはその抗原結合断片も提供される。一部の実施形態では、軽鎖可変領域の配列は配列番号 6 7 である。一部の実施形態では、軽鎖可変領域の配列は配列番号 6 7 であり、抗体または抗原結合断片は重鎖可変領域をさらに含み、重鎖可変領域は配列番号 1 2 のフレームワーク領域を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変領域の配列は配列番号 6 7 であり、抗体または抗原結合断片は重鎖可変領域をさらに含み、重鎖可変領域配列は配列番号 1 2 の重鎖可変領域を含む。

【0026】

また、本明細書では、FcRn に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、重鎖可変領域を含み、重鎖可変領域が、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、もしくは配列番号 1 8 の前記重鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、または配列番号 1 8 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、抗体またはその抗原結合断片も提供される。一部の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号 1 2 の重鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 1 2 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む。

【0027】

また、FcRn に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域が、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、もしくは配列番号 2 6 の軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、または配列番号 2 6 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む、抗体またはその抗原結合断片も提供される。一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 2 の軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 2 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む。一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 2 2 の軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 2 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含む。

【0028】

また、本明細書では、FcRn に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、重鎖可変領域を含み、重鎖可変領域が、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、もしくは配列番号 1 8 の前記重鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、または配列番号 1 8 のフレームワーク領域に対し少なくとも 9 5 % 同一であるフレームワーク領域を含み、かつ軽鎖可変領域をさらに含み、軽鎖可変領域が、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、もしくは配列番号 2 6 の軽鎖可変領域アミノ酸配列のフレームワーク領域を含む、または配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、または配列番号 2 6 のフレームワーク領域に対し少なくと

10

20

30

40

50

も95%同一であるフレームワーク領域を含む、抗体またはその抗原結合断片も提供される。

【0029】

本明細書に記載される抗体の一部の実施形態では、当該抗体はアイソタイプのIgG4を有する。一部の実施形態では、当該抗体は、重鎖中にS241P修飾を含有する。一部の実施形態では、当該抗体は、重鎖中にC末端リジンが欠如している。一部の実施形態では、当該抗体は、重鎖中にS241P修飾を含有し、かつ重鎖中にC末端リジンが欠如している。

【0030】

一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合断片は、scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂、または二重特異性抗体である。

10

【0031】

また、本明細書では、本明細書に記載されるFcRnに結合する抗体またはその抗原結合断片に対して、競合または交差遮断する抗体も提供される。

【0032】

また、本明細書では、本明細書に記載されるFcRn抗体または抗原結合断片をコードする単離核酸も提供される。また、本明細書では、本明細書に記載されるFcRn抗体または抗原結合断片をコードする単離核酸を含む、核酸ベクターも提供される。また、本明細書では、本明細書に記載されるFcRn抗体または抗原結合断片をコードする単離核酸を含む、原核宿主細胞または真核宿主細胞も提供される。また、本明細書では、本明細書に記載されるFcRn抗体または抗原結合断片と薬学的に許容される担体とを含む、組成物も提供される。

20

【0033】

また、本明細書では、FcRnとIgGFcとの間の相互作用を調節する方法であって、FcRnを、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。

【0034】

また、本明細書では、細胞による抗体分解を促進する方法であって、FcRnを、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。

【0035】

また、本明細書では、対象における抗体分解を促進する方法であって、対象に、有効量の、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片を投与することを含む、方法も提供される。一部の実施形態では、分解される抗体は、自己抗体である。一部の実施形態では、分解される抗体は、治療抗体である。

30

【0036】

また、本明細書では、対象におけるIgG媒介疾患を緩和する方法であって、対象に、IgG媒介疾患の緩和に有効な量の、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片を投与することを含む、方法も提供される。

【0037】

また、本明細書では、FcRnによる免疫複合体の結合を阻害する、またはFcRn-免疫複合体相互作用を阻害することにより免疫複合体の循環を減少させる方法であって、FcRnを、有効量の、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。

40

【0038】

また、本明細書では、抗原提示細胞(APC)による免疫複合体抗原の提示を阻害する方法であって、APCを、抗原の提示の阻害に有効な量の、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。

【0039】

また、本明細書では、抗原提示細胞(APC)による免疫複合体抗原の交差提示を阻害する方法であって、APCを、抗原の交差提示の阻害に有効な量の、本明細書に記載され

50

る抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。

【0040】

また、本明細書では、抗原提示細胞（APC）による炎症性サイトカインの分泌を阻害する方法であって、APCを、炎症性サイトカインの分泌の阻害に有効な量の、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインは、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-12（IL-12）、または腫瘍壊死因子-（TNF）である。

【0041】

また、本明細書では、抗原提示細胞によるT細胞活性化を阻害する方法であって、抗原提示細胞を、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。

10

【0042】

また、本明細書では、自己免疫性疾患の治療、阻害、またはその重症度の低減を、それを必要とする対象において行う方法であって、有効量の、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片を投与することを含む、方法も提供される。一部の実施形態では、自己免疫性疾患は、以下からなる群から選択される：尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴天疱瘡、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、特発性血小板減少性紫斑（ITP）、ヘパリン誘発性血小板減少症（HIT）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、重症筋無力症（MG）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、多巣性運動ニューロパチー、視神経脊髄炎、自己免疫性血小板減少症、免疫性好中球減少症、抗血友病FVIIインヒビター、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、ANCA関連疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、水胞性類天疱瘡、多発性硬化症（MS）、ギラン・バレー症候群、慢性多発ニューロパチー、潰瘍性大腸炎、糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス眼症、自己免疫性蕁麻疹、血管炎、及びラスマッセン脳炎。

20

【0043】

また、本明細書では、酸性pH及び生理的pHの両方でFcRnに結合する抗体を同定する方法であって、pH5.8～6.4で行われる2つ以上のスクリーニングステップを含む、方法も提供される。一部の実施形態では、当該方法は、

（a）候補抗体の集合を、pH5.8～6.4でFcRnまたはその一部に接触させ、FcRnまたはその一部に結合する抗体を単離することと、

30

（b）ステップ（a）の単離抗体を、pH5.8～7.6でFcRnまたはその一部に接触させ、FcRnまたはその一部に結合する抗体を単離することと、

（c）ステップ（b）の単離抗体を、pH5.8～6.4でFcRnまたはその一部に接触させ、FcRnまたはその一部に結合する抗体を単離することと、

を含む。

【0044】

また、本明細書では、胎盤を介した病原性抗体の伝播を遮断する方法であって、治療有効量のFcRn抗体またはその抗原結合部分を、それを必要としている妊娠中の哺乳動物に投与することを含む、方法も提供される。

40

【0045】

また、本明細書では、対象からのICのクリアランスを増加させる方法であって、FcRn抗体またはその抗原結合部分を、それを必要としている対象に投与することを含む、方法も提供される。一部の実施形態では、対象は、免疫複合体媒介血管炎を有する。

【0046】

また、本明細書では、試験抗体またはその抗原結合断片が、FcRnと免疫複合体との間の相互作用を遮断するかどうか、または減らすかどうかを決定する方法であって、

（a）哺乳動物から全血を得ることと、

（b）免疫複合体を、全血の第1の部分に添加することと、

（c）免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量のサイ

50

トカインを得ることと、

(d) 試験抗体またはその抗原結合断片を、全血の第2の部分に添加することと、

(e) 試験抗体またはその抗原結合断片の添加後にまたは添加と同時に、免疫複合体を、全血の第2の部分に添加することと、

(f) 免疫複合体の添加後に、全血の第2の部分中のサイトカインの量を測定して、第2の量のサイトカインを得ることと、

を含む、方法も提供される。

【0047】

一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化型、キメラ型、または非天然存在の完全ヒト型である。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、IgG、Fab、F(ab')₂、二重特異性抗体、FV、scFV、遮断ペプチド、またはこれらの抗原結合断片である。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号56を有する重鎖可変領域及び配列番号22を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【0048】

一部の実施形態では、サイトカインは、腫瘍壊死因子(TNF-)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-10(IL-10)、またはインターロイキン-12(IL-12)である。一部の実施形態では、免疫複合体は人工免疫複合体であり、すなわち、哺乳動物中に天然に存在しない。一部の実施形態では、当該免疫複合体は、4-ヒドロキシ-5-ヨード-3-ニトロフェニルアセチル基(NIP)とニワトリオボアルブミン(OVA)と抗NIP抗体との多量体複合体を含む。

20

【0049】

また、本明細書では、抗FcRn療法に対する患者の応答性の期待レベルを決定する方法であって、

(a) 抗FcRn療法の開始前に、患者から全血を得ることと、

(b) 免疫複合体を、全血の第1の部分に添加することと、

(c) 免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量のサイトカインを得ることと、

(d) FcRnと免疫複合体との間の相互作用を遮断するまたは減らすことが知られている抗体またはその抗原結合断片を、全血の第2の部分に添加することと、

30

(e) 抗体またはその抗原結合断片の添加後にまたは添加と同時に、免疫複合体を、全血の第2の部分に添加することと、

(f) 免疫複合体の添加後に、全血の第2の部分中のサイトカインの量を測定して、第2の量のサイトカインを得ることと、

(g) 第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差を決定することと

を含む、方法も提供される。

【0050】

一部の実施形態では、患者はヒトである。

【0051】

一部の実施形態では、抗FcRn療法は、配列番号56の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号22の軽鎖可変領域配列を含む抗体の投与である。

40

【0052】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、IgG、Fab、F(ab')₂、二重特異性抗体、FV、scFV、遮断ペプチド、またはこれらの断片である。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、F(ab')₂である。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号56を有する重鎖可変領域及び配列番号22を有する軽鎖可変領域を含む。

【0053】

一部の実施形態では、サイトカインは、腫瘍壊死因子(TNF-)、インターロイ

50

キン - 6 (I L - 6)、インターロイキン - 10 (I L - 10)、またはインターロイキン - 12 (I L - 12)である。一部の実施形態では、免疫複合体は人工免疫複合体であり、すなわち、哺乳動物中に天然に存在しない。一部の実施形態では、当該免疫複合体は、4 - ヒドロキシ - 5 - ヨード - 3 - ニトロフェニルアセチル基 (N I P) とニワトリオボアルブミン (O V A) と抗 N I P 抗体との多量体複合体を含む。一部の実施形態では、ステップ (g) で決定される差は、対照値と比較される。一部の実施形態では、ステップ (g) で決定される差は、F c ドメイン中に F c R n への結合を無効にする 3 点突然変異 (I 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A) を伴う抗体を含む免疫複合体を用いて当該方法が行われる場合に得られる差と比較される。

【 0 0 5 4 】

また、本明細書では、抗 F c R n 療法に対する患者の応答をモニターする方法であって、

- (a) 抗 F c R n 療法の開始前に、患者から全血を得ることと、
- (b) 免疫複合体を、全血に添加することと、
- (c) 免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第 1 の量のサイトカインを得ることと、
- (d) 抗 F c R n 療法の開始後に、患者から全血を得ることと、
- (e) 免疫複合体を、ステップ (d) の全血に添加することと、
- (f) ステップ (e) の免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第 2 の量のサイトカインを得ることと、
- (g) 第 1 の量のサイトカインと第 2 の量のサイトカインとの間の差を決定することと

を含む、方法も提供される。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、当該患者はヒトである。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態では、当該抗 F c R n 療法は、配列番号 5 6 の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 2 2 の軽鎖可変領域配列を含む抗体の投与である。一部の実施形態では、当該抗体は、I g G、F a b、F (a b ')₂、二重特異性抗体、F V、s c F V、遮断ペプチド、またはこれらの断片である。一部の実施形態では、当該抗体は F (a b ')₂ である。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態では、当該サイトカインは、腫瘍壊死因子 (T N F -)、インターフェロン - (I F N -)、インターロイキン - 6 (I L - 6)、インターロイキン - 10 (I L - 10)、またはインターロイキン - 12 (I L - 12)である。一部の実施形態では、当該免疫複合体は、4 - ヒドロキシ - 5 - ヨード - 3 - ニトロフェニルアセチル基 (N I P) とニワトリオボアルブミン (N I P) と抗 N I P 抗体との多量体複合体を含む。一部の実施形態では、ステップ (g) で決定される差は、対照値と比較される。一部の実施形態では、ステップ (g) で決定される差は、F c ドメイン中に F c R n への結合を無効にする 3 点突然変異 (I 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A) を伴う抗体を含む免疫複合体を用いて当該方法が行われる場合に得られる差と比較される。一部の実施形態では、抗 F c R n 療法は、ステップ (g) で決定される、第 1 の量のサイトカインと第 2 の量のサイトカインとの間の差に基づいて調整される。

【 0 0 5 8 】

また、本明細書では、治療抗体の投与前に内在性抗体の分解を促進する方法であって、治療抗体を投与する前に、F c R n の I g G 結合部位に対し特異的な抗 F c R n 抗体またはその断片を、治療抗体を用いた処置を必要としている患者に投与することを含む、方法も提供される。

【 0 0 5 9 】

また、本明細書では、対象に投与された内在性治療抗体の分解を促進する方法であって

10

20

30

40

50

、有効量の抗FcRn抗体またはその断片を前記対象に投与することを含む、方法も提供される。

【0060】

一部の実施形態では、当該方法は、治療抗体を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、治療抗体の薬物動態または薬物力学が増強される。

【0061】

また、本明細書では、対象における抗FcRn抗体の投与後の抗FcRn抗体のレベルを測定する方法であって、抗FcRn抗体が投与された後に、対象から単球を含む全血を得ることと、単球細胞表面のFcRn発現レベルを測定することと、を含む方法も、提供される。一部の実施形態では、当該対象は哺乳動物である。他の実施形態では、当該哺乳動物はヒトである。

10

【0062】

本特許または出願ファイルには、カラーで制作された図面が少なくとも1点含まれている。カラー図面で発行された本特許または特許出願のコピーは、要請時及び必要料金の支払時に特許商標庁から提供されることになる。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】ヒト化型重鎖変異体(V_H1~V_H4)のアミノ酸配列を示す図である。これらの変異体は、ヒト重鎖可変ドメイン配列に基づいており、潜在的免疫原性を最小限にするため、ある特定の位置に組み込まれたアミノ酸の変更を示すように整列されている。ヒト化型フレームワークの中で変動するアミノ酸残基には下線が引かれている。K a b a t C D Rが枠で囲まれている。

20

【図2】ヒト化型軽鎖変異体(V_L1~V_L3、V_L5)のアミノ酸配列を示す図である。これらの変異体は、ヒト軽鎖可変ドメイン配列に基づいており、潜在的免疫原性を最小限にするため、ある特定の位置に組み込まれたアミノ酸の変更を示すように整列されている。ヒト化型フレームワークの中で変動するアミノ酸残基には下線が引かれている。K a b a t C D Rが枠で囲まれている。

【図3】親和性成熟重鎖H1、H3、及びE7ならびに親和性成熟軽鎖E8と親マウス抗体とを比較する競合ELISAを示す図である。ヒト化型親V_H1軽鎖を用いて親和性成熟重鎖をs c F vとして発現させ、ヒト化型親V_H1重鎖を用いて親和性成熟軽鎖をs c F vとして発現させた。固定されたFcRnへの結合について、pH7.4(A)及びpH6.0(B)で、s c F v抗体をビオチン化親マウス抗体と競合させ、結合したビオチン化親マウス抗体をストレプトアビジン-HRPによって検出した。

30

【図4】ヒト化型親(V_H1V_L1)重鎖及び軽鎖、または親和性成熟(H1V_H1__E8V_L1、H1V_H1__E8V_L2、G7V_H1__E8V_L1、G7V_H1__E8V_L2)重鎖及び軽鎖を含むIgG4抗体と、キメラ型親マウス抗体とを比較する直接結合アッセイを示す図である。抗体をpH7.4(A)及びpH6.0(B)で固定されたFcRnと反応させ、結合した抗体を抗ヒトカップパHRPで検出した。

【図5】ヒト化型親(V_H1V_L1)重鎖及び軽鎖、または親和性成熟(H1V_H1__E8V_L1、H1V_H1__E8V_L2、F7V_H1__E8V_L1、F7V_H1__E8V_L2)重鎖及び軽鎖を含むIgG4抗体と、キメラ型親マウス抗体とを比較する競合ELISAを示す図である。pH7.4(A)及びpH6.0(B)で、試験抗体をビオチン化親マウス抗体と競合させ、結合したビオチン化親マウス抗体をストレプトアビジン-HRPによって検出した。

40

【図6】ヒト化型親(V_H1V_L1)可変ドメインまたは親和性成熟(H3V_H1__E8V_L1)可変ドメインを含む、一価のs c F vと二価のIgG抗体とを比較する競合ELISAを示す図である。pH7.4(A)及びpH6.0(B)で、試験抗体をビオチン化親マウス抗体と競合させ、結合したビオチン化親マウス抗体をストレプトアビジン-HRPによって検出した。

【図7】pH7.4及び6.0におけるmAbのヒトFcRnへの結合を示す図である。

50

親和性成熟 E 8 またはヒト化型親 V₂ 軽鎖と対合させた G 9 または H 3 親和性成熟重鎖を含む I g G 抗体を、B I A C O R E (登録商標) C M 5 センサーチップとカップリングさせた。センサーグラムは、p H 7 . 4 及び p H 6 . 0 における、固定された m A b に注入された滴定量の単量体ヒト F c R n の結合を示している。(A) G 9 E 8、(B) H 3 E 8、(C) G 9 V₂、(D) H 3 V₂。

【図 8】腫瘍壊死因子 (T N F -) の放出を測定した全血アッセイの結果を示す図である。黒色のバーは、H 3 V₂ を伴わずに 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表し、灰色のバーは、H 3 V₂ の存在下で 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表す。4 つの棒グラフは、左から右に、2 4 時間時における動物 1、4 8 時間時における動物 1、2 4 時間時における動物 2、4 8 時間時における動物 2 を表す。動物 1 は非応答者である。すなわち、N I P - O V A - I g G 複合体による刺激で産生された T N F - の量が無視できる程度にわずかであった。動物 2 による 2 4 時間時の T N F - 産生は、実際には H 3 V₂ によって阻害されていたが、大量の T N F - の産生により黒色バー及び灰色バーの両方がこのグラフの測定上限を超えたため、この阻害は表に現れなかった。

10

【図 9】インターロイキン - 6 (I L - 6) の放出を測定した全血アッセイの結果を示す図である。黒色のバーは、H 3 V₂ を伴わずに 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表し、灰色のバーは、H 3 V₂ の存在下で 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表す。4 つの棒グラフは、左から右に、2 4 時間時における動物 1、4 8 時間時における動物 1、2 4 時間時における動物 2、4 8 時間時における動物 2 を表す。

20

【図 10】インターロイキン - 10 (I L - 10) の放出を測定した全血アッセイの結果を示す図である。黒色のバーは、H 3 V₂ を伴わずに 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表し、灰色のバーは、H 3 V₂ の存在下で 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表す。4 つの棒グラフは、左から右に、2 4 時間時における動物 1、4 8 時間時における動物 1、2 4 時間時における動物 2、4 8 時間時における動物 2 を表す。

【図 11】別の全血アッセイの結果を示す図である。右寄りにある (緑、青、及び赤で示される) バーは、H 3 V₂ がサイトカインの産生量に用量依存的な阻害効果を及ぼすことを示している。

30

【図 12】ヒト I g G サブクラスである I g G 1 及び I g G 4 ならびに抗ヒト F c R n m A b である H 3 V k 2 の、p H 7 . 4 及び 6 . 0 におけるヒト F c R n への結合を示す図である。代表的なセンサーグラムは、p H 7 . 4 及び p H 6 . 0 における、固定された (A) H 3 V k 2、(B) h I g G 1、及び (C) h I g G 4 に注入した滴定量の h F c R n の結合を示している。

【図 13】p H 7 . 4 及び p H 6 . 0 における H 3 V k 2 のカニクイザル F c R n への結合を示す図である。代表的なセンサーグラムは、固定された A b に注入した滴定量の (A) p H 7 . 4 における h F c R n、(B) p H 7 . 4 及び p H 6 . 0 における h F c R n、及び (C) p H 7 . 4 及び p H 6 . 0 における c F c R n の結合を示している。

【図 14】インターロイキン - 1 (I L - 1) の放出を測定した全血アッセイの結果を示す図である。黒色のバーは、H 3 V₂ を伴わずに 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表し、灰色のバーは、H 3 V₂ の存在下で 0 . 1 μ g / m l の N I P - O V A - I g G 複合体で実行したアッセイを表す。4 つの棒グラフは、左から右に、2 4 時間時における動物 1、4 8 時間時における動物 1、2 4 時間時における動物 2、4 8 時間時における動物 2 を表す。

40

【図 15】H 3 V k 2 が h F c R n 遺伝子導入マウスの h I g G 異化作用に及ぼす影響を示す図である。データは、4 8 時間時のマウス血漿中の H u L y s 1 1 の量を基準とした残留 H u L y s 1 1 (ヒト I g G 1) のパーセント (± 標準誤差) としてプロットされている。2 0 m g / k g の H 3 V k 2 注入は、この 4 8 時間時の採血の 2 時間後である。H 3 V k 2 処置後に収集された最初のデータポイントは、3 日目の投与後 6 時間時である。

50

【図16】H3V k 2がhFcRn遺伝子導入マウスの多量体免疫複合体(IC)異化作用に及ぼす影響を示す図である。本研究は、Qiao SW, PNAS 2008に従って設計した。結果は、示された時点における24時間ベースラインを基準とした残留ICのパーセント(±標準誤差)としてプロットされている。

【図17】ヒト血液を使用した全血アッセイの結果を示す図である。この全血アッセイでは、NIP-OVA-IgG複合体またはNIP-OVA-IHH複合体の存在下で、腫瘍壊死因子(TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、及びインターロイキン-12(IL-12)の放出を測定した。

【図18】ヒト血液を使用した別の全血アッセイの結果を示す図である。この全血アッセイでは、無関連のIgG4及びIgG1対照に対しH3E8及びH3V k 2を試験した。

【図19】ヒト血液を使用し、F(ab')₂形式の試験抗体及び対照抗体を使用した、別の全血アッセイの結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0064】

一態様では、FcRnに結合する抗体及び結合タンパク質が本明細書で提供される。より詳細には、当該抗体は、抗体Fcのための結合部位に重複するFcRnのエピトープに結合する。結果として、当該抗体は、FcRnのIgG Fcへの結合、IgGの保護、及び免疫複合体(IC)の抗原提示などのFcRn媒介機能を調節する。別の態様では、FcRn抗体またはその抗原結合部分をコードする配列を含む単離核酸が提供される。別の態様では、対象への投与に好適な、FcRn抗体またはその抗原結合部分と薬学的に許容される担体とを含む組成物が提供される。

【0065】

一部の実施形態では、本明細書で開示される抗体は、ヒトIgGのヒトFcRnへの結合を阻害するが、ヒト血清アルブミンのヒトFcRnへの結合は阻害しない。一部の実施形態では、本明細書で開示される抗体は、ヒトIgGの血清半減期を減少させるが、ヒト血清アルブミンの血清半減期は減少させない。

【0066】

別の態様では、治療の方法が提供される。例えば、IgG FcのFcRnへの結合を低減することにより、本明細書に記載の抗体及びその抗原結合部分は、循環IgGの半減期を低減するためと、抗体媒介自己免疫性障害を治療または防止するためとに使用することができる。同様に、本明細書に記載の抗体及びその抗原結合部分は、安定性のために、IgG Fc領域を含む治療IgG及び他の治療剤の半減期を低減するために使用することができる。このような方法は、FcRn媒介IgG保護の低減を必要としている個体に、FcRnのヒトIgGへの結合を阻害するのに十分な量のFcRn抗体を投与することを含む。

【0067】

新生児Fc受容体としても知られるFcRnは、IgGに対する複合膜Fc受容体である。FcRnは、膜結合型アルファ-鎖(GenBankアクセッション番号NM004107)及び可溶性 β -2-ミクログロブリン(β 2m)(GenBankアクセッション番号NM004048)のヘテロ二量体であり、構造上、MHCクラスI分子に関連する。FcRnは、貪食されたIgGに結合し、それをリソソーム区画における分解から保護し、そしてIgGを細胞表面に運搬して細胞外の中性pHにて放出することにより、血清IgG濃度を調節する。この機序を通して、FcRnは、IgGの血清半減期を長くする役割を担っている。したがって、FcRn-IgG相互作用の特異的な遮断を、病原性IgG抗体の分解を促進するために使用することができる。FcRnは、抗原提示細胞(APC)(例えば、樹状細胞(DC))内の多価性IgG免疫複合体(IC)とも結合し、抗原提示細胞は、T細胞に提示しT細胞媒介免疫応答を活性化させるため、結合したICを抗原処理経路に向ける。したがって、FcRn-IgG相互作用の特異的な遮断は、炎症性サイトカイン(例えば、IL-6、IL-12、IFN- γ 、またはTNF- α)の産生を低減することを含めて、T細胞媒介免疫応答を阻害するために使用することができる。

【0068】

FcRnに特異的に結合しFcRnのIgGへの結合を遮断するが、FcRnのアルブミン結合部位には実質的に結合しない、マウス抗体に由来する抗体が提供される。当該抗体は、pH7.4及びpH6.0におけるFcRnとの結合親和性が大幅に改善されており、したがって、生理的条件及び酸性条件下で、IgG FcのFcRnとの結合を遮断する。当該抗体は、自己免疫性疾患及び炎症性疾患の治療に有用である。当該抗体は、1つ以上の親和性成熟CDRを含む。親和性成熟の手順により、6.0~7.4のクリティカルなpH範囲にわたり高い親和性でFcRnに結合する抗体が提供される。したがって、当該抗体は、一旦エンドソームの酸性環境内に内部移行されると、IgG Fcが結合するのを効果的に遮断する。

10

【0069】

ある特定の実施形態によれば、この改善された抗体は、免疫原性低減のためのヒト化型フレームワークも特徴としている。ある特定の実施形態では、FcRn特異的抗体のCDRは、ヒト抗体から得られたフレームワーク中にある。他の実施形態では、FcRn特異的抗体のCDRは、2つ以上のヒト抗体の複合物であるフレームワーク中にある。他の実施形態では、FcRn特異的抗体の表面が露出したフレームワーク残基は、ヒト抗体のフレームワーク残基に置き換えられる。好ましい実施形態では、フレームワークは、広い個体群範囲にわたってT細胞エпитープであることが予測されるアミノ酸配列の存在を最小限にするように選択される。CDRは、ヒト定常領域に結合したマウスフレームワーク(すなわち、キメラ型抗体)中であってもよい。

20

【0070】

本明細書でさらに説明されるように、親和性成熟のため、重鎖及び軽鎖可変ドメインCDR3領域を変異させ、scFv形態においてpH6.0及びpH7.4でスクリーニングした。アミノ酸配列の変化を、配列KNCNNCNNCNCSVCNWCYGG(配列番号71)を含むオリゴヌクレオチドを使用して、重鎖CDR3H領域のアミノ酸98~103位(CDR3Hのアミノ酸98~102及びFW4のアミノ酸103)に導入した。変化は、選択されたアミノ酸の各位置について以下のように提供した：アミノ酸98：A、C、D、F、G、S、V、Y；アミノ酸99：A、C、D、F、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、Y；アミノ酸100：A、C、D、F、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、Y；アミノ酸100a：A、C、D、F、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、Y；アミノ酸101：A、D、G、H、P、R；アミノ酸102：D、F、H、I、L、N、V、Y；アミノ酸103：R、W。アミノ酸配列の変化を、オリゴヌクレオチド配列TGTMRSVMGTVSKRSRRCWMCYCYCBWCRYCTTC(配列番号72)を使用して、軽鎖CDR3L領域のアミノ酸89~97位に導入した。変化は、選択されたアミノ酸の各位置について以下のように提供した：アミノ酸88：C；アミノ酸89：H、K、N、Q、R、S；アミノ酸90：A、E、K、P、Q、T；アミノ酸91：C、S、W、Y；アミノ酸92：C、D、E、G、W、Y；アミノ酸93：D、G、N、S；アミノ酸94：N、S、T、Y；アミノ酸95：F、L、P、S；アミノ酸96：D、F、H、L、V、Y；アミノ酸97：A、I、T、V。

30

【0071】

後述の実施例に示すように、この操作により、FcRn結合親和性を大幅に改善するいくつかのCDR3H変異体をもたらされた。得られた変異体を、CDR3Hライブラリーに導入された変動性と比較して検査すると、比較的アミノ酸の変化が無いままであった特定の位置と、変化が導入され結合が改善されたと思われる他の位置とが示される。したがって、重鎖が、変更され得るある特定のアミノ酸を含むCDR3Hを含む、FcRnに結合する抗体及びその抗原結合部分が提供される。ある1つのそのような実施形態では、CDR3Hは、 $VX_1PPX_2X_3$ (式中、 X_1 はA、R、またはSであり、 X_2 はG、またはRであり、 X_3 はI、L、またはVである)(配列番号73)を含む。別のそのような実施形態では、重鎖CDR3Hは、 $STTVX_1PPX_2X_3$ (式中、 X_1 はA、R、またはSであり、 X_2 はG、またはRであり、 X_3 はI、L、またはVである)(配列番

40

50

号74)である。別のそのような実施形態では、重鎖CDR3Hは、 $VX_1PPX_2X_3$ (式中、 X_1 はA、R、またはSであり、 X_2 は、A、G、H、P、またはRであり、 X_3 はH、I、L、またはVである)(配列番号75)を含む。別のそのような実施形態では、重鎖CDR3Hは、 $STTVX_1PPX_2X_3$ (式中、 X_1 はA、R、またはSであり、 X_2 は、A、G、H、P、またはRであり、 X_3 はH、I、L、またはVである)(配列番号76)である。別のそのような実施形態では、重鎖CDR3Hは、 $VX_1X_2X_3X_4X_5$ (式中、 X_1 はA、H、R、またはSであり、 X_2 は、A、またはPであり、 X_3 はA、D、またはPであり、 X_4 はA、D、G、H、P、またはRであり、 X_5 はF、H、I、L、N、またはVであり、 X_2 及び X_3 のうちの少なくとも1つはPである)(配列番号77)を含む。別のそのような実施形態では、重鎖CDR3Hは、 $STTVX_1X_2X_3X_4X_5$ (式中、 X_1 はA、H、R、またはSであり、 X_2 は、A、またはPであり、 X_3 はA、D、またはPであり、 X_4 はA、D、G、H、P、またはRであり、 X_5 はF、H、I、L、N、またはVであり、 X_2 及び X_3 のうちの少なくとも1つはPである)(配列番号78)である。

10

20

30

40

50

【0072】

ある特定の実施形態では、CDR3Hは、 $STTVSPADF$ (配列番号27)、 $STTVSPPPI$ (配列番号29)、 $STTVSPPAH$ (配列番号31)、または $STTVAPPRL$ (配列番号33)である。ある特定の実施形態では、CDR3Hは、 $STTVHPDRN$ (配列番号35)、 $STTVSPPAL$ (配列番号37)、または $STTVHPDHN$ (配列番号39)、 $STTVSPPHL$ (配列番号41)である。ある特定の実施形態では、CDR3Hは、 $STTVAPPLL$ (配列番号43)、 $STTVSPPHL$ (配列番号45)、 $STTVAPPGH$ (配列番号47)、または $STTVSPPRV$ (配列番号49)である。ある特定の実施形態では、CDR3Hは、 $STTVSPPPL$ (配列番号51)、 $STTVAPPAH$ (配列番号53)、 $STTVRPPGI$ (配列番号55)、または $STTVSAPGV$ (配列番号57)である。これらのうちのある特定の実施形態では、重鎖可変ドメインの103位のアミノ酸は、トリプトファンである。これらのうちのある特定の実施形態では、重鎖可変ドメインの103位のアミノ酸は、アルギニンである。

【0073】

CDR3Hが上記のようなある特定の実施形態では、CDR1Hが配列番号2により示され、CDR2Hが配列番号4により示される。

【0074】

既知の抗体構造に鑑み、マウス抗体のフレームワーク配列を考慮に入れて、いくつかの重鎖及び軽鎖フレームワークを開発した。免疫原性T細胞エピトープを最小限にする目的で、ヒト可変ドメイン配列からヒト化型フレームワークを組み立てた。4つのそのようなヒト化型重鎖フレームワーク及び4つのそのような軽鎖ヒト化型フレームワークが以下のように例示される： V_H1 (配列番号12)； V_H2 (配列番号14)； V_H3 (配列番号16)； V_H4 (配列番号18)； V_L1 (配列番号20)； V_L2 (配列番号22)； V_L3 (配列番号24)；及び V_L5 (配列番号26)。これらの例示されたヒト化型フレームワークに対応するオリゴヌクレオチド配列は、以下によって記載される：配列番号11 (V_H1)；配列番号13 (V_H2)；配列番号15 (V_H3)；配列番号17 (V_H4)；配列番号19 (V_L1)；配列番号21 (V_L2)；配列番号23 (V_L3)；及び配列番号25 (V_L5)。配列番号12、配列番号14、配列番号16、及び配列番号18で提供される重鎖可変ドメイン配列において、CDR1H、CDR2H、及びCDR3Hアミノ酸は「Xaa」として表される。CDR1H及びCDR2Hのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号2及び配列番号4に記載される通りである。CDR1Hに対応するオリゴヌクレオチド配列は配列番号1によって記載され、CDR2Hに対応するオリゴヌクレオチド配列は配列番号3によって記載される。配列番号20、配列番号22、配列番号24、及び配列番号26で提供される軽鎖可変ドメイン配列において、全ての位置で特定のアミノ酸が指定される。CDR1Lのアミノ酸配列は配列番号6に記載される通り

であり、CDR2Lは配列番号8に記載される通りであり、CDR3Lは配列番号10に記載される通りである。対応するオリゴヌクレオチド配列は、以下によって記載される通りである：配列番号5（CDR1L）；配列番号7（CDR2L）；及び配列番号9（CDR3L）。重鎖及び軽鎖におけるFW及びCDRの位置は、それぞれ図1及び図2からも明白となる。

【0075】

表1では、親和性成熟ヒト化型FcRn結合抗体における重鎖及び軽鎖の可変ドメイン及びCDRについての非限定的な例が提供される。本明細書に記載されるように、可変ドメインは、pH6.0及びpH7.4で結合が改善するように選択されたものであり、親マウス抗体に対する実質的な結合の改善を示している。

10

	CDR1H	CDR2H	CDR3H	V _H
A4 V _H 1	2	4	27	28
A7 V _H 1	2	4	29	30
A8 V _H 1	2	4	31	32
C4 V _H 1	2	4	33	34
C7 V _H 1	2	4	35	36
D1 V _H 1	2	4	37	38
E4 V _H 1	2	4	39	40
E7 V _H 1	2	4	41	42
F7 V _H 1	2	4	43	44
G4 V _H 1	2	4	45	46
G7 V _H 1	2	4	47	48
G9 V _H 1	2	4	49	50
H1 V _H 1	2	4	51	52
H2 V _H 1	2	4	53	54
H3 V _H 1	2	4	55	56
H4 V _H 1	2	4	57	58
	CDR1L	CDR2L	CDR3L	V _L
E3_4 V _κ 1	6	8	59	60
E3_4 V _κ 2	6	8	59	61
B7 V _κ 1	6	8	62	63
B7 V _κ 2	6	8	62	64
E8V _κ 1	6	8	65	66
E8V _κ 2	6	8	65	67
F3 V _κ 1	6	8	68	69
F3 V _κ 2	6	8	68	70

20

30

40

【0076】

親和性成熟重鎖CDR3は、重鎖CDR1（例えば、配列番号2を有するCDR1）及び/または重鎖CDR2（例えば、配列番号4を有するCDR2）と組み合わせることができる。親和性成熟軽鎖CDR3は、軽鎖CDR1（例えば、配列番号6を有するCDR1）及び/または軽鎖CDR2（例えば、配列番号8を有するCDR2）と組み合わせることができる。

【0077】

50

後述の実施例で開示されるように、本明細書で例示される様々な抗体可変ドメインはマウス抗体に基づき、親和性成熟CDRを含有する。そして、ある特定の実施形態はヒト化型FWも特徴としている。表1で開示される重鎖及び軽鎖可変ドメインが、適合性であるように設計されていることは、明白となる。したがって、表1で開示される重鎖可変ドメインは、任意の開示された軽鎖と共に共発現させて機能的抗FcRn抗体を作り出すことができる。さらに、親和性成熟重鎖可変ドメインは、本明細書で開示されるヒト化型非親和性成熟軽鎖可変ドメインと対をなすことができ、親和性成熟軽鎖可変ドメインは、ヒト化型非親和性成熟重鎖可変ドメインと対をなすことができる。好ましい実施形態では、親和性成熟重鎖可変ドメインは、ヒト化型軽鎖可変ドメインと対をなすことができる。また、表1は、V_H1における重鎖CDRならびにV_L1及びV_L2における軽鎖CDRも示している。重鎖CDRは、例えば、本明細書で開示されるフレームワークV_H2、V_H3、及びV_H4（図1参照）に対しても適合性である。軽鎖CDRは、例えば、本明細書で開示されるフレームワークV_L3及びV_L5n（図2参照）に対しても適合性である。本明細書で使用される場合、V_H1、V_H2、V_H3、V_H4、V_L1、V_L2、V_L3、V_L5という名称は、本明細書に開示される例示的なヒト化型フレームワークを指し、ヒトの生殖系遺伝子ファミリーに言及しているわけではない。本明細書で開示される任意の重鎖または軽鎖可変ドメインは、相補性可変ドメインのライブラリーと組み合わせることができ、そしてスクリーニングを行って、結合特性の改善及び変更を有する新たな抗体を同定できるということが明らかになる。

10

20

30

40

50

【0078】

本明細書では、表1で開示されるものに類似するが、同一ではない抗体及び抗原結合部分が提供される。当該抗体は、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、及び/または追加を有することができる。ある特定の実施形態では、FcRn抗体は、表1に記載される重鎖可変ドメインに対し少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一である重鎖可変ドメインを含む。ある特定の実施形態では、FcRn抗体は、表1に記載される軽鎖可変ドメインに対し少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメインを含む。ある特定の実施形態では、抗体は、表1に記載される重鎖可変ドメイン、または、表1に記載される重鎖可変ドメインに対し少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%同一である重鎖可変ドメインと、表1に記載される軽鎖可変ドメイン、または、表1に記載される軽鎖可変ドメインに対し少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメインと、を含む。

【0079】

一実施形態では、FcRn抗体は、CDR配列、すなわち表1に記載されるCDR1H、CDR2H、及びCDR3H、を含む重鎖可変ドメインと、V_H1、V_H2、V_H3、もしくはV_H4のフレームワーク（すなわち、FW1、FW2、FW3、及びFW4）、または、V_H1、V_H2、V_H3、もしくはV_H4のフレームワークに対し少なくとも85%、90%、もしくは95%同一であるフレームワークと、を含有する。一実施形態では、FcRn抗体は、表1に記載されるCDR配列を含む重鎖可変ドメインと、当該重鎖可変ドメインが表1に記載される可変ドメインに対し少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるようなフレームワークと、を含有する。

【0080】

一実施形態では、FcRn抗体は、CDR配列、すなわち表1に記載されるCDR1L、CDR2L、及びCDR3Lを含む軽鎖可変ドメインと、V_L1、V_L2、V_L3、もしくはV_L5のフレームワーク（すなわち、FW1、FW2、FW3、及びFW4）、または、V_L1、V_L2、V_L3、もしくはV_L5のフレームワークに対し少なくとも85%、90%、もしくは95%同一であるフレームワークと、を含有する。一実施形態では、FcRn抗体は、表1に記載されるCDR配列を含む軽鎖可変ドメインと、当該軽鎖可変ドメインが表1に記載される軽鎖可変ドメインに対し少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるようなフレームワークと、を含有する。

【0081】

一実施形態では、FcRn抗体は、CDR配列、すなわち表1に記載されるCDR1H、CDR2H、及びCDR3H、を含む重鎖可変ドメインと、V_H1、V_H2、V_H3、もしくはV_H4のフレームワーク（すなわち、FW1、FW2、FW3、及びFW4）、または、V_H1、V_H2、V_H3、もしくはV_H4のフレームワークに対し少なくとも85%、90%、もしくは95%同一であるフレームワークと、V_L1、V_L2、V_L3、もしくはV_L5を含む軽鎖可変ドメイン、または、V_L1、V_L2、V_L3、もしくはV_L5に対し少なくとも85%、90%、もしくは95%同一である配列と、を含有する。

【0082】

「同一性」とは、2つのアミノ酸または核酸の配列間で共有される、同一な位置の数またはパーセンテージを指し、2つの配列の最適な配列比較のために導入される必要のあるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れている。

10

【0083】

アミノ酸配列が、別のアミノ酸配列に対し少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%同一であると記載される場合、これらのアミノ酸配列は保存的置換によって異なる（全ての置換が保存的置換である場合を含む）可能性がある。

【0084】

一部の場合では、アミノ酸置換は、(a)置換エリアにおけるペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、または(c)側鎖のバルク、の維持に及ぼす影響が顕著に異なる置換を選択することによって、行われ得る。例えば、天然に存在する残基は、側鎖の性質に基づいて以下の群に分類することができる；(1)疎水性アミノ酸（メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン）；(2)中性親水性アミノ酸（システイン、セリン、及びトレオニン）；(3)酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）；(4)塩基性アミノ酸（アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、及びアルギニン）；(5)鎖配向に影響を及ぼすアミノ酸（グリシン及びプロリン）；ならびに(6)芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン、及びフェニルアラニン）。これらの群内でなされる置換は、保存的置換とみなすことができる。置換の例としては、限定するものではないが、以下の置換が挙げられる：アラニンに対するバリン、アルギニンに対するリジン、アスパラギンに対するグルタミン、アスパラギン酸に対するグルタミン酸、システインに対するセリン、グルタミンに対するアスパラギン、グルタミン酸に対するアスパラギン酸、グリシンに対するプロリン、ヒスチジンに対するアルギニン、イソロイシンに対するロイシン、ロイシンに対するイソロイシン、リジンに対するアルギニン、メチオニンに対するロイシン、フェニルアラニンに対するロイシン、プロリンに対するグリシン、セリンに対するトレオニン、トレオニンに対するセリン、トリプトファンに対するチロシン、チロシンに対するフェニルアラニン、及び/またはバリンに対するロイシン。

20

30

【0085】

配列の類似性を決定するための方法及びコンピュータープログラムは公的に入手可能であり、以下に限定するものではないが、GCGプログラムパッケージ（Devereux et al., Nucleic Acids Research 12:387, 1984）、BLASTP、BLASTN、FASTA（Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)）、及びALIGNプログラム（バージョン2.0）が挙げられる。よく知られているスミス・ウォーターマンアルゴリズムも、類似性の決定に使用することができる。BLASTプログラムは、NCBI及び他のソース（BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; BLAST2.0 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>）から公的に入手可能である。配列比較の際には、これらの方法により、様々な置換、欠失、及び他の修飾が説明される。

40

【0086】

50

本明細書で使用する「相補性決定領域」(CDR、すなわち、CDR1、CDR2、及びCDR3)という用語は、抗原結合のために必要な存在である、抗体可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは、通常、CDR1、CDR2及びCDR3として識別される3つのCDR領域を有する。各相補性決定領域は、Kabatにより定義される「相補性決定領域」(すなわち、軽鎖可変ドメインにおける24~34(L1)、50~56(L2)及び89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメインにおける31~35(H1)、50~65(H2)及び95~102(H3)について)からのアミノ酸残基を含むことができる。同様に、「フレームワーク」(FW)は、Kabat番号付け方式を考慮に入れて、軽鎖可変ドメインにおける1~23(FW1)、35~49(FW2)、57~88(FW3)、及び98~107(FW4)のアミノ酸ならびに重鎖可変ドメインにおける1~30(FW1)、36~49(FW2)、66~94(FW3)、及び103~113(FW4)のアミノ酸を含む(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987, 1991))。

10

【0087】

Kabat残基の名称は、必ずしもアミノ酸残基の直線的番号付けに直接対応しているわけではない。実際の直線的アミノ酸配列は、基本的な可変ドメイン構造における構造的成分(フレームワークであっても、相補性決定領域(CDR)であっても)の短縮または挿入に対応して、厳密なKabat番号付けよりも少ないアミノ酸またはさらなるアミノ酸を含有する可能性がある。残基における正確なKabat番号付けは、抗体の配列中の相同的な残基と「標準的な」Kabat番号付け配列との配列比較により、所与の抗体に対して決定することができる。

20

【0088】

本明細書で使用される「抗体可変ドメイン」とは、抗体分子の軽鎖及び重鎖の一部を指し、これには相補性決定領域(CDR;すなわち、CDR1、CDR2、及びCDR3)ならびにフレームワーク領域(FR)のアミノ酸配列が含まれる。 V_H は重鎖の可変ドメインを指す。 V_L は軽鎖の可変ドメインを指す。

30

【0089】

抗体は、特定の抗原または物質を認識しそれに結合するタンパク質である。好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合部分は、少なくとも天然のリガンド(例えば、IgG Fc)と同じ強度でFcRnと結合する。親和性は、抗原と抗体との解離に関する平衡定数(Kd)によって表され、抗原決定基と抗体結合部位との間の結合強度を測定するものである。抗原に対する抗体の親和性は、好適な表面プラズモンエネルギー共鳴測定法によって決定することができる。そのような測定法は、国際特許出願公開第WO2005/012359号及び本明細書の他の箇所に記載されるBIACORE(登録商標)アッセイであり得る。親和性を決定する他の方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ、またはラジオイムノアッセイなどの競合アッセイが挙げられる。

40

【0090】

結合活性は、抗体とその抗原との間の結合強度の尺度である。結合活性は、抗原決定基と抗体上の抗原結合部位との間の親和性ならびに、抗体当たりの結合部位の数(数価)の両方に関連する。例えば、一価の抗体(例えば、FabまたはscFv)は、特定のエピトープに対して1つの結合部位を有する。IgG抗体は、2つの抗原結合部位を有する。典型的なKの値(解離定数 K_d の逆数)は、 $10^5 \sim 10^{11}$ リットル/molである。 10^4 リットル/molより小さい任意のKが、非特異的結合を示すものとみなされる。

【0091】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合部分は、 $10^5 \sim 10^{12}$ リットル/mol、 $10^6 \sim 10^{12}$ リットル/mol、 $10^7 \sim 10^{12}$ リットル/mol、 $10^8 \sim 10^{12}$ リットル/mol、 $10^9 \sim 10^{12}$ リットル/mol

50

10^1 、 $10^{10} \sim 10^{12}$ リットル/mol、または $10^{11} \sim 10^{12}$ リットル/molの K_d で、ヒトFcRnのFc結合部分に結合する。他の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合部分は、 $10^5 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^6 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^7 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^8 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^9 \sim 10^{11}$ リットル/mol、または $10^{10} \sim 10^{11}$ リットル/molの K_d で、ヒトFcRnのFc結合部分に結合する。他の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合部分は、 $10^5 \sim 10^{10}$ リットル/mol、 $10^6 \sim 10^{10}$ リットル/mol、 $10^7 \sim 10^{10}$ リットル/mol、 $10^8 \sim 10^{10}$ リットル/mol、または $10^9 \sim 10^{10}$ リットル/molの K_d で、ヒトFcRnのFc結合部分に結合する。他の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合部分は、 $10^5 \sim 10^8$ リットル/mol、 $10^6 \sim 10^8$ リットル/mol、または $10^7 \sim 10^8$ リットル/molの K_d で、ヒトFcRnのFc結合部分に結合する。

10

20

30

40

50

【0092】

ヒトに投与されたときに免疫原性を最小限にするために、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分は、ヒト定常領域を含むことが好ましい。したがって、抗体は任意のアイソタイプまたはサブタイプとすることができ、以下に限定するものではないが、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA、IgD、またはIgEが含まれる。抗体クラスは、エフェクター機能を最適化するように（例えば、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増加または低減するように）選択することができる。ある特定の実施形態では、定常領域（すなわち、C_H1、C_H2、C_H3、及び/またはヒンジ領域）は、例えばFc受容体への結合を増加または減少させるために、修飾される。ある特定の実施形態では、定常領域は、重鎖-重鎖結合を促進または安定化させるために修飾される。ある特定の実施形態では、抗体はIgG₄抗体であり、重鎖のヒンジ領域は、241位のセリンをプロリンに変更することによって修飾され、これにより血清半減期の延長がもたらされる（Angal et al., 1993, Mol. Immunol. 30: 105-108）。ある特定の実施形態では、抗体はIgG₄抗体であり、重鎖の478位のC末端のリジンが欠失される。一部の実施形態では、当該IgG₄抗体は両方のS241P修飾を有し、C末端リジンが欠如している。

【0093】

ある特定の実施形態では、FcRn結合抗体断片が提供される。Fvは、6つの超可変ループ（CDR）を含めた完全な重鎖及び軽鎖可変ドメインを含有する最小の断片である。定常ドメインは欠如し、可変ドメインは非共有結合的に会合している。重鎖及び軽鎖は、V_H及びV_Lドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能にするリンカーを使用して、単一のポリペプチド鎖（「単鎖Fv」または「scFv」）に接続することができる。例えば、Bird et al., 1988, Science 242: 423 及びHouston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879を参照。一実施形態では、当該リンカーは（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₃である。scFv断片は、全抗体の定常領域が欠如しているため、全抗体よりもかなり小さい。また、scFv断片は、通常为重鎖定常ドメインと他の生物学的分子との相互作用も有さず、ある特定の実施形態で望まれ得る。

【0094】

本明細書で使用される「抗体」とは、単量体及び多量体を指す。インタクトな抗体（多量体を含む）、または抗体の抗原結合領域を有する抗体断片を使用することができる。抗原結合領域としては、以下に限定するものではないが、Fv、scFv、Fab、Fab'、及びF(ab')₂断片が挙げられる。抗体断片を調製する方法は、当技術分野で周知である。例えば、重鎖のヒンジ領域が欠如している一価のFab断片は、パピンを用いたタンパク質分解消化によって、全免疫グロブリンから調製することができる。重鎖のヒンジ領域を保持する二価のF(ab')₂断片は、ペプシンを用いたタンパク質分解消

化によって調製することができる。

【0095】

V_H 、 V_L 、及び任意選択により C_L 、 C_{H1} 、または他の定常ドメインを含有する抗体の断片も、使用することができる。そのような断片を、組換えにより産生することもできる。多くの他の有用な抗原結合抗体断片が当技術分野で公知であり、以下に限定するものではないが、二重特異性抗体、三重特異性抗体、単一ドメイン抗体、ならびに他の一価及び多価の形態が挙げられる。

【0096】

さらに、多価の抗原結合タンパク質（以下に限定するものではないが、抗体、その抗原結合断片、及び抗体の全てまたは一部の抗原結合部分を含むタンパク質の形態をとり得る）が提供される。多価の抗原結合タンパク質は、単一特異的、二重特異的、または多重特異的であり得る。特異性という用語は、特定の分子が結合することができる、異なるタイプの抗原決定基の数を指す。免疫グロブリン分子が1つのタイプの抗原決定基のみに結合する場合、この免疫グロブリン分子は単一特異的である。免疫グロブリン分子が異なるタイプの抗原決定基に結合する場合、この免疫グロブリン分子は多重特異的である。

10

【0097】

一実施形態では、多価の単鎖抗体は、可変の重鎖断片に結合した可変の軽鎖断片（scfvに類似）を含み、これはさらに、別のペプチドリンカーにより、少なくとも1つの他の抗原結合ドメインに結合する。典型的には、このペプチドリンカーは、約15アミノ酸残基から構成される。好ましい実施形態では、 V_L 及び V_H ドメインの数が等しい。例えば、二価の単鎖抗体は、以下のように表すことができる： $V_L - L_1 - V_H - L_2 - V_L - L_3 - V_H$ 、または $V_L - L_1 - V_H - L_2 - V_H - L_3 - V_L$ 、または $V_H - L_1 - V_L - L_2 - V_L - L_3 - V_H$ 。三価以上の多価の単鎖抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の単鎖抗体に連結された1つ以上の抗体断片を有する。三価の単鎖抗体の一例は、 $V_L - L_1 - V_H - L_2 - V_L - L_1 - V_H$ である。

20

【0098】

2つの単鎖抗体は、組み合わせて二重特異性抗体（二価の二量体としても知られる）を形成することができる。例えば、欧州特許出願第0404097号またはHollingert et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444を参照。二重特異性抗体は、2つの鎖を有する。二重特異性抗体の各鎖は、約5~10アミノ酸残基の短いリンカー（例えば、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂）によって V_L ドメインに接続した V_H ドメインを含む。そのようなリンカーは、同じ鎖のドメイン間における鎖内の対合を防止する程度に十分短いため、異なる鎖の相補ドメイン間における鎖間の対合を推進し、2つの抗原結合部位を再形成する。二重特異性抗体の構造はコンパクトであり、分子の両端に抗原結合部位を有する。

30

【0099】

V_H 及び V_L のフレームワーク配列変異体及び親和性成熟抗体は、前臨床エキソピボアッセイに供して潜在的免疫原性を評価することができる。このようなアッセイの1つにEPISCREEN（商標）があり、これは、タンパク質治療薬に対するT細胞応答を定量化することにより、T細胞の免疫原性を予測するための有効な技術をもたらすものである。当該アッセイは、世界的母集団において発現されるHLA-DRアロタイプの数及び頻度を最も良好に代表するように、MHCクラスIIハプロタイプに基づいて慎重に選択された血液ドナーのコホートを使用する。当該アッセイは、全タンパク質の免疫原性を、T細胞応答の大きさ及び頻度の両観点から評価し得る方法を提供する（Jones et al., J Interferon Cytokine Res. 2004 24(9): 560-72; Jones et al., J Thromb Haemost. 2005 3(5): 991-1000）。

40

【0100】

50

本明細書で開示される抗体とFcRnとの結合に対し競合もしくは交差遮断する抗体、または本明細書で開示される抗体によって自らの結合が交差遮断される抗体は、本明細書で開示されるFcRn活性を遮断する方法で使用することができる。一部の 경우에는、これらの競合抗体、交差遮断抗体、または被交差遮断抗体は、本明細書に記載される抗体が結合するエピトープに隣接及び/または重複しているFcRnのエピトープに結合する。一部の 경우에는、これらの競合抗体、交差遮断抗体、または被交差遮断抗体は、本明細書に記載される抗体が結合するエピトープと同じFcRnのエピトープに結合する、キメラ型抗体、完全ヒト型抗体、またはヒト化型抗体である。

【0101】

競合抗体、交差遮断抗体、及び被交差遮断抗体は、当技術分野で公知の任意の好適な方法を使用して同定することができ、この方法には、競合抗体または交差遮断抗体とヒトFcRnとの結合によって本明細書で開示される抗体の結合が防止される、またはその逆である、競合ELISAまたはBIACORE（登録商標）アッセイが含まれる。

10

【0102】

ある特定の実施形態では、当該競合抗体または交差遮断抗体は、ヒトIgGのヒトFcRnへの結合を遮断する抗体であって、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、及び配列番号58からなる群から選択される重鎖配列と、配列番号20、配列番号22、配列番号61、配列番号64、配列番号67、及び配列番号70からなる群から選択される軽鎖配列とを有する抗体の結合に対し、競合またはクロス遮断する抗体である。一部の実施形態では、当該競合または交差遮断は、80%超、85%超、90%超、または95%超である。

20

【0103】

一部の実施形態では、当該競合抗体または交差遮断抗体は、ヒトIgGのヒトFcRnへの結合を遮断する抗体であって、配列番号56の重鎖配列及び配列番号22の軽鎖配列を有する抗体の結合に対し、競合または交差遮断する抗体である。一部の実施形態では、当該競合または交差遮断は、80%超、85%超、90%超、または95%超である。

【0104】

ある特定の実施形態では、当該競合抗体または被交差遮断抗体は、ヒトIgGのヒトFcRnへの結合を遮断する抗体であって、自らのFcRnへの結合が、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、及び配列番号58からなる群から選択される重鎖配列と、配列番号20、配列番号22、配列番号61、配列番号64、配列番号67、及び配列番号70からなる群から選択される軽鎖配列とを有する抗体によって、競合または交差遮断される抗体である。一部の実施形態では、当該競合または被交差遮断抗体は、80%超、85%超、90%超、または95%超で競合または交差遮断される。

30

【0105】

一部の実施形態では、当該競合抗体または被交差遮断抗体は、ヒトIgGのヒトFcRnへの結合を遮断する抗体であって、自らのFcRnへの結合が、配列番号56の重鎖配列及び配列番号22の軽鎖配列を有する抗体の結合によって、競合または交差遮断される抗体である。一部の実施形態では、当該競合または被交差遮断抗体は、80%超、85%超、90%超、または95%超で競合または交差遮断される。

40

【0106】

一部の実施形態では、当該競合抗体、交差遮断抗体、または被交差遮断抗体は、キメラ型、完全ヒト型、またはヒト化型である。一部の実施形態では、当該競合抗体、交差遮断抗体、または被交差遮断抗体は、 $10^5 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^6 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^7 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^8 \sim 10^{11}$ リットル/mol、 $10^9 \sim 10^{11}$ リットル/mol、または $10^{10} \sim 10^{11}$ リットル/mol

50

の親和性で、ヒトFcRnのFc結合部位に結合する。

【0107】

また、本明細書では、抗FcRn抗体及びその機能的断片をコードする核酸、ベクター、宿主細胞ならびに発現系が提供される。抗FcRn抗体及びその機能的断片をコードする核酸は、例えば、DNA、cDNA、RNA、合成的に産生されたDNAもしくはRNA、または、これらのポリヌクレオチドを単独でもしくは組み合わせで含む、組換えにより産生されたキメラ型核酸分子とすることができる。例えば、真核及び/または原核宿主細胞における発現に好適な発現制御配列に対し作用可能に結合した、本明細書に記載される抗FcRn抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターが提供される。バクテリアなどの原核細胞及び真核系（限定するものではないが、酵母及び哺乳細胞培養系を含む）で抗体及び断片を効率的に合成するため、様々な発現ベクターが開発されている。ベクターは、染色体配列、非染色体配列及び合成DNA配列のセグメントを含むことができる。

10

【0108】

任意の好適な発現ベクターを使用することができる。例えば、真核クローニングベクターには、E. coliからのプラスミド、例えば、colE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、pKSM、及びRP4、が含まれる。真核ベクターには、ファージDNAの派生物、例えばM13及び他の系状一本鎖DNAファージ、が含まれる。酵母に有用なベクターの例に、2µプラスミドがある。哺乳動物細胞における発現に好適なベクターとしては、よく知られているSV40、アデノウイルス、レトロウイルス由来のDNA配列の派生物、及び上述のような機能的哺乳動物ベクターの組み合わせに由来するシャトルベクター、及び機能的プラスミド、例えば、pLenti6.3/V5-DEST（登録商標）、T-Rex（商標）-DEST31（登録商標）、pGene/V5-His pGene/V5-His（登録商標）（Life Technologies, Norwalk, CT）、が挙げられる。

20

【0109】

さらなる真核発現ベクターが当技術分野で知られている（例えば、P. J. Southern and P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341 (1982); Subramani et al., Mol. Cell. Biol., 1: 854-864 (1981); Kaufmann and Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982); Kaufmann and Sharp, Mol. Cell. Biol. 159, 601-664 (1982); Scahill et al., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80, 4654-4659 (1983); Urlaub and Chasin, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, (1980)）。

30

40

【0110】

発現ベクターは、発現されるDNA配列または断片に作動可能に結合した、少なくとも1つの発現制御配列を含有することができる。制御配列は、クローニングされたDNA配列の発現を制御及び調節するためにベクターに挿入される。有用な発現制御配列の例には、lac系、trp系、tac系、trc系、lambdaファージの主要オペレーター領域及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、酵母の解糖プロモーター（例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ）、酵母の酸性ホスファターゼのプロモーター（例えば、Pho5）、酵母のアルファ接合因子、ならびにサイトメガロウイルス、ポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルス、及びサルウイルスに由来するプロモーター

50

(例えば、SV40の初期プロモーター及び後期プロモーター)、ならびに原核細胞または真核細胞及びそのウイルスまたはその組み合わせの遺伝子発現を制御することが知られている他の配列、がある。使用することができる他の発現制御配列の例としては、チャイニーズハムスターの伸長因子1 (CHEF1) 遺伝子からのDNA制御配列が挙げられる (Running Deer & Allison, 2004, Biotechnol. Prog. 20: 880-889; 米国特許第5, 888, 809号)。

【0111】

また、先に説明した発現ベクターを含有する組換え型宿主細胞も提供される。本明細書に記載の抗体及びその抗原結合部分は、ハイブリドーマ以外の細胞株で発現することができる。本明細書に記載されるポリペプチドをコードする配列を含む核酸は、好適な哺乳動物宿主細胞の形質転換のために使用することができる。

10

【0112】

特に好ましい細胞株は、高いレベルの発現、目的のプロテインの構成的発現及び宿主タンパク質からの最低限の混入、に基づいて選択される。発現の宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当技術分野で周知であり、多くの不死化細胞株、例えば、以下に限定するものではないが、NS0細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞及びその他多数が挙げられる。一部の実施形態では、当該細胞はミエローマ細胞、例えばSP2/0であり、これは、高濃度のIgGを腹水から回収することができるマウスの腹腔中にトランスフェクトし、培養下で増殖させることができる。好適なさらなる真核細胞としては、酵母及び他の真菌類が挙げられる。有用な原核宿主としては、例えば、E. coli (例えば、E. coli SG-936、E. coli HB 101、E. coli W3110、E. coli X1776、E. coli X2282、E. coli DHI、及びE. coli MRC1)、Pseudomonas、Bacillus (例えば、Bacillus subtilis)、及びStreptomycesが挙げられる。

20

【0113】

これらの存在する組換え型宿主細胞は、抗体またはその抗原結合部分の産生に使用することができ、これは、抗体またはその断片の発現を可能にする条件下で細胞を培養し、抗体またはその断片を宿主細胞または宿主細胞の周囲の媒体から精製することによって行われる。したがって、一実施形態では、FcRnのFc結合領域と結合可能な抗体を産生するための方法であって、(a) 上述のように宿主細胞を培養することと、(b) 前記抗体を宿主細胞または宿主細胞の培地から単離することと、を含む、方法が提供される。

30

【0114】

形質転換宿主は、当技術分野で公知の手法に従って、発酵槽で増殖させ、培養することができる。ひとたび抗体の発現が所望レベルに到達したら、硫酸アンモニウム沈殿法、親和性カラムでの精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法などを含めた、当技術分野の標準的な手順に従って、抗体を精製することができる。本明細書に記載される治療方法における使用に関しては、抗体は、少なくとも90%、95%、98%、または99%の純度に精製されることが好ましい。

【0115】

組換え型宿主細胞中で分泌するための発現抗体または断片の標的化は、目的の抗体コード遺伝子の5'末端に、シグナルまたは分泌リーダーペプチドコード配列を挿入することによって、容易に行うことができる (Shokri et al., Appl Microbiol Biotechnol. 60(6): 654-64 (2003), Nielsen et al., Prot. Eng. 10: 1-6 (1997) 及び von Heijne et al., Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986) を参照)。これらの分泌リーダーペプチド要素は、原核配列または真核配列のいずれかに由来し得る。したがって、分泌リーダーペプチドは、ポリペプチドのN末端に連結して、ポリペプチドの移動を宿主細胞サイトゾルの外に向け、分泌を培地内に向けさせるアミノ酸であり、好適に使用される。

40

50

【0116】

当該抗体またはその抗原結合部分は、さらなるアミノ酸残基に対し融合していてもよい。このようなアミノ酸残基は、単離を容易にする可能性のあるペプチドタグであり得る。当該抗体が特定の臓器または組織にホーミングするための他のアミノ酸残基も企図される。

【0117】

一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合部分は1つ以上のエフェクター分子にコンジュゲートされており、これにより、何らかの所望の性質（例えば、血清半減期の増加）が当該抗体またはその抗原結合部分にもたらされる。特定の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合部分は、ポリエチレングリコール（PEG）にコンジュゲートされる。PEGは、任意のアミノ酸側鎖または末端アミノ酸官能基、例えば、遊離アミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、またはカルボキシ基に付着していてもよい。PEGを抗体に付着させる方法は、当技術分野で公知であり、用いることができる。例えば、欧州特許出願第EP0948544号；欧州特許出願第EP1090037号；“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications,” 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York；“Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications,” 1997, J. Milton Harris & S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC；“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences,” 1998, M. Aslam & A. Dent, Grove Publishers, New York；or Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531-545を参照。

10

20

【0118】

別の実施形態では、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分は、当該抗体をコードする核酸を遺伝子導入動物において発現させ、当該抗体を発現させ回収できるようにすることによって、作製される。例えば、当該抗体は、組織特異的に発現させることができ、これにより回収及び精製が容易になる。ある1つのこのような実施形態では、授乳中の哺乳動物の分泌腺で発現される抗体。遺伝子導入動物としては、以下に限定するものではないが、マウス、ヤギ、及びウサギが挙げられる。

30

【0119】

本明細書では、酸性pH及び生理的pHの両方でFcRnと結合する抗体を同定する方法が提供される。当該方法は、酸性pH（例えば、pH5.0～6.6、pH5.8～6.4、pH6.0～6.2、またはpH6.0）で行われる、2つ以上のスクリーニングステップを含む。この2つ以上の酸性スクリーニングステップは、生理的pH（例えば、pH6.8～8.2、pH6.8～7.6、pH7.2～7.4、またはpH7.4）で行われるスクリーニングステップと交互に行われる。

40

【0120】

例えば、このような方法の一実施形態は、

(a) 候補抗体の集合を、pH5.8～6.4でFcRnまたはその一部に接触させ、FcRnまたはその一部に結合する抗体を単離することと、

(b) ステップ(a)の単離抗体を、pH5.8～7.6でFcRnまたはその一部に接触させ、FcRnまたはその一部に結合する抗体を単離することと、

(c) ステップ(b)の単離抗体を、pH5.8～6.4でFcRnまたはその一部に接触させ、FcRnまたはその一部に結合する抗体を単離することと、を含む。

【0121】

50

別の実施形態は、

- (a) F c R n 結合抗体候補の集合を用意することと、
 - (b) F c R n 結合抗体候補の集合を、 F c R n またはその一部に、 p H 6 . 0 で、 F c R n またはその一部と F c R n 結合抗体候補の少なくとも一部との間に複合体が形成されるような条件下で、接触させることと、
 - (c) 複合体を単離することと、
 - (d) F c R n 結合抗体候補を、単離複合体から分離することと、
 - (e) ステップ (d) からの、分離された F c R n 結合抗体候補を、 F c R n またはその一部に、 p H 7 . 4 で、 F c R n またはその一部と F c R n 結合抗体候補の少なくとも一部との間に複合体が形成されるような条件下で、接触させることと、
 - (f) ステップ (e) で形成された複合体を単離することと、
 - (g) F c R n 結合抗体候補を、ステップ (f) の単離複合体から分離することと、
 - (h) ステップ (g) からの、分離された F c R n 結合抗体候補を、 F c R n またはその一部に、 p H 6 . 0 で、 F c R n またはその一部と F c R n 結合抗体候補の少なくとも一部との間に複合体が形成されるような条件下で、接触させることと、
 - (i) ステップ (h) で形成された複合体を単離することと、
 - (j) F c R n 結合抗体候補を、ステップ (i) の単離抗体から分離して、酸性 p H 及び生理的 p H の両方で F c R n に結合する抗体を得ることと、
- を含む。

10

20

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態では、当該 F c R n 結合抗体候補の集合は、抗体またはその一部のライブラリー（例えば、ファージに提示される s c F v のライブラリー）とすることができる。

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態では、 F c R n またはその一部の濃度は、各接触ステップで減少する。例えば、ステップ (b) は 2 5 n M の濃度で行われ得、ステップ (e) は 2 . 5 n M の濃度で行われ得、ステップ (h) は 0 . 2 5 n M の濃度で行われ得る。

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態では、当該 F c R n またはその一部は、固体支持体（例えば磁気ビーズ）に付着していてもよい。そのような実施形態では、単離ステップは単に、抗体と、固体支持体に付着した F c R n またはその一部との結合であり得、例えば、固体支持体がクロマトグラフィーカラムである場合にそのような可能性がある。一部の実施形態では、 F c R n またはその一部は、 F c R n またはその一部と抗体との間の複合体の単離を容易にする部分に付着していてもよい。例えば、 F c R n またはその一部は、ビオチンに付着していてもよい。

30

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載の、抗体またはその抗原結合部分の物理的性質及び機能的性質は、通例の手順によって決定することができる。例えば、抗体が F c R n 活性を遮断する能力は、いくつかの方法によって評価することができる。1つのやり方は、 F c R n の F c 結合領域に結合することが知られている抗体との競合的結合を示すことである。もう1つのやり方は、異化作用からの血清 I g の保護を示すことである。例えば、 A k i l e s e t a l . , 2 0 0 7 , J . I m m u n o l . 1 7 9 : 4 5 8 0 - 8 8 を参照。別のやり方は、試験薬剤の存在下で、 F c R n における抗体を再利用または経細胞輸送する能力を測定することである。例えば、 C l a y p o o l e t a l . , 2 0 0 2 , J . B i o l . C h e m . 2 7 7 : 2 8 0 3 8 - 5 0 では、ヒト F c R n 及び $\beta_2 m$ を発現するようにトランスフェクトされた M a d i n - D a r b y イヌ腎臓 (M D C K) 細胞を使用して、 I g G の経細胞輸送を実証した。 F c R n を内因的に発現する、他の好適な極性化上皮細胞株としては、ヒト腸上皮細胞株 T 8 4 及び C a c o - 2 が挙げられる。実施例では、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分における、 F c R n に結合し、クラス I I M H C による抗原提示及びクラス I M H C による交差提示を阻害する能力を決定するため

40

50

のアッセイ法が提供される。

【0126】

本明細書では、免疫複合体（IC）の処理を調節する抗FcRn抗体の能力を決定するための、全血ベースのアッセイが提供される。FcRnは、単量体IgGに結合し異化作用に向かわせないように機能し、このようにしてIgGの血清半減期が延びる。一方、多量体のIgGまたは抗原-抗体ICは、FcRnと相互作用してサイトカイン産生を活性化し、かつICを抗原提示経路に誘導する。FcRnの主な役割は、おそらくはIgG含有ICの摂取、処理、及び提示を介した、細胞性免疫機能の調節である。FcRn生物学におけるこの態様に関連したサイトカイン産生活活性化により、抗FcRn抗体における、このFcRn-IgG相互作用を調節する（例えば、遮断するまたは減らす）能力を決定するための、全血ベースのアッセイの開発が可能になる。

10

【0127】

一実施形態では、当該アッセイは、哺乳動物（例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類）から全血を得、試験抗体またはその抗原結合断片の存在下または非存在下で、予め形成した免疫複合体を全血に添加してサイトカインの産生を刺激することと、好適なサイトカインの産生量を測定することと、を含む。試験抗体またはその抗原結合断片が、試験抗体またはその抗原結合断片の存在下または非存在下で測定されたサイトカイン量と比較して、測定されたサイトカイン量を遮断するまたは減らすことができる場合、この試験抗体またはその抗原結合断片は、FcRnとICとの相互作用を妨害可能であるとみなされる。測定されたサイトカインがFcRnとICとの相互作用の結果であることを保証するための対照として、当該アッセイは、IgGがFcRnと結合不可能なICを用いて実行してもよい。このようなIgGは公知である（例えば、Qiao et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 9337-9342を参照）。このようなIgGを用いて当該アッセイを実行すれば、サイトカイン産生はない、または非常に少ない結果になるはずである。

20

【0128】

別の実施形態では、当該アッセイは、どの患者が抗FcRn抗体またはその抗原結合断片を用いた療法の利益を得る見込みがあるかを予測するために使用することもできる。このバージョンのアッセイでは、当該アッセイは、FcRnとICとの相互作用を遮断するまたは減らすのに有効であることが知られている、抗体またはその抗原結合断片を用いて実行される。既知の抗FcRn抗体またはその抗原結合断片の非存在下でアッセイを実行した場合との対比で、既知の抗FcRn抗体またはその抗原結合断片を用いたアッセイを実行した場合にサイトカイン産生量の顕著な低減を示す患者は、サイトカイン産生量のより少ない低減または皆無の低減を示す患者よりも、抗FcRn抗体またはその抗原結合断片を用いた療法から利益を得る見込みがより高いと考えられる。

30

【0129】

上述の別バージョンのアッセイは、対象または患者に、全血アッセイで使用するために対象または患者の血液を得る前に、試験抗体もしくはその抗原結合断片、または既知の抗FcRn抗体もしくはその抗原結合断片を投与することを伴う。このバージョンのアッセイでは、試験抗体もしくはその抗原結合断片、または既知の抗FcRn抗体もしくはその抗原結合断片は、既に血液中に存在することになるため、試験抗体もしくはその抗原結合断片、または既知の抗FcRn抗体もしくはその抗原結合断片は、全血に添加されない。

40

【0130】

全血ベースのアッセイの別の使用は、抗FcRn療法に対する患者の応答のモニターである。この実施形態では、当該アッセイは、抗FcRn抗体またはその抗原結合断片を所定の時間期間の間受けている患者の血液で実行される。予め形成したICを血液に添加し、産生されたサイトカインの量を測定する。この量を、抗FcRn抗体またはその抗原結合断片を用いた治療の開始前に得た、同じ患者の血液から産生された量と比較する。治療の開始前に実行される当該アッセイにおいて、産生されたサイトカインの量がより少ない場合、このことは患者が当該療法に応答していることを示す。治療の開始前に患者から採

50

取した血液において、治療が所定の時間期間の間進行した後に採取した血液と比較して、皆無の差、または有意でない差が観察される場合、このことは患者が当該療法に対し有意に応答していないことを示す。何らかの差が観察される場合では、差の大きさは、応答の大きさの指標となり、差が大きいほど、患者は抗FcRn療法に大きく応答していることになる。このバージョンのアッセイは、血液に抗FcRn抗体またはその抗原結合断片を添加することを伴わないと考えられる。

【0131】

本明細書では、試験抗体またはその抗原結合断片が、FcRnと免疫複合体との間の相互作用を遮断するかどうか、または減らすかどうかを決定する方法であって、

- (a) 哺乳動物から全血を得ることと、
- (b) 免疫複合体を、全血の第1の部分に添加することと、
- (c) 免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量のサイトカインを得ることと、
- (d) 試験抗体またはその抗原結合断片を、全血の第2の部分に添加することと、
- (e) 試験抗体またはその抗原結合断片の添加後にまたは添加と同時に、免疫複合体を、全血の第2の部分に添加することと、
- (f) 免疫複合体の添加後に、全血の第2の部分中のサイトカインの量を測定して、第2の量のサイトカインを得ることと、
- (g) 第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差を決定することと

、
を含み、

第1の量のサイトカインが第2の量のサイトカインよりも大きい場合、試験抗体またはその抗原結合断片がFcRnと免疫複合体との相互作用を遮断しているまたは減らしている、方法が提供される。

【0132】

本明細書では、抗FcRn療法に対する患者の応答性の期待レベルを決定する方法であって、

- (a) 抗FcRn療法の開始前に、患者から全血を得ることと、
- (b) 免疫複合体を、全血の第1の部分に添加することと、
- (c) 免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量のサイトカインを得ることと、
- (d) FcRnと免疫複合体との間の相互作用を遮断するまたは減らすことが知られている抗体またはその抗原結合断片を、全血の第2の部分に添加することと、
- (e) 抗体またはその抗原結合断片の添加後にまたは添加と同時に、免疫複合体を、全血の第2の部分に添加することと、
- (f) 免疫複合体の添加後に、全血の第2の部分中のサイトカインの量を測定して、第2の量のサイトカインを得ることと、
- (g) 第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差を決定することと

、
を含む、方法が提供される。

【0133】

第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差の大きさは、第1の量が第2の量よりも大きい場合、患者が抗FcRn療法に対して応答することが期待される程度を示す。この期待される応答の程度に応じて、患者は抗FcRn療法を受けるように選択され得る。

【0134】

本明細書では、抗FcRn療法に対する患者の応答をモニターする方法であって、

- (a) 抗FcRn療法の開始前に、患者から全血を得ることと、
- (b) 免疫複合体を、全血に添加することと、
- (c) 免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第1の量のサイ

トカインを得ることと、

(d) 抗FcRn療法の開始後に、患者から全血を得ることと、

(e) 免疫複合体を、ステップ(d)の全血に添加することと、

(f) ステップ(e)の免疫複合体の添加後に、全血中のサイトカインの量を測定して、第2の量のサイトカインを得ることと、

(g) 第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差を決定することと、

を含む、方法が提供される。

【0135】

第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差の大きさは、第1の量が第2の量よりも大きい場合、患者が抗FcRn療法に対して応答している程度を示す。観察された応答性の程度に応じて、抗FcRn療法を調整することができる。例えば、第1の量が第2の量よりもわずかに大きいに過ぎない場合、抗FcRn療法を増加させることができる。抗FcRn療法が本明細書に記載される抗体である場合、抗体の投与頻度を増加させ、かつ/または投与用量を増加させることができる。療法の調整後に、アッセイを再び実行してもよい。このようにして、アッセイ、療法調整、アッセイ、療法調整等の反復プロセスを行って、療法の最適なレベルを決定することができる。

10

【0136】

上述した方法における一部の実施形態では、第1の量のサイトカインと第2の量のサイトカインとの間の差は、対照の値と比較される。

20

【0137】

上述した方法における一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、ヒトは自己免疫性疾患にかかっている。一部の実施形態では、ヒトは、以下からなる群から選択される自己免疫性疾患にかかっている：尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴天疱瘡、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、特発性血小板減少性紫斑(ITP)、ヘパリン誘発性血小板減少症(HIT)、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、重症筋無力症(MG)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、多発性運動ニューロパチー、視神経脊髄炎、自己免疫性血小板減少症、免疫性好中球減少症、抗血友病FVIIIIインヒビター、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、ANCA関連疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、水胞性類天疱瘡、多発性硬化症(MS)、ギラン・バレー症候群、慢性多発ニューロパチー、潰瘍性大腸炎、糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス眼症、自己免疫性蕁麻疹、血管炎及びバラスムッセン脳炎。

30

【0138】

一部の実施形態では、免疫複合体は、抗原+抗原特異的抗体である。一部の実施形態では、免疫複合体は人工免疫複合体であり、すなわち、哺乳動物中に天然に存在しない。例えば、当該免疫複合体は、4-ヒドロキシ-5-ヨード-3-ニトロフェニル酢酸(NIP)とニワトリオボアルブミン(OVA)と抗NIP抗体との多量体複合体とすることができる。抗NIP抗体についての1つの可能性としては、4-ヒドロキシ-5-ヨード-3-ニトロフェニル酢酸に特異的なマウス可変領域と野生型ヒトIgG₁からのFcドメインとを含有するキメラ型IgG抗体がある(Claypool, 2004, Mol. Biol. Cell 15: 1746-1759)。別の実施形態では、抗NIP抗体は、Fcドメイン中にFcRnへの結合を無効にする3点突然変異(I253A/H310A/H435A)を伴うIgG抗体である。一部の実施形態では、免疫複合体は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のNIP部分を含むNIP-OVA抗体複合体である。

40

【0139】

本明細書に記載されるアッセイにおける免疫複合体の機能は、FcRnの多量体化である。したがって、当該アッセイは、この機能を行うことができる他の物質を用いて実行され得る。例えば、適切に間隔が置かれたFcドメインを有する物質を使用することができ

50

る。このような物質としては、FcRnが認識できるFcドメインを有する抗体でコーティングされたスチレンビーズ、または適切に間隔が置かれたFcドメインを含有するポリペプチドでコーティングされたスチレンビーズであり得る。抗体が当該ビーズに直接結合していてもよく、または、この抗体が認識する抗原が当該ビーズに直接結合し、抗体は、抗原を認識し抗原に結合することにより当該ビーズに付着していてもよい。

【0140】

したがって、本明細書では、FcRnを多量体化する方法であって、

(a) 哺乳動物から全血を得ることと、

(b) 全血に、適切に間隔が置かれたFcドメインを有する物質を添加し、全血中のFcRnが多量体化されることと、

を含む、方法が提供される。

10

【0141】

一部の実施形態では、抗FcRn抗体またはその抗原結合断片は、当該物質の前、または当該物質と同時に、全血に添加される。

【0142】

一部の実施形態では、当該方法は、(c) 全血中のサイトカインの量を測定すること、を含む。一部の実施形態では、サイトカインの量は、抗FcRn抗体または抗原結合断片の非存在下または存在下で測定され、測定された量の差が決定される。

【0143】

上述した方法における一部の実施形態では、当該サイトカインは、腫瘍壊死因子 (TNF-)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-10 (IL-10)、またはインターロイキン-12 (IL-12) である。全血中のサイトカインの量は、当技術分野で公知の方法によって測定することができる。例えば、サイトカインタンパク質の量はサイトカインに特異的な抗体を用いて測定することができ、または全血中のサイトカインのmRNA転写物の量を測定することができる。

20

【0144】

抗FcRn療法に対する患者の応答性の期待レベルの決定についての上記に記載した方法における一部の実施形態では、応答性の期待レベルを特定するレポート、及び/または患者が抗FcRn療法を受けるように選択されたというレポートが生成され、このレポートは医療提供業者に伝えられ、抗FcRn療法が患者に投与される。一部の実施形態では、応答性の期待レベルを特定するレポート、及び/または患者が抗FcRn療法を受けるように選択されたというレポートが生成され、このレポートは医師に伝えられ、医師は抗FcRn療法を投与するか、または別の医療提供業者に抗FcRn療法を投与するように指示する。

30

【0145】

上述されたアッセイ法における一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合断片は、IgG、Fab、F(ab')₂、二重特異性抗体、FV、scFV、遮断ペプチド、またはこれらの断片である。一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合断片は、F(ab')₂ である。一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合断片は、配列番号56を有する重鎖可変領域及び配列番号22を有する軽鎖可変領域を含む。

40

【0146】

上述の患者の抗FcRn療法に対する応答をモニターするための方法における一部の実施形態では、当該抗FcRn療法は、FcRnのFc結合領域に結合し、IgGのFcRnへの結合を遮断するまたは減らす抗体を、患者に投与することである。一部の実施形態では、当該抗体は、H3V₂、H3E8、G9V₂、またはG9E8である。一部の実施形態では、当該抗体は、配列番号49または配列番号55の配列を有する重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、当該抗体は、配列番号50または配列番号56に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む。一部の実施形態、例えばG9V₂では、当該抗体は、配列番号50に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号22に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。一部の実施形態、例えばH3V₂では、当該抗体は、配列番号

50

56に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号22に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、当該抗体は、IgG、Fab、F(ab')₂、二重特異性抗体、Fv、scFv、遮断ペプチド、またはこれらの断片である。一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合断片は、F(ab')₂である。

【0147】

一部の実施形態では、全血に添加される抗体の量は、様々な量を試験し用量-応答曲線を確認することによって決定される。一部の実施形態では、添加される抗体の量は、全血中の抗体濃度を1nM~1μM、10nM~750nM、または100nM~500nMにする程度に十分な量である。

【0148】

上述したアッセイ法における一部の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化型、キメラ型、または非天然存在の完全ヒト型である。

【0149】

本明細書で開示される抗体が結合するヒトFcRnの特定の領域またはエピトープは、当技術分野で公知の、任意の好適なエピトープマッピング法によって同定することができる。そのような方法には、当該抗体がFcRnのどのアミノ酸に結合するかを決定するために、FcRnからの様々な長さのペプチドをスクリーニングして当該抗体に結合するものを探ることが含まれる。当該ペプチドは、FcRnのタンパク質分解消化または化学合成などの周知の方法によって産生することができる。質量分析などの手法を使用して、当該抗体に結合するペプチドを同定してもよい。代替的に、NMR分光法またはX線結晶学を使用することができる。結合ペプチドは、ひとたび同定されれば、FcRnの同じエピトープと結合するさらなる抗体を得るための免疫原として使用することができる。

【0150】

本明細書に記載の抗FcRn抗体またはその抗原結合断片は、予防または治療の目的のために哺乳動物に使用される場合、薬学的に許容される担体を追加的に含む組成物の形態で投与されることになる。好適な薬学的に許容される担体としては、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、ブドウ糖、ヒスチジン、グルタミン酸塩、クエン酸塩、マンニトール、トレハロース、スクロース、アルギニン、酢酸塩、ポリソルベート80、ポロキサマー188などに加えて、これらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容される担体は、少量の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、保存料または緩衝液をさらに含むことができ、これらは抗体の貯蔵寿命または有効性を増強する。

【0151】

一部の実施形態では、抗体及び薬学的に許容される担体を含む当該組成物は、凍結乾燥される。

【0152】

抗体及び薬学的に許容される担体を含む当該組成物は、本明細書に記載の抗FcRn抗体またはその抗原結合部分を様々な濃度で含むことができる。例えば、当該組成物は、抗体を10mg/ml~200mg/ml、25mg/ml~130mg/ml、50mg/ml~125mg/ml、75mg/ml~110mg/ml、または80mg/ml~100mg/mlで含むことができる。また、当該組成物は、抗体を約10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、または150mg/mlで含むことができる。

【0153】

本明細書に記載される方法では、治療有効量の、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分が、それを必要としている哺乳動物に投与される。本明細書で使用される「投与する」という用語は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分を、哺乳動物に対し、求められる結果を達成し得る任意の方法によって送達させることを意味する。当該抗体またはその抗原結合部分は、例えば、皮下、静脈内、または筋肉内に投与することができ

10

20

30

40

50

る。本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分はヒトに対する投与に特に有用であるが、他の哺乳動物に投与することもできる。本明細書で使用される「哺乳動物」という用語には、以下に限定するものではないが、ヒト、実験動物、家庭用ペット及び家畜が含まれる。「治療有効量」とは、哺乳動物に投与された場合に所望の治療効果をもたらすために有効な、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分の量を意味する。例えば、疾患に応じて、抗体に関しては、0.1、1.0、3.0、6.0、または10.0 mg / Kgが必要とされ得る。150,000 g / モルの分子量を有するIgG (2つの結合部位) に関しては、これらの用量は、5 Lの血液量に対しおよそ18 nM、180 nM、540 nM、1.08 μM、及び1.8 μMの結合部位に対応する。

【0154】

ある特定の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合部分は、静脈内注入により哺乳動物に投与され、すなわち、当該抗体またはその抗原結合部分は、ある特定の時間期間にわたり哺乳動物の静脈内に導入される。ある特定の実施形態では、当該時間期間は、約5分、約10分、約30分、約1時間、約2時間、約4時間、または約8時間である。

【0155】

ある特定の実施形態では、当該抗体またはその抗原結合部分は、皮下送達により哺乳動物に投与され、すなわち、哺乳動物の皮膚の下に、一般的には皮膚をつまみ持ち上げて下部にある組織から離すことによって形成された皮膚の下の空間に、当該抗体またはその抗原結合部分を注入する。

【0156】

ある特定の実施形態では、1回用量の化合物または組成物が、毎日、1日おき、2日に1回、3日に1回、週1回、週2回、週3回、または2週に1回、対象に投与される。他の実施形態では、2回、3回または4回用量の化合物または組成物が、毎日、2日に1回、3日に1回、週1回、または2週に1回、対象に投与される。一部の実施形態では、化合物または組成物の用量(複数可)が、2日間、3日間、5日間、7日間、14日間、または21日間、投与される。ある特定の実施形態では、化合物または組成物の1回用量が、1ヵ月、1.5ヵ月、2ヵ月、2.5ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月またはそれ以上、投与される。

【0157】

投与方法には、以下に限定するものではないが、非経口、皮内、硝子体内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、経口、舌下、鼻腔内、大脳内、腔内、経皮、経粘膜、直腸、吸入、または局所的(特に耳、鼻、目、または皮膚に対して)が含まれる。投与様式は、実施する者の自由裁量に委ねられる。ほとんどの場合、投与は結果的に化合物の血流内への放出となる。

【0158】

特定の実施形態では、化合物を局在的に投与することが望ましい場合がある。これは、例えば、限定のためではないが、局在的注入、局所的適用、注射により、カテーテルを用いて、またはインプラントを用いて、達成することができ、前記インプラントは、シラスチック膜などの膜、または繊維を含めた、多孔質、非多孔質、またはゼラチン質の材料でできている。このような場合、投与は、かなりの程度の化合物を血流内に放出することなく、局在的組織を選択的に標的とすることができる。

【0159】

肺への投与も、例えば吸入器またはネブライザーの使用により、エアロゾル化剤を用いた配合により、またはフルオロカーボンもしくは合成肺サーファクタントでの灌流を介して、用いることができる。ある特定の実施形態では、化合物は、従来の結合剤及びトリグリセリドなどのビヒクルを用いて、座薬として配合される。

【0160】

別の実施形態では、化合物は小胞、特にリポソームで送達される(Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Dis

10

20

30

40

50

ease and Bacterial infection, Lopez - Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353 - 365 (1989); Lopez Berestein, *ibid.*, pp. 317 - 327を参照; 全般的には *ibid.* 参照)。

【0161】

別の実施形態では、化合物は、徐放系で送達される(例えば、Goodson, *Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 - 138 (1984)*を参照)。徐放系の例は、Langer, 1990, *Science* 249: 1527 - 1533による概説で論じられており、これを使用することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる(Langer, *supra*; Sef-ton, 1987, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14: 201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88: 507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574を参照)。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができる(*Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1974)*; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)*; Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61を参照; また、Levy et al., 1985, *Science* 228: 190; DURING et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105も参照)。

10

20

【0162】

上述の投与スケジュールは、説明の目的で提供されるに過ぎず、限定的にみなすべきではない。当業者であれば、全ての用量が本発明の範囲内であることを容易に理解することになる。

【0163】

「自己免疫性疾患」とは、対象自身の抗体が宿主組織に反応する、または免疫エフェクターのT細胞が内在性の自己ペプチドに自己反応性であり組織破壊を引き起こす、疾患のクラスを指す。したがって、免疫応答は、対象自身の抗原(自己抗原と呼ばれる)に対して開始される。本明細書で使用される「自己抗原」とは、正常な宿主組織の抗原を指す。正常な宿主組織は、腫瘍性細胞を含まない。

30

【0164】

FcRnに結合する抗体及び抗原結合断片を、免疫応答を調節するために、または免疫障害などの障害を治療、防止、または診断するために、対象に投与することができる。「治療する」という用語は、障害もしくは疾患の改善もしくは寛解、または障害もしくは疾患の進行の低減もしくは防止に有効な療法を投与することを指す。有効量は、例えば状態または障害、個々の対象に応じて変動し得、対象に合わせて対応され得る。FcRnに結合する抗体及び抗原結合断片は、インビトロで使用することもできる。

40

【0165】

一実施形態では、FcRnとIgG Fcとの間の相互作用を調節する方法であって、細胞中または対象中にあるFcRnを、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法が提供される。一実施形態では、当該調節は、FcRnとIgG Fcとの相互作用を阻害する。したがって、細胞によるまたは対象における抗体分解を促進する方法が提供される。一実施形態では、当該抗体は自己抗体である。別の実施形態では、当該抗体は治療抗体である。

【0166】

別の実施形態では、対象におけるIgG媒介疾患を治療または緩和する方法であって、

50

対象に、本明細書で開示される抗体または抗原結合断片を、I g G 媒介疾患の治療または緩和に有効な量で投与することを含む、方法が提供される。このような I g G 媒介疾患は、病原 I g G 抗体を単量体形態で、または I g G 含有免疫複合体 (I C) として伴う疾患であり得、凝血異常、血管炎、コラーゲン障害、皮膚科系疾患、神経系疾患、炎症性腸疾患、及び臓器特異的障害が含まれ得る。

【 0 1 6 7 】

別の実施形態では、胎盤を介した病原性抗体の伝播を遮断する方法であって、治療有効量の、本明細書で開示される F c R n 抗体またはその抗原結合部分を、それを必要としている妊娠中の哺乳動物に投与することを含む、方法が提供される。

【 0 1 6 8 】

別の実施形態では、F c R n による免疫複合体 (I C) の結合を阻害する方法であって、細胞中または対象中にある F c R n を、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法が提供される。したがって、抗原提示細胞 (A P C) による免疫複合体抗原の提示を阻害する方法であって、A P C を、ある量の抗体またはその抗原結合断片に接触させることを含む、方法も提供される。同様に、別の実施形態では、抗原提示細胞 (A P C) による免疫複合体抗原の交差提示を阻害する方法であって、A P C を、ある量の抗体またはその抗原結合断片に接触させることを含む、方法が提供される。

【 0 1 6 9 】

別の実施形態では、対象からの I C のクリアランスを増加させる方法であって、本明細書に記載される F c R n 抗体または抗原結合部分を、必要としている対象に投与することを含む、方法が提供される。このような方法は、I C 媒介血管炎を治療するために使用することができる。

【 0 1 7 0 】

別の実施形態では、抗原提示細胞 (A P C) による炎症性サイトカインの分泌を阻害する方法であって、A P C を、抗体またはその抗原結合断片に接触させることを含む、方法が提供される。炎症性サイトカインの非限定的な例としては、例えば、インターロイキン - 1 2 (I L - 1 2) 、インターロイキン - 6 (I L - 6) 及びインターフェロン (I F N) が挙げられる。

【 0 1 7 1 】

別の実施形態では、抗原提示細胞による T 細胞活性化を阻害する方法であって、抗原提示細胞を、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片に接触させることを含む、方法が提供される。

【 0 1 7 2 】

本明細書では、自己免疫性疾患を治療する方法であって、有効量の F c R n 抗体またはその抗原結合部分を、それを必要としている患者に投与することを含む、方法が提供される。治療することができる疾患の非限定的な例としては、天疱瘡 (尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡または腫瘍随伴天疱瘡) 、クローン病、特発性血小板減少性紫斑 (I T P) 、ヘパリン誘発性血小板減少症 (H I T) 、血栓性血小板減少性紫斑病 (T T P) 、重症筋無力症 (M G) 及び慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (C I D P) が挙げられる。さらなる非限定的な自己免疫性疾患としては、以下のものが挙げられる：自己免疫性血小板減少症、免疫性好中球減少症、抗血友病 F V I I I インヒビター、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、A N C A - 随伴性疾患、多発性筋炎、水疱性類天疱瘡、多発性硬化症 (M S) 、ギラン・バレー症候群、慢性多発ニューロパチー、潰瘍性大腸炎、糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス眼症、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、原発性硬化性胆管炎、全身性エリテマトーデス (S L E) 、自己免疫性脳脊髄炎、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、自己免疫性溶血性貧血、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症、混合性結合組織病、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫随伴性不妊症、糸球体腎炎 (例えば、半月体性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎) 、インシュリン抵抗性糖尿病、及び自己免疫性糖尿病 (1 型糖尿病 ; インシュリン依存性糖尿病) 。自己免疫性疾患は、アテローム動脈硬化症及びアルツハイマー病も包含するものと認識されている。別の実施形態では、自己免疫性疾患として以下

10

20

30

40

50

のものが挙げられる：肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ球増殖症候群（ALPS）、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、糸球体腎炎、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性高脂質血症、自己免疫性免疫不全症、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性膵炎、自己免疫性網膜炎、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性蕁麻疹ニューロパチー、自己免疫性軸索ニューロパチー、Baïo疾患、ベーチェット病、キャッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性再発性多巣的骨髄炎（CRMO）、チャグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、良性粘膜類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、コクサッキー心筋炎、CREST病、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、拡張型心筋症、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性血管中心性線維症、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、エヴァンス症候群、線維化肺肺炎、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、橋本脳炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性ヘルペス、特発性低補体血症性尿細管間質性腎炎、多発骨髄腫、多巣性運動ニューロパチー、NMDA受容体抗体脳炎、IgG4関連疾患、IgG4関連硬化性疾患、炎症性大動脈瘤、炎症性偽腫瘍、封入体筋炎、間質性膀胱炎、若年性関節炎、キュットナー腫瘍、ランバート・イトン症候群、白血球破砕性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、リニアIgA病（LAD）、ライム病、慢性、縦隔線維症、メニエール病、顕微鏡的多発性血管炎、ミクリッツ症候群、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーバーマン病、多巣的線維性硬化症、ナルコレプシー、視神経炎、オーモンド病（後腹膜線維症）、回帰性リウマチ、PANDAS（Streptococcusに関連する小児科自己免疫性神経精神医学的障害）、腫瘍随伴小脳変性症、異常タンパク性多発ニューロパチー、発作性夜間血色素尿（PNH）、パリーロンベルク症候群、パーソネージ・ターナー症候群、大動脈周囲炎、動脈周囲炎、末梢性ニューロパチー、静脈周囲脳脊髄炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、I型、II型、及びIII型自己免疫性多腺症候群、多発性筋痛リウマチ、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変症、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レーノー現象、反射性交感神経性ジストロフィー、ライテル症候群、再発性多発性軟骨炎、下肢静止不能症候群、リウマチ熱、リーデル甲状腺炎、類肉腫症、シュミット症候群、強膜炎、シェーグレン症候群、精液及び睾丸の自己免疫病、全身硬直症候群、細菌性亜急性心内膜炎（SBE）、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、未分化型葯隔組織疾患（UCTD）、小水疱性皮膚症、白斑、ラスムッセン脳炎、及びワルデンストレームマクログロブリン血症。

10

20

30

【0173】

他の実施形態では、感染性疾患を治療する方法であって、有効量のFcRn抗体またはその抗原結合部分を、それを必要としている患者に投与することを含む、方法が提供される。

【0174】

一部の実施形態では、Fcドメインを含有する治療タンパク質、例えば、Fcドメインを含む治療抗体または非抗体タンパク質の血清半減期を低減する方法が提供される。そのような方法は、このような治療タンパク質が望ましくない生理的影響を引き起こす場合に、この治療タンパク質の血流からの除去を増強することができる。この方法に好適であり得る治療タンパク質の例としては、TYSABRI（登録商標）（ナタリズマブ）及びAVASTIN（登録商標）（ベパシズマブ）が挙げられる。一部の実施形態では、当該方法により、治療タンパク質の半減期が約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%減る。

40

【0175】

一部の実施形態では、IgGが結合した放射性トレーサーまたは他の抗体-薬物結合体を循環から除去することが望ましい場合に、これら除去するための方法が提供される。一部の実施形態では、IgG低下剤を用いてFcRnをブロックすれば、内在性IgGレベルを減少させ、IgG含有治療剤の薬物動態及び薬物力学の増強を可能にすることにお

50

いて、有益であると考えられる。この場合、そのような治療剤を投与する前に、I g G 結合部位に特異的な抗 F c R n 抗体で前処理すれば、単量体形態の、または I g G 含有免疫複合体 (I C) としての内在性 I g G 抗体に由来する競合を低下させ、投与する I g G ベースの治療剤をいっそう保護することが可能になる。

【 0 1 7 6 】

本明細書では、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分を使用する方法が提供される。したがって、免疫応答の調節に、または免疫障害などの障害の治療、防止、または診断に使用するための、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分が提供される。また、F c R n と I g G F c との相互作用を調節して、細胞による、または対象における抗体分解の促進に使用するための、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分が提供される。一部の実施形態では、当該抗体は、自己抗体または治療抗体である。また、対象における I g G 媒介疾患の治療または緩和に使用するための、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分も提供され、当該 I g G 媒介疾患は病原 I g G 抗体を伴う疾患であり得、凝血異常、血管炎、コラーゲン障害、皮膚科系疾患、神経系疾患、炎症性腸疾患、及び臓器特異的障害が含まれ得る。

10

【 0 1 7 7 】

本明細書では、F c R n による免疫複合体 (I C) の結合の阻害、抗原提示細胞 (A P C) による免疫複合体抗原の提示の阻害、または抗原提示細胞 (A P C) による免疫複合体抗原の交差提示の阻害に使用するための、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分が提供される。また、抗原提示細胞 (A P C) による炎症性サイトカインの分泌の阻害に使用するための、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分も提供され、当該炎症性サイトカインには、例えば、インターロイキン - 1 2 (I L - 1 2) 、インターロイキン - 6 (I L - 6) 及びインターフェロン (I F N) が含まれる。また、T細胞活性化の阻害に使用するための、本明細書に記載の F c R n 抗体またはその抗原結合部分も提供される。

20

【 0 1 7 8 】

本明細書では F c R n 抗体またはその抗原結合部分が提供され、これらは本明細書で記載されるように、天疱瘡 (尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡または腫瘍随伴性天疱瘡) 、クローン病、特発性血小板減少性紫斑 (I T P) 、ヘパリン誘発性血小板減少症 (H I T) 、血栓性血小板減少性紫斑 (T T P) 、重症筋無力症 (M G) 及び慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (C I D P) の処置に使用される。さらなる非限定的な自己免疫性疾患としては、以下のものが挙げられる：自己免疫性血小板減少症、免疫性好中球減少症、抗血友病 F V I I I インヒビター、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、A N C A - 随伴性疾患、多発性筋炎、水疱性類天疱瘡、多発性硬化症 (M S) 、ギラン・バレー症候群、慢性多発ニューロパチー、潰瘍性大腸炎、糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス眼症、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、原発性硬化性胆管炎、全身性エリテマトーデス (S L E) 、自己免疫性脳脊髄炎、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、自己免疫性溶血性貧血、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症、混合性結合組織病、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫随伴性不妊症、糸球体腎炎 (例えば、半月体性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎) 、インシュリン抵抗性糖尿病、及び自己免疫性糖尿病 (1 型糖尿病 ; インシュリン依存性糖尿病) 。自己免疫性疾患は、アテローム動脈硬化症及びアルツハイマー病も包含するものと認識されている。別の実施形態では、自己免疫性疾患として以下のものが挙げられる：肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ球増殖症候群 (A L P S) 、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、糸球体腎炎、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性高脂質血症、自己免疫性免疫不全症、自己免疫性内耳疾患 (A I E D) 、自己免疫性心筋炎、自己免疫性膵炎、自己免疫性網膜炎、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性蕁麻疹ニューロパチー、自己免疫性軸索ニューロパチー、B a l o 疾患、ベーチェット病、キャッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性再発性多巣的骨髄炎 (C R M O) 、チャーク・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、良性粘膜類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝

30

40

50

集素症、コクサッキー心筋炎、CREST病、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、拡張型心筋症、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性血管中心性線維症、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、エヴァンス症候群、線維化肺胞炎、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、橋本脳炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性ヘルペス、特発性低補体血症性尿細管間質性腎炎、多発骨髄腫、多巣性運動ニューロパチー、NMDA受容体抗体脳炎、IgG4関連疾患、IgG4関連硬化性疾患、炎症性大動脈瘤、炎症性偽腫瘍、封入体筋炎、間質性膀胱炎、若年性関節炎、キョットナー腫瘍、ランバート・イトン症候群、白血球破砕性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、リニアIgA病（LAD）、ライム病、慢性、縦隔線維症、メニエール病、顕微鏡的多発性血管炎、ミクリッツ症候群、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーバーマン病、多巣的線維性硬化症、ナルコレプシー、視神経炎、オーモンド病（後腹膜線維症）、回帰性リウマチ、PANDAS（Streptococcusに関連する小児科自己免疫性神経精神医学的障害）、腫瘍随伴小脳変性症、異常タンパク性多発ニューロパチー、発作性夜間血色素尿（PNH）、パリーロンベルク症候群、パーソネージ・ターナー症候群、大動脈周囲炎、動脈周囲炎、末梢性ニューロパチー、静脈周囲脳脊髄炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、I型、II型、及びIII型自己免疫性多腺症候群、多発性筋痛リウマチ、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変症、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レーノー現象、反射性交感神経性ジストロフィー、ライテル症候群、再発性多発性軟骨炎、下肢静止不能症候群、リウマチ熱、リーデル甲状腺炎、類肉腫症、シュミット症候群、強膜炎、シェーグレン症候群、精液及び睾丸の自己免疫病、全身硬直症候群、細菌性亜急性心内膜炎（SBE）、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、未分化型葯隔組織疾患（UCTD）、小水疱性皮膚症、白斑、ラスムッセン脳炎、またはワルデンストレームマクログロブリン血症。

10

20

30

40

50

【0179】

本明細書に記載される方法では、本明細書に記載の治療有効量の抗体またはその抗原結合部分は、他の薬剤、薬物、またはホルモンと組み合わせ（例えば、同時に、順次に、または別個に）投与することができる。一部の実施形態では、当該他の薬剤、薬物、またはホルモンは、小分子、ペプチド、またはタンパク質（抗体または抗原結合断片を含む）とすることができる。一部の実施形態では、当該他の薬剤、薬物、またはホルモンは、同じ組成物で投与されても別個の組成物で投与されてもよい。一部の実施形態では、当該他の薬剤、薬物、またはホルモンは、本明細書に記載される障害、疾患、または状態を治療するための公知の薬剤、化合物、またはホルモンである。例えば、一部の実施形態では、当該他の薬剤は、免疫媒介疾患の処置のためのモノクローナル抗体療法とすることができる。他の実施形態では、当該他の薬剤は、補体系のインヒビターとすることができる。例えば、Fcガンマ受容体及びFcRnを対象とする組み合わせは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2015/164605に記載されている。

【0180】

一部の実施形態では、当該他の薬剤、薬物、またはホルモンは、免疫阻害剤、免疫賦活性剤、免疫調節物質、またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態では、当該他の薬剤、薬物、またはホルモンは、Ig静注療法；非ステロイド性抗炎症性薬物（NSAID）；コルチコステロイド；シクロスポリン、ラパマイシン、アスコマイシン、またはこれらの免疫阻害性アナログ、例えば、シクロスポリンA、シクロスポリンG、FK-506、ラパマイシン、40-0-(2-60ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキセート；ミコフェノレート；プレキナル；FTY720；レフルノミド；ミゾリピン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；15-デオキシスベルグアリン；免疫抑制性モノクローナル抗体、例えば、白血球受容体に対するモノクローナル抗体、例えば、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、もしくはCD58またはこれらのリガンド；他の免疫調節化合物、例えば、CTLA4Ig；他の接着分子インヒビター、例えば、mAbま

たは、セレクチンアンタゴニスト及びVLA-4アンタゴニストを含めた低分子量インヒビター；免疫調節サイトカイン、例えば、アルファ-インターフェロン、ガンマ-インターフェロン、または腫瘍壊死因子-アルファ；あるいは免疫賦活性サイトカイン、例えば、インターロイキン-2。

【0181】

本明細書では、対象における抗FcRn抗体の投与後の抗FcRn抗体のレベルを測定する方法であって、抗FcRn抗体の投与後に対象から単球を含む全血を得ることと、単球細胞表面のFcRn発現レベルを測定することと、を含む、方法が提供される。いかなる特定の理論にも限定されることなく、単球細胞表面FcRnレベルと抗FcRn抗体の存在との間に相関が存在することが示されている。単球細胞表面のFcRn発現レベルは、当技術分野で公知の任意の方法によって測定することができ、例えば、幾何平均蛍光強度を含むことができる。

10

【0182】

当業者によって、本明細書で開示される本発明の原理における変形形態が考案され得ることは、理解されかつ予想されるべきであり、このような変更は本発明の範囲内に含まれるべきであることが意図されている。

【0183】

本発明の全体にわたり、様々な刊行物が引用されている。こういった刊行物は、本発明が関係する最新技術を、より十分に説明するために、参照によりその全体が本明細書によって本出願に組み込まれる。以下の実施例は本発明をさらに例示するものであるが、いかなる形でも本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

20

【実施例】

【0184】

実施例1

可変ドメインのヒト化

ヒト投与用に好適な重鎖及び軽鎖可変領域を、マウスモノクローナル抗体に基づいて設計した。マウスモノクローナル抗体の選択は、FcRnに結合する能力ならびにFcRn及びIgG Fcの結合を遮断する能力に関して行った。マウス抗体は、ヒト血清アルブミンに対し実質的に結合しない。既存の抗体構造に基づいたモノクローナル抗体のモデルを使用して、ヒト抗体用の可変領域フレームワークをヒトV領域のセグメントから設計した。潜在的免疫原性を最小限にするために、ヒトT細胞エピトープを除去するように設計されたある特定のフレームワーク位置で選択されるアミノ酸を用いて、いくつかの変異体を設計した。

30

【0185】

重鎖及び軽鎖V領域遺伝子を、リガーゼ連鎖反応(LCR)を使用して全長遺伝子に組み立てられた重複オリゴヌクレオチドから構築し、次に増幅しクローニングに好適な制限部位を追加した。

【0186】

ヒトIgG4定常領域を用いて4つの重鎖変異体を構築した。これらの変異体を、V_H1、V_H2、V_H3、及びV_H4と称する。これら重鎖変異体の可変ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号12、14、16、及び18によって表される。これら重鎖変異体の可変ドメインのオリゴヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号11、13、15、及び17によって表される。図1は、4つの変異体の配列比較を示している。4つの軽鎖変異体を構築し、ヒトカップ鎖として発現させた。これらの変異体を、V_L1、V_L2、V_L3、及びV_L5と称する。これら軽鎖変異体のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号20、22、24、及び26によって表される。これら軽鎖変異体の可変ドメインのオリゴヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号19、21、23、及び25によって表される。図2は、4つの変異体の配列比較を示している。

40

【0187】

上流のサイトメガロウイルス即時/初期プロモーター/エンハンサー、免疫グロブリン

50

シグナル配列、及び免疫グロブリン定常領域を用いて、V領域遺伝子を哺乳動物発現ベクターにクローニングすることにより、抗体を全体のIgGとして発現させた。ベクターをHEK293A細胞にトランスフェクトし、発現を定量化し、抗体をプロテインAカラム上で精製した。

【0188】

HEK293A細胞への一過性トランスフェクションにより、4つの重鎖変異体及び4つの軽鎖変異体に対する重鎖-軽鎖組み合わせ全16通りを発現させた。プロテインAセファロースカラム上で抗体を精製し、定量化した。上に示されたように、FcRnは、主として初期の酸性エンドソーム中に存在し、低pHでFc領域に結合することにより、貪食されたIgGを取り込む。貪食されたIgGのFcに対するFcRnの結合を遮断するために、FcRn抗体が、生理的pH（例えば、pH7.4）の細胞内環境に曝露されたFcRnに結合することも望ましい。そのため、精製抗体のFcRnとの結合を、pH6.0及びpH7.4における競合ELISAアッセイで評価した。

10

【0189】

ELISAについては、Nunc Immuroマキシソープ96ウェル平底マイクロタイタープレートをpH7.4で終夜、Fc結合領域とは異なるアルブミン結合エピソードに特異的なFcRn抗体でプレコーティングした。翌日、pH7.4のPBSに希釈した1µg/mlの組換え型ヒトFcRn（Sino Biological Inc. Cat. No. CT009-H08H）をウェルに添加し、37°Cで1時間インキュベートした。一連の4倍希釈の25µg/ml~0.0015µg/mlの対照または試験IgG4抗体を、一定の濃度のビオチン化親マウス抗体と予混合し、プレートに添加し37°Cで1時間インキュベートした。ビオチン化mAbの結合を、ストレプトアビジン-HRP及びTMB基質で検出した。吸光度を450nmで読み取り、結合曲線をプロットした。16の組み合わせの結合をpH7.4及びpH6.0の両方で試験し、表2に示すように親マウス抗体との比較により定量化した。

20

変異体	平均力価 (µg/ml)	平均相対IC ₅₀ (キメラ型親IgG ₁ に対して)	
		pH7.4	pH6
親マウス	48.11	1	1
V _H 1/V _κ 1	82.19	1.14	1.09
V _H 1/V _κ 2	48.54	1.19	0.82
V _H 1/V _κ 3	39.52	1.98	1.56
V _H 1/V _κ 5	58.61	2.02	1.75
V _H 2/V _κ 1	113.52	1.24	0.92
V _H 2/V _κ 2	100.74	1.39	1.01
V _H 2/V _κ 3	88.11	1.93	1.37
V _H 2/V _κ 5	9.43	2.49	2.49
V _H 3/V _κ 1	103.85	1.40	1.26
V _H 3/V _κ 2	130.82	1.30	1.07
V _H 3/V _κ 3	106.68	2.01	1.73
V _H 3/V _κ 5	121.78	2.60	2.26
V _H 4/V _κ 1	46.20	1.36	1.21
V _H 4/V _κ 2	34.22	1.28	1.02
V _H 4/V _κ 3	118.37	1.77	1.70
V _H 4/V _κ 5	107.84	1.98	2.43

30

40

【0190】

50

実施例 2

親和性成熟

酸性 pH 及び生理的 pH における結合親和性を改善するため、重鎖及び軽鎖可変ドメイン CDR3 領域を変異させ、s c F v 形態において pH 6.0 及び pH 7.4 でスクリーニングした。s c F v を調製するため、重複 PCR を使用して、V_H 及び V_L をコードする遺伝子を 15 アミノ酸 (G₄S)₃ リンカーで組み立てた。s c F v 配列を遺伝子 3 融合タンパク質としてファージミドベクターにクローニングし、ベクターを E. coli (TG1) に形質転換させた。V_H1 及び V_L1 変異体を使用して親和性成熟プロセスを行った。スクリーニングのため、V_H1 における重鎖 CDR3 のライブラリーをヒト化型親 V_L1 軽鎖と合わせ、V_L1 における軽鎖 CDR3 のライブラリーをヒト化型親 V_H1 重鎖と合わせた。

【0191】

アミノ酸配列の変化を、オリゴヌクレオチド配列 KNCNNCNNCNNC SV CNW CYGG (配列番号 71) を使用して、重鎖 CDR3 H 領域のアミノ酸 98 ~ 103 位 (CDR3 H のアミノ酸 98 ~ 102 及び FW4 のアミノ酸 103) に導入した。変化は、選択されたアミノ酸の各位置について以下のように提供した：アミノ酸 98 : A、C、D、F、G、S、V、Y；アミノ酸 99 : A、C、D、F、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、Y；アミノ酸 100 : A、C、D、F、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、Y；アミノ酸 100a : A、C、D、F、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V、Y；アミノ酸 101 : A、D、G、H、P、R；アミノ酸 102 : D、F、H、I、L、N、V、Y；アミノ酸 103 : R、W。アミノ酸配列の変化を、オリゴヌクレオチド配列 TGTMR SVMGT VSKRS RRCWM CY YCBWCRYCTTC (配列番号 72) を使用して、軽鎖 CDR3 L 領域のアミノ酸 89 ~ 97 位に導入した。変化は、選択されたアミノ酸の各位置について以下のように提供した：アミノ酸 88 : C；アミノ酸 89 : H、K、N、Q、R、S；アミノ酸 90 : A、E、K、P、Q、T；アミノ酸 91 : C、S、W、Y；アミノ酸 92 : C、D、E、G、W、Y；アミノ酸 93 : D、G、N、S；アミノ酸 94 : N、S、T、Y；アミノ酸 95 : F、L、P、S；アミノ酸 96 : D、F、H、L、V、Y；アミノ酸 97 : A、I、T、V。

【0192】

各 CDR について、およそ $3 \sim 6 \times 10^6$ の DNA 配列を含有する約 $5 \sim 10 \times 10^7$ ファージのライブラリー (すなわち、各 DNA 配列につき約 10 ~ 20 のコピーが示された) を可溶性抗原との結合についてスクリーニングした。具体的には、ファージライブラリーを可溶性のビオチン化 FcRn を用いて混合し、次に FcRn - 抗体ファージ複合体をストレプトアビジンでコーティングしたビーズ上に捕捉した。酸性エンドソーム及び生理的 pH において FcRn に結合する抗体を得るため、交互の pH で連続的ラウンドのライブラリースクリーニングを行った。また、各連続的スクリーニングラウンドの厳密性を高めるため、FcRn 抗原の濃度を低減した。最初の選択ラウンドは、25 nM の抗原の目標濃度で pH 6.0 にて行った。第 2 のラウンドは、2.5 nM の抗原の濃度で pH 7.4 にて行った。第 3 のラウンドは、0.25 nM の抗原の濃度で pH 6.0 にて行った。

【0193】

V_H CDR3 及び V_L CDR3 のライブラリーから、合計で約 60 の s c F v 抗体をさらなる試験用に選択した。s c F v 抗体は、バクテリアのペリプラズム抽出物から調製し、競合 ELISA により pH 6.0 及び pH 7.4 で試験した。競合 ELISA では、固定された FcRn との結合について、s c F v 抗体断片をビオチン化親マウス抗体と競合させた。ヒト化型変異体の試験に使用した ELISA のように、96 ウェル平底マイクロタイタープレートを、Fc 結合領域とは異なるアルブミン結合エピトープに特異的な FcRn 抗体 1 µg/ml でプレコーティングした。結合は、pH 7.4 及び pH 6.0 で決定した。図 3 は、ヒト化型親 V_L1 軽鎖を有する s c F v として発現させた親和性成熟重鎖の 3 つ (H1、H3、E7) と、親 V_H1 重鎖を有する s c F v として発現させた

10

20

30

40

50

親和性成熟軽鎖の1つ(E8)について、pH6.0及びpH7.4の両方で、結合親和性の増加を示している。表3は、15の重鎖及び2つの軽鎖で観察され、親マウス抗体との比較により定量化された、結合の改善を示している。

表3 相対親和性				
変異体	配列番号	CDR配列	IC ₅₀ の減少倍数 (ヒト化型親scFVに対して)	
			pH7.4	pH6
親マウス			1	1
H1 V _H 1	52	STTVSPPL(W)	36.42	17.09
H3 V _H 1	56	STTVRPPGI(W)	50.00	25.51
E7 V _H 1	42	STTVSPPHL(W)	37.44	16.41
A7 V _H 1	30	STTVSPPI(W)	19.98	16.97
H4 V _H 1	58	STTVSAPGV(W)	9.29	6.50
E4 V _H 1	40	STTVHPDHN(W)	16.78	3.65
G4 V _H 1	34	STTVAPPRL(W)	24.44	18.58
A4 V _H 1	28	STTVSPADF(R)	7.18	5.04
C7 V _H 1	36	STTVHPDRN(W)	10.12	8.50
H2 V _H 1	54	STTVAPPAH(W)	23.78	14.20
G7 V _H 1	48	STTVAPPGH(W)	30.79	17.66
D1 V _H 1	38	STTVSPPAL(W)	26.88	15.06
F7 V _H 1	44	STTVAPPPL(W)	26.35	16.43
G4 V _H 1	46	STTVSPPHL(W)	29.01	18.89
G9 V _H 1	50	STTVSPRV(W)	25.27	21.71
親マウス			1	1
E8V _κ 1	66	CHQYYSTPYT	11.66	7.21
B7 V _κ 1	63	CHQYYNTPYT	6.58	6.38

10

20

30

40

50

【0194】

V_H1フレームワーク中に親和性成熟重鎖CDR3を含有するscFvについて、結合の大幅な改善が測定された。そのため、これらの重鎖を改善された軽鎖と組み合わせて試験を進めた。上の実施例1で示したように、V_H1及びV_H2軽鎖は、V_H1(及び他のV_H変異体)と対合させたときに類似した結合を示し、V_H2フレームワークはV_H1よりも免疫原性が低いことが予測された。そのため、親和性成熟CDR3を含有するV_H1及びV_H2ベースの軽鎖を、改善された重鎖と組み合わせて試験を進めた。

【0195】

実施例3

IgG抗体の開発

8つの親和性成熟重鎖(A8、C4、F7、G4、G7、G9、H1、及びH3)を選択し、E8のCDR3を含有するヒト化型軽鎖(V_H1またはV_H2)と共に発現させた。HEK細胞の一過性トランスフェクションにより、16の組み合わせを二価のIgG4抗体として発現させ、次にこのIgG4抗体を精製した。親和性成熟重鎖をヒト化型であるが非親和性成熟軽鎖とも組み合わせて発現させ、ある特定の親和性成熟軽鎖をヒト化型であるが非親和性成熟重鎖と共に発現させた。

【0196】

実施例4

ELISAによって決定されるIgG4抗体の抗原結合及びブロック特性

直接結合ELISAにより、親和性成熟IgGを、ヒト化型親V_H1/V_H1IgGと比較した。Nunc Immuroマキシソープ96ウェル平底マイクロタイタープレ

ートを pH 7.4 で終夜、Fc 結合領域とは異なるアルブミン結合エピトープに特異的な FcRn 抗体でプレコーティングした。翌日、pH 7.4 の PBS に希釈した $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組換え型ヒト FcRn (Sino Biological Inc. Cat. No. CT009-H08H) をウェルに添加し、37 で 1 時間インキュベートした。次に、4% の乳汁/PBS で非特異的結合をブロックした。滴定したヒト化型親 IgG またはヒト化型親和性成熟 IgG をウェルに添加し、次に抗ヒトカップ HRP を使用して結合抗体を検出した。図 4 は、 $\text{H}1\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}1$ 、 $\text{H}1\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}2$ 、 $\text{G}7\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}1$ 、及び $\text{G}7\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}2$ IgG の固定された FcRn との結合が、ヒト化型親 $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ IgG またはキメラ型親マウス抗体と比較して増加したことを示している。

10

【0197】

また、IgG 4 抗体は抗原結合の試験も、競合 ELISA において pH 6.0 及び pH 7.4 で行った。Nunc Immuro マキシソープ 96 ウェル平底マイクロタイタープレート (Fisher, cat. no. DIS-971-030J) を pH 7.4 で終夜、Fc 結合領域とは異なるアルブミン結合エピトープに特異的な FcRn 抗体 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ でプレコーティングした。翌日、pH 7.4 の PBS に希釈した $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組換え型ヒト FcRn (Sino Biological Inc. cat. no. CT009-H08H) をウェルに添加し、37 で 1 時間インキュベートした。プレートを pH 7.4 の PBST で 3 回洗浄した後、プレートを pH 7.4 の PBSM で 37 にて 1 時間ブロックした。この時点以降、全ての洗浄及びインキュベートステップは、選択されたアッセイ pH (pH 6.0 または 7.4) で実施した。PBST で 3 回洗浄した後、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ から最終濃度 $0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの一連の試験抗体 4 倍希釈液を一定の濃度のビオチン化親マウス抗体 (最終濃度 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$) と予混合し、FcRn でコーティングしたプレートに添加し、37 で 1 時間インキュベートした。PBST 洗浄を 3 回行った後、ビオチン化 mAb の結合をストレプトアビジン-HRP (Sigma, cat. no. S5512) 及び TMB 基質 (Invitrogen, cat. no. 00-2023) で検出した。3M の HCl で反応を停止させ、Dynex Technologies MRX TC II プレートリーダー上で 450nm における吸光度を読み取り、結合曲線をプロットした。

20

【0198】

図 5 において 4 つの抗体 ($\text{H}1\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}1$ 、 $\text{H}1\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}2$ 、 $\text{F}7\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}1$ 、 $\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}2$) について示されるように、親和性成熟 IgG は、競合 ELISA において、キメラ型親マウス抗体及びヒト化型親 $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ 抗体と同様の挙動をとった。

30

【0199】

また、競合 ELISA は、一価 (scFv) または二価 (IgG) の形態で発現させた親和性成熟重鎖及び軽鎖のある特定の組み合わせをヒト化型親 $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ と比較するためにも使用した。図 6 は、pH 7.4 及び pH 6.0 の両方における $\text{H}3\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}1$ IgG、 $\text{H}3\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ scFv、 $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ IgG、及び $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ scFv の結合を比較するものである。scFv 形態では、親和性成熟 $\text{H}3\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ scFv は、 $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ scFv の親と比較して、結合の顕著な改善を示した。また、この scFv 形態と比較すると、二価の IgG として発現させた場合、 $\text{H}3\text{V}_{\text{H}1}\text{E}8\text{V}1$ IgG 及び $\text{V}_{\text{H}1}\text{V}1$ の両方が結合の改善を示した。

40

【0200】

さらなるヒト化型親和性成熟重鎖及びヒト化型親和性成熟軽鎖を競合 ELISA で試験した。ヒト化型親和性成熟重鎖及びヒト化型非親和性成熟軽鎖の組み合わせも試験した。得られた結果を表 4 及び 5 に概括する。これらは、pH 7.4 及び pH 6.0 で実施した実験における平均相対 IC_{50} 値ならびに実験回数 (n) を示すものである。これらの組み合わせにおける IC_{50} 値を、同じプレート上で試験したキメラ型親マウス抗体を基準に正規化した。

50

表 4

ヒト化型親和性 成熟組み合わせ	pH7.4 平均相対IC ₅₀	pH6.0 平均相対IC ₅₀
キメラ型	1.0	1.0
VH1/Vκ1	0.87	0.81
VH1_G4/Vκ1_E8	1.18 (n=2)	1.53 (n=2)
VH1_F7/Vκ1_E8	0.78 (n=1)	1.38 (n=2)
VH1_H1/Vκ1_E8	0.84 (n=1)	1.13 (n=3)
VH1_G7/Vκ1_E8	0.87 (n=1)	0.85 (n=3)
VH1_A8/Vκ1_E8	0.74 (n=1)	0.75 (n=3)
VH1_G9/Vκ1_E8	0.82 (n=1)	0.93 (n=3)
VH1_C4/Vκ1_E8	0.95 (n=2)	0.91 (n=2)
VH1_H3/Vκ1_E8	1.01 (n=1)	0.57 (n=2)
VH1_G4/Vκ2_E8	1.10 (n=2)	1.23 (n=2)
VH1_F7/Vκ2_E8	0.98 (n=1)	1.33 (n=2)
VH1_H1/Vκ2_E8	0.93 (n=1)	1.04 (n=3)
VH1_G7/Vκ2_E8	0.88 (n=1)	0.80 (n=3)
VH1_A8/Vκ2_E8	0.84 (n=1)	0.71 (n=3)
VH1_G9/Vκ2_E8	1.58 (n=1)	1.03 (n=3)
VH1_C4/Vκ2_E8	1.47 (n=2)	0.84 (n=2)
VH1_H3/Vκ2_E8	0.73 (n=1)	0.58 (n=2)

10

20

表 5

組み合わせ	pH7.4 平均相対IC ₅₀	pH6.0 平均相対IC ₅₀
キメラ型	1.0	1.0
VH1/Vκ1	1.06	0.92
VH1_H3/Vκ1	0.62 (n=3)	0.57 (n=2)
VH1_C4/Vκ1	0.59 (n=3)	0.60 (n=3)
VH1_G4/Vκ1	0.86 (n=3)	0.81 (n=3)
VH1_G9/Vκ1	n. d.	n. d.
VH1_G7/Vκ1	n. d.	n. d.
VH1_F7/Vκ1	0.66 (n=3)	0.76 (n=3)
VH1_H1/Vκ1	0.88 (n=3)	0.80 (n=2)
VH1_A8/Vκ1	0.89 (n=3)	0.87 (n=3)

30

40

n. d. =実施せず

【 0 2 0 1 】

pH 6.0における全ヒトIgGとの競合ELISAアッセイにおいて、ヒト化型親和性成熟抗体のFcRnへの結合をさらに評価した。Nunc Immuroマキシソープ96ウェル平底マイクロタイタープレート(Fisher, cat. no. DIS-971-030J)をpH7.4で終夜、FcRnのFc結合領域とは異なるアルブミン結合エピトープに特異的なFcRn抗体1μg/mlでプレコーティングした。翌日、pH7.4のPBSに希釈した0.5μg/mlの組換え型ヒトFcRn(Sino Biol

50

ogical Inc. cat. no. CT009-H08H) をウェルに添加し、37 で1時間インキュベートした。プレートをpH7.4のPBSTで3回洗浄した後、プレートをpH7.4のPBSTMで37 にて1時間ブロックした。この時点以降、全ての洗浄及びインキュベートステップは、アッセイpH6.0で実施した。PBSTで3回洗浄した後、25 µg/mlから最終濃度0.034 g µ/mlまでの一連の試験抗体3倍希釈液を一定濃度のビオチン化ヒト血清IgG (Sigma, cat. no. I4506、最終濃度25 µg/ml) と予混合し、プレートに添加し、37 で1時間インキュベートした。PBST洗浄を3回行った後、ビオチン化IgGの結合をストレプトアビジン-HRP (Sigma, cat. no. S5512) 及びTMB基質 (Invitrogen, cat. no. 00-2023) で検出した。3MのHClで反応を停止させ、Dy nex Technologies MRX TC IIプレートリーダー上で450 nmにおける吸光度を読み取り、結合曲線をプロットした。

10

【0202】

ヒト血清IgGの存在下でのpH6.0におけるヒト化型親和性成熟重鎖及びヒト化型親和性成熟軽鎖の組み合わせのFcRnへの結合を、キメラ型親マウス抗体のFcRnへの結合と比較した。結果を表6に概括する。平均相対IC₅₀値を、同じプレート上で試験したキメラ型抗体を基準に正規化した。

表6

組み合わせ	平均相対 IC ₅₀	実験回数
キメラ型	1.00	-
VH1/Vκ1	0.80	12
VH1_G4/Vκ1_E8	1.04	3
VH1_F7/Vκ1_E8	0.94	3
VH1_H1/Vκ1_E8	0.92	3
VH1_G7/Vκ1_E8	0.80	3
VH1_A8/Vκ1_E8	0.94	3
VH1_G9/Vκ1_E8	0.85	3
VH1_C4/Vκ1_E8	0.72	3
VH1_H3/Vκ1_E8	0.98	3
VH1_G4/Vκ2_E8	0.91	3
VH1_F7/Vκ2_E8	0.48	3
VH1_H1/Vκ2_E8	0.90	3
VH1_G7/Vκ2_E8	0.84	3
VH1_A8/Vκ2_E8	0.79	3
VH1_G9/Vκ2_E8	0.81	3
VH1_C4/Vκ2_E8	0.53	3
VH1_H3/Vκ2_E8	0.77	3

10

20

30

40

【0203】

ヒト血清IgGの存在下でのpH6.0におけるヒト化型親和性成熟重鎖及びヒト化型非親和性成熟軽鎖の組み合わせのFcRnへの結合を、親マウスFcRn抗体のFcRnへの結合と比較した。結果を表7に概括する。平均相対IC₅₀値を、同じプレート上で試験した親マウス抗体を基準に正規化した。

表7

組み合わせ	平均相対 IC ₅₀	実験回数
親	1.00	-
VH1_H1/Vκ2_E8	0.66	2
VH1_H1/Vκ1	0.73	2
VH1_H3/Vκ2_E8	0.69	3
VH1_H3/Vκ1	0.41	3
VH1_G9/Vκ2_E8	0.60	3
VH1_G9/Vκ1	0.61	3
VH1_C4/Vκ2_E8	0.66	2
VH1_C4/Vκ1	0.65	2
VH1_G4/Vκ2_E8	1.20	2
VH1_G4/Vκ1	0.87	2
VH1_F7/Vκ2_E8	0.95	2
VH1_F7/Vκ1	0.91	2
VH1_G7/Vκ2_E8	0.98	2
VH1_G7/Vκ1	0.90	2
VH1_A8/Vκ2_E8	0.52	2
VH1_A8/Vκ1	0.53	2

10

20

30

40

【0204】

ヒト化型親和性成熟重鎖及び軽鎖のいくつかの組み合わせならびにヒト化型親和性成熟重鎖とヒト化型非親和性成熟軽鎖との対合のいくつかの組み合わせに関するさらなるデータを、次の表8に示す。

表 8

hIgG競合	pH6.0	pH6.0	hIgG競合	pH6.0	pH6.0	hIgG競合	pH6.0	pH6.0
	キメラ型 に対する 相対IC ₅₀	親に 対する 相対IC ₅₀		キメラ型 に対する 相対IC ₅₀	親に 対する 相対IC ₅₀		キメラ型 に対する 相対IC ₅₀	親に 対する 相対IC ₅₀
キメラ型	1.00		キメラ型	1.00		キメラ型	1.00	
VH1/VK1 (親)	0.79	1.00	VH1/VK1 (親)	0.86	1.00	VH1/VK1 (親)	0.84	1.00
G7/E8VK1	0.72	0.91	A8/E8VK1	0.74	0.86	H3/VK1	0.46	0.70
G7/E8VK2	0.85	1.07	A8/E8VK2	0.53	0.61	F7/VK1	0.73	1.09
G9/E8VK1	0.68	0.86	H3/E8VK1	0.63	0.73	G4/VK1	0.55	0.82
G9/E8VK2	0.64	0.81	H3/E8VK2	0.55	0.63			

10

実施例 5

表面プラズモン共鳴を使用した mAb 結合動態の決定

【 0 2 0 5 】

抗体を pH 4.5 の 10 mM NaAc に希釈し、BIA CORE (登録商標) CM5 チップ上に固定し、およそ 500 ~ 1000 の RU レベルにした。pH 7.4 または pH 6.0 における 1 x PBS-P 中 12 ~ 800 nM の濃度の FcRn の注入により、分析を実施した。表 9 は、1 : 1 ラングミュアモデルを使用して適合させた動態データを示すものである。

20

抗FcRn mAb	pH7.4			pH6.0		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
G4V _H 1E8Vκ2	5.43E+04	5.44E-04	13.1	2.29E+05	2.98E-04	1.3
H1V _H 1E8Vκ2	4.38E+04	4.37E-04	12.1	4.67E+05	3.25E-04	0.7
G7V _H 1E8Vκ2	4.81E+04	5.35E-04	14.6	2.52E+05	3.10E-04	1.3
A8V _H 1E8Vκ2	4.38E+04	6.79E-04	18.2	3.19E+05	4.38E-04	1.4
G9V _H 1E8Vκ2	1.01E+05	4.11E-04	4.1	6.24E+05	3.49E-04	0.6
H3V _H 1E8Vκ2	1.14E+05	5.21E-04	4.8	7.00E+05	3.65E-04	0.5
H3V _H 1Vκ1	1.97E+05	2.12E-04	1.1	7.43E+05	1.32E-04	0.2
G4V _H 1Vκ1	1.14E+05	2.47E-04	2.2	4.56E+05	1.63E-04	0.4
キメラ型親マウス	1.37E+05	3.54E-04	2.7	5.61E+05	2.45E-04	0.4

30

40

【 0 2 0 6 】

さらなる試験では、BIA CORE (登録商標) により、親和性成熟重鎖及び軽鎖を含む IgG の親和性をヒト化型親 V_H1/V_L1 抗体と比較した。プロテイン A 及びアナライト (FcRn) でコーティングした CM5 チップの表面に抗体を流し、抗体を捕捉した。次の表 10 に示すように、親和性成熟重鎖及び軽鎖を含む抗体は、ヒト化型親 V_H1/V_L1 抗体に類似した親和性を示した。

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	χ^2
V _H 1/V _K 1	3.2E5	4.3E-4	1.39	0.11
H3V _H 1_E8V _K 2	3.2E5	6.0E-4	1.9	0.15
G7V _H 1_E8V _K 2	3.3E5	7.1E-4	2.1	0.15
G9V _H 1_E8V _K 2	6.1E5	5.1E-4	0.84	0.25
H1V _H 1_E8V _K 2	2.1E5	2.5E-4	1.2	0.02

10

【0207】

ある親和性成熟重鎖（すなわち、G9V_H1、H3V_H1、またはH1V_H1）を一定に保持する抗体間におけるV_H1を有する場合とV_H2を有する場合との対比較ならびに、V_H2を一定に保持する抗体間におけるH3V_H1を有する場合とG9V_H1を有する場合との対比較を行った。標準的なアミンカップリング化学を使用して、series S CM5 センサーチップ（GE Healthcare Cat. No. BR100530）表面のフローセル（F_c）1、2、3及び4にプロテインA（Sigma Cat. No. P6031）をコーティングした。pH5.0の10mMの酢酸緩衝液中20μg/mlのタンパク質濃度で固定化を行い、目標応答レベルを500レゾナンスユニット（RU）にした。10nMの抗体をF_c2、3及び4上で10μl/minで捕捉して約172のRU（50～150RUのアナライト結合レベル（R_{max}））を得、表面を安定させた。

20

【0208】

動態分析のため、50～0.02nM FcRnの2倍希釈範囲を選択した。FcRnアナライトの会合フェーズを450秒間モニターし、解離を40μl/分で1500秒間測定した。F_c1は参照チャンネルであり、他のフローセルからこれを減算して非特異的結合を補正した。動態値は、1：1結合モデルに基づいている（表11）。

mAb	F _c	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	χ^2
G9V _H 1_V _K 1	3	3.80E5	1.34E-4	0.35	0.30
G9V _H 1_V _K 2	4	4.25E5	1.40E-4	0.39	0.19
H3V _H 1_V _K 1	3	4.66E5	1.11E-4	0.24	0.28
H3V _H 1_V _K 2	4	5.46E5	1.20E-4	0.22	0.30
H1V _H 1_V _K 1	3	2.96E5	8.76E-5	0.30	0.55
H1V _H 1_V _K 2	4	2.89E5	9.28E-5	0.32	0.54
H3V _H 1_V _K 2	3	4.78E5	1.11E-4	0.23	0.25
G9V _H 1_V _K 2	4	3.18E5	1.27E-4	0.40	0.20

30

40

【0209】

さらなる試験では、製造業者による説明通りにアミンカップリング化学を使用してmAb（約500～700レゾナンスユニット）とカップリングさせたCM5センサーチップと共に、Biacore 3000装置（GE Healthcare）を使用して、表面プラズモン共鳴（SPR）を行った。カップリングは、アミンカップリングキット（GE

50

Healthcare)を使用して、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.5 (GE Healthcare)に3 μg/mlの各タンパク質を注入することによって実施した。HBS-P緩衝液pH 7.4 (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、0.005%のsurfactant P20)またはリン酸緩衝液pH 6.0 (67 mMリン酸緩衝液、0.15 M NaCl、0.005%のTween 20)をランニング緩衝液及び希釈緩衝液として使用した。滴定量の単量体ヒスタグ付きhFcRn (400.0 ~ 12.5 nM)を、pH 7.4またはpH 6.0の固定化した抗体に注入することにより、結合動態を決定した。全てのSPR実験を25、40 μl/minの流量で行った。結合データをゼロ調整し、参照セル値を減算した。BIAevaluation software (バージョン4.1)が提供するラングミュア1:1リガンド結合モデルを使用して結合動態を決定した。適合度の近似は統計値²によって説明される。

10

【0210】

図7は、表面プラズモン共鳴によって決定される、変異体軽鎖V₂または親和性成熟軽鎖E₈と対合させた親和性成熟重鎖G₉またはH₃における結合の会合及び解離のプロットを示すものである。動態速度定数は、次の12で提供される。動態速度定数は、簡易的な一次(1:1)ラングミュア二分子相互作用を使用して得た。動態値は、二重反復試験の平均値を表す。²(カイ2乗)値は、結合モデルに対する適合度を表す。

抗FcRn mAb	pH7.4				pH6.0			
	Ka (10 ⁴ /Ms)	Kd (10 ⁻⁴ /s)	KD (nM)	χ ²	Ka (10 ⁴ /Ms)	Kd (10 ⁻⁴ /s)	KD (nM)	χ ²
G9E8	4.1±0.1	6.7±0.4	16.3	1.3	6.9±0.2	12.0±0.1	17.4	2.3
H3E8	6.8±0.3	9.2±0.1	13.5	1.0	13.4±0.5	12.9±0.2	9.6	6.0
G9Vκ2	6.1±0.1	3.0±0.0	4.9	0.5	8.5±0.1	6.3±0.1	7.4	0.9
H3Vκ2	8.1±0.1	4.1±0.1	5.1	1.0	13.0±1.0	5.0±0.2	3.8	5.0

20

【0211】

さらなる試験では、製造業者による説明通りにアミンカップリング化学を使用して抗体(約550レゾナンスユニット(RU))とカップリングさせたCM5センサーチップと共に、Biacore 3000装置(GE Healthcare)を使用して、表面プラズモン共鳴(SPR)を行った。カップリングは、アミンカップリングキット(GE Healthcare)を使用して、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.5 (GE Healthcare)に2.5 μg/mlの各タンパク質を注入することによって実施した。HBS-P緩衝液pH 7.4 (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、0.005%のsurfactant P20)またはリン酸緩衝液pH 6.0 (67 mMリン酸緩衝液、0.15 M NaCl、0.005%のTween 20)をランニング緩衝液及び希釈緩衝液として使用した。滴定量(400.0 - 12.5 nM)の単量体ヒスタグ付きヒトFcRn (hFcRn) (JTA)を、pH 7.4またはpH 6.0の固定されたmAb H3Vκ2に注入することにより、結合動態を決定した。ヒトIgG1 (hIgG1)及びヒトIgG4 (hIgG4)については、10.000 ~ 325.0 nMを注入した。全てのSPR実験を25、40 μl/分の流量で行った。結合データをゼロ調整し、参照セル値を減算した。BIAevaluation software (バージョン4.1)が提供するラングミュア1:1リガンド結合モデルを使用して結合動態を決定した。適合度の近似は統計値²によって説明される。

30

40

【0212】

図12は、hIgG1、hIgG4、及びH3Vκ2についての結合の会合及び解離のプロットを示している。次の表13は、結果を表形式で示している。

	pH7.4				pH6.0			
	Ka (10 ⁴ /Ms)	Kd (10 ⁻⁴ /s)	KD (nM)	χ^2	Ka (10 ⁴ /Ms)	Kd (10 ⁻⁴ /s)	KD (nM)	χ^2
hIgG1	NA	NA	NA		10.8±0.3	823.9±5.4	762.8/1250	1.2/3.0
hIgG4	NA	NA	NA		9.9±0.4	1000.0±0.2	1010.1/970	1.8/0.2
H3Vk2	7.9±0.2	5.6±0.2	7.0	0.3	12.0±0.6	4.6±0.1	3.8	5.0

動態速度定数は、簡易的な一次(1:1)ラングミュア二分子相互作用を使用して得た。
 動態値は、二重反復試験の平均値を表す。
 χ^2 (カイ2乗) 値は、結合モデルに対する適合度を表す。
 データがラングミュア結合モデルに十分適合していないため、動態速度は概算値である。
 NA: 結合が弱いため取得されず。
 hIgG1及びhIgG4についてのKD値は、定常状態の親和性モデルを使用して推定した。

10

【0213】

予想されたように、hIgG1及びhIgG4は、厳密にpH依存的に結合することが示され、pH6.0ではおよそ1 μ MのKDであったが、中性pHでは(10.000nMの最高濃度の注入で)非常に弱い結合応答が得られるに過ぎなかった。

20

【0214】

さらなる試験では、H3Vk2の、2社の異なる供給業者から得たカニクイザルFcRn及びヒトFcRnに対する結合を試験した。

【0215】

製造業者による説明通りにアミンカップリング化学を使用してmAb H3Vk2(約550レゾナンスユニット(RU))とカップリングさせたCM5センサーチップと共に、Biacore3000装置(GE Healthcare)を使用して、表面プラズモン共鳴(SPR)を行った。カップリングは、アミンカップリングキット(GE Healthcare)を使用して、10mMの酢酸ナトリウム、pH4.5(GE Healthcare)に2.5 μ g/mlのH3Vk2を注入することによって実施した。HBS-P緩衝液pH7.4(0.01M HEPES、0.15M NaCl、0.005%のsurfactant P20)またはリン酸緩衝液pH6.0(67mMリン酸緩衝液、0.15M NaCl、0.005%のTween20)をランニング緩衝液及び希釈緩衝液として使用した。結合動態は、pH7.4またはpH6.0において、滴定量(400.0~12.5nM)の受容体を固定されたAb(単量体Hisタグ付きヒトFcRn(hFcRn))(JTA)、またはSINO Biological Incから得たヒトFcRn及びカニクイザルFcRn(cFcRn)に注入することによって決定した。全てのSPR実験を25、40 μ l/minの流量で行った。結合データをゼロ調整し、参照セル値を減算した。BIAevaluation software(バージョン4.1)が提供するラングミュア1:1リガンド結合モデルを使用して結合動態を決定した。適合度の近似は統計値 χ^2 によって説明される。

30

40

【0216】

図13は、結合の会合及び解離のプロットを示している。次の表14は、結果を表形式で示している。

【0217】

表 1 4 H3Vk2の結合動態				
抗FcRn mAb	Ka (10 ⁴ /Ms)	Kd (10 ⁻⁴ /s)	KD (nM)	χ^2
pH7. 4				
hFcRn (JTA) H3Vk2	6. 9±0. 2	3. 2±0. 3	4. 6	1. 3
hFcRn (SINO) H3Vk2	7. 2±0. 2	4. 3±0. 2	5. 9	2. 9
pFcRn (SINO) H3Vk2	4. 7±0. 1	5. 6±0. 0	11. 9	3. 0
pH 6. 0				
hFcRn (SINO) H3Vk2	7. 4±0. 1	4. 3±0. 2	5. 8	12. 0
pFcRn (SINO) H3Vk2	2. 2±0. 2	5. 1±0. 4	2. 3	9. 8
^a 動態速度定数は、簡易的な一次(1:1)ラングミュア二分子相互作用を使用して得た。動態値は、二重反復試験の平均値を表す。 ^b χ^2 (カイ2乗) 値は、結合モデルに対する適合度を表す。 [*] データがラングミュア結合モデルに十分適合していないため、動態速度は概算値である。				

10

20

【 0 2 1 8 】

この実験セットアップでは、SINO Biological Inc. から得た H3Vk2 のヒト FcRn 及び カニクイザル FcRn に対する結合動態を決定した。比較として、自家で産生し、ある特定の過去の研究で使用した単量体ヒト FcRn (JTA) を pH 7. 4 で本実験に含めた。SINO Biological Inc. による市販のヒト形態は、インハウスで産生したヒトバージョンに非常に類似した動態定数を示した。カニクイザル FcRn は、両方の pH 条件で抗体に結合することが示されたが、pH 7. 4 における親和性は、ヒト受容体よりも多少 (およそ 2 倍) 弱いものであった。

30

【 0 2 1 9 】

実施例 6

抗原提示アッセイ

骨髄樹状細胞 (BMDC) の調製 - 骨髄 (BM) 細胞を 8 匹のメス B6 . Cg - Fcgrt^{tm1Dcr} Tg (FCGRT) 32Dcr / DcrJ マウス (Jackson Laboratory ストック番号 014565) から採取した。これらのマウスは、FcRn 鎖のノックアウト対立遺伝子 (Fcgrt^{tm1Dcr}) を有し、ヒト FcRn プロモーターの制御下でヒト FcRn 鎖 (FCGRT) 導入遺伝子を発現する。完全 RPMI (C-RPMI) の入った約 70 の非 TC 処理ペトリ皿内に、BM 細胞を $2 \times 10^6 / 10 \text{ cm}^2$ で蒔いた。3 日目及び 6 日目に GM-CSF (20 ng / ml) を BM 細胞に補充し、BMDC 培養の 8 ~ 12 日目に使用のために採取 (または凍結) した。

40

【 0 2 2 0 】

抗原提示アッセイでは、BMDC による FcRn 媒介抗原提示を T 細胞活性化によって評価する。具体的には、BMDC を抗原 + 抗原特異的抗体 (NIP-OVA + 抗 NIP-IgG) の免疫複合体と共にインキュベートした後、抗原特異的 T 細胞の活性化を決定する。(アイソタイプが一致する非特異的な対照抗体と比較して) 抗 FcRn 抗体が (FcRn と IC との結合を遮断することにより) 抗原提示を阻害し、それにより NIP-OVA の処理及び T 細胞への提示を遮断する能力を、T 細胞活性化の決定によって評価する。T 細胞活性化は、ELISA を使用し IL2 及び IFN- の産生を定量化して評価する

50

。非特異的抗原提示用の対照（すなわち、抗原提示のバックグラウンドレベルがFcRnの媒介を受けない）は、BMDCを試験抗体及び非複合化抗原（すなわち、抗NIP-IgGを伴わないNIP-OVA）と共にインキュベートすることにより用意する。

【0221】

最初に、BMDCを試験抗体またはアイソタイプ対照と共にインキュベートする。具体的には、BMDCを96ウェルプレート内に $5 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ / ウェルにて播種し、37 で30～60分間インキュベートする。各ウェルに100 μl の各試験抗体（またはアイソタイプ対照）を添加して、50、25、12.5、6.25、または3.125 nMの抗体濃度を達成する。BMDC-抗体混合物を30～60分間インキュベートしてから免疫複合体（IC）を添加する。十分な数のウェルを準備して、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の活性化阻害に関して、そして三重反復における測定に関して、各抗体の希釈液一式を試験する。

10

【0222】

免疫複合体（IC）形成

抗NIP-IgG（2倍濃度 = 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）及びNIP-オボアルブミン（「NIP-OVA」）（2倍濃度 = 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）各2.5 mlを混合し、37 で60分インキュベートして、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の免疫複合体（IC）を形成する。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のNIP-OVAの未処理（すなわち、非複合化）試料5 mlを調製する。

【0223】

BMDCへの添加用に、各試験抗体（またはアイソタイプ対照）及びICの混合物を調製する。バックグラウンド対照を提供するため、各試験抗体をNIP-OVAとも混合する。具体的には、試験抗体の段階希釈液（100、50、25、12.5、6.25 nM）を調製し、各希釈液250 μl をIC 250 μl 及び100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のNIP-OVA 250 μl に添加して、50、25、12.5、6.25、及び3.125 nMの濃度の試験抗体を含有する試験抗体+ICまたは試験抗体+NIP-OVA溶液を産生する。

20

【0224】

試験抗体で処理済BMDCを含有する96ウェルプレートを遠心処理し、25 μl / ウェルの培地以外を全て取り除き、試験抗体+ICまたは試験抗体+NIP-OVA溶液100 μl をウェルに添加し、次に37 で2～3時間インキュベートする。

30

【0225】

T細胞調製物

CD8⁺T細胞を得るため、メスのOTI、C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Jマウス（Jackson Laboratoryストック番号003831）の脾臓及びリンパ節から単細胞懸濁液を採取する。これらの遺伝子導入マウスは、H2K^bのコンテキストにおいてオボアルブミン残基257～264を認識するように設計された遺伝子導入T細胞受容体を発現し、正の選択におけるペプチドの役割及びCD8⁺T細胞の抗原に対する応答を研究するために使用される。Miltenyiキットを使用して非CD8⁺T細胞を枯渇させる。

40

【0226】

CD4⁺T細胞を得るため、メスのOTII、B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Jマウス（Jackson Laboratoryストック番号004194）の脾臓及びリンパ節から単細胞懸濁液を採取する。これらの遺伝子導入マウスは、CD4共受容体と対合し、かつI-Abのコンテキストでニワトリオボアルブミン323～339に特異的である、マウスアルファ鎖及びベータ鎖T細胞受容体を発現する。Miltenyiキットを使用して非CD4⁺T細胞を枯渇させる。

【0227】

BMDC、試験抗体、及びIC（または非複合化NIP-OVA）を含有する96ウェルプレートを遠心処理し、25 μl / ウェル以外を除去し、ウェルを予熱したC-RPMIで2回洗浄する。

50

【0228】

1.5 × 10⁵ / 200 μl / ウェルの量のT細胞 (CD4⁺ または CD8⁺ のいずれか) を 37 °C で 24 時間インキュベートする。各ウェルから 150 μl を採取して、ELISA により IL2 を定量化する。150 μl / ウェルの C-RPMI を各ウェルに戻し、次に 37 °C でさらに 48 時間 (合計 72 時間) インキュベートする。この時点で各ウェルから 150 μl を採取して、ELISA により IFN-γ を定量化する。

【0229】

IL2 及び IFN-γ の培養上清への分泌を ELISA によって測定することにより、OTI (CD8⁺) 及び OTII (CD4⁺) T細胞の各培養条件に対する応答を評価する。IL2 は、24 時間時における両方の培養液、OTI については 1 から 3 に希釈したもの、OTII については 1 から 20 に希釈したものから測定する。IFN-γ は、24 時間時における 1 から 3 に希釈した OTI 培養液及び、72 時間時における 1 から 20 に希釈した OTII 培養液から測定する。

10

【0230】

実施例 7

免疫原性試験

抗体を前臨床エキソピボT細胞アッセイ (EPISCREEN (登録商標)、Antitope Ltd.) に供する。EPISCREEN (登録商標) (Antitope Ltd.) アッセイは、世界的母集団において発現される HLA-DR アロタイプの数及び頻度を代表するために選択されたコホートを使用して、タンパク質治療薬に対する T細胞応答を定量化することにより、T細胞免疫原性を有効に予測する。

20

【0231】

実施例 8

全血アッセイ

抗FcRn抗体が生理的に適切な環境においてサイトカイン産生を遮断する能力を試験するため、カニクイザルからの全血を使用したアッセイを開発した。全血に、0.1 μg/ml の NIP-OVA または抗NIPヒトIgG が結合した 0.1 μg/ml の NIP-OVA、のいずれかを添加した。NIP-OVA-IgG は、当該アッセイにおいて代理的な免疫複合体として機能し、FcRn に結合し、サイトカイン産生などの FcRn のエフェクター機能を始動させる。NIP-OVA-IgG の添加により、腫瘍壊死因子 (TNF-α)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-10 (IL-10)、及びインターロイキン-1 (IL-1) といったサイトカインが大量に産生された (それぞれ図 8、9、10、及び 14 の黒色のバーを参照)。これとは対照的に、NIP-OVA を単独で添加してもサイトカインは放出されなかった。NIP-OVA-IgG における IgG を IHH (Fcドメイン中に FcRn への結合を無効にする 3 点突然変異 (I253A/H310A/H435A) を伴う抗NIPヒトIgG1 (Qiaonet al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 9337-9342)) に置き換えた場合、サイトカイン放出は観察されなかった。これは、当該アッセイで測定された効果が FcRn 依存的事であることを示すものである。

30

【0232】

抗FcRn抗体 H3V₂ の存在下で NIP-OVA-IgG を添加したところ、サイトカイン産生量が著しく減少した (それぞれ図 8、9、10、及び 14 の灰色のバーを参照)。これは、本明細書に記載される抗FcRn抗体が FcRn と IC との相互作用による効果の 1 つを遮断するのに有効であることを示すものである。注目すべき点は、本アッセイにおいて全てのサルが顕著な量のサイトカインを産生したわけではないことである。したがって、全てのサルが H3V₂ によるサイトカイン産生の阻害を測定可能な程度に示したわけではない。顕著な量のサイトカインを産生しなかったサルは、抗FcRn抗体を用いた療法に適していないであろう。これとは逆に、顕著な量のサイトカイン産生を示し、H3V₂ の存在下でサイトカイン産生の良好な阻害を示したサルは、抗FcRn抗体を用いた療法に適しているであろう。

40

50

【0233】

図11は、H3V₂の量を増加させて添加した別の全血ベースのアッセイの結果を示している。グラフの右寄りにある3つのバーが示すように、H3V₂はサイトカイン産生量に用量依存的な阻害効果を及ぼすことが観察された。

【0234】

上述の全血アッセイを、ヒトからの全血での使用に適應させた。ヒト対象からのヘパリン化全血に、1.0 μg/ml ~ 100 μg/mlの様々な濃度で予め形成したNIP-OVAの免疫複合体を、安定的濃度の、抗NIPヒトIgG、またはFcRnに結合しないように変異させた抗NIP-IHHのいずれかと共に添加した。全血試料を37℃でインキュベートし、24時間後または36時間後に、ELISAまたはビーズアレイのいずれかによりサイトカインレベルを測定した。図17に示すように、NIP-OVA-IgG免疫複合体は、複数の異なるサイトカインの放出を刺激したが、NIP-OVA-IHH免疫複合体からの応答の欠如は、当該アッセイで測定された効果がFcRn依存的であったことを示すものである。

10

【0235】

図18は、IgG4形式の抗FcRn抗体であるH3E8及びH3V₂の存在下でNIP-OVA-IgGを添加したところ、サイトカイン産生量が減少したことを示している。当該アッセイを、H3V₂及びF(ab')₂形式の対照抗体を用いて再実施した。結果を図19に示す。この結果は、本明細書に記載される抗FcRn抗体が、ヒト全血において、FcRnとICとの相互作用による効果の1つを遮断するのに有効であることを示すものである。

20

【0236】

実施例9

IgGクリアランス研究

抗FcRn抗体がヒトIgGクリアランスに及ぼす影響を検討するため、遺伝子導入マウスを使用したインビボ試験を行った。ヒトFCGR_T導入遺伝子に対し半接合である20匹の14.9週±3日齢のhFcRn_{TG}マウスを、それぞれが5匹のメス及び5匹のオスを含む1群及び2群に分けた。0日目に、全てのマウスに対し、245 mg/kgのヒトIVIGを5 mg/kgの鶏卵リゾチーム特異的ヒト化型IgG1 mAb、HuLys11と混合して合計250 mg/kgにしたものを、静脈注入により予め投与した。IgG/HuLys11の静脈注入後48、56、72、80、96、120、及び144時間時に各マウスから血液試料を収集した。48時間時の採血の1時間後、20 mg/kgのH3V₂またはPBSを静脈投与した。HuLys11の血漿濃度をELISAにより定量化した。20 mg/kgのH3V₂を用いた処置により、HuLys11の血漿濃度において、PBS対照群に対して3倍の非常に顕著な低減(p=0.0001)がもたらされた。この結果は、H3V₂によるhFcRn遮断が、hIgGの循環からのクリアランスを促進することを示すものである。

30

【0237】

図15は当該研究の結果を示しており、48時間時のマウス血漿中のHuLys11の量を基準とした残留HuLys11(ヒトIgG1)のパーセント(±標準誤差)としてプロットされている。20 mg/kgのSYNT001注入は、この48時間時の採血の2時間後である。

40

【0238】

実施例10

免疫複合体クリアランス研究

抗FcRn抗体が、Qiao SW, PNAS 2008に従ってインビトロで形成されhFcRn_{TG}マウスに静脈内注入される、多量体免疫複合体に及ぼす影響を検討するため、遺伝子導入マウスを使用したインビボ試験を行った。ヒトFCGR_T導入遺伝子に対し半接合である16匹の8.1週+/-3日齢のhFcRn_{TG}マウスから、8匹のマウス(オス4匹/メス4匹)を2群にランダム抽出した。750 μg/mlのNIP

50

h I g G 抗 N I P を 7 5 μ g / m l の N I P 結 合 オ ボ ア ル プ ミ ン (O V A 1 つ 当 た り 1 1 の N I P 分 子) と 共 に、 P B S 中 で 室 温 で 2 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト す る こ と に よ り、 多 量 体 I C を 形 成 し た。 0 日 目 に、 各 グ ル ー プ の 8 匹 の マ ウ ス に 対 し、 N I P h I g G / N I P - O V A I C を そ れ ぞ れ 7 . 5 m g / k g 及 び 0 . 7 5 m g / k g、 静 脈 注 入 に よ り 予 め 投 与 し た。 こ れ は、 2 0 g の 体 重 用 量 に つ い て は 1 5 0 μ g の N I P h I g G + 1 5 μ g の N I P - O V A に 相 当 す る。 免 疫 複 合 体 の 静 脈 注 入 後 2 4、 3 2、 4 8、 5 6、 7 2、 9 6、 及 び 1 2 0 時 間 時 に 血 液 試 料 を 収 集 し た。 2 4 時 間 時 の 採 血 の 1 時 間 後、 2 0 m g / k g の H 3 V 2 ま た は P B S を 静 脈 投 与 し た。 N I P h I g G の 血 漿 濃 度 を E L I S A に よ り 定 量 化 し た。 こ の イ ン ビ オ 実 験 に お け る 結 果 は、 実 施 例 9 の 単 量 体 I g G に 見 ら れ た も の と 同 様 に、 I g G と 抗 原 と の 間 で 形 成 さ れ る 免 疫 複 合 体 の 異 化 作 用 に F c R n が も た ら す 保 護 を、 H 3 V 2 が 阻 害 す る こ と を 確 認 す る も の で あ る。

10

【0239】

図 1 6 は 当 該 試 験 の 結 果 を 示 し て お り、 示 さ れ た 時 点 に お け る 2 4 時 間 ベ ー ス ラ イ ン (± 標 準 誤 差) を 基 準 と し た 残 留 I C の 平 均 % と し て プ ロ ッ ト さ れ て い る。

【0240】

実施例 11

単球の F c R n 発現

抗 F c R n 抗体注入後の薬物動態性質及びさらなる薬物力学マーカーの応答を特徴づけるための、カニクイザル全血試料における単球の F c R n 発現。カニクイザルに対し、週に 1 回、静脈注入を介して、ビヒクル (1 群)、 1 0 m g / k g / 用 量 の H 3 V 2 (2 群)、 4 0 m g / k g / 用 量 の H 3 V 2 (3 群)、 また は 4 0 m g / k g / 用 量 の H 3 E 8 (4 群) の い ず れ か を 4 週 間 投 与 し、 そ の 後 に 4 週 間 の 回 復 期 間 を 設 け た。 全 血 試 料 を 静 脈 穿 刺 に よ り K 2 E D T A 抗 凝 固 剤 を 含 有 す る チ ュ ー プ 内 に 収 集 し、 分 析 時 まで 室 温 で 保 管 し た。 抗 F c R n 抗体の初回注入前及び最初の注入から 2 時間後に 2 つの試料を採取し、その後後続の各注入の直前及び 2 時間後に採取した。血液のアリコートを使用して、A D V I A に よ り 白 血 球 数 (合 計、 絶 対 及 び 差 分 %) を 測 定 し た。 白 血 球 数 及 び 総 リ ン パ 球 数 (T L C) を 全 血 の μ L 当 た り の リ ン パ 球 (細 胞 / μ L) と し て 報 告 し た。 全 血 の μ L 当 た り の リ ン パ 球 (細 胞 / μ L) に 加 え て、 単 球 の 細 胞 数 を 相 対 百 分 率 (%) と し て 報 告 し た。

20

【0241】

細胞外及び細胞内単球の F c R n 発現レベルを、フローサイトメトリーにより、F A C S C a n t o T M I I フローサイトメーターを F A C S D i v a T M ソフトウェアと共に使用して分析した。単球における細胞外及び細胞内の F c R n 受容体発現については、C D 4 5 + C D 1 4 + F c R n + 細胞における F c R n 発現の幾何平均蛍光強度 (G e o M F I) と、C D 1 4 + 単球母集団からの F c R n を 発 現 す る C D 1 4 + 単球の百分率の値を報告した。加えて、単球 (C D 4 5 + / C D 1 4 +) の 絶 対 数 及 び 相 対 百 分 率 を 報 告 し た。

30

【0242】

投与した動物の大多数において、研究前の時点と比較した場合に、表 1 5 に示すように、各時点の投与後 2 時間の C D 4 5 + / C D 1 4 + F c R n + 細胞における細胞外 F c R n 発現に関して、幾何平均蛍光強度 (G e o M F I) の減少の傾向が得られた。これらの変化は、抗 F c R n 抗体の F c R n 受容体への結合が増加した結果であるとみなされた。全般的に、g e o M F I 値は、各予定投与の前に研究前のレベルに戻っていた。このパターンは処置群全体に観察され、減少の大きさは、H 3 V 2 を 1 0 m g / k g / 用 量 受 け た 群 と、H 3 V 2 を 4 0 m g / k g / 用 量 受 け た 群 と、H 3 E 8 を 4 0 m g / k g / 用 量 受 け た 群 と の 間 で 類 似 し て い た。 C D 1 4 + 単球における細胞外 F c R n 発現に関しては、C D 4 5 + / C D 1 4 + / F c R n + の 相 対 百 分 率 に 変 化 は 観 察 さ れ な か っ た。

40

【0243】

各時点における全体的な変動性及び傾向の欠如を考慮すると、メイン期間及び回復期間中の全ての処置群における細胞内の F c R n 発現に関する C D 4 5 + / C D 1 4 + / F c

50

Rn+の相対百分率及び幾何平均では、SYNT001-H3Vk2及びSYNT001-H3E8に関連した白血球数の変化はなかった。

【0244】

これらのデータは、細胞表面単球のFcRn発現が、抗FcRn抗体薬物レベルの代理的なマーカーとして使用され得ることを示唆するものである。

	1群		2群		2群		4群	
	動物ID	倍数変化	動物ID	倍数変化	動物ID	倍数変化	動物ID	倍数変化
1日目(2時間)	1001	0.88	2001	0.41	3001	0.54	4001	0.34
8日目(0時間)		0.89		1.14		1.10		0.80
8日目(2時間)		0.87		0.63		0.61		0.59
15日目(0時間)		0.88		1.09		1.08		0.86
15日目(2時間)		0.80		0.72		0.57		0.65
22日目(0時間)		0.73		0.87		0.88		0.70
22日目(2時間)		0.82		0.53		0.61		0.48
57日目		0.82		0.88		0.96		0.77
1日目(2時間)	1002	0.82	2002	0.53	3002	0.57	4002	0.73
8日目(0時間)		1.00		1.11		1.00		1.12
8日目(2時間)		0.91		0.61		0.55		0.87
15日目(0時間)		0.97		1.20		1.15		0.92
15日目(2時間)		0.90		0.77		0.61		0.65
22日目(0時間)		0.73		0.81		0.69		0.77
22日目(2時間)		0.78		0.59		0.54		0.59
57日目		0.96		0.99		0.94		0.92
1日目(2時間)	1003	凝固	2003	0.57	3003	0.70	4003	0.6
8日目(0時間)		0.95		1.00		1.06		1.11
8日目(2時間)		0.90		0.59		0.71		0.82
15日目(0時間)		0.97		1.01		0.95		1.06
15日目(2時間)		0.88		0.62		0.68		0.72
22日目(0時間)		0.73		0.71		0.77		0.89
22日目(2時間)		0.78		0.50		0.59		0.65
57日目		0.82		0.87		1.08		1.05

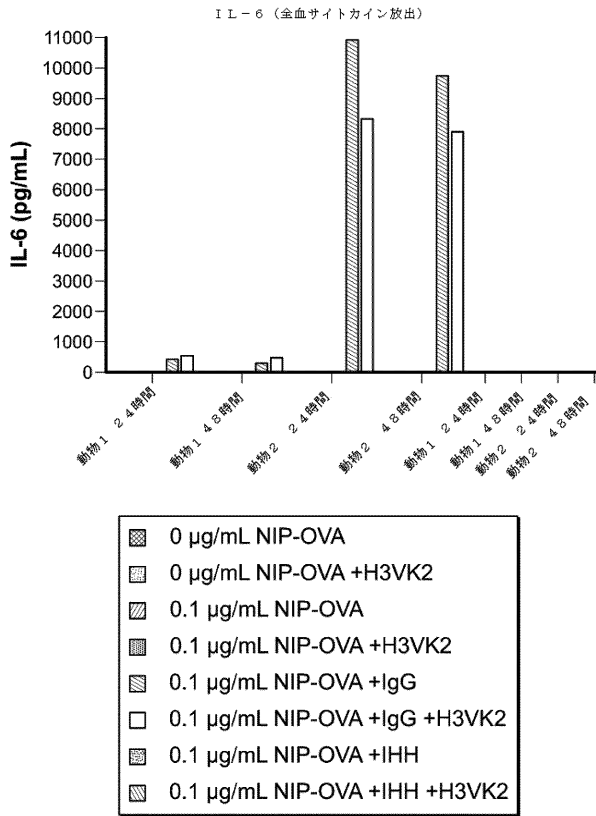
10

20

30

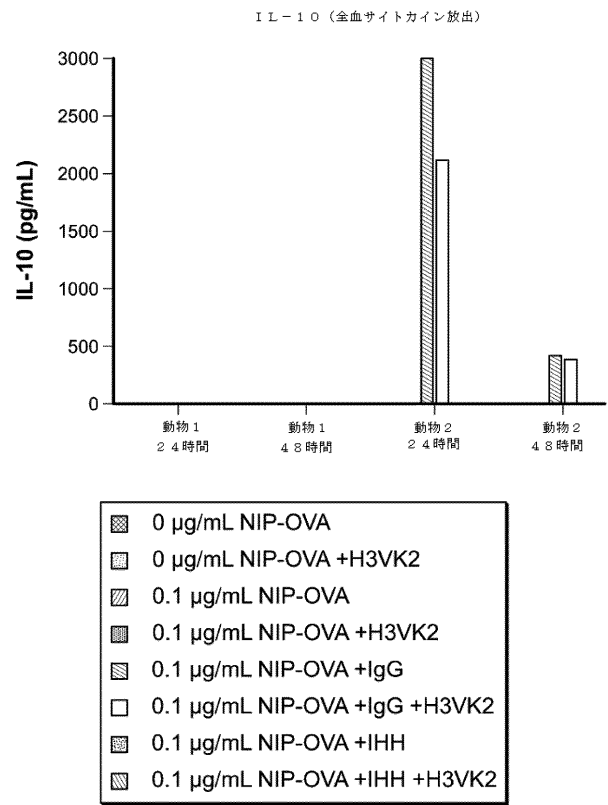
【 図 9 】

図 9



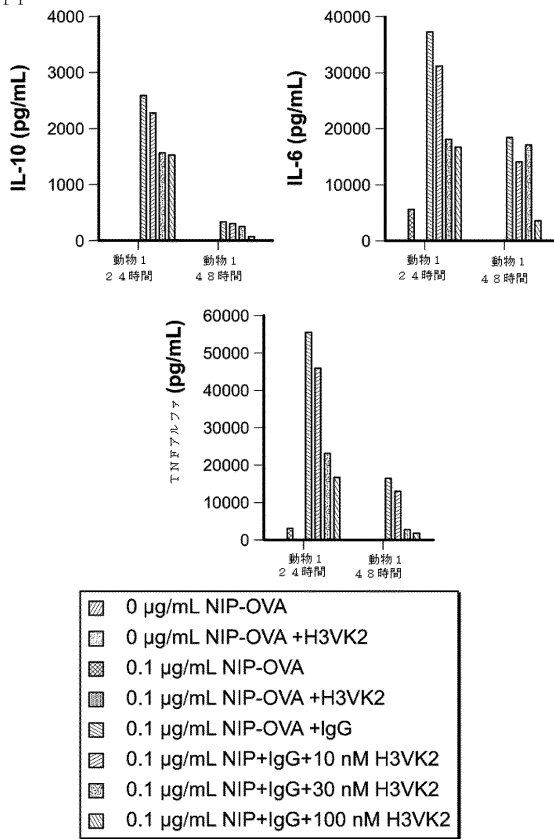
【 図 1 0 】

図 1 0



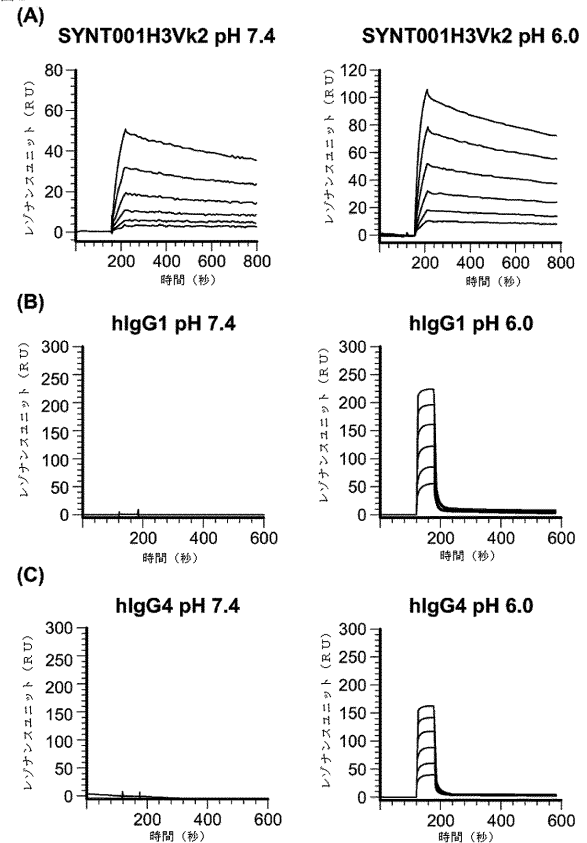
【 図 1 1 】

図 1 1



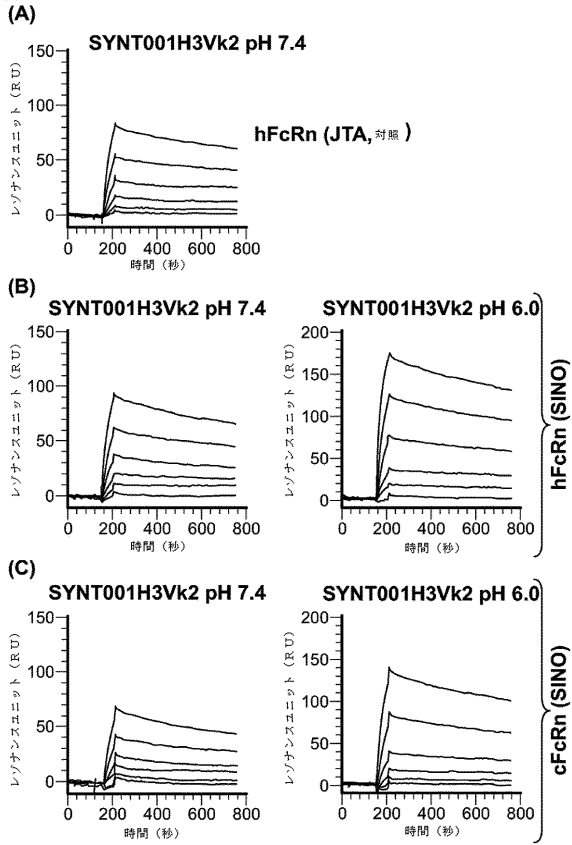
【 図 1 2 】

図 1 2



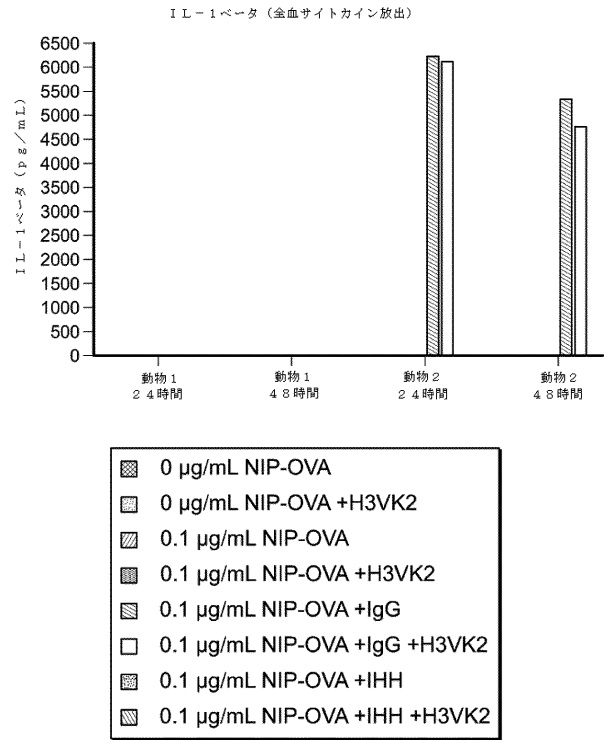
【 図 1 3 】

図 1 3



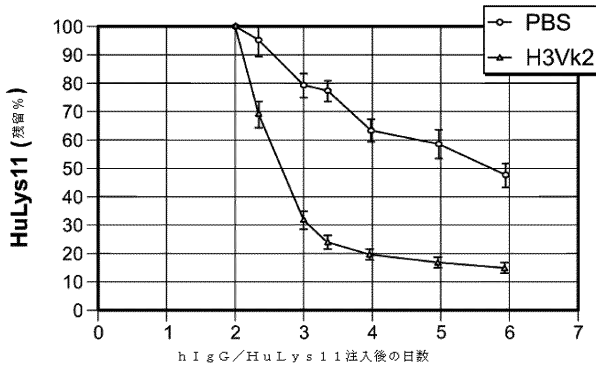
【 図 1 4 】

図 1 4



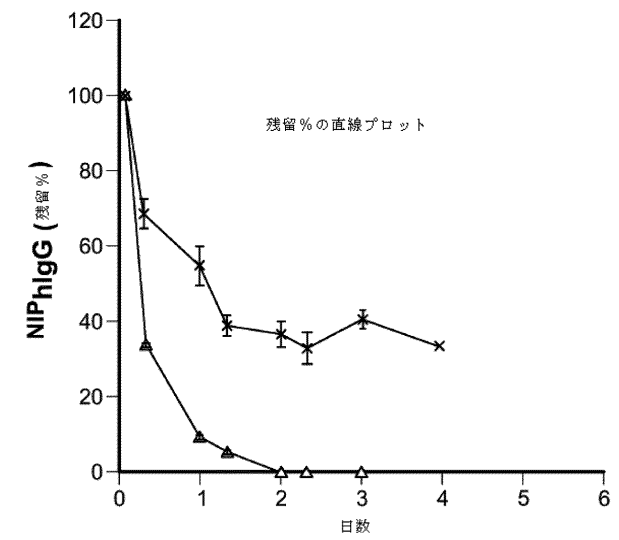
【 図 1 5 】

図 1 5



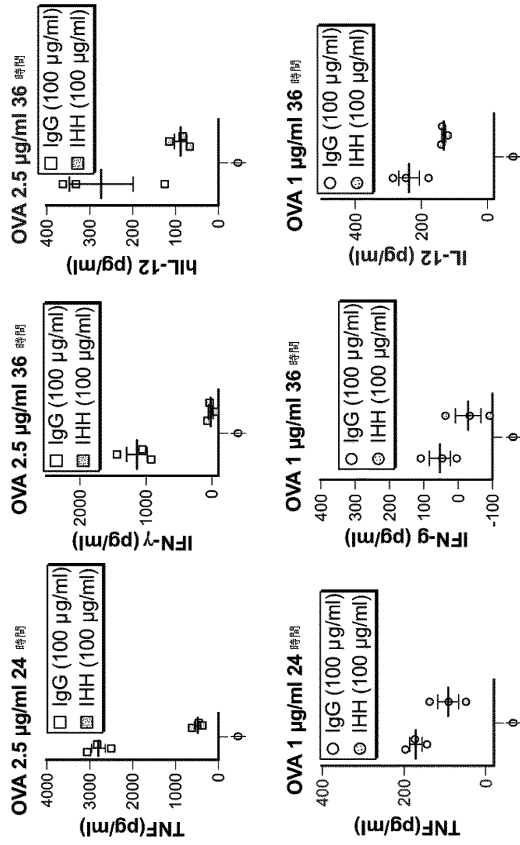
【 図 1 6 】

図 1 6



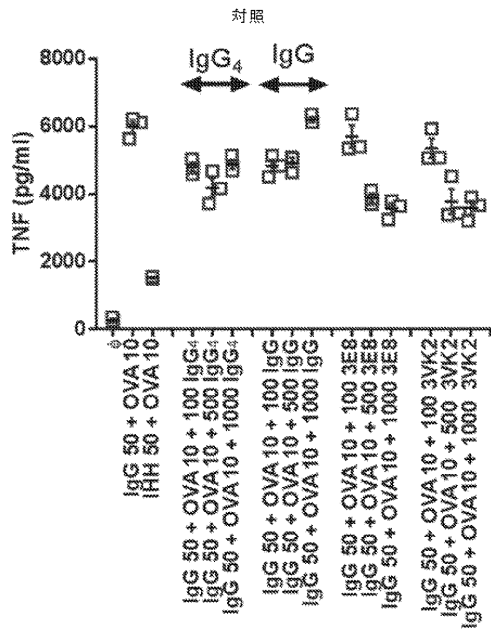
【 17 】

图 17



【 18 】

图 18



【 19 】

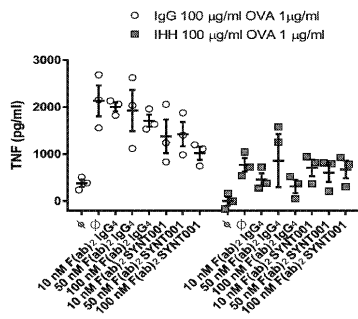


Fig. 19

【配列表】

2018522578000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/032168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(B) - A61K 39/395; A61P 37/06; C07K 16/28; G01N 33/53; G01N 33/564; G01N 33/84 (2016.01) CPC - A61K 2039/505; C07K 16/283; C07K 2317/585; C07K 2317/94; G01N 33/6854 (2016.08) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC - A61K 39/395; A61K 49/00; A61P 29/00; A61P 37/00; A61P 37/06; C07H 21/04; C07K 16/00; C07K 16/28; C07K 16/46; G01N 33/53; G01N 33/564; G01N 33/68; G01N 33/84 CPC - A61K 2039/505; C07K 16/283; C07K 2317/565; C07K 2317/94; G01N 33/6854		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/9.1; 424/172.1; 435/334; 435/375; 435/7.21; 435/320.1; 530/387.3; 530/389.1; 536/23.53 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search terms used: (neonatal Fc receptor%) OR FcRn OR FCGRT OR (Brambell receptor%) antibody* OR immunoglob* OR (antigen binding) OR Ig OR Ab ("pH" W5 "independent")		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/013912 A2 (THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK et al) 17 February 2005 (17.02.2005) entire document	54, 55
A	US 2006/0031954 A1 (ROOPENIAN) 09 February 2006 (09.02.2006) entire document	1, 4, 5, 8-10, 13-16, 18, 19, 26-28, 54-71, 75-86
A	US 2011/0212087 A1 (STROHL et al) 01 September 2011 (01.09.2011) entire document	1, 4, 5, 8-10, 13-16, 18, 19, 26-28, 54-71, 75-86
A	US 2014/0328841 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 06 November 2014 (06.11.2014) entire document	1, 4, 5, 8-10, 13-16, 18, 19, 26-28, 54-71, 75-86
A	ABDICHE et al. "The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity," mAbs, 06 February 2015 (06.02.2015), Vol. 7, Iss. 2, Pgs. 331-343, entire document	1, 4, 5, 8-10, 13-16, 18, 19, 26-28, 54-71, 75-86
A	NIXON et al. "Fully human monoclonal antibody inhibitors of the neonatal Fc receptor reduce circulating IgG in non-human primates," Frontiers in Immunology, 23 April 2015 (23.04.2015), Vol. 6, Pgs. 1-13, entire document	1, 4, 5, 8-10, 13-16, 18, 19, 26-28, 54-71, 75-86
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 October 2016		Date of mailing of the international search report 14 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/032168

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 11, 12, 30-53, 72-74
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see Extra Sheet(s).

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1, 4, 5, 8-10, 13-16, 18, 19, 26-28, 54-71, 75-86 to the extent that they read on an anti-FcRn antibody of SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 27, 28, 55, and 56.
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/032168

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

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

- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 27, 28, 55, and 56 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/032168

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-10, 13-29, 54-71, and 75-86 are drawn to anti-FcRn antibodies or antigen-binding fragments thereof; and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an anti-FcRn antibody or antigen-binding fragment thereof, and methods comprising the same, wherein the anti-FcRn antibody comprises a heavy chain variable region, wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:28, the heavy chain further comprising heavy chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:2, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:4, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:27; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:20, the light chain further comprising light chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:6, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:8, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:10. It is believed that claims 1, 4, 8, 13, 14, 24-27, 29, 54-66, 75-80, 82, 84-86 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on an anti-FcRn antibody of SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 20, 27, and 28.

Applicant is invited to elect additional anti-FcRn antibodies with specified SEQ ID NO for each heavy and light chain CDR1, 2, and 3 to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an anti-FcRn antibody or antigen-binding fragment thereof, and methods comprising the same, wherein the anti-FcRn antibody comprises a heavy chain variable region, wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:30, the heavy chain further comprising heavy chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:2, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:4, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:29; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:60, the light chain further comprising light chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:6, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:8, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:59. Additional anti-FcRn antibodies will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treatment of autoimmune and other disorders, requiring the selection of alternatives the anti-FcRn antibody heavy and light chain variable regions, where "the heavy chain and the light chain variable regions comprises CDR1, CDR2, and CDR3, and wherein: the sequence of CDR1 of the heavy chain is SEQ ID NO:2; the sequence of CDR2 of the heavy chain is SEQ ID NO:4, and the sequence of CDR3 of the heavy chain is selected from the group consisting of SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, and SEQ ID NO:78; and the sequence of CDR1 of the light chain is SEQ ID NO:6; the sequence of CDR2 of the light chain is SEQ ID NO: 8; and the sequence of CDR3 of the light chain is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:65, and SEQ ID NO: 68".

The Groups I+ share the technical features of an antibody or antigen-binding fragment thereof which binds to FcRn comprising a heavy chain variable region, the heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3; an antibody or antigen-binding fragment thereof which binds to FcRn comprising a light chain variable region, the light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3; a method of identifying antibodies that bind FcRn at both acidic pH and physiological pH comprising two or more screening steps that are carried out at pH 5.8-6.4; a method of blocking the transmission of pathogenic antibodies across the placenta that comprises administering to a pregnant mammal in need thereof a therapeutically effective amount of an FcRn antibody or antigen binding fragment thereof; a method of increasing the clearance of ICs from a subject which comprises administering to a subject in need thereof an FcRn antibody or antigen-binding fragment thereof; a method for determining whether a test antibody or antigen-binding fragment thereof blocks or diminishes the interaction between FcRn and immune complexes comprising: (a) obtaining whole blood from a mammal; (b) adding an immune complex to a first portion of the whole blood; (c) measuring the amount of a cytokine in the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a first amount of the cytokine; (d) adding a test antibody or antigen-binding fragment thereof to a second portion of the whole blood; (e) adding the immune complex to the second portion of the whole blood after, or at the same time as, the addition of the test antibody or antigen-binding fragment thereof; and (f) measuring the amount of the cytokine in the second portion of the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a second amount of the cytokine; a method for determining the expected level of responsiveness of a patient to an anti-FcRn therapy comprising: (a) obtaining whole blood from the patient prior to beginning the anti-FcRn therapy; (b) adding an immune complex to a first portion of the whole blood; (c) measuring the amount of a cytokine in the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a first amount of the cytokine; (d) adding an antibody or antigen-binding fragment thereof that is known to block or diminish the interaction between FcRn and immune complexes to a second portion of the whole blood; (e) adding the immune complex to the second portion of the whole blood after, or at the same time as, the addition of the antibody or antigen-binding fragment thereof; (f) measuring the amount of the cytokine in the second portion of the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a second amount of the cytokine; and (g) determining the difference between the first amount of the cytokine and the second amount of the cytokine; a method for monitoring the response of a patient to an anti-FcRn therapy comprising: (a) obtaining whole blood from the patient before an anti-FcRn therapy begins; (b) adding an immune complex to the whole blood; (c) measuring the amount of a cytokine in the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a first amount of the cytokine; (d) obtaining whole blood from the patient after an anti-FcRn therapy begins; (e) adding the immune complex to the whole blood of step (d); (f) measuring the amount of the cytokine in the whole blood after the addition of the immune complex in step (e) to obtain a second amount of the cytokine; and (g) determining the difference between the first amount of the cytokine and the second amount of the cytokine; a method of promoting endogenous antibody degradation prior to the administration of a therapeutic antibody comprising administering an anti-FcRn antibody or fragment thereof that is specific for the IgG binding site of FcRn to a subject in need of treatment with the therapeutic antibody prior to administering the therapeutic antibody; a method of

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/032168

promoting endogenous antibody degradation prior to the administration of a therapeutic antibody comprising administering an anti-FcRn antibody or fragment thereof that is specific for the IgG binding site of FcRn to a subject in need of treatment with the therapeutic antibody prior to administering the therapeutic antibody; a method of promoting degradation of an exogenous therapeutic antibody that has been administered to a subject, which comprises administering to the subject an effective amount of an anti-FcRn antibody or fragment thereof; a method of measuring the level of anti-FcRn antibody in a subject after administration of an anti-FcRn antibody, the method comprising: (a) obtaining whole blood from the subject after an anti-FcRn antibody has been administered, wherein the whole blood comprises monocytes; and (b) measuring the monocyte cell surface FcRn expression level. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2014/0328841 A1 to The Brigham and Women's Hospital Inc. et al. discloses an antibody or antigen-binding fragment thereof which binds to FcRn (antibodies or other polypeptides useful in the methods of the invention can be attached to serum albumin or a portion of serum albumin that binds to the FcRn receptor, Para. [0056]) comprising a heavy chain variable region, the heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 (Determining Regions (CDRs; i.e. CDRI, CDR2, and CDR3), and Framework Regions (FRs). VH refers to the variable domain of the heavy chain. VL refers to the variable domain of the light chain, Para. [0036]); an antibody or antigen-binding fragment thereof which binds to FcRn comprising a light chain variable region, the light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 (antibodies or other polypeptides useful in the methods of the invention can be attached to serum albumin or a portion of serum albumin that binds to the FcRn receptor, Para. [0056]); Determining Regions (CDRs; i.e. CDRI, CDR2, and CDR3), and Framework Regions (FRs). VH refers to the variable domain of the heavy chain. VL refers to the variable domain of the light chain, Para. [0036]); a method of identifying antibodies that bind FcRn at both acidic pH and physiological pH comprising two or more screening steps that are carried out (lyophilizing from acidic solutions, Para. [0272]; and preferably at about physiological concentrations, Para. [0288]); that comprises administering to a pregnant mammal in need thereof a therapeutically effective amount of an FcRn antibody or antigen binding fragment thereof (provided herein are methods of treating pancreatic cancer, the methods comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition, Para. [0019]; antibodies or other polypeptides useful in the methods of the invention can be attached to serum albumin or a portion of serum albumin that binds to the FcRn receptor, Para. [0056]); a method for determining whether a test antibody or antigen-binding fragment thereof blocks or diminishes the interaction between FcRn and immune complexes (in order to screen for antibodies which bind to an epitope on an antigen bound by an antibody of interest, a routine cross-blocking assay, Para. [0051]; it can be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody, Para. [0173]) comprising: (a) obtaining whole blood from a mammal (sample...blood, Para. [0249]; By "subject" is meant a mammal, Para. [0073]); a method for determining the expected level of responsiveness of a patient to an anti-FcRn therapy comprising: (a) obtaining whole blood from the patient prior to beginning the anti-FcRn therapy (expression in tumor biopsies to identify likely responders for personalized medicine approaches, Para. [0100]; antibodies or other polypeptides useful in the methods of the invention can be attached to serum albumin or a portion of serum albumin that binds to the FcRn receptor, Para. [0056]); (d) adding an antibody or antigen-binding fragment thereof that is known to block or diminish the interaction between FcRn and immune complexes to a second portion of the whole blood (in order to screen for antibodies which bind to an epitope on an antigen bound by an antibody of interest, a routine cross-blocking assay, Para. [0051]; it can be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody, Para. [0173]); a method for monitoring the response of a patient to an anti-FcRn therapy comprising: (a) obtaining whole blood from the patient before an anti-FcRn therapy begins (d) obtaining whole blood from the patient after an anti-FcRn therapy begins (provided herein are methods of treating pancreatic cancer, the methods comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition, Para. [0019]; antibodies or other polypeptides useful in the methods of the invention can be attached to serum albumin or a portion of serum albumin that binds to the FcRn receptor, Para. [0056]) wherein the whole blood comprises monocytes (The cells can be any of a wide range of types including, Para. [0255]; and (b) measuring the monocyte cell surface FcRn expression level (constitutively expressed in a wide range of tissues and cell types, Para. [0103]).

Further, US 2006/0031954 A1 to Roopenian discloses antibodies that bind FcRn at both acidic pH and physiological pH comprising two or more screening steps that are carried out at pH 5.8-6.4 (FcRn and beta2M retaining the in vivo function of binding IgG-Fc at about pH 6, Para. [0043]), a method of blocking the transmission of pathogenic antibodies across the placenta (defective in transplacental and trans-intestinal IgG transport, Para. [0067]; Each class of antibody has a specific role in immunity, including primary and secondary immune responses, antigen inactivation and allergic reactions. IgG is the only class of antibody that can pass the placental barrier, Para. [0003]); a method of increasing the clearance of ICs from a subject which comprises administering to a subject in need thereof an FcRn antibody or antigen-binding fragment thereof (Therefore, another aspect of this invention is the use of the monoclonal antibody as an inhibitor of FcRn-mediated IgG protection. The antibody would be administered to the patient in sufficient doses to inhibit FcRn-mediated IgG protection, Para. [0034]); a method of promoting endogenous antibody degradation prior to the administration of a therapeutic antibody (mice were given human IgG1 intravenously and followed for degradation of the administered human IgG1, Para. [0077]; Prior to...administration of the tracer antibodies, a candidate inhibitor is administered to the mouse, Para. [0048]) comprising administering an anti-FcRn antibody or fragment thereof that is specific for the IgG binding site of FcRn to a subject in need of treatment with the therapeutic antibody prior to administering the therapeutic antibody (Antibodies which bind to FcRn at the site where FcRn binds IgG-Fc, are likely to inhibit FcRn binding, Para. [0052]; mice were given human IgG1 intravenously and followed for degradation of the administered human IgG1, Para. [0077]; Prior to...administration of the tracer antibodies, a candidate inhibitor is administered to the mouse, Para. [0048]); a method of measuring the level of anti-FcRn antibody in a subject after administration of an anti-FcRn antibody, the method comprising: (a) obtaining whole blood from the subject after an anti-FcRn antibody has been administered (The sample could consist of blood, Para. [0033]; analysis of the huFcRn transgenic mouse indicates normal levels and fidelity of expression patterns of huFcRn compared with mouse FcRn, Para. [0076]).

Further still, US 2011/0212087 A1 to Strohl et al. discloses adding an immune complex to a first portion of the whole blood (Briefly, whole human blood provided the effector Cells, Para. [0077]; an antibody of interest is added, Para. [0023]); (c) measuring the amount of a cytokine in the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a first amount of the cytokine (Cytokine release using anti-HER2/neu IgG mutants was performed after direct binding of IgGs to latex beads after overnight incubation. Washed beads were added to isolated human PBMCs, Para. [0074]); (d) adding a test antibody or antigen-binding fragment thereof to a second portion of the whole blood (Consistent with previous ADCC, CDC and ADCP data, no significant or detectable levels of cytokine release were observed with IgG2c4e, Para. [0078]; an antibody of interest is added, Para. [0023]); (e) adding the immune complex to the second portion of the whole blood after, or at the same time as, the addition of the test antibody or antigen-binding fragment thereof and (f) measuring the amount of the cytokine in the second portion of the whole blood after the addition of the immune complex to obtain a second amount of the cytokine and (g) determining the difference between the first amount of the cytokine and the second amount of the cytokine (Consistent with previous ADCC, CDC and ADCP data, no significant or detectable levels of cytokine release were observed with IgG2c4e, Para. [0078]; an antibody of interest is added, Para. [0023]).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/032168

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
C 0 7 K 14/57 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
	C 0 7 K 16/28	
	C 1 2 N 5/10	
	C 0 7 K 14/54	
	C 0 7 K 14/57	

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

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ローレンス ジェイ・ブランバーク

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 0 0 2 4, ニューヨーク, ウェスト エンド アベニュー 4 2 4, アパートメント 2 1 ジェイ

(72)発明者 リチャード エス・ブランバーク

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 4 5 1, ウォルサム, フォックス ロード 1 9 5, ユニット 1 0 1

(72)発明者 スーザン ダーナ ジョーンズ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 2 1 0, ボストン, アトランティック アベニュー 5 0

0, ユニット 15 ピー

(72) 発明者 デリー ルーベニアン

アメリカ合衆国, メイン 04672, サルズベリー コープ, ローカスト レーン 15

(72) 発明者 ロバート ジョージ エドワード ホールゲイト

イギリス国, ロイストン エスジ-8 7 ディーディー, ハートフォードシャー, スタンフォード
アベニュー 22

(72) 発明者 ティモシー デイビッド ジョーンズ

イギリス国, ケンブリッジ シービー 22 3 エージェイ, ケンブリッジシャー, バブラハム, ブ
リック ロウ 27

(72) 発明者 アーロン ロバート ハーン

イギリス国, イーリー シービー 6 6 ダブルユティ- , ケンブリッジシャー, ブルック グロー
ブ 49

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC14 AC20 CA44 CA46

4C085 AA14 AA15 AA16 BB31 BB36 BB41 BB42 BB43 CC03 CC23

CC31 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08

GG10

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA22 EA50

专利名称(译)	ヒト化型亲和性成熟抗FcRn抗体		
公开(公告)号	JP2018522578A	公开(公告)日	2018-08-16
申请号	JP2018511346	申请日	2016-05-12
[标]发明人	ローレンスジェイブランバーグ リチャードエスブランバーグ スーザンダーナジョーンズ デリールーペニアン ロバートジョージエドワードホールゲイト ティモシーデイビッドジョーンズ アーロンロバートハーン		
发明人	ローレンス ジェイ.ブランバーグ リチャード エス.ブランバーグ スーザン ダーナ ジョーンズ デリー ルーペニアン ロバート ジョージ エドワード ホールゲイト ティモシー デイビッド ジョーンズ アーロン ロバート ハーン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61P37/06 A61P43/00 A61P17/00 A61P37/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P7/00 A61P7/06 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/00 A61P21/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P27/02 A61P9/00 A61P17/04 A61K39/395 G01N33/53 C07K16/28 C12N5/10 C07K14/54 C07K14/57		
CPC分类号	A61K39/395 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/04 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37 /06 A61P43/00 C07K16/283 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K2039/505 C07K2317/54 G01N33/6863 C07K16/2803 C07K2317/56		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61P37/06 A61P43/00.105 A61P17/00 A61P37/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P7/00 A61P7/06 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/00 A61P21 /00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P27/02 A61P9/00 A61P17/04 A61P43/00.107 A61P43/00.111 A61K39/395.N A61K39/395.U G01N33/53.P G01N33/53.N C07K16/28 C12N5/10 C07K14/54 C07K14 /57		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085 /AA16 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/CC03 4C085/CC23 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085 /GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎 喀米·金加繆拉		
優先权	62/160423 2015-05-12 US 62/217490 2015-09-11 US		
其他公开文献	JP2018522578A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了可用于结合FcRn和阻断FcRn与IgG Fc结合的重组抗体及其抗原结合部分。FcRn结合蛋白可用于治疗各种疾病，包括自身免疫疾病。 [选型图]图1

Wabat No.	1	2	3	4
W1	QVQLVQSGAELEKRPDAEYLRCRAEGYFPE	XXXXXXXXXX	WYRQAGGG	
W2	QVQLVQSGAEYKRPDAEYLRCRAEGYFPE	XXXXXXXXXX	WYRQAGGG	
W3	QVQLVQSGAEYKRPDAEYLRCRAEGYFPE	XXXXXXXXXX	WYRQAGGG	
W4	QVQLVQSGAEYKRPDAEYLRCRAEGYFPE	XXXXXXXXXX	WYRQAGGG	

Habat No.	5	6	7	8
H1	GLHWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXX	RAFLTADHSTGPTATMELRSL		
H2	GLHWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXX	RAFLTADHSTGPTATMELRSL		
H3	GLHWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXX	RAFLTADHSTGPTATMELRSL		
H4	GLHWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXX	RAFLTADHSTGPTATMELRSL		

Xabat No.	S	D	I	J
X1	RSDAVYFCARXXXXXXXXXX	RGTRGVVYSS	(SDQ LD NO: 12)	
X2	RSDAVYFCARXXXXXXXXXX	RGTRGVVYSS	(SDQ LD NO: 14)	
X3	RSDAVYFCARXXXXXXXXXX	RGTRGVVYSS	(SDQ LD NO: 16)	

Fig. 1