

(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2012-531897

(P2012-531897A)

(43) 公表日 平成24年12月13日(2012.12.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-517843 (P2012-517843)  
 (86) (22) 出願日 平成22年6月29日 (2010. 6. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年1月19日 (2012. 1. 19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/040304  
 (87) 国際公開番号 W02011/008517  
 (87) 国際公開日 平成23年1月20日 (2011. 1. 20)  
 (31) 優先権主張番号 61/221, 999  
 (32) 優先日 平成21年6月30日 (2009. 6. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505098937  
 リサーチ ディベロップメント ファウン  
 デーション  
 アメリカ合衆国 ネバダ州 カーソン シ  
 ティー ノース ディビジョン ストリー  
 ト 4 0 2  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

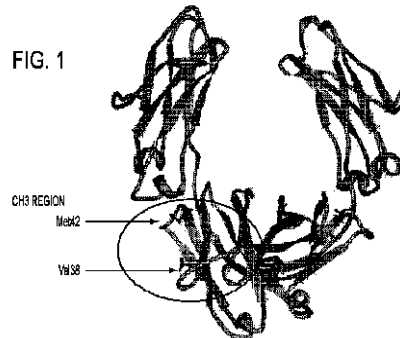
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンFcポリペプチド

(57) 【要約】

グリコシル化されていない抗体Fcドメインを有しているポリペプチドを含む方法および組成物。特定の実施形態では、ポリペプチドは、天然のFcドメインと比較して1つ以上の置換を含むグリコシル化されていないFcドメインを有する。さらに、いくつかの実施形態では、いくつかのFc受容体に結合するが、他のものには結合しないFcドメインが含まれる。例えば、グリコシル化されたFcドメインの2倍以内のレベルでFcRIに選択的に結合するが、他のFc受容体に対する結合については有意には減少させられたグリコシル化されていないFcドメインを持つポリペプチドが提供される。さらに、修飾されたグリコシル化されていないFcドメインと第2の非Fc結合ドメイン（これは、抗体の抗原結合領域または非抗原結合領域であり得る）を有しているポリペプチドを使用して抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性を促進するための方法および組成物が提供される。

FIG. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトFcRポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインを含むポリペプチドであって、

ここで、該Fcドメインは、382位と428位のアミノ酸でのアミノ酸置換、ならびに以下のアミノ酸：224位、241位、251位、266位、269位、276位、279位、286位、295位、297位、300位、315位、325位、328位、330位、331位、332位、338位、340位、341位、348位、369位、378位、382位、392位、424位、426位、428位、および/または434位のうちのいずれかの少なくとも1つのさらなる置換を含む、ポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

前記FcドメインがヒトFcRIポリペプチドに結合することができる、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

少なくとも1つのさらなる置換が、上方CH2領域中のアミノ酸の置換である、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

少なくとも1つのさらなる置換が、上方CH2領域の以下の部分：234L~239S；264V~268H；297N~299T；または、328L~332Iの中のアミノ酸の置換である、請求項3に記載のポリペプチド。

20

## 【請求項 5】

前記382位のアミノ酸の置換がバリン(E382V)である、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 6】

前記428位のアミノ酸の置換がイソロイシン(M428I)である、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

前記382位のアミノ酸の置換がバリン(E382V)であり、前記428位のアミノ酸の置換がイソロイシン(M428I)である、請求項6に記載のポリペプチド。

30

## 【請求項 8】

前記328位のアミノ酸の置換がトリプトファン(L328W)である、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 9】

前記332位のアミノ酸の置換がチロシンである(I332Y)、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 10】

少なくとも328位および332位のアミノ酸に別の置換を有している、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 11】

前記328位のアミノ酸の置換がトリプトファン(L328W)であり、332位のアミノ酸の置換がチロシン(I332Y)である、請求項10に記載のポリペプチド。

40

## 【請求項 12】

341位のアミノ酸に別の置換を有している、請求項1に記載のポリペプチド。

## 【請求項 13】

前記341位のアミノ酸の置換がバリン(G341V)である、請求項12に記載のポリペプチド。

## 【請求項 14】

前記少なくとも1つのさらなる置換が：

H224R/Y、F241L、K251F、V266M、E269K、N276D、V2

50

79M、N286D、Q295R、N297D、Y300C、N315D、N325S、  
L328W、A330V/E/I、P331A/S/E、I332Y、K338I/R、  
K340N/Q、G341V、V348M、V369A、A378D、K392E、S4  
24L、S426I、またはN434S/D

である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項15】

前記ポリペプチドが、グリコシル化されていない野生型抗体Fcドメインを持つポリペプチドと比較して、pH依存性のFcRn結合において少なくとも2倍の減少を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項16】

前記ポリペプチドが、G341Vのさらなる置換を有さない、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項17】

前記ポリペプチドが、K338Rのさらなる置換を有さない、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項18】

前記ポリペプチドが、K338RおよびG341Vのさらなる置換を有さない、請求項17に記載のポリペプチド。

【請求項19】

前記FcドメインがE382VおよびM428Iの置換を有し、G341Vおよび/またはK340N/Qのさらなる置換を有する、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項20】

前記FcドメインがG341Vのさらなる置換を有する、請求項19に記載のポリペプチド。

【請求項21】

前記Fcドメインが、H224Y、F241L、E269K、N276D、N286D、  
Y300C、N325S、K338R、V348M、V369A、K392E、S424  
L、およびN434D/Sからなる群より選択される少なくとも1つの他の置換を有する、請求項20に記載のポリペプチド。

【請求項22】

前記Fcドメインが前記群より選択される複数の他の置換を有する、請求項21に記載のポリペプチド。

【請求項23】

前記FcドメインがK338R置換を含む、請求項21に記載のポリペプチド。

【請求項24】

前記Fcドメインが、

a) K338RおよびG341V; b) N297D、N315D、およびK340N、c)  
K340N、d) K338IおよびK340N、e) K340QおよびA378D; f)  
N325SおよびK340N、g) H224Y、E269K、N325S、およびG3  
41V、h) G341VおよびK392E、i) K338R、G341V、S424L、  
およびN434D、j) F241LおよびG341V、k) G341V、l) N276D  
およびG341V、m) G341VおよびV369A、n) N286D、G341V、お  
よびN434S、o) N325SおよびG341V、p) Y300CおよびG341V、  
q) G341VおよびV348M、r) E382VおよびM428I、s) V266M;  
t) A330V、P331A、およびQ295R、u) A330E、P331E、および  
V279M、v) A330EおよびP331E、w) A330E、P331V、およびS  
426T、x) A330EおよびP331V、y) A330IおよびP331E、z) A  
330E、aa) P331S、ならびに、bb) A330V、P331S、H224R、  
およびL251F

からなる群より選択される置換のセットを含む、請求項14に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

結合可能なリンカーをさらに含む、請求項 20 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 26】

非 FcR 結合ドメインをさらに含む、請求項 20 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 27】

前記非 FcR 結合ドメインが抗体の抗原結合部位である、請求項 26 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 28】

前記非 Fc 結合領域が抗体の抗原結合部位ではない、請求項 26 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 29】

前記非 Fc 結合領域が細胞表面タンパク質に結合する、請求項 28 に記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 30】

前記細胞表面タンパク質が受容体である、請求項 28 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 31】

前記受容体がチロシンキナーゼである、請求項 30 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 32】

前記非 Fc 結合領域が複数のチロシンキナーゼ受容体に結合する、請求項 31 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 33】

請求項 1 ~ 32 に記載のポリペプチドのいずれかをコードする核酸。

20

## 【請求項 34】

前記核酸が DNA セグメントである、請求項 33 に記載の核酸。

## 【請求項 35】

前記核酸が発現ベクターである、請求項 33 に記載の核酸。

## 【請求項 36】

請求項 33 に記載の核酸を含む宿主細胞。

## 【請求項 37】

前記核酸が第 1 の発現ベクター中に存在する、請求項 36 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 38】

第 2 の発現ベクターをさらに含む、請求項 37 に記載の宿主細胞。

30

## 【請求項 39】

前記第 2 の発現ベクターが免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードする、請求項 38 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 40】

請求項 39 に記載の宿主細胞の集団であって、異なる Fcドメインを発現する複数の宿主細胞を含む集団。

## 【請求項 41】

いずれか 2 つの異なる Fcドメインのアミノ酸配列が、同一性に関して、20%未満異なる、請求項 40 に記載の宿主細胞の集団。

40

## 【請求項 42】

FcR I ポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない Fcドメインと第 2 の結合ドメインを含むポリペプチドであって、ここで、該第 2 の結合ドメインは細胞表面分子に結合することができる、ポリペプチド。

## 【請求項 43】

前記第 2 の結合ドメインが抗体抗原結合ドメインである、請求項 42 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 44】

前記第 2 の結合ドメインが抗体抗原結合ドメインではない、請求項 42 に記載のポリペプチド。

50

## 【請求項 4 5】

前記細胞表面分子がタンパク質様分子である、請求項 4 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4 6】

前記第 2 の結合ドメインが細胞表面受容体のリガンドである、請求項 4 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4 7】

前記第 2 の結合ドメインが細胞表面リガンドの受容体である、請求項 4 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4 8】

請求項 4 2 ~ 4 7 に記載のポリペプチドのいずれかをコードする核酸。

10

## 【請求項 4 9】

前記核酸が DNA セグメントである、請求項 4 8 に記載の核酸。

## 【請求項 5 0】

前記核酸が発現ベクターである、請求項 4 8 に記載の核酸。

## 【請求項 5 1】

請求項 4 8 に記載の核酸を含む宿主細胞。

## 【請求項 5 2】

前記核酸が第 1 の発現ベクター中に存在する、請求項 5 1 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 5 3】

第 2 の発現ベクターをさらに含む、請求項 5 2 に記載の宿主細胞。

20

## 【請求項 5 4】

前記第 2 の発現ベクターが免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードする、請求項 5 3 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 5 5】

グリコシル化されていないポリペプチドを調製するためのインビトロでの方法であって、

a) FcR ポリペプチドに結合することができる Fc ドメインを含むグリコシル化されていない抗体を発現することができる宿主細胞を得る工程であって、ここで、該 Fc ドメインは 3 8 2 位および 4 2 8 位のアミノ酸でのアミノ酸置換と、以下のアミノ酸：2 2 4 位、2 4 1 位、2 5 1 位、2 6 6 位、2 6 9 位、2 7 6 位、2 7 9 位、2 8 6 位、2 9 5 位、2 9 7 位、3 0 0 位、3 1 5 位、3 2 5 位、3 2 8 位、3 3 0 位、3 3 1 位、3 3 2 位、3 3 8 位、3 4 0 位、3 4 1 位、3 4 8 位、3 6 9 位、3 7 8 位、3 8 2 位、3 9 2 位、4 2 4 位、4 2 6 位、4 2 8 位、および / または 4 3 4 位のうちのいずれかの少なくとも 1 つのさらなる置換を含む、工程；

30

b) 該グリコシル化されていない抗体の発現を促進する条件下で、培養物中で該宿主細胞をインキュベーションする工程；ならびに

c) 該宿主細胞から、発現された抗体を精製する工程を包含する、方法。

## 【請求項 5 6】

前記宿主細胞が原核生物細胞である、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

前記宿主細胞が真核生物細胞であり、前記ポリペプチドは N 2 9 7 D の置換を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

40

## 【請求項 5 8】

発現された抗体を上清から回収する工程をさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

前記抗体を上清から精製する工程が、上清に由来する抗体を、濾過、HPLC、陰イオン交換または陽イオン交換、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、アフィニティークロマトグラフィー、あるいはそれらの組み合わせに供することを包含する、請求項 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 6 0】

50

アフィニティークロマトグラフィーにプロテイン A が含まれる、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

被験体において免疫応答を誘導するための、請求項 1 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 62】

前記グリコシル化されていない抗体が、FcRI ポリペプチドに特異的に結合することができる、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記グリコシル化されていない抗体が、前記抗体のグリコシル化された野生型バージョンよりも少なくとも 50 倍低いレベルで FcRIIb ポリペプチドに特異的に結合することができる、請求項 61 に記載の方法。

10

【請求項 64】

前記抗体が治療用抗体のグリコシル化されていないバージョンである、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

標的化された細胞表面ポリペプチドを発現する標的細胞に対して樹状細胞 (DC) 媒介性の細胞の殺傷を誘導する方法であって、

a) 該標的細胞を、少なくとも FcRI ポリペプチドと、該標的化された細胞表面ポリペプチドに結合する第 2 の結合ドメインとに特異的に結合することができる変異させたグリコシル化されていない Fcドメインを含むポリペプチドと接触させる工程であって、ここで、該グリコシル化されていない Fcドメインが、グリコシル化された Fcドメインよりも少なくとも 50 倍低いレベルで FcRIIb ポリペプチドに特異的に結合する、工程；および

20

b) 該標的細胞を、該標的細胞の殺傷を促進する条件下で樹状細胞に曝す工程を包含する、方法。

【請求項 66】

前記 Fcドメインが、以下のアミノ酸の中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、請求項 65 に記載の方法：224 位、241 位、251 位、266 位、269 位、276 位、279 位、286 位、295 位、297 位、300 位、315 位、325 位、328 位、330 位、331 位、332 位、340 位、348 位、369 位、378 位、382 位、392 位、424 位、426 位、428 位、および / または 434 位。

30

【請求項 67】

前記 Fcドメインに E382V および M428I の置換が含まれる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

特異的な FcRI ポリペプチドに結合する Fcドメインを有しているグリコシル化されていないポリペプチドをスクリーニングするためのインビトロでの方法であって、

a) グラム陰性細菌細胞の集団を得る工程であって、この集団の細胞が、それらのペリプラズムの中で Fcドメインを含むグリコシル化されていないポリペプチドを発現し、前記集団が、複数の異なる Fcドメインを発現する、工程；

40

b) 該細菌細胞を第 1 の FcRI ポリペプチドと、該 FcRI ポリペプチドと該グリコシル化されていない Fcドメインとの間での接触を可能にする条件下で接触させる工程であって、ここで、該 FcRI ポリペプチドが、FcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、または FcRI である、工程；

c) 該グリコシル化されていない Fcドメインの、該第 1 の FcRI ポリペプチドに対する結合に基づいて少なくとも 1 つの細菌細胞を選択する工程を包含する、方法。

【請求項 69】

50

前記選択された細菌細胞から前記グリコシル化されていないポリペプチドを同定または単離する工程をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

選択された細菌細胞中のグリコシル化されていないポリペプチドが他の F c R ポリペプチドに結合できるかどうかを決定する工程をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

選択された細菌細胞中のグリコシル化されていないポリペプチドが他の F c R ポリペプチドに結合できるかどうかを決定する工程が、第 2 の F c R ポリペプチドを用いて工程 a ) ~ c ) を繰り返し行って該グリコシル化されていないポリペプチドが該第 2 の F c R ポリペプチドにも結合するかどうかを決定することを含む、請求項 7 0 に記載の方法。

10

【請求項 7 2】

前記工程 a ) ~ c ) が、2 つより多くの異なる F c R ポリペプチドを用いて繰り返し行われる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記グリコシル化されていないポリペプチドが複数の F c R ポリペプチドに結合する、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記細菌細胞が E . c o l i 細胞である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記 F c ドメインが、I g G、I g A、または I g E の F c ドメインである、請求項 6 8 に記載の方法。

20

【請求項 7 6】

前記 I g G F c ドメインが I g G 1 F c ドメインである、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記 I g G 1 F c ドメインが抗 H E R 2 抗体の F c ドメインである、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記 I g G 1 F c ドメインがトラスツズマブの F c ドメインの F c ドメインである、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記グラム陰性細菌細胞の集団が、前記複数のグリコシル化されていない F c ドメインをコードする複数の核酸を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

30

【請求項 8 0】

前記複数の核酸が、前記複数のグリコシル化されていない F c ドメインに融合させられた膜分泌シグナルをさらにコードする、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記膜分泌シグナルが P e l B である、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記膜分泌シグナルが D s b A である、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記グリコシル化されていない F c ドメインが、ヒンジ領域、C H 2 領域、および C H 3 領域を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

40

【請求項 8 4】

前記グリコシル化されていないポリペプチドが真核生物の F c ドメインを含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記グリコシル化されていないポリペプチドが合成 F c ドメインを含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記 F c R ポリペプチドが、表 1 のうちのポリペプチドの 1 つに由来する抗体結合ドメイ

50

ンを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記 F c R ポリペプチドが、ヒト F c R I a、F c R I I a、F c R I I b、F c R I I c、F c R I I I a、F c R I I I b、F c R I、または C 1 q に由来する抗体結合ドメインを含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記 F c R ポリペプチドが、ヒト F c R I a に由来する抗体結合ドメインを含む、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 F c R ポリペプチドが標識されている、請求項 6 8 に記載の方法。

10

【請求項 9 0】

前記 F c R ポリペプチドが、発蛍光団、放射性同位体、または酵素で標識されている、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記 F c R ポリペプチドが発蛍光団で標識されている、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記 F c R ポリペプチドが蛍光タンパク質または酵素に融合している、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記 F c R ポリペプチドが緑色蛍光タンパク質 G F P に融合している、請求項 9 2 に記載の方法。

20

【請求項 9 4】

前記 F c R ポリペプチドが固定化されている、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記工程 ( c ) の選択が、少なくとも 2 回の選択を含むとさらに定義され、ここでは、第 1 回目の選択において得られた細菌細胞のサブ集団が、F c R ポリペプチドに対する F c ポリペプチドの結合に基づき少なくとも第 2 回目の選択に供される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 9 6】

2 回 ~ 1 0 回の選択を含む、請求項 9 5 に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

前記選択が、F A C S または磁気分離により行われる、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記細菌細胞を少なくとも 2 つの F c R ポリペプチドと接触させる工程をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記少なくとも 2 つの F c R ポリペプチドが異なる標識を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記少なくとも 2 つの F c R ポリペプチドに対するグリコシル化されていない F c ドメインの結合に基づいて細菌細胞を選択する工程をさらに含む、請求項 9 9 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 1】

少なくとも 1 つの F c R ポリペプチドに対するグリコシル化されていない F c ドメインの結合に基づいて、そして、少なくとも 1 つの他の F c R ポリペプチドに対しては該グリコシル化されていない F c ドメインが結合しないことに基づいて細菌細胞を選択する工程をさらに含む、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記細菌細胞を F c R ポリペプチドと接触させる前に、前記細菌細胞の外膜を破壊する工程をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

50

前記細菌細胞の外膜を破壊する工程に、高浸透圧条件での処理、物理的ストレスでの処理、細菌のファージ感染、リゾチームでの処理、EDTAでの処理、消化酵素での処理、または外膜を破壊する化学物質での処理が含まれる、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

前記細菌細胞の外膜を破壊する工程に、前記方法の組み合わせが含まれる、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

前記細菌細胞の外膜を破壊する工程に、外膜の物理的、化学的、および酵素的破壊の組み合わせとともに細菌細胞を加熱することが含まれる、請求項102に記載の方法。

【請求項106】

前記細菌細胞の外膜を破壊する工程に、前記細菌の外膜を除去することがさらに含まれる、請求項102に記載の方法。

【請求項107】

グリコシル化されていないFcドメインに結合していないFcRポリペプチドを除去する工程がさらに含まれる、請求項68に記載の方法。

【請求項108】

前記細菌が、スクロース、ソルビトール、マンニトール、またはトレハロースを含む培地中で増殖させられる、請求項68に記載の方法。

【請求項109】

前記細菌が、トレハロースを含む培地中で増殖させられる、請求項68に記載の方法。

【請求項110】

FcRポリペプチドに対して特異的親和性を有している抗体Fcポリペプチドをコードする核酸配列を産生する方法としてさらに定義される、前記細菌細胞からFcポリペプチドをコードする核酸配列をクローニングして、FcRポリペプチドに対して特異的親和性を有している抗体Fcポリペプチドをコードする核酸配列を産生する工程をさらに含む、請求項68に記載の方法。

【請求項111】

前記クローニング工程が前記核酸配列の増幅を含む、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

FcRポリペプチドに対して特異的親和性を有している抗体Fcポリペプチドを産生する方法としてさらに定義される、前記抗体Fcポリペプチドをコードする核酸配列を発現させて、FcRポリペプチドに対して特異的親和性を有している抗体Fcポリペプチドを産生する工程をさらに含む、請求項110に記載の方法。

【請求項113】

前記FcRポリペプチドがFcRIポリペプチドである、請求項112に記載の方法。

【請求項114】

前記複数の異なるFcドメインが1つのFcドメインの変異体バリエーションである、請求項68に記載の方法。

【請求項115】

前記変異体バリエーションが無作為に作製されたものである、請求項114に記載の方法。

【請求項116】

Fcドメインを有しているグリコシル化されていないポリペプチドの1つ以上の特異的FcRポリペプチドに対するFcの結合を最適化するためのインビトロでの方法であって：  
a) グラム陰性細菌細胞の集団を得る工程であって、該集団の細胞が、それらのペリプラズムの中でFcドメインを含むグリコシル化されていないポリペプチドを発現し、ここでは、該集団が様々な変異したFcドメインを発現する複数の様々なポリペプチドを発現する、工程；

b) 該細菌細胞を第1のFcRポリペプチドと、該FcRポリペプチドと該グリコシル化されていないFcドメインとの間での接触を可能にする条件下で接触させる工程であって

10

20

30

40

50

、ここで、該FcRポリペプチドは、FcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、またはFcRIである、工程

；  
c) 該グリコシル化されていないFcドメインの、該第1のFcRポリペプチドに対する結合に基づいて少なくとも1つの細菌細胞を選択する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本願は、2009年6月30日に出願した米国出願第61/221,999号に対する優先権を主張する。米国出願第61/221,999号の開示全体は、権利を放棄することなくその全体が具体的に本明細書中に援用される。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は一般的に、タンパク質工学の分野に関する。より具体的には、本発明は、細菌の中で発現されたコンビナトリアル抗体Fcライブラリーをスクリーニングするための改良された方法と組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術についての記載

現在、組み換え体である治療用抗体は、100億ドル/年を優に上回る売り上げがあり、20.9%の年間成長率が見込まれており、2010年には250億ドル/年にまで拡大すると予測される。モノクローナル抗体(mAb)には、現在病院にある組み換え体タンパク質の大部分が含まれ、世界中にある企業により資金提供を受けた研究において150を超える製品がある(Pavlou and Belsey, 2005)。治療の目的に関して、mAb市場は、腫瘍学および関節炎、免疫疾患および炎症性疾患について大変に注目を集めており、製品は、これらの治療領域内で、予測期間にわたり重要な増殖ドライバー(growth driver)であり続けるように設計される。1つのグループとして、遺伝子操作されたmAbは、一般的には、低分子薬物よりもFDAによる認可が得られる可能性が高い。少なくとも50のバイオテクノロジー企業と、あらゆる主要な製薬会社が、環境が整った活性のある抗体発見プログラムを有している。

【0004】

mAbの単離および産生のための最初の方法は、MilsteinおよびKohler(Kohler and Milstein, 1975)によって1975年に最初に報告され、これには、マウスのリンパ球と骨髄細胞を融合させ、それによりマウスハイブリドーマを得る工程が含まれる。治療用のマウスmAbは1980年代の初期に臨床試験に入った。しかし、ヒト抗マウス抗体(HAMA)を患者が産生することが原因で、効率かつ迅速なクリアランスが行われれないという問題が明らかになった。これらの問題、ならびにこの技術に関して時間とコストがかかることが、mAb生産技術の進展への推進力となった。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、免疫化された動物のリンパ球からのモノクローナル抗体遺伝子の直接のクローニング、および断片抗体のコンビナトリアルライブラリーの細菌の中での発現を容易にした(Orlandiら、1989)。後に、相補性決定領域3(CDR3)が再配置された自然なままの遺伝子を使用したインビトロでのクローニング技術により、ライブラリー全体が作製された(Griffiths and Duncan, 1998; Hoogenboomら、1998)。結果として、所望される特異性を持つ抗体断片の単離は、もはや対応する抗原の免疫原性には依存しない。さらに、合成のコンビナトリアルライブラリーにおける抗原特異性の範囲は、免疫化されたマウスから作製されたハイブリドーマのパネルにおいて見られる抗原特異性の範囲よりも大きかった。これらの利点が、低分子化合物(ハプテン)(Hoogenboom and

10

20

30

40

50

Winter, 1992)、分子複合体 (Chamesら、2000)、不安定な化合物 (Kjaerら、1998)、および細胞表面タンパク質 (Desaiら、1998) を含む複数の特有の抗原に対する抗体断片の開発を容易にした。

#### 【0005】

微生物の細胞の中では、フローサイトメトリーによるディスプレイスクリーニングを行うことができる。具体的には、Anchored Periplasmic Expression (APEX) は、E. coli の内膜のペリプラズム側の表面上に抗体断片を固定すること、その後の、外膜の崩壊、蛍光標識された標的とのインキュベーション、およびスフェロプラストの選別に基づく (米国特許第7,094,571号)。APEX は、抗体断片の親和性成熟に使用された (Harveyら、2004; Harveyら、2006)。1つの研究では、わずか2回のスクリーニングの後に、200倍を上回る親和性の改善が得られた。

10

#### 【0006】

抗体治療薬の効力の根底にある1つの重要な機構は、標的抗原 (または細胞) に対して免疫細胞を動員する抗体の能力である。したがって、抗体のFc領域が、免疫学的細胞の動員および抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) に重要である。具体的には、抗体により誘発されるADCC応答の性質は、Fc領域と多くの細胞のタイプの表面上にある受容体 (FcR) との相互作用に依存する。ヒトは、5つの異なるクラスのFc受容体を含む。加えて、特定のクラスに属している様々なFcRのハプロタイプまたは遺伝的バリエーションが知られている。FcRに対する抗体の結合が、他の免疫学的細胞を動員するその能力と動員される細胞のタイプを決定する。したがって、特定の種類の細胞だけを動員することができるように抗体を操作する能力が治療に極めて重要であり得る。

20

#### 【0007】

しかし、本発明者が知る限りは、Fcドメインを操作するこれまでの試みは、哺乳動物により発現されたIgG分子を使用して行われてきた。哺乳動物の抗体はグリコシル化される。炭水化物鎖がFc領域に結合させられ、タンパク質の立体構造を変化させて、その抗体がFcRに結合できるようにする。対照的に、細菌の中で産生されたグリコシル化されていない抗体はFcRに結合することができず、したがって、ADCCを誘発することができない。ADCCを誘発できるようにグリコシル化されていない抗体を操作し、それにより、細菌による発現により得られる低い生産コストの利益を得ることが所望される。

30

#### 【0008】

第2に、そして最も重要であるのは、操作されたFc領域を持つ哺乳動物の抗体が、目的の特定のFcRに対する結合の増大を示し、加えて、これらはなおも通常の親和性で他のFcRに結合できることである。したがって、そのような抗体は、免疫系により自然に産生された分子よりも選択性が高いにも関わらず、それでもなおこれらは、望ましくない免疫学的応答を媒介する可能性がある。

#### 【0009】

それにも関わらず、今日利用できる全てのハイスループット抗体スクリーニング技術は、抗体断片の微生物による発現に頼る。ライブラリーの構築およびスクリーニングにおけるインタクトなIgGまたは全長のIgGではなく抗体断片の使用は、はるかに大きなIgGの微生物の中での発現に関連する限界により決定されている。IgGライブラリーは、これまでは、細菌または酵母のような微生物を使用して発現またはスクリーニングされることはなかった。結果として、抗原結合タンパク質の単離は、もっぱら、より小さく、生産がはるかに容易である抗体断片を使用して行われている。一旦単離されれば、そのような抗体断片は、全長の免疫グロブリンを発現するベクターに融合させられ、これがその後、哺乳動物細胞 (例えば、CHO細胞) の中で優先的に発現させられる。

40

#### 【0010】

E. coli は、ジスルフィド結合を持つタンパク質の折り畳みには適さない還元性の細胞質を持つ。これは、折り畳まれていない状態または不正確に折り畳まれた状態で蓄積

50

する (Baneyx and Mujacic, 2004)。細胞質とは対照的に、E. coliのペリプラズムは酸化された状態で維持され、これがタンパク質のジスルフィド結合の形成を可能にする。特に、ペリプラズムでの発現は、抗体断片(例えば、Fv、scFv、Fab、またはF(ab')<sub>2</sub>(Kipriyanov and Little, 1999)の発現のための使用に成功している。これらの断片は、抗原結合活性を保持したまま、大量に、比較的迅速に作製することができる。しかし、抗体断片はFcドメインを欠くので、これらはFcRn受容体には結合せず、迅速に除去される。したがって、これらが治療用タンパク質として適していることはわずかしかない(Knightら、1995)。最近までは、全長の抗体は不溶性凝集物としてE. coliの中で発現させ、その後、インビトロで再度折り畳むことしかできなかった(Bossら、1984; Cabillyら、1984)。現在の技術を用いても、何百万または何千万もの抗体を個々に折り畳むことができないので、このアプローチは明らかに、抗体ライブラリーのハイスクリーンングには適さない。さらなる問題は、E. coliにより発現された抗体はグリコシル化されないため、これらは、補体因子1q(C1q)またはFc、および多くの他のFc受容体に結合することができないことである。しかし、グリコシル化されていないFcドメインは、新生児のFc受容体(FcRn)に効率よく結合することができる。結果として、細菌により発現されたグリコシル化されていない抗体は、ヒト細胞の中で産生された完全にグリコシル化されたIgGのものと類似する血清持続および薬物動態を示す。それにも関わらず、グリコシル化されていない抗体は補体活性を誘発することができず、マクロファージのような免疫細胞の動員も媒介できないので、これまでのところは多くの治療的用途については有効ではない。

#### 【0011】

さらに、いくつかの研究は、FcドメインによるいくつかのFc受容体の結合が活性化効果を有している可能性があり、阻害効果を有しているものもあることを報告した(Boruchovら、2005; KalerGISら、2002)。様々なFc Rエフェクター機能として、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)、サイトカインの放出、食作用、および成熟が挙げられる。選択的エフェクター機能を有するように操作されたFcドメインは、生理学的利点をもたらす可能性がある。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

##### 発明の要旨

本開示は、Fc受容体に結合するグリコシル化されていない抗体Fcドメインを含む化合物および方法を提供する。

#### 【0013】

いくつかの実施形態においては、抗体に由来するグリコシル化されていないFcドメイン(「抗体Fcドメイン」)を有するポリペプチドを含む組成物が存在する。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインは野生型Fcドメインのバリエーションであり、その結果、そのようなバリエーションが、Fcドメインが1つ以上のFc受容体に特異的に結合することを可能にする。いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドは、野生型Fcドメインのグリコシル化されたバージョン(「グリコシル化された野生型Fcドメイン」)を持つポリペプチドが結合できるFc受容体のサブセットだけに結合することができる。特異的な実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドはFcRIに特異的に結合することができる。いくつかの場合には、これは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドの2倍以内の親和性または結合能力を有する。他の実施形態においては、さらに、またはあるいは、グリコシル化されていないFcドメインバリエーションを持つポリペプチドは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドと比較して、有意に低下した親和性または結合能力(50倍以上の低下)を有する。特定の実施形態においては、グリコシル化されていない

Fcドメインバリエーションを持つポリペプチドは、FcRIIbに結合することについて有意に低下した親和性または能力を有する。ポリペプチドが、(いずれも、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドと比較して)匹敵する(2倍以内)のFcRIに対する親和性または結合能力を有し得ること、ならびに、FcRIIbに対する有意に低下した親和性または結合能力を有し得ることが想定される。

#### 【0014】

本明細書中で使用される場合は、用語「親和性」は、2つの物質の可逆的結合についての平衡定数をいい、これはKdとして表わされる。結合ドメインのその標的に対する親和性は、例えば、約100ナノモル(nM)~約0.1nM、約100nM~約1ピコモル(pM)、または約100nM~約1フェムトモル(fM)であり得る。あるいはこれは、100nM~1nMの間、または0.1nM~10nMの間であり得る。さらに、2つの物質間の親和性が上記で議論した親和性範囲内にある場合は、上記物質は特異的に結合すると想定される。

10

#### 【0015】

抗体Fcドメインは、IgA、IgM、IgE、IgD、またはIgG抗体のFcドメイン、あるいはそれらのバリエーションであり得る。特定の実施形態においては、上記ドメインはIgG抗体のFcドメイン(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgG4抗体のFcドメインである。さらに、上記抗体Fcドメインは、ヒトFcドメインと定義され得る。この場合、ヒトFcドメインは1つ以上のヒトFc受容体に特異的に結合する。特定の態様においては、Fcドメインは、IgG1Fcドメイン(例えば、抗HER2抗体のFcドメイン、より具体的には、トラツズマブのFcドメイン)であり得る。いくつかの実施形態においては、ポリペプチド全体がグリコシル化されていないか、または他の実施形態においては、ポリペプチドの一部(例えば、Fcドメイン)だけがグリコシル化されないことが想定される。ポリペプチドに、Fcドメインに加えて抗体由来の1つ以上の領域が含まれる場合があることもまた想定される。ポリペプチドには、抗体由来の抗原結合ドメイン(antigen binding domain)が含まれ得る。さらに、複数のポリペプチドが抗体または抗体様タンパク質を形成し得る。

20

#### 【0016】

いくつかの実施形態においては、ヒトFcRポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインを含むポリペプチドが存在する。ここでは、上記Fcドメインに、特定のアミノ酸置換が含まれる。いくつかの実施形態においては、複数のアミノ酸置換が存在する。さらなる実施形態においては、野生型Fcドメイン配列と比較して8個までのアミノ酸置換が存在する。ヒトFcドメインの中に置換を持つ実施形態には、382位および428位のアミノ酸でのアミノ酸置換、ならびに以下のアミノ酸：224位、241位、251位、266位、269位、276位、279位、286位、295位、297位、300位、315位、325位、328位、330位、331位、332位、338位、340位、341位、348位、369位、378位、382位、392位、424位、426位、428位、および/または434位のうちのいずれかの少なくとも1つのさらなる置換を有しているヒトFcドメインを持つポリペプチドが含まれる。いくつかの場合には、ヒトFcドメインの329位のアミノ酸が野生型配列、すなわち、プロリンであることが具体的に想定される。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、グルタミン酸(E)の代わりにバリン(V)である382位のアミノ酸でのヒトFcドメイン置換(E382V)を有する。アミノ酸についての従来の一文字の省略形を本明細書中で使用する。さらなる実施形態においては、ポリペプチドは、イソロイシンである428位のアミノ酸に、ヒトFcドメイン置換(M428I)を有する。いくつかの場合には、ポリペプチドは、382位のアミノ酸でのバリンによる置換(E382V)と428位のアミノ酸でのイソロイシンによる置換(M428I)の両方をヒトFcドメインの中に有する。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、328位のアミノ酸でのトリプトファンによる置換(L328W)をヒトFcドメインの中に有する。さ

30

40

50

らなる実施形態においては、ポリペプチドは、332位のアミノ酸でのチロシンでのヒトFcドメイン置換(I332Y)を有する。他のポリペプチドとしては、少なくとも328位および332位のアミノ酸にヒトFcドメイン置換を有しているポリペプチドが挙げられる。328位のアミノ酸の置換はトリプトファン(L328W)であり得、332位のアミノ酸での置換はチロシン(I332Y)であり得る。さらなる実施形態においては、ポリペプチドは、341位のアミノ酸にヒトFcドメイン置換を有し、さらなる実施形態においては、これはバリン(G341V)である。さらなる実施形態には、382位と428位にヒトFcドメイン置換を持ち、以下の群のうちの少なくとも1つのさらなるドメイン置換を持つポリペプチドが含まれる：H224R/Y、F241L、K251F、V266M、E269K、N276D、V279M、N286D、Q295R、N297D、Y300C、N315D、N325S、L328W、A330V/E/I、P331A/S/E、I332Y、K338I/R、K340N/Q、G341V、V348M、V369A、A378D、K392E、S424L、S426I、またはN434S/D。いくつかの実施形態においては、複数のさらなる置換が想定される。

10

## 【0017】

いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、382位と428位のアミノ酸に置換を持つグリコシル化されていないヒトFcドメインを有し、上方CH2領域に少なくとも1つのさらなる置換をもまた有する。いくつかの実施形態には、上方CH2領域の以下の部分のアミノ酸に少なくとも1つのさらなるヒトFcドメイン置換を有しているポリペプチドが含まれる：234L~239S；264V~268H；297N~299T；または328L~332I。

20

## 【0018】

さらなる実施形態においては、ポリペプチドは、ヒトFcドメインの中にG341Vおよび/またはK338Rのさらなる置換を有さない。しかし、他の場合には、Fcドメインは、G341Vの置換と、以下からなる群より選択される少なくとも1つの他の置換を有し得る：H224Y、F241L、E269K、N276D、N286D、Y300C、N325S、K338R、V348M、V369A、K392E、S424L、およびN434D/S。いくつかの実施形態においては、Fcドメインは上記群から選択される複数の他の置換を有する。ポリペプチドは、K338R置換を含むFcドメイン置換を有する場合がある。

30

## 【0019】

いくつかの実施形態においては、以下からなる群より選択される置換の1つのセットを有するヒトFcドメインを持つポリペプチドが存在する：a) K338RとG341V；b) N297D、N315D、およびK340N、c) K340N、d) K338IとK340N、e) K340QとA378D；f) N325SとK340N、g) H224Y、E269K、N325S、およびG341V、h) G341VとK392E、i) K338R、G341V、S424L、およびN434D、j) F241LとG341V、k) G341V、l) N276DとG341V、m) G341VとV369A、n) N286D、G341V、およびN434S、o) N325SとG341V、p) Y300CとG341V、q) G341VとV348M、r) E382VとM428I、s) V266M；t) A330V、P331A、およびQ295R、u) A330E、P331E、およびV279M、v) A330EとP331E、w) A330E、P331V、およびS426T、x) A330EとP331V、y) A330IとP331E、z) A330E、aa) P331S、ならびにbb) A330V、P331S、H224R、およびL251F。いくつかの実施形態においては、さらなるポリペプチドが存在し、これにヒト以外に由来するFcドメインが含まれる場合があることが想定される。この場合、列挙する置換は対応するアミノ酸において実施され得る。

40

## 【0020】

1つ以上の特定のヒトFcRポリペプチドに特異的に結合することができるグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドが、複数の実施形態に含まれる。

50

いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインは、FcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、またはFcRIのうち1つ以上に結合できるように変異させられている。これらの特定のヒトFcRポリペプチドの1つ以上に対する結合が、グリコシル化されたFc領域を持つ場合に見られる結合の10%以内、20%以内、30%以内、40%以内、50%以内、60%以内、70%以内、80%以内、90%以内、または100%以内（または、これらの中で導くことができる任意の範囲）であること、あるいは、結合が、野生型のグリコシル化されたFcドメインと比較して少なくともまたは多くても50%、60%、70%、80%、90%、または100%（または、これらの中で導くことができる任意の範囲）変化する（増加するまたは減少する）ことが想定される。あるいは、変異したグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドとグリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドとの間での相対的な結合能力は、X倍の差（増加または減少）として表わすことができる。例えば、少なくとも、または多くとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差、あるいはこれらから導くことができる任意の範囲であり得る。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

いくつかの実施形態においては、変異したグリコシル化されていないFcドメインを持つポリペプチドは、FcRIポリペプチドに特異的に結合することができる。いくつかの場合には、これは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドによる結合レベルの2倍以内のレベルで結合する。他の実施形態においては、結合レベルは、グリコシル化された野生型Fcドメインの少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍以内である。例えば、特定のFc受容体と、グリコシル化されていないFcドメインパリアントを持つポリペプチドまたはグリコシル化された野生型Fcドメインを持つポリペプチドのいずれかについての $K_D$ 値は、本明細書中に記載される実施形態においては、少なくとも2倍または3倍以内である。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、グリコシル化されていない野生型抗体Fcドメインを持つポリペプチドと比較して、pH依存性のFcRn結合において少なくとも2倍の減少を有する。さらなる実施形態においては、

いくつかの実施形態においては、本明細書中に記載されるポリペプチドにはリンカーが含まれ得る。さらなる実施形態においては、上記リンカーは結合可能なリンカーである。いくつかの実施形態においては、上記ポリペプチドに、抗体に由来するFcドメインが含まれる。これには、抗体に由来する他の領域（例えば、別の結合ドメイン）が含まれる場合がある。特定の実施形態においては、このさらなる結合ドメインはFcR結合ドメインではない。いくつかの実施形態においては、これに、抗体に由来する抗原結合部位またはドメインが含まれ得る。これには、抗体に由来する可変領域全体またはその一部が含まれるであろう。他の実施形態においては、ポリペプチドには、抗体に由来するFcドメインが含まれるが、別の結合ドメインは非FcR結合ドメインである。いくつかの実施形態においては、非Fc結合領域は抗体の抗原結合部位ではないが、細胞表面タンパク質に特異的に結合する。いくつかの場合には、非Fc結合領域が認識する細胞表面タンパク質は受容体である。いくつかの実施形態においては、細胞表面受容体はチロシンキナーゼである。さらなる実施形態においては、ポリペプチドは複数のチロシンキナーゼ受容体に結合できる非Fc結合領域を有する。いくつかの実施形態においては、そのような非Fc結合領域は、VEGF受容体、PDGF受容体、EGFR受容体、ErbB-2受容体、EGF受容体、HGF受容体、および他のSrc様チロシンキナーゼ受容体、またはそれらの組み合わせのうち1つ以上に結合することができる。ポリペプチドが、これらの受容体チロシンキナーゼの1つ以上を認識する抗原結合領域を有することもまた具体的に想定される。

#### 【0022】

他のポリペプチドとしては、FcRIポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていないFcドメインと第2の結合ドメインを有しているポリペプチドが挙げら

れる。ここでは、第2の結合ドメインは、細胞表面分子に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態においては、第2の結合ドメインは、抗体の抗原結合ドメイン（「抗体抗原結合ドメイン」）である。いくつかの場合には、第2の結合ドメインは抗体抗原結合ドメインではない。いくつかの実施形態においては、第2の結合ドメインは、タンパク質様分子である細胞表面分子に特異的に結合することができる。第2の結合ドメインは細胞表面受容体のリガンドである場合があり、またこれは、細胞表面リガンドの受容体である場合もある。

#### 【0023】

複数の実施形態は、本明細書中に開示されるポリペプチドのいずれかをコードする核酸にも関係する。この核酸は単離することができる場合があり、および/または組み換え体である場合もある。これは、単離されたおよび/または組み換え体である核酸セグメントであり得る。いくつかの実施形態においては、核酸はDNAであり、他の実施形態においては、核酸はRNAである。特定の実施形態においては、核酸はDNAセグメントである。他の実施形態においては、核酸は、ヒトFcRポリペプチドに特異的に結合する、1つ以上の置換を持つFc結合ドメインを有しているポリペプチドのうちのいずれかを発現することができる発現ベクターである。核酸は、ポリペプチドが生産される方法に応じてグリコシル化される場合も、またグリコシル化されない場合もある、1つ以上の上記で議論されたポリペプチドをコードし得る。

10

#### 【0024】

いくつかの実施形態においては、ヒトFcRポリペプチドに特異的に結合することができるFcドメインを持つポリペプチドをコードする核酸が存在する。上記核酸は、ポリペプチド（特に、ポリペプチドのグリコシル化されていないバージョン）を発現することができる宿主細胞中に配置され得る。宿主細胞は原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。あるいは、宿主細胞は真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞）であり得る。いくつかの実施形態においては、宿主細胞に第1の発現ベクターが含まれ、それにもかかわらずさらに、これには、第2の発現ベクターも含まれる場合がある。いくつかの抗体は複数のポリペプチドからなるので、いくつかの実施形態においては、これらのポリペプチドを発現する宿主細胞が想定される。例えば、いくつかの実施形態においては、免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードする第2の発現ベクターを含む宿主細胞が存在する。

20

#### 【0025】

いくつかの実施形態においては、宿主細胞の集団が存在する。この場合、上記集団には、異なるFcドメインを有しているポリペプチドを発現する複数の宿主細胞が含まれる。任意の2つの異なるFcドメインのアミノ酸配列は、同一性において20%未満、15%、10%、5%、またはそれ未満異なることが想定される。

30

#### 【0026】

いくつかの実施形態においては、本明細書中で記載されるポリペプチド（グリコシル化されていないFc領域を有しているポリペプチド）を作製する方法、およびこれらのポリペプチドを使用する方法が存在する。これらの方法のうちのいずれかが、本明細書中に記載される任意のポリペプチドに関して実施され得る。

#### 【0027】

いくつかの実施形態においては、以下の工程を含む、グリコシル化されていないポリペプチドを調製するための方法が存在する：a) FcRポリペプチドに結合することができるFcドメインを含むグリコシル化されていない抗体を発現することができる宿主細胞を得る工程（ここでは、Fcドメインには、382位と428位のアミノ酸での置換と、以下のアミノ酸：224位、241位、251位、266位、269位、276位、279位、286位、295位、297位、300位、315位、325位、328位、330位、331位、332位、338位、340位、341位、348位、369位、378位、382位、392位、424位、426位、428位、および/または434位のうちのいずれかの少なくとも1つのさらなる置換が含まれる）；b) 上記宿主細胞を、グリコシル化されていない抗体の発現を促進する条件下にて培養物中でインキュベーションす

40

50

る工程；ならびに、c) 上記宿主細胞から発現された抗体を精製する工程。いくつかの実施形態においては、宿主細胞は原核生物細胞（例えば、細菌細胞）である。他の実施形態においては、宿主細胞は真核生物細胞であり、ポリペプチドにはN297D置換が含まれる。さらなる実施形態においては、複数の方法に、上清から発現された抗体を回収する工程が含まれ、これは、精製の前に行われる場合がある。

【0028】

いくつかの実施形態においては、複数の方法に、上清から抗体を精製する工程が含まれる。これには、上清に由来する抗体について、濾過、HPLC、陰イオン交換または陽イオン交換、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、アフィニティークロマトグラフィー、またはこれらの組み合わせを行うことが含まれ得る。いくつかの実施形態においては、複数の方法に、IgG Fc領域に結合するブドウ球菌プロテインAを使用するアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。他の精製方法は当業者に周知である。

10

【0029】

他の実施形態には、被験体において免疫応答を誘導するための方法が含まれる。FcRポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドがそのような方法において実施され得る。特定の実施形態においては、グリコシル化されていない、FcRIポリペプチドに結合することができるFcドメインを有する抗体が使用されるか、または被験体に投与される。あるいは、複数の方法に、そのような抗体で被験体を処置する工程が含まれ得る。本明細書中に記載されるポリペプチドのいずれかが使用され得る。特定の実施形態には、382位と428位のアミノ酸でのアミノ酸置換と、以下のアミノ酸：224位、241位、251位、266位、269位、276位、279位、286位、295位、297位、300位、315位、325位、328位、330位、331位、332位、338位、340位、341位、348位、369位、378位、382位、392位、424位、426位、428位、および/または434位のうちのいずれかの少なくとも1つのさらなる置換を含む、グリコシル化されていないヒトFcドメインを有しているポリペプチドが含まれる。

20

【0030】

いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体は、活性化FcRポリペプチドに特異的に結合することができる。活性化FcRポリペプチドは、1つ以上の免疫細胞を活性化するFcRポリペプチドをいう。活性化ポリペプチドには、FcRI、IIa、IIIa、IIb、およびIIIcが含まれる。FcRIIbは阻害性FcRポリペプチドである。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体は、もはや、グリコシル化された野生型Fcドメインに匹敵するレベルでは阻害性FcRポリペプチドには結合しない。特異的な実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体は、FcRIポリペプチドに特異的に結合する。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドまたは抗体はFcRIIbポリペプチドに結合する能力が低下しており、この場合、その親和性は、ポリペプチドまたは抗体のグリコシル化された野生型バージョンよりも少なくとも50倍小さい。特定の実施形態においては、グリコシル化されていない抗体は治療用抗体のグリコシル化されていないバージョンであり、これは、疾患または症状の治療あるいは処置に使用される抗体をいう。上記で議論されたものを含む本明細書中で議論される抗体またはポリペプチドのいずれかが、免疫応答を誘導するための方法の実施において使用され得る。治療用抗体の一例はトラスツズマブである。

30

40

【0031】

いくつかの実施形態においては、以下の工程を含む、標的化された細胞表面ポリペプチドを発現する標的細胞に対する樹状細胞（DC）媒介性の細胞殺傷を誘導する方法が存在する：a) 標的細胞を、i) 少なくとも1つの樹状細胞活性化FcRに特異的に結合することができる変異させられたグリコシル化されていないFcドメインと、ii) 標的化された細胞表面ポリペプチドに結合する第2の結合ドメインを含むポリペプチドと接触させる工程；およびb) 標的細胞の殺傷を促進する条件下で標的細胞を樹状細胞に曝す工程。

50

いくつかの実施形態においては、活性化FcRはFcRIポリペプチドである。さらなる実施形態においては、グリコシル化されていないFcドメインを持つポリペプチドは、グリコシル化された野生型Fcドメインを有しているポリペプチドと比較して低いレベルで、FcRIIBポリペプチドに対して特異的に結合する。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、以下のアミノ酸に少なくとも1つのアミノ酸置換を含むFcドメインを有する：224位、241位、251位、266位、269位、276位、279位、286位、295位、297位、300位、315位、325位、328位、330位、331位、332位、340位、348位、369位、378位、382位、392位、424位、426位、428位、および/または434位。さらなるポリペプチドは、上記、および本出願を通じて議論される。いくつかの実施形態においては、標的細胞は癌細胞である。結果として、抗体療法においてグリコシル化された野生型Fcドメインの代わりにグリコシル化されていない変異させたFcドメインを使用して癌を処置する方法が想定される。グリコシル化された野生型Fcドメインを使用する、他の疾患または症状の抗体を含む処置を、本明細書中に記載されるグリコシル化されていないFcバリエーションポリペプチドを用いる場合にも同様に実施することができる。

10

#### 【0032】

他の実施形態は、以下の工程を含む1つ以上の特異的FcRポリペプチドに結合するFcドメインを有しているグリコシル化されていないポリペプチドをスクリーニングするための方法に関する：a) グラム陰性細菌細胞の集団を得る工程であって、この集団の細胞が、それらのペリプラズムの中でFcドメインを含むグリコシル化されていないポリペプチドを発現する工程（ここでは、上記集団は複数の異なるFcドメインを発現する）；b) 上記細菌細胞を第1のFcRポリペプチドと、FcRポリペプチドとグリコシル化されていないFcドメインとの間での接触を可能にする条件下で接触させる工程（ここでは、上記FcRポリペプチドは、FcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、またはFcRIである）；およびc) グリコシル化されていないFcドメインの第1のFcRポリペプチドに対する結合に基づいて少なくとも1つの細菌細胞を選択する工程。複数の方法にはさらに、選択された細菌細胞からグリコシル化されていないポリペプチドを同定または単離する工程が含まれ得る。また、複数の方法には、選択された細菌細胞の中のグリコシル化されていないポリペプチドが他のFcRポリペプチドに結合できるかどうかを決定する工程が含まれ得る。いくつかの実施形態においては、選択された細菌細胞の中のグリコシル化されていないポリペプチドが他のFcRポリペプチドに結合できるかどうかを決定する工程には、グリコシル化されていないポリペプチドもまた第2のFcRポリペプチドに結合するかどうかを決定するために、第2のFcRポリペプチドを用いて工程a)～c)を繰り返し行う工程が含まれる。工程a)～c)を、3つ以上の異なるFcRポリペプチドを用いて繰り返すことができることが想定される。いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドは複数のFcRポリペプチドに結合する。

20

30

#### 【0033】

いくつかの実施形態においては、複数の方法に、E. coli細胞である細菌細胞が含まれる。さらなる実施形態においては、Fcドメインは、IgG、IgA、またはIgE Fcドメインである。さらなる実施形態においては、グラム陰性細菌細胞の集団に、複数のグリコシル化されていないFcドメインをコードする複数の核酸が含まれる。いくつかの場合には、複数の核酸はさらに、複数のグリコシル化されていないFcドメインに融合させられた膜分泌シグナルをコードする。膜分泌シグナルはPelBまたはDsbAであり得る。さらに、グリコシル化されていないFcドメインには、ヒンジ、CH2、およびCH3領域が含まれ得る。特定の実施形態においては、グリコシル化されていないポリペプチドに、真核生物のFcドメインが含まれる。いくつかの実施形態においては、表1のポリペプチドのうちの1つに特異的に結合するFcドメインを持つポリペプチドが存在する。特定の実施形態においては、Fcドメインは、ヒトFcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、FcR

40

50

I、またはC 1 qに結合する。他の実施形態においては、これは、Fcドメインのグリコシル化された野生型バージョンと比較して、Fc R I I bに対して低い結合親和性を有する。特異的な方法が、引用により本明細書中に組み入れられるWO 2 0 0 8 / 1 3 7 4 7 5に開示されている。

【0034】

他の実施形態には、以下の工程を含む、Fcドメインを有しているグリコシル化されていないポリペプチドの1つ以上の特異的Fc R ポリペプチドに対するFcの結合を最適化するための方法が含まれる：a) グラム陰性細菌細胞の集団を得る工程であって、この集団の細胞が、それらのペリプラズムの中でFcドメインを含むグリコシル化されていないポリペプチドを発現する工程（ここでは、上記集団は、様々な変異したFcドメインを発現する複数の異なるポリペプチドを発現する）；b) 上記細菌細胞を第1のFc R ポリペプチドと、Fc R ポリペプチドとグリコシル化されていないFcドメインとの間での接触を可能にする条件下で接触させる工程（ここでは、Fc R ポリペプチドは、Fc R I a、Fc R I I a、Fc R I I b、Fc R I I c、Fc R I I I a、Fc R I I I b、またはFc R Iである）；およびc) グリコシル化されていないFcドメインの第1のFc R ポリペプチドに対する結合に基づいて少なくとも1つの細菌細胞を選択する工程。上記の実施形態の議論のいずれかをこれらの方法の実施のために適用することができる。

10

【0035】

本発明の方法および/または組成物の状況において議論される実施形態は、本明細書中に記載される任意の他の方法または組成物に関して利用され得る。したがって、1つの方法または組成物に関する実施形態は、本発明の他の方法および組成物にも同様に適用することができる。

20

【0036】

本明細書中で使用される場合は、用語「コードする」または「コーディング」は、核酸に関して、当業者が本発明を容易に理解できるようにするために使用される。しかし、これらの用語は、それぞれ「含む」または「含んでいる」と互換的に使用され得る。

【0037】

明細書において本明細書中で使用される場合は、「a」または「an」は、1つ以上を意味する場合がある。特許請求の範囲（単数または複数）において本明細書中で使用される場合は、語句「含んでいる」と組み合わせて使用されていれば、語句「a」または「an」は、1つまたは2つ以上を意味し得る。

30

【0038】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、代替えのものだけを言うように明白に示されているか、または代替えのものが相互に排他的でない限りは、「および/または」を意味するように使用されるが、上記開示は、代替えのものだけ、および「および/または」をいう定義をサポートする。本明細書中で使用される場合は、「別」は、少なくとも第2のものまたはそれ以上を意味し得る。

【0039】

本明細書全体を通じて、用語「約」は、値が、デバイスの固有の偏差、値を決定するために利用される方法、または実験対象間に存在する変動を含むことを示すために使用される。

40

【0040】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な記述から明らかとなるであろう。しかし、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、本発明の趣旨および範囲内での様々な変更と改変が、この詳細な説明から当業者に明らかとなるであろうとの理由から、説明のために提供されるにすぎないことが理解されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0041】

50

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに明らかにするために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特異的な実施形態についての詳細な記載と組み合わせて、これらの図面の1つ以上を参照することによってさらに理解され得る。

【図1】図1は、グリコシル化されたIgG1 Fc (PBD Code: 1FC1)の3D構造上に示される単離されたグリコシル化されていないFc5の変異点(382Eおよび428M)を示す図面である。

【図2】図2は、グリコシル化されたIgG (PBD Code: 1FC1)の結晶構造上に示されるCH3ドメインのシートC中に382EおよびシートC中に428Mを含む2つのシートを示す図面である。

【図3】図3は、グリコシル化されていないFc5ドメインを操作するためのError prone PCRライブラリーを示す図面である。

【図4】図4は、Fc RIa - FITCで標識された選別の異なる回に由来するスフェロプラストの蛍光ヒストグラムを示す図面である。

【図5A】図5は、Fc5よりもFc RIaに対して高い親和性を示す単離されたFc変異体クローンのDNA配列を示す図面である。Fc RIaで標識されたそれぞれのクローンについての平均蛍光値を括弧内に示す。

【図5B】図5は、Fc5よりもFc RIaに対して高い親和性を示す単離されたFc変異体クローンのDNA配列を示す図面である。Fc RIaで標識されたそれぞれのクローンについての平均蛍光値を括弧内に示す。

【図6】図6は、グリコシル化されたIgG1 Fc (PBD Code: 1FC1)の3D構造上に示される単離されたグリコシル化されていないFc601~619の変異点を示す図面である。

【図7】図7は、30nMのFc RIa - FITCで標識した野生型Fc、Fc5、およびFc601のスフェロプラストについての蛍光ヒストグラムを示す図面である。M: 平均蛍光強度。

【図8】図8は、グリコシル化されたIgG1 Fc (PBD Code: 1FC1)の3D構造上に示される単離されたグリコシル化されていないFc601の変異点(K338R、G341V、E382V、M428I)を示す図面である。

【図9】図9は、プラスミドpSTJ4 - Herceptin IgG1のマッピングを示す図面である。

【図10】図10は、Fc RIaに対する結合についてBIACore分析により決定した、グリコシル化されていないトラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、トラスツズマブ - Fc601、およびグリコシル化されたトラスツズマブの運動速度定数と平衡解離定数を示す図面である。

【図11】図11は、Fc RIa - GSTに対するトラスツズマブ抗体の結合についてのELISAアッセイを示す図面である。

【図12】図12は、Fc RIb - GSTに対するトラスツズマブ抗体の結合についてのELISAアッセイを示す図面である。

【図13】図13は、Fc RIa 1aに対するトラスツズマブ抗体の結合についてのELISAアッセイを示す図面である。

【図14】図14は、pH7.4およびpH6.0でのFcRnに対するpH依存性の結合についてのELISAアッセイを示す図面である。プレートを、グリコシル化されていないトラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、トラスツズマブ - Fc601、または市販されているグリコシル化されたトラスツズマブでコーティングし、FcRnの結合を抗GST - HRPを使用して検出した。

【図15】図15は、pH依存性のFcRn結合についてFc5を上回るFc RIaに対する高い親和性についてのライブラリーを示す図面である。

【図16】図16は、上方CH2領域を無作為化した4つのサブライブラリーの構築のための遺伝子アセンブリPCRを示す図面である。

10

20

30

40

50

【図17】図17は、Fc5よりもFc R I aに対して高い親和性を示している単離されたFc変異体クローンのDNA配列を示す図面である。Fc R I aで標識されたそれぞれのクローンについての平均蛍光値を括弧内に示す。

【図18】図18は、Fc701~709の中の変異のまとめを示す図面である。

【図19】図19は、1nMのFc R I a - F I T Cで標識された野生型Fc、Fc5、Fc701、およびFc702についてのスフェロプラスト化細胞の蛍光ヒストグラムを示す図面である。M：平均蛍光強度。

【図20】図20は、1nMのFc R I a - F I T Cで標識された野生型Fc、Fc5、Fc601、およびFc701についてのスフェロプラスト化細胞の蛍光ヒストグラム。M：平均蛍光強度。

10

【図21】図21は、グリコシル化されたI g G 1 F c ( P B D C o d e : 1 F C 1 )の3D構造上に示される単離されたグリコシル化されていないFc5の変異点(382Eおよび428M)を示す図面である。

【図22】図22は、Fc R Iに対する結合についてのB I A C o r e分析により決定した、グリコシル化されていないトラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、トラスツズマブ - Fc601、トラスツズマブ - Fc701、およびグリコシル化されたトラスツズマブの運動速度定数と平衡解離定数を示す図面である。

【図23】図23は、pH7.4およびpH6.0でのFc R nに対するpH依存性の結合についてのE L I S Aアッセイを示す図面である。プレートを、グリコシル化されていないトラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、トラスツズマブ - Fc601、トラスツズマブ - Fc701、または市販されているグリコシル化されたトラスツズマブでコーティングし、Fc R nの結合を抗G S T - H R Pを使用して検出した。

20

【図24】図24は、共有結合した全長I g Gディスプレイシステム。

【図25】図25は、2つのプラスミドを共有結合した全長I g Gディスプレイシステムと2シストロン性システムとの間でのF A C Sシグナルの比較を示す図面である。トラスツズマブ全長I g Gを、2つのプラスミドを固定した全長I g Gディスプレイシステムまたは2シストロン性全長I g Gディスプレイシステムのいずれかを使用して発現させた。M：平均蛍光強度。スフェロプラストを、検出のための30nMのFc R I - F I T Cプローブとともにインキュベーションした。

【図26】図26は、2つのプラスミドを共有結合した全長I g Gディスプレイシステムと2シストロン性システムとの間でのF A C Sシグナルの比較を示す図面である。トラスツズマブ全長I g Gを、2つのプラスミドを固定した全長I g Gディスプレイシステムまたは2シストロン性全長I g Gディスプレイシステムのいずれかを使用して発現させた。M：平均蛍光強度。スフェロプラストを30nMのFc R I I a - G S Tとともにインキュベーションし、検出のためのポリクローナル抗G S T - F I T C ( 1 : 2 0 0 )プローブで標識した。

30

【図27】図27は、2つのプラスミドを共有結合した全長I g Gディスプレイシステムと2シストロン性システムを使用したトラスツズマブ全長I g GのF A C S分析を示す図面である。トラスツズマブ全長I g Gを発現するスフェロプラストを、検出のための30nMのFc R I - F I T Cプローブとともにインキュベーションした。M：平均蛍光強度。

40

【図28】図28は、2つのプラスミドを共有結合した全長I g Gディスプレイシステムと2シストロン性システムを使用したトラスツズマブ全長I g GのF A C S分析を示す図面である。トラスツズマブ全長I g Gを発現するスフェロプラストを、30nMのFc R I I a - G S Tとともにインキュベーションし、検出のためのポリクローナル抗G S T - F I T C ( 1 : 2 0 0 )プローブで標識した。M：平均蛍光強度。

【図29】図29は、上方CH2領域の無作為化のためのライブラリーを示す図面である。

【図30】図30は、エフェクター細胞としてP B M Cを、標的細胞としてS k B r 3を用いたA D C Cアッセイを示す図面である。\*、P<0.05。

50

【図31】図31は、エフェクター細胞としてmDCを、標的細胞SkBr3を用いたADCCアッセイを示す図面である。\*、 $P < 0.05$ ；\*\*、 $P < 0.01$ 。

【発明を実施するための形態】

【0042】

代表的実施形態の説明

本発明者らは、これまでに、Fc受容体ポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインを提供することにおける、現在の免疫治療技術に伴ういくつかの重要な問題を克服してきた。操作された特性を持つさらなるFcドメインが開発されている。さらなる実施形態と利点が以下に記載されるが、Fcライブラリーについての情報とスクリーニング方法が提供される。

10

【0043】

I. ペリプラズム発現

いくつかの実施形態においては、抗体Fcドメインを含むポリペプチドを、グラム陰性細菌のペリプラズム空間内で発現させることができる。さらに、いくつかの態様においては、抗体Fcドメインを、内膜のペリプラズム表面に固定することができる。例えば、Fcドメインは、膜貫通ポリペプチドもしくは膜結合型ポリペプチドに直接融合させることができ、また、膜貫通ポリペプチドもしくは膜結合型ポリペプチドと相互作用する（例えば、タンパク質-タンパク質相互作用を介して）場合もある。そのような技術は、「固定化ペリプラズム発現」または「APEX」と呼ぶことができる。

20

【0044】

ペリプラズム区画は、グラム陰性細胞の内膜と外膜との間に含まれる（例えば、Oliver, 1996を参照のこと）。ペリプラズム区画は、細胞内区画（sub-cellular compartment）であるので、細胞の増殖および分裂に伴って大きさ、形状、および内容物が変動する。ペプチドグリカンの枠組み内では、ヘテロポリマーはペリプラズムタンパク質およびわずかな水の高密度環境であり、この区画にゲル様の粘稠度をもたらす（Hobotら、1984；van Wielink and Duine、1990）。ペプチドグリカンは、外膜への近さに依存して様々な程度に重合され、至近距離では、細胞の形状および浸透圧溶解に対する耐性を与えるムレイン細胞嚢を形成する。

30

【0045】

外膜（Nikaido、1996を参照のこと）は、リン脂質、ポーリンタンパク質、および、培地内へ伸長するリポ多糖（LPS）から構成される。外膜の完全性の分子基盤は、2価の陽イオン（ $Mg^{2+}$ および $Ca^{2+}$ ）を結合し、互いを静電的に連結して表面上に高次の規則正しい準結晶配向した「瓦屋根」を形成するLPSの能力により備わっている（Labischinskiら、1985）。この膜は、ポーリンを介して、約650Da以下の分子の通過を可能にする非常に厳密な透過性障壁を形成する（Burmanら、1972；Decad and Nikaido、1976）。大量の水で満たされたポーリンチャンネルは、単糖および二糖、イオン、ならびにアミノ酸のペリプラズム区画への自由な通過の許容を主に担う（Nikaido and Nakae、1979；Nikaido and Vaara、1985）。分子のペリプラズムへの接近の、そのような厳密な生理的調節により、より大きなリガンド（すなわち、650Daの排除限界より大きいもの）をスクリーニング方法において利用できることは、一見して不可解に見えるかもしれない。しかし、本発明者らは、2000Daよりも大きいリガンドがペリプラズム膜を破壊することなくペリプラズム内に拡散し得ることを示した。このような拡散は、細菌細胞の1つ以上の処理によって支援することができ、これにより、本明細書中において以下に記載されるように、外膜をより透過性にすることができる。

40

【0046】

ペリプラズム空間内でポリペプチド、および特に、抗体を発現させるための方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第7,094,571号、ならびに米国特許公開番号第20030180937号および同第20030219870号（それぞれが引用

50

により本明細書中に組み入れられる)を参照のこと。いくつかの場合には、本発明のグラム陰性細菌細胞は、E. coli細胞として定義され得る。さらに、いくつかの態様においては、グラム陰性細菌細胞は、遺伝子操作された細菌細胞(例えば、E. coliのJude-1株)として定義され得る。

#### 【0047】

##### II. 外膜の透過処理

いくつかの実施形態においては、複数の方法に、当該分野で周知である細菌の外膜を破壊する、透過処理する、または除去する工程が含まれる。例えば、米国特許第7,094,571号を参照のこと。例えば、細菌細胞をFcRポリペプチドと接触させる前に、細菌細胞の外膜を、高浸透圧条件、物理的ストレス、リゾチーム、EDTA、消化酵素、外膜を破壊する化学物質で、または細菌をファージに感染させることにより、あるいは上記方法の組み合わせにより処理することができる。このように、いくつかの場合には、外膜を、リゾチームとEDTAでの処理により破壊することができる。さらに、特定の実施形態においては、細菌の外膜を完全に取り除くことができる。

10

#### 【0048】

1つの実施形態においては、1つ以上の標識されたりリガンドに対する外膜の透過性を増大させる方法が利用される。これにより、通常なら外膜を通過できない標識されたりリガンドのスクリーニングアクセスを利用することが可能になる。しかし、特定のクラスの分子(例えば、650Daの排除限界よりも大きい疎水性抗生物質)は、膜ポーチンとは無関係にそれ自体が細菌の外膜を通過して拡散することができる(Farmerら、1999)。このプロセスは、そのように行うと膜を実際に透過処理することができる(Jouenne and Junter、1990)。このような機構は、ポリミキシンBノナペプチドを用いてインピボで細胞質膜タンパク質のペリプラズムループを選択的に標識するために採用されている(Wadaら、1999)。また、特定の長鎖リン酸ポリマー(100Pi)も、外膜の正常な分子ふるい活性をまとめて回避するとみられる(Raon and Torriani、1988)。

20

#### 【0049】

生存性を喪失することなく、または発現されたタンパク質が細胞から放出されることなく、リガンドのペリプラズム内への透過をもたらす条件が同定されているが、本発明は外膜を維持せずに行うことが可能である。本明細書中で示されるように、Fcドメインをペリプラズム空間の中で発現させ、ペリプラズム空間の中の候補の結合性ポリペプチドに対して固定することにより、結合した標識リガンドを検出するために(細胞からの結合性タンパク質(binding protein)の漏出を妨げる障壁としての)外膜を維持する必要がなくなる。結果として、細胞質膜の外(ペリプラズム)面に固定された結合性タンパク質を発現する細胞は、ある程度透過処理された膜を有する細胞またはほぼ完全に外膜が除去された細胞のいずれかにおいて、単に蛍光標識リガンドの溶液とともにインキュベーションすることにより、蛍光標識することができる。

30

#### 【0050】

異なる細菌宿主株の外膜の透過性は、大きく異なり得る。OmpFの過剰発現が原因である透過性の増大が、ヒストン様タンパク質が存在しないことにより起こり、これにより、OmpFの翻訳に関する負の調節性mRNAの量の減少が生じることが以前に示されている(Painbeniら、1997)。また、DNA複製および染色体分離も、レプリソームと内膜との密接した接触に依存することが公知であり、内膜自体は複数の箇所を外膜と接触している。ライブラリースクリーニングの用途に好ましい宿主は、プラスミドコピー数を減少させる変異をさらに有するE. coli ABLE C株である。

40

#### 【0051】

高浸透圧ショックのような処理により標識を有意に改善することができる。カルシウムイオン(Bukauら、1985)、およびさらにはTris緩衝液(Irvinら、1981)を含む多くの物質が、外膜の透過性を変化させることは公知である。さらに、ファージ感染が標識化プロセスを刺激する。繊維状ファージの内膜タンパク質pIIIおよび

50

び大きな多量体外膜タンパク質 p I V の両方によって膜透過性は変わり得 ( B o e k e r a 、 1 9 8 2 ) 、 p I V 中の変異が、通常は排除されるマルトデキストリンへの接近を改善することが知られている ( M a r c i a n o r a 、 1 9 9 9 ) 。 株、塩、およびファージの賢明な組み合わせを含む本発明の技法を使用して、高度な透過性が達成され得る ( D a u g h e r t y r a 、 1 9 9 9 ) 。 次に、フローサイトメトリーまたは他の関連する技術を使用して、蛍光標識リガンドに結合している固定されたポリペプチドまたはペリプラズムと関係があるポリペプチドを含む細胞を、標識リガンドに対する親和性を持たない結合性タンパク質を発現する細胞から容易に単離することができる。しかし、いくつかの場合には、細胞の生存性を維持するために、破壊的な技法の使用を控えることが望ましいと考えられる。 E D T A 処理およびリゾチーム処理もまた、これに関して有用であり得る。

10

#### 【 0 0 5 2 】

##### I I I . 抗体結合性ポリペプチド

特定の態様においては、 F c 受容体のような抗体結合性ポリペプチドに対して特異的親和性を持つ抗体 F c ドメインを同定するための方法が存在する。いくつかの実施形態においては、 F c ドメインは、 1 つ以上の特異的 F c 受容体に結合するように操作される。さらに、またはあるいは、 F c ドメインは、それが 1 つ以上の特異的 F c 受容体に特異的に結合しないように操作される場合もある。

#### 【 0 0 5 3 】

特定の実施形態においては、天然のまたは野生型タンパク質と比較して修飾されたタンパク質様分子を含む組成物が存在する。

20

#### 【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態においては、タンパク質様化合物は、アミノ酸残基が欠失している。他の実施形態においては、タンパク質様化合物のアミノ酸残基は置換されており、なおさらなる実施形態においては、タンパク質様化合物中のアミノ酸残基の欠失と置換の両方が作製されている。さらに、タンパク質様化合物には、アミノ酸分子を含有する 2 つ以上のポリペプチド物質が含まれ得る。本明細書中で使用される場合は、「タンパク質様分子」、「タンパク質様組成物」、「タンパク質様化合物」、「タンパク質様鎖」、または「タンパク質様物質」は、一般的には、 1 つの遺伝子から翻訳された約 2 0 0 を超えるアミノ酸もしくは全長の内因性の配列のタンパク質； 1 0 0 以上のアミノ酸のポリペプチド；および/または 3 ~ 1 0 0 アミノ酸のペプチドをいうが、これらに限定されない。上記全ての「タンパク質様」の用語は、本明細書中では互換的に使用され得る。しかし、特定のタイプのタンパク質様化合物 ( 例えば、ポリペプチド ) に限定される実施形態が存在し得ることが具体的に想定される。さらに、これらの用語は、融合タンパク質またはタンパク質結合体にも同様に適用され得る。タンパク質には、 2 つ以上のポリペプチドが含まれる場合がある。例えば、 I g G 抗体は、 2 つの重鎖ポリペプチドと 2 つの軽鎖ポリペプチドを有し、これらは、ジスルフィド結合を通じて互いに連結される。

30

#### 【 0 0 5 5 】

本明細書中で使用される場合は、「異なる F c ドメイン」は、わずか 1 つのアミノ酸が別の F c とは異なるドメインと定義され得る。異なる抗体 F c ドメインまたは複数の抗体をコードする核酸のライブラリーを作製するための方法は当該分野で周知であり、本明細書中で例示される。例えば、いくつかの場合には、 F c ドメインを、本明細書中で例示される e r r o r p r o n e P C R により増幅させることができる。さらに、特定の場合には、複数の抗体 F c ドメインに、無作為化された ( 1 個、 2 個、 3 個、 4 個、 5 個、 6 個、 7 個、 8 個、 9 個、 1 0 個、またはそれ以上の ) アミノ酸の 1 つのストレッチが含まれ得る。特定の場合には、特異的な変異が、 F c ドメインの中に操作され得る。例えば、いくつかの態様においては、抗体 F c ドメインにおいて通常グリコシル化される残基を変異させることができる。さらに、特定の態様においては、通常グリコシル化される残基 ( または隣接する残基 ) を、 1 個、 2 個、 3 個、 4 個、 5 個、 6 個、 7 個、 8 個、 9 個、 1 0 個、またはそれ以上のアミノ酸の挿入のための部位として使用することができる。アミノ酸の挿入は、 I g G 1 F c ( 配列番号 2 ) の 3 8 4 位のアミノ酸に対応している残

40

50

基に、またはそれに隣接するように作製することができる。なおさらなる場合には、本発明のグラム陰性細菌の集団は、少なくとも約  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、またはそれ以上の異なる抗体Fcドメインを含むと定義され得る。いくつかの特異的な場合には、グラム陰性細菌細胞の集団は、以下の工程を含む方法により産生され得る：(a)複数の異なる抗体Fcドメインをコードする複数の核酸配列を調製する工程；および(b)グラム陰性細菌の集団を上記核酸で形質転換する工程(ここでは、上記グラム陰性細菌には、ペリプラズムの中で発現された複数の抗体Fcドメインが含まれる)。

#### 【0056】

様々な抗体結合ドメイン(例えば、FcRポリペプチド)が当該分野で公知であり、本発明の方法および組成物において使用され得る。例えば、いくつかの態様においては、FcRは、特定のタイプまたはサブタイプのIg(例えば、IgA、IgM、IgE、またはIgG(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgG4))に対して特異性を有し得る。したがって、いくつかの実施形態においては、抗体結合ドメインは、IgG結合ドメインとして定義され得る。FcRポリペプチドには、真核生物の、原核生物の、または合成のFcRドメインが含まれ得る。例えば、抗体Fc結合ドメインは、哺乳動物の、細菌の、または合成の結合ドメインと定義され得る。本発明において使用されるいくつかのFc結合ドメインとしては、表1のポリペプチドのうちの一つに由来する結合ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Fc結合ポリペプチドは、FCGR2A、FCGR2B、FCGR2C、FCGR3A、FCGR3B、FCGR1A、Fcgr1、FCGR2、FCGR2、Fcgr2、Fcgr2、FCGR3、FCGR3、Fcgr3、FCGR3、Fcgr3、FCGRT、mrp4、spa、またはspg遺伝子によりコードされ得る。好ましくは、本発明にしたがって使用されるFcRポリペプチドは、ヒトFcRIa、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、FcRIIIb、FcRI、またはC1q由来のFc結合領域であり得る。

#### 【0057】

本発明のなおさらなる実施形態においては、Fcポリペプチドがグラム陰性細菌の内膜に固定され得る。グラム陰性細菌の内膜へのポリペプチドの固定のための方法および組成物は、これまでに記載されている(米国特許第7,094,571号および米国特許公開番号20050260736)。したがって、いくつかの態様においては、Fcドメインは、細菌の内膜と会合するかまたは細菌の内膜の中に組み込まれるポリペプチドに融合させることができる。そのような融合タンパク質には、FcドメインとのN末端またはC末端融合が含まれ得、いくつかの場合には、膜固定性ポリペプチドとFcドメインとの間にさらに別のリンカーアミノ酸が含まれ得る。特定の特異的な場合には、膜固定性ポリペプチドは、E.coli NlpA遺伝子によりコードされる最初の6個のアミノ酸、E.coli内膜タンパク質由来の一つ以上の膜貫通ヘリックス、線維性ファージの遺伝子IIIタンパク質またはその断片、あるいは内膜リポタンパク質またはその断片であり得る。したがって、一例として、膜固定性ポリペプチドは、以下のような内膜リポタンパク質またはその断片であり得る：AraH、MglC、MalF、MalG、MalC、MalD、RbsC、RbsC、ArtM、ArtQ、GlnP、ProW、HisM、HisQ、LivH、LivM、LivA、LivE、DppB、DppC、OppB、AmiC、AmiD、BtuC、ThuD、FecC、FecD、FecR、FepD、NikB、NikC、CysT、CysW、UgpA、UgpE、PstA、PstC、PotB、PotC、PotH、Pod、ModB、NosY、PhnM、LacY、SecY、TolC、Dsb、B、DsbD、TouB、TatC、CheY、TraB、ExbD、ExbB、またはAas。

#### 【0058】

当業者は、FcRとのそれらの相互作用(結合)に基づいて細胞を選択するための方法が当該分野で周知であることを理解するであろう。例えば、FcRが、カラムまたはビー

10

20

30

40

50

ズ（例えば、磁気ビーズ）上に固定化され得、FcRに対する細菌細胞の結合が、ビーズ（例えば、磁気による分離）またはカラムを繰り返し洗浄することにより分離される。さらに、いくつかの態様においては、標的リガンドが、例えば、発蛍光団、放射性同位体、または酵素で標識され得る。したがって、いくつかの場合には、細菌細胞は、結合したFcR上の標識を検出することにより選択され得る。例えば、発蛍光団が、蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用して細胞を選択するために使用され得る。さらに、いくつかの態様においては、細菌細胞は、2つ以上のFcRポリペプチドの結合、またはその結合が存在しないことに基づいて選択され得る。例えば、2つのFcRポリペプチドに結合する抗体を提示する細菌が選択され得る。ここでは、各FcRは、細菌を連続して選択するため使用される。反対に、特定の態様においては、1つのFcR（例えば、第1の標識を含むFcR）に結合するが、第2のFcR（例えば、第2の標識を含むFcR）には結合しない抗体Fcドメインを提示する細菌が選択され得る。上記方法は、例えば、特異的FcRに結合するが、第2の特異的FcRには結合しない抗体Fcドメインを同定するために使用することができる。

10

#### 【0059】

特定の実施形態においては、少なくとも1つのタンパク質様分子の大きさとして、以下を挙げることができるが、これらに限定されない：約または少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、もしくはそれより多いアミノ酸分子残基、あるいはその中から導くことができる任意の範囲。化合物には、配列番号2（ヒトIgGFcポリペプチド）または配列番号4～31に由来する、上記数の連続するアミノ酸が含まれ得、これらは、配列番号2または配列番号4～31のいずれかに対して同一性または相同性（%）を有しているとしてさらに条件をつけることができる（以下で議論される）。配列番号2に関する実施形態が、本明細書中に記載される任意の他のアミノ酸配列に関しても利用され得ること、および適切である場合にはその逆も想定される。

20

#### 【0060】

本明細書中で使用される場合は、「アミノ分子」は、任意のアミノ酸、当業者に公知である任意のアミノ酸誘導体またはアミノ酸模倣物をいう。特定の実施形態においては、タンパク質様分子の残基は連続しており、アミノ分子の残基の配列の間に割り込んでいる非アミノ分子は存在しない。他の実施形態においては、上記配列に、1つ以上の非アミノ分子部分が含まれ得る。特定の実施形態においては、タンパク質様分子の残基の配列の間に、1つ以上の非アミノ分子部分が割り込んでいる場合がある。

30

#### 【0061】

##### A. 修飾されたタンパク質およびポリペプチド

複数の実施形態は、修飾されたタンパク質およびポリペプチド、特に、修飾されていないバージョンに匹敵する少なくとも1つの機能的活性を示す修飾されたタンパク質またはポリペプチドに関係するが、上記修飾されたタンパク質またはポリペプチドは、なおも、修飾されていないバージョンを上回るさらなる利点（例えば、ADCCを誘発すること、生産がより容易であり、より安価であること、誘発する副作用が少ないこと、および/またはより優れたもしくはより長い効力または生体利用性を有していること）を持つ。したがって、本出願が「修飾されたタンパク質」または「修飾されたポリペプチド」の機能あるいは活性について言及する場合には、当業者は、これに、例えば、1) 未修飾のタンパク質もしくはポリペプチドと少なくとも1つの同じ活性を行うか、または少なくとも1つの同じ特異性を有するが、異なるレベルの別の活性または特異性を有し得る；そして、2) 未修飾のタンパク質またはポリペプチドを上回るさらなる利点を持つタンパク質あるいはポリペプチドが含まれることを理解するであろう。活性の決定は、（特に、タンパク質

40

50

の活性に関する)当業者が良く知っているアッセイを使用して達成され得、これには、比較目的のための、例えば、修飾されたもしくは未修飾のタンパク質またはポリペプチドのいずれかの未改変のならばに/あるいは組み換え体バージョンの使用が含まれ得る。「修飾されたタンパク質」と関係がある複数の実施形態は、「修飾されたポリペプチド」に関して実行することができる場合があり、そしてその逆もあり得ることが具体的に想定される。本明細書中で議論される修飾されたタンパク質およびポリペプチドに加えて、複数の実施形態には、W O 2 0 0 8 / 1 3 7 4 7 5 (引用により本明細書中に具体的に組み入れられる)に記載されているドメイン、ポリペプチド、およびタンパク質が含まれ得る。

#### 【0062】

修飾されたタンパク質は、アミノ酸の欠失および/または置換を持つ場合がある。したがって、欠失を持つタンパク質、置換を持つタンパク質、および欠失と置換を持つタンパク質は、修飾されたタンパク質である。いくつかの実施形態においては、これらの修飾されたタンパク質にはさらに、例えば、融合タンパク質またはリンカーを持つタンパク質のように、アミノ酸の挿入または付加が含まれる場合がある。「修飾された欠失タンパク質」は、未改変のタンパク質の1つ以上の残基を欠くが、未改変のタンパク質の特異性および/または活性を持つ。「修飾された欠失タンパク質」はまた、低下した免疫原性または抗原性を有し得る。修飾された欠失タンパク質の一例は、少なくとも1つの抗原性領域(すなわち、特定の生物(例えば、修飾されたタンパク質が投与され得る生物のタイプ)において抗原性であると決定されたタンパク質の1つの領域)に由来するアミノ酸残基が欠失しているタンパク質である。

10

20

#### 【0063】

置換(substitutional)バリエーションまたは置き換え(replacement)バリエーションは、典型的にはタンパク質内の1つ以上の部位での、1つのアミノ酸の別のアミノ酸への交換を含み、ポリペプチドの1つ以上の特性(特に、そのエフェクター機能および/または生体利用性)を調節するように設計され得る。置換は保存的である、すなわち1つのアミノ酸が類似する形状および電荷を持つもので置き換えられている場合も、またそうではない場合もある。保存的置換は当該分野で周知であり、これには例えば、以下の変化が含まれる:アラニンからセリンへ;アルギニンからリジンへ;アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへ;アスパラギン酸からグルタミン酸へ;システインからセリンへ;グルタミンからアスパラギンへ;グルタミン酸からアスパラギン酸へ;グリシンからプロリンへ;ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへ;イソロイシンからロイシンまたはバリンへ;ロイシンからバリンまたはイソロイシンへ;リジンからアルギニンへ;メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへ;フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニンへ;セリンからスレオニンへ;スレオニンからセリンへ;トリプトファンからチロシンへ;チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへ;およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへ。

30

#### 【0064】

欠失または置換に加えて、修飾されたタンパク質は残基の挿入を持つ場合があり、これには典型的には、ポリペプチドの中の少なくとも1つの残基の付加が含まれる。これには、標的化ペプチドもしくはポリペプチド、または単に1つの残基の挿入が含まれ得る。融合タンパク質と呼ばれる末端付加は以下で議論される。

40

#### 【0065】

用語「生物学的に機能的に等価」は、当該分野で十分に理解されており、本明細書中でさらに詳細に定義される。したがって、天然のポリペプチドのアミノ酸に対して同一または機能的に等価であるアミノ酸の約70%~約80%、または約81%~約90%、さらには約91%~約99%を有している配列が、そのタンパク質の生物学的活性が維持される限りにおいて含まれる。修飾されたタンパク質は、その天然の対応物と生物学的に機能的に等価であり得る。

#### 【0066】

アミノ酸配列および核酸配列に、さらなる残基(例えば、さらなるN末端アミノ酸もし

50

くはC末端アミノ酸、または5'配列もしくは3'配列)が含まれる場合があり、それでもなお、本質的には、その配列が、タンパク質発現が関係する生物学的タンパク質活性の維持を含む上記に示された基準を満たす限りは、本明細書中で開示される配列のうちの1つの中に示されるものであることも、理解されるであろう。末端配列の付加は、特に、例えば、コード領域の5'部分もしくは3'部分のいずれかに隣接している様々な非コード配列を含み得るか、または、遺伝子内に存在することが知られている様々な内部配列(すなわち、イントロン)を含み得る核酸配列に適用される。

#### 【0067】

以下は、等価であるか、またはなおさらには改良された第2世代の分子を作製するための、タンパク質のアミノ酸の変化に基づく議論である。例えば、特定のアミノ酸を、構造(例えば、基質分子に対する結合部位)との相互作用による結合能力の感知できるほどの喪失を伴って、または伴わずに、タンパク質構造中の他のアミノ酸で置換することができる。そのタンパク質の生物学的機能的活性を定義するものが、タンパク質の相互作用能力および性質であるので、特定のアミノ酸置換をタンパク質配列中、およびその根底にあるDNAコード配列中に作製することができ、それでもなお、類似する特性を持つタンパク質が生じる。したがって、以下で議論されるように、それらの生物学的有用性または活性の感知できるほどの喪失を伴わない様々な変化を、遺伝子のDNA配列中に作製することができるが、本発明者らにより想定される。タンパク質様分子は、以下の「相同性の基準」が満たされる場合には、第2のタンパク質様分子に対して「相同性」を有するか、または「相同である」と考えられる：1)タンパク質様分子の少なくとも30%が第2のタンパク質様分子と同じ位置に配列同一性を有する；2)第2のタンパク質様分子と同じ位置に、ある程度の配列同一性が存在し、同一ではない残基では、本明細書中に記載される場合には、それらのうちの少なくとも30%が第2のタンパク質様分子と保存的に異なる；または、3)タンパク質様分子の少なくとも30%が第2のタンパク質様分子と配列同一性を有するが、同一である残基の間に同一ではない残基のギャップが存在する可能性がある。本明細書中で使用される場合は、用語「相同」は、分子全体ではなくタンパク質様分子の1つの領域にも同様に適用することができる。用語「相同性」または「相同」は数により定性化され(例えば、「50%の相同性」または「50%相同」)、その後、1)、2)、および3)に関する相同性の基準が、「少なくとも30%」から「少なくとも50%」までで調節される。したがって、2つのタンパク質様分子またはタンパク質様分子の複数の部分の間に、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上の相同性が存在し得ることが想定される。

#### 【0068】

あるいは、修飾されたポリペプチドは、未修飾のポリペプチドに対して、または配列番号2もしくは配列番号4~31のいずれかを含む本明細書中に開示される任意のポリペプチド配列に対して、特定の割合(%)の同一性を有するとして特性決定することができる。同一性の割合(%)は、2つのタンパク質様分子またはタンパク質様分子の複数の部分の間で、多くとも、または少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%(あるいはそれらから導くことができる任意の範囲)であり得る。上記で議論される同一性の割合(%)が、ポリペプチドの未修飾の領域と比較したポリペプチドの特定の領域に関係し得ることが想定される。例えば、ポリペプチドには、修飾されたFcドメインまたは変異体Fcドメインが含まれ得る。これらは、同じ種に由来する未修飾のFcドメインまたは変異体Fcドメインに対する、修飾されたFcドメインまたは変異体Fcドメインのアミノ酸配列の同一性に基いて特性決定することができる。例えば、未修飾のFcドメインに対して90%の同一性を有していると特性決定された修飾されたヒトFcドメインまたは変異体ヒトFcドメインは、そのドメイン中のアミノ酸の90%が未修飾のヒトFcドメイン(配列番号2)中のアミノ酸と同一であることを意味する。

#### 【0069】

そのような変化を作製することにおいて、アミノ酸の疎水性親水性指数が考慮される場合がある。タンパク質に対して相互作用性の生物学的機能を付与する疎水性親水性アミノ酸指数の重要性は当該分野で一般的に理解されている (K y t e & D o o l i t t l e , 1 9 8 2 ) 。アミノ酸の相対的な疎水性親水性特性が得られるタンパク質の二次構造に寄与し、これは次いで、そのタンパク質の他の分子 (例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原など) との相互作用を決定すると認められている。

【 0 0 7 0 】

類似するアミノ酸の置換が親水性に基づいて有効となり得ることもまた当該分野で理解されている。引用により本明細書中に組み入れられる米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号には、その隣接するアミノ酸の親水性により支配されるタンパク質の最大の局所平均親水性 ( l o c a l a v e r a g e h y d r o p h i l i c i t y ) がタンパク質の生物学的特性と関係していることが記載されている。米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号に詳細に記載されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+ 3 . 0 ) ; リジン (+ 3 . 0 ) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 ± 1 ) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 ± 1 ) ; セリン (+ 0 . 3 ) ; アスパラギン (+ 0 . 2 ) ; グルタミン (+ 0 . 2 ) ; グリシン ( 0 ) ; スレオニン ( - 0 . 4 ) ; プロリン ( - 0 . 5 ± 1 ) ; アラニン ( - 0 . 5 ) ; ヒスチジン ( - 0 . 5 ) ; システイン ( - 1 . 0 ) ; メチオニン ( - 1 . 3 ) ; バリン ( - 1 . 5 ) ; ロイシン ( - 1 . 8 ) ; イソロイシン ( - 1 . 8 ) ; チロシン ( - 2 . 3 ) ; フェニルアラニン ( - 2 . 5 ) ; トリプトファン ( - 3 . 4 ) 。

10

【 0 0 7 1 】

アミノ酸を類似する親水性値を有している別のアミノ酸で置換することができ、なおも生物学的に等価であり免疫学的に等価なタンパク質が生じることが理解される。このような変化においては、その親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 以内にあるアミノ酸の置換が特に好ましく、± 0 . 5 以内であるアミノ酸の置換がなおさらに特に好ましい。

20

【 0 0 7 2 】

上記で概説されたように、アミノ酸置換は、一般的には、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性 (例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、大きさなど) に基づく。様々な上記特徴を考慮する例示的な置換は当業者に周知であり、これには、アルギニンおよびリジン ; グルタミンおよびアスパラギン ; セリンおよびスレオニン ; グルタミン酸およびアスパラギン酸 ; ならびに、バリン、ロイシンおよびイソロイシンが含まれる。

30

【 0 0 7 3 】

それに対して F c ドメインが結合する様々な F c 受容体が当該分野で周知であり、受容体のいくつかの例が表 1 において以下に列挙される。

【 0 0 7 4 】

【表 1 - 1】

表 1: 選択されたFcRポリペプチド

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc $\gamma$ RII-a (CD32)	FCGR2A	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II-a 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	317	(Stuart <i>et al.</i> , 1987)
Fc $\gamma$ RII-a	FCGR2A	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II-a 前駆体	<i>Pan troglodytes</i> (チンパンジー)	316	
Fc $\gamma$ RII-b	FCGR2B	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II-b 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	310	(Stuart <i>et al.</i> , 1989)
Fc $\gamma$ RII-c	FCGR2C	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II-c 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	323	(Stuart <i>et al.</i> , 1989)
Fc $\gamma$ RIIIa	FCGR3A	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 III-A 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	254	(Ravetch and Perussia, 1989)
Fc $\gamma$ RIIIb	FCGR3B	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 III-B 前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	233	(Ravetch and Perussia, 1989)

10

20

30

【 0 0 7 5 】

【表 1 - 2】

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc $\gamma$ RI (CD64)	FCGR1A	高親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 受容体I前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	374	(Allen and Seed, 1988)
Fc $\gamma$ RI	Fcgr1	高親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 受容体I前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	404	(Sears <i>et al.</i> , 1990)
Fc $\gamma$ RII	FCGR2	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Bos taurus</i> (ウシ)	296	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)
Fc $\gamma$ RII	FCGR2	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Cavia porcellus</i> (モルモット)	341	(Tominaga <i>et al.</i> , 1990)
Fc $\gamma$ RII	Fcgr2	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	330	(Ravetch <i>et al.</i> , 1986)
Fc $\gamma$ RII	Fcgr2	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 II 前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	285	(Bocek and Pecht, 1993)
Fc $\gamma$ RIII	FCGR3	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Bos taurus</i> (ウシ)	250	(Collins <i>et al.</i> , 1997)
Fc $\gamma$ RIII	FCGR3	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Macaca fascicularis</i> (カニクイザル) (マカクザル)	254	
Fc $\gamma$ RIII	Fcgr3	低親和性免疫 グロブリン $\gamma$ Fc 領域受容体 III 前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	261	(Ravetch <i>et al.</i> , 1986)

10

20

30

40

【 0 0 7 6 】

【表 1 - 3】

タンパク質の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc $\gamma$ RIII	FCGR3	低親和性免疫グロブリン $\gamma$ Fc領域受容体III前駆体	<i>Sus scrofa</i> (ブタ)	257	(Halloran <i>et al.</i> , 1994)
Fc $\gamma$ RIII	Fcgr3	低親和性免疫グロブリン $\gamma$ Fc領域受容体III前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	267	(Zeger <i>et al.</i> , 1990)
FcRn	FCGRT	IgG受容体トランスポーターFcRnラージサブユニットp51前駆体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	365	
FcRn	FCGRT	IgG受容体トランスポーターFcRnラージサブユニットp51前駆体	<i>Macaca fascicularis</i> (カニクイザル) (マカクザル)	365	
FcRn	Fcgrt	IgG受容体トランスポーターFcRnラージサブユニットp51前駆体	<i>Mus musculus</i> (マウス)	365	(Ahouse <i>et al.</i> , 1993)
FcRn	Fcgrt	IgG受容体トランスポーターFcRnラージサブユニットp51前駆体	<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	366	(Simister and Mostov, 1989)
MRPタンパク質	mrp4	フィブリノーゲン結合性タンパク質前駆体およびIg結合性タンパク質前駆体	<i>Streptococcus pyogenes</i>	388	(Stenberg <i>et al.</i> , 1992)
プロテインB		cAMP 因子	<i>Streptococcus agalactiae</i>	226	(Ruhlmann <i>et al.</i> , 1988)
プロテインA	spa	免疫グロブリンG結合性プロテインA前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8325株)	516	(Uhlen <i>et al.</i> , 1984)
プロテインA	spa	免疫グロブリンG結合性プロテインA前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i>	508	(Shuttleworth <i>et al.</i> , 1987)

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

【表 1 - 4】

タンパク質の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
プロテイン A	spa	免疫グロブリンG 結合性プロテインA 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50 株 / ATCC 700699)	450	(Kuroda <i>et al.</i> , 2001)
プロテイン A	spa	免疫グロブリンG 結合性プロテインA 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (N315 株 )	450	(Kuroda <i>et al.</i> , 2001)
プロテイン G	spg	免疫グロブリンG 結合性プロテインG 前駆体	<i>Streptococcus</i> G 群連鎖球菌	448	(Fahnestock <i>et al.</i> , 1986)
プロテイン G	spg	免疫グロブリンG 結合性プロテインG 前駆体	<i>Streptococcus</i> G 群連鎖球菌	593	(Olsson <i>et al.</i> , 1987)
プロテイン H		免疫グロブリンG 結合性プロテインH 前駆体	<i>Streptococcus pyogenes</i> 血清型 M1	376	(Gomi <i>et al.</i> , 1990)
プロテイン sbi	sbi	免疫グロブリンG 結合性プロテイン sbi 前駆体	<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8325-4 株 )	436	(Zhang <i>et al.</i> , 1998)
アレルゲン Asp fl 1		アレルゲン Asp fl 1 はヒトにおいてアレルギー反応を引き起こす。IgE と IgG に結合する。	<i>Aspergillus flavus</i>	32	
アレルゲン Asp fl 2		アレルゲン Asp fl 2 はヒトにおいてアレルギー反応を引き起こす。IgE と IgG に結合する。	<i>Aspergillus flavus</i>	20	
アレルゲン Asp fl 3		アレルゲン Asp fl 3 はヒトにおいてアレルギー反応を引き起こす。IgE と IgG に結合する。	<i>Aspergillus flavus</i>	32	
Fc ε RI		肥満細胞、好酸球、および好塩基球上に提示される IgE 受容体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		

10

20

30

40

【表 1 - 5】

タンパク質 の名称	遺伝子の名称	説明	生物	長さ (aa)	参考文献
Fc $\alpha$ RI (CD86)		マクロファージ上に 提示されるIgA (IgA1, IgA2) 受容体	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		
Clq	CIQA NP_057075.1 , CIQB NP_000482.3 , CIQC NP_758957.1	Clqは、6つの A鎖、6つのB鎖、 および6つのC鎖 からなる抗体Fc に結合する多量 体複合体である。	<i>Homo sapiens</i> (ヒト)		

10

上記で議論されたように、ポリペプチドには、FcRポリペプチドに結合することができるグリコシル化されていない抗体Fcドメインが含まれる場合がある。いくつかの態様においては、上記グリコシル化されていないFcドメインは、生理学的条件下でFcRポリペプチドに対して特異的親和性を有しているとしてさらに定義され得る。例えば、Fcドメインは、生理学的条件下で約 $10^{-6}$  M ~ 約 $10^{-9}$  Mの間の平衡解離定数を有し得る。いくつかの態様においてはさらに、グリコシル化されていないFcドメインは、野生型配列（例えば、ヒトの野生型配列）と比較して1つ以上のアミノ酸置換または挿入を含むと定義することができる。

20

## 【0079】

そのようなポリペプチドを調製する手段としては、引用により本明細書中に組み入れられるWO2008/137475において議論されているものが挙げられる。あるいは、例えば、既知のFcバックグラウンドの中に選択されたアミノ酸置換または挿入を導入することにより、遺伝子操作技術によって直接そのようなポリペプチドを調製することもできる。この場合、上記挿入または置換により、グリコシル化されていないFc領域に対する改善されたFcR結合能力がもたらされる。本発明者らは、そのような改善されたFcR結合を得るために特に好ましい置換として、Fcドメインの331位、382位、および/または428位の置換を同定し（例えば、Nagaoka and Akaïke 2003を参照のこと；引用により本明細書中に組み入れられる米国特許公開番号US20060173170に示されているような、ヒトIgG Fcドメイン配列のP331、E382、および/またはM428）、P331L、E382V、M428I、またはM428Lにより定義される1つ以上の置換（substitution）がなおさらに好ましい。

30

## 【0080】

以下の表5および6に記載される置換に加えて、ポリペプチドは、以下のような、Fcドメインの426位、229位、322位、350位、361位、372位、442位、402位、224位、430位、238位、436位、310位、313位、384位、372位、380位、または331位の1つ以上を含む置換を有し得る：ヒトIgG FcドメインのS426、C229、K322、T350、N361、F372、S442、G402、H224、E430、P238、Y436、H310、W313、N384、F372、E380、またはP331。特に好ましい例は以下である：a) E382およびM428；b) N361、E382、およびM428；c) N361、F372、E382、およびM428；d) H310、K322、T350、E382、S426、およびS442；e) C229R、E382、およびM428；f) W313およびM428；g) E382、N384、およびM428；h) E380、E382、およびN38

40

50

4 ; i ) N 3 6 1、E 3 8 2、および M 4 2 8 ; j ) E 3 8 2、M 4 2 8、および Y 4 3 6 ; k ) P 2 3 8、E 3 8 2、S 4 2 6、M 4 2 8、および E 4 3 0 ; l ) E 3 8 0、E 3 8 2、N 3 8 4、S 4 2 6、M 4 2 8、および E 4 3 0 ; m ) E 3 8 2、S 4 2 6、M 4 2 8、および E 4 3 0 ; n ) H 2 2 4、E 3 8 2、S 4 2 6、M 4 2 8、および E 4 3 0 ; o ) P 3 3 1 ; p ) S 2 3 9、I 2 5 3、Q 3 4 7、E 3 8 2 ; q ) E 3 8 2、G 4 0 2、および M 4 2 8 ; ならびに r ) E 3 8 2、P 3 3 1、および M 4 2 8。特定の置換としては以下が挙げられる : a ) E 3 8 2 V および M 4 2 8 I ; b ) E 3 8 2 V ; c ) N 3 6 1 D、E 3 8 2 V、および M 4 2 8 I ; d ) N 3 6 1 D、F 3 7 2 L、E 3 8 2 V、および M 4 2 8 I ; e ) H 3 1 0 Y、K 3 2 2 R、T 3 5 0 A、E 3 8 2 V、S 4 2 6 T、および S 4 4 2 P ; f ) C 2 2 9 R、E 3 8 2 V、および M 4 2 8 I ; g ) W 3 1 3 R、および M 4 2 8 I ; h ) E 3 8 2 T、N 3 8 4 D、および M 4 2 8 I ; i ) E 3 8 0 R、E 3 8 2 M、および N 3 8 4 E ; j ) N 3 6 1 S、E 3 8 2 V、および M 4 2 8 I ; k ) E 3 8 2 V、M 4 2 8 I、および Y 4 3 6 A ; l ) P 2 3 8 S、E 3 8 2 V、S 4 2 6 V、M 4 2 8 L、および E 4 3 0 H ; m ) E 3 8 0 D、E 3 8 2 V、N 3 8 4 R、S 4 2 6 V、M 4 2 8 L、および E 4 3 0 D ; n ) E 3 8 2 V、S 4 2 6 I、M 4 2 8 L、および E 4 3 0 S ; o ) H 2 2 4 R、E 3 8 2 V、S 4 2 6 T、M 4 2 8 S、および E 4 3 0 P ; p ) P 3 3 1 L ; q ) S 2 3 9 L、I 2 5 3 T、Q 3 4 7 L、E 3 8 2 V ; r ) E 3 8 2 V、G 4 0 2 D、および M 4 2 8 I ; ならびに s ) E 3 8 2 V、P 3 3 1 L、および M 4 2 8 I。

10

20

## 【0081】

さらなるアミノ酸が挿入されると改善された F c R 結合能力をもたらす、様々な挿入点が F c ドメイン中に存在し得る。5 ~ 15 アミノ酸の挿入が想定される。いくつかの実施形態においては、10 アミノ酸が、例えば、F c ドメイン (例えば、ヒト I g G F c ドメイン) のアミノ酸 N 2 9 7 と S 2 9 8 との間に挿入される。この位置での具体的な挿入 (ならびに置換) としては、以下が挙げられる : a ) R T E T P V Y M V M (配列番号 7 9) ; b ) W Q V F N K Y T K P (配列番号 8 0) ; c ) L G D G S P C K A N (配列番号 8 1) ; d ) F 2 4 1 L および K 3 2 6 E とともに E V P L V W M W V S (配列番号 8 2) ; ならびに e ) V 2 8 2 A とともに E Q W G S Q F G C G (配列番号 8 3)。

## 【0082】

F c ドメインは、I g G F c ドメインの E 3 8 2 に対応するアミノ酸残基にアミノ酸置換を含むヒト I g G F c であり得る。さらに、グリコシル化されていない F c ドメインには、I g G F c ドメインの E 3 8 2 に対応するアミノ酸残基に隣接してアミノ酸配列の挿入 (例えば、約 1 ~ 5 アミノ酸) が含まれる場合がある。したがって、いくつかの特異的な態様においては、F c ドメインには、E から V への置換のような E 3 8 2 位での疎水性アミノ酸置換が含まれる場合がある。さらに、いくつかの態様においては、本発明の F c ドメインには、ヒト I g G F c の M 4 2 8 (例えば、M 4 2 8 から I)、S 4 2 6、C 2 2 9、H 3 1 0、K 3 2 2、T 3 5 0、N 3 6 1、F 3 7 2、または S 4 4 2 に対応する残基でのアミノ酸置換が含まれ得る。特定の特異的な実施形態においては、グリコシル化されていない F c ドメインに、引用により本明細書中に組み入れられる W O 2 0 0 8 / 1 3 7 4 7 5 に記載されているように、F c L 1 の中で見られるアミノ酸置換に対応するアミノ酸置換が含まれ得る。したがって、極めて特異的な場合には、グリコシル化されていない F c ドメインに配列番号 2 のアミノ酸配列が含まれ得る (F c 5)。

30

40

## 【0083】

いくつかの実施形態においては、グリコシル化されていない F c ドメインに、F c R (例えば、ヒト F c R I a、F c R I I a、F c R I I b、F c R I I c、F c R I I I a、F c R I I I b、F c R I、または C 1 q) に対する特異的結合親和性が含まれる。したがって、いくつかの態様においては、本発明のグリコシル化されていない F c ドメインは、F c R I a に対して特異的親和性を持つ F c ドメインと定義される。さらに、そのような F c ドメインは、生理学的条件下で約  $10^{-6}$  M ~ 約  $10^{-9}$  M の F c R I a 結合に関する平衡解離定数を有していると定義され得る。

50

## 【 0 0 8 4 】

## B . 異種領域を持つ修飾された抗体およびタンパク質様化合物

複数の実施形態が、2つ以上の自然界に存在しているかまたは天然のポリペプチドあるいはタンパク質に由来するアミノ酸配列を含むことができるタンパク質様化合物に関係する。上記で議論された実施形態は、このセクションにも適用されると想定され、その逆も想定される。例えば、修飾された抗体は、抗原結合ドメインを持つ修飾されたFcドメインを含む抗体である。さらに、抗体は、2つの異なる抗原結合領域（例えば、2つの重鎖のそれぞれの上にある異なる領域）を有し得る。あるいは、またはさらに、いくつかの実施形態においては、複数の異種ペプチドおよび/またはポリペプチド（「異種」は、それらが同じポリペプチドには由来しないことを意味している）を含むポリペプチドが存在する。タンパク質様化合物または分子は、例えば、抗体由来ではないタンパク質結合領域を持つ修飾されたFcドメインを含み得る。いくつかの実施形態においては、細胞表面受容体に結合するタンパク質結合領域を持つ修飾されたFcドメインを含むポリペプチドが存在する。複数の機能的ドメインを含むこれらのタンパク質様分子は、互いに化学的に結合した2つ以上のドメインである場合があり、また、これは、同じ核酸分子によりコードされる2つ以上のポリペプチドの融合タンパク質である場合もある。タンパク質またはポリペプチドが、2つ以上の異種ポリペプチド全体あるいはそれらの一部を含み得ると想定される。

10

## 【 0 0 8 5 】

したがって、マルチポリペプチドタンパク質様化合物は、第1のポリペプチド全体またはその一部と、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、第4のポリペプチド、第5のポリペプチド、第6のポリペプチド、第7のポリペプチド、第8のポリペプチド、第9のポリペプチド、第10のポリペプチド、またはさらなるポリペプチドの全体またはその一部から構成され得る。

20

## 【 0 0 8 6 】

抗体の抗原結合ドメインまたは領域とグリコシル化されていないFcドメインを有しているポリペプチドあるいはタンパク質（抗体を含む）は、以下の標的のリストに属しているタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフ、および/またはエピトープを含むがこれらに限定されない任意の抗原あるいはエピトープに対して使用することができる： 17 - I A、4 - 1 B B、4 D c、6 - ケト - P G F 1 a、8 - イソ - P G F 2 a、8 - オキソ - d G、A 1 アデノシン受容体、A 3 3、A C E、A C E - 2、アクチビン、アクチビン A、アクチビン A B、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン R I A、アクチビン R I A A L K - 2、アクチビン R I B A L K - 4、アクチビン R I I A、アクチビン R I I B、A D A M、A D A M 1 0、A D A M 1 2、A D A M 1 5、A D A M 1 7 / T A C E、A D A M 8、A D A M 9、A D A M T S、A D A M T S 4、A D A M T S 5、アドレッシン、a F G F、A L C A M、A L K、A L K - 1、A L K - 7、 - 1 - 抗トリプシン、 - V / - 1 アンタゴニスト、A N G、A n g、A P A F - 1、A P E、A P J、A P P、A P R I L、A R、A R C、A R T、アルテミン、抗 I d、A S P A R T I C、心房ナトリウム利尿因子、a v / b 3 インテグリン、A x 1、b 2 M、B 7 - 1、B 7 - 2、B 7 - H、B リンパ球刺激因子 ( B l y S )、B A C E、B A C E - 1、B a d、B A F F、B A F F - R、B a g - 1、B A K、B a x、B C A - 1、B C A M、B c 1、B C M A、B D N F、b - E C G F、b F G F、B I D、B i k、B I M、B L C、B L - C A M、B L K、B M P、B M P - 2 B M P - 2 a、B M P - 3 オステオゲニン、B M P - 4 B M P - 2 b、B M P - 5、B M P - 6 V g r - 1、B M P - 7 ( O P - 1 )、B M P - 8 ( B M P - 8 a、O P - 2 )、B M P R、B M P R - I A ( A L K - 3 )、B M P R - I B ( A L K - 6 )、B R K - 2、R P K - 1、B M P R - I I ( B R K - 3 )、B M P s、b - N G F、B O K、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、B P D E、B P D E - D N A、B T C、補体因子 3 ( C 3 )、C 3 a、C 4、C 5、C 5 a、C 1 0、C A 1 2 5、C A D - 8、カルシトニン、c A M P、癌胎児性抗原 ( C E A )、癌関連抗原、カテプシン A、カテプシン B、カテプシン C / D P P I、カテプシン D、カテプシ

30

40

50

ンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテ  
 プシンX/ZIP、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL  
 12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、C  
 CL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、  
 CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、C  
 CL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR  
 10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CC  
 R9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、  
 CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD  
 16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD  
 27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タン  
 パク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46  
 、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD6  
 6e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137  
 、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD  
 164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、Clostridium b  
 otulinum毒素、Clostridium perfringens毒素、CKb  
 8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret  
 、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3  
 CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、C  
 XCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CX  
 CL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CX  
 CR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン  
 腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩壊促進因子、des (1  
 -3)-IGF-I (脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase  
 、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-  
 A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA  
 、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、Ep  
 CAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクチン、ET-1、第  
 I Ia因子、第VII因子、第VIIIC因子、第IX因子、線維芽細胞活性化タンパク  
 質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、F  
 GF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLI  
 P、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルキン、FZD1、FZD2  
 、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD1  
 0、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1  
 、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6  
 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF  
 -8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF  
 、GFAP、GFRa-1、GFR-1、GFR-2、GFR-3、GITR、グ  
 ルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIa (GPIIb/IIa)、GM  
 -CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-c  
 apまたはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベローブ糖タ  
 ンパク質、HCMV) gHエンベローブ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (
 HGF)、HepB gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu (Erb  
 B-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイル  
 ス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量の黒色  
 腫瘍関連抗原 (HMW-MM)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V  
 3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、  
 ヒト心筋ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH  
 )、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、

10

20

30

40

50

ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン(INF)-、INF-、INF-、インヒピン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様成長因子1、インテグリン 2、インテグリン 3、インテグリン 4、インテグリン 4/1、インテグリン 4/7、インテグリン 5(V)、インテグリン 5/1、インテグリン 5/3、インテグリン 6、インテグリン 1、インテグリン 2、インターフェロン、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト成長因子(KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP(TGF-1)、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、Lewis-Y抗原、Lewis-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性物質、黄体形成ホルモン、リンホトキシン受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC(HLA-D 20 R)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン(Muc1)、MUC18、ミューラー管抑制因子(Muellerian-inhibiting substance)、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-カドヘリン、NCA90、NCAM、NCAM、ネプリリシン、ニュートロフィン-3、ニュートロフィン-4、またはニュートロフィン-6、ニュールツリン、神経成長因子(NGF)、NGFR、NGF-、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ(PLAP)、PIGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロリラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)F、RSV Fgp、Ret、リウマチ因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72(腫瘍関連糖タンパク質-72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体(例えば、T細胞受容体 / )、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、精巢性PLAP様アルカリホスファターゼ(testicular PLAP-like alkaline phosphatase)、TfR、TGF、TGF-、TGF-、TGF-(Pan特異的)、TGF-RI(ALK-5)、TGF-RII、TGF-RIIb、TGF-RIII、TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、TGF-5、トロンピン、胸線Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-、TNF-、TNF-2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNF

10

20

30

40

50

R S F 1 0 A ( T R A I L R 1 A p o - 2, D R 4 ), T N F R S F 1 0 B ( T R A I L R 2 D R 5, K I L L E R, T R I C K - 2 A, T R I C K - B ), T N F R S F 1 0 C ( T R A I L R 3 D c R 1, L I T, T R I D ), T N F R S F 1 0 D ( T R A I L R 4 D c R 2, T R U N D D ), T N F R S F 1 1 A ( R A N K O D F R, T R A N C E R ), T N F R S F 1 1 B ( O P G O C I F, T R 1 ), T N F R S F 1 2 ( T W E A K R F N 1 4 ), T N F R S F 1 3 B ( T A C I ), T N F R S F 1 3 C ( B A F F R ), T N F R S F 1 4 ( H V E M A T A R, H v e A, L I G H T R, T R 2 ), T N F R S F 1 6 ( N G F R p 7 5 N T R ), T N F R S F 1 7 ( B C M A ), T N F R S F 1 8 ( G I T R A I T R ), T N F R S F 1 9 ( T R O Y T A J, T R A D E ), T N F R S F 1 9 L ( R E L T ), T N F R S F 1 A ( T N F R I C D 1 2 0 a, p 5 5 - 6 0 ), T N F R S F 1 B ( T N F R I I C D 1 2 0 b, p 7 5 - 8 0 ), T N F R S F 2 6 ( T N F R H 3 ), T N F R S F 3 ( L T b R T N F R I I I, T N F C R ), T N F R S F 4 ( O X 4 0 A C T 3 5, T X G P 1 R ), T N F R S F 5 ( C D 4 0 p 5 0 ), T N F R S F 6 ( F a s A p o - 1, A P T 1, C D 9 5 ), T N F R S F 6 B ( D c R 3 M 6 8, T R 6 ), T N F R S F 7 ( C D 2 7 ), T N F R S F 8 ( C D 3 0 ), T N F R S F 9 ( 4 - 1 B B C D 1 3 7, I L A ), T N F R S F 2 1 ( D R 6 ), T N F R S F 2 2 ( D c T R A I L R 2 T N F R H 2 ), T N F R S T 2 3 ( D c T R A I L R 1 T N F R H 1 ), T N F R S F 2 5 ( D R 3 A p o - 3, L A R D, T R - 3, T R A M P, W S L - 1 ), T N F S F 1 0 ( T R A I L A p o - 2 リガンド, T L 2 ), T N F S F 1 1 ( T R A N C E / R A N K リガンド O D F, O P G リガンド ), T N F S F 1 2 ( T W E A K A p o - 3 リガンド, D R 3 リガンド ), T N F S F 1 3 ( A P R I L T A L L 2 ), T N F S F 1 3 B ( B A F F B L Y S, T A L L 1, T H A N K, T N F S F 2 0 ), T N F S F 1 4 ( L I G H T H V E M リガンド, L T g ), T N F S F 1 5 ( T L 1 A / V E G I ), T N F S F 1 8 ( G I T R リガンド A I T R リガンド, T L 6 ), T N F S F 1 A ( T N F - a コネクチン, D I F, T N F S F 2 ), T N F S F 1 B ( T N F - b L T a, T N F S F 1 ), T N F S F 3 ( L T b T N F C, p 3 3 ), T N F S F 4 ( O X 4 0 リガンド g p 3 4, T X G P 1 ), T N F S F 5 ( C D 4 0 リガンド C D 1 5 4, g p 3 9, H I G M 1, I M D 3, T R A P ), T N F S F 6 ( F a s リガンド A p o - 1 リガンド, A P T 1 リガンド ), T N F S F 7 ( C D 2 7 リガンド C D 7 0 ), T N F S F 8 ( C D 3 0 リガンド C D 1 5 3 ), T N F S F 9 ( 4 - 1 B B リガンド C D 1 3 7 リガンド ), T P - 1, t - P A, T p o, T R A I L, T R A I L R, T R A I L - R 1, T R A I L - R 2, T R A N C E, トランスフェリン受容体, T R F, T r k, T R O P - 2, T S G, T S L P, 腫瘍関連抗原 C A 1 2 5, L e w i s Y 関連炭水化物を発現する腫瘍関連抗原, T W E A K, T X B 2, U n g, u P A R, u P A R - 1, ウロキナーゼ, V C A M, V C A M - 1, V E C A D, V E - カドヘリン, V E - カドヘリン - 2, V E F G R - 1 ( f l t - 1 ), V E G F, V E G F R, V E G F R - 3 ( f i t - 4 ), V E G I, V I M, ウイルス抗原, V L A, V L A - 1, V L A - 4, V N R インテグリン, フォン・ヴィレブランド因子, W I F - 1, W N T 1, W N T 2, W N T 2 B / 1 3, W N T 3, W N T 3 A, W N T 4, W N T 5 A, W N T 5 B, W N T 6, W N T 7 A, W N T 7 B, W N T 8 A, W N T 8 B, W N T 9 A, W N T 9 A, W N T 9 B, W N T 1 0 A, W N T 1 0 B, W N T 1 1, W N T 1 6, X C L 1, X C L 2, X C R 1, X C R 1, X E D A R, X I A P, X P D, ならびに、ホルモンおよび成長因子の受容体。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドまたはタンパク質は、1 つ以上の細胞表面腫瘍抗原に特異的な抗原結合ドメインを有する。複数の方法および組成物が、A D C C のために腫瘍細胞を標的化するために利用され得る。

#### 【 0 0 8 7 】

F c ドメインは F c R に結合することができる。しかし、F c ドメインを含むポリペプチド上の抗原結合ドメインを介してのみならず、いくつかの他のタンパク質結合ドメインを介しても、A D C C に対して指向させることができると想定される。結果として、複数

の実施形態は、Fcドメインと異種非抗原結合ドメインとに関係する。特定の実施形態においては、非抗原結合ドメインは細胞表面に結合する。したがって、これらの物質には、特異的標的細胞に結合することができる物質/タンパク質に対する化学的結合、またはそれらとの融合のいずれかが必要である。複数の実施形態には、表2に列挙されるタンパク質のいずれかの全体またはその一部に対して、グリコシル化されていないFcドメイン全体またはその一部を連結させることがさらに含まれる。複数の実施形態に、表2および本明細書中の記載の中で提供される例が含まれるが、これらに限定されるわけではないことが想定される。

【0088】

【表2】

表 2

タンパク質の分類	下位分類	種	亜種
1) 抗体	ポリクローナル		
	モノクローナル	組み換え体ではない	
		組み換え体	
			キメラ
			単鎖
			ダイアボディー 多量体
2) 細胞表面受容体の リガンド			IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19
	サイトカイン/成長因子		
		受容体チロシンキナーゼ のサイトカイン/成長因子	
			GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EGF, VEGF, FGF, PDGF, HGF, GDNF, Trk, AXL, LTK, TIE, ROR, DDR, KLG, RYK, MuSK リガンド
3) 細胞表面分子の 非Ab結合タンパク質			
	細胞表面タンパク質の バインダー		
		分化抗原クラスター (CD) 分子	

受容体のリガンドは、その表面上にリガンドの受容体を発現する細胞を標的化するために利用され得る。リガンドとしてはまた、例えば、CD95リガンド、TRAIL、TNF（例えば、TNF- $\alpha$  またはTNF- $\beta$ ）、成長因子（VEGFおよびサイトカイン（

10

20

30

40

50

例えば、インターフェロンまたはインターロイキン、およびそれらのバリエーション)のような上記で議論されたものを含む)が挙げられる。

【0089】

VEGF受容体1(Flt-1)の第2の細胞外ドメインをVEGF受容体2の第3のドメイン(KDR/FIK-1)とIgGFc領域とともに含むVEGF Trap融合タンパク質のような、複数のドメインを持つ実施形態もまた想定される。

【0090】

#### 1. 融合タンパク質および複合タンパク質

挿入バリエーションの特別な種は融合タンパク質である。この分子は、一般的には、第2のポリペプチド全体またはその一部に対してN末端またはC末端で連結された天然の分子全体またはその実質的な部分を有する。

10

【0091】

複数の実施形態はまた、修飾されたタンパク質またはポリペプチドが形成するように、少なくとも1つの物質に連結させられる、複合ポリペプチド(例えば、翻訳されたタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド)にも関係する。診断用物質または治療用物質としての分子の有効性を高めるためには、少なくとも1つの所望される分子または部分に連結させる、または共有結合させる、または複合体化させることが一般的である。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であり得るが、これらに限定されるわけではない。エフェクター分子は、所望される活性(例えば、細胞傷害性活性)を有している分子を含む。抗体に結合させられているエフェクター分子の限定ではない例としては、毒素、抗腫瘍薬、治療用酵素、放射線標識核種、抗ウイルス薬、キレート化剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出することができる任意の部分と定義される。抗体に結合させられているレポーター分子の限定ではない例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色された粒子またはリガンド(例えば、ビオチン)が挙げられる。

20

【0092】

十分な選択性、特異性、または親和性の任意の抗体を、抗体結合体の基礎として利用することができる。そのような特性は、当業者に公知の従来の免疫学的スクリーニング方法論を使用して評価することができる。標準的な抗原結合部位に加えて、抗体分子中の生物学的活性分子への結合のための部位として、病原体、B細胞スーパー抗原、T細胞共受容体CD4、およびHIV-1エンベロープに結合することができる可変ドメイン中に存在する部位が挙げられる(Sassora, 1989; Shorkira, 1991; Silvermannら, 1995; Clearyら, 1994; Lenertra, 1990; Berberianら, 1993; Kreiera, 1991)。加えて、可変ドメインは抗体の自己結合にも関与しており(Kangら, 1988)、これには抗抗体により認識されるエピトープ(イディオトープ)が含まれる(Kohlerら, 1989)。

30

【0093】

抗体結合体の特定の例は、抗体が検出可能な標識に連結させられた結合体である。「検出可能な標識」は、それらの特異的機能的特性、および/または化学的特性から検出することができ、その使用により、それらを検出しようとする抗体に結合することができる、および/またはさらには、所望される場合には定量化することができる、化合物ならびに/あるいはエレメントである。別のそのような例は、細胞傷害性物質または抗細胞性物質(anti-cellular agent)に連結させられた、「免疫毒素」と呼ぶことができる、抗体を含む結合体の形成である。

40

【0094】

アミノ酸(例えば、選択的に切断可能なリンカー、合成のリンカー、または他のアミノ酸配列)を、タンパク質様部分を分けるために使用することができる。

【0095】

50

### C. タンパク質精製

実施形態のいくつかには組み換え体タンパク質が含まれるが、複数の実施形態には、修飾されたタンパク質と組み換え体タンパク質を含む、タンパク質を精製するための方法ならびにプロセスが含まれ得る。一般的には、これらの技術には、1つのレベルでの、細胞環境からポリペプチドおよび非ポリペプチド画分への粗分画が含まれる。他のタンパク質からポリペプチドが分離されると、目的のポリペプチドを、部分的または完全な精製（または均質にするための精製）を達成するためのクロマトグラフィー技術および電気泳動技術を使用してさらに精製することができる。調製に特に適している分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー；ポリアクリルアミドゲル電気泳動法；等電点電気泳動法である。ペプチドの精製に特に有効な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィーまたはさらにはHPLCである。加えて、そのような技術を実行する条件は、精製される分子の特性（例えば、機能的活性）に影響を及ぼし得る。

10

#### 【0096】

特定の態様は精製に関係し、具体的な実施形態においては、コードされるタンパク質またはペプチドの実質的な精製に関係する。用語「精製されたタンパク質またはペプチド」は、本明細書中で使用される場合は、他の成分から単離することができる1つの組成をいうように意図される。ここでは、タンパク質またはペプチドは、その自然界で得られる状態と比較して任意の程度に精製される。したがって、精製されたタンパク質またはペプチドはまた、それが自然界に存在し得る環境から離れたタンパク質またはペプチドをいう。「実質的に精製された」タンパク質またはペプチド

20

一般的には、「精製された」は、様々な他の成分を除去するための分画が行われたタンパク質またはペプチド組成物をいい、この組成物は、その発現された生物学的活性を実質的に保持している。用語「実質的に精製された」が使用される場合は、この標記は、タンパク質またはペプチドが組成物の主な成分を形成する、例えば、組成物の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.2%、約99.4%、約99.6%、約99.8%、約99.9%またはそれ以上をそのタンパク質が占める組成物をいう。

#### 【0097】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量化するための様々な方法が、本発明の開示を考慮して当業者に既知である。これらには、例えば、活性画分の比活性を測定すること、またはSDS/PAGE分析により画分内のポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評価するための好ましい方法は、画分の比活性を計算すること、これを最初の抽出物の比活性に対する活性に対して比較すること、これにより本明細書において「精製倍率」により評価される純度の程度を計算することである。活性の量を示すために使用される実際の単位は、もちろん、精製後に選択される特定のアッセイ技術と、発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうかに依存する。

30

#### 【0098】

タンパク質精製での使用に適している様々な技術は当業者に周知であろう。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などでの沈殿、または熱変性、その後の遠心分離；クロマトグラフィー工程（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）；等電点電気泳動法；ゲル電気泳動法；ならびにそのような技術と他の技術の組み合わせが含まれる。当該分野で一般的に公知であるように、様々な精製工程を実施する順序を変えることができること、または特定の工程を省略できる場合があること、およびそれでもなお、実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製のための適切な方法が生じると考えられる。

40

#### 【0099】

タンパク質またはペプチドが常にそれらの最も精製された状態で提供されることは、一般的な要件ではない。実際に、特定の実施形態においては、実質的にはほとんど精製されていない産物が有用性を有することが想定される。部分的な精製は、数種類の精製工程を

50

組み合わせる使用することにより、または様々な形態の同じ一般的な精製スキームを利用することにより、達成され得る。例えば、HPLC装置を利用して行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、一般的には、低圧クロマトグラフィーシステムを利用する同じ技術よりも大きな精製「倍率」を生じることが理解されている。低い程度の相対的精製を示す方法は、タンパク質生成物の全体的な回収率、または発現されたタンパク質の活性の維持において利点を有し得る。

#### 【0100】

ポリペプチドの移動は、SDS/PAGEの様々な条件によっては時に有意に変動し得ることが知られている(Capaldiら、1977)。したがって、様々な電気泳動条件下で、精製されたかまたは部分的に精製された精製発現産物の見かけの分子量が異なる可能性があることが理解されるであろう。

10

#### 【0101】

複数の方法および組成物と組み合わせたペプチドタグの使用もまた想定される。タグは、2つのポリペプチド間での相互作用を利用する。相互作用に関与している一方のポリペプチドの部分がタグとして使用され得る。例えば、グルタチオンビーズをGSTタグを含む化合物について富化させるために使用できるように、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)の結合領域がタグとして使用され得る。抗体またはT細胞受容体によって認識されるアミノ酸領域であるエピトプタグが使用され得る。融合タンパク質が核酸分子によりコードされるように、タグは、修飾されたタンパク質をコードする核酸セグメントに作動可能であるように連結される核酸セグメントによりコードされ得る。他の適切な融合タンパク質は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ユビキチン、ヘキサヒスチジン(6xHis)などを持つものである。

20

#### 【0102】

##### IV. 抗体Fcライブラリー

多様な抗体Fcドメインおよび/またはそのようなドメインを含む抗体の作製のための実施形態と組み合わせる使用することができる技術の例は、米国特許第5,824,520号に記載されている免疫グロブリン重鎖ライブラリーの発現のための技術と類似する技術を利用することができる。これまでに利用されたFcライブラリーは、引用により具体的に本明細書中に組み入れられるWO2008/137475の中で議論されている。

30

#### 【0103】

##### V. 抗体Fcドメインのスクリーニング

特定のFcRに結合することができる分子を同定するための方法を含む実施形態が存在する。これらは、本明細書中、ならびにその全体が引用により本明細書中に具体的に組み入れられる、PCT出願WO2008/137475に記載されている。スクリーニングされた結合ポリペプチドには、多様な候補のFcドメインの大きなライブラリーが含まれる場合があり、また代わりに、それらが標的リガンドに結合する可能性をさらに高くすると考えられる目的とする構造的寄与を用いて選択された特定のクラスのFcドメイン(例えば、操作された点変異またはアミノ酸の挿入)が含まれる場合もある。1つの実施形態においては、候補の結合タンパク質は完全な抗体、またはFcドメインを含むその断片または一部である。

40

#### 【0104】

標的リガンドに結合することができる候補のFcドメインを同定するためには、以下の工程を行うことができる:異なる抗体Fcドメインを発現するグラム陰性細菌細胞の集団を提供する工程;細菌またはファージと、抗体に接触することができる少なくとも1つの第1の標識または固定化された標的リガンド(FcRポリペプチド)を混合する工程、および標的リガンドに結合することができる分子を発現する少なくとも1つの第1の細菌を同定する工程。

#### 【0105】

上記方法のいくつかの態様においては、抗体Fcドメインと標識されたFcRポリペプチドとの間での結合は、細菌細胞の拡散を妨げるであろう。この方法で、標識されたりガ

50

ンドの分子を、透過化された外膜を含む細菌のペリプラズムの中に保持することができる。あるいは、Fcドメインは内膜と会合することが示されているので、ペリプラズムを除去し、それにより、Fcドメインが結合した候補分子の保持を生じることができる。その後、標識を、FcRポリペプチドに結合できる結合ポリペプチドを発現する細胞、およびこの方法では、単離されたFcドメインポリペプチドをコードする遺伝子を単離するために使用することができる。次いで、標的リガンドに結合することができる分子が、インピボまたはエキソピボでの発現方法を使用して大量に産生され得、その後、任意の所望される用途（例えば、診断用途または治療用途）に使用され得る。さらに、同定された単離された抗体Fcドメインが、抗原結合ドメインを含む抗体断片または全長抗体を構築するために使用され得ることが理解されるであろう。

10

#### 【0106】

さらなる実施形態においては、本発明の細菌の産生のための方法には、少なくとも2回の選択（工程c）が含まれる。ここでは、第1回目の選択において得られた細菌細胞のサブ集団について、FcRに対する候補の抗体Fcドメインの結合に基づく少なくとも第2回目の選択が行われる。さらに、いくつかの態様においては、第1回目の選択において得られた細菌細胞のサブ集団を、（細胞の総数を増加させるために）第2回目の選択の前に許容条件下で増殖させることができる。したがって、いくつかの態様においては、複数の方法に、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、またはそれ以上の回数を選択が含まれ得る。さらに、いくつかの態様においては、それぞれの回の選択により得られた細菌細胞のサブ集団が、続く回の選択の前に許容条件下で増殖させられるであろう。1回以上のそのような選択後に単離された細胞は、変異誘発のさらなる回に供され得る。いくつかの場合には、選択は、抗体に結合していないFcRポリペプチドを除去した後に行われるであろう。さらに、いくつかの場合には、選択のストリンジエンシーは、抗体を提示する細菌を含む溶液のpH、塩濃度、または温度を調節することにより変えることができる。したがって、いくつかの態様においては、本発明の細菌細胞を、約25のような生理学的温度より低い温度（sub-physiological temperature）で増殖させることが好ましい場合がある。

20

#### 【0107】

なおさらなる態様においては、本発明の細菌細胞を産生する方法はさらに、少なくとも第1のFcRに結合するFcドメインをコードする核酸配列を産生する方法として定義することができる。したがって、本明細書中の方法により産生された細菌細胞は、FcRポリペプチドに対して特異的親和性を有しているFcドメインをコードする核酸配列をクローニングするために使用することができる。細胞からそのような核酸を単離し、増幅させるための方法（例えば、PCRによる）は当該分野で周知であり、以下にさらに記載される。したがって、上記方法により産生された核酸配列は、本発明の一部として含まれる。さらに、そのような配列は、FcRに対して特異的親和性を有しているFcドメインを産生させるために、細胞中で発現させることができる。したがって、いくつかの態様においては、本発明は、FcRに対して特異的親和性を有しているFcドメインを産生するための方法を提供する。さらに、本発明には、本発明の方法により産生された抗体Fcドメインが含まれる。しかし、そのようなスクリーニングにより産生された抗体Fcドメインを、特定の標的リガンドに対して親和性を有している抗体可変領域と組み合わせることができること、これらの抗体もまた本発明の一部として含まれることが理解されるであろう。

30

40

#### 【0108】

##### A. Fcドメインのコード配列のクローニング

抗体Fcまたは他の結合タンパク質の結合親和性は、例えば、Munson & Pollard (1980) のスキャッチャード解析により決定することができる。あるいは、結合親和性は、表面プラズモン共鳴、またはタンパク質：タンパク質相互作用について速度論および平衡定数を決定するための任意の他の周知の方法により決定することができる。所望される特異性、親和性、および/または活性の分子を産生する細菌細胞が同定された後、対応するコード配列をクローニングすることができる。この方法では、上記分子

50

をコードするDNAを、従来の手順を使用して（例えば、抗体または結合タンパク質をコードする遺伝子に特異的に結合することができる遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）単離し、配列決定することができる。

#### 【0109】

一旦単離されると、抗体FcドメインDNAを発現ベクターの中に配置することができる。これをその後、細菌のような宿主細胞にトランスフェクトすることができる。上記DNAはまた、例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変ドメインの配列の付加により、あるいは、免疫グロブリンではないポリペプチドのコード配列全体またはその一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより、修飾することができる。そのような方法で、所望される結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」結合タンパク質が調製される。例えば、同定された抗体Fcドメインは、治療用ポリペプチドまたは毒素に融合させられる場合があり、また、特定のFcRを発現する標的細胞に対して（インビトロまたはインビボで）使用される場合もある。

10

#### 【0110】

キメラまたはハイブリッドFcドメインはまた、合成タンパク質化学反応（架橋剤を含む化学反応を含む）において公知の方法を使用してインビトロで調製することもできる。例えば、標的化された毒素を、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成させることにより構築することができる。この目的に適している試薬の例としては、イミノチオラートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

20

#### 【0111】

核酸を、生存細胞から、また非生存細胞からもクローニングできることは当業者に理解されるであろう。非生存細胞の場合には、例えば、（例えば、PCRを使用する）クローニングされたDNAの増幅を使用することが所望され得る。これはまた、細胞のさらなる増殖を伴って生存細胞を使用して行われる場合があり、また、細胞のさらなる増殖を伴わずに生存細胞を使用して行われる場合のいずれもある。

#### 【0112】

##### B. 標識されたりガンド

1つの実施形態においては、標識されたFcRポリペプチドに対して親和性を有するFcドメインが単離される。本発明のグラム陰性細菌のペリプラズム膜の透過化および/または除去により、あらゆる大きさである可能性がある標識されたりガンドをスクリーニングすることができる。ペリプラズム膜の除去を行わない場合には、リガンドが細菌のペリプラズム膜を通過して効率よく拡散できるようにするために、標識されたりガンドが50,000Da未満の大きさであることが通常は好ましいであろう。

30

#### 【0113】

上記で示されたように、1つ以上の検出可能な物質（単数または複数）で標識されたFcRポリペプチドを提供することが通常は望ましいであろう。これは、結合体が形成するように、例えば、少なくとも1つの検出可能な物質に対してリガンドを連結させることにより行うことができる。例えば、少なくとも1つの検出可能な分子または部分に連結させる、共有結合させる、または複合体化させることが一般的である。「標識」または「検出可能な標識」は、その使用により、それが結合したりガンドを検出し、および/またはさらには所望される場合には定量化することが可能となる、特別な機能的特性および/または化学的特性により検出することができる化合物ならびに/あるいはエレメントである。使用することができる標識の例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発色分子、光親和性分子、着色された粒子、またはビオチンのようなリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0114】

本発明の1つの実施形態においては、視覚的に検出可能なマーカーが使用される。その結果、その標識についての細胞の自動スクリーニングを行うことができる。具体的には、蛍光標識が、これらが所望される結合タンパク質または抗体を発現する細胞の単離にフコ

50

ーサイトメトリーを使用することを可能にするので、有用である。適切な機器を用いて視覚により検出することができる物質の例は、所望されるリガンドに対するそれらの結合についての方法と同様に、当該分野で公知である（例えば、米国特許第5,021,236号；同第4,938,948号；および同第4,472,509号（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと）。そのような物質としては、常磁性イオン；放射性同位体；発蛍光団；NMRにより検出可能な物質、およびX線画像化法のための物質を挙げることができる。

【0115】

別のタイプのFcR結合体は、リガンドが、色素形成性基質と接触すると着色された生成物を生じるであろう第2の結合分子に対しておよび/または酵素に対して（酵素タグ）連結される場合である。そのような酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋ワサビ）水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。そのような例においては、選択された細胞が依然生存可能であることが所望されるであろう。好ましい第2の結合リガンドは、ビオチンおよび/またはアビジン、ならびにストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されている。

10

【0116】

アジド基を含む分子もまた、弱い紫外線により発生する反応性ナイトレン中間体を通じてタンパク質に対して共有結合を形成させるために使用することができる（Potter & Haley, 1983）。具体的には、プリンクレオチドの2-アジドアナログおよび8-アジドアナログが、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的フォトプローブ（photoprobe）として使用されている（Owens & Haley, 1987；Athertonら、1985）。2-アジドヌクレオチドおよび8-アジドヌクレオチドはまた、精製されたタンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするために使用されており（Khattoonら、1989；Kingら、1989；およびDholakiaら、1989）、そして、リガンド結合剤として使用することができる。

20

30

【0117】

標識化は、当業者に周知である任意の技術によって行うことができる。例えば、FcRポリペプチドは、リガンドを、所望される標識および化学酸化剤（例えば、次亜塩素酸ナトリウム）または酵素的酸化剤（例えば、ラクトペルオキシダーゼ）と接触させることによって標識することができる。同様に、リガンド交換プロセスが使用され得る。あるいは、直接標識化技術は、例えば、標識、還元剤（例えば、 $\text{SnCl}_2$ ）、緩衝溶液（例えば、ナトリウム-カリウムフタレート溶液）、およびリガンドをインキュベーションすることによって使用され得る。リガンド上の中間官能基（intermediary functional group）もまた、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）の存在下でリガンドに標識を結合させるために使用することができる。

40

【0118】

リガンドのその結合体部分への結合または結合体化のための他の方法もまた、当該分野で公知である。いくつかの結合方法は、リガンドに結合させられた有機キレート剤（例えば、無水ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）；エチレントリアミン四酢酸；N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド；および/またはテトラクロロ-3,6-ジフェニルグリコウリル（tetrachloro-3,6-diphenylglycouril-3）の使用を含む（米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）。FcRポリペプチドはまた、カップリング剤（例えば、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩）の存在下で、

50

酵素と反応させることができる。蛍光マーカ-との結合体は、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応により調製することができる。米国特許第4,938,948号において、乳癌の画像化はモノクローナル抗体を使用して達成され、そして、検出可能な画像化部分は、リンカー（例えば、メチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート)を使用して抗体に結合させられる。なおさらなる態様においては、FcRポリペプチドを、レポータータンパク質（例えば、上記のような酵素）または蛍光タンパク質に融合させることができる。

#### 【0119】

適切な蛍光リガンドを用いて、ペリプラズムで発現されるタンパク質を特異的に標識化する能力はまた、ライブラリスクリーニング以外の用途を有する。蛍光リガンドでの特異的標識化およびフローサイトメトリーは、タンパク質の製造の際のFcドメインの産生をモニタリングするために使用することができる。

10

#### 【0120】

一旦、Fcドメインが単離されると、結合体を形成させるために、分子を少なくとも1つの物質に連結して、この分子の有用性を高めることが所望され得る。例えば、診断薬または治療薬としてのFcドメインあるいは抗体分子の有効性を高めるためには、少なくとも1つの所望される分子または部分に連結させる、または共有結合させる、または複合体化させることが一般的である。このような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクター分子またはレポーター分子であり得るが、これらに限定されない。エフェクター分子には、所望される活性（例えば、細胞傷害活性）を有している分子が含まれる。抗体へ結合させられるエフェクター分子の限定ではない例として、以下が挙げられる：毒素、抗腫瘍薬、治療用酵素、放射性標識ヌクレオチド、抗ウイルス薬、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出することができる任意の部分として定義される。そのような分子を標識化するための技術は当業者に公知であり、そして、本明細書中で上記に記載されている。

20

#### 【0121】

次いで、本発明に従って調製された標識化された結合タンパク質（例えば、Fcドメイン）はまた、例えば、生物学的成分（例えば、タンパク質（単数または複数）、ポリペプチド（単数または複数）、またはペプチド（単数または複数））の結合、精製、除去、定量、および/または、別の一般的な検出のための免疫検出方法において利用され得る。いくつかを挙げると、いくつかの免疫検出法として、少し言及すると、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウェスタンブロット法が挙げられる。様々な有用な免疫検出法の工程は、以下のような科学技術文献に記載されている：例えば、Doolittle and Ben-Zeev, 1999; Gulbis and Galand P, 1993; および De Jager Rら、1993（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）。このような技術として、結合アッセイ（例えば、当該分野で公知である、様々なタイプの酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および/または放射免疫アッセイ（RIA））が、挙げられる。

30

40

#### 【0122】

Fcドメイン分子（抗体を含む）はまた、例えば、免疫組織化学（IHC）によって、研究のために調製された新鮮凍結された、および/またはホルマリン固定され、パラフィンに包埋された組織ブロックと組み合わせて利用され得る。これらの粒子検体から組織ブロックを調製する方法は、種々の予後因子に関するこれまでのIHC研究においてうまく使用されており、そして/または当業者に周知である（Abbondanzolaら、1990）。

#### 【0123】

VI. フローサイトメトリーを用いる自動スクリーニング

50

本発明の1つの実施形態においては、蛍光活性化細胞選別（FACS）スクリーニング、または他の自動フローサイトメトリ技術を、Fcドメインに結合した標識されたりガンドを含む細菌細胞の効率的な単離のために使用することができる。フローサイトメトリを実施するための機器は当業者に公知であり、そして市販されている。そのような機器の例として、以下が挙げられる：FACS Star Plus、FACSscanおよびFACSsort機器（Becton Dickinson（Foster City、Calif.）から）、Epics C（Coulter Epics Division（Hialeah、Fla.）から）ならびにMOFLO（商標）（Cytomation（Colorado Springs, Co）から）。

【0124】

一般的に、フローサイトメトリ技術には、液体試料中の細胞または他の粒子の分離が含まれる。典型的には、フローサイトメトリの目的は、分離された粒子を、それらの1つ以上の特性（例えば、標識されたりガンドまたは他の分子の存在）について分析することである。フローサイトメトリの基本的な工程は、装置を通る液体試料の方向に関係し、その結果、液体の流れが検出領域を通り抜ける。粒子は、センサーによって1度に1つずつ通過するものとし、そして、大きさ、屈折、光散乱、不透明度、粗度、形状、蛍光などに基づいて分類される。

【0125】

細胞の迅速な定量分析が生物医学的研究および医療において有用であることを証明する。装置は、1秒あたり数千個の細胞の速度で、細胞特性の定量的多パラメータ分析をすることができる。これらの機器は、細胞型間を区別する能力を提供する。多くの場合、データは、測定された変数の1次元度数分布（ヒストグラム）または2次元度数分布（輪郭プロット、散布図）で表示される。多パラメータデータファイルの分配には、対話型（interactive）の1次元図表プログラムまたは2次元図表プログラムの継続的使用が含まれる。

【0126】

迅速な細胞検出のための多パラメータフローサイトメトリデータの定量分析は、以下の2つの段階からなる：細胞のクラスの特性決定と試料の処理。一般に、細胞のクラスの特性決定のプロセスは、細胞の特徴を、目的の細胞と目的ではない細胞とに分配する。その後、試料の処理において、各細胞が、それらが分類される領域に従って、2つのカテゴリのうちの一方に分類される。細胞のクラスの分析は、非常に重要である。なぜなら、高い検出性能は、細胞の適切な特性が取得される場合にしか期待できないからである。

【0127】

フローサイトメトリによっては、細胞分析が実施されるだけでなく、細胞の分別も行われる。米国特許第3,826,364号には、粒子（例えば、機能的に異なる細胞のタイプ）を物理的に分離する装置が開示されている。この機械では、レーザーは、適切なレンズまたはレンズシステムによって粒子の流れに集められた照明を提供し、その結果、その中に、粒子からの高度に限局化させられた散乱が存在する。加えて、強度照明光源は、流れの中での蛍光粒子の励起のために、粒子の流れに向けられる。この流れの中の特定の粒子を選択的に帯電させ、次いで、これら粒子を指定されるレセプタクルへ偏向させることによって分離することができる。この分離の古典的な形態は蛍光タグ化抗体を介するものであり、この蛍光タグ化抗体は、分離のために、1つ以上の細胞のタイプに印を付けるために使用される。

【0128】

フローサイトメトリの他の方法として、以下に記載されている方法を挙げることができるが、これらに限定されるわけではない：米国特許第4,284,412号、同第4,989,977号、同第4,498,766号、同第5,478,722号、同第4,857,451号、同第4,774,189号、同第4,767,206号、同第4,714,682号、同第5,160,974号および同第4,661,913号（これらの開示のそれぞれが、引用により本明細書中に組み入れられる）。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 9 】

本発明についてのフローサイトメトリーの重要な局面は、複数回のスクリーニングを連続して行うことができることである。細胞は、最初の回の選別により単離することができ、すぐにフローサイトメーターに再度導入され、スクリーンのストリンジェンシーを改善するために再びスクリーニングされ得る。当業者に公知である別の利点は、非生存細胞をフローサイトメトリーを使用して回収できることである。フローサイトメトリーは本質的には粒子選別技術であるので、増殖または繁殖する細胞の能力は必要ない。そのような非生存細胞からの核酸の回収のための技術は当該分野で周知であり、これには例えば、PCRを含む鑄型依存性増幅技術の使用が含まれ得る。

## 【 0 1 3 0 】

## V I I . フローサイトメトリーを用いる自動スクリーニング

核酸に基づく発現システムは、組み換え体タンパク質の発現のための本発明の特定の実施形態において用途が見出され得る。例えば、本発明の1つの実施形態には、抗体Fcドメイン、または好ましくは、複数の異なるFcドメインのコード配列でのグラム陰性細菌の形質転換が含まれる。

## 【 0 1 3 1 】

## V I I I . 核酸に基づく発現システム

核酸に基づく発現システムは、組換えタンパク質の発現のための本発明の特定の実施形態において用途が見出され得る。例えば、本発明の1つの実施形態は、抗体Fcドメイン、または好ましくは、複数の異なるFcドメインのコード配列でのグラム陰性細菌の形質転換が含まれる。

## 【 0 1 3 2 】

## A . 核酸送達の方法

本発明の特定の態様は、標的細胞（例えば、グラム陰性細菌）への核酸の送達を含み得る。例えば、細菌宿主細胞は、FcRに結合する可能性がある候補Fcドメインをコードする核酸で形質転換され得る。本発明の特定の実施形態においては、発現を細菌のペリプラズムに標的化することが所望され得る。真核生物宿主細胞の形質転換は同様に、標的リガンドに結合できるとして同定される様々な候補分子の発現において用途が見出され得る。

## 【 0 1 3 3 】

細胞の形質転換のための核酸送達に関する適切な方法は、核酸（例えば、DNA）を、そのような細胞に、またはさらにはその細胞小器官にさえも導入できる、実質的に任意の方法を含むと考えられる。このような方法としては以下のようなDNAの直接送達が挙げられるが、これらに限定されない：注入（米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、同第5,656,610号、同第5,589,466号、および同第5,580,859号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）（マイクロインジェクション（HarlanおよびWeintraub, 1985；米国特許第5,789,215号、引用により本明細書中に組み入れられる）を含む）；エレクトロポレーション（米国特許第5,384,253号、引用により本明細書中に組み入れられる）；リン酸カルシウム沈澱（GrahamおよびVan Der Eb, 1973；ChenおよびOkayama, 1987；Rippeら, 1990）；DEAE-デキストランと、それに続くポリエチレングリコールの使用（Gopal, 1985）；直接の音波負荷（direct sonic loading）（Fechheimerら, 1987）；リボソーム媒介性トランスフェクション（NicolaouおよびSene, 1982；Fraleyleら, 1979；Nicolaouら, 1987；Wongら, 1980；Kanedaら, 1989；Katoら, 1991）；マイクロプロジェタイルボンバードメント（PCT出願番号WO94/09699号および同WO95/06128号；米国特許第5,610,042号、同第5,322,783号、同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号、お

10

20

30

40

50

よび同第5, 538, 880号、それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる) ;  
あるいは、炭化ケイ素繊維を用いた攪拌 (Kaepplerら、1990 ; 米国特許第5  
, 302, 523号および同第5, 464, 765号、それぞれが引用により本明細書中  
に組み入れられる) ; 乾燥 / 阻害媒介性のDNAの取り込み (desiccation /  
inhibition-mediated DNA uptake) (Potrykus  
ら、1985)。これらのような技術の適用により、細胞を安定に、または一時的に形質  
転換することができる。

#### 【0134】

##### B. ベクター

ベクターは、例えば、標的FcRに結合する能力についてスクリーニングすることが望  
まれる候補Fcドメインをコードする核酸配列でのグラム陰性細菌の形質転換において、  
本発明での用途が見出され得る。本発明の1つの実施形態において、標的ポリペプチドを  
コードする核酸配列の不均質な「ライブラリー」全体が細菌集団に導入され得、それによ  
り、全ライブラリーのスクリーニングが可能となる。用語「ベクター」は、核酸配列を複  
製することができる細胞への導入のために核酸配列を挿入することができるキャリア核酸  
分子をいうために使用される。核酸配列は「外来性」または「異種」であり得、この「外  
来性」または「異種」は、ベクターがその中に導入される細胞にとって外来のものである  
こと、または、この配列がその細胞中の配列に対して相同であるが、通常その配列が見ら  
れない宿主細胞核酸内の位置にあるということの意味する。ベクターとしては、プラスミ  
ド、コスミド、およびウイルス (例えば、バクテリオファージ) が挙げられる。当業者は  
、標準的な組換え技術によりベクターを構築することができる。この技術は、Mania  
tisら、1988およびAusubelら、1994 (これらはいずれも、引用により  
本明細書中に組み入れられる) に記載されている。

#### 【0135】

用語「発現ベクター」は、転写される能力がある遺伝子産物の少なくとも一部分をコー  
ドする核酸配列を含むベクターをいう。いくつかの場合には、その後、RNA分子が、タ  
ンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。発現ベクターには様々な「制御  
配列」を含めることができる。「制御配列」は、特定の宿主生物体において作動可能であ  
るようにつながれたコード配列の転写と、おそらくは翻訳に不可欠な核酸配列をいう。転  
写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターには、さらに他  
の機能も供与する核酸配列を含めることができ、これらを以下に記載する。

#### 【0136】

##### 1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、転写の開始および転写の速度が制御される核酸配列の領域である  
、制御配列である。プロモーターは、調節タンパク質および調節分子 (例えば、RNAポ  
リメラーゼおよび他の転写因子) がそれに結合し得る遺伝子エレメントを含み得る。表現  
「作動可能であるように配置された」、「作動可能であるように連結された」、「制御下  
」、および「転写制御下」は、配列の転写開始および / または発現を制御するために、プ  
ロモーターが、核酸配列に関連して正しい機能的な位置および / または方向にあることをい  
う。プロモーターは、「エンハンサー」と組み合わせて使用することができ、またそうで  
ない場合もあり、この「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性  
調節配列をいう。

#### 【0137】

プロモーターは、コードセグメントおよび / またはエキソンの上流に位置する5'非コ  
ード配列を単離することにより得ることができるように、遺伝子または配列に生来付随し  
ているものであり得る。このようなプロモーターは、「内因性」として呼ぶことができる  
。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置し、核酸配列に  
生来付随しているものであり得る。あるいは、特定の利点は、組換え体プロモーターまた  
は異種プロモーター (その自然環境における核酸配列に通常は付随しないプロモーターを  
いう) の制御下にコード核酸セグメントを配置することにより得られるであろう。組換え

体エンハンサーまたは異種エンハンサーはまた、その自然環境において核酸配列に通常は付随しないエンハンサーをいう。このようなプロモーターまたはエンハンサーとしては、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他の原核生物細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「自然界には存在」しないプロモーターまたはエンハンサー（すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および/または発現を変化させる変異を含む）を挙げることができる。合成によりプロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を作製することに加えて、配列は、組換えクローニングおよび/または核酸増幅技術を使用して作製され得、この技術としては、本明細書に開示される組成物と組み合わせたPCR（商標）が挙げられる（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照のこと）。

10

#### 【0138】

当然のことながら、発現のために選択される細胞のタイプにおいてDNAセグメントの発現を効率的に指示するプロモーターおよび/またはエンハンサーを利用することが重要である。本発明とともに使用することができるそのようなプロモーターの1つの例は、E.coliアラビノースプロモーターまたはT7プロモーターである。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞のタイプの組み合わせの使用に精通している。例えば、引用により本明細書中に組み入れられるSambrookら（1989）を参照のこと。利用されるプロモーターは、構成的、組織特異的、誘導性、ならびに/あるいは、組換え体であるタンパク質および/またはペプチドの大量生産において有利であるような、導入されたDNAセグメントの高いレベルの発現を指示するための適切な条件下で有用であり得る。プロモーターは、異種である場合も、また内因性である場合もある。

20

#### 【0139】

##### 2. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

特別な開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳に必要である場合がある。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接する配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルを、提供することが必要な場合がある。当業者は、容易にこの配列を決定することができ、そして必要なシグナルを提供することができる。挿入物全体の翻訳を確実にするためには、開始コドンが、所望されるコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然のものであっても、また、合成のものであってもいずれであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることにより増強され得る。

30

#### 【0140】

##### 3. マルチクローニング部位

ベクターには、マルチクローニング部位(MCS)を含めることができる。これは、ベクターを消化するための標準的な組換え技術と組み合わせて使用することができる任意の複数の制限酵素部位を含む核酸領域である（引用により本明細書中に組み入れられる、Carbone l l iら、1999、Levensonら、1998、およびCocea、1997を参照のこと）。「制限酵素消化」は、核酸分子中の特定の位置でのみ機能する酵素での核酸分子の触媒的切断をいう。これらの制限酵素の多くは市販されている。このような酵素の使用は当業者に理解されている。多くの場合、ベクターは、外因性の配列をベクターに連結できるようにするために、MCS内で切断する制限酵素を使用して直鎖化または断片化される。「ライゲーション」は、2つの核酸断片の間にホスホジエステル結合を形成するプロセスをいう。これらの断片は互いに連続している場合があり、また連続していない場合もある。制限酵素およびライゲーション反応を含む技術は組換え技術の当業者に周知である。

40

#### 【0141】

##### 4. 終結シグナル

50

本発明にしたがって調製されたベクターまたは構築物には、一般的に、少なくとも1つの終結シグナルが含まれるであろう。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写の特異的終結に關与するDNA配列から構成される。したがって、特定の実施形態において、RNA転写産物の産生を終わらせる終結シグナルが想定される。ターミネーターは、所望されるメッセージレベルを得るためにインピボで不可欠であり得る。

#### 【0142】

本発明での使用が想定されるターミネーターとしては、本明細書中に記載されるか、または当業者に公知の転写の任意の公知のターミネーターが挙げられる。これには、例えば、rhp依存性ターミネーターまたはrho非依存性ターミネーターが含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態においては、終結シグナルは、配列の短縮が原因であるような、転写可能な配列または翻訳可能な配列の欠損であり得る。

10

#### 【0143】

##### 5. 複製起点

宿主細胞中でベクターを増殖させるために、複製が開始される特定の核酸配列である1つ以上の複製起点部位(しばしば「ori」と呼ばれる)を含めることができる。

#### 【0144】

##### 6. 選択マーカーおよびスクリーニングマーカー

本発明の特定の実施形態において、本発明の核酸構築物を含む細胞は、発現ベクター中にマーカーを含めることによってインピト口またはインピボで同定することができる。このようなマーカーは、発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にする同定可能な変化を細胞に付与する。一般的には、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。ポジティブな選択マーカーは、そのマーカーの存在がその選択を可能にする選択マーカーであり、一方、ネガティブな選択マーカーは、その存在がその選択を妨げる選択マーカーである。ポジティブな選択マーカーの例は薬物耐性マーカーである。

20

#### 【0145】

通常、薬物選択マーカーを含めることは、形質転換体のクローニングおよび同定を補助し、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が有用な選択マーカーである。実施の条件に基づく形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その根拠が比色分析であるGFPのようなスクリーニングマーカーを含む他のタイプのマーカーもまた想定される。あるいは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)のようなスクリーニング可能な酵素が利用され得る。当業者はまた、おそらくは、FACS分析と組み合わせて免疫学的マーカーを利用する方法を理解するであろう。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現させることが可能である限りは、使用されるマーカーは重要ではないと考えられる。選択マーカーおよびスクリーニングマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

30

#### 【0146】

##### C. 宿主細胞

異種の核酸配列を発現する状況においては、「宿主細胞」は原核生物細胞をいい、そしてこれには、ベクターを複製することができる、および/またはベクターによってコードされる異種遺伝子が発現することができる、任意の形質転換可能な生物が含まれる。宿主細胞は、ベクターのためのレシピエントとして使用することができ、そして使用されてきた。宿主細胞は、「トランスフェクト」されるかまたは「形質転換」され得る。これは、外因性の核酸が、宿主細胞内に形質導入されるかまたは導入されるプロセスをいう。形質転換された細胞には、最初の被験細胞とその子孫が含まれる。

40

#### 【0147】

本発明の特定の実施形態においては、宿主細胞は、グラム陰性細菌細胞である。これらの細菌は、これらが内膜と外膜との間にペリプラズム空間を、特に、ペリプラズムと細胞質との間の上記内膜を(これは、細胞質膜としても知られている)持つ点で、本発明での

50

使用について適している。このように、そのようなペリプラズム空間を持つ任意の他の細胞を、本発明に従って使用することができる。本発明を用いた用途が見出され得るグラム陰性細菌の例としては、E. coli、Pseudomonas aeruginosa、Vibrio cholera、Salmonella typhimurium、Shigella flexneri、Haemophilus influenza、Bordetella pertussis、Erwinia amylovora、Rhizobium sp.を挙げることができるが、これらに限定されない。グラム陰性細菌細胞は、なおさらに、選択されたりガンドに結合することができる候補の結合ポリペプチドを含む融合ポリペプチドのコード配列で形質転換された細菌細胞として定義され得る。ポリペプチドは、ペリプラズム空間に面している細胞質膜の外表面に固定され、そしてこれには抗体のコード配列または別の配列が含まれ得る。ポリペプチドの発現のための1つの手段は、このような指示を生じ得るポリペプチドにリーダー配列を結合させることによる。

10

#### 【0148】

複数の原核生物細胞株および原核生物細胞培養物が、宿主細胞としての使用に利用可能であり、そして、これらはAmerican Type Culture Collection (ATCC)を介して入手することができる。ATCCは、生きた培養物および遺伝物質のための保管所としての役割を果たす機関である(www.atcc.org)。適切な宿主は、ベクター骨格および所望される結果に基づいて当業者によって決定され得る。プラスミドまたはコスミドは、例えば、多くのベクターの複製のために原核生物宿主細胞中に導入することができる。ベクターの複製および/または発現のための宿主細胞として使用される細菌細胞としては、DH5、JM109、およびKC8、ならびに複数の市販されている細菌宿主(例えば、SURE(登録商標)Competent CellsおよびSOLOPACK(商標)Gold Cells(STRATAGENE(登録商標)、La Jolla))が挙げられる。あるいは、E. Coli LE392のような細菌細胞をバクテリオファージのための宿主細胞として使用することができる。

20

#### 【0149】

様々な細胞のタイプおよび生物由来の多くの宿主細胞が入手可能であり、そして当業者に公知である。同様に、ウイルスベクターは、原核生物宿主細胞、特にベクターの複製または発現について許容性のものと組み合わせて使用され得る。いくつかのベクターは、ベクターが原核生物細胞および真核生物細胞の両方において複製および/または発現できるようにする制御配列を利用することができる。当業者は、さらに、上記に記載された宿主細胞の全てがこれらを維持し、そしてベクターの複製を可能にするための、インキュベーションするための条件を理解する。ベクターの大量生産、ならびにベクターによってコードされる核酸およびこれらの同族のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの産生を可能にする技術ならびに条件もまた理解され、そして公知である。

30

#### 【0150】

##### D. 発現システム

上記で議論した組成物の少なくとも一部または全てを含む複数の発現システムが存在する。そのようなシステムは、例えば、特定のリガンドに結合できるとして本発明に従って同定されたポリペプチド産物の産生のために使用することができる。原核生物をベースとするシステムは、核酸配列、またはそれらの同族のポリペプチド、タンパク質およびペプチドを産生するために、本発明を用いる用途に利用することができる。複数のこのようなシステムは、商業的に広範に利用することができる。発現システムの他の例として、強力な原核生物のプロモーター(例えば、T7、Tac、Trc、BAD、pL、テトラサイクリン、またはLacプロモーター)、pET発現システム、およびE. coli発現システムが挙げられる。

40

#### 【0151】

##### E. 候補の結合タンパク質および抗体

特定の実施形態においては、抗体Fcドメインは、宿主細菌細胞の細胞質上、またはペ

50

リ plazm 空間膜中で発現される。そのような Fcドメインの不均質な集団の発現によって、標的リガンド (FcR) に対して高い親和性を有しているこれらのポリペプチドが同定され得る。その後、同定された Fcドメインは、本明細書中に記載されるように、様々な診断的適用または治療的適用に使用され得る。

#### 【0152】

本明細書中で使用される場合は、用語「Fcドメイン」は、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE Fcのような任意の免疫グロブリンFc領域を広くいうように意図される。種々な抗体をベースとする構築物および断片を調製し、使用するための技術は、当該分野で周知である。抗体を調製および特性決定するための方法もまた、当該分野で周知である (例えば、引用により本明細書中に組み入れられる、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと)。

10

#### 【0153】

一旦、標的リガンドに対して親和性を有している抗体が同定されると、Fcドメインを、必要に応じて、濾過、遠心分離、および様々なクロマトグラフィー方法 (例えば、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー) を使用して精製することができる。あるいは、より一般的にはFcドメイン、またはポリペプチドおよびペプチドを、自動ペプチド合成機を使用して合成することができる。

#### 【実施例】

#### 【0154】

20

#### IX. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術が、本発明者によって発見された技術が本発明の実施において良好に機能することを示し、従って、本実施例において開示された技術が、その実施のための好ましい態様を構成するとみなされ得ることが当業者によって理解されるものとする。しかし、本開示を考慮して、当業者は、開示される特定の実施形態の中で多くの変更を行うことができ、そしてなお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様もしくは類似する結果が得られることを理解するものとする。

#### 【0155】

30

#### 実施例 1

#### Fc5を操作するためのコンビナトリアルライブラリーの構築

本研究で使用した全てのプラスミドとプライマーを、表3および表4に記載する。これまでに単離されたFc断片よりもFc RIに対して高い結合親和性を示すIgG1 Fc断片 (アミノ酸置換E328V/M428Iを含むFc5) (図1および2) のスクリーニングのために、Fc5遺伝子について、error prone PCRによる無作為な変異誘発を行った。標準的なerror prone PCR法 (Fromantら、1995) を、pPelBFLAG-Fc5の鋳型と、Integrated DNA技術 (Coralville, IA) により合成した2つのプライマー (STJ#196およびSTJ#197) とともに利用した。増幅したPCR断片を、SfiIで消化したpPelBFLAGに連結した。得られたプラスミドを、E. coli Jude-1 (F' [Tn10 (Tet<sup>r</sup>) proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> (lacZ) M15] mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZ M15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG) (Kawarasakiら、2003) に形質転換した。無作為に選択した20個のライブラリークローンの配列に基づくと、ライブラリーは、遺伝子1つあたり0.264%のエラー率を有している7x108の個々の形質転換体であった (図3)。

40

#### 【0156】

#### 実施例 2

Fc5の親和性成熟のためのスフェロプラスト化とハイスループットフローサイトメト

50

## リースクリーニング

クロラムフェニコール (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を補充した 2% (wt/vol) グルコースを含む Terrific Broth (Becton Dickinson Diagnostic Systems Difco (商標)、Sparks, MD) 中で 250 rpm で振盪させながら 37 で一晚培養したライブラリー細胞を、0.5 M のトレハロース (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) とクロラムフェニコール (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む新しい TB 培地中で 1:50 に希釈した。250 rpm で振盪させながら、37 で 3 時間のインキュベーション、その後の 20 分の 25 での冷却の後、Fc 断片の発現を、1 mM のイソプロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシド (IPTG) で誘導した。25 での 5 時間の培養後、4.5 ml の培養液を遠心分離により回収し、1 ml の冷却した 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で 2 回洗浄した。1 ml の冷却した STE 溶液 (0.5 M のスクロース、10 mM の Tris-HCl、10 mM の EDTA、pH 8.0) 中への再懸濁の後、細胞を、37 で 30 分間、回転混合しながらインキュベーションし、12,000  $\times g$  で 1 分間の遠心分離によりペレット化し、1 ml の冷却した Solution A (0.5 M のスクロース、20 mM の MgCl<sub>2</sub>、10 mM の MOPS、pH 6.8) 中で洗浄した。洗浄した細胞を、1 mg/ml のニワトリの卵のリゾチームを含む 1 ml の Solution A の中で、37 で 15 分間インキュベーションした。12,000  $\times g$  で 1 分間の遠心分離の後、得られたスフェロプラストのペレットを 1 ml の冷却した PBS 中に再懸濁した。

10

20

30

40

50

## 【0157】

ライブラリーのスクリーニングのために、組み換え体であるグリコシル化された Fc RIa/CD64 (R&D Systems, Minneapolis, MN) の細胞外ドメインを、FITC タンパク質標識キット (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して FITC で標識した。標識化反応の後、FITC で標識した Fc RI のヒト IgG Fc に対する親和性を、Fc でグリコシル化したヒト IgG-Fc をコーティングしたウェルにおいて、BSA をコーティングしたウェルと比較して高い蛍光を示す蛍光 ELISA により確認した。スフェロプラストを 30 nM の Fc RI-FITC で標識した。次の回の選別においては、低濃度の Fc RIa-FITC (2 回目、3 回目、および 4 回目の選別についてそれぞれ、10 nM、3 nM、および 1 nM) を、スフェロプラストの標識に使用した。4  $\times 10^8$  より多いスフェロプラストを、励起のための 488 nm のアルゴンレーザーを搭載した MoFlo (Dako Cytomation, Fort Collins, CO) により選別した。それぞれの回において、Fc RIa-FITC の結合が原因で最も高い蛍光を示した集団の上部の 3% を、最初の選別の直後の選別と再選別により単離した。

## 【0158】

スフェロプラスト中の Fc 遺伝子を、2 つの特異的プライマー (STJ # 16 および STJ # 220) を使用して PCR 増幅によりレスキューし、SfiI 制限酵素部位を使用して pPelBFLAG-Fc に連結し、エレクトロコンピテント (electrocompetent) E. coli Jude-1 細胞に形質転換した。得られた形質転換体を、クロラムフェニコール含有培地上で選択し、その後、増殖させ、次の回の選別のための準備において上記のようにスフェロプラスト化した。高蛍光クローンを、続けて行う選別の回と同様に富化させた (図 4)。5 回目の選別の後、Fc 5 より高い蛍光を示す 19 個の個々のクローンを単離した (図 5)。不必要な変異を除き、全ての変異は、Fc RIa と直接接触し得る上方 CH2 部分、CH2 ドメインと CH3 ドメインの界面にあるリンカー領域、および Fc RIa に対する結合のための Fc 断片の立体構造変化に寄与し得る CH3 領域を含む、3 つの異なる領域の中に存在していた (図 6)。最も高い蛍光を示すクローンは Fc 601 であり、これは、Fc 5 (E382V/M428I) 中に 2 つのさらなる変異 (K338R、G341V) を有する (図 7 および 図 8)。

## 【0159】

## 実施例 3

Fc5よりもFc R I aに対して高い結合親和性を示す選択したクローンの配列

Fc5 (ヌクレオチド配列#2およびタンパク質配列#2)は、野生型IgG1-Fcの配列(ヌクレオチド配列#1およびタンパク質配列#1)中に2つの変異(E382VおよびM428I)を有する。Fc5よりもFc R I aに対して高い親和性を示す操作されたFc変異体は、Fc5の配列中に置換変異を有する。単離したFc変異体Fc601-Fc619(タンパク質配列#3~#21)は、Fc5配列中に置換変異を有する。単離した変異体を表5にまとめる。

#### 【0160】

##### 実施例4

##### 全長のIgG1-Fc601の作製と精製

トラスツズマブ(Herceptin(商標))は、HER2/neu(Erb2)を過剰発現する転移性乳癌の処置に臨床的に使用されている(Sergina and Moasser, 2007)。転移性の癌腫の排除のために、トラスツズマブ抗体はHER2/neu(Erb2)を認識し、免疫細胞の表面Fc Rと相互作用して、治療的作用に不可欠なエフェクター機能の機構である抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)をもたらす(Lazarら、2006; Sergina and Moasser, 2007)。高いFc R親和性のために操作したFc断片遺伝子を、全長のトラスツズマブ抗体に取り込ませた。pSTJ4-Herceptin IgG1の構築のために、ヒト化4D5(抗p185HER2)のE.coliコドンに最適化した(Hoover and Lubkowski, 2002)VLドメインとVHドメインを、それぞれ、VL 20 についての2つの外部プライマー(STJ#302およびSTJ#313)と10個の内部プライマー(STJ#303~312)、ならびにVHについての全部で14個のプライマー(2つの外部プライマー(STJ#314およびSTJ#327)と12個の内部プライマー(STJ#315~326)を含む12のオリゴヌクレオチドを使用した重複伸長PCRを用いた全遺伝子合成により合成した。VLについてはNcoI/NotI制限エンドヌクレアーゼ部位を、そしてVHについてはNheI/HindIII制限エンドヌクレアーゼ部位を使用した、増幅したVLおよびVHのpMAZ360-M18.1-Hum-IgG1への連結により、pSTJ4-Herceptin IgG1を作製した。pSTJ4-Herceptin-Fc2a-IgG1およびpSTJ4-Herceptin-Fc5-IgG1については、Fc5およびFc2a変異遺伝子を、プライ 30 イマー(STJ#290およびSTJ#291)と鑄型であるpPelBFLAG-Fc5またはpPelBFLAG-Fc601を使用して増幅し、SalI/EcoRVを使用して消化したpSTJ4-Herceptin IgG1に連結した。グリコシル化されていないトラスツズマブ、およびトラスツズマブ-Fc5、およびトラスツズマブ-Fc601のE.coliの中での準備としての産生のために、2シストロン性プラスミドであるpSTJ4-Herceptin-IgG1、pSTJ4-Herceptin-Fc5-IgG1、およびpSTJ4-Herceptin-Fc601-IgG1を構築した。これらのプラスミドは、重鎖および軽鎖の両方に対するPelBリーダーペプチド融合を持つ2シストロン性オペロン中のlacプロモーターの制御下にある(図9)。

#### 【0161】

これらのプラスミドのE.coli BL21(DE3)(EMD Chemicals, Gibbstown, NJ)への形質転換後、細胞を、LB複合培地中で一晚増殖させ、その後、2gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6.75gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.93gのクエン酸H<sub>2</sub>O、0.34gのMgSO<sub>4</sub>、20gのグルコース、0.05gのアンピシリン、および5mlの、2NのHCl中に溶解させた微量金属の溶液(1Lあたり10gのFeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2.25gのZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1gのCuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.35gのMnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、0.23gのNa<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O、1.5gのCaCl<sub>2</sub>、および0.1gの(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>)からなるR/2培地(Jeong and Lee, 2003)中での順応のために2回、一晚の培養を行った。pSTJ4-Herceptin-IgG1、pSTJ4-Herceptin-Ig 40

10

20

30

40

50

G1 - Fc5、または pSTJ4 - Herceptin - IgG1 - Fc601 を持つ E.coli BL21 (DE3) を、30、250 rpm で 8 時間、120 ml の R/2 培地を含む 500 ml のバッフル底フラスコの中で培養し、その後、1.2 L の R/2 培地を含む 3.3 L の BioFlo 310 発酵装置 (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) に接種した。流加発酵を、pH スタットグルコース供給ストラテジー (pH-stat glucose feeding strategy) を使用して 30 で行った。溶存酸素 (DO) 濃度は、攪拌速度を 100 rpm から 1000 rpm まで、空気の循環速度を 1 SLPM (1 分あたりの標準的な液体 (Standard liquid per minute)) から 3 SLPM まで、そして必要に応じて、純粋な酸素の流速を 0 SLPM から 1.5 SLPM まで増大させることにより、自動カスケード制御を使用して、40% の空気飽和度で維持した。最初の pH は 6.8 に調整し、6.75 未満にまで低下した場合には、30% (v/v) の水酸化アンモニウムの添加により、そして 6.9 より上に上昇した場合には、栄養溶液 (feeding solution) (700 g/L のグルコースおよび 10 g/L の MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 導入前) と (500 g/L のグルコース、10 g/L の MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、および 100 g/L の酵母抽出物; 誘導後) の供給により、制御した。OD<sub>600</sub> が 100 に達したら、培養温度を 25 に下げ、30 分後、タンパク質の発現を 1 mM の イソプロピル - 1 - チオ - D - ガラクトピラノシド (IPTG) で誘導した。培養液を、約 130 ~ 140 の OD<sub>600</sub> で 7 時間後に回収した。グリコシル化されていない四量体 IgG の収量は約 40 g/L であった。

10

20

#### 【0162】

細胞を、11,000 × g で 30 分間の遠心分離により回収し、4 mg の リゾチーム (1 g の乾燥細胞重量あたり) と 1 mM の PMSF を補充した、100 mM の Tris、10 mM の EDTA (pH 7.4) を含む 1.2 L の溶液中に懸濁した。ペリプラズムタンパク質を、250 rpm、30 で 16 時間、振盪させながら懸濁溶液をインキュベーションすることにより、放出させた。14,000 × g で 30 分間の遠心分離の後、0.2% (w/v) の最終濃度となるように上清をポリエチレンジイミン (MP Biomedical, Solon, OH) と混合し、14,000 × g で 30 分間、再度遠心分離し、0.2 μm のフィルターを通して濾過した。透明な濾液を、20 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中に予め平衡化させた固定化した Protein A アガロース樹脂と混合し、4 で 16 時間インキュベーションした。200 ml の 20 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) および 200 ml の 40 mM のクエン酸ナトリウム (pH 5.0) での洗浄後、野生型のグリコシル化されていないトラスツズマブ、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc5、およびグリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc601 を、15 ml の 0.1 M のグリシン (pH 3.0) を使用して樹脂から溶離させ、1 M の Tris (pH 8.0) 溶液ですぐに中和した。溶離させた試料を、10 kDa の MW カットオフメンブレンを通した限外濾過により濃縮し、濃縮液を、PBS (pH 7.4) で展開させた Superdex 200 ゲル濾過カラムにアブライした。

30

#### 【0163】

##### 実施例 5

Fc 受容体に対するグリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc601 の親和性完全にあセンブリされたグリコシル化されていないトラスツズマブ抗体の Fc RIa に対する親和性を、グリコシル化されたトラスツズマブ (Clinical grade, Fox Chase Cancer Center Pharmacy)、グリコシル化されていないトラスツズマブ、およびグリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc5、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc601 を個々に CM-5 センサーチップ上に固定化することにより測定した。HBS-EP (10 mM の HEPES (pH 7.4)、150 mM の NaCl、3.4 mM の EDTA、および 0.005% の P20 界面活性剤) 緩衝液中の可溶性の単量体 Fc RIa を、解離時間 300 秒で、60 秒間、30 μl / 分の流速で注入した。リガンドの再生を、100 mM のクエン酸 (pH 3.0

40

50

）の1回の注入により行った。グリコシル化されたトラスツズマブ、グリコシル化されていないトラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、およびトラスツズマブ - Fc601との可溶性の単量体FcRIaの親和性を、固定化したグリコシル化されたトラスツズマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、およびトラスツズマブFc601上を30 $\mu$ l/分の流速で60秒間かけた、0nM、25nM、50nM、100nM、200nMの濃度で2連での可溶性FcRIaの注入により得た。野生型のグリコシル化されていないトラスツズマブに対するFcRIaの親和性は、固定化したグリコシル化されていないトラスツズマブ上を30 $\mu$ l/分の流速で60秒間かけた、0nM、200nM、300nM、400nM、500nM、および600nMの濃度で2連でのFcRIaの注入により得た。ゼロ濃度での結合曲線をブランクとして引き算した。平衡解離定数 ( $K_D$ ) を、BIAevaluation 3.0ソフトウェアにより提供される定常状態の親和性モデルに対して平衡応答をフィットさせることにより決定した。図10に示すように、トラスツズマブ - Fc601は、CHO細胞由来の市販されている等級のグリコシル化されたトラスツズマブと類似する親和性でFcRIaに結合し、野生型のグリコシル化されていないトラスツズマブと比較して、130倍を上回るほどに親和性が増大した。

10

#### 【0164】

FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIaの細胞外ドメインに対する精製したIgGの親和性を、ELISAによって分析した。50 $\mu$ lの4 $\mu$ g/mlのグリコシル化されていないトラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc5、またはE. coliから精製したトラスツズマブ - Fc601、グリコシル化されたIgGトラスツズマブを、0.05MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH9.6) 緩衝液中に希釈し、4 $\times$ で16時間、96ウェルのポリスチレンELISAウェル (Corning, Corning, NY) をコーティングするために使用した。1 $\times$ PBS (pH7.4)、0.5%のBSAでの室温で2時間のブロッキング後、プレートを、0.05%のTween20を含むPBSで4回洗浄し、段階希釈したFcRIIa、GSTに対してC末端融合させたFcRIIb (Berntzenら、2005)、FcRIIIa (R&D Systems, Minneapolis, MN) とともに室温で1時間インキュベーションした。同じ緩衝液での4回の洗浄後、FcRIIaとFcRIIbについては1:5,000に希釈した抗GST抗体HRP結合体 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)、またはFcRIIIaについては1:10,000に希釈した抗ポリヒスチジン抗体HRP結合体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加し、プレートを洗浄し、以前に記載されたとおりに現像した (Mazorら、2007)。pH7.4でのFcRnに対するIgGの結合を決定するために、以前に記載されたとおりに (Andersenら、2006)、室温で1時間、1:5,000に希釈した抗GST-HRPを含むPBS (pH7.4) 中でプレインキュベーションした2 $\mu$ g/mlのFcRnを、トラスツズマブ抗体をコーティングしたプレートに添加した。pH6.0で結合を評価するために、ELISAを、20mMのMESを洗浄緩衝液と試料希釈緩衝液に添加し、pHを6.0に調整したことを除き、上記と同様に行った。予想したとおり、グリコシル化されていないトラスツズマブは、FcRIIaまたはFcRIIb (GSTを融合させたFcRIIaおよびGSTを融合させたFcRIIbについてそれぞれ、EC<sub>50</sub> 1000倍および100倍以上、図3CおよびD) (図11および図12)、またはFcRIIIa (図13) に対して低い親和性を示した。トラスツズマブ - Fc601抗体は、FcRIIbに対してのみわずかに高い親和性を示した。CH2ドメインとCH3ドメインの界面に対する新生児のFcRn受容体の結合は、血漿中のIgGのエンドソームリサイクリングの原因である (Ghetie and Ward, 2000)。トラスツズマブ - Fc5は、新生児のFcRnに対してそのpH依存性結合 (pH6.0での高い親和性での結合と、pH7.4でのその低い結合) を示した。しかし、トラスツズマブ - Fc601は、pH6.0でFcRnに対してはるかに低い結合親和性を示した (図14)。

20

30

40

50

## 【0165】

## 実施例6

Fc5よりもFcRIaに対する高い親和性およびpH依存性のFcRn結合のためのライブラリーの構築

ヒトFcRnは、わずかに酸性のpH条件下でヒトIgGに対して高い親和性を有し、中性または塩基性pHでは低い親和性を有する(Oberら、2004a; Oberら、2004b; Raghavan and Bjorkman, 1996; Rodewald, 1976)。FcRn結合部位は、CH2ドメインとCH3ドメインの界面に位置しており、ブドウ球菌プロテインA(SpA)の結合ドメインに類似している(Kimら、1994; Shieldsら、2001)。Fc601は、Fc5よりも改善されたFcRIa結合親和性を示した。しかし、IgG1の下の方のCH2領域中のFc601の2つのさらなる変異(K338R、G341V)は、リソソーム中での分解の代わりに血管内皮細胞膜を通過して血液に再循環するために、飲作用されたIgGを、酸性化されたエンドソーム中で強いIgG-FcRn複合体にすることを可能にすることにより、血清IgG濃度の調節に重要であるpH依存性のFcRn結合を弱めた(Ghetie and Ward, 2000)。

10

## 【0166】

Fc5よりもFcRIaに対して高い親和性を示し、pH依存性のFcRn結合を保持している操作されたFc断片を単離するために、上方CH2領域中の無作為なアミノ酸からなる新しいコンビナトリアルライブラリーを構築した。このライブラリーは、4つのサブライブラリーからなる。上方CH2領域の4つの部分(234L~239S、264V~268H、297N~299T、328L~332I)(Kabatraら、1991)を、NNS縮重コドンを使用して無作為のアミノ酸により置換した(図15および16)。第1のサブライブラリーについて、DNA断片を、プライマー(STJ#465およびSTJ#220)と鋳型pPelBFLAG-Fc5を使用して増幅した。プライマーSTJ#473を使用してPCR増幅した断片のN末端配列伸長により、無作為なアミノ酸で領域234L~239S中の5個のアミノ酸を置き換えたサブライブラリーを作製した。プライマー(STJ#467およびSTJ#220)により増幅したDNA断片とプライマー(STJ#473およびSTJ#468)により増幅したDNA断片を使用した遺伝子アセンブリPCR産物は、264V~268Hについて5つのアミノ酸残基が無作為化された第2のサブライブラリーを生じた。297N~299Tが無作為化された第3のサブライブラリーは、プライマー対(STJ#473/STJ#470およびSTJ#469/STJ#220)を使用して作製し、そして第4のサブライブラリー(328L~332I)は、プライマー対(STJ#473/STJ#470およびSTJ#469/STJ#220)を使用し、同じPCR鋳型プラスミドpPelBFLAG-Fc5を使用して作製した。可能な変異の数に基づいて、5個のアミノ酸残基を無作為化した3つのサブライブラリー(234L~239S; 264V~268H; 328L~332I)に由来する同じ量のDNAを、3つのアミノ酸残基を無作為化した第3のサブライブラリー(297N~299T)に由来する $20^3/20^5$ 倍量のDNAと混合した。3つのサブライブラリーのそれぞれを、SfiIで消化したpPelBFLAGにサブクローニングした。得られたプラスミドを、E. coli Jude-1(F'[Tn10(Tet<sup>r</sup>) proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> (lacZ)M15] mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZ M15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG)(Kawarasakiら、2003)に形質転換した。

20

30

40

## 【0167】

## 実施例7

Fc5よりもFcRIaに対して高い親和性を示すFc変異体のpH依存性のFcRn結合についてのスクリーニング

4つのサブライブラリーからなるライブラリー細胞を、実施例2に記載した方法により

50

スフェロプラストに転換させた。4 × 10<sup>8</sup> 個を超えるスフェロプラストを、アルゴンレーザーを搭載した MoFlo フローサイトメトリー (Dako Cytomation, Fort Collins, CO) によって選別した。室温で1時間の10 nM (2回目については3 nM、3回目については1 nM、4回目については0.3 nM) の Fc RIa - FITC の標識後、スフェロプラストを選別し、Fc RIa - FITC 結合が原因で最も高い蛍光を示す集団の上位3%を選択的にゲーティング (gating) した。最初の選別の後、収集したスフェロプラストをすぐに再度選別した。Fc をコードする遺伝子を、2つの特異的プライマー (STJ # 16 および STJ # 220) を使用して PCR によりレスキューし、Sfi I で消化した pPelBFLAG プラスミドに連結した。連結混合物を、E. coli Jude-1 に形質転換した。クロラムフェニコール含有培地上で選別した形質転換体を増殖させ、上記のようにスフェロプラスト化し、選別した。4回目の選別の後、Fc 5 よりも高い蛍光を示す8個の個々のクローンを単離した (図17)。これらのクローンの全てが、L328W および I332Y の変異においてコンセンサス変異を有している。また、アミノ酸残基 329P は十分に保存されており、これは、Fc RIa の結合における特定のアミノ酸残基の重要な役割を示唆している (図18)。最も高い蛍光のクローンは Fc 701 であり、これは、328L ~ 332I 領域に L328W、A330V、P331A、I332Y 変異と、1つのさらなる Q295R 変異を有している (図19 ~ 21)。

10

【0168】

## 実施例 8

20

上方 CH2 無作為化ライブラリーからスクリーニングした、Fc RIa に対して高い結合親和性を示す選別したクローンの配列

Fc 5 よりも Fc RIa に対して高い親和性を示す操作した Fc 変異体は、Fc 5 の配列中に置換変異を有する。単離した Fc 変異体 Fc 701 ~ Fc 708 (タンパク質配列 # 22 ~ # 29) は、Fc 5 の配列中に変異を有する。Fc 5 よりも Fc RI に対して高い親和性を示す単離した変異体を表6にまとめる。

【0169】

## 実施例 9

全長のトラスツズマブ - Fc 701 IgG1 の特性決定

全長のトラスツズマブ - Fc 701 IgG1 を流加発酵を使用して産生させ、Protein A アフィニティークロマトグラフィー、その後のゲル濾過クロマトグラフィーを使用して、実施例4に記載したように精製した。全長のトラスツズマブ - Fc 701 の Fc RIa に対する結合についての反応速度定数を得るために、精製したトラスツズマブ - Fc 701 を、アミンカップリング方法を使用して CM5 センサーチップ上に固定化した。トラスツズマブ - Fc 701 と Fc RIa との間での相互作用を、実施例5に記載した条件を使用して分析した。トラスツズマブ - Fc 701 は、トラスツズマブ Fc 601 と同様の親和性で Fc RIa に結合した (図22)。pH 依存性の Fc Rn 結合を、実施例5に記載したように、pH 6.0 および pH 7.4 で、ELISA を使用して分析した。予想したとおり、トラスツズマブ - Fc 701 を含む全てのトラスツズマブ抗体が、中性の pH 7.4 では Fc Rn に対して有意な結合親和性を示さなかった。一方、トラスツズマブ Fc 701 は、pH 6.0 で、野生型のグリコシル化されていないトラスツズマブ抗体またはグリコシル化されたトラスツズマブ抗体よりも、Fc Rn に対して高い結合親和性を示した (図23)。

30

40

【0170】

表3. 本研究で使用したプラスミド

プラスミド	関連する特性	参考文献または供給源
pMoPac1	Cm <sup>r</sup> , lac プロモーター, tetA 遺伝子, C末端ポリヒスチジンタグ, およびc-mycタグ	(Hayhurst et al., 2003)
pMoPac12	Ap <sup>r</sup> , lac プロモーター, tetA 遺伝子, <i>skp</i> 遺伝子, C末端ポリヒスチジンタグ, およびc-mycタグ	(Hayhurst et al., 2003)
pMoPac1-FLAG-M18	NlpA を融合した M18 scFv 遺伝子, pMoPac1 中の C 末端 FLAG タグ	(Jung et al., 2007)
pPelBFLAG	Cm <sup>r</sup> , lac プロモーター, tetA 遺伝子, <i>skp</i> 遺伝子, C末端 FLAG タグ	本研究
pPelBFLAG-Fc	pPelBFLAG 中の <i>IgG1-Fc</i> 遺伝子	本研究
pPelBFLAG-Fc5	pPelBFLAG 中の <i>IgG1-Fc5</i> 遺伝子	本研究
pPelBFLAG-Fc601	pPelBFLAG 中の <i>IgG1-Fc601</i> 遺伝子	本研究
pPelBFLAG-Fc701	pPelBFLAG 中の <i>IgG1-Fc601</i> 遺伝子	本研究
pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360 中の M18.1 ヒト化 <i>IgG1</i> 遺伝子	(Mazor et al.)
pSTJ4-Herceptin IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中の <i>Herceptin IgG1</i> 遺伝子	本研究
pSTJ4-Herceptin-Fc5-IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中の <i>Herceptin IgG1-Fc5</i> 遺伝子	本研究
pSTJ4-Herceptin-Fc601-IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中の <i>Herceptin IgG1-601</i> 遺伝子	本研究
pSTJ4-Herceptin-Fc701-IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中の <i>Herceptin IgG1-701</i> 遺伝子	本研究

【表 4 - 1】

表4. 本研究で使用したプライマー

プライマー の名称	配 列 番 号	プライマーのヌクレオチド配列 (5' → 3')
STJ#16	32	TTGTGAGCGGATAACAATTTC
STJ#196	33	CGCAGCGAGGCCACAGCGGGCCATGGCG
STJ#197	34	CGCAATTCCGAATTCGGCCCCCGAGGCCCC
STJ#220	35	CAATTTTGTACGCCGCTGAGCAGAAG
STJ#302	36	GCGGAATTCCTCAI6GGGGATAITCAAAAGACCC
STJ#303	37	CAGACGGCGCTTAAAGAMGACGGGCTTTGGGTCAITTTGAAATACCGCCATG
STJ#304	38	CGTCTCTTTAAGCGCGTCTGTCTGGGTGATCGGTGACCAIACACGTGTCTGT
STJ#305	39	AGGCCACCGCGCTAATACATCTTGGCTGGCAGCACACGGTATGGTACAG
STJ#306	40	GTTAATAAGCGCGTGGCTGGTATCAACAAAAACCGGTAMGGCCCCGAA
STJ#307	41	GAGTACAGAAAAGCTGGCGCTGTAGATTAACAGCTTCGGGCTTTTCTGGCAGCC
STJ#308	42	CAGCGCCAGCTTTCTGTACTCTGGGCTCCCGAGCCGCTTTTCTGGCAGCC
STJ#309	43	TGCTAATGGTACAGGTGAAGTCCGTACCGCTGCGGCTGCCAGAAAAGCGG
STJ#310	44	ACTTCACGCTGACCAITTAGCAGCTGCAGCCGGAGGATTTGGCCACCTAT
STJ#311	45	TGGCGGGTGGTGTAGTGTGTGCTGACAAATATAGGTGGCGAAATCCTCCG
STJ#312	46	ACTACACCACCCGCCAACCTTTGGCCAGGGTACGAAAAGTGGAGATTAAG
STJ#313	47	GACAGATGGTGGCGCGCGGTGCTTAAATCTCCACTTTCGTACCCCTGG
STJ#314	48	ATTGTTATTGCTAGCGGCTCAGCCGGCAATGGCG
STJ#315	49	ACCAGACCAGCCAGATTCCACTAATTGAACCTCCGCCATTTGCCGGCTG
STJ#316	50	TCTGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGCGGGGTAGCTTACGTTCTGAGCTGTGC
STJ#317	51	AGGTAATCTTTGATGTTGAAGCCAGACGCTGCACAGCTCAGACGTAAGCTA
STJ#318	52	TCTGGCTTCAACATCAAAGATACCTACATTCATTGGGTTCCGCCAAGCCCC
STJ#319	53	ATAGATACGGGCCACCCACTCCAGGCTTTACCTGGGGCTTTGGCGAACC
STJ#320	54	GAGTGGTGGCCGTAATCTATCCAAACCAATGGCTACACGGCTTATGGCAGA
STJ#321	55	GCGCTAATGGTGAAGCGGCTTTTCACAGAGTCTGCATAACGGCTGTAGCC
STJ#322	56	CCGCTTACCAATTAAGCGCGACACCTCTAAGAACAACCCGATATTTACAGA
STJ#323	57	GTCTCTGGCGGTAAAGAGTTCATCTGTAAATATGCGGTTCTTCTTAGAGG

10

20

30

【 0 1 7 2 】

【表 4 - 2】

STJ#324	58	AAC	10
STJ#325	59	AGT	10
STJ#326	60	GGT	10
STJ#327	61	GCC	10
STJ#465	62	CCC	10
STJ#466	63	GGG	10
STJ#467	64	CCT	10
STJ#468	65	CCG	10
STJ#469	66	GCC	10
STJ#470	67	GAG	10
STJ#471	68	CAA	10
STJ#472	69	CCG	10
STJ#473	70	CGC	10
STJ#474	71	CAA	10
STJ#475	72	CCG	10
STJ#476	73	CGC	10
STJ#477	74	CGC	10
STJ#478	75	CGC	10
STJ#479	76	CGC	10
STJ#480	77	GAC	10
	78	GGC	10

【 0 1 7 3 】

10  
20  
30

## 【表5】

表5. Fc5よりもFc $\gamma$ RIに対して高い親和性を付与するFcの変異

Fcの変異体	変異	
Fc601	K338R, G341V, E382V, M428I	
Fc602	N297D, N315D, K340N, E382V, M428I	
Fc603	K340N, E382V, M428I	10
Fc604	K338I, K340N, E382V, M428I	
Fc605	K340Q, A378D, E382V, M428I	
Fc606	N325S, K340N, E382V, M428I	
Fc607	H224Y, E269K, N325S, G341V, E382V, M428I	
Fc608	G341V, E382V, K392E, M428I	20
Fc609	K338R, G341V, E382V, S424L, M428I, N434D	
Fc610	F241L, G341V, E382V, M428I	
Fc611	G341V, E382V, M428I	
Fc612	N276D, G341V, E382V, M428I	
Fc613	G341V, V369A, E382V, M428I	
Fc614	N286D, G341V, E382V, M428I, N434S	30
Fc615	N325S, G341V, E382V, M428I	
Fc616	Y300C, G341V, E382V, M428I	
Fc617	G341V, V348M, E382V, M428I	
Fc618	E382V, M428I, N434S	
Fc619	V266M, E382V, M428I	40

【 0 1 7 4 】

【表6】

表6. 上の方のCH2領域の無作為化ライブラリーから単離した、Fc5よりもFcγRIIに対して高い親和性を付与する変異

Fcの変異体	変異(E382VとM428Iに加えて)
Fc701	L328W, A330V, P331A, I332Y, Q295R
Fc702	L328W, A330E, P331E, I332Y, V279M
Fc703	L328W, A330E, P331E, I332Y
Fc704	L328W, A330E, P331V, I332Y, S426T
Fc705	L328W, A330E, P331V, I332Y
Fc706	L328W, A330I, P331E, I332Y
Fc707	L328W, A330E, I332Y
Fc708	L328W, P331S, I332Y
Fc709	L328W, A330V, P331S, I332Y, H224R, L251F

10

20

## 実施例10

共有結合させた全長IgGディスプレイシステムのためのプラスミドの構築の詳細

ヒトIgG1-Fc断片をコードする、PCR増幅し、SfiIで消化したFc遺伝子、ヒトIgG1重鎖(GeneBankアクセッション番号AF237583)のヒンジ、CH2、およびCH3領域の、SfiIで消化したpPelBFLAGへのサブクローニングにより、pPelBFLAG-Fcを作製した。pBADNlpAHis-M18は、pMopac1-FLAG-M18由来のXbaI-HindIIIで消化したNlpAを融合したM18 scFv遺伝子を、同じ制限エンドヌクレアーゼで消化したpBAD30-KmRに連結することにより行った。プライマー(STJ#475およびSTJ#476)と鑄型pSTJ4-Herceptin IgG1を使用して増幅したSfiIで消化したトラスツズマブVL-Ckの、SfiIで消化したpBADNlpAHis-M18への連結により、pBADNlpA-VL-Ck-Hisを作製した。PelBリーダーペプチドを融合したトラスツズマブVL-Ckを、プライマー(STJ#16およびSTJ#340)と鑄型(pSTJ4-Herceptin IgG1)を使用して増幅し、XbaI/HindIIIエンドヌクレアーゼにより消化し、同じエンドヌクレアーゼで消化したpBAD-NlpA-VL-Ck-Hisに連結して、pBADPelB-VL-Ckを作製した。pBADPelB-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-Hisは、プライマー(STJ#70およびSTJ#332)と鑄型(pBADPelB-VL-Ck)を使用して増幅したXbaIで消化したPCR断片を、同じエンドヌクレアーゼを使用して消化したpBADNlpA-VL-Ck-Hisに連結することにより構築した。トラスツズマブ重鎖を、pPelB-Herceptin(H)-FLAG、pPelB-Herceptin(H)-Fc2a-FLAG、およびpPelB-Herceptin(H)-Fc2a-FLAGについてそれぞれ、プライマー(STJ#474およびSTJ#67)と鑄型pSTJ4-erceptin IgG1を使用して増幅した。Fc2aは、上方CH2領域中の2つの変異(S298G/T299A)によりFcRII結合について最適化されたグリコシル化されていない抗体バリエーションである。これは、Fc2aを含むIgGが、グリコシル化された抗体のものと匹敵するFcR

30

40

50

I I a 結合とエフェクター機能を示すことが報告されている (S a z i n s k y ら、2008)。E . c o l i のペリプラズム空間の中での正確にアセンブリされたホモ二量体野生型 F c および F c 2 a の発現のために、プラスミド p D s b A - F c - F L A G と p D s b A - F c 2 a - F L A G を、D s b A シグナルペプチドを介する F c の輸送のために構築した。P C R 増幅した断片を S f i I で消化し、同じエンドヌクレアーゼで消化した p P e l B F L A G に連結して、p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F L A G 、 p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F c 5 - F L A G と、p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F c 2 a - F L A G を作製した。

【0175】

表7および表8は、実施例10~14に使用したプラスミドとプライマーをまとめる。

10

【0176】

実施例11

I g G 重鎖を操作するための共有結合した全長 I g G ディスプレイシステムのためのスフェロプラストの調製および F A C S 分析

ライブラリースクリーニングのために細菌の全長 I g G ディスプレイシステムを使用するためには、4つの要素を考慮しなければならない。最初に、I g G 重鎖と軽鎖が十分に発現されなければならない。第2に、重鎖と軽鎖は、E . c o l i 中で十分にアセンブリされなければならない。第3に、結合リガンドは、細菌細胞中で全長 I g G に接近できなければならない。最後に、4番目は、提示される全量 I g G の固定化は、ライブラリースクリーニングの間、耐えられなければならない。

20

【0177】

2つのプラスミドの同時発現プラスミドを、全長 I g G の安定な共有結合に使用した (図24)。p B A D P e l B - V L - C k - N l p A - V L - C k - H i s プラスミドは、N l p A リーダーペプチドを融合した I g G 軽鎖 (V L - C k ) と P e l B リーダーペプチドを融合した I g G 軽鎖 (V L - C k ) を発現することができる。したがって、軽鎖の一部は、内膜のペリプラズム側に固定され、ここで、軽鎖の一部が重鎖と会合して、四量体の全長 I g G を生じる。p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F L A G は、l a c プロモーターの制御下に I g G 重鎖をコードする高コピー数のプラスミドである。プラスミド p B A D P e l B - V L - C k - N l p A - V L - C k - H i s を、野生型トラスツズマブ、トラスツズマブ - F c 5、またはトラスツズマブ - F c 2 a のそれぞれについて、p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F L A G 、 p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F c 5 - F L A G 、 または p P e l B - H e r c e p t i n ( H ) - F c 2 a - F L A G で、E . c o l i J u d e - 1 ( F ' [ T n 1 0 ( T e t <sup>r</sup>) p r o A B + l a c I <sup>q</sup> ( l a c Z ) M 1 5 ] m c r A ( m r r - h s d R M S - m c r B C ) 8 0 d l a c Z M 1 5 l a c X 7 4 d e o R r e c A 1 a r a D 1 3 9 ( a r a l e u ) 7 6 9 7 g a l U g a l K r p s L e n d A 1 n u p G ) ( K a w a r a s a k i ら、2003) に形質転換した。形質転換した E . c o l i 細胞を、クロラムフェニコール (50 μg / ml) とカナマイシン (50 g / ml) を補充した、2% (w t / v o l) グルコースを含む T e r r i f i c B r o t h ( B e c t o n D i c k i n s o n D i a g n o s t i c S y s t e m s D i f c o (商標)、S p a r k s , M D) 中で 250 r p m で振盪させながら、37 °C で一晩培養した。

30

40

【0178】

一晩培養した細胞を、125 ml の三角フラスコ中のクロラムフェニコール (50 μg / ml) とカナマイシン (50 g / ml) を含む 7 ml の新しい T B 培地中に 1 : 100 に希釈した。37 °C で2時間のインキュベーションと、250 r p m で振盪させながら 25 °C で20分間の冷却の後、タンパク質の発現を、1 mM のイソプロピル - 1 - チオ - D - ガラクトピラノシド (I P T G) で誘導した。I P T G での誘導の20時間後、6 ml の培養液を遠心分離により回収し、1 ml の冷却した 10 mM の T r i s - H C l (p H 8 . 0) で2回洗浄した。1 ml の冷却した S T E 溶液 (0 . 5 M のスクロース、10 m

50

MのTris-HCl、10mMのEDTA、pH8.0)中への再懸濁後、細胞を、37で30分間、回転混合しながらインキュベーションし、12,000×gで1分間の遠心分離によりペレット化し、1mlの冷却したSolution A(0.5Mのスクロース、20mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのMOPS、pH6.8)中で洗浄した。洗浄した細胞を、1mg/mlのニワトリの卵のリゾチームを含む1mlのSolution A中で、37で15分間インキュベーションした。12,000×gで1分間の遠心分離の後、得られたスフェロプラストのペレットを1mlの冷却したPBS中に再懸濁した。300μlのスフェロプラストを、700μlのPBS中に希釈し、FcRIIaの結合を分析するために、30nMのFcRI-FITCで標識した。FcRIIa結合のFACS分析のために、スフェロプラストを、90nMの、GSTにC末端融合させたFcRIIa(Berntzenら、2005)とともにインキュベーションし、1mlのPBS中で洗浄し、1mlのPBS中に1:200に希釈したポリクローナルヤギ抗GST-FITC(Abcam, Cambridge, MA)で標識した。暗条件下、25で激しく振盪させながらの1時間のインキュベーションの後、この混合物を、12,000×gで1分間の遠心分離によりペレット化し、1mlのPBS中に再懸濁した。蛍光標識したスフェロプラストを2.5mlのPBS中に希釈し、BD FACSCalibur(BD Bioscience, San Jose, CA)上で分析した。

10

## 【0179】

## 実施例12

## FACS分析

20

選択的蛍光および散乱領域のゲーティングに基づくFACS選別方法を使用した親和性成熟のためには、低い変動係数(CV=[標準偏差/平均値]×100)を持つネガティブ対照と比較して、識別できるほどに高いまたは低い蛍光シグナルを得ることが必要である。2つのプラスミドを共有結合した全長IgGディスプレイシステムについての蛍光を、2シストロン性プラスミドpSTJ4-Herceptin IgG、pSTJ4-Herceptin-IgG1-Fc5、またはpSTJ4-Herceptin-IgG1-Fc2aの蛍光と比較した。

## 【0180】

内膜に固定化された(NlpA-VL-Ckポリペプチドを介して)野生型の全長IgGトラスツズマブを発現するスフェロプラストと、2シストロン性ベクターシステムから可溶性IgGを発現するスフェロプラストの蛍光プロフィール(Mazorら、2007)を比較した。2つのプラスミドを固定化した全長IgGディスプレイシステムは、FcRIIa-FITCで標識すると、劇的に改善されたシグナル強度とCV値を明らかに示した。固定化した全長IgGディスプレイシステムについての蛍光シグナルを、TB中で12または25で培養した細胞を用いて試験した。25で培養した、2つのプラスミドを共有結合した全長IgGディスプレイシステムを使用してトラスツズマブ-Fc5を提示する細胞から作製したスフェロプラストは、野生型トラスツズマブを発現するスフェロプラストと比較して、FcRI-FITCで標識すると、はるかに高い蛍光と改善されたCVを示した(図25)。また、FcRIIa-GSTに対するスフェロプラストの親和性を測定するためのFACS分析においては(図26)、TB中で25で培養した2つのプラスミドを共有結合した全長IgGディスプレイシステムは、驚くほどに改善されたシグナル強度とCVを示し、全長のIgGの実際の親和性成熟のための選択的ディスプレイシステムを提供する(図27および図28)。

30

40

## 【0181】

## 実施例13

## IgGFcの操作のためのerror prone PCRライブラリーの構築

固定化したIgG中のCH2-CH3領域のerror prone PCRライブラリーを、野生型Fcを鋳型として、そして2つのプライマー(STJ#196およびSTJ#197)を使用した標準的なerror prone PCR(Fromantら、1995)により構築した。増幅したPCR断片を、error prone PCRラ

50

ライブラリーのための S f i I 制限酵素部位を持つ p P e l B F L A G に連結した。ライブラリー F c 断片を、プライマー ( S T J # 4 7 9 および S T J # 6 7 ) を使用して増幅した。無作為化した F c 領域を持つトラスツズマブ重鎖 ( V H - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 ) ライブラリーのために、V H - C H 1 断片を、プライマー ( S T J # 4 7 4 および S T J # 4 8 0 ) を使用して、鑄型 p S T J 4 - H e r c e p t i n I g G から増幅した。プライマー ( S T J # 4 7 4 および S T J # 6 7 ) を使用した 2 つの断片 ( ヒンジ - C H 2 - C H 3 領域および V H - C H 1 領域 ) からの遺伝子アセンブリ P C R により、F c 領域を無作為化したトラスツズマブ重鎖 ( V H - C H 1 - H i n g e - C H 2 - C H 3 ) ライブラリーを作製した。遺伝子をアセンブリした P C R 断片を、S f i I 制限酵素部位を用いて p P e l B F L A G に連結した。得られたプラスミドを、E . c o l i J u d e - 1 ( F ' [ T n 1 0 ( T e t <sup>r</sup>) p r o A B <sup>+</sup> l a c I <sup>q</sup> ( l a c Z ) M 1 5 ] m c r A ( m r r - h s d R M S - m c r B C ) 8 0 d l a c Z M 1 5 l a c X 7 4 d e o R r e c A 1 a r a D 1 3 9 ( a r a l e u ) 7 6 9 7 g a l U g a l K r p s L e n d A 1 n u p G ) ( K a w a r a s a k i ら、2 0 0 3 ) に形質転換した。このライブラリーは、無作為に選択した 2 0 個のライブラリークローンの配列決定に基づくと、遺伝子 1 つあたり 0 . 4 9 % のエラー率を有している  $9 . 2 \times 1 0 ^ 8$  の個々の形質転換体から構成されていた。

10

【 0 1 8 2 】

実施例 1 4

I g G F c の操作のための上方 C H 2 領域無作為化ライブラリーの構築

20

これらのライブラリーは、4 つのサブライブラリーからなる。上方 C H 2 領域の 4 つの部分 ( 2 3 4 L ~ 2 3 9 S 、 2 6 4 V ~ 2 6 8 H 、 2 9 7 N ~ 2 9 9 T 、 3 2 8 L ~ 3 3 2 I ) ( K a b a t ら、1 9 9 1 ) を、N N S 縮重コドンを使用して無作為のアミノ酸により置換した ( 図 2 9 ) 。第 1 のサブライブラリーについて、DNA 断片を、プライマー ( S T J # 4 6 5 および S T J # 2 2 0 ) と鑄型 p P e l B F L A G - F c を使用して増幅した。プライマー S T J # 4 7 3 を使用した 5 ' 配列の伸長を使用して、無作為なアミノ酸で領域 2 3 4 L ~ 2 3 9 S 中の 5 個のアミノ酸を置き換えたサブライブラリーを作製した。プライマー ( S T J # 4 6 7 および S T J # 2 2 0 ) を使用して増幅した DNA 断片とプライマー ( S T J # 4 7 3 および S T J # 4 6 8 ) を使用して増幅した DNA 断片を使用した遺伝子アセンブリ P C R 産物は、2 6 4 V ~ 2 6 8 H について 5 つのアミノ酸残基が無作為化された第 2 のサブライブラリーを生じた。第 3 のサブライブラリーにおいては、プライマー対 ( S T J # 4 7 3 / S T J # 4 7 0 および S T J # 4 6 9 / S T J # 2 2 0 ) を使用して残基 2 9 7 N ~ 2 9 9 T を無作為化し、そして第 4 のサブライブラリー ( 3 2 8 L ~ 3 3 2 I ) は、プライマー対 ( S T J # 4 7 3 / S T J # 4 7 0 および S T J # 4 6 9 / S T J # 2 2 0 ) を使用し、同じ P C R 鑄型プラスミド p P e l B F L A G - F c 5 を使用して作製した。可能な変異の数に基づいて、5 個のアミノ酸残基を無作為化した 3 つのサブライブラリー ( 2 3 4 L ~ 2 3 9 S ; 2 6 4 V ~ 2 6 8 H ; 3 2 8 L ~ 3 3 2 I ) に由来する同じ量の DNA を、3 つのアミノ酸残基を無作為化した第 3 のサブライブラリー ( 2 9 7 N ~ 2 9 9 T ) に由来する  $2 0 ^ 3 / 2 0 ^ 5$  倍量の DNA と混合した。3 つのサブライブラリーのそれぞれを、S f i I で消化した p P e l B F L A G にサブクローニングした。上方 C H 2 領域を無作為化したトラスツズマブ重鎖 ( V H - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 ) ライブラリーについては、V H 1 - C H 1 断片を、プライマー ( S T J # 4 7 4 および S T J # 4 8 0 ) を使用して、鑄型 p S T J 4 - H e r c e p t i n I g G から増幅した。2 つの断片 ( ヒンジ - C H 2 - C H 3 領域および V H 1 - C H 1 領域 ) からの、プライマー ( S T J # 4 7 4 および S T J # 6 7 ) を使用した遺伝子アセンブリ P C R により、上方 C H 2 領域を無作為化したトラスツズマブ重鎖 ( V H - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 ) ライブラリーを作製した。遺伝子をアセンブリした P C R 断片を、S f i I 制限酵素部位を用いて p P e l B F L A G に連結した。得られたプラスミドを E . c o l i J u d e - 1 に形質転換した。構築したライブラリーの大きさは、無作為に選択した 2 0 個のライブラリークローンの配列に基づくと、 $3 \times 1 0 ^ 8$  の個

30

40

50

々の形質転換体を上回る大きさであった。

【 0 1 8 3 】

【 表 7 - 1 】

表7. 本研究で使用したプラスミド

プラスミド	関連する特性	参考文献または供給源	
pMoPac1	Cmr, lacプロモーター、tetA遺伝子、C末端ポリヒスチジンタグ、およびc-mycタグ	(Hayhurst et al., 2003)	
pMoPac12	Apr, lacプロモーター、tetA遺伝子、skp遺伝子、C末端ポリヒスチジンタグ、およびc-mycタグ	(Hayhurst et al., 2003)	10
pMoPac1-FLAG-M18	NlpAを融合したM18 scFv遺伝子、pMoPac1中のC末端FLAGタグ	(Jung et al., 2007)	
pPelBFLAG-M18	Cmr, lacプロモーター、tetA遺伝子、skp遺伝子、C末端FLAGタグ	本研究	
pPelBFLAG-Fc	pPelBFLAG中のIgG1-Fc遺伝子	本研究	
pPelBFLAG-Fc5	pPelBFLAG中のIgG1-Fc5遺伝子	本研究	
pPelBFLAG-Fc2a	pPelBFLAG中のIgG1-Fc2a遺伝子	本研究	
pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360中のM18.1ヒト化IgG1遺伝子	(Mazor et al.)	20
pSTJ4-Herceptin IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc5	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc5遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc2a遺伝子	本研究	
pPelB-Herceptin(H)-FLAG	pPelBFLAG 中のIgG1重鎖遺伝子	本研究	
pPelB-Herceptin(H)-Fc5-FLAG	pPelBFLAG 中のIgG1-Fc5重鎖遺伝子	本研究	30
pPelB-Herceptin(H)-Fc2a-FLAG	pPelBFLAG 中のIgG1-Fc2a重鎖遺伝子	本研究	
pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360中のM18.1ヒト化IgG1遺伝子	(Mazor et al.)	
pSTJ4-Herceptin IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc5	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc5遺伝子	本研究	
pSTJ4-Herceptin IgG1-Fc2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1中のトラスツズマブIgG1-Fc2a遺伝子	本研究	
pDsbA	pTrc99A中のDsbAシグナル配列遺伝子	本研究	40
pDsbA-Fc-FLAG	DsbAを融合したIgG1-Fc遺伝子、pTrc99A中のC末端FLAGタグ	本研究	
pDsbA-Fc5-FLAG	DsbAを融合したIgG1-Fc5遺伝子、pTrc99A中のC末端FLAGタグ	本研究	
pDsbA-Fc2a-FLAG	DsbAを融合したIgG1-Fc2a遺伝子、pTrc99A中のC末端FLAGタグ	本研究	

【 0 1 8 4 】

【表 7 - 2】

pBAD30	Apr, BAD プロモーター	(Guzman et al., 1995)
pBAD30-KmR	Km <sup>r</sup> , BAD プロモーター	(Jung et al., 2007)
pBADNlpAHis-M18	NlpAを融合したM18 scFv、 pBAD30中のC末端ポリヒスチジンタグ	本研究
pBAD-PelB-VL-Ck-His	PelBを融合したトラスツズマブVL-Ck ドメイン、C末端ポリヒスチジンタグ、 およびpBAD30-KmR中のc-mycタグ	本研究
pBAD-PelB-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-His	PelBを融合したトラスツズマブVL-Ck ドメイン、およびpBAD30-KmR中のNlpA を融合したトラスツズマブVL-Ck-His	本研究

10

【 0 1 8 5 】



【表 8 - 2】

STJ#475	CGCAGCGAGGCCAGCCGGCCATGGCGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCG
STJ#476	CGCAATTCGGCCCCCGAGGCCCGCACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG
STJ#479	GACAAAACACACATGCCACCCGTCGCC
STJ#480	GGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTGTC

## 実施例 15

抗体依存性細胞傷害性アッセイのためのヒト単球由来樹状細胞 (mDC) の単離および分化

Buffy coats (Gulf Coast Blood Center, Galveston, TX) を、histopaque 溶液 (Sigma) に対して 1:1 の容量で添加して、内容物の混合を回避した。血液-histopaque 溶液を、遠心分離のブレイキを行わずに、23 で 30 分間、1600 RPM で遠心分離した。末梢血単核細胞層を、勾配遠心分離後に単離し、洗浄緩衝液 (PBS、2.5% のウシ胎児血清 (FBS)、1 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)) とともに遠心分離して 2 回洗浄した。その後、細胞を、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (IMDM、Cambrex) 中に再懸濁し、24 ウェルプレートに添加し、単球をプレートに接着させるために 37 で 2 時間インキュベーションした。典型的には、50 ml の容量の血液に由来する P BMC を 24 ml の IMDM 中に再懸濁し、1 ml / ウェルでプレートした。その後、培地および接着しなかつた細胞を吸引し、接着細胞を洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。その後、細胞を、IMDM (Cambrex)、10% の FBS、および 200 ng / ml の組み換え体サイトカインインターロイキン - 4 (IL - 4、R & D systems)、および 200 ng / ml の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF、R & D systems) からなる 1 ml / ウェルの増殖培地とともに再懸濁した。さらに、IL - 4 と GM - CSF を、培地を交換せずに、それぞれ 2 日目および 5 日目に、200 ng / ml で添加した。DC の分化を、DC 特異的表面マーカー CD 11c (eBioscience) に対する蛍光抗体での染色により、フローサイトメトリーによって測定した。

## 【0187】

## 実施例 16

抗体依存性細胞傷害性 (ACCC) アッセイ

Her 2 を高レベルで発現する乳癌細胞株 SkBr 3 を、ADCC アッセイの標的として使用した。細胞を、100 uCi / 10<sup>6</sup> 細胞の放射性同位体 Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (Perkin Elmer Life Sciences) で、37 で 1 時間標識した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Roswell Park Memorial Institute medium - 1640 with glutamax (RPMI) 中に再懸濁し、10<sup>4</sup> 細胞 / ウェルで 96 ウェルプレートに添加した。グリコシル化されていない野生型トラスツズマブ、トラスツズマブ - Fc 5、およびトラスツズマブ - Fc 601 (実施例 4 に記載したように調製した)、ならびにグリコシル化されたトラスツズマブ (Clinical grade, Genentech) と関連する対照を、3 連のウェルで標的細胞に添加し、37 で 1 時間インキュベーションした。その後、プレートを、2000 RPM で 1 分間遠心分離し、PBS で洗浄した。エフェクター細胞 (完全に分化した mDC (7 日目) または新しく単離した P BMC のいずれか) を RPMI、2% の低 IgG FBS (Invitrogen)、250 ng / 10<sup>6</sup> 細胞のリポ多糖類 (LPS) 中に再懸濁し、様々な割合でウェルに添加した。標的細胞と mDC を 37 で 24 時間インキュベーションした。その後、細胞培地中に存在する放射性同位体のレベルを、クオム 51 についての液体シンチレーションカウンターの中で測定した。SDS との標的細胞のインキュベーションを、最大溶解のポジティブ対照として使用し、エフェクター細胞を含めないインキュベーションをバックグラウンド溶解として使用した。mDC をエフェクター細胞として使用する場合は、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc 5

およびトラスツズマブ - 601 は、極めて高レベルの ADC C を示し、グリコシル化されたトラスツズマブは極めて低い ADC C を誘導する ( 図 3 1 ) 。おそらく、これは、Fc - 601 および Fc - 5 が Fc RI だけに結合し、これもまた単球由来 DC の表面上で発現される阻害剤受容体 Fc RI I b には結合しないことが原因である。一方、H e r c e p t i n は、Fc RI I b を含む全ての Fc R 受容体に対する結合と、標的細胞の活性化および殺傷をおそらく阻害する後者の受容体に対する結合を示す。エフェクター細胞として P B M C を用いる場合は、Fc 受容体の全てとかみ合うことができ、NK 細胞を活性化することができるグリコシル化されたトラスツズマブは、高い ADC C を示す。対照的に、グリコシル化されていないトラスツズマブ - Fc 5 およびトラスツズマブ - 601 は低い ADC C を示す ( 図 3 0 ) 。

10

**【 0 1 8 8 】**

本明細書中に開示され特許請求された方法の全ては、本開示を考慮して、過度の実験を伴わずに行うことができ、実行することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される方法および本明細書に記載される方法、および工程に、または本明細書中に記載される方法の工程の順序に変更を適用することができることは、当業者に明らかである。さらに詳細には、化学的かつ生理学的の両方に関連する特定の物質を、本明細書中に記載される物質の代用とされる場合があり、それでも、同じまたは類似する結果が得られることは、明らかである。当業者に明らかであるこのような類似の代用品および改変はすべて、添付の特許請求の範囲により定義されるような、本発明の趣旨、範囲、および概念内にあるとみなされる。

20

**【 0 1 8 9 】****参考文献**

以下の参考文献は、本明細書中に示した手順または他の詳細を補足する例示的な手順または他の詳細を提供する程度まで、引用により本明細書中に組み入れられる。

**【 0 1 9 0 】**

【表 9 - 1】

米国特許第 3,817,837 号	
米国特許第 3,826,364 号	
米国特許第 3,850,752 号	
米国特許第 3,939,350 号	
米国特許第 3,996,345 号	
米国特許第 4,275,149 号	
米国特許第 4,277,437 号	10
米国特許第 4,284,412 号	
米国特許第 4,366,241 号	
米国特許第 4,472,509 号	
米国特許第 4,498,766 号	
米国特許第 4,661,913 号	
米国特許第 4,683,195 号	
米国特許第 4,683,202 号	20
米国特許第 4,714,682 号	
米国特許第 4,767,206 号	
米国特許第 4,774,189 号	
米国特許第 4,800,159 号	
米国特許第 4,857,451 号	
米国特許第 4,883,750 号	
米国特許第 4,938,948 号	30
米国特許第 4,988,618 号	
米国特許第 4,989,977 号	
米国特許第 5,021,236 号	
米国特許第 5,160,974 号	
米国特許第 5,302,523 号	
米国特許第 5,322,783 号	
米国特許第 5,384,253 号	40

【 0 1 9 1 】

## 【表 9 - 2】

米国特許第 5,464,765 号	
米国特許第 5,478,722 号	
米国特許第 5,538,877 号	
米国特許第 5,538,880 号	
米国特許第 5,550,318 号	
米国特許第 5,563,055 号	10
米国特許第 5,567,326 号	
米国特許第 5,580,859 号	
米国特許第 5,589,466 号	
米国特許第 5,610,042 号	
米国特許第 5,656,610 号	
米国特許第 5,702,932 号	
米国特許第 5,736,524 号	
米国特許第 5,779,907 号	20
米国特許第 5,780,448 号	
米国特許第 5,789,215 号	
米国特許第 5,824,520 号	
米国特許第 5,843,650 号	
米国特許第 5,846,709 号	
米国特許第 5,846,783 号	
米国特許第 5,849,497 号	30
米国特許第 5,849,546 号	
米国特許第 5,849,547 号	
米国特許第 5,858,652 号	
米国特許第 5,866,366 号	
米国特許第 5,882,864 号	
米国特許第 5,912,148 号	
米国特許第 5,916,776 号	40
米国特許第 5,916,779 号	
米国特許第 5,922,574 号	
米国特許第 5,928,905 号	
米国特許第 5,928,906 号	
米国特許第 5,932,451 号	
米国特許第 5,935,825 号	

## 【 0 1 9 2 】

## 【表 9 - 3】

- 米国特許第 5,939,291 号
- 米国特許第 5,942,391 号
- 米国特許第 5,945,100 号
- 米国特許第 5,981,274 号
- 米国特許第 5,994,624 号
- 米国特許第 7,094,571 号
- 米国特許第 7,094,571 号 10
- 米国特許出願公開第 20030180937 号
- 米国特許出願公開第 20030219870 号
- 米国特許出願公開第 20050260736 号
- 米国特許出願公開第 20060173170 号
- Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.
- Ahouse *et al.*, *J. Immunol.*, 151:6076-6088, 1993. 20
- Allen and Seed, *Nucleic Acids Res.*, 16:11824, 1988.
- Andersen *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 36:3044-3051, 2006.
- Andersen *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 36:3044-3051, 2006.
- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- Atherton *et al.*, *Biol. Reprod.*, 32(1):155-171, 1985.
- Ausubel *et al.*, *In: Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc,  
NY, 1994. 30
- Baneyx and Mujacic, *Nat. Biotechnol.*, 22:1399-1408, 2004.
- Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berntzen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 298:93-104, 2005.
- Berntzen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 298:93-104, 2005.
- Berntzen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 298:93-104, 2005.
- Better *et al.*, *Science*, 240: 1041-10433, 1988.
- Bocek and Pecht, *FEBS Lett.*, 331, 86-90, 1993.
- Boeke *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 186, 1982. 40
- Boss *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:3791-3806, 1984.
- Bowden and Georgiou, *J. Biol. Chem.*, 265:16760-16766, 1990.
- Bukau *et al.*, *J. Bacteriol.*, 163:61, 1985.
- Burman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 112:1364, 1972.
- Cabilly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3273-3277, 1984.

## 【表 9 - 4】

- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.*, 177:75-82, 1999
- Chames *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:7969-7974, 2000.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Cocca, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Collins *et al.*, *Immunogenetics*, 45:440-443, 1997.
- Daugherty *et al.*, *Protein Eng.*, 12:613-621, 1999.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993. 10
- de Kruif and Logtenberg, *J. Biol. Chem.*, 271:7630-7634, 1996.
- Decad and Nikaido, *J. Bacteriol.*, 128:325, 1976.
- Desai *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2417-2425, 1998.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(34):20638-20642, 1989.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol Biol*, 109:215-237, 1999.
- Eigenbrot *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 229:969-995, 1993.
- Elbein *et al.*, *Glycobiology*, 13:17R-27, 2003. 20
- European Appln. 320 308
- European Appln. 329 822
- Fahnestock *et al.*, *J. Bacteriol.*, 167:870-880, 1986.
- Farmer *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 176:11, 1999.
- Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fraleley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10444-10448, 1993.
- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990. 30
- Fromant *et al.*, *Analytical Biochem.*, 224:347-353, 1995.
- Fromant *et al.*, *Analytical Biochem.*, 224:347-353, 1995.
- Fromant *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 224:347-353, 1995.
- Garinot-Schneider *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 260:731-742, 1996.
- GB Appln. 2 202 328
- Georgiou and Segatori, *Current Opin. Biotech.*, 16:538-545, 2005. 40
- Ghetie and Ward, *Annu. Rev. Immunol.*, 18:739-766, 2000.
- Ghetie and Ward, *Annu. Rev. Immunol.*, 18:739-766, 2000.
- Gomi *et al.*, *J. Immunol.*, 144:4046-4052, 1990.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

## 【表 9 - 5】

- Griffiths and Duncan, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:102-108, 1998.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12):1271-1285, 1993.
- Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:4121-30, 1995.
- Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:4121-4130, 1995.
- Halloran *et al.*, *J. Immunol.*, 153:2631-2641, 1994.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Harvey *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 308:43-52, 2006. 10
- Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9193-9198, 2004.
- Hayhurst *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 276:185-196, 2003.
- Hayhurst *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 276:185-196, 2003.
- Hayhurst *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 276:185-196, 2003.
- Hobot *et al.*, *J. Bacteriol.*, 160:143, 1984.
- Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388, 1992.
- Hoogenboom *et al.*, *Immunotechnology.*, 4:1-20, 1998. 20
- Hoover and Lubkowski, *Nucl. Acids Res.*, 30:e43, 2002.
- Hoover and Lubkowski, *Nucleic Acids Res.*, 30:e43, 2002.
- Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Irvin *et al.*, *J. Bacteriol.*, 145:1397, 1981.
- Jefferis, *Biotechnol. Prog.*, 21:11-16, 2005.
- Jeong and Lee, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1295-1298, 2003.
- Jeong and Lee, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1295-1298, 2003. 30
- Jouenne and Junter, *FEMS Microbiol. Lett.*, 56:313, 1990.
- Jung *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 98:39-47, 2007
- Jung *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 98:39-47, 2007.
- Jung *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 98:39-47, 2007.
- Jung *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 31:240-246, 2003.
- Kabat *et al.*, In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. Health and Hum. Serv., Bethesda, Md., 1991.
- Kabat *et al.*, In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. of Health and Hum. Serv., Bethesda, 1991. 40
- Kaepler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawarasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31:e126, 2003.

【 0 1 9 5 】

## 【表 9 - 6】

- Kawarasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31:e126, 2003.
- Khatoon *et al.*, *Ann. Neurol.*, 26(2):210-215, 1989.
- Kim *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:2429-2434, 1994.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(17):10210-10218, 1989.
- Kipriyanov and Little, *Mol. Biotechnol.*, 12:173-201, 1999.
- Kjaer *et al.*, *FEBS Lett.*, 431:448-452, 1998. 10
- Knight *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1271-1281, 1995.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kouzarides and Ziff, *Nature*, 336:646-6451, 1988.
- Kuroda *et al.*, *Lancet.*, 357:1225-1240, 2001.
- Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.
- Labischinski *et al.*, *J. Bacteriol.*, 162:9, 1985.
- Landschulz *et al.*, *Science*, 240:1759-1764, 1988.
- Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4005-4010, 2006. 20
- Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4005-4010, 2006.
- Lei *et al.*, *J. Bacteriol.*, 169:4379-4383, 1987.
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Li *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 337:743-759, 2004.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Marciano *et al.*, *Science*, 284:1516, 1999. 30
- Masaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 13:1623-1635, 1985.
- Mazor *et al.*, *Nat. Biotech.*, 25(5):563-565, 2007.
- Mazor *et al.*, *Nat. Biotech.*, 25:563-5, 2007.
- Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220, 1980.
- Nagaoka and Akaike, *Protein Engineering*, 16: 243-245, 2003.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nikaido and Nakae, *Adv. Microb. Physiol.*, 20:163, 1979. 40
- Nikaido and Vaara, *Microbiol. Rev.*, 49:1, 1985.
- Nikaido, *J. Bacteriology*, 178(20):5853-5859, 1996.
- O'Brien *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 24 :43-50, 2002.
- Ober *et al.*, *J. Immunol.*, 172:2021-2029, 2004b.
- Ober *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:11076-11081, 2004a.

## 【表 9 - 7】

- Olsson *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 168:319-324, 1987.
- Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837, 1989.
- Osborn *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 247:3973-3986, 1972.
- Owens and Haley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142(3):964-971, 1987.
- Painbeni *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6712, 1997.
- Pavlou and Belsey, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59:389-396, 2005. 10
- PCT 出願 PCT/US87/00880
- PCT 出願 PCT/US89/01025
- PCT 出願 WO 88/10315
- PCT 出願 WO 89/06700
- PCT 出願 WO 90/07641
- PCT 出願 WO 93/06213
- PCT 出願 WO 94/09699
- PCT 出願 WO 95/06128 20
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Potter and Haley, *Methods Enzymol*, 91:613-633, 1983.
- Purvis *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3761-3769, 2005.
- Raghavan and Bjorkman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:181-220, 1996.
- Rao and Torriani, *J. Bacteriol.*, 170, 5216, 1988.
- Ravetch and Perussia *et al.*, *J. Exp. Med.*, 170:481-497, 1989.
- Ravetch *et al.*, *Science*, 234:718-725, 1986. 30
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rodewald, *J. Cell Biol.*, 71:666-669, 1976.
- Ruhlmann *et al.*, *FEBS Lett.*, 235:262-266, 1988.
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sazinsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:20167-20172, 2008.
- Schierle *et al.*, *J. Bacteriol.*, 185:5706-5713, 2003.
- Sears *et al.*, *J. Immunol.*, 144:371-378, 1990. 40
- Sergina and Moasser, *Trends in Molec. Med.*, 13:527-534, 2007.
- Sergina, and Moasser, *Trends in Molec. Med.*, 13:527-534, 2007.
- Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604, 2001.
- Shuttleworth *et al.*, *Gene*, 58(2-3):283-295, 1987.
- Simister and Mostov, *Nature*, 337(6203):184-187, 1989.

## 【 0 1 9 7 】

【表 9 - 8】

Sondermann *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 309:737-749, 2001.

Stenberg *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 6:1185-1194, 1992.

Stengelin *et al.*, *Embo J*, 7:1053-1059, 1988.

Stuart *et al.*, *Embo J.*, 8:3657-3666, 1989.

Stuart *et al.*, *J. Exp. Med.*, 166:1668-1684, 1987.

Tominaga *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168:683-689, 1990.

Uhlen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259:1695-702, 1984.

Van Wielink and Duine, *Trends Biochem Sci.*, 15:136, 1990.

Wada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:17353-17357, 1999.

Walker *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 20(7):1691-1696, 1992.

Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wright and Morrison, *Trends Biotech.*, 15:26-32, 1997.

Zeger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3425-3429, 1990.

Zhang *et al.*, *Immunogenetics*, 39:423-437, 1994.

Zhang *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 4):985-991, 1998.

10

20

【図 1】

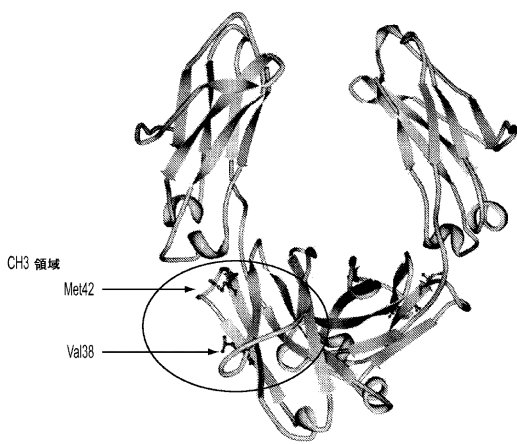


FIG. 1

【図 2】

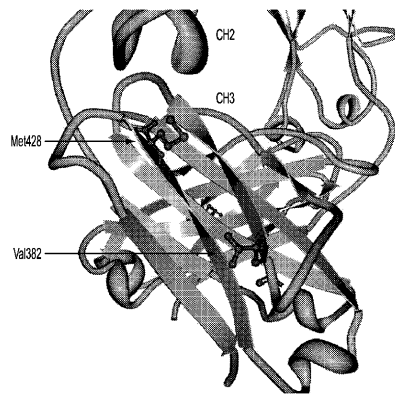
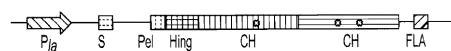


FIG. 2

【図 3】

ERROR PRONE PCR ライブラリー (Fc5の無作為化)



ライブラリーの大きさ:  $7 \times 10^8$   
エラー率: 0.264%

FIG. 3



【 図 7 】

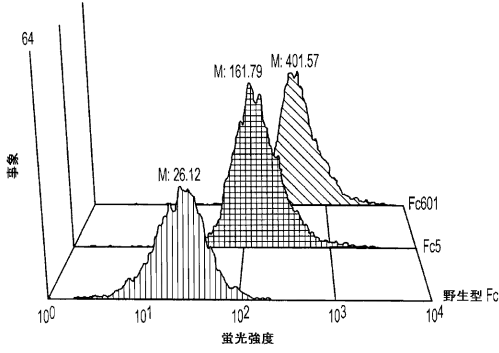


FIG. 7

【 図 8 】

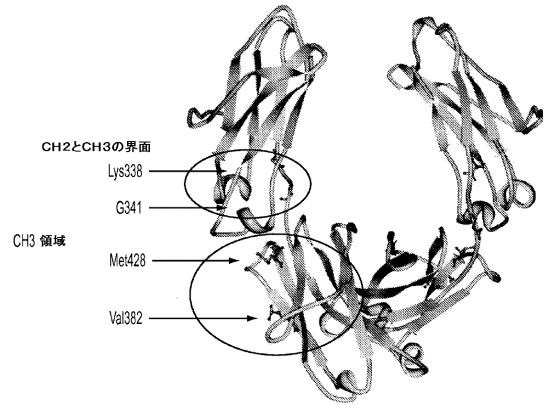


FIG. 8

【 図 9 】

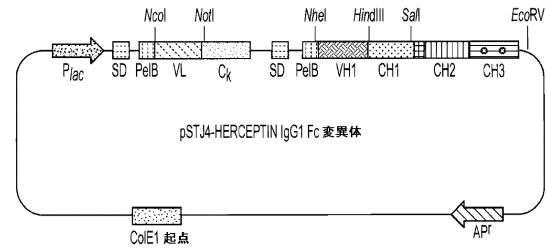


FIG. 9

【 図 10 】

	$K_{ON} (M^{-1} sec^{-1})$	$K_{OFF} (sec^{-1})$	$K_D (nM)$	$Chi^2$
グリコシル化されていない野生型トラスツマブ	$1.31 \times 10^5$	$5.02 \times 10^{-2}$	382	0.78
グリコシル化されていないトラスツマブ-Fc5	$2.17 \times 10^5$	$1.23 \times 10^{-3}$	5.69	0.78
グリコシル化されていないトラスツマブ-Fc601	$1.34 \times 10^5$	$3.92 \times 10^{-4}$	2.92	1.42
グリコシル化されたHERCEPTIN	$1.77 \times 10^5$	$2.66 \times 10^{-4}$	1.5	2.74

FIG. 10A

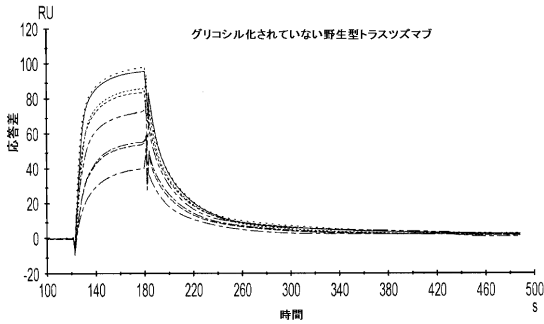


FIG. 10B

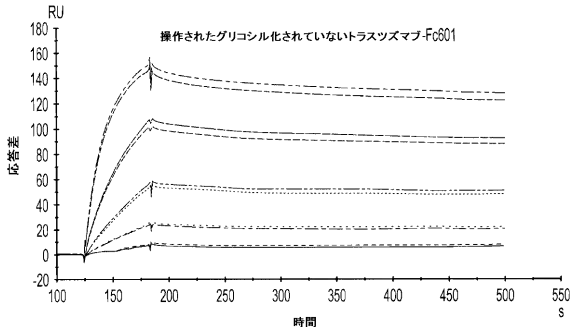


FIG. 10C

【 図 11 】

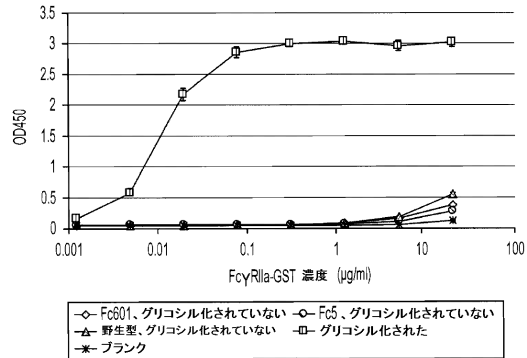


FIG. 11

【 図 12 】

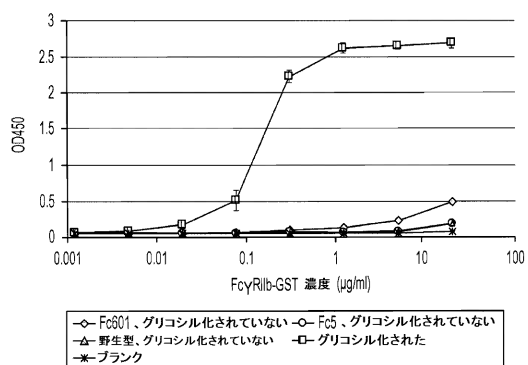


FIG. 12

【 図 1 3 】

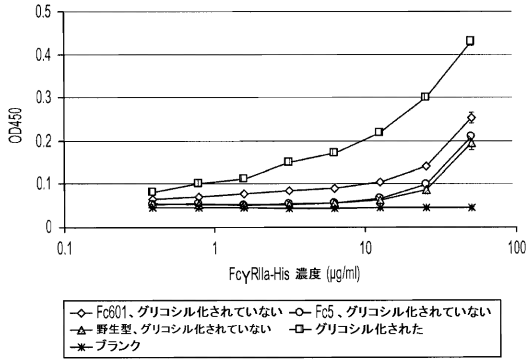


FIG. 13

【 図 1 4 】

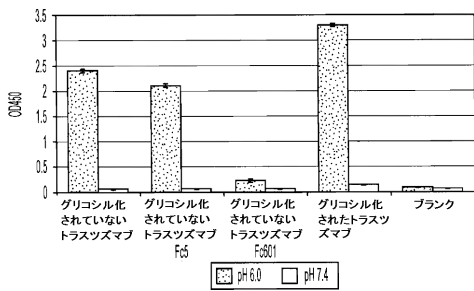


FIG. 14

【 図 1 6 】

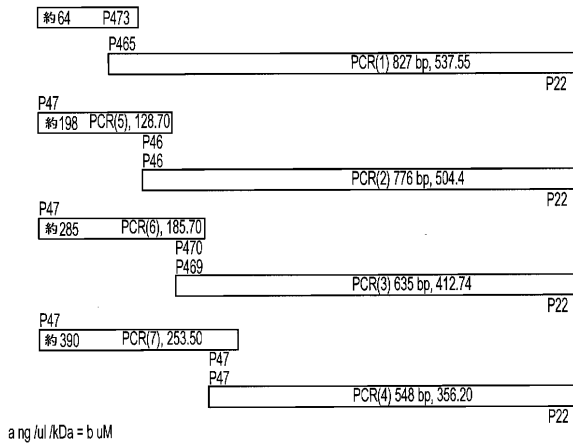


FIG. 16

【 図 1 5 】

234 239  
ELLGSPV  
264 268  
VVDVSHE  
297 299  
YNSTY  
328 332  
ALPAPIE

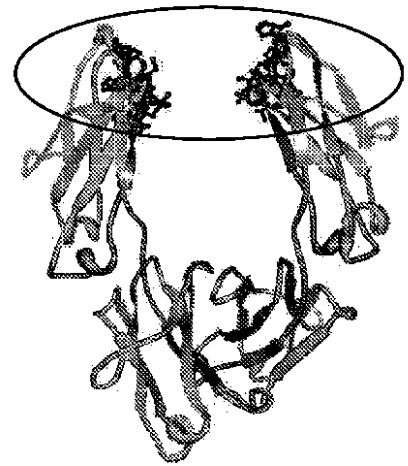


FIG. 15

【 図 1 7 】

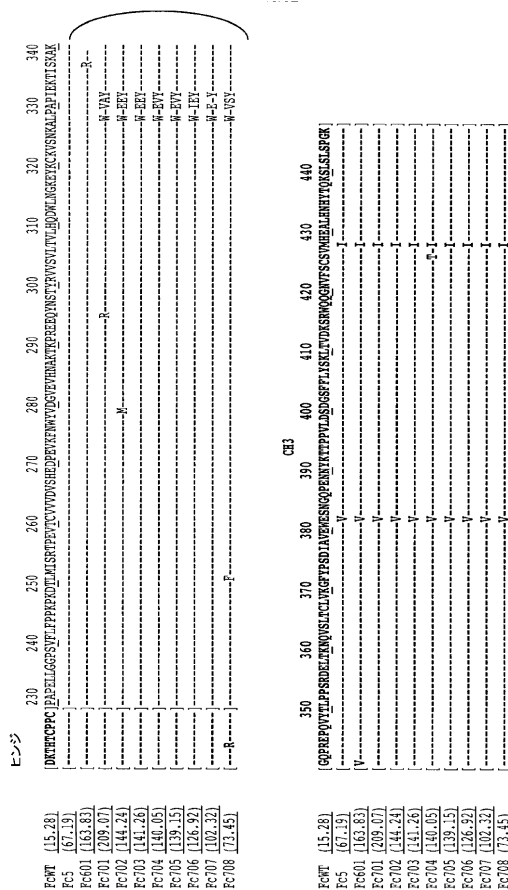


FIG. 17

1) FCS の平均値を括弧内に示す

【 図 1 8 】

FcWT	32 LPAPI	33
Fc701	W-VAY	Q295R
Fc702	W-EEY	V279M
Fc703	W-EEY	
Fc704	W-EVY	S426T
Fc705	W-EVY	
Fc706	W-IEY	
Fc707	W-EPY	
Fc708	W-VSY	H224R, L251F

FIG. 18

【 図 1 9 】

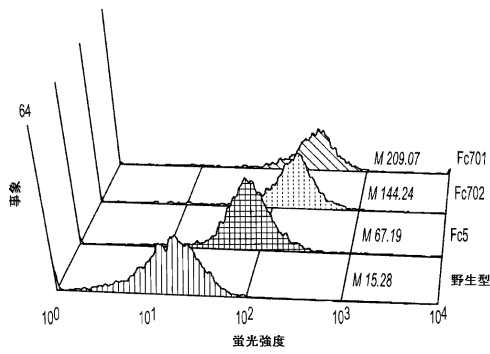


FIG. 19

【 図 2 2 】

	$K_{ON}$ ( $M^{-1} sec^{-1}$ )	$K_{OFF}$ ( $sec^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	$Chi^2$
グリコシル化されていない野生型トラスツズマブ	$1.31 \times 10^5$	$5.02 \times 10^{-2}$	382	0.78
グリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc5	$2.17 \times 10^5$	$1.23 \times 10^{-3}$	5.69	0.78
グリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc601	$1.34 \times 10^5$	$3.92 \times 10^{-4}$	2.92	1.42
グリコシル化されていないトラスツズマブ-Fc701	$2.96 \times 10^5$	$9.25 \times 10^{-4}$	3.12	0.24
グリコシル化されたHERCEPTIN	$1.77 \times 10^5$	$2.66 \times 10^{-4}$	1.5	2.74

FIG. 22A

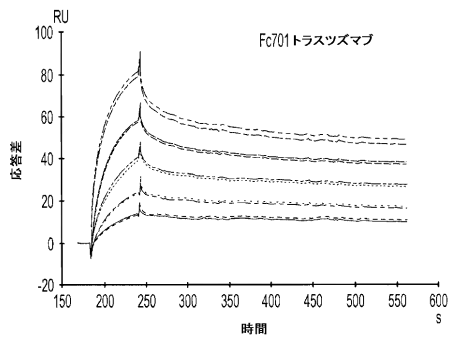


FIG. 22B

【 図 2 0 】

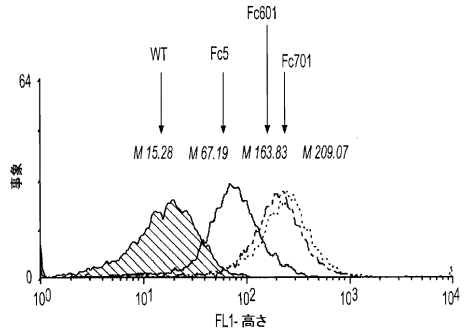


FIG. 20

【 図 2 1 】

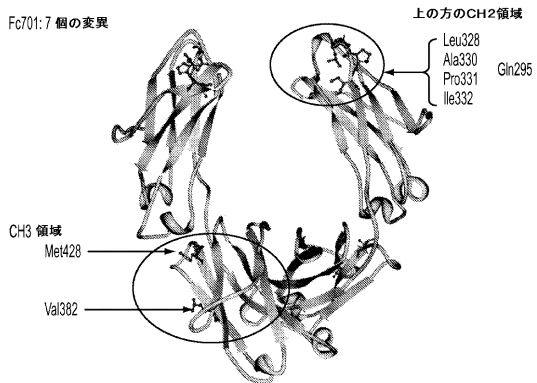


FIG. 21

【 図 2 3 】

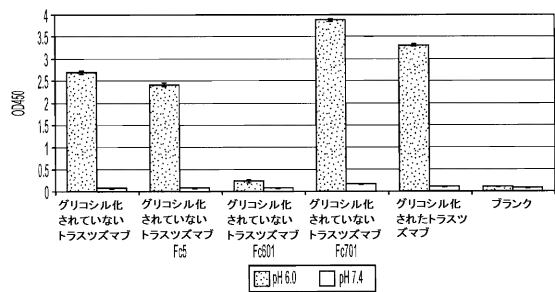


FIG. 23

【 図 2 4 】

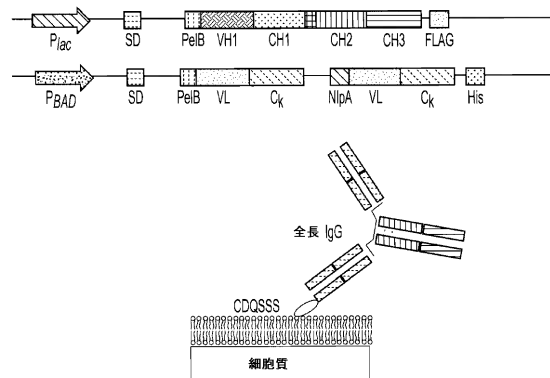


FIG. 24

【 図 2 5 】

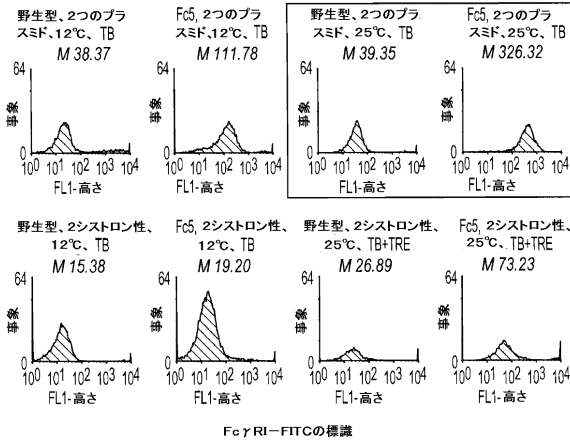


FIG. 25

【 図 2 6 】

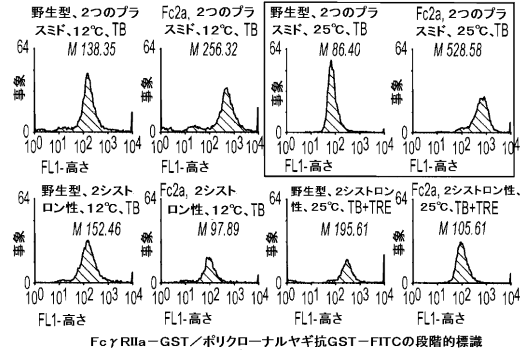


FIG. 26

【 図 2 7 】

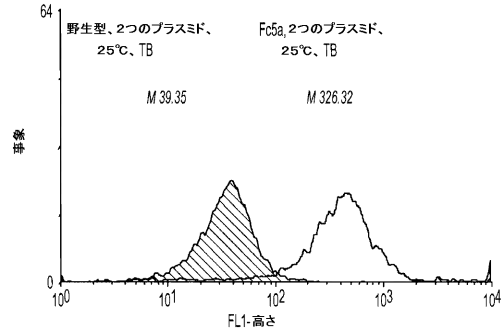


FIG. 27

【 図 2 8 】

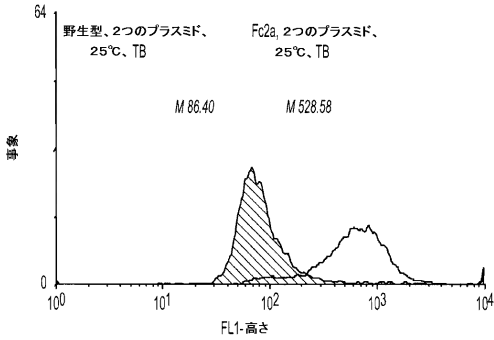


FIG. 28

【 図 2 9 】

234 239  
ELLGGPSV  
264 268  
WVDSHE  
297 299  
YNSTY  
328 332  
ALPAPIE

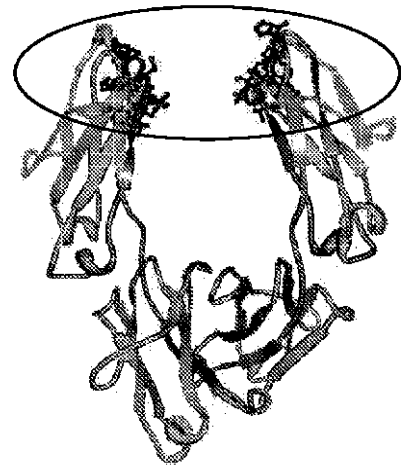


FIG. 29

【 図 3 0 】

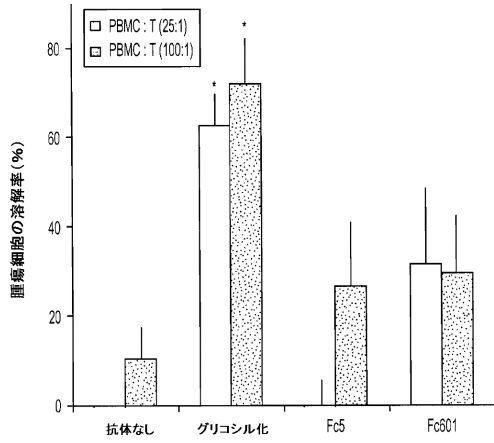


FIG. 30

【 図 3 1 】

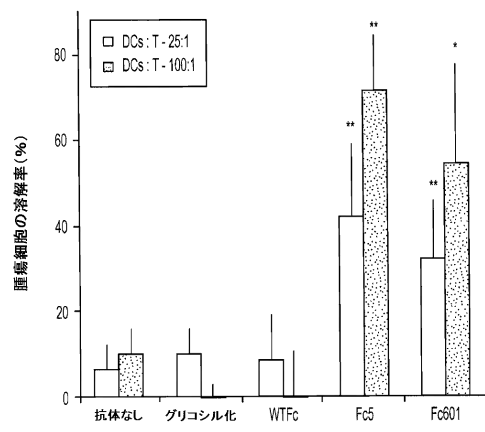




FIG. 31

【 配 列 表 】

2012531897000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2010/040304</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C07K 16/28(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: aglycosylated antibody, Fc domain, enhanced ADCC, mutation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A A A A	WO 2008-137475 A2 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION et al.) 13 November 2008 See the abstract, claims, and paragraphs 22-25.  DALL' AQUA, W. F. et al 'Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn).' J. Biol. Chem., 18 August 2006, Vol. 281, No. 33, Pages 23514-23524. See the whole document.  RICHARDS, J. O. et al. 'Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells.' Mol. Cancer Ther., 21 August 2008, Vol. 7, Pages 2517-2527. See the whole document.  SAZINSKY, S. L. et al. 'Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23 December 2008, Vol. 105, No. 51, Pages 20167-20172. See the whole document.	1-7, 14-18, 21, 22, 33-41 8-13, 19, 20, 23-32  1-41  1-41  1-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 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 27 MAY 2011 (27.05.2011)		Date of mailing of the international search report <b>30 MAY 2011 (30.05.2011)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Kim, Jeong-Ah  Telephone No. 82-42-481-8747

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2010/040304**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	JUNG, S. T. et al. 'Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind FcγRI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 12 January 2010, Vol. 107, No. 2, Pages 404-609. See the whole document.	1-41

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/040304

**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.:  
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:

(Continued on Supplemental Box)

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-41

- 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/US2010/040304**

Continuation of: Box III

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

**Group I:** Claims 1-41 are directed to a polypeptide comprising an aglycosylated antibody Fc domain capable of binding a human FcR polypeptide and nucleic acid encoding any of said polypeptides.

**Group II:** Claims 42-54 are directed to a polypeptide comprising an aglycosylated Fc domain capable of binding an FcR $\gamma$ I polypeptide and a second binding domain, wherein the second binding domain is capable of binding a cell-surface molecule.

**Group III:** Claims 55-64 are directed to an in vitro method for preparing an aglycosylated polypeptide.

**Group IV:** Claims 65-67 are directed to a method of inducing dendritic cell mediated cell killing against a target cell by contacting the target cell with an aglycosylated polypeptide.

**Group V:** Claims 68-115 are directed to an in vitro method for screening for an aglycosylated polypeptide having an Fc domain that binds to a specific Fc $\gamma$ R polypeptide.

**Group VI:** Claim 116 is directed to an in vitro method for optimizing Fc binding to one or more specific FcR polypeptides of an aglycosylated polypeptide having an Fc domain.

The only common technical feature between Groups I-VI is an aglycosylated polypeptide. However, this feature is known in the art. For instant, WO 2008/137475A2 (13 November 2008) discloses several aglycosylated polypeptides and preparation of said polypeptides, see the whole document. In the light of WO 2008/137475A2, this feature lacks novelty and/or inventive step.

Therefore, there is no technical relationship left over the prior art among the claimed inventions leaving the claims without a single general inventive concept. Hence there is lack of unity "a posteriori" (PCT Rules 13.1 and 13.2).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2010/040304**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008-137475 A2	13. 11. 2008	AU 2008-247819 A1	13. 11. 2008
		CA 2685675 A1	13. 11. 2008
		EP 2155789 A2	24. 02. 2010
		US 2009-136936 A1	28. 05. 2009
		WO 2008-137475 A2	13. 11. 2008
		WO 2008-137475 A3	08. 01. 2009
		WO 2008-137475 A3	13. 11. 2008

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
C 0 7 K	1/14	(2006.01)	C 0 7 K	1/14		
C 0 7 K	1/16	(2006.01)	C 0 7 K	1/16		
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50		Z
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/566		
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 7 5	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		Y
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/48		A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジョルジオ, ジョージ

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 7 1 2, オースティン, 1 ユニバーシティー ステーショ  
ン シー 0 4 0 0, デパートメント オブ バイオメディカル エンジニアリング, イーエヌ  
エス 6 1 7 エー, ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン

(72)発明者 チャン, サン テク

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 7 1 2, オースティン, 1 ユニバーシティー ステーショ  
ン シー 0 4 0 0, デパートメント オブ バイオメディカル エンジニアリング, イーエヌ  
エス 6 1 7 エー, ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン 気付

(72)発明者 レディー, サイ

アメリカ合衆国 テキサス 7 8 7 1 2, オースティン, 1 ユニバーシティー ステーショ  
ン シー 0 4 0 0, デパートメント オブ バイオメディカル エンジニアリング, イーエヌ  
エス 6 1 7 エー, ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン 気付

Fターム(参考) 2G045 BB16 BB20 CB01 DA36 FB07 FB12

4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA20 DA06 EA04 GA11

4B063 QA01 QQ06 QS33

4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 EA20 FA74 GA21

专利名称(译)	免疫球蛋白Fc多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012531897A</a>	公开(公告)日	2012-12-13
申请号	JP2012517843	申请日	2010-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
[标]发明人	ジョルジオジョージ チャンサンテク レディーサイ		
发明人	ジョルジオ, ジョージ チャン, サン テク レディー, サイ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K1/14 C07K1/16 C07K1/22 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/56911 C07K16/00 C07K16/005 C07K16/32 C07K2317/24 C07K2317/41 C07K2317/72 C07K2317/732 C07K2317/75 C07K2317/76 G01N33/6857 G01N2500/10		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/18.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K1/14 C07K1/16 C07K1/22 C12Q1/02 G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/543.575 G01N33/53.Y G01N33/48.A		
F-TERM分类号	2G045/BB16 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB07 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ06 4B063/QS33 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /CA25 4B065/CA44 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/221999 2009-06-30 US		
其他公开文献	JP2012531897A5 JP5683581B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

涉及具有非糖基化抗体Fc结构域的多肽的方法和组合物。在某些实施方案中，多肽具有非糖基化的Fc结构域，其与天然Fc结构域相比含有一个或多个取代。另外，一些实施方案涉及结合一些Fc受体但不结合其他Fc受体的Fc结构域。例如，向多肽提供非糖基化的Fc结构域，其选择性地结合FcγRI的水平在糖基化Fc结构域的2倍以内，但是对于与其他Fc受体的结合显著降低。此外，提供了使用具有修饰的非糖基化Fc结构域和第二非Fc结合结构域的多肽来促进抗体依赖性细胞介导的毒性 (ADCC) 的方法和组合物，所述第二非Fc结合结构域可以是抗体或非抗体的抗原结合区域。- 抗原结合区。一些实施方案涉及具有此类多肽的抗体，其可具有相同或不同的非Fc结合结构域。

FIG. 1

