

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5918129号  
(P5918129)

(45) 発行日 平成28年5月18日 (2016.5.18)

(24) 登録日 平成28年4月15日 (2016.4.15)

(51) Int.Cl.	F I	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>C O 7 K 16/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/00	
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	
<b>G O 1 N 33/531 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/531	A
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574	Z
請求項の数 16 (全 93 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-517629 (P2012-517629)	(73) 特許権者	504333972 メディミュン, エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーラン ド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミ ュン ウェイ
(86) (22) 出願日	平成22年6月21日 (2010.6.21)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(65) 公表番号	特表2012-530514 (P2012-530514A)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(43) 公表日	平成24年12月6日 (2012.12.6)	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/039351	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 国際公開番号	W02011/005481		
(87) 国際公開日	平成23年1月13日 (2011.1.13)		
審査請求日	平成25年4月22日 (2013.4.22)		
(31) 優先権主張番号	61/219, 225		
(32) 優先日	平成21年6月22日 (2009.6.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 部位特異的共役のための操作されたFc領域

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体のFc領域であって、289位に置換を含み、該置換がシステイン、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、およびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸への置換を含み、異種物質が置換アミノ酸に結合している、前記Fc領域。

【請求項2】

239位、282位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1つ以上の位置の置換をさらに含み、該置換がシステイン、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、およびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸への置換を含む、請求項1に記載のFc領域。

【請求項3】

前記Fc領域は、

- a) 289および440、
- b) 289および359、
- c) 289および339、ならびに
- d) 289および330、

の置換対のうちの1つ以上を含む、請求項1に記載のFc領域。

【請求項4】

前記Fc領域は、

- a) 289、339、および442、  
 b) 289、330、および339、ならびに  
 c) 289、330、および442

の置換群のうちの1つ以上を含む、請求項1に記載のFc領域。

【請求項5】

前記Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプから選択される、請求項1に記載のFc領域。

【請求項6】

前記置換は、システインを含む、請求項1に記載のFc領域。

【請求項7】

前記システインは、チオール基を含む、請求項6に記載のFc領域。

【請求項8】

前記チオール基は、化学的共役が可能である、請求項7に記載のFc領域。

【請求項9】

前記Fc領域は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、非天然アミノ酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、およびビオチンのうちの1つ以上と共役させられる、請求項8に記載のFc領域。

【請求項10】

請求項1に記載のFc領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項11】

前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体様分子である、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項12】

前記抗体は、前記抗体のCH1ドメインの131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、および139位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換をさらに含む、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項13】

請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。

【請求項14】

癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を検出するための薬剤の製造における請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの使用。

【請求項15】

癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を治療するための薬剤の製造における請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの使用。

【請求項16】

異種物質が置換アミノ酸に結合している抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する方法であって、

(i) 抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させるために適切な条件下で、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸を含む宿主細胞をインキュベートするステップ、

(ii) 前記抗体またはその抗原結合フラグメントを単離するステップ、および

(iii) 異種物質を、前記抗体またはその抗原結合フラグメントのFc領域の置換アミノ酸と結合させるステップ  
 を含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願に対する相互参照

10

20

30

40

50

本出願は、2009年6月22日に出願された米国仮出願第61/219,225号に対する優先権を主張するものであり、当該出願は、参照によりその全体が組み込まれる。

【0002】

## 2. 配列表の参照

本出願は、2010年6月14日に作成された、「MED0455.PCT\_ST25」と題され、69キロバイトの大きさを有するテキストファイルとして本出願と共に提出される配列表を、参照することにより組み込む。

【0003】

## 3. 技術分野

本開示は、共役反応のための基をもたらずFc領域に関する。また、かかるFc領域の設計、修飾、産生、および使用の方法も提供する。

10

【背景技術】

【0004】

## 4. 背景技術

### 4.1 癌および癌療法

毎年120万人を超える米国人が癌を発症する。癌は、米国における第2位の死亡原因であり、現在の傾向が続けば、癌は2010年までに第1位の死亡原因になると予想される。肺癌および前立腺癌が、米国における男性の最上位の癌死亡原因である。肺癌および乳癌が、米国における女性の最上位の癌死亡原因である。米国の2人に1人の男性が生涯のうちのある時点で癌だと診断される。米国の3人に1人の女性が生涯のうちのある時点で癌だと診断される。手術、化学療法、および放射線治療のような現在の治療選択肢は、しばしば、効果がないか、重大な副作用を示す。

20

【0005】

抗転移剤の開発の1つの障害は、これらの薬物を設計し、評価するために使用されるアッセイ系にある。ほとんどの従来の癌療法は、急速に成長する細胞を標的とする。しかしながら、癌細胞は、必ずしも、より急速に成長するわけではなく、むしろ、正常細胞には許容されない条件下で生存し、成長する(Lawrence and Steeg, 1996, World J. Urol. 14: 124-130)。正常細胞の挙動と悪性細胞の挙動との間のこれらの基本的相違は、治療標的化のための機会を提供する。微小転移性腫瘍が既に全身に散在しているという事例は、外来および三次元微小環境において、可能性のある化学療法薬を評価する必要性を強調している。多くの標準的な抗癌剤アッセイは、典型的な細胞培養条件下(すなわち、単層成長)で、腫瘍細胞の成長または生存を測定する。しかしながら、二次元アッセイにおける細胞挙動は、しばしば、インビボでの腫瘍細胞挙動を確実に予測するものではない。

30

【0006】

現在、癌療法は、患者における腫瘍細胞を根絶させるための手術、化学療法、ホルモン療法、および/または放射線治療を含み得る(例えば、Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", in Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Chapter 12, Section IVを参照)。これらのアプローチのすべては、大きな欠点を患者に課す。手術は、例えば、患者の健康によっては禁忌となることがあり、あるいは患者に受け入れられないことがある。さらに、手術は、腫瘍組織を完全には除去できない可能性がある。放射線療法は、腫瘍組織が正常組織より高い感受性を示す場合に有効となるに過ぎず、放射線療法も、しばしば、重大な副作用を惹起し得る。ホルモン療法は、単剤として投与されることはほとんどなく、有効であり得るものの、他の治療によって癌細胞の大部分が除去された後の癌の再発を予防するか、または遅延させるために使用されることが多い。

40

【0007】

化学療法に関しては、癌の治療に利用可能な種々の化学療法剤が存在する。癌化学療法

50

剤の大多数は、DNA合成を抑制することにより作用する(例えば、Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed. (Pergamon Press, New York, 1990)を参照)。したがって、化学療法剤は、本質的に非特異的である。加えて、ほとんどすべての化学療法剤は、毒性であり、化学療法は、重篤な嘔気、骨髄抑制、免疫抑制等を含む、顕著な、そしてしばしば危険な副作用を引き起こす(例えば、Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., ch. 12, sect. 10)。さらに、化学療法剤の組み合わせ投与の場合であっても、多くの腫瘍細胞が該化学療法剤に対して抵抗性であるか、または抵抗性を獲得する。

10

#### 【0008】

癌療法は、現在、生物学的療法または免疫療法も含み得る。生物学的療法/免疫療法は、数的に限定され、化学療法剤より特異的であるものの、多くはまだ、健常細胞および癌細胞の両方を標的とする。加えて、このような療法は、発疹または腫脹等の副作用、発熱、悪寒および疲労を含むインフルエンザ様症状、消化管異常、またはアレルギー反応を引き起こし得る。

#### 【0009】

### 4.2 癌治療のための抗体

20

抗体は、特定の抗原に結合する免疫タンパク質である。ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳動物においては、抗体は、対になった重および軽ポリペプチド鎖から構成される。各鎖は、可変(Fv)領域および定常(Fc)領域と称される2つの異なる領域から構成される。軽鎖および重鎖Fv領域は、該分子の抗原結合決定基を含有し、標的抗原に結合することに関与する。Fc領域は、抗体(例えば、IgG)のクラス(またはアイソタイプ)を定義し、いくつかの天然タンパク質との結合に関与し、重要な生化学的事象を惹起する。

#### 【0010】

抗体のFc領域は、Fc受容体および他のリガンドを含む多数のリガンドと相互作用して、エフェクター機能と称される一連の重要な機能的能力を付与する。IgGクラスに対する重要なFc受容体ファミリーは、Fcガンマ受容体(FcR)である。これらの受容体は、抗体と免疫系の細胞の腕の間と間の連絡を媒介する(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220, Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。ヒトにおいて、このタンパク質ファミリーは、アイソフォームFcRIA、FcRIB、およびFcRICを含むFcRI(CID64);アイソフォームFcRIIA、FcRIIB、およびFcRIICを含むFcRI(CD32);ならびにアイソフォームFcRIIIAおよびFcRIIBを含むFcRIII(CD16)を含む(Jefferys et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。これらの受容体は、典型的には、Fcへの結合を媒介する細胞外ドメイン、膜伸長領域、および細胞内の一部のシグナル伝達事象を媒介し得る細胞内ドメインを有する。これらの異なるFcRサブタイプは、異なる細胞型上で発現される(Ravetch et al., 1991, Annu Rev Immunol 9:457-492に概説される)。例えば、ヒトにおいて、FcRIIBは、好中球上でのみ見出され、FcRIIIAは、マクロファージ、単球、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびT細胞の小集団上で見出される。

30

40

#### 【0011】

Fc/FcR複合体の形成は、エフェクター細胞を結合抗原の部位へ動員して、典型的には、該細胞内でのシグナル伝達事象、ならびに炎症メディエーターの放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、食作用、および細胞傷害性攻撃等の、その後の重要な免疫応

50

答を引き起こす。細胞傷害性および食作用のエフェクター機能を媒介する能力が、抗体が標的細胞を破壊する可能性のある機構である。Fc Rを発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて、標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介性反応は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)と称される(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220, Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766, Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。注目すべきことに、ADCCを媒介するための一次細胞であるNK細胞は、Fc RIIIAを発現するに過ぎないが、単球は、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIIを発現する(Ravetch et al., 1991、上記を参照)。

10

#### 【0012】

別の重要なFcリガンドは、補体タンパク質C1qである。C1qへのFc結合は、補体依存性細胞傷害(CDC)と称される過程を媒介する(Ward et al., 1995, Ther Immunol 2:77-94に概説される)。補体カスケードを活性化するためには2つのIgGへの結合で十分であるが、C1qは、6つの抗体に結合することができる。C1qは、C1rおよびC1sセリンプロテアーゼとの複合体を形成して、補体経路のC1複合体を形成する。

#### 【0013】

標的に対する特異性、免疫エフェクター機能を媒介する能力、および血清中の長い半減期が含まれるが、これらに限定されるものではない、抗体のいくつかの重要な特徴により、抗体および関連免疫グロブリン分子が強力な治療薬となる。多数のモノクローナル抗体が現在開発中であり、あるいは癌を含む種々の症状の治療のために治療用に使用されている。これらの例には、Herceptin(登録商標)(Genentech)、乳癌の治療のために承認されているヒト化抗Her2/neu抗体(例えば、米国特許第5,677,171号)、CNT095(Centocor)、ヒトインテグリン $\alpha$ v抗体(PCI公開第02/12501号)、Rituxan(登録商標)(IDEC/Genentech/Roche)、非ホジキンリンパ腫の治療のために承認されているキメラ抗CD20抗体(例えば、米国特許第5,736,137号)、およびErbibitux(登録商標)(ImClone)、キメラ抗EGFR抗体(例えば、米国特許第4,943,533号)が含まれる。

20

30

#### 【0014】

必要とされる成長経路の遮断による抗増殖、アポトーシスを招く細胞内シグナル伝達、受容体の下方調節および/または代謝回転の増強、ADCC、CDC、ならびに適応免疫応答の促進を含む、抗体が腫瘍細胞を破壊するいくつかの考えられ得る機構が存在する(Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547, Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410)。しかしながら、広範な使用にもかかわらず、抗体は、臨床用途にまだ完全には最適化されておらず、多くは、準最適な抗癌効力を有するに過ぎない。したがって、標的癌細胞を破壊する抗体の能力を増強することが大いに必要とされている。

40

#### 【0015】

### 4.3 抗体共役体

細胞傷害性または細胞増殖抑制剤、すなわち、細胞治療において腫瘍細胞を殺すまたは抑制する薬物の局所送達のための、抗体共役体、すなわち、免疫共役体の使用は(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549, Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146, Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212, Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614, Nic

50

ulescu - Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26: 151 - 172、米国特許第4,975,278号)、腫瘍への薬物部分の標的化送達およびそこにおける細胞内蓄積を可能にすることができ、これらの共役されていない薬剤の全身投与は、排除されるべき腫瘍細胞と同様に、正常細胞に対しても許容されないレベルの毒性を引き起こし得る (Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986): 603 - 05、Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475 - 506)。それにより、最小の毒性と共に最大の効力が追求される。抗体コンジュゲートを設計し、精密化するための努力は、モノクローナル抗体 (mAb) の選択性、ならびに薬物連結および薬物放出特性に焦点が当てられている (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5: 543 - 549)。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は共に、これらの戦略において有用であると報告されている (Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183 - 87)。これらの方法において使用される薬物には、ダウノマイシン、ドキシソルピシン、メトトレキセート、およびビンデシンが含まれる (Rowland et al (1986))。抗体 - 毒素共役体において使用される毒素には、ジフテリア毒素等の細菌毒素、リシンおよびゲロニン等の植物毒素、ゲルダナマシン等の小分子毒素 (Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92 (19): 1573 - 1581、Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025 - 1028、Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786 - 791)、メイタンシノイド (欧州特許第1391213号、Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618 - 8623)、ならびにカリケアマイシン (Lode et al (1998) Cancer Res. 58: 2928、Hinman et al (1993) Cancer Res. 53: 3336 - 3342) が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ抑制を含む機構により、それらの細胞傷害性および細胞増殖抑制効果をもたらす。いくつかの細胞傷害性薬物は、大きな抗体またはタンパク質受容体リガンドに共役されている場合には、不活性であるか、またはそれほど活性でない傾向にある。

#### 【0016】

いくつかの抗体共役体は、FDAにより承認されているか、または臨床治験中である。例えば、ZEVALIN (登録商標) (イブリツモマブ・チウキセタン、Biogen / Idéc) は、正常および悪性Bリンパ球の表面上に見出されるCD20抗原に対するマウスIgG1カッパモノクローナル抗体と、チオ尿素リンカー - キレーターに結合した<sup>111</sup>Inまたは<sup>90</sup>Y放射性同位体とから構成される (Wiseman et al (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27 (7): 766 - 77、Wiseman et al (2002) Blood 99 (12): 4336 - 42、Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10): 2453 - 63、Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20 (15): 3262 - 69)。ZEVALIN (登録商標) は、B細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) に対する活性を有するが、投与は、ほとんどの患者において重篤かつ持続的な血球減少症を引き起こす。また、カリケアマイシンに連結されたヒトCD33抗体から構成される抗体 - 薬物共役体であるMYLOTARG (登録商標) (ゲンツズマブ・オゾガミシン、Wyeth Pharmaceuticals) は、注射による急性骨髄球様白血病の治療のために2000年に承認された (Drugs of the Future (2000) 25 (7): 686、米国特許第4,970,198号、同第5,079,233号、同第5

10

20

30

40

50

, 585, 089号、同第5, 606, 040号、同第5, 693, 762号、同第5, 739, 116号、同第5, 767, 285号、同第5, 773, 001号)。

【0017】

アウリスタチン (auristatin) ペプチド、アウリスタチンE (AE)、およびモノメチルアウリスタチン (MMAE)、ドラスタチン (dolastatin) の合成類似体 (国際公開第WO02/088172号) は、(i) キメラモノクローナル抗体 cBR96 (癌腫上のルイス (Lewis) Y に特異的)、(ii) 血液悪性腫瘍上の CD30 に特異的である cAC10 (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773、Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784、Francisco et al (2003) Blood 102(4): 1458-1465、米国特許第2004/0018194号、(iii) 抗CD20抗体、例えば、CD20を発現する癌および免疫障害の治療のための RITUXAN (登録商標) (国際公開第WO04/032828号)、(iv) 結腸直腸癌の治療のための抗EphB2R抗体2H9および抗IL-8 (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3): 781-788)、(v) E-セレクチン抗体 (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394、ならびに (vi) 他の抗CD30抗体 (国際公開第WO03/043583号) に共役されている。アウリスタチンEの変異体は、米国特許第5, 767, 237号および米国特許第6, 124, 431号に開示されている。モノクローナル抗体に共役されたモノメチルアウリスタチンEは、2004年3月28日に提示された Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示されている。アウリスタチン類似体MMAEおよびMMAFは種々の抗体に共役されている (国際公開第WO2005/081711号)。

【0018】

薬物部分を抗体に結合、すなわち、共有結合により連結させるための従来手段は、薬物部分が抗体上の多くの部位で結合する、分子の不均一混合物をもたらす。例えば、細胞傷害性薬物は、典型的には、抗体のしばしば多数のリシンまたはシステイン残基を介して抗体に共役されて、不均一な抗体-薬物共役混合物を生じる。反応条件に応じて、この不均一混合物は、典型的には、0~約8またはそれ以上の結合薬物部分を伴う抗体の分布を含有する。加えて、薬物部分と抗体との特定の整数比を伴う共役の各亜群内に、薬物部分が抗体上の種々の部位で結合する潜在的に不均一な混合物がある。

【0019】

プロトン化されたおよびpH7付近でそれほど求核性ではないほとんどのアミンとは異なり、システインチオールは、中性pHで反応性である。チオール (R-SH、スルフヒドリル) 基は、比較的反応性であるため、システイン残基を有するタンパク質は、しばしば、ジスルフィド結合オリゴマーとしてそれらの酸化形態で存在するか、または内部架橋ジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、一般に、遊離チオールを有さない (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55)。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準的なエルマンアッセイにより評価することができる。IgMは、ジスルフィド結合五量体の一例であり、IgGは、サブユニットを互いに結合させる内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の一例である。このようなタンパク質において、ジチオトレイトール (DTT) またはセレノール (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156)、およびトリス-(2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) 等の試薬でのジスルフィド結合の還元が、反応性チオールを生成させるのに必要であり得る。

【0020】

抗体システインチオール基は、一般に、求電子共役試薬に対して、抗体アミンまたはヒ

10

20

30

40

50

ドロキシル基よりもさらに反応性、すなわち、さらに求核性である。システイン残基は、リガンドとの共有結合を形成させるため、または新たな分子内ジスルフィド結合を形成させるために、遺伝子操作技術によりタンパク質内に導入されている (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13: 9644 - 9650、Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126 - 132、Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1: 247 - 255、Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4862 - 4867、Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76: 207 - 214、Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98 (15): 8480 - 8484、米国特許第6,248,564号)。しかしながら、システインアミノ酸へのタンパク質の種々のアミノ酸残基の変異によるシステインチオール基の設計は、不對 (遊離 Cys) 残基の場合または反応もしくは酸化を比較的受けやすい場合に、特に、問題となる可能性がある。タンパク質の濃縮溶液において、大腸菌のペリプラズム、培養上清、または部分的もしくは完全に精製されたタンパク質のいずれの場合でも、該タンパク質の表面上の不對 Cys 残基は、対形成し、酸化されて、分子間ジスルフィド、ひいてはタンパク質二量体または多量体を形成し得る。ジスルフィド二量体の形成は、新たな Cys を、薬物、リガンド、または他の標識への共役に対して無反応性にする。さらに、タンパク質が、新たに操作された Cys と既存の Cys 残基との間で分子内ジスルフィド結合を酸化的に形成すると、Cys 基は共に、活性部位への関与および相互作用には利用できない。また、タンパク質は、ミスフォールディングまたは三次構造の喪失により、不活性または非特異的にされ得る (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311: 1 - 9)。

#### 【0021】

システインは、共役のために使用され得る唯一のアミノ酸ではなく、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、セレノメチオニン等の他のアミノ酸、および他のアミノ酸も可能である。

#### 【0022】

共役部位を抗体内に操作することは、既に試みられている。米国特許第5,219,916号は、Ser156またはThr173等の「表面ポケット」残基の修飾を記載している (Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 4<sup>th</sup> ed., US Dept. of Health and Human Services, 1987による)。関連研究において、研究者らは、「表面ポケット」上の残基のみが、共役部位を操作する試みにおけるシステインの置換を支持することができることを確認した (Lyons et al. (1990) Protein Eng. 3: 8 pg 703 - 708)。

#### 【0023】

したがって、種々の薬剤への共役が可能なチオール基を提供する操作された抗体を含む、種々の薬剤への共役が可能な反応基を提供する安定した操作された抗体を開発する必要がある。

#### 【0024】

本明細書の参照の引用または考察は、それが本発明の先行技術であると自認するものと解釈してはならない。

#### 【発明の概要】

#### 【0025】

### 5. 発明の概要

本開示は、種々の薬剤への共役が可能な、非天然に生じる (すなわち、タンパク質中のその位置では通常存在しないもの) アミノ酸残基 (天然および/または合成であり得る) を含有するFc領域を提供する。このような置換の1例は、システインの使用であるが、下述されるように、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、セレノメチオニ

10

20

30

40

50

ン、および他のアミノ酸等の他の置換が可能である。

【0026】

本開示のFc領域は、1つ以上の非天然に生じるアミノ酸で置換された抗体の重鎖のFc領域からの1つ以上のアミノ酸を含み、それによって、共役が可能な基を提供する。本開示の1つの態様において、置換は、システインを用いたものであり、それによって、置換されたシステインアミノ酸残基は、共役のためにチオール基を提供する。

【0027】

1つの実施形態において、本開示のFc領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上の置換アミノ酸を含む。他の実施形態において、本開示のFc領域は、親もしくは天然抗体の抗体重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上のアミノ酸が、または代替的に、非天然に生じるアミノ酸で置換されるFc領域を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabatra (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA、以下「Kabata」と称する)に記載されるEUインデックスのものである。「Kabataに記載されるEUインデックス」とは、上のKabatraに記載されるヒトIgG1 EU抗体の残基の付番を指す。

【0028】

1つの実施形態において、本開示のFc領域は、抗体を含む。

【0029】

1つの実施形態において、本開示は、配列番号1~24のアミノ酸配列を含むFc領域を提供する。別の実施形態において、本開示は、任意の組み合わせで、配列番号1~24によって例示される置換のいずれかを含むFc領域を提供する。

【0030】

1つの実施形態において、本開示は、配列番号1~24のアミノ酸配列を含む抗体を提供する。別の実施形態において、本開示は、任意の組み合わせで、配列番号1~24によって例示される置換のいずれかを含むFc領域を提供する。

【0031】

本開示の別の態様は、Fc領域の生成のための核酸、ベクター、および宿主細胞を提供する。

【0032】

本開示の別の態様は、Fc領域共役体、および1つ以上のさらなる物質に結合した本開示のFc領域を含むかかる共役体を作製する方法を提供する。1つの実施形態において、該物質は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、ペプチド、ペプチド模倣剤、タンパク質スカフォールド、酵素、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、蛍光タグ、またはビオチンから選択される、薬物である。

【0033】

本開示の別の態様は、細胞表面受容体に結合すると、内在化が可能である本開示のFc領域を含む抗体を提供する。かかる態様において、本開示の抗体は、カーゴ(cargo)分子および/または薬剤の細胞内送達に有用である。

【0034】

本開示の別の態様は、本開示の抗体共役体を用いて、癌、自己免疫、炎症性、または感染性疾患を治療する、検出する、および診断する方法を提供する。

【0035】

本開示の別の態様は、本開示のFc領域を含む組成物を提供する。

【0036】

10

20

30

40

50

## 6. 図面の簡単な説明

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0037】

【図1】Fc領域表面システイン操作。このパネルは、図式的に表示され、棒状に示される、表面部位特異的の変異を有するIgG1 Fcドメインのリボン表示である。このリボン表示において、CH2およびCH3ドメインは、図式的に表示される。糖鎖は、棒表示として示される。20個のシステイン操作変異ND2からND21は、棒表示として示され、天然抗体を提示するND1と共に、括弧内にそれぞれのクローン名を用いて図式的に表示される。それらの付番は、Kabataに記載されるEUインデックスに基づく。

【図2】還元条件下のプロテインAで精製したFcシステイン変異のSDS-PAGE。すべての変異および野生型タンパク質を、プロテインAによって精製し、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析し、還元条件および非還元条件下で10%均一なSDS-PAGEにおいて分析した。SeeBlue Plus2 (Invitrogen) 分子量標準(図式的に示されるようにkDaで)を使用した。3μgの各サンプルを充填し、ゲルをSimply Blue (商標) Safe Stain (Invitrogen)を用いて染色した。サンプルは、図に図式的に表示され、図1に提示されるクローン名に対応する。このSDS-PAGE分析は、組換えタンパク質がそれらの予想される分子量を保持することを確認する。

【図3a】抗体変異のサイズ排除クロマトグラフィー。すべての変異タンパク質は、プロテインAによって精製され、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析し、SEC-HPLCにおいて分析した。サンプルの同一性は、図1に提示されるクローン名に対応する。右から左の標準タンパク質(点線で示したクロマトグラム)のピーク位置は、チログロブリン670kDa; 2、ウシガンマグロブリン158kDa; 3、ニワトリオボアルブミン44kDa; 4、ウマミオグロビン17kDa; 5、ビタミンB12 13.5kDaである。変異抗体保持時間は、約8.6分であり、これは、約150kDaの分子量に相当する。また、各変異に対する単量体含有率も示される。この分析は、それらの期待される分子量を保持することに加えて組換えタンパク質が、導入されたシステインにより、ジスルフィド結合ホモ二量体を形成しないことを確認する。

【図3b】同上。

【図3c】同上。

【図3d】同上。

【図4-1】重鎖定常ドメイン配列。図4は、ND1(天然)の重鎖定常ドメイン配列を示す。

【図4-2a】重鎖定常ドメイン配列。図4aは、変異体ND2からND6の配列を示す。

【図4-2b】重鎖定常ドメイン配列。図4bは、変異体ND7からND11の配列を示す。

【図4-2c】重鎖定常ドメイン配列。図4cは、変異体ND12からND16の配列を示す。

【図4-2d】重鎖定常ドメイン配列。図4dは、変異体ND17からND21の配列を示す。ND2からND21で導入した点変異を、下線および太字により表す。

【図5】Fcドメイン変異体の発現。Fcシステイン変異体の組換え発現を示す。各変異体は、天然ND1に匹敵する発現レベルがあった。また、変異体ND5を除くすべての変異体は、93%で、または93%を超えるモノマーで発現した(SEC-HPLCによって判定される)。

【図6】FcRnへのFcドメイン変異体の結合。システインFc操作された変異体のFcRn結合は、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって判定された。70%単量体である変異体ND5(D312C)、および非グリコシル化変異体ND20(N297C)を除く、すべての変異体は、天然抗体ND1と類似のFcRnへの結合シグナルを保持する。

10

20

30

40

50

【図7】示差走査熱量測定(DSC)分析。ND1-21のDSC分析を、pH6.0の25mM His緩衝液を用いて、15 から110 の範囲で、1 /分で行った。変異体ND5(D312C)、ND11(E356C)、およびND20(N297C)を除く、変異体は天然ND1に対して類似のDSCプロファイルを有する。

【図8】共役プロトコル。抗体Fcシステインへのピオチン-PEG2-マレイミドの共役に対する種々のプロトコルを、1mgスケールでD1~21に対して示す。別途特定されない限り、モル抗体に関してモル過剰を示す。

【図9】共役プロトコルDからのサンプルにおけるタンパク質ゲルを還元するためのウエスタンブロット。変異体および天然タンパク質を、プロテインAによって精製し、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析した。1~21の数字は、それぞれ、ND1~21に相当する。Mは、分子量マーカである。サンプルは、まず、NuPage 10%ゲル上でSDS-PAGEによって分解された。移動させたタンパク質を有するブロットを、TBST 2%BSAでブロッキングし、アビジン-HRPでインキュベートし、HRPに対する発色性基質で可視化した。HCは、抗体重鎖に対応するタンパク質バンドであり、LCは、抗体軽鎖に相当するタンパク質バンドである。いくつかの変異体(特に、ND2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、18、19)の重鎖において顕著な共役があるが、ND1(天然)のHCにおいて検出可能な共役はない。ND1を含む、すべての変異体のLCにおいていくつかの共役がある。

【図10】共役プロトコルDからのサンプルにおいてクーマシー染色した非還元タンパク質ゲル。変異体および天然タンパク質を、プロテインAによって精製し、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析し、非還元条件下で、10%均一なSDS-PAGEにおいて分析した。SeeBlue Plus2(Invitrogen)分子量標準を使用した。3μgの各サンプルを充填し、ゲルをSimplyBlue(商標)SafeStain(Invitrogen)を用いて染色した。1~21の数字は、それぞれ、ND1~21に相当する。Mは、分子量マーカである。ほとんどの共役させた変異体は、天然ND1と類似する電気泳動移動度パターンを示す。いくつかの共役させた変異体は、いくつかの明らかな二量体(ND3、5、13、15、17、18、19)を含有し、ある変異体は、いくつかの明らかな断片化(ND20)を示す。

【図11】プロトコルDにより共役された、ND変異体の無傷集団およびペプチドマッピングデータの要約。変異体ND4、7、10、12、18は、操作されたシステインで、ほぼ90%または90%を超え、オリゴマー化がない、またはほとんどないことを示す。DARは、共役されたサンプルの薬物対抗体のモル比である。

【図12】二重変異体。11個の二重変異体を、選択単一変異体に基づいて設計した。図の左上のグリッドは、二重変異体を生成するために使用される単一変異体の組み合わせを示す。

【図13】二重変異体の発現。11個の二重ND変異体の1セットは、選択単一変異体、ND4、ND7、ND10、ND12、ND18に基づいて作製され、別の二重変異体は、ND10およびND19に基づく。すべての二重変異体は、一過性トランスフェクションによって十分に発現する。これらの二重変異体のうちの4個DM8、DM9、DM10、DM11のみが、発現し、(紫外検出によるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-UV)によって判定される)93%を超えるモノマーレベルで精製される。

【図14】非還元SDS-PAGEにおける二重ND変異体の比較。「C」は、対照として使用された天然ND1である。「M」は、分子量標準である。1~10の数字は、DM1~10に相当する。SDS-PAGEの結果は、SEC-UVの結果と一致する。変異体DM4は、最小量のモノマーを有し、DM8は、最大パーセントのモノマーを含有する。

【図15】二重変異体のDSC分析。4個の大部分が単量体である(93%超)二重変異体は、天然および単一変異体ND10と非常に類似するDSCプロファイルを示す。

【図16】二重変異体の共役。二重変異体DM8(ND4およびND10)とDM11(ND10およびND19)の共役は、プロトコルD(図8を参照)で、10:1のピオチ

10

20

30

40

50

ン - マレイミド：抗体の比および 20 : 1 のビオチン - マレイミド：抗体の比を使用する。ウエスタンブロット法およびクーマシー染色に供された還元ゲルを示す。

【図 17】図 16 に記載されるように共役された、二重変異体の無傷集団およびペプチドマッピングデータ。DM8 (ND4 および ND10) ならびに DM11 (ND10 および ND19) は、10 : 1 のビオチン - マレイミド：抗体の比あるいは 20 : 1 のビオチン - マレイミド：抗体の比のいずれかで操作システインで、ほぼ 90% または 90% を超える共役を有する。DAR は、共役されたサンプルの薬物対抗体のモル比である。

【図 18】単一および二重 ND 変異体の共役。TCEP 処理後のより広範な一晚透析の使用を除いて、共役プロトコル D (図 8) を使用し、室温で 1 時間共役した。薬物：mAb のモル比は、単一変異体に対して 10 : 1、二重変異体に対して 20 : 1 であった。ウエスタンブロット法およびクーマシー染色に供された還元ゲル、ならびにクーマシーで染色された非還元ゲルを示す。

【図 19】単一および二重変異体のペプチドマッピング。前の図 18 に示される共役されたサンプルをペプチドマッピング分析により分析した。本表は、操作されたシステインでの共役の効率、ならびに全体の薬物対抗体比 (DAR) を要約している。DM9 は、同じ変異を用いた DM9 の第 2 の調製物である。

【図 20】スケールアップ共役実験。(a) 2.5、(b) 5、(c) 10、(d) 20、および (e) 40 mg/ml の抗体で、共役を行った。図 18 に記載される共役プロトコルを使用した。薬物：mAb のモル比は、10 : 1 であった。タンパク質ゲルにおいて、C は、天然 ND1 である。ウエスタンブロット法およびクーマシー染色に供した還元ゲル、ならびにクーマシーで染色した非還元ゲルを示す。

【図 21】スケールアップ共役のペプチドマッピング。前の図 20 からの共役されたサンプルをペプチドマッピング分析により分析した。共役効率の結果を示す。

【図 22】三重変異体。これは、単一変異体に基づく 4 つの三重変異体の変異に対して選択された残基を示す。図の左上のグリッドは、三重変異体を生成するために使用された変異体の組み合わせを示す。

【図 23】4 つの三重変異体の発現およびモノマーレベル。タンパク質は、0.5 L の培養液から精製した。モノマーレベルを、SEC-HPLC において判定した。比較のための天然抗体 ND1 は、99% 単量体である。

【図 24】ビオチン - マレイミドによる三重変異体の共役。プロトコル D は、室温で、1 時間、1 : 20 の抗体：薬物のモル比での共役を伴い使用した。T1 の 2 つの異なるタンパク質製剤を共役させた。共役特異性および効率のための対照として、天然 ND1 および二重変異体 DM11 を含んだ。ウエスタンブロット法およびクーマシー染色に供した還元ゲル、ならびにクーマシーで染色した非還元ゲルを示す。

【図 25】三重変異体のペプチドマッピング。前の図 24 からの共役された三重変異体サンプルを、ペプチドマッピング分析により分析した。操作システインでの共役の効率を提示する。

【図 26】三重変異体の DSC 分析。T1 は、第 1 の遷移、CH2 に対して数度低い溶解温度を示す。T2 は、85 で、沈殿物の一部を示す。T3 は、高温で沈殿する。T4 は、天然型とほぼ同一である。

【発明を実施するための形態】

【0038】

## 7. 詳細な説明

本開示は、抗体の CH2 または CH3 ドメインの表面上に存在する残基 (図 1 を参照) が、例えば、システインで天然に生じるアミノ酸の置換に適しており、種々の薬剤への共役が可能な部位を操作するのに有用であるという所見に基づく。

【0039】

天然および / または非天然アミノ酸を含むシステイン以外の他のアミノ酸を、置換に用いて、種々の薬剤の共役を可能にさせることができる。かかる他のアミノ酸には、リシン (Benhar et al., (1994) Bioconj. Chem. 55, 3

10

20

30

40

50

21-326に記載)、チロシン(Byers & Baldwin, (1988) Immunology. 65, 329-335に記載)、ヒスチジン(Waibel et al. (1999) Nature Biotechnol. 17: 897-901に記載)、セレノスチン、セレノメチオニン、および/または非天然アミノ酸が含まれる。したがって、1つ以上のシステイン置換が、本明細書に記載される場合、当業者は、任意に、システインの代わりに、これらの天然および/または非天然アミノ酸のうちの1つ以上を使用し得る。当業者はまた、システインおよびリシンによる置換等の置換におけるアミノ酸の任意の組み合わせを使用して、一部の位置でシステインおよび他の位置でリシンを用いて、変異抗体を生成し得る。

#### 【0040】

本開示のFc領域は、親、天然の、または野生型抗体の抗体重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上のアミノ酸が、別のアミノ酸(天然および合成アミノ酸を含む)で置換される操作された抗体を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabataら(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA、以下、「Kabata」と称する)に記載されるEUインデックスのものである。例えば、システイン残基の単一置換は、IgG分子のホモ二量体の性質により、得られた抗体における2つの相当する残基の提示を通常もたらすことに注目すべきである。本開示の得られた操作された抗体は、薬物または化合物への共役のための少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40個またはそれ以上の反応基を提示し得る。一実施形態において、1つ以上の置換は、システイン残基を用いるものであり、得られた操作された抗体は、薬物または化合物への共役のための少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40個またはそれ以上のチオール基を提示し得る。

#### 【0041】

いくつかの実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される位置において、少なくとも1つの置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabataら(上記を参照)に記載されるEUインデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される少なくとも2つの置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabataらに記載されるEUインデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される少なくとも3つの置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabataらに記載されるEUインデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位

10

20

30

40

50



の重鎖の 239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位から選択される少なくとも 15 の置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の 239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位から選択される少なくとも 16 の置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の 239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位から選択される少なくとも 17 の置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の 239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位から選択される少なくとも 18 の置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の 239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位から選択される少なくとも 19 の置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の 239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位のそれぞれで置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。

#### 【0042】

1 つの実施形態において、操作された抗体は、

- a) 289 および 440、
- b) 330 および 440、
- c) 339 および 440、
- d) 359 および 440、
- e) 289 および 359、
- f) 330 および 359、
- g) 339 および 359、
- h) 289 および 339、
- i) 330 および 339、
- j) 289 および 330、ならびに
- k) 339 および 442

の置換対を含む。

#### 【0043】

別の実施形態において、操作された抗体は、

- a) 289、339、および 442、
- b) 289、330、および 339、
- c) 330、339、および 442、ならびに
- d) 289、330、および 442

の置換群うちの 1 つ以上を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

上記の置換は、次のように、配列番号 1 の位置に対応し、本開示を通して K a b a t を参照した数字は、本開示の組成物を説明するために、配列番号 1 の置換の位置で交換可能に使用され得ることを意図する。

【表 1】

ND	Kabat 位置	配列番号 1 の位置
2	239	121
3	282	164
4	289	171
5	312	194
6	324	206
7	330	212
8	335	217
9	337	219
10	339	221
11	356	238
12	359	241
13	361	243
14	383	265
15	384	266
16	398	280
17	422	304
18	440	322
19	442	324
20	297	179
21	400	282

10

20

## 【 0 0 4 5 】

他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の S e r 2 3 9、V a l 2 8 2、T h r 2 8 9、A s n 2 9 7、A s p 3 1 2、S e r 3 2 4、A l a 3 3 0、T h r 3 3 5、S e r 3 3 7、A l a 3 3 9、G l u 3 5 6、T h r 3 5 9、A s n 3 6 1、S e r 3 8 3、A s n 3 8 4、L e u 3 9 8、S e r 4 0 0、S e r 4 4 0、V a l 4 2 2、および S e r 4 4 2 から選択される少なくとも 1 つの天然に生じるアミノ酸の置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。

30

## 【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の S e r 2 3 9、V a l 2 8 2、T h r 2 8 9、A s n 2 9 7、A s p 3 1 2、S e r 3 2 4、A l a 3 3 0、T h r 3 3 5、S e r 3 3 7、A l a 3 3 9、G l u 3 5 6、T h r 3 5 9、A s n 3 6 1、S e r 3 8 3、A s n 3 8 4、L e u 3 9 8、S e r 4 0 0、S e r 4 4 0、V a l 4 2 2、および S e r 4 4 2 から選択される位置での置換を含まず、ここで、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。

40

## 【 0 0 4 7 】

他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、297 位で天然に生じるアミノ酸の置換を含み、該置換は、297 位でのグリコシル化を減少させるおよび/または除去する。特定の実施形態において、本開示の抗体は、抗体の重鎖の 297 位でのアスパラギンのシステインによる置換を含む。なお他の実施形態において、本開示は、抗体の重鎖の 297 位でのグリコシル化を欠く抗体を提供する。これらのそれぞれにおいて、定常領域の付番体系は、K a b a t に記載される E U インデックスのものである。

## 【 0 0 4 8 】

1 つの実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体の重鎖の 2 3 9、2 8 2、2 8 9、2 9 7、3 1 2、3 2 4、3 3 0、3 3 5、3 3 7、3 3 9、3 5 6、3 5 9、

50

361、383、384、398、400、440、422、および442から選択される位置で置換された天然に生じるアミノ酸を有する（例えば、システインを有する）IgG1を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabatに記載されるEUインデックスのものである。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4形態に由来する。なお他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、IgA1、IgA2、IgM、IgD、またはIgE等の非IgG形態に由来する。他の実施形態において、本開示の抗体は、システインおよび/または他のアミノ酸に対する天然に生じる残基の置換によって、IgG1分子またはその同等物のCH2および/またはCH3領域の表面残基を操作することを含む。

【0049】

当業者は、置換に使用する適切なアミノ酸を容易に選択することができる。タンパク質構造への変化を最小限に抑えるために、非天然に生じる残基と同様の残基を選択することが望ましい場合がある。例えば、システイン置換については、システインを天然に生じるアラニンまたはセリンの代わりにすることが望ましい場合がある。

【0050】

IgG2、IgG3、およびIgG4における置換の場合は、当業者は、所望のアイソフォームのどの残基が、抗体の重鎖の239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422、および442の上記の位置に対応するかを決定するために、IgG1との配列アライメントを使用することができ、ここで、定常領域の付番体系は、Kabatに記載されるEUインデックスのものである。IgG2、IgG3、およびIgG4の重鎖定常ドメイン（HC<sub>1</sub>Fc）はそれぞれ、配列番号22、23、および24として本明細書に開示されている。

【0051】

他の実施形態において、本開示は、操作残基を含む単離されたFc領域の発現を含む。かかる単離されたFc領域は、提示目的のスcaffoldとして、または二量化ドメインを単独で、または別の薬剤と組み合わせた場合、有用であり得る。

【0052】

他の実施形態において、本開示は、別のタンパク質に融合される、239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422、および442から選択される位置で少なくとも1つ以上の置換を含むFc領域を含む融合タンパク質を提供し、ここで、定常領域の付番体系は、Kabatに記載されるEUインデックスのものである。

【0053】

他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体のCH1ドメインの131～139領域内に少なくとも1つ以上の非天然に生じるシステインアミノ酸をさらに含む得る。いくつかの実施形態において、本開示の操作された抗体は、抗体のCH1ドメインの131、132、133、134、135、136、137、138、および139から選択される位置で少なくとも1つの置換を含み、ここで、定常領域の付番体系は、Kabatに記載されるEUインデックスのものである。さらなる実施形態は、2009年1月16日に出版されたPCT公開第PCT/US09/31294号、および2008年1月18日に出版された米国仮出願第61/022,073号に相当する「部位特異的共役のためのシステイン操作された抗体」に見出され得、当該出願の各々は、すべての目的のために参照によりその全体が組み込まれる。

【0054】

本明細書で使用する場合、免疫グロブリンとしても公知である「抗体（単数および複数）」という用語は、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの異なるエピトープ結合フラグメントから形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、1本鎖Fvs（scFv）、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、Fab

10

20

30

40

50

フラグメント、F ( a b ) 2フラグメント、所望の生物学的活性を示す抗体フラグメント（例えば、抗原結合部分）、ジスルフィド結合F v s ( s d F v )、および抗イデオタイプ（抗I d）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗I d抗体を含む）、細胞内抗体、ならびに上のいずれのエピトープ結合フラグメントを含むFcを含む以下の抗体のいずれかを包含する。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性を有するフラグメント、すなわち、少なくとも1つの抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、いかなるアイソタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、およびI g Y）、サブアイソタイプ（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、およびI g A 2）、またはアロタイプ（例えば、G m、例えば、G 1 m ( f、z、a、もしくはx )、G 2 m ( n )、G 3 m ( g、b、もしくはc )、A m、E m、およびK m ( 1、2、もしくは3 ) ) からのものであり得る。抗体は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス等を含むが、それらに限定されないいずれの哺乳動物、またはトリ（例えば、ニワトリ）等の他の動物に由来してもよい。1つの実施形態において、本開示の抗体は、本明細書に開示されているいずれかまたはすべての置換を有する米国特許出願公開第20090144275 A1号に開示されている二重特異性抗体を含む。米国特許出願公開第20090144275 A1号は、参照によりその全体が組み込まれる。

#### 【0055】

##### 抗体親和性

本開示の操作された抗体は、それらの天然相対物の抗原結合能力を保持する。1つの実施形態において、本開示の操作された抗体は、操作前の抗体と比較して本質的に同じ親和性を示す。別の実施形態において、本開示の操作された抗体は、操作前の抗体と比較して低下した親和性を示す。別の実施形態において、本開示の操作された抗体は、操作前の抗体と比較して増強された親和性を示す。

#### 【0056】

本開示の抗体は、その同族抗原の1つ以上に対する高い結合親和性を有し得る。例えば、本明細書に記載される抗体は、少なくとも $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の会合定数または $k_{on}$ 速度（抗体(A b) + 抗原 -> A b - A g）を有し得る。

#### 【0057】

別の実施形態において、本開示の抗体は、 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、または $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満の $k_{off}$ 速度（A b - A g -> A b + A g）を有し得る。別の実施形態において、本開示の抗体は、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満、または $10^{-10} \text{ s}^{-1}$ 未満の $k_{off}$ を有する。

#### 【0058】

別の実施形態において、本開示の抗体は、少なくとも $10^2 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^4 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^5 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times$

10

20

30

40

50

$10^{-14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも  $10^{-15} \text{ M}^{-1}$ 、または少なくとも  $5 \times 10^{-15} \text{ M}^{-1}$  未満の親和定数または  $K_a (k_{on} / k_{off})$  を有し得る。なお別の実施形態において、本開示の抗体は、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$  未満、 $10^{-2} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  未満、 $10^{-3} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  未満、 $10^{-4} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  未満、 $10^{-5} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  未満、 $10^{-6} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$  未満、 $10^{-7} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$  未満、 $10^{-8} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$  未満、 $10^{-9} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$  未満、 $10^{-10} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$  未満、 $10^{-11} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$  未満、 $10^{-12} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$  未満、 $10^{-13} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$  未満、 $10^{-14} \text{ M}$  未満、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$  未満、または  $10^{-15} \text{ M}$  未満の解離定数または  $K_d (k_{off} / k_{on})$  を有し得る。

10

#### 【0059】

本明細書に記載される方法に従って使用される抗体は、本明細書に記載される方法または当業者に既知の方法（例えば、BIAcoreアッセイ、ELISA）（Biacore International AB, Uppsala, Sweden）を用いて評価されたとき、 $3000 \text{ pM}$  未満、 $2500 \text{ pM}$  未満、 $2000 \text{ pM}$  未満、 $1500 \text{ pM}$  未満、 $1000 \text{ pM}$  未満、 $750 \text{ pM}$  未満、 $500 \text{ pM}$  未満、 $250 \text{ pM}$  未満、 $200 \text{ pM}$  未満、 $150 \text{ pM}$  未満、 $100 \text{ pM}$  未満、 $75 \text{ pM}$  未満の解離定数（ $K_d$ ）を有し得る。

#### 【0060】

##### 抗体特異性

いくつかの実施形態において、本開示の操作された抗体は、アバゴボマブ、アバタセプト（ORENCIA（登録商標）としても公知である）、アブシキシマブ（REOPRO（登録商標）、c7E3 Fabとしても公知である）、アダリムマブ（HUMIRA（登録商標）としても公知である）、アデカツムマブ、アレムツズマブ（CAMPATH（登録商標）、Mab Campath、またはCampath-1Hとしても公知である）、アルツモマブ、アフエリモマブ（afelimomab）、アナツモマブ・マフェナトックス（anatumomab mafenatox）、アネツムマブ（anatumumab）、アンルキズマブ（anrুক্তizumab）、アポリズマブ（apolizumab）、アルシツモマブ（arcitumomab）、アセリズマブ（aselizumab）、アトリズマブ（atlizumab）、アトロリムマブ（atorolimab）、バピネウスマブ（bapineuzumab）、バシリキシマブ（basiliximab）（SIMULECT（登録商標）としても公知である）、バビツキシマブ（bavituximab）、ベクツモマブ（bectumomab）（LYMPHOSCAN（登録商標）としても公知である）、ベリムマブ（belimumab）（LYMPHO-STAT-B（登録商標）としても公知である）、ベルチリムマブ（berlimumab）、ベシレソマブ（besilesomab）、ベバシズマブ（bevacizumab）（AVASTIN（登録商標）としても公知である）、ビシロマブ・ブラロバルピタール（bicirumab brallobarbitol）、ビバツズマブ・メルタンシン（bivatuzumab mertansine）、カンパス（campath）、カナキヌマブ（canakinumab）（ACZ885としても公知である）、カンツズマブ・メルタンシン（cantuzumab mertansine）、カプロマブ（capromab）（PROSTASCINT（登録商標）としても公知である）、カツムキサマブ（catumaxomab）（REMOVAB（登録商標）としても公知である）、セデリズマブ（cedelizumab）（CIMZIA（登録商標）としても公知である）、セルトリズマブ・ペゴール（certolizumab pegol）、セツキシマブ（cetuximab）（ERBITUX（登録商標）としても公知である）、クレノリキシマブ（clenoliximab）、ダセツズマブ（dacetuzumab）、ダクリキシマブ（dacliximab）、ダクリズマブ（dacilizumab）（ZENAPAX（登録商標）としても公知である）、デノスマブ（denosumab）（AMG 162としても公知である）、デツモマブ（detumomab）、ドルリモマブ・アリトクス（dorlimomab aritox）、ドル

20

30

40

50

リキシズマブ (dorlixizumab)、ダンツムマブ (duntumumab)、  
 ドゥリムルマブ (durimulumab)、ドゥルムルマブ (durmulumab)  
 、エクロメキシマブ (ecromeximab)、エクリズマブ (eculizumab)  
 ) (SOLIRIS (登録商標)としても公知である)、エドバコマブ (edobacomab)、  
 エドレコロマブ (edrecolomab) (Mab17-1A、PANOREX (登録商標)としても公知である)、  
 エファリズマブ (efalizumab) (RAPTIVA (登録商標)としても公知である)、  
 エフングマブ (efungumab) (MYCOGRAB (登録商標)としても公知である)、  
 エルシリモマブ (elsilimomab)、エンリモマブ・ペゴール (enlimomab pegol)、  
 エピツモマブ・シツキセタン (epitumomab cituxetan)、エファリズマブ (efalizumab)、  
 エピツモマブ (epitumomab)、エプラツズマブ (epratuzumab)、  
 エルリズマブ (erlizumab)、エルツマキシマブ (ertumaxomab) (REXOMUN (登録商標)としても公知である)、  
 エタネルセプト (etanercept) (ENBREL (登録商標)としても公知である)、  
 エタラシズマブ (etaracizumab) (エタラツズマブ (etaratuzumab)、  
 VITAXIN (登録商標)、ABEGRIN (商標)としても公知である)、  
 エクスビビルマブ (exbivirumab)、ファノレスオマブ (fanolesomab) (NEUTROSPEC (登録商標)としても公知である)、  
 ファラリモマブ (faralimomab)、フェルビズマブ (felvizumab)、  
 フォントリズマブ (fontolizumab) (HUZAF (登録商標)としても公知である)、  
 ガリキシマブ (galiximab)、ガントネルマブ (gantenerumab)、  
 ガビリモマブ (gavilimomab) (ABX-CBL (登録商標)としても公知である)、  
 ゲンツズマブ・オゾガミシン (gemtuzumab ozogamicin) (MYLOTARG (登録商標)としても公知である)、  
 ゴリムマブ (golimumab) (CNT0148としても公知である)、  
 ゴミリキシマブ (gomiliximab)、イバリズマブ (ibalizumab) (TNX-355としても公知である)、  
 イブリツモマブ・チウキセタン (ibritumomab tiuxetan) (ZEVALIN (登録商標)としても公知である)、  
 イゴボマブ (igovomab)、インシロマブ (imciromab)、  
 インフリキシマブ (infliximab) (REMICADE (登録商標)としても公知である)、  
 イノリモマブ (inolimomab)、イノツズマブ・オゾガミシン (inotuzumab ozogamicin)、  
 イピリムマブ (ipilimumab) (MDX-010、MDX-101としても公知である)、  
 イラツムマブ (iratumumab)、ケリキシマブ (keliximab)、  
 ラベツズマブ (labetuzumab)、レマレスオマブ (lemalesomab)、  
 レブリリズマブ (lebrilizumab)、レルデリムマブ (lerdelimumab)、  
 レキサツムマブ (lexatumumab) (HGS-ETR2、ETR2-ST01としても公知である)、  
 レキシツムマブ (lexitumumab)、リビビルマブ (libivirumab)、  
 リンツズマブ (lintuzumab)、ルカツムマブ (lucatumumab)、  
 ルミリキシマブ (lumiliximab)、マパツムマブ (mapatumumab) (HGS-ETR1、  
 TRM-1としても公知である)、マスリモマブ (maslimomab)、  
 マツズマブ (matuzumab) (EMD72000としても公知である)、  
 メポリズマブ (mepolizumab) (BOSATRIA (登録商標)としても公知である)、  
 メテリムマブ (metelimumab)、ミラツズマブ (milatuzumab)、  
 ミンレツモマブ (minretumomab)、ミツモマブ (mitumomab)、  
 モロリムマブ (morolimumab)、モタビズマブ (motavizumab) (NUMAX (商標)としても公知である)、  
 ムロモナブ (mromonab) (OKT3としても公知である)、  
 ナコロマブ・タフェナトクス (nacolomab tafentox)、  
 ナプツモマブ・エスタフェナトクス (naptumomab estafentox)、  
 ナタリズマブ (natalizumab) (TYSABRI (登録商標)、  
 ANTEGREN (登録商標)としても公知である)、ネ

バクマブ (nebacumab)、ネレリモマブ (nerelimomab)、ニモツズマブ (nimotuzumab) (THERACIM hR3 (登録商標)、THERA-CIM-hR3 (登録商標)、THERALOC (登録商標)としても公知である)、ノフェツモマブ・メルペンタン (nofetumomab merpentan) (VERLUMA (登録商標)としても公知である)、オクレリズマブ (ocrelizumab)、オデュリモマブ (odulimomab)、オフアツムマブ (ofatumumab)、オマリズマブ (omalizumab) (XOLAIR (登録商標)としても公知である)、オレゴボマブ (oregovomab) (OVAREX (登録商標)としても公知である)、オテリキシズマブ (otelixizumab)、バジバキシマブ (pagibaximab)、パリビズマブ (palivizumab) (SYNAGIS (登録商標)としても公知である)、パニツムマブ (panitumumab) (ABX-EGF、VECTIBIX (登録商標)としても公知である)、パスコリズマブ (pascopolizumab)、ペンツモマブ (pemtumomab) (THERAGYN (登録商標)としても公知である)、ペルツズマブ (pertuzumab) (2C4、OMNITARG (登録商標)としても公知である)、ペキセリズマブ (pexelizumab)、ピンツモマブ (pintumomab)、プリリキシマブ (priliximab)、プリツムマブ (pritumumab)、ラニビズマブ (ranibizumab) (LUCENTIS (登録商標)としても公知である)、ラキシバクマブ (raxibacumab)、レガビルマブ (regavirumab)、レスリズマブ (reslizumab)、リツキシマブ (rituximab) (RITUXAN (登録商標)、MabTHERA (登録商標)としても公知である)、ロベリズマブ (rovelizumab)、ルブリズマブ (ruplizumab)、サツモマブ (satumomab)、セビルマブ (sevirumab)、シブロツズマブ (sibrotuzumab)、シブリズマブ (simplizumab) (MEDI-507としても公知である)、ソントズマブ (sontuzumab)、スタムルマブ (stamulumab) ((MYO-029としても公知である)、スレソマブ (sulesomab) (LEUKOSCAN (登録商標)としても公知である)、タカツズマブ・テトラキセタン (tacatuzumab tetraxetan)、タドシズマブ (tadocizumab)、タリズマブ (talizumab)、タブリツモマブ・パプトクス (taplitumomab paptox)、テフィバズマブ (tefibazumab) (AUREXIS (登録商標)としても公知である)、テリモマブ・アリトクス (telimomab aritox)、テネリキシマブ (teneliximab)、テプリズマブ (teplizumab)、チシリムマブ (ticilimumab)、トシリズマブ (tocilizumab) (ACTEMRA (登録商標)としても公知である)、トラリズマブ (toralizumab)、トシツモマブ (tositumomab)、トラスツズマブ (trastuzumab) (HERCEPTIN (登録商標)としても公知である)、トレメリムマブ (tremelimumab) (CP-675, 206としても公知である)、ツコツズマブ・セルモレウキン (tucotuzumab celmoleukin)、ツビルマブ (tuvirumab)、ウルトキサズマブ (urtioxazumab)、ウステキヌマブ (ustekinumab) (CNT01275としても公知である)、バパリキシマブ (vapaliximab)、ベルツズマブ (veltuzumab)、ベパリモマブ (vepalimomab)、ビシリズマブ (visilizumab) (NUVION (登録商標)としても公知である)、ボロシキシマブ (volociximab) (M200としても公知である)、ボツムマブ (votumumab) (HUMASPECT (登録商標)としても公知である)、ザルツムマブ (zalutumumab)、ザノリムマブ (zanolimomab) (HUMAX-CD4としても公知である)、ジラリムマブ (ziralinomab)、またはゾリモマブ・アリトクス (zolimomab aritox) から選択される、エピトープ結合ドメイン (例えば、限定されるものではないが、すべて6つのCDRを有する抗体可変領域、または抗体可変領域と少なくとも

10

20

30

40

50

も90%同一である同等の領域)を含む抗体を含む。

【0061】

他の実施形態において、本開示の抗体は、6つのCDRを有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、前述の表から選択される抗体の結合について競合する。他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、6つのすべてのCDRを有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、前述の表中の抗体と同一の抗原に結合する。

【0062】

他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、6つのすべてのCDRを有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、PDGFRアルファ、PDGFRベータ、PDGF、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FGF、FGF2、HGF、KDR、flt-1、FLK-1、Ang-2、Ang-1、PLGF、CEA、CXCL13、Baff、IL-21、CCL21、TNFアルファ、CXCL12、SDF-1、bFGF、MAC-1、IL23p19、FPR、IGFBP4、CXCR3、TLR4、CXCR2、EphA2、EphA4、EphrinB2、EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2またはp185neu)、HER3(ErbB3)、HER4(ErbB4またはtyro2)、SC1、LRP5、LRP6、RAGE、Nav1.7、GLP1、RSV、RSV Fタンパク質、インフルエンザHAタンパク質、インフルエンザNAタンパク質、HMGB1、CD16、CD19、CD20、CD21、CD28、CD32、CD32b、CD64、CD79、CD22、ICAM-1、FGFR1、FGFR2、HDGF、EphB4、GITR、  
-アミロイド、hMPV、PIV-1、PIV-2、OX40L、IGFBP3、cMet、PD-1、PLGF、ペプロライシン(Neprosylsin)、CTD、IL-18、IL-6、CXCL-13、IL-1R1、IL-15、IL-4R、IgE、PAI-1、NGF、EphA2、uPARt、DLL-4、  
v6、51、I型およびII型インターフェロン受容体、CD19、ICOS、IL-17、因子II、Hsp90、IGF、IGF-I、IGF-II、CD19、GM-CSFR、PIV-3、CMV、IL-13、IL-9、およびEBVから選択される抗原に特異的に結合する。

【0063】

他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、TNFスーパーファミリーのメンバー(受容体またはリガンド)に特異的に結合する。種々の分子としては、腫瘍壊死因子アルファ(「TNFアルファ」)、腫瘍壊死因子ベータ(「TNFベータ」)、リンホトキシンアルファ(「LTアルファ」)、CD30リガンド、CD27リガンド、CD40リガンド、4-1BBリガンド、Apo-1リガンド(FasリガンドもしくはCD95リガンドとも称される)、Apo-2リガンド(TRAILとも称される)、Apo-3リガンド(TWEAKとも称される)、オステオプロテゲリン(OPG)、APRIL、RANKリガンド(TRANCEとも称される)、TALL-1(BlyS、BAFF、もしくはTHANKとも称される)、DR4、DR5(Apo-2、TRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2、もしくはKILLERとも称される)、DR6、DcR1、DcR2、DcR3(TR6もしくはM68とも称される)、CAR1、HVEM(ATARもしくはTR2とも称される)、GITR、ZTNFR-5、NTR-1、TNFL1、CD30、LTBr、4-1BB受容体、およびTR9が挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

別の実施形態において、本開示の操作された抗体は、5T4、ABL、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、ADORA2A、アグレカン(Aggreccan)、AGR2、AICDA、AIFI、AIG1、AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、アロマターゼ、ATX、AX1、AZGP1(亜鉛-a-糖タンパク質)、B7.1、B7.2、B7-H1、BA

10

20

30

40

50

D、BAFF、BAG1、BAI1、BCR、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK  
、BLR1(MDR15)、BIYS、BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)  
、BMP4、BMP6、BMP8、BMPRI A、BMPRI B、BMPRI 2、BPAG  
1(プレクチン)、BRCA1、C19orf10(IL27w)、C3、C4A、C5  
、C5R1、CANT1、CASP1、CASP4、CAV1、CCBP2(D6/JA  
B61)、CCL1(1-309)、CCL11(エオタキシン)、CCL13(MCP  
-4)、CCL15(MIP-Id)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TAR  
C)、CCL18(PARC)、CCL19(MIP-3b)、CCL2(MCP-1)  
、MCAF、CCL20(MIP-3a)、CCL21(MEP-2)、SLC、エキソ  
デュス(exodus)-2、CCL22(MDC/STC-I)、CCL23(MPI  
F-I)、CCL24(MPIF-2/エオタキシン-2)、CCL25(TECK)、  
CCL26(エオタキシン-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、C  
CL3(MIP-Ia)、CCL4(MIP-Ib)、CCL5(RANTES)、CC  
L7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、  
CCNE1、CCNE2、CCR1(CKR1/HM145)、CCR2(mcp-1R  
B/RA)、CCR3(CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5  
/ChemR13)、CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6  
)、CCR7(CKR7/EBI1)、CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L  
1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CC  
R)、CD164、CD19、CD1C、CD20、CD200、CD-22、CD24  
、CD28、CD3、CD33、CD35、CD37、CD38、CD3E、CD3G、  
CD3Z、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45RB、CD52、CD6  
9、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CD8、CD80、CD81、CD  
83、CD86、CD137、CDH1(E-カドヘリン)、CDH10、CDH12、  
CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH5、CDH7、CDH8、C  
DH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、C  
DKN1A(p21Wapl/Cipl)、CDKN1B(p27Kipl)、CDKN  
1C、CDKN2A(p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、  
CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、キチナーゼ、CHST10、CKLFSF  
2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF  
7、CKLFSF8、CLDN3、CLDN7(クラウジン(claudin)-7)、  
CLN3、CLU(クラステリン)、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CNR  
1、COL18A1、COL1A1、COL4A3、COL6A1、CR2、Cript  
o、CRP、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF  
)、CTLA4、CTL8、CTNNB1(b-カテニン)、CTSB(カテプシンB)  
、CX3CL1(SCYD1)、CX3CR1(V28)、CXCL1(GRO1)、C  
XCL10(IP-IO)、CXCL11(I-TAC/IP-9)、CXCL12(S  
DF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2(GRO2)、CX  
CL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)  
、CXCL9(MIG)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR4、CXC  
R6(TYMSTR/STRL33/ボンゾ(Bonzo))、CYB5、CYC1、C  
YSLTR1、DAB2IP、DES、DKFZp451J0118、DNCL1、DP  
P4、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF  
、EGFR、ELAC2、ENG、ENO1、ENO2、ENO3、EPHA1、EPH  
A2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EPHA6、EPHA7、EPHA8、E  
PHA9、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB  
5、EPHB6、EHRIN-A1、EHRIN-A2、EHRIN-A3、EP  
HRIN-A4、EHRIN-A5、EHRIN-A6、EHRIN-B1、EP  
HRIN-B2、EHRIN-B3、EPHB4、EPG、ERBB2(Her-2)  
、EREG、ERK8、エストロゲン受容体、ESR1、ESR2、F3(TF)、FA

10

20

30

40

50

DD、ファルネシルトランスフェラーゼ、FasL、FASNf、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1(aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2(bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF8、FGF9、FGFR3、FIGF(VEGFD)、FILL1(EPSILON)、FBL1(ZETA)、FLJ12584、FLJ25530、FLRT1(フィブロネクチン)、FLT1、FLT-3、FOS、FOSL1(FRA-I)、FY(DARC)、GABRP(GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GD2、GDF5、GFIL、GGT1、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2(CCR10)、GPR31、GPR44、GPR81(FKSG80)、GRCC10(C10)、GRP、GSN(ゲルゾリン)、GSTP1、HAVCR2、HDAC、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ヘッジホッグ、HGF、HIF1A、HIP1、ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HSP90、HUMCYT2A、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNガンマ、IFNW1、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、DL-I、IL10、IL10RA、IL10RB、IL-1、IL1R1(CD121a)、IL1R2(CD121b)、IL-1RA、IL-2、IL2RA(CD25)、IL2RB(CD122)、IL2RG(CD132)、IL-4、IL-4R(CD123)、IL-5、IL5RA(CD125)、IL3RB(CD131)、IL-6、IL6RA(CD126)、IR6RB(CD130)、IL-7、IL7RA(CD127)、IL-8、CXCR1(IL8RA)、CXCR2(IL8RB/CD128)、IL-9、IL9R(CD129)、IL-10、IL10RA(CD210)、IL10RB(CDW210B)、IL-11、IL11RA、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL13RA1、IL13RA2、IL14、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17A、IL17B、IL17C、IL17R、IL18、IL18BP、IL18R1、IL18RAP、IL19、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、DL1F9、IL1HY1、IL1R1、IL1R2、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RL1、IL1RL2、IL1RN、IL2、IL20、IL20RA、IL21R、IL22、IL22R、IL22RA2、IL23、DL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL30、IL3RA、IL4、IL4R、IL6ST(糖タンパク質130)、ILK、INHBA、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、IRAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6(6インテグリン)、ITGAV、ITGB3、ITGB4(4インテグリン)、JAG1、JAK1、JAK3、JTB、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KITLG、KLF5(GCボックスBP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19(ケラチン19)、KRT2A、KRTHB6(毛特異的II型ケラチン)、LAMA5、LEP(レプチン)、Lingo-p75、Lingo-Troy、LPS、LTA(TNF-b)、LTB、LTB4R(GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACMARCKS、MAGもしくはOmgp、MAP2K7(c-Jun)、MCP-1、MDK、MIB1、ミドカイン(midkine)、MIF、MISRII、MJP-2、MK、MKI67(Ki-67)、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3(メタロチオネクチン-UI)、mTOR、MTSS1、MUC1(ムチン)、MYC、MYD88、NCK2、ニューロカン(neurocan)、NFKB1、NFKB2、NGFB(NGF)、NGFR、NgR-Li

10

20

30

40

50

ngo、NgR - Nogo66 (ノゴ (Nogo))、NgR - p75、NgR - Tro  
y、NME1 (NM23A)、NOTCH、NOTCH1、NOX5、NPPB、NRO  
B1、NR0B2、NR1D1、NR1D2、NR1H2、NR1H3、NR1H4、N  
R1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1  
、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4  
A3、NR5A1、NR5A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NT5E、NTN4  
、ODZ1、OPRD1、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PC  
A3、PCDGF、PCNA、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、  
PECAM1、peg - アスパラギナーゼ、PF4 (CXCL4)、PGF、PGR、ホ  
スファカン (phosphacan)、PIAS2、PI3キナーゼ、PIK3CG、P  
LAU (uPA)、PLG、PLXDC1、PKC、PKCベータ、PPBP (CXCL  
7)、PPID、PRL、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、P  
SAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、RAC  
2 (P21Rac2)、RANK、RANKリガンド、RARB、RGS1、RGS13  
、RGS3、RNFILO (ZNF144)、Ron、ROBO2、RXR、S100A  
2、SCGB 1D2 (リポフィリンB)、SCGB2A1 (マンマグロビン2)、SC  
GB2A2 (マンマグロビン1)、SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン)、SDF  
2、SERPENA1、SERPINA3、SERPINB5 (マスピン (maspin  
))、SERPINE1 (PAI-I)、SERPINF1、SHIP-1、SHIP-  
2、SHB1、SHB2、SHBG、SfcaZ、SLC2A2、SLC33A1、SL  
C43A1、SLIT2、SPP1、SPRRLB (Spr1)、ST6GAL1、ST  
ABL、STAT6、STEAP、STEAP2、TB4R2、TBX21、TCP10  
、  
TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3  
、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、THBS1 (ト  
ロンボスポンジン - 1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、  
TIMP3、組織因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR  
6、TLR7、TLR8、TLR9、TNF、TNF-a、TNFAIP2 (B94)、  
TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFR  
SF21、TNFRSF5、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSF  
8、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANSE)  
、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、  
TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、TN  
FSF4 (OX40リガンド)、TNFSF5 (CD40リガンド)、TNFSF6 (F  
asL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSF8 (CD30リガンド)、T  
NFSF9 (4-1BBリガンド)、TOLLIP、Toll様受容体、TOP2A (ト  
ポイソメラーゼIIa)、TP53、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、T  
RAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、TRKA、TREM1、  
TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、チロシナーゼ、uPAR、VEGF、  
VEGFB、VEGFC、ベルシカン (versican)、VHL C5、VLA-4  
、Wnt-1、XCL1 (リンホタクチン (lymphotactin))、XCL2 (S  
CM-Ib)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、YY1、およびZFPM2から  
選択される1つ以上の標的に結合することができる。

#### 【0065】

##### Fc領域のさらなる改変

本開示はまた、上記の変異Fc領域のいずれかまたはすべてと組み合わせることができ  
るさらに改変されたFc領域を有する操作された抗体を提供する。Fc領域の変異型 (例  
えば、アミノ酸の置換、挿入、および/または付加、および/または欠失) は、エフェク  
ター機能を増強または軽減させることが公知である (Presta et al., 20  
02, Biochem Soc Trans 30: 487-490、米国特許第5, 6

10

20

30

40

50

24, 821号、同第5, 885, 573号、およびPCT公開第WO00/42072号、同第WO99/58572号、および同第WO04/029207号を参照)。1つの実施形態において、抗体の変異Fc領域は、天然Fcと比較して、同様のレベルのエフェクター機能の誘導を示す。別の実施形態において、変異Fc領域は、天然Fcと比較して、より高いエフェクター機能誘導を示す。別の実施形態において、変異Fc領域は、天然Fcと比較して、より低いエフェクター機能誘導を示す。別の実施形態において、変異Fc領域は、天然Fcと比較して、より高いADCC誘導を示す。別の実施形態において、変異Fc領域は、天然Fcと比較して、より低いADCC誘導を示す。別の実施形態において、変異Fc領域は、天然Fcと比較して、より高いCDC誘導を示す。別の実施形態において、変異Fc領域は、天然Fcと比較して、より低いCDC誘導を示す。変異Fc領域の特定の実施形態は、以下に詳細される。

10

## 【0066】

また、Fc領域のグリコシル化は、エフェクター機能を増加または減少させるために、改変され得ることも公知である(例えば、Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180、Davies et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294、Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740、Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473) 米国特許第6,602,684号、米国特許出願第10/277,370号、米国特許出願第10/113,929号、PCT国際公開第WO00/61739A1号、PCT国際公開第WO01/292246A1号、PCT国際公開第WO02/311140A1号、PCT国際公開第WO02/30954A1号、Potillegent (商標)技術(Biowa, Inc. Princeton, N.J.)、GlycoMAb (商標)グリコシル化操作化技術(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerlandを参照)。

20

## 【0067】

したがって、一実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、アミノ酸残基のグリコシル化の変化を含む。別の実施形態において、アミノ酸残基のグリコシル化の変化は、エフェクター機能の低下をもたらす。別の実施形態において、アミノ酸残基のグリコシル化の変化は、エフェクター機能の増加をもたらす。特定の実施形態において、Fc領域は、軽減されたフコシル化を有する。別の実施形態において、Fc領域は、アフコシル化される(例えば、米国特許出願公開第2005/0226867号を参照)。

30

## 【0068】

最近の研究は、IgG分子上のオリゴ糖へのシアル酸の付加がそれらの抗炎症活性を増強し、それらの細胞傷害性を変化させることを示唆している(Keneko et al., Science 313, 670-673 (2006)、Scallion et al., Mol. Immunol. 2007 Mar; 44(7):1524-34)。したがって、抗体治療薬の有効性は、意図される用途に適している糖形態の選択により最適化され得る。抗体の2つのCH2ドメインの間に介在する2つのオリゴ糖鎖が、Fc領域のその受容体への結合に関与する。前記の研究は、増加したシアリル化を有するIgG分子は、抗炎症特性を有し、減少したシアリル化を有するIgG分子は、増強した免疫刺激特性を有することを示している。したがって、抗体治療薬は、特定の用途のための適当なシアリル化プロファイルを有するよう「特製(tailor-made)」され得る。抗体のシアリル化状態のモジュレーションのための方法が、「Methods And Compositions With Enhanced Therapeutic Activity」と題される国際公開第WO2007/005786号、および「Polypeptides With Enhanced Anti-Inflammatory And Decreased Cytotoxic Properties And Related Methods」と題される国際公開第WO2007/117505号(これらのそれぞれは、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれ

40

50

る)に提示されている。

【0069】

1つの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、改変されたシアリル化プロファイルを含む。1つの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、増加したシアリル化プロファイルを含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%、約150%またはそれ以上のシアリル化の増加を含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上のシアリル化の増加を含む。

10

【0070】

別の実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、減少したシアリル化プロファイルを含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約65%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%、約150%またはそれ以上のシアリル化の減少を含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上のシアリル化の減少を含む。

20

【0071】

また、Fc領域を、タンパク質の半減期を増加させるために改変し得ることも公知である。半減期の増加は、患者に投与する薬物の量の減少および投与の頻度の減少を可能にする。したがって、半減期の増加を伴う本開示の抗体は、FcとFcRn受容体との間の相互作用に参与するものとして特定されたアミノ酸残基を改変(例えば、置換、欠失、または付加)することにより作製され得る(例えば、PCT公開第97/34631号および同第02/060919号を参照されたく、これらのそれぞれは、参照によりその全体が組み込まれる)。加えて、本開示の抗体の半減期は、当技術分野で広く利用されている技術によるPEGまたはアルブミンへの共役により増加され得る。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%、約150%またはそれ以上の半減期の増加を含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上の半減期の増加を含む。

30

【0072】

代替の実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、半減期の減少を含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%、約150%またはそれ以上の半減期の減少を含む。いくつかの実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、基準の未改変Fc領域と比較して、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上の半減期の減少を含む。

40

【0073】

本開示は、比較され得る分子(例えば、天然Fc領域を有することを除いて同一のアミノ酸配列を有するタンパク質)と比較して、Fcリガンド(例えば、Fc受容体、C1q)に対する変化した結合特性を有するFc変異タンパク質を包含する。結合特性の例とし

50

ては、結合特異性、平衡解離定数 ( $K_D$ )、解離率および会合速度 (それぞれ  $k_{off}$  および  $k_{on}$ )、結合親和性、ならびに  $\gamma$  または結合力が挙げられるが、これらに限定されない。概して、低い  $K_D$  を有する結合分子 (例えば、抗体等の Fc 変異タンパク質) は、高い  $K_D$  を有する結合分子よりも好ましい可能性があることが理解される。しかしながら、場合によっては、 $k_{on}$  または  $k_{off}$  の値が、 $K_D$  の値よりも関連し得る。当業者は、どの動力学パラメータが、所定の抗体用途に最も重要であるかを決定することができる。

#### 【0074】

そのリガンドに対する Fc 領域の親和性および結合特性は、Fc - Fc R 相互作用、すなわち、Fc R への Fc 領域の特異的結合を決定するための、当技術分野で既知の多種多様のインビトロ検定法 (生化学的または免疫学的ベースの検定) によって決定されてもよく、それには平衡方法 (例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、または放射免疫測定法 (RIA))、または動力学 (例えば、BIACORE (登録商標) 分析)、ならびに間接結合検定、競合阻害検定、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET)、ゲル電気泳動、およびクロマトグラフィー (例えば、ゲルろ過) 等の他の方法が含まれるが、これらに限定されない。これらのおよび他の方法は、検査されている構成成分の1つ以上に対する標識を利用してよく、および  $\gamma$  または色素生成法、蛍光法、発光法、または同位体法を含むが、それらに限定されない多種多様の検出方法を用いてもよい。結合親和性および動力学の詳細な説明は、Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999) に見出すことができ、それは抗体 - 免疫原相互作用に焦点を合わせている。

#### 【0075】

1つの実施形態において、Fc 変異タンパク質は、同等の分子と比較して、1つ以上の Fc リガンドへの強化された結合を有する。別の実施形態では、Fc 変異タンパク質は、同等の分子の親和性よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍高い、Fc リガンドに対する親和性を有する。特定の実施形態において、Fc 変異タンパク質は、Fc 受容体への増強された結合を有する。別の具体的な実施形態において、Fc 変異タンパク質は、Fc 受容体 Fc RIIIA への増強された結合を有する。さらなる特定の実施形態において、Fc 変異タンパク質は、Fc 受容体 Fc RIIIB への増強された結合を有する。さらに別の特定の実施形態において、Fc 変異タンパク質は、Fc 受容体 Fc Rn への増強された結合を有する。また別の特定の実施形態において、Fc 変異タンパク質は、同等の分子と比較して、C1q への増強された結合を有する。

#### 【0076】

ADCC によって標的細胞の溶解を媒介する任意の特定の Fc 変異タンパク質の能力はアッセイすることができる。ADCC 活性を評価するために、目的の Fc 変異タンパク質は、免疫エフェクター細胞と組み合わせて標的細胞に付加され、免疫エフェクター細胞は、抗原抗体複合体によって活性化され、標的細胞の細胞溶解をもたらす。細胞溶解は、概して、溶解した細胞からの標識 (例えば、放射性基質、蛍光色素、または天然細胞内タンパク質) の放出によって検出される。かかるアッセイのために有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。インビトロ ADCC アッセイの特定の例は、Wisecarver et al., 1985 79: 277-282、Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166: 1351-1361、Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258: 183-191、Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184: 29-38 に

10

20

30

40

50

記載されている。目的のFc変異タンパク質のADCC活性はまた、インビボ、例えば、Clynes et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656に開示されているもの等の動物モデルにおいても評価され得る。

【0077】

1つの実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、増強されたADCC活性を有する。特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子のADCC活性よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍高いADCC活性を有する。別の特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、Fc受容体FcRIIIAへの増強された結合を有し、増強されたADCC活性を有する。他の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、増強されたADCC活性および増加した血清半減期の両方を有する。

10

【0078】

1つの実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、低減したADCC活性を有する。特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子のADCC活性よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍低いADCC活性を有する。別の特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、Fc受容体FcRIIIAへの低減した結合を有し、低減したADCC活性を有する。他の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、低減したADCC活性および増加した血清半減期の両方を有する。

20

【0079】

1つの実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、増強されたCDC活性を有する。特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子のADCC活性よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍高いCDC活性を有する。他の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、増強されたCDC活性および増加した血清半減期の両方を有する。1つの実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、1つ以上のFcリガンドへの低減した結合を有する。別の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子の親和性よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍低い、Fcリガンドに対する親和性を有する。特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、Fc受容体への低減した結合を有する。別の特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、Fc受容体FcRIIIAへの低減した結合を有する。さらなる特定の実施形態において、本明細書に記載されるFc変異体は、同等の分子の親和性よりも少なくとも約5倍低い、Fc受容体FcRIIIAに対する親和性を有し、該Fc変異体は、同等の分子の親和性の約2倍以内である、Fc受容体FcRIIBに対する親和性を有する。さらに別の特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、Fc受容体FcRnへの低減した結合を有する。また別の特定の実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子と比較して、CIqへの低減した結合を有する。

30

40

【0080】

1つの実施形態において、本開示は、Fc変異体を提供し、ここで、Fc領域は、Kabattに記載されるEUインデックスによって付番されたとき、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267

50

、 268、269、279、280、284、292、296、297、298、299  
 、 305、313、316、325、326、327、328、329、330、331  
 、 332、333、334、339、341、343、370、373、378、392  
 、 416、419、421、440、および443から選択される1つ以上の位置で、非  
 天然に生じるアミノ酸残基（上記に開示される置換に加えて、またはそれら以外）をさら  
 に含む。任意に、Fc領域は、当業者に公知のさらなるおよび/または代替的位置に非天  
 然に生じるアミノ酸残基を含み得る（例えば、米国特許第5,624,821号、同第6  
 ,277,375号、同第6,737,056号、同第7,217,797号、米国特許  
 公開第US2007/0135620号、PCT特許公開第WO01/58957、同第  
 WO02/06919、同第WO04/016750、同第WO04/029207、同  
 第WO04/035752、同第WO04/074455、同第WO04/099249  
 、同第WO04/063351、同第WO05/070963、同第WO05/0402  
 17、同第WO05/092925、および同第WO06/020114号を参照されたく、  
 これらのそれぞれは、参照によりその全体が組み込まれる）。

10

## 【0081】

特定の実施形態において、本開示は、Fc変異体を提供し、ここで、Fc領域は、Ka  
 batに記載されるEUインデックスによって付番されたとき、234D、234E、2  
 34N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、2  
 35A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、2  
 35T、235H、235Y、235I、235V、235F、236E、239D、2  
 39E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、2  
 40A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、2  
 43W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、2  
 47V、247G、251F、252Y、254T、255L、256E、256M、2  
 62I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、2  
 64L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、2  
 64E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、2  
 65L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、2  
 67L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、2  
 84M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、2  
 96T、296L、296I、296H、269G、297S、297D、297E、2  
 98H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、2  
 99V、299H、299F、299E、305I、313F、316D、325Q、3  
 25L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、3  
 27G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、3  
 28N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、3  
 29F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、3  
 30Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、3  
 31L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、3  
 31V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、3  
 31T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、3  
 32T、332H、332Y、332A、339T、370E、370N、378D、3  
 92T、396L、416G、419H、421K、440Y、および443Wから選択  
 される少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸残基を含む。任意に、Fc領域は、当業  
 者に公知のさらなるおよび/または代替的な非天然に生じるアミノ酸残基を含み得る（例  
 えば、米国特許第5,624,821号、同第6,277,375号、同第6,737,  
 056号、PCT特許公開第WO01/58957号、第WO02/06919号、第W  
 O04/016750号、第WO04/029207号、第WO04/035752号、  
 および第WO05/040217号を参照）。

20

30

40

## 【0082】

50

特定の実施形態において、本開示は、Fc変異抗体を提供し、ここで、Fc領域は、234、235、および331から選択される1つ以上の位置で、少なくとも1つの改変（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、アミノ酸付加）を含む。1つの実施形態において、非天然に生じるアミノ酸は、234F、235F、235Y、および331Sから選択される。別の特定の実施形態において、本開示は、Fc変異体を提供し、ここで、Fc領域は、239、330、および332から選択される1つ以上の位置で、少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。1つの実施形態において、非天然に生じるアミノ酸は、239D、330L、および332Eから選択される群から選択される。

#### 【0083】

特定の実施形態において、本開示は、Fc変異抗体を提供し、ここで、Fc領域は、252、254、および256から選択される1つ以上の位置で、少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。1つの実施形態において、非天然に生じるアミノ酸は、Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem., 281, 23514-23524 (2006)、および米国特許第7,083,784号（これらの両方は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、252Y、254T、および256Eから選択される群（「YTE修飾」とも称される）から選択される。

#### 【0084】

##### 抗体を産生する方法

本開示の操作された抗体は、抗体の合成のために当技術分野で既知のいずれかの方法により、特に、化学合成、または好ましくは、組換え発現技術により産生され得る。

#### 【0085】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当技術分野で既知の多種多様の技術を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で既知であり、例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. 1988)、Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)（該参照は、参照によりそれらの全体が組み込まれる）に教示されているものを含むハイブリドーマ技術を用いて産生され得る。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術により産生された抗体には限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核性、原核性、またはファージクローンを含む単クローンに由来する抗体を指し、それが産生された方法によらない。

#### 【0086】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生し、それに関してスクリーニングするための方法は、常套的なものであり、当技術分野で公知である。簡潔に言えば、マウスを標的抗原（完全長タンパク質またはそのドメイン、例えば、細胞外ドメインまたはリガンド結合性ドメイン）で免疫化することが可能であり、免疫応答が検出される、例えば、該標的抗原に特異的な抗体が該マウス血清中で検出されると、該マウス脾臓を採取し、脾細胞を単離する。次いで、該脾細胞を、公知の技術により、任意の適当な骨髓腫細胞、例えば、ATCCから入手可能な細胞系SP20からの細胞に融合させる。ハイブリドーマを選択し、限界希釈によりクローン化する。次いで、ハイブリドーマクローンを、本開示のポリペプチドに結合可能な抗体を分泌する細胞に関して、当技術分野で公知の方法によってアッセイする。高レベルの抗体を一般に含有する腹水は、陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫化することにより生成することができる。

#### 【0087】

したがって、モノクローナル抗体は、本開示の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することによって生成することができ、好ましくは、該ハイブリドーマは、標的抗原で

10

20

30

40

50

免疫化されたマウスから単離された脾細胞を骨髓腫細胞と融合させ、次いで、特異的標的抗原に結合可能な抗体を分泌するハイブリドマクロンに関して、該融合から生じたハイブリドマをスクリーニングすることにより生成される。

【0088】

特異的標的抗原エピトープを認識する抗体フラグメントは、当業者に公知のいずれかの技術により生成され得る。例えば、本開示のFabおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントは、(Fabフラグメントを産生するための)パインまたは(F(ab)<sub>2</sub>フラグメントを産生するための)ペプシン等の酵素を用いて、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により産生され得る。F(ab)<sub>2</sub>フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含有する。さらに、本開示の抗体はまた、当技術分野で公知の種々のファージディスプレイ法を用いて生成することもできる。

10

【0089】

ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上に提示される。特に、VHおよびVLドメインをコードするDNA配列を、動物cDNAライブラリー(例えば、リンパ組織のヒトまたはマウスcDNAライブラリー)から増幅させる。VHおよびVLドメインをコードするDNAを、scFvリンカーと共にPCRにより組換え、ファジミドベクター(例えば、pCANTAB 6またはpComb 3 HSS)内にクローン化する。ベクターは、大腸菌中でエレクトロポレーションされ、大腸菌は、ヘルパーファージに感染させる。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、fdおよびM13を含む繊維状ファージであり、VHおよびVLドメインは、通常、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIのいずれかに組換え的に融合させる。目的のエピトープに結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原、例えば、標識抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を用いて、選択または特定され得る。本開示の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の例には、Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50、Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177、Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958、Persic et al., 1997, Gene 187:9、Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280、国際出願第PCT/GB91/01134号、国際公開第WO90/02809号、同第WO91/10737号、同第WO92/01047号、同第WO92/18619号、同第WO93/11236号、同第WO95/15982号、同第WO95/20401号、および同第WO97/13844、ならびに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516,637号、同第5,780,225号、同第5,658,727号、同第5,733,743号、および同第5,969,108号(これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されているものが含まれる。

20

30

40

【0090】

上の参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体コード領域を、単離し、それを使用して、ヒト抗体を含む全抗体、または他の任意の所望の抗原結合フラグメントを生成することができ、例えば、下記のように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む任意の所望の宿主内で発現することができる。また、Fab、Fab<sub>2</sub>、およびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントを組換え的に産生するための技術は、国際公開第WO92/22324号、Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12:864、Sawai et al., 1995, AJRI 34:26、およびBetter et al., 1988, Science 240:1041(該参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる)等が開示され

50

るもの等の当技術分野で公知の方法を用いて利用することができる。

【0091】

全抗体を生成するために、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するためのフランキング配列を含むPCRプライマーを使用して、scFvクローン中のVHまたはVL配列を増幅することができる。当業者に既知のクローン化技術を利用して、PCR増幅VHドメインは、VH定常ドメイン、例えば、ヒトガンマ4定常領域を発現するベクターへとクローン化することができ、PCR増幅VLドメインは、VL定常領域、例えば、ヒトカッパまたはラムダ定常領域を発現するベクターへとクローン化することができる。好ましくは、該VHまたはVLドメインを発現するためのベクターは、EF-1プロモーター、分泌シグナル、可変ドメイン、定常ドメインのためのクローニング部位、およびネオマイシン等の選択マーカーを含む。また、VHおよびVLドメインは、必要な定常領域を発現する1つのベクターへとクローン化されてもよい。次いで、重鎖転換ベクターおよび軽鎖転換ベクターは、当業者に既知の技術を用いて、細胞株にコトランスフェクトされて、完全長抗体、例えば、IgGを発現する安定または一過性細胞株を生成する。

10

【0092】

ヒトにおける抗体のインビボでの使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途には、ヒトまたはキメラ抗体を使用するのが好ましい場合がある。ヒト対象の治療には完全ヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いる上記のファージディスプレイ法を含む当技術分野で既知の種々の方法により作製され得る。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号、ならびに国際公開第WO98/46645号、同第WO98/50433号、同第WO98/24893号、同第WO98/16654号、同第WO96/34096号、同第WO96/33735号、および同第WO91/10741号も参照されたく、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0093】

また、ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を、ランダムに、または相同組換えにより、マウス胚幹細胞内に導入することが可能である。代替的に、該ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域を、マウス胚幹細胞内に導入することが可能である。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別にまたは該導入と同時に、非機能性にされ得る。特に、J<sub>H</sub>領域のホモ接合欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変した胚幹細胞を拡大し、胚盤胞内にマイクロインジェクションして、キメラマウスを産出する。次いで、キメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現するホモ接合子孫を生じる。該トランスジェニックマウスを、常法により、選択された抗原、例えば、本開示のポリペプチドのすべてまたはその一部で免疫化する。従来ハイブリドーマ技術を用いて、該免疫化トランスジェニックマウスから該抗原に対するモノクローナル抗体を得ることが可能である。トランスジェニックマウスに保有されるヒト免疫グロブリン遺伝子は、B細胞分化中で再構成され、続いて、クラススイッチおよび体細胞変異を受ける。したがって、このような技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgA、IgM、およびIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するための本技術の概説については、Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93)を参照のこと。ヒト抗体およびモノクローナル抗体を産生するための本技術、ならびにかかる抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば、国際公開第WO98/24893号、同第WO96/34096号、および同第WO96/33735号、ならびに米国特許第5,413,923号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,569,825号、同第5,661,016号、同第5,545,806号、同第5,814,318号、および同第5,939,5

30

40

50

98号を参照されたく、これらは、参照によりそれら全体が組み込まれる。加えて、Medarex (Princeton, NJ) 等の企業が、前記と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに関与し得る。

#### 【0094】

キメラ抗体は、異なる抗体の部分が、非ヒト抗体およびヒト免疫グロブリン定常領域由来の可変領域を有する抗体等の異なる免疫グロブリン分子由来の分子である。キメラ抗体を産生するための方法は、当技術分野で既知である。例えば、Morrisson, 1985, Science 229:1202、Oiet al., 1986, BioTechniques 4:214、Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202、ならびに米国特許第6,311,415号、同第5,807,715号、同第4,816,567号、および同第4,816,397号を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。非ヒト種由来の1つ以上のCDRおよびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を含むキメラ抗体は、例えば、CDRグラフティング(欧州特許第EP239,400号、国際公開第WO91/09967号、ならびに米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号)、ベニアリング(veneerling)またはリサーフェシング(resurfacing)(欧州特許第EP592,106号、同第EP519,596号、Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498、Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805、およびRoguska et al., 1994, PNAS 91:969)、ならびにチェーンシャuffling(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)を含む、当技術分野で既知の種々の技術を用いて産生することができる。

#### 【0095】

しばしば、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換して、抗原結合を変化させる、好ましくは改善するであろう。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための該CDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を特定するための配列比較により特定される(例えば、米国特許第5,585,089号、およびRiechmann et al., 1988, Nature 332:323を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0096】

ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域と、非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRとを含む、所定の抗原に結合可能な抗体またはその変異体またはそのフラグメントである。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)に対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には、2つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。好ましくは、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的には、ヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。通常、該抗体は、軽鎖、および重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。該抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域も含み得る。該ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEを含む免疫グロブリン、ならびにIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、およびIgG<sub>4</sub>を含むいずれかのアイソタイプのいかなるクラスから選択され得る。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞傷害性活性を示す望ましい場合には、補体結合定常ドメインであり、該クラスは、典型的には、IgG<sub>1</sub>である。このような細胞傷害性活性が望ましくない場合には、定常ドメインは、IgG<sub>2</sub>クラスのものであり得る。ヒト化抗体は、1を超えるクラスまたはアイソタイプからの配列を含むことが可能であり、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択する

10

20

30

40

50

ことは当技術分野の通常の技量の範囲内である。ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は、親配列、例えば、ドナーCDRに厳密に対応する必要はなく、あるいは、コンセンサフレームワークが少なくとも1つの残基の置換、挿入、または欠失により突然変異誘発されて、その部位のCDRまたはフレームワーク残基がコンセンサあるいは移入抗体のいずれかに対応しないようにされることが可能である。しかしながら、このような変異は、広範なものではないであろう。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、より頻繁には90%、さらには95%を超える親フレームワーク領域(FR)およびCDR配列のものに対応するであろう。

【0097】

ヒト化抗体は、CDRグラフィティング(欧州特許第EP239,400号、国際公開第WO91/09967号、および米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号)、ベニアリングまたはリサーフェシング(欧州特許第EP592,106号、同第EP519,596号、Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498、Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814、およびRoguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973)、チェーンシャフリング(米国特許第5,565,332号)、ならびに例えば、米国特許第6,407,213号、同第5,766,886号、同第5,585,089号、国際公開第WO9317105号、Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25、Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60、Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79、Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84、Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904、Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55(23 Supp):5973s-5977s、Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22、Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10、Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73、Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525、Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323、およびPresta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596が含まれるが、これらに限定されない、当技術分野で公知の種々の技術を用いて産生され得る。しばしば、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは改善するためにCDRドナー抗体由来の対応する残基で置換されるであろう。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための該CDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を特定するための配列比較により特定される(例えば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号およびRiechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0098】

さらに、本開示の抗体は、同様に、当業者に公知の技術を用いて、抗イディオタイプ抗体を生成するために利用され得る(例えば、Greenspan & Bona, 1989, *FASEB J.* 7:437-444、およびNissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147:2429-2438を参照)。本開示は、本開示の抗体またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの使用を利用する方法を提供する。

【0099】

さらに、種々の刊行物は、FcRn結合ポリペプチドを分子内に導入することによって(国際公開第WO97/43316号、米国特許第5,869,046号、米国特許第5

10

20

30

40

50

、747,035号、国際公開第WO96/32478号、国際公開第WO91/14438号)、あるいはFcRn結合親和性は維持されているが、他のFc受容体に対する親和性は著しく低下している抗体と分子とを融合させることによって(国際公開第WO99/43713号)、あるいは抗体のFcRn結合ドメインと融合させることによって(国際公開第WO00/09560号、米国特許第4,703,039号)のいずれかで、半減期が修飾される生理的に活性な分子を得るための方法を記載している。生理的に活性な分子の半減期を増加させるための具体的な技術および方法は、2006年8月1日に付与された「Antibodies with Increased Half-lives」と題される米国特許第7,083,784号に見出され得、これは、すべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。特に、本開示の抗体は、アミノ酸残基変異(KabatにおけるEUインデックスにより付番される): M252Y/S254T/T256EまたはH433K/N434F/Y436Hを含むFc領域を含むと企図される。

10

#### 【0100】

##### 抗体をコードするポリヌクレオチド

当技術分野で公知のいずれかの方法により、該ポリヌクレオチドは入手することができ、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が判定され得る。抗体のアミノ酸配列は既知であるため、これらの抗体をコードするヌクレオチド配列は、当技術分野で公知の方法を用いて判定することができ、すなわち、特定のアミノ酸をコードすることが知られているヌクレオチドコドン、本開示の抗体またはそのフラグメントをコードする核酸を生成するような方法で組み立てられる。抗体をコードするこのようなポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから組み立てられてもよく(例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載される)、簡潔に言えば、抗体をコードする配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニールおよび連結、次いで、連結されたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を含む。

20

#### 【0101】

代替的に、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供与源に由来する核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが利用可能でないが、抗体分子の配列が知られている場合、免疫グロブリンをコードする核酸を化学的に合成し、または適切な供与源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または該抗体を発現する任意の組織もしくは細胞から生成されたcDNAライブラリー、またはそのような組織もしくは細胞から単離された核酸、好ましくはポリA+RNA)から得ることが可能であり、これは、該配列の3'および5'末端とハイブリッド形成可能な合成プライマーを用いるPCR増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いるクローン化によって行うことが可能であり、それにより、例えば、該抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを特定することが可能である。次いで、PCRによって生成された増幅された核酸を、当技術分野で公知のいずれかの方法を用いて、複製可能なクローン化ベクターへとクローン化することが可能である。

30

#### 【0102】

一旦抗体のヌクレオチド配列が決定されると、ヌクレオチド配列の操作のための当技術分野で公知の方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCR等を用いて(例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、およびAusubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載される技術を参照されたく、これらは共に、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)、抗体のヌクレオチド配列を操作して、異なるアミノ酸配列を有する抗体を得、そのようにして、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/もしくは挿入を行うことが可能である。

40

50

## 【0103】

特定の実施形態において、通常の組換えDNA技術を用いて、該CDRの1つ以上をフレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は、天然に生じるまたはコンセンサスフレームワーク領域であることが可能であり、好ましくは、ヒトフレームワーク領域である（例えば、ヒトフレームワーク領域の一覧については、Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479を参照）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせにより生成されたポリヌクレオチドは、EphA2またはEphA4に特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に論じられるように、1つ以上のアミノ酸置換は、該フレームワーク領域内に施され得、好ましくは、アミノ酸置換が抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法を使用して、鎖内ジスルフィド結合に關与する1つ以上の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を施して、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体を生成することが可能である。該ポリヌクレオチドに対する他の変化は、本開示に包含され、当技術分野の技量の範囲内である。

10

## 【0104】

抗体の組換え発現

本開示の抗体、その誘導體、類似体、またはフラグメントの組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を要する。一旦本開示の抗体、または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはその一部をコードするポリヌクレオチドが得られると、当技術分野で公知の方法を用いる組換えDNA技術により、抗体の産生のためのベクターを産生することが可能である。したがって、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含有するポリヌクレオチドを発現させることによるタンパク質を調製するための方法が、本明細書に記載されている。当業者に周知である方法を用いて、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳調節シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが含まれる。

20

## 【0105】

したがって、本開示は、プロモーターに機能的に連結された、本開示の抗体、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメインもしくはその一部、あるいは重鎖もしくは軽鎖CDRをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、該抗体の定常ドメインをコードするヌクレオチド配列を含み得（例えば、国際公開第WO86/05807号および同第WO89/01036号、ならびに米国特許第5,122,464号を参照）、該抗体の可変ドメインは、全重鎖、全軽鎖、または全重鎖もしくは全軽鎖の両方の発現のために、このようなベクター内にクローン化され得る。

30

## 【0106】

発現ベクターを、従来技術によって、宿主細胞に移し、次いで、トランスフェクト細胞を、従来技術により培養して、本開示の抗体を産生する。したがって、本開示は、異種プロモーターに機能的に連結された、本開示の抗体もしくはそのフラグメント、またはその重鎖もしくは軽鎖、またはそれらの一部、または本開示の1本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。2本鎖抗体の発現のためのある実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、下に詳述する通り、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中で共発現させてもよい。

40

## 【0107】

本開示の抗体を発現させるために、種々の宿主発現ベクター系が利用され得る（例えば、米国特許第5,807,715号を参照）。このような宿主発現系は、ビヒクルに相当し、これにより、目的のコード配列が産生され、次いで、精製され得るが、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされた場合に、本開示の抗体を原位置（in situ）で発現し得る細胞にも相当する。これらは、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクター

50

で形質転換された細菌（例えば、大腸菌および *B. subtilis*）等の微生物、抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）、抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV*；タバコモザイクウイルス、*TMV*）に感染した、もしくは組換えプラスミド発現ベクター（例えば、*Ti* プラスミド）で形質転換された植物細胞系、または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター）を含有する組換え発現構築物を保持する哺乳動物細胞系（例えば、*COS*、*CHO*、*BHK*、293、*NS0*、および 3T3 細胞）が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、大腸菌等の細菌細胞、およびより好ましくは、特に全組換え抗体の発現には真核細胞を、組換え抗体の発現のために使用する。

10

## 【0108】

例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（*CHO*）等の哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要前初期遺伝子プロモーターエレメント等のベクターと併せて、抗体のための有効な発現系である（*Foeckling et al.*, 1986, *Gene* 45:101 および *Cockett et al.*, 1990, *BioTechnology* 8:2）。

## 【0109】

細菌系において、いくつかの発現ベクターは、発現させようとする抗体のために意図される使用に応じて、有利に選択され得る。例えば、抗体の医薬組成物の生成のために、大量のかかるタンパク質が産生されるべきである場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を誘導するベクターが望ましい可能性がある。このようなベクターとしては、融合タンパク質が産生されるように、抗体コード配列を個々に *lacZ* コード領域とインフレーションで該ベクターに連結され得る大腸菌発現ベクター *pUR278*（*Rutherford et al.*, 1983, *EMBO* 12:1791）；*pIN* ベクター（*Inouye & Inouye*, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109、*Van Heeke & Schuster*, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509）等が含まれるが、これらに限定されない。また、*PGE X* ベクターを使用して、グルタチオン 5-トランスフェラーゼ（*GST*）との融合タンパク質として、外来ポリペプチドを発現させることが可能である。概して、かかる融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、続いて、遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解した細胞から容易に精製することができる。該 *pGEX* ベクターは、クローン化標的遺伝子産物が *GST* 部分から放出され得るように、*tronbin* または *Xa* 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

20

30

## 【0110】

昆虫系においては、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして、オートグラフィア・カリフォルニカ核多角体病ウイルス（*AcNPV*）が使用される。該ウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞中で成長する。該抗体コード配列は、該ウイルスの非必須領域内に個々にクローン化され、*AcNPV* プロモーターの制御下に配置され得る。

40

## 【0111】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、目的の抗体コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳調節複合体、例えば、後期プロモーターおよび三成分リーダー配列に連結することが可能である。次いで、このキメラ遺伝子は、インピトロまたはインピボ組換えによって、アデノウイルスゲノムに挿入することが可能である。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域 E1 または E3）への挿入は、感染宿主内で生存可能で、かつ抗体を発現することができる組換えウイルスをもたらすであろう（例えば、*Logan & Sh*

50

enk, 1984, PNAS 81:6355-6359を参照)。また、挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のために、具体的な開始シグナルが必要とされ得る。これらのシグナルには、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、挿入物全体の翻訳を保証するために、該開始コドンは、所望のコード配列のリーディングフレームとフェーズが一致していなければならない。これらの外因性翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方で、多種多様の起源由来であってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等の組み込みによって増強され得る(例えば、Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544を参照)。

#### 【0112】

加えて、所望の特定の状態で、挿入された配列の発現を調節する、または該遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のかかる修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)は、該タンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングならびに修飾のための、特徴的および特異的機構を有する。適切な細胞株または宿主系を選択して、発現させた外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確保することができる。この目的のために、遺伝子産物の適切な一次転写、グリコシル化、およびリン酸化のプロセッシングのための細胞機構を有する真核性宿主細胞が使用することが可能である。かかる哺乳動物宿主細胞としては、CHO、VERO、BHK、HeIa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、NS1、およびT47D、NS0(いかなる免疫グロブリン鎖も内因性で産生しないマウス骨髄腫細胞株)、CRL7030、ならびにHsS78Bst細胞が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0113】

1つの実施形態において、本開示の抗体は、米国特許第7,521,541号および米国特許公開第12/399,241号に開示される方法に従って産生され、これらは、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

#### 【0114】

組換えタンパク質の長期的な高収率の産生のためには、安定した発現が好ましい。例えば、抗体を安定に発現する細胞株を、操作することが可能である。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを使用する代わりに、適当な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等)により制御されるDNA、および選択可能なマーカーで宿主細胞を形質転換することが可能である。外来DNAの導入に続いて、操作された細胞は、強化培地中で1~2日間増殖させ、次いで、選択培地に切り替えることが可能である。組換えプラスミド中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、プラスミドをそれらの染色体に安定に統合した細胞が増殖し、かつ増殖巣を形成することを可能にし、次いで細胞は、クローン化され、細胞株に拡大され得る。この方法は、該抗体を発現する細胞株を操作するために有利に用いられ得る。このような操作された細胞株は、抗体と直接的または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評価において特に有用であり得る。

#### 【0115】

多数の選択系を使用することができ、それには、限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、グルタミンシンターゼ、ヒポキサンチン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., 1980, Cell 22:8-17)が含まれるが、これらの遺伝子はそれぞれ、tk-、gs-、hgprt-、またはaprt-細胞において使用され得る。また、以下の遺伝子に関する選択の基礎として、抗代謝産物の耐性を使用することができる:メトトレキセートに対する耐性を付与するdhfr

10

20

30

40

50

(Wigler et al., 1980, PNAS 77:357; O'Hare et al., 1981, PNAS 78:1527)、ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt(Mulligan & Berg, 1981, PNAS 78:2072)、アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo(Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87、Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573、Mulligan, 1993, Science 260:926、およびMorgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191、May, 1993, TIB TECH 11:155-)、ならびにハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro(Santerre et al., 1984, Gene 30:147)。組換えDNA技術の技術分野で一般に公知の方法は、所望の組換えクローンを選択するために通常に適用することが可能であり、かかる方法は、例えば、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993)、Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990)、およびin Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY(1994)、Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1に記載され、これらの参考文献は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0116】

抗体の発現レベルは、ベクター増幅によって増加させることができる(概説については、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)を参照)。抗体を発現するベクター系におけるマーカが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤レベルの増加は、マーカ遺伝子のコピー数を増加させるであろう。増幅領域は、抗体遺伝子と関連しているため、抗体の産生もまた増加するであろう(Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

#### 【0117】

宿主細胞は、本開示の2つの発現ベクターでコトランスフェクトされ得、第1のベクターは、重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2のベクターは、軽鎖由来ポリペプチドをコードする。これらの2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同一の選択可能なマーカを含有し得る。代替的に、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、かつそれらが発現することができる単一のベクターが使用され得る。かかる状況では、軽鎖は、過剰の毒素のない重鎖を回避するために、重鎖の前に配置されるべきである(Proudfoot, 1986, Nature 322:52およびKohler, 1980, PNAS 77:2197)。重鎖および軽鎖に関するコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

#### 【0118】

一旦、本開示の操作された抗体が組換え発現によって産生されると、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、特に、プロテインA後の特異的抗原に対する親和性によって、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準技術によって精製され得る。さらに、本開示の抗体またはそのフラグメントは、精製を促進するために、本明細書に記載される、または当技術分野で既知の異種ポリペプチド配列に融合され得る。

## 【 0 1 1 9 】

## a . 操作された抗体の規模改変可能な産生

多量の本開示の操作された抗体を得るために、これらを、規模改変可能な ( s c a l a b l e ) プロセス (以下、「本開示の規模改変可能なプロセス」と称される) により産生し得る。いくつかの実施形態において、操作された抗体は、該タンパク質の機能活性を維持しながら、分析規模バイオリアクター (例えば、5 L、10 L、15 L、30 L、または50 Lのバイオリアクターに限定されない) において、本開示のタンパク質を産生するために大規模化できる、研究実験室における本開示の規模改変可能なプロセスにより産生することができる。例えば、1つの実施形態において、本開示の規模改変可能なプロセスによって産生されるタンパク質は、H P S E Cまたはr C G Eにより測定されるように、低レベルないし検出不能レベルの凝集、すなわち、5 %以下、4 %以下、3 %以下、2 %以下、1 %以下、0 . 5 %以下 (タンパク質の重量%) の凝集、および/または低レベルないし検出不能レベルの断片化、すなわち、無傷の操作された抗体に相当するピークにおける全ピーク面積の80 %以上、85 %以上、90 %以上、95 %以上、98 %以上もしくは99 %以上もしくは99 . 5 %以上を示す。

10

## 【 0 1 2 0 】

他の実施形態において、該操作された抗体は、産生規模バイオリアクター (例えば、75 L、100 L、150 L、300 L、または500 Lに限定されない) において、本開示のタンパク質を産生するために大規模化できる、研究実験室における本開示の規模改変可能なプロセスにより産生することができる。いくつかの実施形態において、本開示の規模改変可能なプロセスは、研究実験室において行われる産生プロセスと比較して、産生効率をほとんどまたは全く減少させない。他の実施形態において、本開示の規模改変可能なプロセスは、約10 mg / L、約20 mg / L、約30 mg / L、約50 mg / L、約75 mg / L、約100 mg / L、約125 mg / L、約150 mg / L、約175 mg / L、約200 mg / L、約250 mg / L、約300 mg / Lまたはそれ以上の産生効率で操作された抗体を産生する。

20

## 【 0 1 2 1 】

他の実施形態において、本開示の規模改変可能なプロセスは、少なくとも約10 mg / L、少なくとも約20 mg / L、少なくとも約30 mg / L、少なくとも約50 mg / L、少なくとも約75 mg / L、少なくとも約100 mg / L、少なくとも約125 mg / L、少なくとも約150 mg / L、少なくとも約175 mg / L、少なくとも約200 mg / L、少なくとも約250 mg / L、少なくとも約300 mg / Lまたはそれ以上の産生効率で操作された抗体を産生する。

30

## 【 0 1 2 2 】

他の実施形態において、本開示の規模改変可能なプロセスは、約10 mg / L ~ 約300 mg / L、約10 mg / L ~ 約250 mg / L、約10 mg / L ~ 約200 mg / L、約10 mg / L ~ 約175 mg / L、約10 mg / L ~ 約150 mg / L、約10 mg / L ~ 約100 mg / L、約20 mg / L ~ 約300 mg / L、約20 mg / L ~ 約250 mg / L、約20 mg / L ~ 約200 mg / L、約20 mg / L ~ 約175 mg / L、約20 mg / L ~ 約150 mg / L、約20 mg / L ~ 約125 mg / L、約20 mg / L ~ 約100 mg / L、約30 mg / L ~ 約300 mg / L、約30 mg / L ~ 約250 mg / L、約30 mg / L ~ 約200 mg / L、約30 mg / L ~ 約175 mg / L、約30 mg / L ~ 約150 mg / L、約30 mg / L ~ 約125 mg / L、約30 mg / L ~ 約100 mg / L、約50 mg / L ~ 約300 mg / L、約50 mg / L ~ 約250 mg / L、約50 mg / L ~ 約200 mg / L、約50 mg / L ~ 約175 mg / L、約50 mg / L ~ 約150 mg / L、約50 mg / L ~ 約125 mg / L、約50 mg / L ~ 約100 mg / Lの産生効率で操作された抗体を産生する。

40

## 【 0 1 2 3 】

本開示の抗体の安定性を確保するために、適当なアッセイが開発されている。1つの実施形態において、本開示のタンパク質の安定性は、当技術分野における公知技術により特

50

徴づけされる。他の実施形態において、本開示のタンパク質の安定性は、凝集および/または断片化速度またはプロファイルにより評価され得る。凝集または断片化のレベルを決定するためには、多くの技術が用いられ得る。1つの実施形態において、凝集および/または断片化プロファイルは、分析用超遠心法(AUC)、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)、融解温度( $T_m$ )、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)、光散乱(SLS)、フーリエ変換赤外分光法(FTIR)、円偏光二色性(CD)、尿素誘発性タンパク質アンフォールディング技術、内在性トリプトファン蛍光、示差走査熱量測定、または1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸(ANS)タンパク質結合技術の使用により評価され得る。別の実施形態において、本開示のタンパク質の安定性は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)分析により特徴づけされる。別の実施形態において、本開示のタンパク質の安定性はサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)プロファイル分析により特徴づけされる。

10

#### 【0124】

#### 抗体共役体および融合タンパク質

本開示は、Fc領域の使用、操作された抗体の使用を包含し、これらは、異種物質に組換え的に融合されるか、または化学的に共役される(共有結合および非共有結合の両方を含む)。抗体への結合に対して適切な物質としては、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、多糖、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ハプテン、薬物、ホルモン、脂質、脂質アセンブリ、合成高分子、高分子微粒子、生体細胞、ウイルス、蛍光色素分子、発色団、染料、毒素、ハプテン、酵素、抗体、抗体フラグメント、放射性同位体、固体マトリックス、半固体マトリックス、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。抗体に別の物質を共役または共有結合するための方法は、当技術分野に公知である。融合または共役は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して生じ得る。異種物質に融合されるまたは共役される抗体は、当技術分野で周知の方法を用いて障害の進行を検出する、治療する、管理する、またはモニターするために、インビボで使用され得る。例えば、国際公開第WO93/21232号、欧州特許第EP439,095号、Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99、米国特許第5,474,981号、Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432、およびFell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が組み込まれる。いくつかの実施形態において、検出、治療、管理、またはモニターされるべき障害は、自己免疫、炎症性、感染性疾患、または癌に関連する障害である。抗体部分にポリペプチドを融合または共役するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第5,336,603号、同第5,622,929号、同第5,359,046号、同第5,349,053号、同第5,447,851号、および同第5,112,946号、欧州特許第EP307,434号、欧州特許第EP367,166号、国際公開第WO96/04388号、同第WO91/06570号、Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88:10535-10539、Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600、およびVil et al., 1992, PNAS 89:11337-11341を参照(該参照文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる)。

20

30

40

#### 【0125】

さらなる融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エキソシャフリング、および/またはコドンシャフリング(集団的に「DNAシャフリング」と称される)の技術を通じて生成され得る。DNAシャフリングは、本開示の操作された抗体(例えば、より高い親和性およびより低い解離速度を有する抗体)の活性を改変するために、用いられ得る。概して、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号、同第5,830,721号、同第5,834,252号、および同第5,837,458号、およびPatten et al., 1997, Curr. Opinion B

50

iotech nol . 8 : 7 2 4 - 3 3、Harayama , 1 9 9 8 , Trends Biotechnol . 1 6 : 7 6、Hansson , et al . , 1 9 9 9 , J . Mol . Biol . 2 8 7 : 2 6 5、および Lorenzo and Blasco , 1 9 9 8 , BioTechniques 2 4 : 3 0 8 (これらの特許および刊行物のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照。抗体もしくはそのフラグメント、またはコード化抗体もしくはそのフラグメントは、エラーブローンPCRによるランダム突然変異誘発、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法に付すことにより改変され得る。抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドの部分の1つ以上を、1つ以上の異種物質の1つ以上の成分、モチーフ、部分、ドメイン、フラグメント等と再結合させることが可能である。

10

## 【0126】

ある実施形態において、本開示の抗体のFc領域は、固体支持体に共役させる。抗体は、スクリーニングおよび/または精製および/または製造プロセスの一部として固体支持体に共役させることが可能である。代替的に、本開示の抗体は、診断方法または組成物の一部として固体支持体に共役させることが可能である。本開示で用いるのに適している固体支持体は、一般に、液相中で実質的に不溶性である。多くの支持体が利用可能であり、当業者に公知である。したがって、固体支持体には、エアロゲルおよびヒドロゲル、樹脂、ビーズ、バイオチップ(薄膜コーティングしたバイオチップを含む)、マイクロ流体チップ、シリコンチップ、マルチウェルプレート(マイクロタイタープレートまたはマイクロプレートとも称する)、膜、伝導性および非伝導性金属、ガラス(顕微鏡用スライドを含む)、ならびに磁気支持体等の固体および半固体マトリックスが含まれる。固体支持体のさらに具体的な例には、シリカゲル、高分子膜、粒子、誘導体化されたプラスチック薄膜、ガラスビーズ、コットン、プラスチックのビーズ、アルミナゲル、セファロース等の多糖体、ポリ(アクリラート)、ポリスチレン、ポリ(アクリルアミド)、ポリオール、アガロース、寒天、セルロース、デキストラン、デンプン、FICOLL、ヘパリン、グリコーゲン、アミロペクチン、マンナン、イヌリン、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン(ポリ(エチレングリコール)を含む)、ナイロン、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、常磁性ビーズ、超常磁性ビーズ、デンプン等が含まれる。

20

## 【0127】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体を付着させるための固体支持体は、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、チオール、アルデヒド、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミド、尿素、カルボナート、カルバメート、イソシアネート、スルホン、スルホナート、スルホンアミド、スルホキシド等が含まれるが、これらに限定されない、反応官能基を含み得る。

30

## 【0128】

適切な固相支持体は、所望の最終用途および種々の合成プロトコルに対する適合性に基づいて選択することができる。例えば、固体支持体に本開示の抗体を付着させるためにアミド結合形成が望ましい場合、ポリスチレン(例えば、Bachem Inc. , Peninsula Laboratories等から得られるPAM樹脂)、POLYHIP E(商標)樹脂(Aminotech, Canadaから得られる)、ポリアミド樹脂(Peninsula Laboratoriesから得られる)、ポリエチレングリコールでグラフトしたポリスチレン樹脂(TentaGel(商標)、Rapp Polymer, Tubingen, Germany)、ポリジメチル-アクリルアミド樹脂(Milligen/Biosearch, Californiaから入手可能)、またはPEG Aビーズ(Polymer Laboratoriesから得られる)等の、ペプチド合成において一般に有用な樹脂が使用され得る。

40

## 【0129】

1つの実施形態において、本開示の操作された抗体またはそのフラグメントまたは変異体は、精製を促進するために、ペプチド等のマーカー配列に共役させるか、または融合さ

50

せる。ある実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)において提供されるタグ等のヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、これらの多くは、市販されている。Gentz et al., 1989, PNAS 86: 821に記載されるように、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する赤血球凝集素「HA」タグ(Wilson et al., 1984, Cell 37: 767)、および「flag」タグが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0130】

他の実施形態において、本開示の抗体は、診断用または検出可能な薬剤に共役させる、または融合させる。このような抗体は、臨床試験手順の一部として、障害(限定されないが、例えば癌)の発生または進行をモニタリングまたは予後診断する、例えば、特定の療法の有効性を決定する等に有用であり得る。

#### 【0131】

このような診断および検出は、検出可能な物質に該抗体を融合させる、または共役させることにより達成され得、検出可能な物質には、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-カラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ等に限定されない種々の酵素；例えば、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチン等に限定されない補欠分子族；例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリン等に限定されない蛍光物質；例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン等に限定されない生物発光物質等に限定されない発光物質；例えば、ビスマス( $^{213}\text{Bi}$ )、炭素( $^{14}\text{C}$ )、クロム( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ガリウム( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、ゲルマニウム( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{117}\text{In}$ )、ヨウ素( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ )、ランタニウム( $^{140}\text{La}$ )、ルテニウム( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム( $^{103}\text{Pd}$ )、リン( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジウム( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテニウム( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム( $^{47}\text{Sc}$ )、セレンウム( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム( $^3\text{H}$ )、キセノン( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム( $^{90}\text{Y}$ )、亜鉛( $^{65}\text{Zn}$ )等に限定されない放射性物質；種々の陽電子放射断層撮影法を用いる陽電子放出性金属、ならびに非放射性常磁性金属イオンが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0132】

他の実施形態において、本開示の操作された抗体は、治療剤、例えば、細胞毒素、例えば、細胞増殖抑制剤もしくは細胞破壊剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば、アルファ-放射体と共役させられる。細胞毒素または細胞傷害性薬剤には、細胞に有害な任意の薬剤が含まれる。例には、バクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルピシン、およびシクロホスファミド、ならびにそれらの類似体または同族体が含まれる。治療剤としては、抗代謝産物(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデ

10

20

30

40

50

カルバジン) ; アルキル化剤 (例えば、メクロルエタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BCNU)、およびロムスチン (CCNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン) ; アントラサイクリン (例えば、ダウノルピシン (元ダウノマイシン) およびドキシソルピシン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (元アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC)) ; ならびに抗有糸分裂剤 (例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン) が含まれるが、これらに限定されない。化学的毒素はまた、デュオカルマイシン (米国特許第 5, 703, 080号、同第 4, 923, 990号)、メトトレキサート、ドキシソルピシン、メルファラン、クロラムブシル、ARA-C、ビンデシン、マイトマイシンC、シス-プラチナム、エトポシド、ブレオマイシン、および5-フルオロウラシルから選択される群から得ることができる。また、化学療法剤の例としては、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド (Ara-C)、シクロホスファミド、チオテパ、タキソテール (ドセタキセル)、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスベラミシン (米国特許第 4, 675, 187号)、メルファラン、および他の関連した窒素マスタードも含まれる。

10

20

#### 【0133】

1つの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、エネジイン (enediyne)、レキシトロプシン (lexitropsin)、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド (maytansinoid)、およびピンカアルカロイドから選択される。他の実施形態において、細胞傷害性薬剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノ-ドキシソルピシン、リゾキシシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、ドラスタチン-10、エキノマイシン、コンプレタスタチン、カリケアマイシン、メイタンシン、DM-1、アウリスタチン、または他のドラスタチン誘導体、例えば、アウリスタチンEもしくはアウリスタチンF、AEB、AEVB、AEFP、MMAE (モノメチルアウリスタチンE)、エリュテロピン、またはネトロプシンである。当技術分野でドラスタチン-10としても公知である、アウリスタチンE、およびその誘導体の合成および構造はまた、米国特許出願公開第 2003/0083263 A1号および同第 2005/0009751 A1号、国際特許公開第 PCT/US02/13435号、米国特許第 6, 323, 315号、同第 6, 239, 104号、同第 6, 034, 065号、同第 5, 780, 588号、同第 5, 665, 860号、同第 5, 663, 149号、同第 5, 635, 483号、同第 5, 599, 902号、同第 5, 554, 725号、同第 5, 530, 097号、同第 5, 521, 284号、同第 5, 504, 191号、同第 5, 410, 024号、同第 5, 138, 036号、同第 5, 076, 973号、同第 4, 986, 988号、同第 4, 978, 744号、同第 4, 879, 278号、同第 4, 816, 444号、および同第 4, 486, 414号に記載されており、これらのすべては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

#### 【0134】

ある実施形態において、細胞傷害性薬剤は、メイタンシンまたはメイタンシノイド (maytansinoid)、およびその誘導体であり、本開示の抗体 (完全長またはフラグメント) は、1つ以上のメイタンシノイド分子と共役させられる。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することにより作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、初め東アフリカの低木マイテヌスセーラタ (Maytenus serrata) から単離された (米国特許第 3, 896, 111号)。続いて、特定の微生物も、メイタンシノール、およびC-3メイタンシノールエステル等のメイタンシノイドを産生すること

50

が発見された（米国特許第4,151,042号）。合成メイタンシノールおよびその誘導体および類似体は、例えば、米国特許第4,137,230号、同第4,248,870号、同第4,256,746号、同第4,260,608号、同第4,265,814号、同第4,294,757号、同第4,307,016号、同第4,308,268号、同第4,308,269号、同第4,309,428号、同第4,313,946号、同第4,315,929号、同第4,317,821号、同第4,322,348号、同第4,331,598号、同第4,361,650号、同第4,364,866号、同第4,424,219号、同第4,450,254号、同第4,362,663号、および同第4,371,533号に開示されている。

#### 【0135】

メイタンシンまたはメイタンシノイドの治療指数を改善するために、これらを、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と共役させている。メイタンシノイドを含有する免疫共役体およびそれらの治療上の使用は、例えば、米国特許第5,208,020号、同第5,416,064号、および欧州特許第EP0 425 235 B1号に開示されている。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に連結された、DM1と称するメイタンシノイドを含む免疫共役体を説明した。この共役体は、培養大腸癌細胞に対して高い細胞傷害性を示すことが見出され、インビボ腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)には、ヒト大腸癌細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7、またはHER-2/neu癌遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体TA.1にジスルフィドリンカーを介し、メイタンシノイドを共役した免疫共役体が記載されている。インビトロで、1細胞当たり $3 \times 10^5$ のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3について、TA.1-メイタンシノイド共役体の細胞傷害性を試験した。この薬物共役体は、遊離メイタンシノイド薬物に類似する程度の細胞傷害性に達し、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子数を増やすことによって、細胞傷害性を増加させることができた。A7-メイタンシノイド共役体は、マウスにおいて低い全身細胞傷害性を示した。したがって、本開示は、ある癌の治療処置のためのメイタンシノイド剤と共役させる抗体を企図する。

#### 【0136】

他の実施形態において、本開示の抗体コンジュゲートの細胞傷害性薬剤は、抗チューブリン剤である。抗チューブリン剤は、十分に確立された癌療法化合物の一群である。抗チューブリン剤の例としては、タキサン（例えば、Taxol（登録商標）（パクリタキセル）、ドセタキセル）、T67（Tularik）、ビンカス（vincas）、およびアウリスタチン（例えば、アウリスタチンE、AEB、AEVB、MMAE、MMAF、AEFP）が含まれるが、これらに限定されない。この群に含まれる抗チューブリン剤はまた、ピンクリスチンおよびピンブラスチン、ピンデシンおよびピノレルピンを含むピンカアルカロイド；タキサン、例えばパクリタキセルおよびドセタキセルおよびバクカチン（baccatin）誘導体、エピチロンAおよびB、ノコダゾール、5-フルオロウラシルおよびコルセミド、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、メイタンシノイド、コンプレタスタチン、ドラスタチン、ディスコデルモリド、およびエリテロピンである。より特定の実施形態において、細胞傷害性薬剤は、ピンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキサン、バクカチン誘導体、クリプトフィシン、メイタンシノイド、コンプレタスタチン、およびドラスタチンから選択される。より特定の実施形態において、細胞傷害性薬剤は、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ピノレルピン、VP-16、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロンA、エピチロンB、ノコダゾール、コルヒチン（coichicine）、コルセミド、エストラムスチン、セマドチン、ディスコデルモリド、メイタンシン、DM-1、アウリスタチン、または他のドラスタチン誘導体、例えばアウリスタチンEまたはアウリスタチンF、AEB、AEVB、AEFP、MMAE（モノメチルアウリスタチンE）、MMAF（モノメチル

10

20

30

40

50

アウリスタチンF)、エリテロピン、またはネトロプシンである。

【0137】

特定の実施形態において、この薬物は、メイタンシノイドおよび一連の抗チューブリン剤である。さらに特定の実施形態において、この薬物は、メイタンシンである。さらに、特定の実施形態において、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤は、DM-1 (Immuno Gen, Inc., Chari et al. 1992, Cancer Res 52: 127-131も参照)である。天然物であるメイタンシンは、チューブリン重合を阻害して、有糸分裂の遮断および細胞死を招く。したがって、メイタンシンの作用機構は、ピンクリスチンおよびピンプラスチンの作用機構に類似していると思われる。しかしながら、メイタンシンは、これらのピンカルカロイドより約200~1,000倍細胞傷害性である。別の特定の実施形態において、この薬物は、AEFPである。

10

【0138】

いくつかの実施形態において、該抗体は、例えば、アブリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、パトラコトキシン、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、緑膿菌外毒素、緑膿菌内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール、フモニシンB1、フモニシンB2、アルファ毒素、マウロトキシン (maurotoxin)、アジトキシン (agitoxin)、チャリブドトキシン (charybdotoxin)、マルガトキシン (margatoxin)、スロトキシン (slotoxin)、シルラトキシン (scyllatoxin)、ヘフトキシン (hefutoxin)、カルシセプチン (calciseptine)、タイカトキシン (taicatoxin)、カルシクルジン (calcicludeine)、ゲルダナマイシン、ゲロニン、ロタウストラリン、オクラトキシン (ocratoxin) A、パツリン (patulin)、リシン、ストリキニーネ、トリコテセン (trichothecene)、ゼアーレノン (zearenone)、およびテトラドトキシン等があるが、これらに限定されない、他の小分子またはタンパク質毒素に共役または融合され得る。使用することができる酵素的に活性な毒素およびそれらのフラグメントには、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A鎖 (緑膿菌由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォルディイタンパク質、ジアンシタンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質 (PAPI, PAPII, およびPAP-S)、モルディカ・カランチア阻害剤、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、リストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセネスが含まれる。

20

30

【0139】

毒素、スパーサー、リンカー、ストレッチャー (stretcher) 等のさらなる例およびそれらの構造は、米国特許出願公開第2006/0074008 A1号、同第2005/0238649 A1号、同第2005/0123536 A1号、同第2005/0180972 A1号、同第2005/0113308 A1号、同第2004/0157782 A1号、米国特許第6,884,869 B2号、米国特許第5,635,483号に見出され得、これらのすべては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0140】

本明細書に論じられるように、本開示の抗体共役体への共役に使用される化合物には、従来の化学療法剤、例えば、ドキソルビシン、バクリタキセル、カルボプラチン、メルファラン、ピンカルカロイド、メトトレキサート、マイトマイシンC、エトポシド等が含まれ得る。加えて、強力な薬剤、例えば、CC-1065類似体、カリキアマイシン (calichiamycin)、メイタンシン、ドラスタチン10の類似体、リゾキシン、およびパリトキシンを、条件的に安定なリンカーを用いて該抗体に連結して、強力な免疫共役を形成させることが可能である。

【0141】

ある実施形態において、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤は、ドラスタチンである。さ

50

らに特定の実施形態において、ドラスタチンは、アウリスタチンクラスのものである。本開示の特定の実施形態において、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤は、MMAEである。本開示の別の特定の実施形態において、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤は、AEFPである。本開示の別の特定の実施形態において、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤は、MMAFである。

#### 【0142】

他の実施形態において、本開示の抗体は、与えられた生物学的応答を修飾する治療剤または薬物部分に共役される。治療剤または薬物部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、該薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、コレラ毒素またはジフテリア毒素等の毒素；腫瘍壊死因子、インターフェロン、インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス剤、例えばTNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、AIM-1 (国際公開第WO97/33899号を参照)、AIM-2 (国際公開第WO97/34911号を参照)、Fasリガンド (Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6:1567)、およびVEGF (国際公開第WO99/23105号を参照)等のタンパク質、血栓性薬剤または抗血管新生物質、例えばアンジオスタチンもしくはエンドスタチン；あるいは生物応答改変物質、例えばリンホカイン (例えば、インターロイキン1 (「IL-1」)、インターロイキン2 (「IL-2」)、インターロイキン4 (「IL-4」)、インターロイキン6 (「IL-6」)、インターロイキン7 (「IL-7」)、インターロイキン9 (「IL-9」)、インターロイキン15 (「IL-15」)、インターロイキン12 (「IL-12」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、および顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」))、または増殖因子 (例えば、成長ホルモン (「GH」)) が含まれ得る。

#### 【0143】

他の実施形態において、本開示の抗体は、ポリアルギニンまたはポリリシン残基を含むポリペプチドに共役されるか、または融合される。いくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個またはそれ以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、該ポリアルギニンポリペプチドは、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個またはそれ以上のアルギニン残基を含み得る。他の実施形態において、該ポリリシンポリペプチドは、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個またはそれ以上のリシン残基を含み得る。他の実施形態において、該ポリペプチドは、アルギニンおよびリシン残基の任意の組み合わせを含み得る。

#### 【0144】

他の実施形態において、本開示の抗体は、放射性金属イオン (放射性物質の例については前記を参照) を共役するのに有用な放射性物質または大環状キレーター等の治療剤と共役させられる。ある実施形態において、該大環状キレーターは、リンカー分子を介して該抗体に付着させることができる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N''-四酢酸 (DOTA) である。本明細書中で後記においてさらに詳しく説明される、このようなリンカー分子は、当技術分野で一般に公知であり、Denard et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90、Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553、およびZimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50に記載されており、各々は、参照によりその全体が組み込まれる。

#### 【0145】

他の実施形態において、本開示の抗体は、核酸と共役させられる。該核酸は、DNA、RNA、短鎖干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA、ヘアピン、またはペプチド核酸等の核酸模倣体から選択され得る。いくつかの実施形態において、該共役核酸は、少な

10

20

30

40

50

くとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも5000またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態において、該共役核酸は、一本鎖である。代替的な実施形態において、該共役核酸は、二重鎖である。

【0146】

いくつかの実施形態において、該共役核酸は、オープンリーディングフレームをコードしている。いくつかの実施形態において、該共役核酸によりコードされるオープンリーディングフレームは、アポトーシス誘導性タンパク質、ウイルスタンパク質、酵素、または腫瘍抑制タンパク質に相当する。このような核酸を細胞へ運搬するための技術は、Son 10  
g et al. *Nature Biotechnology*, 2005, Vol 23: 6 p 709 - 717、およびまた、米国特許第6,333,396号にも見出され得、これは、参照によりその全体が組み込まれる。

【0147】

治療部分に抗体を共役させるための技術は、公知である。部分は、アルデヒド/シッフ 20  
連結、スルフヒドリル連結、酸不安定性連結、シス-アコニチル連結、ヒドラゾン連結、酵素分解性連結が含まれるが、これらに限定されない、当技術分野で公知の任意の方法により抗体と共役させられる。(一般的には、Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 171 - 216を参照)。治療部分を抗体に共役させるための追加的技術は、公知である。例えば、Arnon et al., "Monoclonal 20  
Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug 30  
Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2<sup>nd</sup> Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer 30  
Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985)、およびThorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119 - 58を参照。抗体をポリペプチド部分に融合または共役させるための方法は、当技術分野で公知である。例えば、米国特 40  
許第5,336,603号、同第5,622,929号、同第5,359,046号、同第5,349,053号、同第5,447,851号、および同第5,112,946号、欧州特許第EP307,434号、欧州特許第EP367,166号、国際公開第WO96/04388号、同第WO91/06570号、Ashkenazi et al., 1991, *PNAS* 88: 10535 - 10539、Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154: 5590 - 5600、およびVil et al., 1992, *PNAS* 89: 11337 - 11341を参照。このような部分への抗体の融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して生じ得る。この 50  
ようなリンカー分子は、当技術分野で一般に公知であり、Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.* 4: 2483 - 90、Peterson

et al., 1999, Bioconj. Chem. 10:553、Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50、Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216に記載されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0148】

本開示の抗体共役体により標的化される細胞の外部における薬物活性を最小にするために、2つの例示的なアプローチが考慮され得る。第1に、プロドラッグ変換酵素の作用により産生された薬物を含む薬物が活性化リンパ球等の細胞の細胞表面に集中するように、細胞膜受容体には結合するが可溶性受容体には結合しない抗体が使用され得、第2に、該薬物が加水分解または該抗体から切断されない限り、その活性が低下する様式で該薬物を共役することである。このような方法は、活性化リンパ球の細胞表面における環境（例えば、活性化リンパ球の細胞表面に存在するプロテアーゼの活性）または共役が活性化リンパ球により取り込まれた場合に該共役が遭遇する活性化リンパ球の内部の環境（例えば、エンドソーム内、またはリソソーム環境中、例えばpH感受性もしくはプロテアーゼ感受性により）に対して感受性であるリンカーで該薬物を該抗体に付着させることを用いるものである。本開示において使用することができるリンカーの例は、米国特許出願公開第2005/0123536 A1号、同第2005/0180972 A1号、同第2005/0113308 A1号、同第2004/0157782 A1号、および米国特許第6,884,869 B2号に開示されており、これらのすべては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0149】

1つの実施形態において、該リンカーは、リソソーム中で加水分解される酸不安定性ヒドラゾンまたはヒドラジド基である（例えば、米国特許第5,622,929号を参照）。代替的な実施形態において、薬物は、他の酸不安定性リンカー、例えばシス-アコニット酸アミド、オルトエステル、アセタール、およびケタール等を介して抗体と共役させられ得る（Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123、Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661）。このようなリンカーは、中性pH条件下、例えば、血中の条件下では比較的安定であるが、リソソームのおおよそのpHであるpH5より下では不安定である。

#### 【0150】

他の実施形態において、薬物は、細胞内プロテアーゼにより切断されるペプチドスペーサーを用いて、本開示の抗体に付着させる。標的酵素には、カテプシンBおよびDならびにプラスミンが含まれ、これらのすべては、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞の内部で活性薬物の放出をもたらすことが知られている（Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123）。細胞内タンパク質分解薬物放出を用いる利点は、該薬物が、共役されている場合には非常に弱められ、該共役体の血清安定性が非常に高くなり得ることである。

#### 【0151】

さらに他の実施形態において、該リンカーは、マロナートリンカー（Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lau et al., 1995, Bioorg. Med. Chem. 3(10):1299-1304）、または3-N-アミド類似体（Lau et al., 1995, Bioorg. Med. Chem. 3(10):1305-12）である。

#### 【0152】

マレイミド基およびスペーサー（ポリエチレングリコール（PEG）等）を利用する連結化学は、システイン、リシン、セレノシステイン、およびセレノメチオニン置換に適している。ヒスチジン置換に関しては、共役のために、金属（銅、亜鉛、鉄、ニッケル等）

を伴うスパーサーを使用し得る。チロシンに関しては、糖または他のヒドロキシル化合物に存在する官能基と共役させられ得る。これらのおよび他の適した共役技術の詳細は、当業者には公知であり、例えば、Bioconjugate Techniques, 2nd ed., by Greg T. Hermanson, Academic Press (2008)に見出され得る。

【0153】

上で論じられるように、抗体共役体は、一般に、リンカーを介して化合物または薬物を抗体に共役させることによって作製される。当技術分野で公知の任意のリンカーは、本開示の共役体、例えば、二官能性薬剤（ジアルデヒドまたはイミドエステル等）または分枝ヒドラゾンリンカー（例えば、米国特許第5,824,805号を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に組み入れる）が使用され得る。

10

【0154】

本開示のある非限定的な実施形態において、共役部分と抗体部分との間のリンカー領域は、ある条件下で切断可能であり、この場合、リンカーの切断または加水分解は、抗体部分からの薬物部分を放出する。いくつかの実施形態において、該リンカーは、細胞内条件下で、切断または加水分解に感受性がある。

【0155】

1つの実施形態において、共役部分と抗体部分との間のリンカー領域は、pHがある値で変化するか、ある値を超える場合、切断可能である。本開示の別の実施形態において、該リンカーは、リソソームの環境中、例えば、酸性条件下（すなわち、約5～5.5またはそれ未満のpH）で切断可能である。他の実施形態において、該リンカーは、リソソームプロテアーゼ酵素、膜結合プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼ、またはエンドソームプロテアーゼが含まれるが、これらに限定されない、ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素により切断されるペプチジルリンカーである。典型的には、該リンカーは、少なくとも2アミノ酸長、より典型的には、少なくとも3アミノ酸長である。例えば、癌組織において高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼであるカテプシンBにより切断可能なペプチジルリンカー（例えば、Gly-Phe-Leu-Glyリンカー）が使用され得る。他のこのようなリンカーは、例えば、米国特許第6,214,345号に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0156】

本開示の他の非相互的排他的な実施形態において、本開示の抗体共役体の抗体および化合物が共役されているリンカーは、細胞内在化（cellular internalization）を促進する。ある実施形態において、該リンカー-薬物部分は、細胞内在化を促進する。ある実施形態において、該リンカーは、抗体共役体全体の構造が細胞内在化を促進するように、選択される。1つの実施形態において、該リンカーは、チオエーテルリンカーである（例えば、Willnerらの米国特許第5,622,929号を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。別の実施形態において、該リンカーは、ヒドラゾンリンカーである（例えばGreenfieldらの米国特許第5,122,368号およびKingらの同第5,824,805号を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。

30

40

【0157】

なお他の実施形態において、該リンカーは、ジスルフィドリンカーである。種々のジスルフィドリンカーが当技術分野で公知であり、それらには、SATA（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセター）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオナート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）ブチラート）、およびSMPT（N-スクシンイミジル-オキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-（2-ピリジル-ジチオ）トルエン）、SPDBおよびSMPT（例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res., 47:5924-5931, Wawrzynczak et al., 1987, In Immunconjugates: Antibody Conjugates in R

50

radioimager y and Therapy of Cancer, ed. C. W. Vogel, Oxford U. Press, pp. 28 - 55を参照; また、Thorpeらの米国特許第4,880,935号も参照されたく、これは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)を用いて形成され得るものが含まれるが、これらに限定されない。

【0158】

本開示の組成物および方法と共に使用され得る種々のリンカーが、米国特許出願公開第US2004/0018194 A1号に記載されており、これは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0159】

本開示のなお他の実施形態において、抗体共役体のリンカー単位は、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤(薬物単位; -D)と抗体単位(-A)とを共役させる。ある実施形態において、該リンカー単位は、以下の一般式を有する:

i. -Ta-Ww-Yy-、ここで

ii. -T-は、伸長単位であり、

iii. aは、0または1であり、

iv. 各-W-は独立して、アミノ酸単位であり、

v. wは独立して、2~12の範囲の整数であり、

vi. -Y-は、スペーサー単位であり、

vii. yは、0、1、または2である。

【0160】

伸長単位(-T-)は、存在する場合には、該抗体単位をアミノ酸単位(-W-)に連結する。天然であるいは化学的操作のいずれかにより抗体上に存在し得る有用な官能基としては、スルフヒドリル、アミノ、ヒドロキシル、炭水化物のアノマー性ヒドロキシル基、およびカルボキシルが含まれるが、これらに限定されない。システインが導入されている本開示の操作された抗体は、共役のために少なくとも1つのスルフヒドリル基に存在する。スルフヒドリル基を導入する他の方法には、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元が含まれる。代替的に、スルフヒドリル基は、抗体のリシン部分のアミノ基と、2-イミノチオラン(トラウト試薬)または他のスルフヒドリル生成試薬との反応により生成され得る。

【0161】

アミノ酸単位(-W-)は、スペーサー単位が存在する場合には、伸長単位(-T-)をスペーサー単位(-Y-)に連結し、スペーサー単位が存在しない場合には、伸長単位を細胞傷害性または細胞増殖抑制剤(薬物単位; D)に連結する。

【0162】

いくつかの実施形態において、-W<sub>w</sub>-は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド、またはドデカペプチド単位である。該リンカー単位のアミノ酸単位は、腫瘍関連プロテアーゼを含むが、これに限定されない酵素により酵素的に切断されて、該薬物単位(-D-)を遊離させることが可能であり、これは、放出に際してインビボでプロトン化されて細胞傷害性薬物(D)を提供する。

【0163】

1つの実施形態において、該アミノ酸単位は、フェニルアラニン-リシンジペプチド(phenylsまたはFKリンカー)である。別の実施形態において、該アミノ酸単位は、バリン-シトルリンジペプチド(val-citまたはVCリンカー)である。

【0164】

スペーサー単位(-Y-)は、存在する場合には、アミノ酸単位を該薬物単位に連結する。スペーサー単位は、自己犠牲および非自己犠牲の2つの一般的タイプのものである。非自己犠牲スペーサー単位は、該抗体-リンカー-薬物共役体または該薬物-リンカー化合物からアミノ酸単位の酵素切断の後に、該スペーサー単位の一部またはすべてが該薬物

10

20

30

40

50

部分に結合したままのものである。非自己犠牲スペーサー単位の例としては、(グリシン - グリシン) スペーサー単位およびグリシンスペーサー単位が含まれるが、これらに限定されない。グリシン - グリシンスペーサー単位またはグリシンスペーサー単位を含有する本開示の抗体 - リンカー - 薬物共役体が腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ、またはリンパ球関連プロテアーゼによる酵素切断を受けると、グリシン - グリシン - 薬物部分またはグリシン - 薬物部分が A - T - W<sub>w</sub> - から切断される。該薬物を遊離させるためには、標的細胞内で、該グリシン - 薬物単位結合を切断するための独立した加水分解反応が生じるべきである。

#### 【0165】

自己犠牲スペーサーの他の例には、PAB基と電子的に等価である芳香族化合物、例えば2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体(例えば、Hay et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 2237を参照)およびオルトまたはパラ - アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されない。アミド結合の加水分解に際して容易な環化を受けるスペーサー、例えば、置換および非置換4 - アミノ酪酸アミド(Rodrigues et al., Chemistry, Biology, 1995, 2, 223)、適切に置換された環系(Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815)、および2 - アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)が使用され得る。グリシンの位において置換されたアミン含有薬物の除去(Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)も、本開示の抗体 - リンカー - 薬物共役体に適用され得る自己犠牲スペーサー戦略の例である。

#### 【0166】

##### 抗体に異種分子を共役させる方法

本明細書に記載されるもの等の異種分子は、操作されたアミノ酸残基が提供する反応基を介して、本開示の抗体またはFc領域に効率的に共役させ得る。1つの態様において、本開示は、異種分子をシステイン操作された抗体に効率的に共役させるための方法を提供する。1つの実施形態において、異種分子の共役は、Fc領域または抗体の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される少なくとも1つの操作残基によって提供される反応基で生じ得、ここで、定常領域の付番体系は、Kabattに記載されるEUIンデックスのものである。さらなる態様において、反応基は、チオールであり、異種分子の共役は、Fc領域または抗体の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される少なくとも1つの操作残基によって提供されるチオール基で生じ得、ここで、定常領域の付番体系は、Kabattに記載されるEUIンデックスのものである。

#### 【0167】

抗体への非天然に生じるシステイン残基の操作は、ジスフィルド結合の一部であった天然に生じるシステイン残基が遊離され、共役が可能なチオール基を提示するように、重鎖および軽鎖のジスフィルド対を改変し得る。別の実施形態において、抗体のFc領域の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される少なくとも1つの操作されたシステイン残基によって提供されないチオール基でのシステイン操作された抗体への異種分子の効率的な共役を含む。

#### 【0168】

抗体における遊離チオール基の存在は、実施例1に記載されるもの等の当技術分野で受け入れられている種々の技術によって判定され得る。抗体への異種分子の共役の効率は、

10

20

30

40

50

共役反応後に残留する遊離チオール基の存在を評価することによって判定され得る。1つの実施形態において、本開示は、システイン操作された抗体への異種分子を効率的に共役させる方法を提供する。1つの実施形態において、共役効率は、共役反応後に残留する遊離チオール基のレベルによって測定した場合、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれ以上である。

#### 【0169】

別の実施形態において、本開示は、抗体またはFc領域への異種分子を共役させる方法を提供し、ここで、抗体またはFc領域は、2つ以上の反応基が形成されるように、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。別の実施形態において、該方法は、少なくとも2、少なくとも4、少なくとも6、少なくとも8、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも22、少なくとも24、少なくとも26、少なくとも28、少なくとも30、少なくとも32、少なくとも34、少なくとも36、少なくとも38、少なくとも40またはそれ以上の新しく導入した反応基が形成されるように、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むFc領域または抗体を含む。さらなる実施形態において、少なくとも1つの置換は、システインを用い、反応基は、チオール基である。

#### 【0170】

共役が可能な本開示のFc領域および抗体は、ブロッキングまたはキャップ化されたスルフヒドリル基を含むシステイン残基を含有し得る。かかるキャップは、スルフヒドリル基と相互作用し、共役体形成を妨げるまたは抑制するタンパク質、ペプチド、イオン、および他の物質が含まれる。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、共役反応前に脱キャップ化を要し得る。特定の実施形態において、本開示の抗体は、脱キャップ化され、共役可能なスルフヒドリル基を提示する。他の特定の実施形態において、本開示の抗体は、天然に生じるジスルフィド結合を妨げない、または再構成しない脱キャップ化反応に付される。他の実施形態において、本開示の抗体は、2009年1月16日に出願されたPCT公開第PCT/US09/31294号の実施例9または10で示されている脱キャップ化反応に付される。

#### 【0171】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、共役されるべき抗体は、少なくとも1 mg/mL、少なくとも2 mg/mL、少なくとも3 mg/mL、少なくとも4 mg/mL、少なくとも5 mg/mLまたはそれ以上の濃度で存在する共役反応に付され得る。

#### 【0172】

##### 抗体共役体の使用方法

本開示の共役体は、種々の疾患または障害、例えば、腫瘍抗原の過剰発現により特徴づけられるものを治療するために使用され得ると企図される。例示的な状態または過剰増殖性障害には、良性または悪性の腫瘍、白血病、およびリンパ系悪性疾患が含まれる。その他には、ニューロン、グリア、星状膠、視床下部、腺性、マクロファージ、上皮、内皮、および間質悪性疾患が含まれる。他の癌または過剰増殖性障害には、頭部、頸部、眼、口、喉、食道、胸部、皮膚、骨、肺、結腸、直腸、結腸直腸、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮下組織、転移性メラノーマ、子宮内膜、前立腺、乳房、卵巣、精巣、甲状腺、血液、リンパ節、腎臓、肝臓、膵臓、脳、または中枢神経系の癌が含まれる。本開示の方法により予防、処置、治療、または改善され得る癌の例としては、頭部、頸部、眼、口、喉、食道、胸部、骨、肺、結腸、直腸、胃、前立腺、乳房、卵巣、腎臓、肝臓、膵臓、および脳の癌が含まれるが、これらに限定されない。追加的な癌には、白血病、限定的なものではないが、例えば急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、例えば骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病性白血病および骨髄形成異常症候群、慢性白血

10

20

30

40

50

病、限定的なものではないが、例えば慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリー細胞白血病；真性多血症；リンパ腫、限定的なものではないが、例えばホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、限定的なものではないが、例えば、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性（nonsecretory）骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞性白血病、単発性形質細胞腫、および髄外性形質細胞腫；ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症；意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン異常症；良性単クローン性ガンマグロブリン血症；重鎖病；骨癌および結合組織肉腫、限定的なものではないが、例えば骨肉腫、骨髄腫骨疾患、多発性骨髄腫、真珠腫誘発性骨肉腫、骨パジェット病、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟部肉腫、血管肉腫（hemangiosarcoma）、線維肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経線維鞘腫、横紋筋肉腫、および骨膜肉腫；脳腫瘍、限定的なものではないが、例えば神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起神経膠腫、非グリア腫瘍、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽細胞腫、および原発性脳リンパ腫；乳癌、限定的なものではないが、例えば腺癌、小葉（小細胞）癌、管内癌、髄様乳癌、ムチン産生乳癌、細管乳癌、乳頭状乳癌、パジェット病（若年性パジェット病を含む）、および炎症性乳癌；副腎癌、限定的なものではないが、例えば褐色細胞腫および副腎皮質癌；甲状腺癌、限定的なものではないが、例えば乳頭状または小胞性甲状腺癌、髄様甲状腺癌および退形成甲状腺癌；膵臓癌、限定的なものではないが、例えばインスリノーマ、ガストリン産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、VIP産生腫瘍、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドもしくは島細胞腫；下垂体癌、限定的なものではないが、例えばクッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端肥大症、および尿崩症；眼癌、限定的なものではないが、例えば眼メラノーマ、例えば虹彩メラノーマ、脈絡膜メラノーマ、毛様体メラノーマ、および網膜芽細胞腫；膣癌、例えば扁平上皮癌、腺癌、およびメラノーマ；外陰癌、例えば扁平上皮癌、メラノーマ、腺癌、基底細胞癌、肉腫、およびパジェット病；子宮頸癌、限定的なものではないが、例えば扁平上皮癌および腺癌；子宮癌、限定的なものではないが、例えば子宮内膜癌および子宮肉腫；卵巣癌、限定的なものではないが、例えば卵巣上皮癌、境界（borderline）腫瘍、胚細胞腫瘍、および間質腫瘍；食道癌、限定的なものではないが、例えば扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺様扁平上皮癌、肉腫、メラノーマ、プラズマ細胞腫、疣状癌、および燕麦細胞（小細胞）癌；胃癌、限定的なものではないが、例えば腺癌、菌状発育（fungating）（ポリプ状）、潰瘍性、表在性、びまん性、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および癌肉腫；結腸癌；直腸癌；肝癌、限定的なものではないが、例えば肝細胞癌および肝芽腫、胆嚢癌、例えば腺癌；胆管癌、限定的なものではないが、例えば乳頭状、結節性、およびびまん性；肺癌、例えば非小細胞肺癌、扁平上皮癌（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌、および小細胞肺癌；精巣癌、限定的なものではないが例えば胚芽性腫瘍、セミノーマ、無形成性、古典的（典型的）、精母細胞、非セミノーマ、胎児性癌、テラトーマ癌、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）、前立腺癌、限定的なものではないが、例えば腺癌、平滑筋肉腫、および横紋筋肉腫；ペナル（penal）癌；口内癌、限定的なものではないが、例えば扁平上皮癌；基底癌；唾液腺癌、限定的なものではないが、例えば腺癌、粘表皮癌、および腺様嚢胞癌；咽頭癌、限定的なものではないが、例えば鱗状細胞癌および疣状；皮膚癌、限定的なものではないが例えば基底細胞癌、扁平上皮癌およびメラノーマ、表在性メラノーマ、結節性メラノーマ、悪性ほくろ、末端性ほくろ性メラノーマ；腎臓癌、限定的なものではないが、例えば腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌（腎盤およびノまたは尿管）；ウィルムス腫瘍；膀胱癌、限定的なものではないが、例えば移行上皮癌、鱗状細胞癌、腺癌、癌肉腫、等が含まれるが、これらに限定されない。加えて、癌には、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、および乳頭状腺癌が含まれる（このような障害の概説としては、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, およびMurphy et al., 1997, Informed

10

20

30

40

50

Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., United States of Americaを参照)。また、アポトーシスにおける異常により引き起こされる癌も、本開示の方法および組成物により治療され得ると企図される。このような癌としては、濾胞性リンパ腫、p53変異を有する癌、乳房、前立腺、および卵巣のホルモン依存性腫瘍、ならびに前癌性病変、例えば家族性腺腫様ポリプ症、および骨髄形成異常症候群が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0173】

本開示のタンパク質および同一物を含む組成物は、例えば、自己免疫および/もしくは炎症障害、例えばシェーグレン症候群、慢性関節リウマチ、狼瘡、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成(グレーヴス病を含む)、角膜および他の組織移植、および慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流障害、敗血症、内毒素ショック、嚢胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎(例えば、乾癬性関節炎)、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流障害、脊髄損傷、ならびに同種移植片拒絶が含まれるが、これらに限定されない、多数の目的に、広範囲の慢性および急性の疾患および障害に対する治療物質として有用である。自己免疫および/または炎症障害の他の例としては、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、シェーグレン症候群、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成(グレーヴス病を含む)、角膜および他の組織移植、および慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、再灌流障害、敗血症、内毒素ショック、嚢胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎(例えば、乾癬性関節炎)、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流障害、脊髄損傷および同種移植片拒絶、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄多発性神経障害、チャージェストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、円板状狼瘡、必須混合クリオグロブリン血症、線維筋肉痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーヴズ病、ギランバレー、橋本病甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫媒介型糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性ガンマグロブリン欠乏血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎、例えば疱疹状皮膚炎脈管炎、尋常性白斑およびウェゲナー肉芽腫症が含まれるが、これらに限定されない。炎症障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節障害、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性ウイルスまたは細菌感染から生じる慢性炎症が含まれるが、これらに限定されない。本開示の組成物および方法は、上述の疾患を予防、処置、または治療するために使用される1つ以上の従来の療法と共に使用され得る。

#### 【0174】

本開示はまた、ウイルス、真菌、真核微生物、および細菌等の種々の感染性因子を不活性化するための本開示の組成物の使用方法を提供する。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、RSV、hMPV、PIV、またはインフルエンザウイルスを不活性化するために使用され得る。他の実施形態において、本開示の組成物は、例えば、ネグレリア属(Naegleria)、アスペルギルス属(Aspergillus)、プラスト

10

20

30

40

50

マイセス属 (*Blastomyces*)、ヒストプラズマ属 (*Histoplasma*)、カンジダ属 (*Candida*)、または白癬 (*Tinea* 属) 等であるが、これらに限定されない、真菌病原体のメンバーを不活性化するために使用され得る。他の実施形態において、本開示の組成物は、例えば、ジアルジア属 (*Giardia*)、トキソプラズマ属 (*Toxoplasma*)、プラスモジウム属 (*Plasmodium*)、トリパノソーマ属 (*Trypanosoma*)、およびエントアメーバ属 (*Entamoeba*) 等であるが、これらに限定されない、真核微生物のメンバーを不活性化するために使用され得る。他の実施形態において、本開示の組成物は、例えば、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、ボレリア (*Borrelia*)、ビブリオ (*Vibrio*)、およびネイセリア (*Neisseria*) 属等であるが、これらに限定されない、細菌病原体のメンバーを不活性化するために使用され得る。

#### 【0175】

本開示の組成物は、多数の目的に、例えば、ウイルス性、細菌性、および真菌性疾患を含む感染症が含まれるが、これらに限定されない、多種多様な慢性および急性の疾患および障害に対する治療剤として有用である。ウイルス病原体の例としては、アデノウイルス科 (例えば、マストアデノウイルス属およびアピアデノウイルス属)、ヘルペスウイルス科 (例えば、単純ヘルペスウイルス1、単純ヘルペスウイルス2、単純ヘルペスウイルス5、および単純ヘルペスウイルス6)、レヴィウイルス科 (例えば、レヴィウイルス属、腸内細菌ファージMS2、アロレヴィウイルス属)、ポックスウイルス科 (例えば、チヨルドポックスウイルス亜科、パラポックスウイルス属、アピポックスウイルス属、カプリポックスウイルス属、レポリポックスウイルス属、スイポックスウイルス属、モルスサイポックスウイルス属、およびエントモポックスウイルス亜科)、パパーバウイルス科 (例えば、ポリオーマウイルス属およびパピローマウイルス属)、パラミクソウイルス科 (例えば、パラミクソウイルス属、パラインフルエンザウイルス1、モルビリウイルス属 (例えば、麻疹ウイルス)、ルブラウイルス属 (例えば、ムンプスウイルス)、ニューモノウイルス亜科 (例えば、ニューモウイルス属、ヒト呼吸器合包体ウイルス)、メタニューモウイルス (例えば、トリニューモウイルスおよびヒトメタニューモウイルス))、ピコルナウイルス科 (例えば、エンテロウイルス属、ライノウイルス属、ヘパトウイルス属 (例えば、ヒトA型肝炎ウイルス)、カルチオウイルス属、およびアフトウイルス属)、レオウイルス科 (例えば、オルソレオウイルス属、オルビウイルス属、ロタウイルス属、シボウイルス属、フィジーウイルス属、フィトレオウイルス属、およびオリザウイルス属)、レトロウイルス科 (例えば、哺乳類B型レトロウイルス属、哺乳動物C型レトロウイルス属、トリC型レトロウイルス属、D型レトロウイルス群、BLV-HTLVレトロウイルス、レンチウイルス属 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス1およびヒト免疫不全ウイルス2)、スプマウイルス属)、フラビウイルス科 (例えば、C型肝炎ウイルス)、ヘパドナウイルス科 (例えば、B型肝炎ウイルス)、トガウイルス科 (例えば、アルファウイルス属 (例えば、シンドビスウイルス)、およびルビウイルス属 (例えば、風疹ウイルス))、ラブドウイルス科 (例えば、ベシクロウイルス属、リッサウイルス属、エフェメロウイルス属、シトラブドウイルス属、およびヌクレオラブドウイルス属)、アレナウイルス科 (例えば、アレナウイルス属、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イッピーウイルス、およびラッサウイルス)、ならびにコロナウイルス科 (例えば、コロナウイルス属およびトロウイルス属) が含まれるが、これらに限定されない。細菌病原体の例としては、アクワスピリルム (*Aquaspirillum*) 科、アゾスピリルム (*Azospirillum*) 科、アゾトバクター (*Azotobacteraceae*) 科、バクテロイデス (*Bacteroidaceae*) 科、バルトネラ (*Bartonella*) 種、ブデロビブリオ (*Bdellovibrio*) 科、カンピロバクター (*Campylobacter*) 種、クラミジア (*Chlamydia*) 種 (例えば、クラミジア肺炎菌 (*Chlamydia pneumoniae*))、クロストリジウム、腸内細菌 (*Enterobact*

10

20

30

40

50

eriaceae)科(例えば、シトロバクター(*Citrobacter*)種、エドワードシエラ(*Edwardsiella*)、エンテロバクター・エアロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、エルウィニア(*Erwinia*)種、大腸菌(*Escherichia coli*)、ハフニア(*Hafnia*)種、クレブジエラ(*Klebsiella*)種、モルガネラ(*Morganella*)種、変形菌(*Protus vulgaris*)、プロビデンシア(*Providencia*)、サルモネラ(*Salmonella*)種、セラティア・マルセセンス(*Serratia marcescens*)、およびシゲラ・フレクスネリ(*Shigella flexneri*)、ガルジネラ(*Gardineella*)科、インフルエンザエ菌(*Haemophilus influenzae*)、ハロバクテリアム(*Halobacteriaceae*)科、ヘリコバクター(*Helicobacter*)科、レジオネラ(*Legionellaceae*)科、リステリア(*Listeria*)種、メチロコッカス(*Methylococcaceae*)科、マイコバクテリア(*Mycobacteria*) (例えば結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、ナイセリア(*Neisseriaceae*)科、オセアノスピリルム(*Oceanospirillum*)科、パストレラ(*Pasteurellaceae*)科、肺炎球菌(*Pneumococcus*)種、シュードモナス(*Pseudomonas*)種、リゾビウム(*Rhizobiaceae*)科、スピリルム(*Spirillum*)科、スピロソマセア(*Spirosomaceae*)科、ブドウ球菌(*Staphylococcus*) (例えば、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*))、およびスタフィロコッカス・パイロゲネス(*Staphylococcus pyrogenes*)、連鎖球菌(*Streptococcus*) (例えば、腸炎連鎖球菌(*Streptococcus enteritidis*))、ストレプトコッカス・フェーシエ(*Streptococcus fasciae*)、および肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、バンピロビブルヘリコバクター(*Vampirovibr Helicobacter*)科、ならびにバンピロビブリオ(*Vampirovibrio*)科が含まれるが、これらに限定されない。真菌病原体の例としては、アブシディア(*Absidia*)種(例えば、アブシディア・コリムピフェラ(*Absidia corymbifera*)およびアブシディア・ラモサ(*Absidia ramosa*))、アスペルギルス(*Aspergillus*)種(例えば、アスペルギルス・フラブス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)、およびアスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*))、バシジオボルス・ラナルム(*Basidiobolus ranarum*)、ブラストマイセス・デルマティティス(*Blastomyces dermatitidis*)、カンジダ種(例えば、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ・ガラブラータ(*Candida glabrata*)、カンジダ・ケル(*Candida kerr*)、カンジダ・クルーゼイ(*Candida krusei*)、カンジダ・パラプシロシス(*Candida parapsilosis*)、カンジダ・シュードトロピカリス(*Candida pseudotropicalis*)、カンジダ・クイレルモンディイ(*Candida quillermontii*)、カンジダ・ルゴーザ(*Candida rugosa*)、カンジダ・ステラトイデア(*Candida stellatoidea*)、およびカンジダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*))、コクシジオイデス・イミティス(*Coccidioides immitis*)、コニジオボルス(*Conidiobolus*)種、クリプトコッカス・ネオフォルムス(*Cryptococcus neoforms*)、カニングハメラ(*Cunninghamella*)種、皮膚糸状菌、ヒストプラズマ・カプスラタム(*Histoplasma capsulatum*)、マイクロスポルム・ジブセウム(*Microsporium gypseum*)、ムコル・プシルス(*Mucor pusillus*)

、パラコッキディオイデス・ブラシリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*)、シューダルエシエリア・ボイディイ (*Pseudallescheria boydii*)、リノスポリジウム・シーベリ (*Rhinosporidium seeberi*)、ニューモシステイス・カリニイ (*Pneumocystis carinii*)、クモノスカビ (*Rhizopus*) 種 (例えば、リゾップス・アルヒザス (*Rhizopus arrhizus*)、リゾップス・オライザエ (*Rhizopus oryzae*)、およびリゾップス・マイクロスポルス (*Rhizopus microsporus*))、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 種、スポロトリクス・シエネキイ (*Sporothrix schenckii*)、ならびに例えば接合菌 (*Zygomycetes*)、子嚢菌 (*Ascomycetes*)、担子菌 (*Basidiomycetes*)、不完全菌 (*Deuteromycetes*)、および卵菌 (*Oomycetes*) 等の綱が含まれるが、これらに限定されない。

10

## 【0176】

本開示はまた、細胞集団を枯渇させるための抗体の使用を提供する。1つの実施形態において、本開示の方法は、好酸球、好塩基球、好中球、T細胞、B細胞、マスト細胞、単球、内皮細胞、および腫瘍細胞の細胞型を枯渇させるのに有用である。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、操作されない対照抗体またはその共役体と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上のそれぞれの細胞集団を枯渇させる。

20

## 【0177】

本開示の抗体およびその共役体はまた、疾患またはその症状の診断および検出においても有用であり得る。別の実施形態において、本開示の組成物は、疾患の進行のモニタリングにおいて有用であり得る。別の実施形態において、本開示の組成物は、治療計画のモニタリングにおいて有用であり得る。別の実施形態において、本開示の組成物は、エクスピボ用途、例えば、診断キットにおける診断に有用であり得る。

## 【0178】

本開示の組成物は、標的抗原の可視化において有用であり得る。いくつかの実施形態において、該標的抗原は、内在化する細胞表面受容体である。他の実施形態において、該標的抗原は、細胞内抗原である。他の実施形態において、該標的は、核内抗原である。

30

## 【0179】

1つの実施形態において、本開示の抗体または抗体-薬物共役体は、一旦結合すると、細胞内に内在化され、ここで、内在化は、本明細書に記載される対照抗体よりも少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約110%、少なくとも約130%、少なくとも約140%、少なくとも約150%、少なくとも約160%、または少なくとも約170%多い。

## 【0180】

別の実施形態において、本開示の抗体は、一旦結合すると、細胞内に内在化され、ここで、内在化は、本明細書に記載される対照抗体よりも1~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%、90~100%、100~110%、110~120%、120~130%、130~140%、140~150%、150~160%、または160~170%多い。

40

## 【0181】

別の実施形態において、本開示の抗体は、一旦結合すると、細胞内に内在化され、ここで、内在化は、二次抗体を用いた内在化アッセイにより判定されるように、対照抗体よりも1~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%、90~100%、100~110%、

50

110～120%、120～130%、130～140%、140～150%、150～160%、または160～170%多い。

【0182】

医薬組成物

別の態様において、本開示は、例えば、薬学的に許容される担体と共に製剤化された本開示の抗体または抗体共役体の1つまたは組み合わせを含有する医薬組成物が含まれるが、これに限定されない組成物を提供する。このような組成物は、限定的なものではないが、例えば、本開示の2つ以上の異なる抗体の1つまたは組み合わせを含み得る。例えば、本開示の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するまたは相補的活性を有する抗体の組み合わせを含み得る。

10

【0183】

本開示の医薬組成物はまた、他の薬剤と併用した併用療法においても投与され得る。例えば、該併用療法は、少なくとも1つの他の両方と併用した本開示の抗体を含むことができ、ここで、該療法は、手術、免疫療法、化学療法、放射線治療、または薬物療法であり得る。

【0184】

本開示の医薬化合物は、1つ以上の薬学的に許容される塩を含み得る。かかる塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン等の無毒性無機酸に由来するもの、ならびに脂肪族モノ-およびジ-カルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族酸、および芳香族スルホン酸等の無毒性有機酸に由来するものが含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属に由来するもの、ならびにN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等の無毒性有機アミンに由来するものが含まれる。

20

【0185】

本開示の医薬組成物はまた、薬学的に許容される抗酸化剤も含み得る。薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等の水溶性抗酸化剤、(2)アスコルビルパルミタート、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、プロピルガラート、アルファ-トコフェロール等の油溶性抗酸化剤、および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸等の金属キレート剤が含まれる。

30

【0186】

本開示の医薬組成物において使用され得る適当な水性および非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、およびそれらの適当な混合物、オリーブ油等の植物油、ならびにオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが含まれる。適当な流動性は、例えば、レシチン等のコーティング剤の使用により、分散液の場合には要求される粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。

40

【0187】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤等の補助剤も含み得る。微生物の存在の予防は、滅菌法、ならびにパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等の種々の抗菌および抗真菌剤の組み込みの両方により確保され得る。糖、塩化ナトリウム等の等張化剤を該組成物に含めることも望ましい場合がある。加えて、注射可能な医薬品形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによりもたらされ得る。

【0188】

医薬組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。該組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に適した

50

他の秩序構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）、およびその適当な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。適当な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用により、分散液の場合には要求される粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。多くの場合、例えば、糖、多価アルコール（マンニトール、ソルビトール等）、または塩化ナトリウム等の等張化剤を該組成物中に含めることが好ましいであろう。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによりもたらされ得る。

#### 【0189】

10

滅菌注射液は、上記列挙の成分の1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み込み、必要に応じて、その後に滅菌精密濾過を行うことによって、調製することができる。一般に、分散液は、上記列挙の塩基性分散媒および必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルへの活性化化合物の組み込みによって調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、その予め濾過滅菌した溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

#### 【0190】

1つの実施形態において、本開示の組成物は、内毒素および/または関連発熱物質を実質的に含有しない発熱物質非含有製剤である。内毒素には、微生物の内部に封じ込められた毒素、および微生物が破壊または死亡した場合に放出される毒素が含まれる。また、発熱物質には、細菌および他の微生物の外膜由来の発熱誘発性熱安定性物質（糖タンパク質）が含まれる。これらの物質は共に、ヒトに投与された場合に、発熱、低血圧、およびショックを引き起こし得る。潜在的な有害な作用のため、低量の内毒素であっても、それを静脈内に投与される医薬品溶液から除去するのが有利である。Food & Drug Administration（「FDA」）は、静脈内薬物投与の1回の1時間の期間中、5内毒素単位（EU）/用量/キログラム体重の上限を定めている（The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26（1）：223（2000））。治療タンパク質が数百または数千ミリグラム/キログラム体重の量で投与される場合、微量の内毒素であってもそれを除去するのが有利である。1つの実施形態において、該組成物中の内毒素および発熱物質レベルは、10 EU/mg未満、または5 EU/mg未満、または1 EU/mg未満、または0.1 EU/mg未満、または0.01 EU/mg未満、または0.001 EU/mg未満である。別の実施形態において、該組成物中の内毒素および発熱物質レベルは、約10 EU/mg未満、または約5 EU/mg未満、または約1 EU/mg未満、または約0.1 EU/mg未満、または約0.01 EU/mg未満、または約0.001 EU/mg未満である。

20

30

#### 【0191】

1つの実施形態において、本開示は、組成物を投与することを含み、該投与は、経口、非経口、筋肉内、鼻腔内、腔、直腸、舌、舌下、頬側、頬内、静脈内、皮膚、皮下、または経皮投与である。

40

#### 【0192】

別の実施形態において、本開示は、さらに、手術、化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、免疫療法、または放射線療法等の他の療法と組み合わせて組成物を投与することを含む。

#### 【0193】

##### 用量/投与

本開示の抗体または抗体共役体を含む医薬または無菌組成物を調製するために、該抗体/抗体共役体は、薬学的に許容される担体または賦形剤と混合する。治療および診断薬剤の製剤は、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液、ローション、または懸濁液剤の形

50

態で、生理的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することにより調製され得る(例えば、Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.を参照)。

10

**【0194】**

治療薬のための投与計画の選択は、実体(entity)の血清または組織ターンオーバー速度、症状のレベル、実体の免疫原性、および生物学的マトリックスにおける標的細胞の接近性を含むいくつかの要因に依存する。ある実施形態において、投与計画は、副作用の許容されるレベルと調和させて、患者に送達される治療薬の量を最大にする。したがって、送達される生物学的製剤の量は、部分的には、特定の実体および治療される状態の重症度に依存する。抗体、サイトカイン、および低分子の適切な用量を選択するにあたっての指針は、入手可能である(例えば、Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., Baert, et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608, Milgrom, et al. (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973, Slamon, et al. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792, Beniaminovit z, et al. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619, Ghosh, et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32, Lipsky, et al. (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602を参照)。

20

30

**【0195】**

適当な用量の決定は、例えば、治療に影響を及ぼすこと、または治療に影響を及ぼすと予想されることが当技術分野で公知であるまたは疑われるパラメータおよび要因を用いて、臨床医によってなされる。一般に、該用量は、最適用量より若干少ない量から開始し、いずれかの負の副作用に対して所望のまたは最適な効果が達成されるまで、その後少量ずつ増加させる。重要な診断尺度には、例えば、炎症の症状の尺度、または産生される炎症サイトカインのレベルが含まれる。

40

**【0196】**

本開示の医薬組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性となることなく、特定の患者、組成物、および投与様式に関する所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分量が得られるよう変化させ得る。選択される投与量レベルは、使用される本開示の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、

50

投与時点、使用される特定の化合物の排泄速度、治療の持続期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および/または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康状態、および病歴、ならびに医学分野で公知の同様の要因を含む種々の薬物動態学的要因に依存する。

【0197】

本開示の抗体または抗体共役体を含む組成物は、連続的注入により、または例えば、1日、1週間、もしくは週1～7回の間隔での投与により提供され得る。用量は、静脈内、皮下、局所、経口的、鼻腔内、直腸、筋肉内、脳内に、または吸入により提供され得る。特定の用量プロトコルは、顕著な望ましくない副作用を回避する最大用量または投与頻度を含むものである。週当たりの合計用量は、少なくとも0.05 μg/kg体重、少なくとも0.2 μg/kg、少なくとも0.5 μg/kg、少なくとも1 μg/kg、少なくとも10 μg/kg、少なくとも100 μg/kg、少なくとも0.2 mg/kg、少なくとも1.0 mg/kg、少なくとも2.0 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも25 mg/kg、または少なくとも50 mg/kgであり得る(例えば、Yang, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 427-434、Herold, et al. (2002) *New Engl. J. Med.* 346: 1692-1698、Liu, et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456、Portielji, et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 133-144を参照)。該用量は、少なくとも15 μg、少なくとも20 μg、少なくとも25 μg、少なくとも30 μg、少なくとも35 μg、少なくとも40 μg、少なくとも45 μg、少なくとも50 μg、少なくとも55 μg、少なくとも60 μg、少なくとも65 μg、少なくとも70 μg、少なくとも75 μg、少なくとも80 μg、少なくとも85 μg、少なくとも90 μg、少なくとも95 μg、または少なくとも100 μgであり得る。対象に投与される用量回数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12またはそれ以上であり得る。

【0198】

本開示の抗体または抗体共役体に関しては、患者に投与される投与量は、患者の体重の0.0001 mg/kg～100 mg/kgであり得る。該投与量は、患者の体重の0.0001 mg/kg～20 mg/kg、0.0001 mg/kg～10 mg/kg、0.0001 mg/kg～5 mg/kg、0.0001～2 mg/kg、0.0001～1 mg/kg、0.0001 mg/kg～0.75 mg/kg、0.0001 mg/kg～0.5 mg/kg、0.0001 mg/kg～0.25 mg/kg、0.0001～0.15 mg/kg、0.0001～0.10 mg/kg、0.0001～0.5 mg/kg、0.01～0.25 mg/kg、または0.01～0.10 mg/kgであり得る。

【0199】

本開示の抗体または抗体共役体の投与量は、キログラム(kg)単位の患者の体重とmg/kg単位の投与用されるべき用量とを乗じることにより算出され得る。本開示の抗体の投与量は、患者の体重の150 μg/kg以下、125 μg/kg以下、100 μg/kg以下、95 μg/kg以下、90 μg/kg以下、85 μg/kg以下、80 μg/kg以下、75 μg/kg以下、70 μg/kg以下、65 μg/kg以下、60 μg/kg以下、55 μg/kg以下、50 μg/kg以下、45 μg/kg以下、40 μg/kg以下、35 μg/kg以下、30 μg/kg以下、25 μg/kg以下、20 μg/kg以下、15 μg/kg以下、10 μg/kg以下、5 μg/kg以下、2.5 μg/kg以下、2 μg/kg以下、1.5 μg/kg以下、1 μg/kg以下、0.5 μg/kg以下、または0.5 μg/kg以下であり得る。

【0200】

本開示の抗体または抗体共役体の単位用量は、0.1 mg～20 mg、0.1 mg～15 mg、0.1 mg～12 mg、0.1 mg～10 mg、0.1 mg～8 mg、0.1 mg～7 mg、0.1 mg～5 mg、0.1～2.5 mg、0.25 mg～20 mg、0.

10

20

30

40

50

25 ~ 15 mg、0.25 ~ 12 mg、0.25 ~ 10 mg、0.25 ~ 8 mg、0.25 mg ~ 7 mg、0.25 mg ~ 5 mg、0.5 mg ~ 2.5 mg、1 mg ~ 20 mg、1 mg ~ 15 mg、1 mg ~ 12 mg、1 mg ~ 10 mg、1 mg ~ 8 mg、1 mg ~ 7 mg、1 mg ~ 5 mg、または1 mg ~ 2.5 mgであり得る。

【0201】

本開示の抗体または抗体共役体の投与量は、対象において、少なくとも0.1 µg/mL、少なくとも0.5 µg/mL、少なくとも1 µg/mL、少なくとも2 µg/mL、少なくとも5 µg/mL、少なくとも6 µg/mL、少なくとも10 µg/mL、少なくとも15 µg/mL、少なくとも20 µg/mL、少なくとも25 µg/mL、少なくとも50 µg/mL、少なくとも100 µg/mL、少なくとも125 µg/mL、少なくとも150 µg/mL、少なくとも175 µg/mL、少なくとも200 µg/mL、少なくとも225 µg/mL、少なくとも250 µg/mL、少なくとも275 µg/mL、少なくとも300 µg/mL、少なくとも325 µg/mL、少なくとも350 µg/mL、少なくとも375 µg/mL、または少なくとも400 µg/mLの血清力価を達成し得る。代替的に、本開示の抗体の投与量は、対象において、少なくとも0.1 µg/mL、少なくとも0.5 µg/mL、少なくとも1 µg/mL、少なくとも2 µg/mL、少なくとも5 µg/mL、少なくとも6 µg/mL、少なくとも10 µg/mL、少なくとも15 µg/mL、少なくとも20 µg/mL、少なくとも25 µg/mL、少なくとも50 µg/mL、少なくとも100 µg/mL、少なくとも125 µg/mL、少なくとも150 µg/mL、少なくとも175 µg/mL、少なくとも200 µg/mL、少なくとも225 µg/mL、少なくとも250 µg/mL、少なくとも275 µg/mL、少なくとも300 µg/mL、少なくとも325 µg/mL、少なくとも350 µg/mL、少なくとも375 µg/mL、または少なくとも400 µg/mLの血清力価を達成し得る。

10

20

【0202】

本開示の抗体または抗体共役体の用量は、少なくとも1日間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、30日間、45日間、2ヶ月間、75日間、3ヶ月間、または少なくとも6ヶ月間で分けられ得る。

【0203】

特定の患者に対する有効量は、治療される状態、患者の一般的健康状態、投与の方法、経路、および用量、ならびに副作用の重症度等の要因によって異なり得る（例えば、Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UKを参照）。

30

【0204】

投与の経路は、例えば、局所または皮膚適用、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、病巣内への注射または注入、あるいは徐放系またはインプラントによるものであり得る（例えば、Sidman et al. (1983) Biopolymers 22: 547 - 556、Langer, et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167 - 277、Langer (1982) Chem. Tech. 12: 98 - 105、Epstein, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 - 3692、Hwang, et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 - 4034、米国特許第6,350,466号および同第6,316,024号を参照）。必要に応じて、該組成物はまた、可溶化剤、および注射部位の疼痛を軽減するためにリドカイン等の局所麻酔薬も含み得る。加えて、肺内投与はまた、例えば、吸入器またはネブライザーの使用およびエアゾール化剤による製剤も使用することができる。例えば、米国特許第6,019,968号、同第5,985,320号、同第5,985,309号、同

40

50

第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号、および同第4,880,078号、ならびにPCT公開第WO92/19244号、同第WO97/32572号、同第WO97/44013号、同第WO98/31346号、同第WO99/66903号を参照されたく、これらの各々は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。1つの実施形態において、本開示の抗体、併用療法、または組成物は、Alkermes AIR(商標)肺薬物送達技術(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)を用いて投与される。

【0205】

本開示の組成物はまた、当技術分野で公知の種々の方法の1つ以上を用いて、1つ以上の投与経路で投与され得る。当業者に理解されるように、投与の経路および/または様式は、所望の結果によって異なるであろう。本開示の抗体の選択される投与経路には、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、または他の非経口投与経路、例えば、注射または注入が含まれる。非経口投与は、腸内および局所投与以外の投与様式に相当し得るものであり、通常は、注射によるものであり、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外、および胸骨内の注射および注入が含まれるが、これらに限定されない。代替的に、本開示の組成物は、非経口経路、例えば、局所、表皮、または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、膺、直腸、舌下、または局所経路により投与することができる。

【0206】

本開示の抗体またはその共役体は、制御放出または徐放系で投与される場合には、制御放出または徐放を達成するためにポンプが使用され得る(例えば、Langer、上記を参照、Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20、Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507、Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照)。高分子物質を使用して、本開示の療法を制御放出または徐放を達成することができる(例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974)、Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York (1984)、Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照、また、Levy et al., 1985, Science 228:190、Durand et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351、Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照)、米国特許第5,679,377号、米国特許第5,916,597号、米国特許第5,912,015号、米国特許第5,989,463号、米国特許第5,128,326号、PCT公開第99/15154号、およびPCT公開第99/20253号を参照。徐放製剤に使用されるポリマーの例としては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセタート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルが含まれるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、徐放製剤に使用されるポリマーは、不活性であり、浸出性不純物を含有せず、貯蔵時に安定であり、無菌であり、生分解性である。制御放出または徐放系は、予防または治療標的に接近して配置され、したがって、全身用量のごく一部を要するに過ぎない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release、上記を参照、vol. 2, pp. 115-138(1984))。

10

20

30

40

50

## 【0207】

制御放出系は、Langer (1990, Science 249:1527-1533) による総説において考察されている。当業者に公知の任意の技術を用いて、本開示の1つ以上の抗体またはその共役体を含む徐放製剤を産生することができる。例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開第WO91/05548号、PCT公開第WO96/20698号、Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189、Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397、Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854、およびLam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照されたく、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

## 【0208】

本開示の抗体または抗体共役体を局所投与する場合、それは、軟膏剤、クリーム剤、経皮パッチ、ローション剤、ゲル剤、シャンプー、噴霧剤、エアゾール剤、溶液剤、乳剤、または当業者に公知の他の形態で製剤化され得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)を参照。非噴霧可能局所剤形の場合、局所適用に適しており、場合によっては、水より大きな動的粘性率を有する担体または1つ以上の賦形剤を含む粘性ないし半固体または固体形態が典型的に使用される。適当な製剤には、溶液剤、懸濁液剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、リニメント剤、口剤（外用軟膏）等が含まれるが、これらに限定されるものではなく、これらは、所望により、滅菌され、または例えば浸透圧等の種々の特性に影響を及ぼすための補助物質（例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤、バッファー、または塩）と混合される。他の適当な局所剤形には、噴霧可能なエアゾール剤が含まれ、ここで、活性成分は、場合によっては、固体または液体不活性担体と組み合わせられ、加圧揮発性物質（例えば、気体推進剤、例えばフレオン）との混合物として、またはスクイズボトル内に充填される。所望により、保湿剤または湿潤剤を、医薬組成物および剤形にも加えられ得る。このような追加的成分の例は、当技術分野で公知である。

30

40

## 【0209】

抗体または抗体共役体を含む組成物を鼻腔内に投与する場合には、それは、エアゾール形態、噴霧剤、ミスト、または滴剤の形態で製剤化され得る。特に、本開示において使用する予防または治療剤は、適当な推進剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適当な気体）の使用により、加圧パックまたはネブライザーから、エアゾール噴霧剤の形態で簡便に送達され得る。加圧エアゾールの場合、定量を送達するための弁を設けることにより投与単位が定められ得る。吸入器または通気器において使用されるカプセル剤およびカートリッジ剤（例えばゼラチンから構成されるもの）は、該化合物と、ラクトースまたはデンプン等の適当な粉末基剤との粉末混合物を含有するよう製剤化され得る。

50

## 【0210】

第2の治療剤、例えば、サイトカイン、ステロイド、化学療法剤、抗生物質、または放射線による共投与または治療のための方法は、当技術分野で公知である（例えば、Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. sup. th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y., Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa., Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotechnology, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.を参照）。有効量の治療薬は、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも約30%、少なくとも40%、または少なくとも50%、症状を軽減し得る。

10

## 【0211】

本開示の抗体またはその共役体と組み合わせて投与することができる追加的な療法（例えば、予防または治療剤）は、本開示の抗体から5分未満を隔てて、30分未満を隔てて、約1時間を隔てて、約1時間を隔てて、約1～約2時間を隔てて、約2時間～約3時間を隔てて、約3時間～約4時間を隔てて、約4時間～約5時間を隔てて、約5時間～約6時間を隔てて、約6時間～約7時間を隔てて、約7時間～約8時間を隔てて、約8時間～約9時間を隔てて、約9時間～約10時間を隔てて、約10時間～約11時間を隔てて、約11時間～約12時間を隔てて、約12時間～18時間を隔てて、18時間～24時間を隔てて、24時間～36時間を隔てて、36時間～48時間を隔てて、48時間～52時間を隔てて、52時間～60時間を隔てて、60時間～72時間を隔てて、72時間～84時間を隔てて、84時間～96時間を隔てて、または96時間～120時間を隔てて投与され得る。2つ以上の療法は、患者の1回の同じ来院時に投与され得る。

20

## 【0212】

本開示の抗体または抗体共役体および他の療法は、周期的に投与され得る。周期的療法は、ある期間にわたる第1の療法（例えば、第1の予防または治療剤）の投与、およびそれに続く、ある期間にわたる第2の療法（例えば、第2の予防または治療剤）の投与、および任意に、それに続く、ある期間にわたる第3の療法（例えば、予防または治療剤）等の投与、ならびにこの連続的投与の反復を含み、すなわち、該周期は、これらの療法のうちの1つに対する耐性の発生を軽減するため、および/またはこれらの療法のうちの1つの副作用を回避または軽減するため、および/またはこれらの療法の効力を改善するためのものである。

30

## 【0213】

ある実施形態において、本開示の抗体および抗体共役体は、インビボにおける適切な分布が確保されるように製剤化され得る。例えば、血液-脳関門(BBB)は、多数の高親水性化合物を排除する。本開示の治療化合物がBBB(所望により)を通過することを確保するために、それらは、例えば、リポソーム中に製剤化することができる。リポソームの製造方法に関しては、例えば、米国特許第4,522,811号、同第5,374,548号、および同第5,399,331号を参照。該リポソームは、特定の細胞または器官へ選択的に輸送される1つ以上の部分を含むことができ、したがって、標的とされる薬物送達を増強させる（例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照）。例示的な標的化部分には、ホラートまたはビオチン（例えば、Lowらの米国特許第5,416,016号を参照）、マンノシド(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)、抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140、M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)、界面活性

40

50

剤プロテインA受容体 (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)、p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)を参照、また、K. Keinänen、M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123、J. J. Killion、I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照)が含まれる。

【0214】

本開示は、投与を必要とする対象に、本開示の抗体または抗体共役体を含む医薬組成物を、単独で、または他の療法と組み合わせて投与するためのプロトコルを提供する。本開示の併用療法の療法(例えば、予防または治療剤)は、同時または連続的に対象に投与され得る。本開示の併用療法の療法はまた、周期的にも投与され得る。周期的療法は、ある期間にわたる第1の療法(例えば、第1の予防または治療剤)の投与、およびそれに続く、ある期間にわたる第2の療法(例えば、第2の予防または治療剤)の投与を含み、すなわち、該周期は、これらの療法のうちの1つに対する耐性の発生を軽減するため、および/またはこれらの療法のうちの1つの副作用を回避または軽減するため、および/またはこれらの療法の効力を改善するためのものである。

10

【0215】

本開示の併用療法の療法(例えば、予防または治療剤)は、同時に対象に投与され得る。「同時に」という用語は、厳密に同一時点での療法(例えば、予防または治療剤)の投与に限定されるものではなく、本開示の抗体またはその共役体が他の療法と共に作用して、それらがそれ以外の状態で投与された場合に比べて増加した利益をもたらすように、ある配列および時間間隔で、本開示の抗体または抗体共役体を含む医薬組成物が対象に投与されることを意味する。例えば、各療法は、同時に、または異なる時点においていずれかの順序で連続的に対象に投与され得るが、それらは、同時に投与されない場合には、所望の治療または予防効果が得られるよう時間的に十分に接近して投与されるべきである。各療法は、任意の適当な形態および任意の適当な経路で、別々に対象に投与され得る。種々の実施形態において、該療法(例えば、予防または治療剤)は、15分未満を隔てて、30分未満を隔てて、1時間未満を隔てて、約1時間を隔てて、約1時間~約2時間を隔てて、約2時間~約3時間を隔てて、約3時間~約4時間を隔てて、約4時間~約5時間を隔てて、約5時間~約6時間を隔てて、約6時間~約7時間を隔てて、約7時間~約8時間を隔てて、約8時間~約9時間を隔てて、約9時間~約10時間を隔てて、約10時間~約11時間を隔てて、約11時間~約12時間を隔てて、24時間を隔てて、4時間を隔てて、8時間を隔てて、72時間を隔てて、または1週間を隔てて、対象に投与される。他の実施形態において、2つ以上の療法(例えば、予防または治療剤)は、患者の同一来院時に投与される。

20

30

【0216】

該併用療法の予防または治療剤は、同じ医薬組成物中で対象に投与され得る。代替的に、該併用療法の予防または治療剤は、別々の医薬組成物中で対象に同時に投与され得る。該予防または治療剤は、同じまたは異なる投与経路により対象に投与され得る。

【0217】

均等物

前述の明細書は、当業者が、本開示を実施し得るのに十分なものであると見なされる。前述の説明および実施例は、本開示のある例示的な実施形態を詳細に示している。しかしながら、前記の説明がどんなに詳細に本文中に記載されているとしても、本開示は多数の様態で実施可能であり、本開示は添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従い解釈されるべきであると理解されよう。

40

【0218】

特許、特許出願、論文、教科書等を含む本明細書中で引用されているすべての参考文献、およびそれらの中で引用されている参考文献は、それらが既に組み込まれていない限りにおいて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

50

## 【 0 2 1 9 】

例示的な実施形態

1 . システイン操作された抗体であって、該システイン操作された抗体は、抗体重鎖の定常ドメインにおける少なくとも1つの表面アミノ酸残基における1つ以上のアミノ酸のシステイン残基への置換を含み、該システイン操作された抗体は、少なくとも1つのチオール基を含む、システイン操作された抗体。

2 . 前記抗体が2つ以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

3 . 前記抗体が4つ以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

4 . 前記抗体が6つ以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

5 . 前記抗体が8つ以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

6 . 前記抗体が10以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

7 . 前記抗体が12以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

8 . 前記抗体が14以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

9 . 前記抗体が16以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

10 . 前記抗体が18以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

11 . 前記抗体が20以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

12 . 前記抗体が22以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

13 . 前記抗体が24以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

14 . 前記抗体が26以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

15 . 前記抗体が28以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

16 . 前記抗体が30以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

17 . 前記抗体が32以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

18 . 前記抗体が34以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

19 . 前記抗体が36以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

20 . 前記抗体が38以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

21 . 前記抗体が40以上のチオール基を含む、実施形態1に記載のシステイン操作された抗体。

## 【 0 2 2 0 】

22 . 前記表面アミノ酸残基は、239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選

10

20

30

40

50

扱われる、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

2 3 . 前記抗体は、前記抗体の C H 1 ドメインの 1 3 1 位、1 3 2 位、1 3 3 位、1 3 4 位、1 3 5 位、1 3 6 位、1 3 7 位、1 3 8 位、および 1 3 9 位から選択される位置でのシステイン残基への置換をさらに含む、実施形態 1 ~ 2 2 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

【 0 2 2 1 】

2 4 . 前記システイン操作された抗体は、特定の標的に対して、システイン操作前の抗体と同じまたはそれより高い結合親和性を示す、実施形態 1 ~ 2 3 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

2 5 . 前記システイン操作された抗体は、特定の標的に対して、システイン操作前の抗体と同じまたはそれより低い結合親和性を示す、実施形態 1 ~ 4 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

2 6 . 前記システイン操作された抗体は、システイン操作前の抗体と同じ、それより低い、またはそれより高い結合親和性を示す、実施形態 1 ~ 2 5 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

2 7 . 前記システイン操作された抗体は、システイン操作前の抗体と同じまたはそれより高いレベルの抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) を誘導する、実施形態 1 ~ 2 6 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

2 8 . 前記システイン操作された抗体は、システイン操作前の抗体より低いレベルの抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) を誘導する、実施形態 1 ~ 2 6 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

2 9 . 前記システイン操作された抗体は、システイン操作前の抗体と同じまたはそれより高いレベルの抗体依存性補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) を誘導する、実施形態 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

3 0 . 前記システイン操作された抗体は、システイン操作前の抗体と同じまたはそれより低いレベルの抗体依存性補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) を誘導する、実施形態 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

【 0 2 2 2 】

3 1 . 前記システイン操作された抗体は、断片化、T m、および/または凝集プロファイルにより測定すると、システイン操作前の抗体と同じまたはそれより高いレベルの安定性を示す、実施形態 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

3 2 . 前記システイン操作された抗体は、断片化、T m、および/または凝集プロファイルにより測定すると、システイン操作前の抗体より低いレベルの安定性を示す、実施形態 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

3 3 . 前記システイン操作された抗体は、システイン操作前の抗体と比較して、改善されたまたは低減した半減期を示す、実施形態 1 ~ 3 2 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

【 0 2 2 3 】

3 4 . 前記チオール基は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、非天然アミノ酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、またはビオチンへの化学的共役が可能である、実施形態 1 ~ 3 3 のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

3 5 . 前記細胞傷害性薬剤は、抗チューブリン剤、DNAマイナーグループ結合剤、抗ミトメタンサノイド、およびアウリスタチンから選択される、実施形態 3 4 に記載のシステイン操作された抗体。

3 6 . 前記化学療法剤は、タキソール、パクリタキセル、ドキソルビシン、メトトレキサート、ドラスタチン、ピンカアルカロイド、メトトレキサート、およびデュオカルマイシンから選択される、実施形態 3 4 に記載のシステイン操作された抗体。

3 7 . 前記毒素は、アプリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノ

10

20

30

40

50

ール、アルファ毒素、ゲルダナマイシン、ゲロニン、ロタウストラリン、リシン、ストリキニーネ、およびテロドトキシンから選択される、実施形態34に記載のシステイン操作された抗体。

38. 前記放射性核種は、クロミウム ( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト ( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ゲルマニウム ( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム ( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタニウム ( $^{140}\text{La}$ )、ルテチウム ( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン ( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、リン ( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジミウム ( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム ( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム ( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテニウム ( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム ( $^{47}\text{Sc}$ )、セレンウム ( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム ( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ )、および亜鉛 ( $^{65}\text{Zn}$ ) から選択される、実施形態34に記載のシステイン操作された抗体。

【0224】

39. 前記抗体は、内在化抗体である、実施形態34に記載のシステイン操作された抗体。

40. 前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体様分子である、実施形態1~39のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。

【0225】

41. 実施形態1~40のいずれかに記載のシステイン操作された抗体の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸。

42. 実施形態41に記載の核酸を含むベクター。

43. 実施形態42に記載のベクターを含む宿主細胞。

44. 実施形態1~40のいずれかに記載のシステイン操作された抗体の抗体共役体。

45. 実施形態44に記載の抗体共役体を含む医薬組成物。

【0226】

46. 検出を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を検出する方法であって、実施形態45に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

47. 前記疾患または障害は、前記抗体共役体により結合される細胞表面抗原を過剰発現する細胞を含む、実施形態46に記載の方法。

48. 標的細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の実施形態44に記載の抗体共役体と前記細胞を接触させることを含む、方法。

49. 対象において、標的細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の実施形態45に記載の組成物を投与することを含む、方法。

50. 前記標的細胞は、前記抗体共役体により結合される細胞表面抗原を過剰発現する細胞を含む、実施形態48または49に記載の方法。

51. 治療を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を治療する方法であって、治療有効量の実施形態45に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

52. 前記疾患または障害は、前記抗体共役体により結合される細胞表面抗原を過剰発現する細胞を含む、実施形態51に記載の方法。

53. 前記方法は、前記疾患と関連する細胞を殺すまたは該細胞の増殖速度を低減することを含む、実施形態51に記載の方法。

54. 前記方法は、B細胞またはT細胞を枯渇することを含む、実施形態51に記載の方法。

10

20

30

40

50

55. 追加の療法を施すことを含み、前記追加の療法が、化学療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法、ホルモン療法、および外科手術から選択される、実施形態51に記載の方法。

【0227】

56. 実施形態1~40のいずれかに記載のシステイン操作された抗体に異種分子を効率的に共役させるための方法。

57. 前記方法は、抗体のFc領域の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される少なくとも1つの位置に、前記異種分子を共役させることを含む、実施形態56に記載の方法。

10

58. 前記異種分子は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、またはビオチンから選択される、実施形態56または57に記載の方法。

59. 前記細胞傷害性薬剤は、抗チューブリン剤、DNAマイナーグループ結合剤、抗ミトメイトサンノイド、およびアウリスタチンから選択される、実施形態58に記載の方法。

60. 前記化学療法剤は、タキソール、パクリタキセル、ドキソルビシン、メトトレキサート、ドラスタチン、ピンカアルカロイド、およびメトトレキサートから選択される、実施形態58に記載の方法。

20

61. 前記毒素は、アプリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール、アルファ毒素、ゲルダナマイシン、ゲロニン、ロタウストラリン、リシン、ストリキニーネ、およびテトロドトキシンから選択される、実施形態58に記載の方法。

62. 前記放射性核種は、クロミウム ( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト ( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ゲルマニウム ( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム ( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタニウム ( $^{140}\text{La}$ )、ルテチウム ( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン ( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、リン ( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジミウム ( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム ( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム ( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテニウム ( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム ( $^{47}\text{Sc}$ )、セレンウム ( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム ( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ )、および亜鉛 ( $^{65}\text{Zn}$ ) から選択される、実施形態58に記載の方法。

30

【0228】

63. 共役の効率は、共役反応後に残留する残りのチオール基によって測定した場合、少なくとも5%またはそれ以上である、実施形態56~62のいずれかに記載の方法。

64. 前記効率は、共役反応後に残留する残りのチオール基によって測定した場合、少なくとも25%またはそれ以上である、実施形態56~63のいずれかに記載の方法。

40

65. 前記効率は、共役反応後に残留する残りのチオール基によって測定した場合、少なくとも75%またはそれ以上である、実施形態56~64のいずれかに記載の方法。

【0229】

66. 操作された抗体であって、抗体のFc領域のCH2および/またはCH3ドメインの少なくとも1つの表面アミノ酸残基において1つ以上のアミノ酸の非天然に生じる残基への置換を含み、

前記操作された抗体は、少なくとも1つの反応基を含み、

前記非天然に生じる残基は、システイン、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、セレノメチオニン、および非天然アミノ酸から選択される、操作された抗体。

50

67. 前記抗体は、2つ以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
68. 前記抗体は、4つ以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
69. 前記抗体は、6つ以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
70. 前記抗体は、8つ以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
71. 前記抗体は、10以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
72. 前記抗体は、12以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
73. 前記抗体は、14以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
74. 前記抗体は、16以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
75. 前記抗体は、18以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。 10
76. 前記抗体は、20以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
77. 前記抗体は、22以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
78. 前記抗体は、24以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
79. 前記抗体は、26以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
80. 前記抗体は、28以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
81. 前記抗体は、30以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
82. 前記抗体は、32以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
83. 前記抗体は、34以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
84. 前記抗体は、36以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
85. 前記抗体は、38以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。 20
86. 前記抗体は、40以上の置換を含む、実施形態66に記載の操作された抗体。
- 【0230】
87. 前記表面アミノ酸残基は、239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される、実施形態66～86のいずれかに記載のシステイン操作された抗体。
88. 前記抗体は、前記抗体のCH1ドメインの131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、および139位から選択される位置で、システインへの置換をさらに含む、実施形態66～87のいずれかに記載の操作された抗体。 30
- 【0231】
89. 前記操作された抗体は、特定の標的に対して、操作前の抗体と同じまたはそれより高い結合親和性を示す、実施形態66～88のいずれかに記載の操作された抗体。
90. 前記操作された抗体は、特定の標的に対して、操作前の抗体より低い親和性を示す、実施形態66～89のいずれかに記載の操作された抗体。
91. 前記操作された抗体は、1つ以上のIgG Fc受容体に対して、操作前の抗体と同じ、低減した、またはそれより高い結合親和性を示す、実施形態66～90のいずれかに記載の操作された抗体。
92. 前記操作された抗体は、操作前の抗体と同じまたはそれより高いレベルの抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を誘導する、実施形態66～91のいずれかに記載の操作された抗体。 40
93. 前記操作された抗体は、操作前の抗体より低いレベルの抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を誘導する、実施形態66～91のいずれかに記載の操作された抗体。
94. 前記操作された抗体は、操作前の抗体と同じまたはそれより高いレベルの抗体依存性補体依存性細胞傷害性(CDC)を誘導する、実施形態66～91のいずれかに記載の操作された抗体。
95. 前記操作された抗体は、操作前の抗体より低いレベルの抗体依存性補体依存性細胞傷害性(CDC)を誘導する、実施形態66～91のいずれかに記載の操作された抗体。
- 【0232】
96. 前記操作された抗体は、断片化、Tm、および/または凝集プロファイルにより測 50

定すると、操作前の抗体と同じまたはそれより高いレベルの安定性を示す、実施形態 66 ~ 95 のいずれかに記載の操作された抗体。

97. 前記操作された抗体は、断片化、Tm、および/または凝集プロファイルにより測定すると、操作前の抗体より低いレベルの安定性を示す、実施形態 66 ~ 95 のいずれかに記載の操作された抗体。

98. 前記操作された抗体は、操作前の抗体と比較して、増加したまたは低減した半減期を示す、実施形態 66 ~ 97 のいずれかに記載の操作された抗体。

#### 【0233】

99. 前記チオール基は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、非天然アミノ酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、またはビオチンへの化学的共役が可能である、実施形態 66 ~ 98 のいずれかに記載の操作された抗体。

100. 前記細胞傷害性薬剤は、抗チューブリン剤、DNAマイナーグループ結合剤、抗ミトメイトサンノイド、およびアウリスタチンから選択される、実施形態 99 に記載の操作された抗体。

101. 前記化学療法剤は、タキソール、パクリタキセル、ドキシソルピシン、メトトレキサート、ドラスタチン、ピンカアルカロイド、メトトレキサート、およびデュオカルマイシンから選択される、実施形態 99 に記載の操作された抗体。

102. 前記毒素は、アプリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール、アルファ毒素、ゲルダナマイシン、ゲロニン、ロタウストラリン、リシン、ストリキニーネ、およびテトロドトキシンから選択される、実施形態 99 に記載の操作された抗体。

103. 前記放射性核種は、クロミウム ( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト ( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ゲルマニウム ( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム ( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタニウム ( $^{140}\text{La}$ )、ルテチウム ( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン ( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、リン ( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジミウム ( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム ( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム ( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテニウム ( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム ( $^{47}\text{Sc}$ )、セレンウム ( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム ( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ )、および亜鉛 ( $^{65}\text{Zn}$ ) から選択される、実施形態 99 に記載の操作された抗体。

#### 【0234】

104. 前記抗体は、内在化抗体である、実施形態 99 に記載の操作された抗体。

105. 前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体様分子である、実施形態 66 ~ 104 のいずれかに記載の操作された抗体。

#### 【0235】

106. 実施形態 66 ~ 105 のいずれかに記載の操作された抗体の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸。

107. 実施形態 106 に記載の核酸を含むベクター。

108. 実施形態 107 に記載のベクターを含む宿主細胞。

109. 実施形態 66 ~ 105 のいずれかに記載の操作された抗体の抗体共役体。

110. 実施形態 109 に記載の抗体共役体を含む医薬組成物。

#### 【0236】

111. 検出を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または

10

20

30

40

50

障害を検出する方法であって、実施形態 1 1 0 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

1 1 2 . 前記疾患または障害は、前記抗体共役体により結合される細胞表面抗原を過剰発現する細胞を含む、実施形態 1 1 1 に記載の方法。

1 1 3 . 標的細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の実施形態 1 0 9 に記載の抗体共役体と前記細胞を接触させることを含む、方法。

1 1 4 . 対象において、標的細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の実施形態 1 1 0 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

1 1 5 . 前記標的細胞は、前記抗体共役体により結合される細胞表面抗原を過剰発現する細胞を含む、実施形態 1 1 3 または 1 1 4 に記載の方法。

1 1 6 . 治療を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を治療する方法であって、治療有効量の実施形態 1 1 0 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

1 1 7 . 前記疾患または障害は、前記抗体共役体により結合される細胞表面抗原を過剰発現する細胞を含む、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

1 1 8 . 前記方法は、前記疾患と関連する細胞を殺すまたは該細胞の増殖速度を低減することを含む、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

1 1 9 . 前記方法は、B 細胞または T 細胞を枯渇することを含む、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

1 2 0 . 追加の療法を施すことを含み、前記追加の療法が、化学療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法、ホルモン療法、および外科手術から選択される、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

#### 【 0 2 3 7 】

1 2 1 . 実施形態 6 6 ~ 1 0 5 のいずれかに記載の操作された抗体に異種分子を効率的に共役させるための方法。

1 2 2 . 前記方法は、前記抗体の F c 領域の 2 3 9 位、2 8 2 位、2 8 9 位、2 9 7 位、3 1 2 位、3 2 4 位、3 3 0 位、3 3 5 位、3 3 7 位、3 3 9 位、3 5 6 位、3 5 9 位、3 6 1 位、3 8 3 位、3 8 4 位、3 9 8 位、4 0 0 位、4 4 0 位、4 2 2 位、および 4 4 2 位から選択される少なくとも 1 つの位置に、前記異種分子を共役させることを含む、実施形態 1 2 1 に記載の方法。

1 2 3 . 前記異種分子は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、またはビオチンから選択される、実施形態 1 2 1 または 1 2 2 に記載の方法。

1 2 4 . 前記細胞傷害性薬剤は、抗チューブリン剤、DNA マイナーグループ結合剤、抗ミトメタンサノイド、およびアウリスタチンから選択される、実施形態 1 2 3 に記載の方法。

1 2 5 . 前記化学療法剤は、タキソール、パクリタキセル、ドキソルピシン、メトトレキサート、ドラスチン、ピンカアルカロイド、およびメトトレキサートから選択される、実施形態 1 2 3 に記載の方法。

1 2 6 . 前記毒素は、アプリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール、アルファ毒素、ゲルダナマイシン、ゲロニン、ロタウストラリン、リシン、ストリキニーネ、およびテトロドトキシンから選択される、実施形態 1 2 3 に記載の方法。

1 2 7 . 前記放射性核種は、クロミウム ( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト ( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ゲルマニウム ( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム ( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタニウム ( $^{140}\text{La}$ )、ルテチウム ( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン ( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、リン ( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジミウム ( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム ( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム ( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテ

10

20

30

40

50

ニウム ( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム ( $^{47}\text{Sc}$ )、セレンウム ( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム ( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ )、および亜鉛 ( $^{65}\text{Zn}$ ) から選択される、実施形態 123 に記載の方法。

【0238】

128. 前記効率は、共役反応後に残留する残りのチオール基によって測定した場合、少なくとも 5% またはそれ以上である、実施形態 121 ~ 127 のいずれかに記載の方法。

129. 前記効率は、共役反応後に残留する残りのチオール基によって測定した場合、少なくとも 25% またはそれ以上である、実施形態 121 ~ 128 のいずれかに記載の方法。

10

130. 前記効率は、共役反応後に残留する残りのチオール基によって測定した場合、少なくとも 75% またはそれ以上である、実施形態 121 ~ 129 のいずれかに記載の方法。

【0239】

131. 抗体の Fc 領域であって、239 位、282 位、289 位、297 位、312 位、324 位、330 位、335 位、337 位、339 位、356 位、359 位、361 位、383 位、384 位、398 位、400 位、440 位、422 位、および 442 位から選択される 1 つ以上のアミノ酸の置換を含む、前記 Fc 領域。

20

132. 前記 Fc 領域は、

- a) 289 および 440、
- b) 330 および 440、
- c) 339 および 440、
- d) 359 および 440、
- e) 289 および 359、
- f) 330 および 359、
- g) 339 および 359、
- h) 289 および 339、
- i) 330 および 339、
- j) 289 および 330、ならびに
- k) 339 および 442

30

の置換対のうちの 1 つ以上を含む、実施形態 131 に記載の Fc 領域。

133. 前記 Fc 領域は、

- a) 289、339、および 442、
- b) 289、330、および 339、
- c) 330、339、および 442、ならびに
- d) 289、330、および 442

の置換群のうちの 1 つ以上を含む、実施形態 131 および 132 に記載の Fc 領域。

【0240】

40

134. 前記 Fc 領域は、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 アイソタイプから選択される、実施形態 131 ~ 133 のいずれかに記載の Fc 領域。

135. 前記置換は、システイン、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、およびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸への置換を含む、実施形態 131 ~ 133 のいずれかに記載の Fc 領域。

136. 前記置換は、システインを含む、実施形態 1 ~ 134 のいずれかに記載の Fc 領域。

137. 前記システインは、チオール基を含む、実施形態 136 に記載の Fc 領域。

138. 前記チオール基は、化学的共役が可能である、実施形態 137 に記載の Fc 領域。

50

139. 前記Fc領域は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、非天然アミノ酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、およびビオチンのうちの1つ以上と共役させられる、請求項138に記載のFc領域。

【0241】

140. 実施形態1～139のいずれかに記載のFc領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

141. 前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体様分子である、実施形態140に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

142. 前記抗体は、前記抗体のCH1ドメインの131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、および139位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換をさらに含む、実施形態140に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

143. 実施形態131～142のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。

144. 検出を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を検出する方法であって、抗体またはその抗原結合フラグメントを前記対象に投与することを含み、操作された抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換を含む、方法。

145. 治療を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を治療する方法であって、治療有効量の抗体またはその抗原結合フラグメントを前記対象に投与することを含み、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換を含む、方法。

【0242】

146. 実施形態1～145のいずれかに記載のFc領域をコードする配列を含む核酸。

147. 配列番号1～24の配列から選択されるアミノ酸配列をコードする配列を含む、実施形態146に記載の核酸。

148. 実施形態146および147のいずれかに記載の核酸を含む宿主細胞。

149. 哺乳動物細胞である、実施形態148に記載の宿主細胞。

【0243】

150. 抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する方法であって、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させるために適切な条件下で、実施形態148に記載の宿主細胞をインキュベートするステップと、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを単離するステップを含む、方法。

【0244】

151. 抗体のFc領域を含む組成物であって、前記Fc領域は、239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換を含む組成物。

152. 前記Fc領域は、

a) 289および440、

b) 330および440、

10

20

30

40

50

- c) 3 3 9 および 4 4 0、
- d) 3 5 9 および 4 4 0、
- e) 2 8 9 および 3 5 9、
- f) 3 3 0 および 3 5 9、
- g) 3 3 9 および 3 5 9、
- h) 2 8 9 および 3 3 9、
- i) 3 3 0 および 3 3 9、
- j) 2 8 9 および 3 3 0、ならびに
- k) 3 3 9 および 4 4 2

の置換対のうちの1つ以上を含む、実施形態151に記載のFc領域。

10

153. 前記Fc領域は、

- a) 2 8 9、3 3 9、および 4 4 2、
- b) 2 8 9、3 3 0、および 3 3 9、
- c) 3 3 0、3 3 9、および 4 4 2、ならびに
- d) 2 8 9、3 3 0、および 4 4 2

の置換群のうちの1つ以上を含む、実施形態151および152に記載のFc領域。

【0245】

154. 前記Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプから選択される、実施形態151～153のいずれかに記載のFc領域。

155. 前記置換は、システイン、リシン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステイン、およびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸への置換を含む、実施形態151～154のいずれかに記載のFc領域。

20

156. 前記置換は、システインを含む、実施形態1～154のいずれかに記載のFc領域。

【0246】

157. 前記システインは、チオール基を含む、実施形態156に記載のFc領域。

158. 前記チオール基は、化学的共役が可能である、実施形態157に記載のFc領域。

159. 前記Fc領域は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、毒素、放射性核種、DNA、RNA、siRNA、マイクロRNA、ペプチド核酸、非天然アミノ酸、ペプチド、酵素、蛍光タグ、およびビオチンのうちの1つ以上と共役させられる、請求項158に記載のFc領域。

30

【0247】

160. 実施形態1～159のいずれかに記載のFc領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

161. 前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体様分子である、実施形態160に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

162. 前記抗体は、前記抗体のCH1ドメインの131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、および139位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換をさらに含む、実施形態160に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

163. 実施形態151～162のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。

【0248】

164. 検出を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を検出する方法であって、抗体またはその抗原結合フラグメントを前記対象に投与することを含み、操作された抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、4

50

40位、422位、および442位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換を含む、方法。

165. 治療を必要とする対象において、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾患または障害を治療する方法であって、治療有効量の抗体またはその抗原結合フラグメントを前記対象に投与することを含み、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖の239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位、および442位から選択される1つ以上のアミノ酸の置換を含む、方法。

【0249】

166. 実施形態131～165のいずれかに記載のFc領域をコードする配列を含む核酸。

167. 配列番号1～24の配列から選択されるアミノ酸配列をコードする配列を含む、実施形態166に記載の核酸。

168. 実施形態166および167のいずれかに記載の核酸を含む宿主細胞。

169. 哺乳動物細胞である、実施形態168に記載の宿主細胞。

【0250】

170. 抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する方法であって、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させるために適切な条件下で、実施形態168に記載の宿主細胞をインキュベートするステップと、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを単離するステップを含む、方法。

171. 配列番号1～24から選択されるアミノ酸配列を含む組成物。

【実施例】

【0251】

## 8. 実施例

次に、本開示を、次の実施例を参照して説明する。これらの実施例は、例証目的のために提供されるにすぎず、本開示は、これらの実施例に限定されるものとして決して解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書に提供される教示の結果としてより明白となる任意かつすべての変形を包含するものとして解釈されるべきである。

【0252】

### 8.1 実施例1. 単一変異体のシステイン操作された抗体の発現および特徴づけ

一連のシステイン置換を、IgG1分子のCH2およびCH3ドメインの表面領域(図1を参照)およびFc空洞(cavity)(例えば、Leu398)の表面露出領域に施した。システイン操作されたIgG1分子を、標準的なDNA組換え技術を用いて生成した(例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, December 2000, Cold Spring Harbor Lab Pressを参照)。IgG1分子中に存在するCH2およびCH3ドメインの表面領域は、溶媒露出される領域に相当する。これらの領域が示す溶媒への露出は、領域内の特異的残基への試薬の共役を可能にする。CH2および/またはCH3ドメインの表面上にあることが予測される種々のアミノ酸は、システイン残基で置換されるべき特定の候補アミノ酸である。

【0253】

図2においては、ND1野生型およびそのシステイン操作された誘導体を発現させ、精製し、PAGE分析に付した。ND1天然抗体(レーン1)およびその種々のシステイン操作された誘導体(レーン2～21、クローンND2～21に相当する)は、還元条件下で非常に類似した分子量プロファイルを示した。これらの結果は、組換えシステイン操作された抗体が、十分に発現し、対照レーンと比較してそれらの予測された分子量を保持することを示唆している。

【0254】

図3においては、すべての組換えシステイン操作されたタンパク質は、プロテインAに

10

20

30

40

50

よって精製され、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析し、SEC-HPLCにおいて分析した。サンプルの同一性を図に図式的に表示する。右から左の標準タンパク質（点線で示したクロマトグラム）のピーク位置は、チログロブリン670kDa；2、ウシガンマグロブリン158kDa；3、ニワトリオボアルブミン44kDa；4、ウマミオグロビン17kDa；5、ビタミンB12 13.5kDaである。変異抗体保持時間は、約8.6分であり、これは、約150kDaの分子量に相当する。各変異に対する単量体含有率を示す。各変異体（ND2～21）は、天然抗体（ND-1）と比較して、類似のSEC溶出プロファイルを示した。この分析は、それらの期待される分子量を保持することに加えて組換えタンパク質が、導入されたシステインにより、ジスルフィド結合ホモ二量体を形成しないことを確認する。

10

## 【0255】

図4は、ND1（天然）の重鎖定常ドメイン配列の配列を示す。図4aは、変異体ND2からND6の配列を示す。図4bは、変異体ND7からND11の配列を示す。図4cは、変異体ND12からND16の配列を示す。図4dは、変異体ND17からND21の配列を示す。ND2からND21の導入した点変異を、下線および太字により表す。

## 【0256】

ND1からND21はそれぞれ、配列番号1～21を有する。各々は、ヒトIgG1に対してHC Fcに由来する。

## 【0257】

図5は、Fcシステイン変異体の組換え発現を示す。変異体の各々は、天然ND1に匹敵する発現レベルがあった。さらに、ND5を除く各々の変異体は、93%で、または93%を超えるモノマーで発現した（SEC-HPLCによって判定される）。それらはまた、天然ND1（MALLSによって判定される）と類似の分子量および流体力学半径を有した（データ示されず）。

20

## 【0258】

図6は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって判定されたシステインFc操作された変異体のFcRn結合を示す。70%単量体である変異体ND5（D312C）、および非グリコシル化変異体ND20（N297C）は別として、変異体は、天然抗体ND1と類似のFcRnへの結合シグナルを保持する。

## 【0259】

示差走査熱量測定（DSC）を使用して、図7に示される天然およびシステイン操作された抗体の融解温度（ $T_m$ ）を決定した。DSC実験は、10～110の範囲の温度の関数として、本開示の抗体の熱容量を測定した。DSC測定は、Microcal VP-DSC超高感度走査マイクロ熱量計を用いて行った。DSC実験は、25mMヒスチジン-HCl pH6、5mM EDTA中で行った。DSCのために使用された溶液およびサンプルは、0.22ミクロンフィルターを使用して濾過し、熱量計内への充填直前に脱気した。各組の測定に関して、まず、バッファー対ベースライン実施を行った。この直後に、該バッファー溶液をサンプル細胞から除去した。該サンプル細胞に、0.5～1mg/mLの濃度の0.5mLの抗体（天然およびシステイン操作された）溶液を充填した。測定中、参照細胞をサンプルバッファーで満たした。各々のサンプル対バッファー実験から、対応するバッファー対バッファーベースライン実施を差し引いた。生データを濃度および走査速度に関して正規化した。Microcalにより提供されたOrigin DSCソフトウェアを用いて、該データを適合させた。

30

40

## 【0260】

図7に示されるND1～21のDSC分析を、pH6.0の25mM His緩衝液を用いて、15から110の範囲で、1/分で行った。変異体ND5（D312C）、ND11（E356C）、およびND20（N297C）を除いて、変異体は、天然ND1に対して類似のDSCプロファイルを有する。

## 【0261】

図8は、1mgスケールでの操作された抗体へのピオチン-PEG2-マレイミドの共

50

役および対照ND1における種々のプロトコルを示す。これらの実験におけるビオチン部分は、薬物と置き換えることができ、ビオチンは、共役のモデルとしての役割を果たす。PEG2は、リンカーであり、マレイミド部分は、システインと反応する。「TCEP」は、トリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィンを示す。別途特定されない限り、モル抗体に関してモル過剰を示す。

#### 【0262】

図9は、共役プロトコルDからのサンプルにおける還元タンパク質ゲルのウエスタンブロットを示す。変異および天然タンパク質を、プロテインAによって精製し、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析した。1~21の数字は、それぞれ、ND1~21に相当する。Mは、分子量マーカである。Cは、軽鎖および重鎖の両方のリシン残基でのビオチンと共役した対照抗体である。サンプルは、まず、NuPage 10%ゲル上でSDS-PAGEによって分解された。移動させたタンパク質を有するブロットを、TBST 2%BSAでブロッキングし、アビジン-HRPでインキュベートし、HRPに対する発色性基質で可視化した。HCは、抗体重鎖に対応するタンパク質バンドであり、LCは、抗体軽鎖に対応するタンパク質バンドである。いくつかの変異体(特に、ND2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、18、19)の重鎖において顕著な共役があるが、ND1(天然)のHCにおいて検出可能な共役はない。ND1を含む、すべての変異体のLCにおいていくつかの共役がある。

10

#### 【0263】

図10は、共役プロトコルDからのサンプルにおいてクーマシー染色した非還元タンパク質ゲルを示す。すべての変異体および天然タンパク質を、プロテインAによって精製し、PBS 1X、10mM EDTA、pH7.2で透析し、還元および非還元条件下で、10%均一なSDS-PAGEにおいて分析した。SeeBlue Plus 2(Invitrogen)分子量標準(図式的に示されるようにkDaで)を使用した。3μgの各サンプルを充填し、ゲルをSimply Blue(商標)SafeStain(Invitrogen)を用いて染色した。1~21の数字は、それぞれ、ND1~21に相当する。Mは、分子量マーカである。ほとんどの共役変異体は、天然ND1と類似する電気泳動移動度パターンを示す。いくつかの共役変異体は、いくつかの明らかな二量体(ND3、5、13、15、17、18、19)を含有し、ある変異体は、いくつかの明らかな断片化(ND20)を示す。

20

30

#### 【0264】

図11は、プロトコルDにより共役された、ND変異体の無傷集団およびペプチドマッピングの結果を含む。変異体ND4、7、10、12、18は、操作されたシステインで、ほぼ90%または90%を超え、オリゴマー化がない、またはほとんどないことを示す。DARは、共役サンプルの薬物対抗体のモル比である。

#### 【0265】

### 8.2 実施例2. 二重変異体のシステイン操作された抗体の発現および特徴づけ

選択変異体に基づいて、DM1~DM11に付番された、図12に示される11個の二重変異体を構築した。二重変異体のうちの10個は、選択変異体ND4、ND7、ND10、ND12、ND18に基づき、別の二重変異体は、ND10およびND19に基づいた。

40

#### 【0266】

図13は、二重変異体の発現におけるデータを提供する。すべての二重変異体は、一過性トランスフェクションによって十分に発現した。これらの二重変異体のうちの4個DM8、DM9、DM10、DM11のみが、発現し、(UV検出によるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-UV)によって判定される)93%を超えるモノマーレベルで精製される。これらの4個の二重変異体は、天然ND1と類似するMWおよびRhを有する(データ示されず)。

#### 【0267】

二重ND変異体は、図14に見られるように、非還元SDS-PAGEにおいて分析さ

50

れた。「C」は、対照として、天然ND1である。「M」は、分子量標準である。1～10の数字は、DM1～10に相当する。SDS-PAGEの結果は、SEC-UVの結果と一致する。変異体DM1～7は、高い凝集パーセントを含む。変異体DM4は、最小量のモノマーを有し、DM8は、最大パーセントのモノマーを含有する。

【0268】

図15は、二重変異体のDSC分析からの結果を示す。His緩衝液が10mMであることを除いて、上記のようにDSCを分析した。4個の大部分が単量体(93%超)である二重変異体は、天然および単一変異体ND10と非常に類似するDSCプロファイルを示す。

【0269】

図16は、二重変異体の共役を分析するウエスタンブロット法およびクーマシー染色の結果を提供する。二重変異体DM8(ND4およびND10)とDM11(ND10およびND19)の共役は、プロトコルD(図6を参照)で、10:1のビオチン-マレイミド:抗体の比および20:1のビオチン-マレイミド:抗体の比を使用する。

【0270】

図16に記載されるように共役された二重変異体を無傷集団およびペプチドマッピングに付し、そのデータを図17に提供する。2個の二重変異体、DM8(ND4およびND10)およびDM11(ND10およびND19)は、操作されたシステインで、ほぼ90%または90%を超える共役を有する。DARは、共役サンプルの薬物対抗体のモル比である。

【0271】

### 8.3 実施例3. 修飾された共役プロトコル

共役反応をスケールアップする際の実験を行った。図18は、単一および二重ND変異体に行われた共役の結果を示す。TCEP処理後のより過剰な一晚透析の使用を除いて、共役プロトコルD(図8)を使用し、室温で1時間、それ自体の共役を行った。薬物:MAbのモル比は、単一変異体に対して10:1、二重変異体に対して20:1であった。

【0272】

図19は、前の図18に示されるように、単一および二重変異体の共役されたサンプルのペプチドマッピング分析の結果を示す。本表は、操作されたシステインでの共役の効率、ならびに全体の薬物対抗体比(DAR)を要約している。DM9"は、同じ変異を用いたDM9の第2の調製物である。

【0273】

### 8.4 実施例4. スケールアップ共役

図20は、スケールアップ共役実験の結果を示す。(a)2.5、(b)5、(c)10、(d)20、および(e)40mg/mLの抗体で、共役を行った。図18に記載される共役プロトコルを使用した。薬物:抗体のモル比は、10:1であった。タンパク質ゲルにおいて、「C」は、天然ND1である。

【0274】

図21は、スケールアップ共役のペプチドマッピングの結果を示す。前の図20からの共役されたサンプルをペプチドマッピング分析に付した。共役効率の結果を示す。該濃度は、TCEP処理中の抗体濃度、dhAAで刺激されたリフォールディングおよび共役に相当する。

【0275】

### 8.5 実施例5. 三重変異体のシステイン操作された抗体の発現および特徴づけ

4個の三重変異体は、選択変異体に基づいて開発された。図22は、T1～T4と称される、三重変異体における変異に対して選択された残基を示す。

【0276】

図23は、4個の三重変異体の発現およびモノマーレベルを提供する。タンパク質は、0.5Lの培養液から精製されたタンパク質であった。モノマーレベルを、SEC-HPLCにおいて判定した。比較のために、天然抗体ND1は、99%単量体である。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 7 】

図 2 4 は、ビオチン - マレイミドによる三重変異体の共役の結果を含む。T C E P / d h A A プロトコルは、室温で、1 時間、1 : 2 0 の抗体 : 薬物のモル比での共役を併用した。T 1 の 2 つの異なるタンパク質製剤を共役させた。共役特異性および効率のための対照として、天然 N D 1 および二重変異体 D M 1 1 を含んだ。

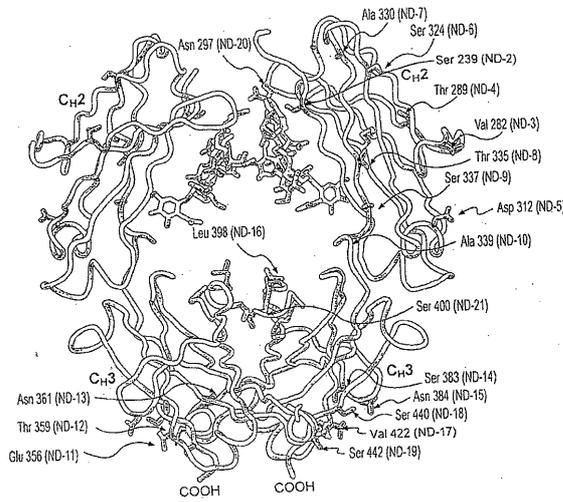
【 0 2 7 8 】

図 2 5 は、三重変異体のペプチドマッピングの結果を示す。前の図 2 4 からの共役された三重変異体サンプルを、ペプチドマッピング分析に付した。操作システインでの共役の効率を提示する。

【 0 2 7 9 】

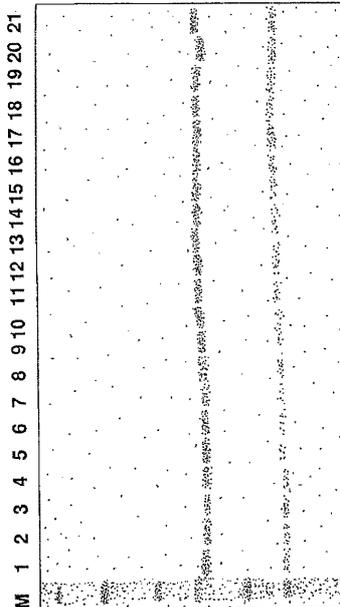
図 2 6 は、1 0 m M H i s 緩衝液を用いて、上記のように行われた三重変異体の D S C 分析を示す。T 1 は、第 1 の遷移、C H 2 に対して数度低い溶解温度を示す。T 2 は、8 5 で、沈殿物の一部を示す。T 3 は、高温で沈殿する。T 4 は、天然型とほぼ同一である。

【 図 1 】

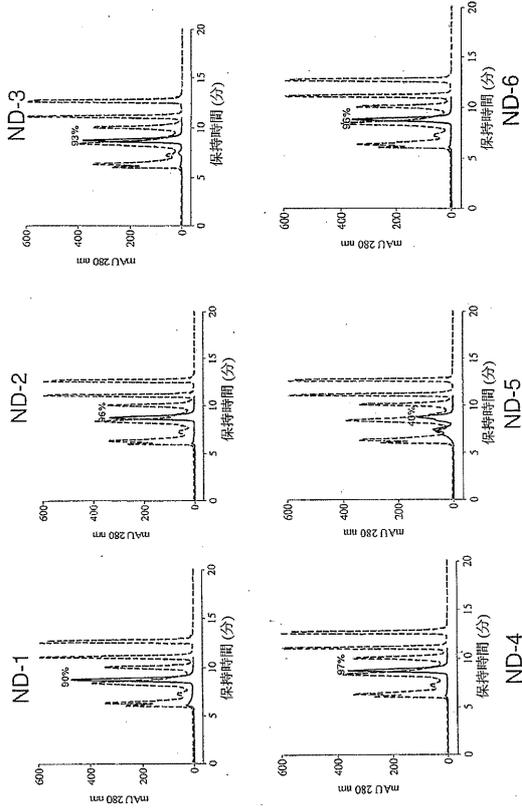


【 図 2 】

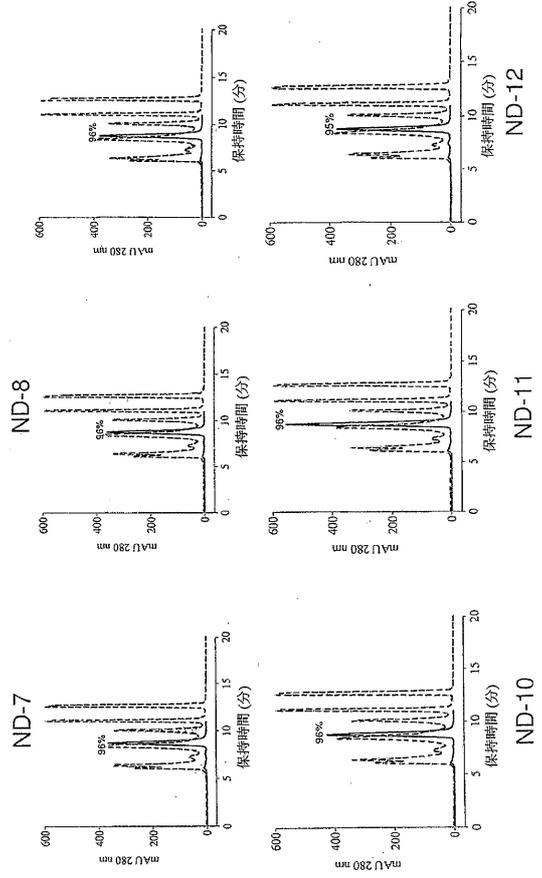
- M. SeeBlue Plus 2
1. ND-1 Fc-野生型
  2. ND-2 Fc-Ser239Cys
  3. ND-3 Fc-Val282Cys
  4. ND-4 Fc-Thr289Cys
  5. ND-5 Fc-Asp312Cys
  6. ND-6 Fc-Ser324Cys
  7. ND-7 Fc-Ala330Cys
  8. ND-8 Fc-Thr335Cys
  9. ND-9 Fc-Ser337Cys
  10. ND-10 Fc-Ala339Cys
  11. ND-11 Fc-Glu356Cys
  12. ND-12 Fc-Thr359Cys
  13. ND-13 Fc-Ans361Cys
  14. ND-14 Fc-Ser383Cys
  15. ND-15 Fc-Asn384Cys
  16. ND-16 Fc-Leu398Cys
  17. ND-17 Fc-Val422Cys
  18. ND-18 Fc-Ser440Cys
  19. ND-19 Fc-Ser442Cys
  20. ND-20 Fc-Asn297Cys
  21. ND-21 Fc-Ser400Cys



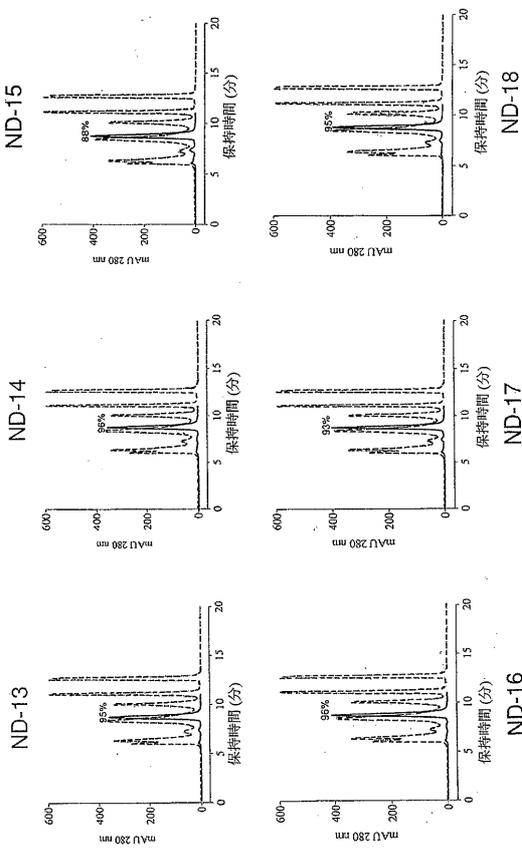
【 3 a 】



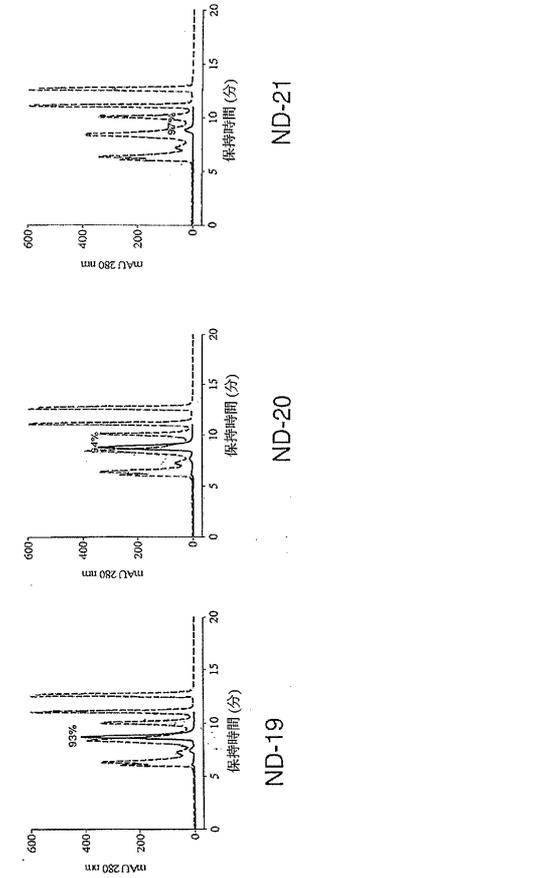
【 3 b 】



【 3 c 】



【 3 d 】





【 図 4 - 2 d )

>ND17-Fc-Vai42Cys  
 STKGSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVQDYFPEPTVSNNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYLSLSSVVTVFSSSLGTQYIICNVNHPGNTKV  
 DKRVPSKCDKHTPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLSRTPVETCVVDVSHEDPEVAFWYVDGVEVHNAKTKPREQVNSTYRVVS  
 VLTVLHQDMLNGKEYKCKYSNKALPAPTEKTSKAKQGPREFQVYTLPPSRREMTKQVSLTCLVKGFPYSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPV  
 LPSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCSVNHEALHNYTKSLSLSPGK

>ND18-Fc-Ser440Cys  
 STKGSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVQDYFPEPTVSNNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYLSLSSVVTVFSSSLGTQYIICNVNHPGNTKV  
 DKRVPSKCDKHTPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLSRTPVETCVVDVSHEDPEVAFWYVDGVEVHNAKTKPREQVNSTYRVVS  
 VLTVLHQDMLNGKEYKCKYSNKALPAPTEKTSKAKQGPREFQVYTLPPSRREMTKQVSLTCLVKGFPYSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPV  
 LPSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCSVNHEALHNYTKSLSLSPGK

>ND19-Fc-Ser442Cys  
 STKGSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVQDYFPEPTVSNNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYLSLSSVVTVFSSSLGTQYIICNVNHPGNTKV  
 DKRVPSKCDKHTPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLSRTPVETCVVDVSHEDPEVAFWYVDGVEVHNAKTKPREQVNSTYRVVS  
 VLTVLHQDMLNGKEYKCKYSNKALPAPTEKTSKAKQGPREFQVYTLPPSRREMTKQVSLTCLVKGFPYSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPV  
 LPSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCSVNHEALHNYTKSLSLSPGK

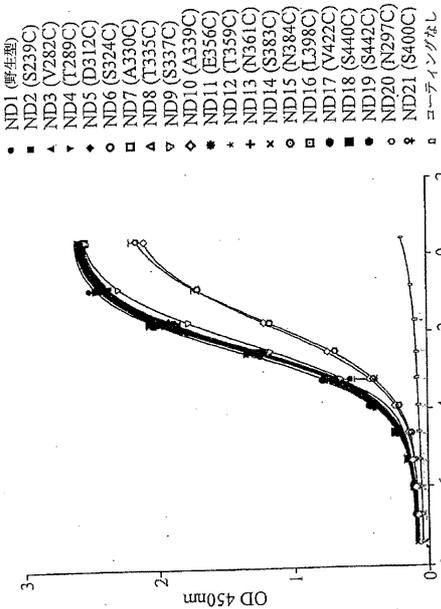
>ND20-Fc-Asn297Cys  
 STKGSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVQDYFPEPTVSNNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYLSLSSVVTVFSSSLGTQYIICNVNHPGNTKV  
 DKRVPSKCDKHTPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLSRTPVETCVVDVSHEDPEVAFWYVDGVEVHNAKTKPREQVNSTYRVVS  
 VLTVLHQDMLNGKEYKCKYSNKALPAPTEKTSKAKQGPREFQVYTLPPSRREMTKQVSLTCLVKGFPYSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPV  
 LPSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCSVNHEALHNYTKSLSLSPGK

>ND21-Fc-Ser440Cys  
 STKGSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVQDYFPEPTVSNNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYLSLSSVVTVFSSSLGTQYIICNVNHPGNTKV  
 DKRVPSKCDKHTPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLSRTPVETCVVDVSHEDPEVAFWYVDGVEVHNAKTKPREQVNSTYRVVS  
 VLTVLHQDMLNGKEYKCKYSNKALPAPTEKTSKAKQGPREFQVYTLPPSRREMTKQVSLTCLVKGFPYSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPV  
 LPSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCSVNHEALHNYTKSLSLSPGK

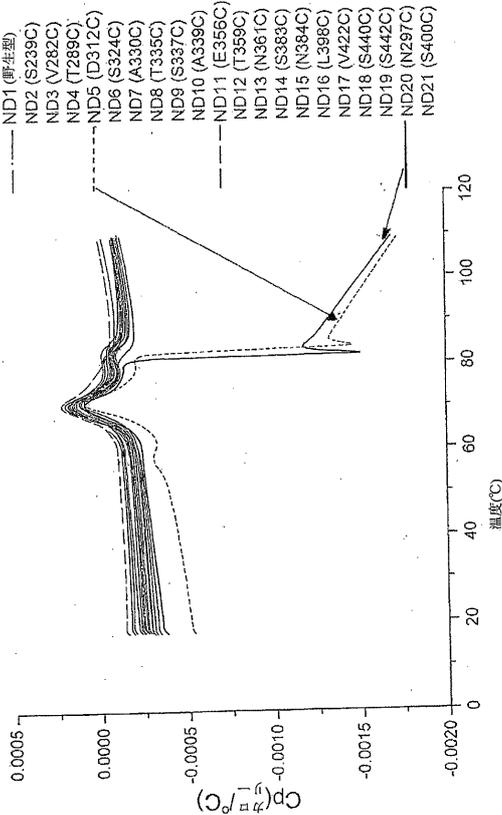
【 図 5 】

変異体名	変異	10 日目の一過性発現 (mg/l)	モノマー(%) SEC-UV
ND1	野生型	283	100
ND2	S239C	331	100
ND3	V282C	322	98
ND4	T289C	335	100
ND5	D312C	131	70
ND6	S324C	332	99
ND7	A330C	313	98
ND8	T335C	314	98
ND9	S337C	297	98
ND10	A339C	285	100
ND11	E356C	238	98
ND12	T359C	225	94
ND13	N361C	194	93
ND14	S383C	214	99
ND15	N384C	210	93
ND16	L398C	218	98
ND17	V422C	215	97
ND18	S440C	216	95
ND19	S442C	220	97
ND20	N297C	210	96
ND21	S400C	250	99

【 図 6 】



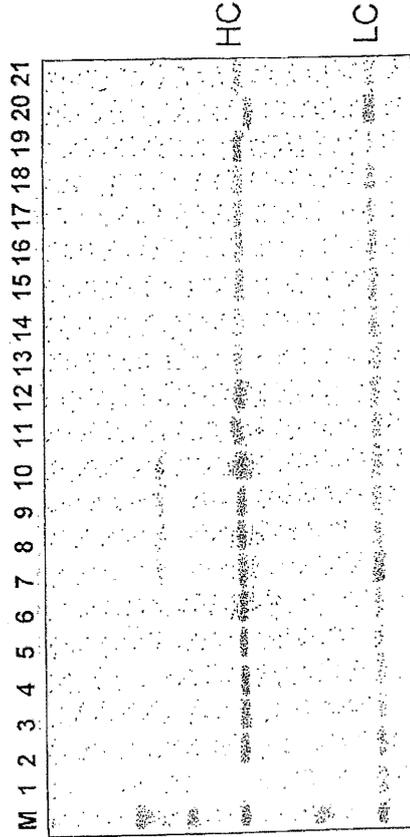
【 図 7 】



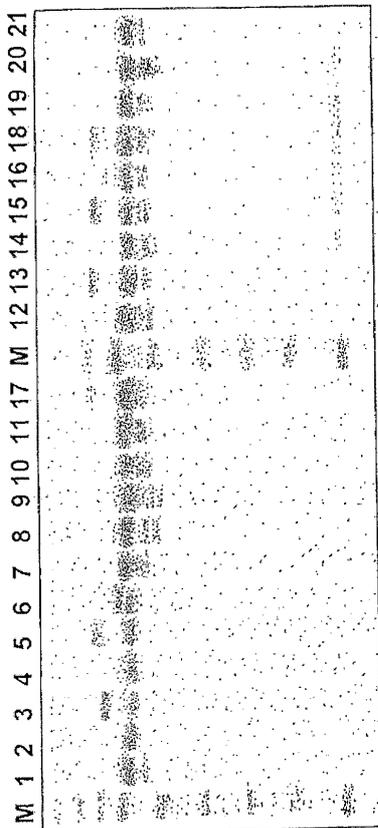
【 図 8 】

	A	B	C	D
1. 共役前処理	TCEP, 10 μM PBS, 10 mM EDTA, pH 7.2, 透析, 4°C	TCEP, 10 μM PBS, 10 mM EDTA, pH 7.2, 透析, 4°C	L-システイン, 20 倍モル過剰 37°C, 2時間	TCEP, 10 倍モル過剰, 22°C, 2時間
2. 共役前処理			PBS 中広範な透析, 10 mM EDTA, pH 7.2	PBS 中広範な透析, pH 7.2
3. 共役前処理				デヒドロアスコルビン酸, 20 倍モル過剰, 22°C, 3時間
4. 共役	DMSO 中ピオチン-PEG2-マレイミド, 10 倍モル過剰, 4°C, 30 分間	DMSO 中ピオチン-PEG2-マレイミド, 10 倍モル過剰, 4°C, 30 分間	DMSO 中ピオチン-PEG2-マレイミド, 10 倍モル過剰, 4°C, 30 分間	DMSO 中ピオチン-PEG2-マレイミド, 10 倍モル過剰, 4°C, 30 分間
5. 共役終了	N-アセチルシステイン, マレイミドに対して5倍モル過剰	N-アセチルシステイン, マレイミドに対して5倍モル過剰	N-アセチルシステイン, マレイミドに対して5倍モル過剰	N-アセチルシステイン, マレイミドに対して5倍モル過剰
6. 共役後	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C

【 図 9 】



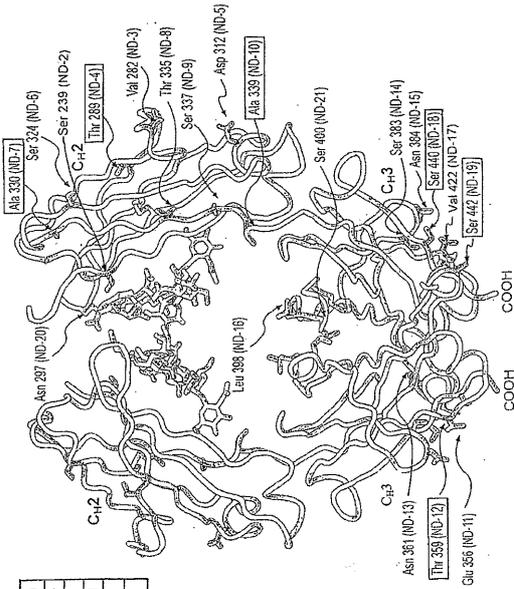
【 図 10 】



【 図 11 】

変異体	変異	ピオチンで共役されたヒンジ中のシステインの割合	ピオチンで共役されたヒンジ中の自然システインの割合	ピオチンで共役された軽鎖中の自然システインの割合	DAR
ND1	野生型	該当なし	0.1	2.1	該当なし
ND2	S239C	79.4	該当なし	4.7	1.6
ND3	V282C	91.5	0.4	8.2	1.8
ND4	T289C	94.9	0.1	3.1	1.9
ND5	D312C	68.7	0.8	6.1	1.4
ND6	S324C	63.1	0.3	6.3	1.3
ND7	A330C	95.4	7.9	12	1.9
ND8	T335C	57.6	4.2	7.3	1.2
ND9	S337C	4.7	0.3	3.6	0.1
ND10	A339C	89.1	0.5	3.7	1.8
ND11	E356C	55.4	0.1	3.2	1.1
ND12	T359C	92	0.1	3.2	1.8
ND13	N361C	49.9	0.1	3	1.0
ND14	S383C	36.4	0.1	2.5	0.7
ND15	N384C	91.7	0.1	3.9	1.8
ND16	L398C	65.7	0.4	4.4	1.3
ND17	V422C	83.3	0.1	3.5	1.7
ND18	S440C	90	0.1	2.7	1.8
ND19	S442C	34.1	0.1	3.3	0.7
ND20	N297C	24.2	22.1	23.9	0.5
ND21	S400C	71.8	0.2	4.2	1.4

【 図 1 2 】

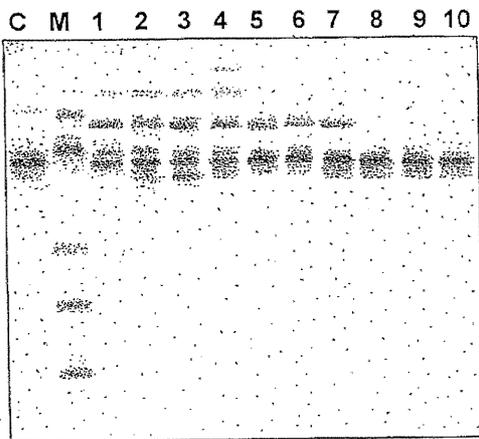


ND	4	7	10	12	18	19
18	1	2	3	4	X	X
12	5	6	7	X	X	X
10	8	9	X	X	X	11
7	10	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X

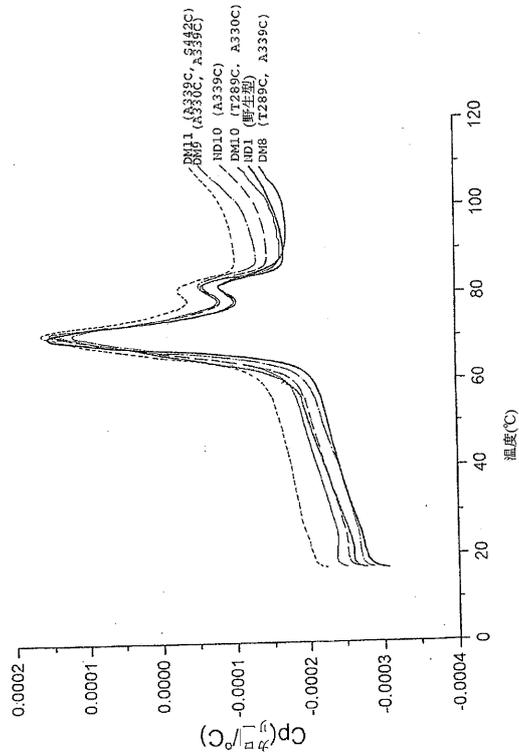
【 図 1 3 】

構造物	システイン変異	11 日目の発現 (mg/L)	モノマーレベル(%) SEC-UV
DM1	ND4 (T289C) ND18 (S440C)	193	74.8
DM2	ND7 (A330C) ND18 (S440C)	231	73.0
DM3	ND10 (A339C) ND18 (S440C)	227	78.6
DM4	ND12 (T359C) ND18 (S440C)	199	43.8
DM5	ND4 (T289C) ND12 (T359C)	198	74.4
DM6	ND7 (A330C) ND12 (T359C)	190	67.8
DM7	ND10 (A339C) ND12 (T359C)	213	76.6
DM8	ND4 (T289C) ND10 (A339C)	229	98.7
DM9	ND7 (A330C) ND10 (A339C)	228	93.2
DM10	ND4 (T289C) ND7 (A330C)	212	94.8
DM11	ND10 (A339C) ND19 (S442C)	275	98.1

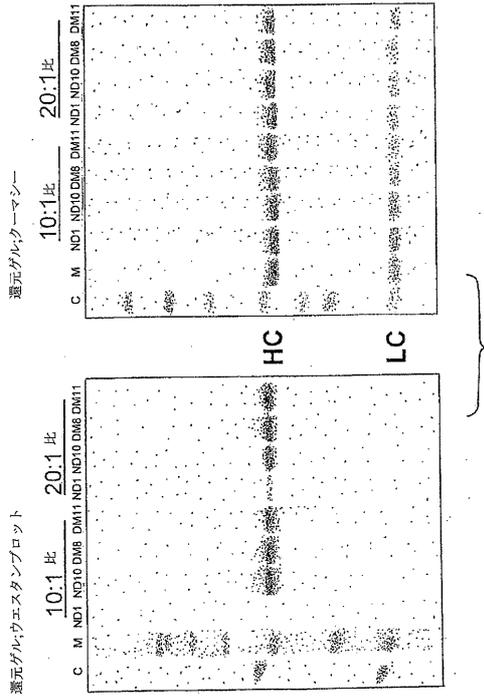
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



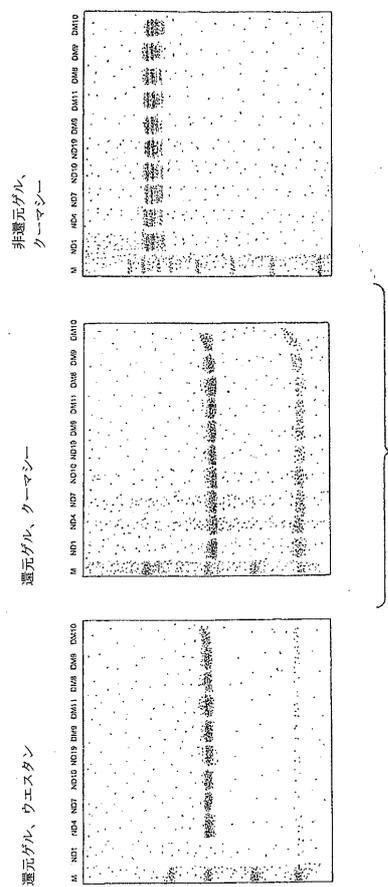
【図 16】



【図 17】

変異体	薬物MABの共役されたセル比	変異	ビオチン共役	算出されたDAR	Darの合計
DM8	1 to 10	T289C	89.8%	1.8	3.6
		A339C	91.6%	1.8	
DM8	1 to 20	T289C	88.2%	1.8	3.5
		A339C	87.6%	1.8	
DM11	1 to 10	S442C	89.2%	1.8	3.5
		A339C	84.0%	1.7	
DM11	1 to 20	S442C	93.1%	1.9	3.6
		A339C	87.2%	1.7	

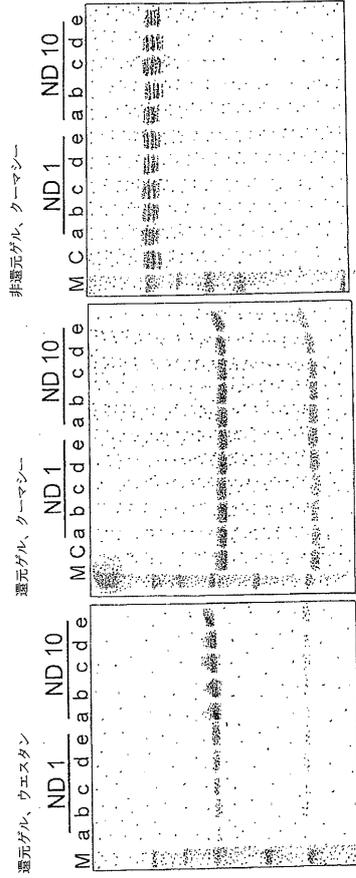
【図 18】



【図 19】

変異体	変異	ビオチン共役	算出されたDAR	DARの合計
ND 4	T289C	82.2%	1.6	1.6
ND 7	A330C	87.8%	1.8	1.8
ND 10	A339C	87.8%	1.8	1.8
ND19	S442C	91.7%	1.8	1.8
DM 9''	A330C	87.5%	1.7	3.4
(7,10)	A339C	84.4%	1.7	
DM 11	A339C	86.4%	1.7	3.6
(10,19)	S442C	93.8%	1.9	
DM 8	T289C	86.2%	1.7	3.5
(4,10)	A339C	86.6%	1.7	
DM 9	A330C	88.6%	1.8	3.5
(7,10)	A339C	86.8%	1.7	
DM 10	T289C	84.6%	1.7	3.4
(4,7)	A330C	86.0%	1.7	

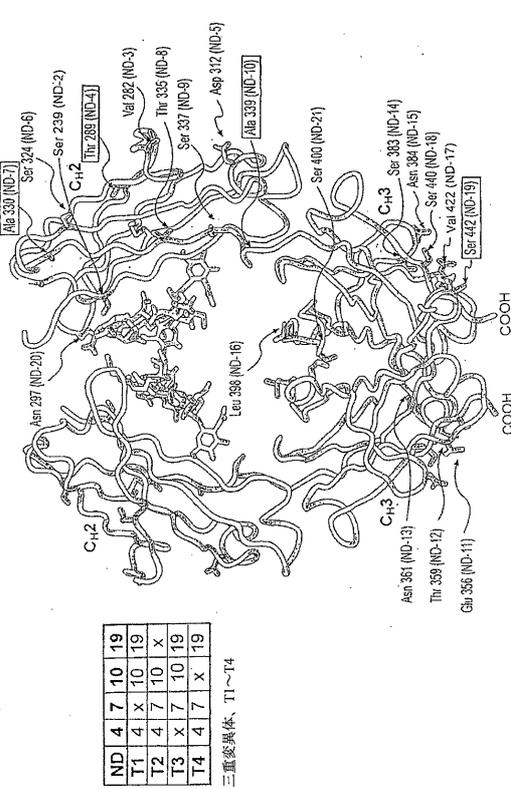
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

変異体	変異	濃度 (mg/ml)	ビオチン共役	DAR
ND10a	A339C	2.5	88.9%	1.8
ND10b	A339C	5.0	87.7%	1.8
ND10c	A339C	10	84.7%	1.7
ND10d	A339C	20	82.5%	1.6
ND10e	A339C	40	76.4%	1.5

【 図 2 2 】



ND	4	7	10	19
T1	4	x	10	19
T2	4	7	10	x
T3	x	7	10	19
T4	4	7	x	19

三重変異体、T1~T4

【 図 2 3 】

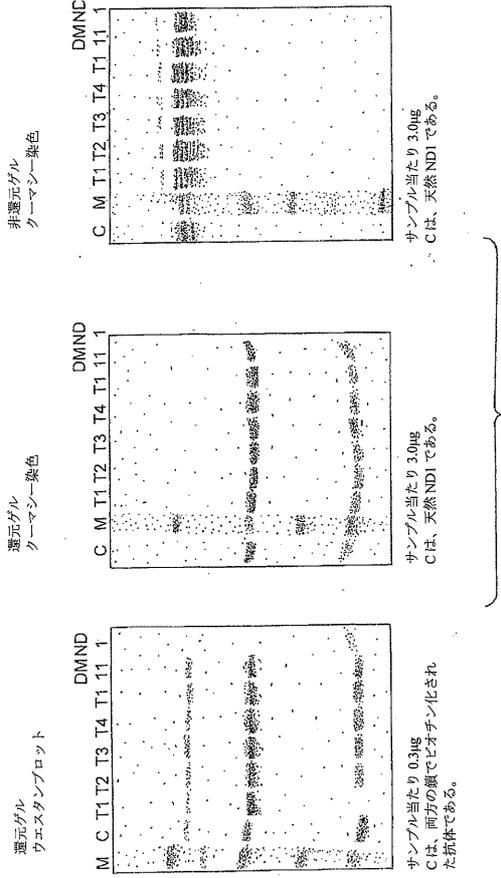
変異体名	変異	10 日目の発現 (mg/L)	モノマー % SEC-UV
T1	T289C	204	97
	A339C		
	S442C		
T2	T289C	219	94
	A330C		
	A339C		
T3	A330C	206	92
	S442C		
T4	T289C	233	92
	A330C		
	S442C		

三重変異体、T1~T4

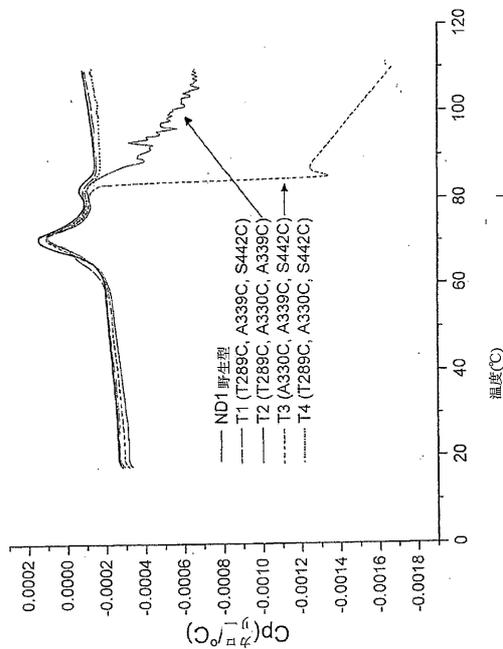
ND	4	7	10	19
T1	4	x	10	19
T2	4	7	10	x
T3	x	7	10	19
T4	4	7	x	19

- Thr 289 (ND-4)
- Ala 330 (ND-7)
- Ala 339 (ND-10)
- Ser 442 (ND-19)

【 図 2 4 】



【 図 2 6 】



【 図 2 5 】

変異体名	変異	ヒオチン共役	DAR
T1 (4,10,19)	T289C	81.1%	1.6
	A339C	74.4%	1.5
	S442C	95.1%	1.9
T2 (4,7,10)	T289	81.5%	1.6
	A330	94.8%	1.9
	A339C	76.9%	1.5
T3 (7,10,19)	A330C	95.0%	1.9
	A339C	72.8%	1.5
	S442C	95.9%	1.9
T4 (4,7,19)	T289C	79.7%	1.6
	A330C	95.1%	1.9
	S442C	95.4%	1.9

三重変異体 T1~T4

ND	4	7	10	19
T1	4	x	10	19
T2	4	7	10	x
T3	x	7	10	19
T4	4	7	x	19

Thr 289 (ND-4)
Ala 330 (ND-7)
Ala 339 (ND-10)
Ser 442 (ND-19)

【配列表】

0005918129000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)		A 6 1 P 31/00	

(72)発明者 ディマシ, ナッツアレノ  
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイザースバーグ, ナンバー347, マーケット  
 ストリート イースト 311

(72)発明者 ガオ, チャンショウ  
 アメリカ合衆国 20854 メリーランド州, ポトマク, メーブルクレスト レーン 1082  
 2

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第2008/070593(WO, A1)  
 米国特許第06737056(US, B1)  
 J. Biol. Chem., (2000), 275, [39], p.30445-30450  
 Chem. Biol., (2003), 10, [9], p.807-814

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C12N 15/00 - 15/90  
 PubMed

专利名称(译)	用于位点特异性缀合的工程化Fc区		
公开(公告)号	<a href="#">JP5918129B2</a>	公开(公告)日	2016-05-18
申请号	JP2012517629	申请日	2010-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
[标]发明人	デイマシナツツアレノ ガオチャンシヨウ		
发明人	デイマシ,ナツツアレノ ガオ,チャンシヨウ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/00 C07K16/46 G01N33/531 G01N33/574 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P31/00		
CPC分类号	A61K47/6835 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/00 C07K2317/72 C07K16/18 C07K2317/52 C07K2317/524 C07K2317/526 G01N33/574		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/00 C07K16/46 G01N33/531.A G01N33/574.Z A61K39/395.L A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P31/00		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/219225 2009-06-22 US		
其他公开文献	JP2012530514A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)  
提供有用的Fc区用于与各种试剂的位点特异性缀合。还提供了用于这种Fc区的设计, 制备, 筛选, 选择和使用的方法。 点域1

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第5918129号 (P5918129)
(45) 発行日 平成28年5月18日(2016.5.18)	(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)	
(51) Int. Cl.	F 1	
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
<b>C 0 7 K</b> 16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00
<b>C 0 7 K</b> 16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
<b>G 0 1 N</b> 33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/531 A
<b>G 0 1 N</b> 33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574 Z
請求項の数 16 (全 93 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2012-517629 (P2012-517629)	(73) 特許権者 504333972	
(86) (22) 出願日 平成22年6月21日(2010.6.21)	メディムーン、エルエルシー	
(65) 公表番号 特表2012-530514 (P2012-530514A)	アメリカ合衆国 20878	メリーラン
(43) 公表日 平成24年12月6日(2012.12.6)	下州、ゲイサーズバーグ、ワン	メディムーン ウェイ
(86) 国際出願番号 PCT/US2010/039351	(74) 代理人 100091096	
(87) 国際公開番号 W02011/005481	弁理士 平木 祐輔	
(87) 国際公開日 平成23年1月13日(2011.1.13)	(74) 代理人 100118773	
審査請求日 平成25年4月22日(2013.4.22)	弁理士 藤田 郎	
(31) 優先権主張番号 61/219,225	(74) 代理人 100122389	
(32) 優先日 平成21年6月22日(2009.6.22)	弁理士 新井 栄一	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100111741	
	弁理士 田中 夏夫	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 部位特異的共役のための操作されたFc領域		