

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-136541

(P2012-136541A)

(43) 公開日 平成24年7月19日 (2012.7.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B 0 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
審査請求 有 請求項の数 59 O L 外国語出願 (全 311 頁)		

(21) 出願番号	特願2012-39207 (P2012-39207)	(71) 出願人	501061858
(22) 出願日	平成24年2月24日 (2012.2.24)		アプライド モレキュラー エボリューション, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2007-524825 (P2007-524825) の分割		Applied Molecular Evolution, Inc.
原出願日	平成17年7月18日 (2005.7.18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サン ディエゴ, ダンヒル ストリート 3520
(31) 優先権主張番号	60/598,855	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成16年8月4日 (2004.8.4)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	60/602,953		弁理士 鯨島 睦
(32) 優先日	平成16年8月19日 (2004.8.19)	(74) 代理人	100126778
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 品川 永敏
(31) 優先権主張番号	60/604,339		
(32) 優先日	平成16年8月25日 (2004.8.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 変異 F c 領域

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 治療用タンパク質の有効性を改善するために必要とされる、改善した属性を有する変異 F c 領域を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列からなる、軽鎖及び重鎖可変領域と、変異 F c 領域が 247I/339Q 及び 247I/339D からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む母体 F c 領域の変異体を含むことを特徴とする抗 CD20 抗体。並びに、前記変異 F c 領域を有する抗 CD20 抗体を含む医薬組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

母体 F c 領域の変異体又はその部分を含むポリペプチドであって、変異 F c 領域又はその部分は、該母体 F c 領域に存在するアミノ酸と比較して、F c 領域のアミノ酸位 2 7 9、3 4 1、3 4 3、又は 3 7 3 の 1 又は複数においてアミノ酸置換を含むポリペプチド。

【請求項 2】

母体 F c 領域の変異体を含むポリペプチドであって、変異 F c 領域は、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含むポリペプチド。

2 3 5 G、2 3 5 R、2 3 6 F、2 3 6 R、2 3 6 Y、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R	
、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y	10
、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 7 A、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 M、2 4 7 N	
、2 4 7 Q、2 4 7 R、2 4 7 S、2 4 7 T、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 F、2 4 8 P	
、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 N、2 4 9 P、2 4 9 Y、2 5 1 H	
、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I	
、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 V	
、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 H、2 5 6 I、2 5 6 K、2 5 6 L	
、2 5 6 V、2 5 6 W、2 5 6 Y、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S	
、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 K、2 6 5 S、2 6 7 H、2 6 7 I	
、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 1 T、2 7 2 H、2 7 2 K、2 7 2 L	
、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 F、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 I、2 7 9 K	20
、2 7 9 L、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W	
、2 7 9 Y、2 8 0 T、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L	
、2 8 3 M、2 8 3 P、2 8 3 R、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F	
、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 2 E、2 9 2 F、2 9 2 G、2 9 2 I、2 9 2 L、2 9 3 S	
、2 9 3 V、3 0 1 W、3 0 4 E、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 2 P、3 1 5 F、3 1 5 K	
、3 1 5 L、3 1 5 P、3 1 5 R、3 1 6 F、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 7 T、3 1 8 N	
、3 1 8 P、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 G、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 S、3 3 2 V	
、3 3 2 W、3 3 9 D、3 3 9 E、3 3 9 F、3 3 9 G、3 3 9 H、3 3 9 I、3 3 9 K	
、3 3 9 L、3 3 9 M、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 3 9 W、3 3 9 Y	
、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M	30
、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4 1 W	
、3 4 1 Y、3 4 3 A、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 F、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 I	
、3 4 3 K、3 4 3 L、3 4 3 M、3 4 3 N、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T	
、3 4 3 V、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 D、3 7 3 E、3 7 3 F、3 7 3 G、3 7 3 H	
、3 7 3 I、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 S	
、3 7 3 T、3 7 3 V、3 7 3 W、3 7 5 R、3 7 6 E、3 7 6 F、3 7 6 G、3 7 6 H	
、3 7 6 I、3 7 6 L、3 7 6 M、3 7 6 N、3 7 6 P、3 7 6 Q、3 7 6 R、3 7 6 S	
、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 6 W、3 7 6 Y、3 7 7 G、3 7 7 K、3 7 7 P、3 7 8 N	
、3 7 9 N、3 7 9 Q、3 7 9 S、3 7 9 T、3 8 0 D、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T	
、3 8 2 D、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N	40
、3 8 2 P、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y	
、3 8 5 E、3 8 5 P、3 8 6 K、4 2 3 N、4 2 4 H、4 2 4 M、4 2 4 V、4 2 6 D	
、4 2 6 L、4 2 7 N、4 2 9 A、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F	
、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P	
、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H	
、4 3 1 K、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 8 G、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T	
、4 3 8 W、4 3 9 E、4 3 9 H、4 3 9 Q、4 4 0 D、4 4 0 E、4 4 0 F、4 4 0 G	
、4 4 0 H、4 4 0 I、4 4 0 K、4 4 0 L、4 4 0 M、4 4 0 Q、4 4 0 T、4 4 0 V	
、又は 4 4 2 K。	

【請求項 3】

前記変異 F c 領域が、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 2 に記載のポリペプチド。

2 3 5 G、2 3 6 F、2 3 6 R、2 3 6 Y、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 E
、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R
、2 4 7 A、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 R
、2 4 7 T、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 L
、2 4 9 M、2 4 9 N、2 4 9 P、2 4 9 Y、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D
、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M
、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K
、2 5 5 N、2 5 6 H、2 5 6 I、2 5 6 K、2 5 6 L、2 5 6 W、2 5 7 A、2 5 7 I 10
、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 K
、2 6 5 S、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 1 T
、2 7 2 H、2 7 2 K、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 N
、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 0 T、2 8 3 F、2 8 3 H
、2 8 3 K、2 8 3 M、2 8 3 R、2 8 3 W、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P
、2 9 2 E、2 9 2 G、2 9 2 I、3 0 1 W、3 0 4 E、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 2 P
、3 1 5 F、3 1 5 L、3 1 5 P、3 1 6 F、3 1 7 P、3 1 7 T、3 1 8 N、3 1 8 P
、3 1 8 T、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 D、3 3 9 F
、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 M、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 3 9 W
、3 3 9 Y、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L 20
、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V
、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 N
、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 D、3 7 3 E
、3 7 3 G、3 7 3 H、3 7 3 I、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 Q、3 7 3 R
、3 7 3 S、3 7 3 T、3 7 3 W、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 N、3 7 6 P、3 7 6 Q
、3 7 6 R、3 7 6 S、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 6 W、3 7 6 Y、3 7 7 G、3 7 7 K
、3 7 7 P、3 7 8 D、3 7 8 N、3 7 9 N、3 7 9 Q、3 7 9 T、3 8 0 N、3 8 0 S
、3 8 0 T、3 8 2 D、3 8 2 F、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 Q、3 8 2 R
、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、3 8 5 E、3 8 6 K、4 2 3 N
、4 2 4 H、4 2 4 M、4 2 4 V、4 2 6 D、4 2 6 L、4 2 7 N、4 2 9 A、4 2 9 F 30
、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K
、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T
、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S
、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T、4 3 8 W、4 3 9 E、4 4 0 D、4 4 0 I、又は 4 4
0 L。

【請求項 4】

前記母体 F c 領域が、天然の F c 領域である請求項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記母体 F c 領域が、I g G の F c 領域、実質的に I g G の F c 領域、又はその部分である請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチド。 40

【請求項 6】

前記母体 F c 領域が、I g G 1、I g G 3、もしくは I g G 4 の F c 領域であり、実質的に I g G 1、I g G 3、もしくは I g G 4 の F c 領域、又はその部分である請求項 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドがモノクローナル抗体である請求項 1～6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒトのモノクローナル抗体 50

である請求項 12 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

前記モノクローナル抗体が、全長抗体又は単鎖のモノクローナル抗体である請求項 12 又は 13 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

母体 Fc 領域の変異体を含むモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、Fc 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含み、その変異 Fc 領域を含むモノクローナル抗体は、該母体 Fc 領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大した ADC C を呈するモノクローナル抗体。

247A、247F、247M、247T、247V、247Y、249E、249Y 10
、254F、254M、254Y、256A、258D、279A、283A、283I
、283K、283M、283R、288N、292A、311A、311D、311N
、311T、311V、311Y、315L、318N、318P、318T、318V
、332T、332V、339D、339F、339G、339I、339K、339M
、339N、339Q、339R、339S、339T、376A、376V、377G
、377K、379N、380N、380S、382A、382I、385E、427N
、429M、434W、436I、440G、440H、440I、又は 440L。

【請求項 11】

前記 Fc 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 10 に記載のモノクローナル抗体。

247A、247F、247M、247T、247V、247Y、254F、254Y 20
、258D、279A、283M、288N、292A、311D、311N、311T
、315L、318N、318P、318T、318V、339D、339I、339K
、339M、339N、339Q、339R、339S、376A、376V、377K
、379N、380N、382A、440I、又は 440L。

【請求項 12】

母体 Fc 領域の変異体を含むモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、Fc 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含み、その変異 Fc 領域を含むモノクローナル抗体は、該母体 Fc 領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少した ADC C を呈するモノクローナル抗体。

235Q、235R、235S、236F、236R、236Y、237E、237K 30
、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V
、238W、238Y、247G、247R、249L、249P、250K、250M
、250R、251H、251I、251W、252Y、254L、254P、254Q
、254T、254V、256V、257A、257I、257M、257N、257S
、257V、260S、262L、264S、265H、265K、265S、267G
、267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K
、270N、271T、272H、272K、272L、272N、272R、279D
、279F、279K、279L、279W、283D、283F、283G、283H 40
、283L、283T、283W、283Y、285N、288P、292E、292F
、292G、292I、293S、293V、301W、304E、307A、307E
、307M、311F、311I、311K、311S、312P、314F、314I
、314V、314W、315F、315P、316F、317P、327T、328V
、329Y、332G、332K、332L、332R、332W、341D、341E
、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P
、341Q、341R、341S、341T、341W、341Y、343A、343D
、343E、343F、343G、343H、343L、343M、343N、343Q
、343R、343S、343T、343V、343W、343Y、373A、373D
、373E、373F、373G、373I、373K、373L、373M、373N 50
、373Q、373R、373S、373T、373V、373W、375R、376A

、 3 7 6 E、 3 7 6 F、 3 7 6 G、 3 7 6 H、 3 7 6 W、 3 7 6 Y、 3 7 9 Q、 3 8 2 D
 、 3 8 2 S、 4 3 0 H、 4 3 0 K、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 W、 4 3 2 R
 、 4 3 2 S、 4 3 4 I、 4 4 0 D、 4 4 0 T、 4 4 0 V、 又は 4 4 2 K。

【請求項 1 3】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 1 2 に記載のモノクローナル抗体。

2 3 5 R、 2 3 6 F、 2 3 6 Y、 2 3 7 E、 2 3 7 K、 2 3 7 N、 2 3 7 R、 2 3 8 E
 、 2 3 8 G、 2 3 8 H、 2 3 8 I、 2 3 8 L、 2 3 8 V、 2 3 8 W、 2 3 8 Y、 2 4 7 R
 、 2 5 0 K、 2 5 1 H、 2 5 4 T、 2 5 7 I、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 7 V
 、 2 6 5 H、 2 6 5 K、 2 6 5 S、 2 6 7 G、 2 6 7 H、 2 6 7 I、 2 6 7 K、 2 6 9 N
 、 2 6 9 Q、 2 7 0 A、 2 7 0 G、 2 7 0 K、 2 7 0 M、 2 7 0 N、 2 7 1 T、 2 7 2 N
 、 2 7 2 R、 2 8 8 P、 2 9 2 E、 3 0 1 W、 3 0 4 E、 3 1 6 F、 3 1 7 P、 3 2 7 T
 、 3 2 8 V、 3 2 9 Y、 3 3 2 K、 3 3 2 R、 3 4 1 F、 3 4 1 I、 3 4 1 M、 3 4 1 P
 、 3 4 1 Q、 3 4 1 R、 3 4 1 T、 3 4 1 W、 3 4 1 Y、 3 4 3 W、 3 7 3 A、 3 7 3 E
 、 3 7 3 G、 3 7 3 S、 3 7 6 W、 4 3 2 R、 又は 4 3 2 S。

10

【請求項 1 4】

母体 F c 領域の変異体を含むモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含み、その変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、該母体 F c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大した F c R n 結合親和性を呈するモノクローナル抗体。

20

2 3 8 L、 2 4 4 L、 2 4 5 R、 2 4 9 P、 2 5 2 Y、 2 5 6 P、 2 5 7 A、 2 5 7 I
 、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 7 0 K、 2 7 2 L
 、 2 7 2 R、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 G、 2 7 9 H、 2 7 9 M、 2 7 9 N、 2 7 9 Q
 、 2 7 9 R、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 3 A、 2 8 3 D、 2 8 3 F
 、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I、 2 8 3 K、 2 8 3 L、 2 8 3 N、 2 8 3 P、 2 8 3 Q
 、 2 8 3 R、 2 8 3 S、 2 8 3 T、 2 8 3 W、 2 8 3 Y、 2 8 5 N、 2 8 6 F、 2 8 8 N
 、 2 8 8 P、 2 9 3 V、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 1 A、 3 1 1 I、 3 1 1 K、 3 1 1 L
 、 3 1 1 M、 3 1 1 V、 3 1 1 W、 3 1 2 P、 3 1 6 K、 3 1 7 P、 3 1 8 N、 3 1 8 T
 、 3 3 2 F、 3 3 2 H、 3 3 2 K、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 R、 3 3 2 S、 3 3 2 W
 、 3 3 9 N、 3 3 9 T、 3 3 9 W、 3 4 1 P、 3 4 3 E、 3 4 3 H、 3 4 3 K、 3 4 3 Q
 、 3 4 3 R、 3 4 3 T、 3 4 3 Y、 3 7 5 R、 3 7 6 G、 3 7 6 I、 3 7 6 M、 3 7 6 P
 、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 7 K、 3 7 8 D、 3 7 8 N、 3 8 0 N、 3 8 0 S、 3 8 0 T
 、 3 8 2 F、 3 8 2 H、 3 8 2 I、 3 8 2 K、 3 8 2 L、 3 8 2 M、 3 8 2 N、 3 8 2 Q
 、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 4 2 3 N、 4 2 7 N
 、 4 3 0 A、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H、 4 3 0 I、 4 3 0 K、 4 3 0 L、 4 3 0 M
 、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V、 4 3 0 Y、 4 3 1 H
 、 4 3 1 K、 4 3 4 F、 4 3 4 G、 4 3 4 H、 4 3 4 W、 4 3 4 Y、 4 3 6 I、 4 3 6 L
 、 4 3 6 T、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 4 3 8 T、 4 3 8 W、 4 4 0 K、 又は 4 4 2 K。

30

【請求項 1 5】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 1 4 に記載のモノクローナル抗体。

40

2 4 5 R、 2 5 2 Y、 2 5 6 P、 2 5 7 A、 2 5 7 I、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S
 、 2 5 7 V、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 G、 2 7 9 H
 、 2 7 9 N、 2 7 9 Q、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 3 F、 2 8 3 H
 、 2 8 3 K、 2 8 3 R、 2 8 5 N、 2 8 6 F、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 1 I、 3 1 1 K
 、 3 1 1 M、 3 1 2 P、 3 1 8 N、 3 1 8 T、 3 3 2 S、 3 3 9 W、 3 4 3 E、 3 4 3 H
 、 3 4 3 K、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 7 5 R、 3 7 7 K、 3 7 8 D、 3 7 8 N、 3 8 0 S
 、 3 8 0 T、 3 8 2 F、 3 8 2 K、 3 8 2 Q、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V
 、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 4 2 3 N、 4 2 7 N、 4 3 0 A、 4 3 0 F、 4 3 0 H、 4 3 0 I
 、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 V、 4 3 0 Y

50

、431H、431K、434F、434G、434H、4342、434Y、436I
、436L、438K、438L、又は438W。

【請求項16】

母体Fc領域に変異体を含むモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、Fc領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含み、その変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、該母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少したFcRn結合親和性を呈するモノクローナル抗体。

235Q、236Y、237K、237R、238E、238G、238H、238W
、247A、247D、247E、247F、247G、247H、247I、247L
、247M、247N、247Q、247R、247S、247W、247Y、248A
、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249Y
、251F、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G
、254H、254I、254K、254L、254M、254N、254P、254Q
、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F
、256H、256I、256K、256M、256R、256W、256Y、264S
、265S、265Y、267G、267I、268D、268K、270A、270M
、279I、279K、279L、280T、292E、292F、292G、292I
、292L、311D、311E、311F、311G、311N、311R、311Y
、315F、315K、315P、316F、317T、326W、327T、339E
、339G、339L、339R、341D、341E、341F、341I、341K
、341L、341M、341N、341Q、341R、341S、341T、341V
、341W、341Y、343M、343V、343W、373D、373G、373A
、373D、373G、373K、373L、373M、373N、373Q、373S
、373T、373V、373W、376H、376L、376W、376Y、424M
、424V、426D、429A、429F、429M、430D、430W、431P
、432R、432S、439Q、440A、440D、440E、440F、又は440M。

10

20

【請求項17】

前記Fc領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む請求項16に記載のモノクローナル抗体。

237R、247D、247E、247F、247H、247I、247L、247M
、247N、247Q、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q
、248W、249L、249M、249Y、251H、251I、251W、254D
、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254M、254N
、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y、255K
、255N、256F、256H、256K、256M、256R、256W、265Y
、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N、315F
、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341I
、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W
、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S。

30

40

【請求項18】

母体Fc領域の変異体を含むモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、Fc領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含み、その変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、該母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大したCDCを呈するモノクローナル抗体。

236Y、244L、247A、247D、247E、247G、247N、247Q
、247R、247S、247W、248F、248P、248Q、248W、249E
、249L、249M、249N、249P、249Y、251F、251H、251I
、251W、254A、254F、254K、254L、254M、254R、254Y
、255K、256A、256G、256I、256L、256M、256P、256Q

50

、 2 5 6 W、 2 5 6 Y、 2 6 0 S、 2 6 8 D、 2 7 9 Q、 2 7 9 S、 2 7 9 W、 2 7 9 Y
 、 2 8 0 K、 2 8 0 T、 2 8 3 F、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I、 2 8 3 K、 2 8 3 L
 、 2 8 3 M、 2 8 3 N、 2 8 3 P、 2 8 3 R、 2 8 3 S、 2 8 3 W、 2 9 2 L、 3 0 7 A
 、 3 0 7 M、 3 1 1 F、 3 1 1 I、 3 1 1 K、 3 1 1 L、 3 1 1 M、 3 1 1 T、 3 1 1 V
 、 3 1 1 W、 3 1 1 Y、 3 1 2 P、 3 1 4 F、 3 1 4 I、 3 1 4 V、 3 1 4 W、 3 1 4 Y
 、 3 1 5 F、 3 1 5 K、 3 1 5 L、 3 1 5 P、 3 1 5 R、 3 1 6 K、 3 1 7 P、 3 1 7 T
 、 3 1 8 N、 3 1 8 T、 3 3 2 A、 3 3 2 D、 3 3 2 E、 3 3 2 F、 3 3 2 G、 3 3 2 L
 、 3 3 2 M、 3 3 2 Q、 3 3 2 S、 3 3 2 T、 3 3 2 V、 3 3 2 W、 3 3 2 Y、 3 3 9 D
 、 3 3 9 F、 3 3 9 G、 3 3 9 H、 3 3 9 I、 3 3 9 K、 3 3 9 N、 3 3 9 Q、 3 3 9 R
 、 3 3 9 S、 3 3 9 T、 3 3 9 W、 3 3 9 Y、 3 4 1 D、 3 4 1 E、 3 4 1 F、 3 4 1 H 10
 、 3 4 1 I、 3 4 1 K、 3 4 1 L、 3 4 1 M、 3 4 1 N、 3 4 1 P、 3 4 1 Q、 3 4 1 R
 、 3 4 1 S、 3 4 1 T、 3 4 1 V、 3 4 1 W、 3 4 1 Y、 3 4 3 A、 3 4 3 D、 3 4 3 E
 、 3 4 3 G、 3 4 3 H、 3 4 3 K、 3 4 3 L、 3 4 3 M、 3 4 3 N、 3 4 3 Q、 3 4 3 R
 、 3 4 3 S、 3 4 3 T、 3 4 3 W、 3 4 3 Y、 3 7 3 D、 3 7 3 E、 3 7 3 F、 3 7 3 H
 、 3 7 3 I、 3 7 3 K、 3 7 3 L、 3 7 3 M、 3 7 3 N、 3 7 3 Q、 3 7 3 R、 3 7 3 T
 、 3 7 3 V、 3 7 3 W、 3 7 5 R、 3 7 6 A、 3 7 6 F、 3 7 6 G、 3 7 6 H、 3 7 6 L
 、 3 7 6 N、 3 7 6 P、 3 7 6 Q、 3 7 6 R、 3 7 6 S、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 7 P
 、 3 7 9 N、 3 7 9 Q、 3 7 9 S、 3 7 9 T、 3 8 0 A、 3 8 0 N、 3 8 0 S、 3 8 0 T
 、 3 8 2 I、 3 8 2 L、 3 8 2 Q、 3 8 2 V、 3 8 6 K、 4 2 6 D、 4 2 6 L、 4 2 9 A
 、 4 2 9 F、 4 2 9 M、 4 3 0 A、 4 3 0 D、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H、 4 3 0 I 20
 、 4 3 0 K、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 P、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 T
 、 4 3 0 V、 4 3 0 W、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 P、 4 3 2 R、 4 3 2 S、 4 3 8 L
 、 4 3 8 W、 4 3 4 Y、 4 3 8 L、 4 3 8 W、 4 4 0 Q、 又は 4 4 0 Y。

【請求項 19】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 18 に記載のモノクローナル抗体。

2 3 6 Y、 2 4 8 F、 2 4 8 P、 2 4 8 Q、 2 4 8 W、 2 4 9 E、 2 4 9 L、 2 4 9 M
 、 2 4 9 N、 2 4 9 Y、 2 5 1 H、 2 5 1 I、 2 5 1 W、 2 5 4 F、 2 5 4 K、 2 5 4 L
 、 2 5 4 M、 2 5 4 R、 2 5 4 Y、 2 5 5 K、 2 5 6 A、 2 5 6 G、 2 5 6 I、 2 5 6 L 30
 、 2 5 6 M、 2 5 6 P、 2 5 6 Q、 2 5 6 W、 2 6 0 S、 2 8 0 K、 2 8 3 W、 3 0 7 M
 、 3 1 1 F、 3 1 1 I、 3 1 1 K、 3 1 1 L、 3 1 1 M、 3 1 1 T、 3 1 1 V、 3 1 1 W
 、 3 1 1 Y、 3 1 4 I、 3 1 4 V、 3 1 4 W、 3 1 4 Y、 3 1 5 P、 3 1 7 P、 3 3 2 D
 、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 S、 3 3 2 W、 3 3 9 D、 3 3 9 F、 3 3 9 I、 3 3 9 K
 、 3 3 9 N、 3 3 9 S、 3 3 9 W、 3 3 9 Y、 3 4 1 D、 3 4 1 E、 3 4 1 F、 3 4 1 H
 、 3 4 1 I、 3 4 1 K、 3 4 1 L、 3 4 1 M、 3 4 1 N、 3 4 1 P、 3 4 1 Q、 3 4 1 R
 、 3 4 1 S、 3 4 1 T、 3 4 1 V、 3 4 1 W、 3 4 1 Y、 3 4 3 D、 3 4 3 E、 3 4 3 G
 、 3 4 3 H、 3 4 3 K、 3 4 3 N、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 S、 3 4 3 T、 3 4 3 W
 、 3 4 3 Y、 3 7 3 E、 3 7 3 F、 3 7 3 H、 3 7 3 I、 3 7 3 K、 3 7 3 L、 3 7 3 Q
 、 3 7 3 R、 3 7 3 T、 3 7 3 W、 3 7 6 A、 3 7 6 G、 3 7 6 N、 3 7 6 P、 3 7 6 Q
 、 3 7 6 R、 3 7 6 S、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 7 P、 3 7 9 N、 3 7 9 Q、 3 7 9 T 40
 、 3 8 2 I、 3 8 2 L、 3 8 6 K、 4 2 6 D、 4 2 6 L、 4 2 9 F、 4 2 9 M、 4 3 0 A
 、 4 3 0 D、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H、 4 3 0 I、 4 3 0 K、 4 3 0 L、 4 3 0 M
 、 4 3 0 N、 4 3 0 P、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V、 4 3 0 W、 4 3 0 Y
 、 4 3 1 H、 4 3 1 P、 4 3 4 Y、 4 3 8 L、 又は 4 4 0 Y。

【請求項 20】

母体 F c 領域の変異体を含むモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含み、その変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、該母体 F c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少した CDC を呈するモノクローナル抗体。

2 3 5 G、 2 3 6 R、 2 3 5 S、 2 3 7 K、 2 3 7 E、 2 3 7 K、 2 3 7 N、 2 3 7 R 50

、 2 3 8 A、 2 3 8 E、 2 3 8 G、 2 3 8 H、 2 3 8 I、 2 3 8 L、 2 3 8 V、 2 3 8 W
 、 2 3 8 Y、 2 4 5 R、 2 4 7 H、 2 4 7 I、 2 4 7 L、 2 4 7 T、 2 4 7 Y、 2 5 0 M
 、 2 5 2 Y、 2 5 4 D、 2 5 4 E、 2 5 4 I、 2 5 4 P、 2 5 4 Q、 2 5 4 T、 2 5 4 V
 、 2 5 5 N、 2 5 7 A、 2 5 7 I、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 7 V、 2 6 2 L
 、 2 6 4 S、 2 6 5 H、 2 6 5 Y、 2 6 7 G、 2 6 7 H、 2 6 7 I、 2 6 7 K、 2 6 8 K
 、 2 6 9 N、 2 6 9 Q、 2 7 0 G、 2 7 0 M、 2 7 0 N、 2 7 1 T、 2 7 2 H、 2 7 2 L
 、 2 7 2 N、 2 9 2 A、 2 9 3 S、 3 0 1 W、 3 0 7 E、 3 1 1 E、 3 1 1 S、 3 1 6 F
 、 3 1 8 P、 3 2 7 T、 3 2 8 V、 3 2 9 Y、 3 3 0 K、 3 3 0 R、 3 3 2 E、 3 3 2 M
 、 3 4 3 I、 3 7 3 S、 3 7 8 D、 3 8 0 D、 3 8 2 D、 3 8 2 F、 3 8 2 N、 3 8 2 P
 、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 3 8 5 E、 3 8 5 P、 4 2 3 N、 4 2 4 H
 、 4 2 4 M、 又は 4 2 7 N。

10

【請求項 2 1】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 2 0 に記載のモノクローナル抗体。

2 3 5 G、 2 3 5 S、 2 3 6 R、 2 3 7 E、 2 3 7 K、 2 3 7 N、 2 3 7 R、 2 3 8 A
 、 2 3 8 E、 2 3 8 G、 2 3 8 H、 2 3 8 I、 2 3 8 L、 2 3 8 V、 2 3 8 W、 2 3 8 Y
 、 2 4 5 R、 2 4 7 I、 2 4 7 L、 2 4 7 T、 2 5 0 M、 2 5 7 A、 2 5 7 I、 2 5 7 M
 、 2 6 2 L、 2 6 4 S、 2 6 7 G、 2 6 7 H、 2 6 7 I、 2 6 7 K、 2 6 8 K、 2 6 9 N
 、 2 6 9 Q、 2 7 0 G、 2 7 0 M、 2 7 0 N、 2 7 1 T、 2 7 2 H、 3 0 1 W、 3 1 1 S
 、 3 2 7 T、 3 2 9 Y、 3 3 0 K、 3 7 8 D、 3 8 5 E、 4 2 3 N、 又は 4 2 4 H。

20

【請求項 2 2】

前記モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒトのモノクローナル抗体である請求項 1 0～2 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 2 3】

前記モノクローナル抗体が、全長抗体又は単鎖のモノクローナル抗体である請求項 1 0～2 2 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 2 4】

前記抗体が、CD 3、CD 2 0、CD 2 5、TNF α 、Her 2/neu、CD 3 3、
 CD 5 2、EGFR、EpCAM、MUC 1、GD 3、CEA、CA 1 2 5、HLA-D
 R、TGF β 、VEGF、GDF 8、GDF 1 1、グレリン、又はそれらの前駆体又は機
 能性フラグメントからなる群から選択されるヒト標的抗原に特異的に結合する請求項 7～
 2 3 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 2 5】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換を少なくとも 1 つ含み、前記ポリペプチドが、母体
 F c 領域を含むポリペプチドに比べて増大した血清半減期を呈する変異 F c 領域を含む請
 求項 1～7 のいずれかに記載のポリペプチド

2 3 8 L、 2 4 4 L、 2 4 5 R、 2 4 9 P、 2 5 2 Y、 2 5 6 P、 2 5 7 A、 2 5 7 I
 、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 7 V、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 7 0 K
 、 2 7 2 L、 2 7 2 R、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 G、 2 7 9 H、 2 7 9 M、 2 7 9 N
 、 2 7 9 Q、 2 7 9 R、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 3 A、 2 8 3 D
 、 2 8 3 F、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I、 2 8 3 K、 2 8 3 L、 2 8 3 N、 2 8 3 P
 、 2 8 3 Q、 2 8 3 R、 2 8 3 S、 2 8 3 T、 2 8 3 W、 2 8 3 Y、 2 8 5 N、 2 8 6 F
 、 2 8 8 N、 2 8 8 P、 2 9 3 V、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 1 A、 3 1 1 I、 3 1 1 K
 、 3 1 1 L、 3 1 1 M、 3 1 1 V、 3 1 1 W、 3 1 2 P、 3 1 6 K、 3 1 7 P、 3 1 8 N
 、 3 1 8 T、 3 3 2 F、 3 3 2 H、 3 3 2 K、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 R、 3 3 2 S
 、 3 3 2 W、 3 3 9 N、 3 3 9 T、 3 3 9 W、 3 4 1 P、 3 4 3 E、 3 4 3 H、 3 4 3 K
 、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 T、 3 4 3 Y、 3 7 5 R、 3 7 6 G、 3 7 6 I、 3 7 6 M
 、 3 7 6 P、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 7 K、 3 7 8 D、 3 7 8 N、 3 8 0 N、 3 8 0 S
 、 3 8 0 T、 3 8 2 F、 3 8 2 H、 3 8 2 I、 3 8 2 K、 3 8 2 L、 3 8 2 M、 3 8 2 N
 、 3 8 2 Q、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 4 2 3 N

40

50

、 4 2 7 N、 4 3 0 A、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H、 4 3 0 I、 4 3 0 K、 4 3 0 L
 、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V、 4 3 0 Y
 、 4 3 1 H、 4 3 1 K、 4 3 4 F、 4 3 4 G、 4 3 4 H、 4 3 4 W、 4 3 4 Y、 4 3 6 I
 、 4 3 6 L、 4 3 6 T、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 4 3 8 T、 4 3 8 W、 4 4 0 K、 又は 4 4
 2 K。

【請求項 2 6】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 2 5 に記載のポリペ
 プチド。

2 4 5 R、 2 5 2 Y、 2 5 6 P、 2 5 7 A、 2 5 7 I、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S
 、 2 5 7 V、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 G、 2 7 9 H
 、 2 7 9 N、 2 7 9 Q、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 3 F、 2 8 3 H
 、 2 8 3 K、 2 8 3 R、 2 8 5 N、 2 8 6 F、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 1 I、 3 1 1 K
 、 3 1 1 L、 3 1 1 M、 3 1 2 P、 3 1 8 N、 3 1 8 T、 3 3 2 S、 3 3 9 W、 3 4 3 E
 、 3 4 3 H、 3 4 3 K、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 7 5 R、 3 7 7 K、 3 7 8 D、 3 7 8 N
 、 3 8 0 S、 3 8 0 T、 3 8 2 F、 3 8 2 K、 3 8 2 Q、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T
 、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 4 2 3 N、 4 2 7 N、 4 3 0 A、 4 3 0 F、 4 3 0 H
 、 4 3 0 I、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 V
 、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 K、 4 3 4 F、 4 3 4 G、 4 3 4 H、 4 3 4 W、 4 3 4 Y
 、 4 3 6 I、 4 3 6 L、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 又は 4 3 8 W。

【請求項 2 7】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換を少なくとも 1 つ含み、前記ポリペプチドが、母体
 F c 領域を含むポリペプチドに比べて減少した血清半減期を呈する変異 F c 領域を含む請
 求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

2 3 5 Q、 2 3 6 Y、 2 3 7 K、 2 3 7 R、 2 3 8 E、 2 3 8 G、 2 3 8 H、 2 3 8 W
 、 2 4 7 A、 2 4 7 D、 2 4 7 E、 2 4 7 F、 2 4 7 G、 2 4 7 H、 2 4 7 I、 2 4 7 L
 、 2 4 7 M、 2 4 7 N、 2 4 7 Q、 2 4 7 R、 2 4 7 S、 2 4 7 W、 2 4 7 Y、 2 4 8 A
 、 2 4 8 F、 2 4 8 P、 2 4 8 Q、 2 4 8 W、 2 4 9 E、 2 4 9 L、 2 4 9 M、 2 4 9 Y
 、 2 5 1 F、 2 5 1 H、 2 5 1 I、 2 5 1 W、 2 5 4 D、 2 5 4 E、 2 5 4 F、 2 5 4 G
 、 2 5 4 H、 2 5 4 I、 2 5 4 K、 2 5 4 L、 2 5 4 M、 2 5 4 N、 2 5 4 P、 2 5 4 Q
 、 2 5 4 R、 2 5 4 T、 2 5 4 V、 2 5 4 W、 2 5 4 Y、 2 5 5 K、 2 5 5 N、 2 5 6 F
 、 2 5 6 H、 2 5 6 I、 2 5 6 K、 2 5 6 M、 2 4 6 R、 2 5 6 W、 2 5 6 Y、 2 6 4 S
 、 2 6 5 S、 2 6 5 Y、 2 6 7 G、 2 6 7 I、 2 6 8 D、 2 6 8 K、 2 7 0 A、 2 7 0 M
 、 2 7 9 I、 2 7 9 K、 2 7 9 L、 2 8 0 T、 2 9 2 E、 2 9 2 F、 2 9 2 G、 2 9 2 I
 、 2 9 2 L、 3 1 1 D、 3 1 1 E、 3 1 1 F、 3 1 1 G、 3 1 1 N、 3 1 1 R、 3 1 1 Y
 、 3 1 5 F、 3 1 5 K、 3 1 5 P、 3 1 6 F、 3 1 7 T、 3 2 6 W、 3 2 7 T、 3 3 9 E
 、 3 3 9 G、 3 3 9 L、 3 3 9 R、 3 4 1 D、 3 4 1 E、 3 4 1 F、 3 4 1 I、 3 4 1 K
 、 3 4 1 L、 3 4 1 M、 3 4 1 N、 3 4 1 Q、 3 4 1 R、 3 4 1 S、 3 4 1 T、 3 4 1 V
 、 3 4 1 W、 3 4 1 Y、 3 4 3 M、 3 4 3 V、 3 4 3 W、 3 7 3 A、 3 7 3 D、 3 7 3 G
 、 3 7 3 K、 3 7 3 L、 3 7 3 M、 3 7 3 N、 3 7 3 Q、 3 7 3 S、 3 7 3 T、 3 7 3 V
 、 3 7 3 W、 3 7 6 H、 3 7 6 L、 3 7 6 W、 3 7 6 Y、 4 2 4 M、 4 2 4 V、 4 2 6 D
 、 4 2 9 A、 4 2 9 F、 4 2 9 M、 4 3 0 D、 4 3 0 W、 4 3 1 P、 4 3 2 R、 4 3 2 S
 、 4 3 9 Q、 4 4 0 D、 4 4 0 E、 4 4 0 F、 又は 4 4 0 M。

【請求項 2 8】

前記 F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む請求項 2 7 に記載のポリペ
 プチド。

2 3 7 R、 2 4 7 D、 2 4 7 E、 2 4 7 F、 2 4 7 H、 2 4 7 L、 2 4 7 M、 2 4 7 N
 、 2 4 7 Q、 2 4 7 W、 2 4 7 Y、 2 4 8 A、 2 4 8 F、 2 4 8 P、 2 4 8 Q、 2 4 8 W
 、 2 4 9 L、 2 4 9 M、 2 4 9 Y、 2 5 1 H、 2 5 1 I、 2 5 1 W、 2 5 4 D、 2 5 4 E
 、 2 5 4 F、 2 5 4 G、 2 5 4 H、 2 5 4 I、 2 5 4 K、 2 5 4 M、 2 5 4 N、 2 5 4 P
 、 2 5 4 Q、 2 5 4 R、 2 5 4 T、 2 5 4 V、 2 5 4 W、 2 5 4 Y、 2 5 5 K、 2 5 5 N

、256F、256H、256K、256M、256R、256W、265Y、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N、315F、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341I、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S。

【請求項29】

変異モノクローナル抗体の母体モノクローナル抗体に比べて増大したADCC反応を呈する前記変異モノクローナル抗体を生成する方法であって、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含むように前記母体モノクローナル抗体のFc領域を設計することを含む方法。

247A、247F、247H、247I、247L、247M、247T、247Y、249E、249Y、251F、254F、254M、254Y、256A、256M、258D、268D、268E、279A、280A、280K、283A、283I、283K、283M、283R、288N、292A、311A、311D、311N、311T、311V、311Y、315L、318N、318P、318T、318V、330K、332T、332V、339D、339F、339G、339I、339K、339M、339N、339Q、339R、339S、339T、376A、376V、377G、377K、379N、380N、380S、382A、382I、385E、427N、429M、434W、436I、440G、440H、440I、又は440L。

【請求項30】

請求項29の方法によって生成される変異モノクローナル抗体。

【請求項31】

変異モノクローナル抗体の母体モノクローナル抗体に比べて減少したADCC反応を呈する前記変異モノクローナル抗体を生成する方法であって、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含むように前記母体モノクローナル抗体のFc領域を設計することを含む方法。

235Q、235R、235S、236F、236R、236Y、237E、237K、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、247G、247R、249L、249P、250K、250M、250R、251H、251I、251W、252Y、254L、254P、254Q、254T、254V、256V、257A、257I、257M、257N、257S、257V、260S、262L、264S、265K、265S、267G、267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K、270M、270N、271T、272H、272K、272L、272N、272R、279D、279F、279K、279L、279W、283D、283F、283G、283H、283L、283T、283W、283Y、285N、288P、292E、292F、292G、292I、293S、293V、301W、304E、307A、307E、307M、311F、311I、311K、311S、312P、314F、314I、314V、314W、315F、315P、316F、317P、327T、328V、329Y、332G、332K、332L、332R、332W、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341W、341Y、343A、343D、343E、343F、343G、343H、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343V、343W、343Y、373A、373D、373E、373F、373G、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373S、373T、373V、373W、375R、376A、376E、376F、376G、376H、376W、376Y、379Q、382D、382S、429A、429F、430H、430K、430N、430Q、430R、430W、432R、432S、434I、440D、440T、440V、又は44

10

20

30

40

50

2 K。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 の方法によって生成される変異モノクローナル抗体。

【請求項 3 3】

変異モノクローナル抗体の母体モノクローナル抗体に比べて増大した F c R n 結合親和性を有する前記変異モノクローナル抗体を生成する方法であって、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含むように前記母体モノクローナル抗体の F c 領域を設計することを含む方法。

2 3 8 L、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I
、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 0 K 10
、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 M、2 7 9 N
、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 A、2 8 3 D
、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 N、2 8 3 P
、2 8 3 Q、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F
、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 3 V、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 A、3 1 1 I
、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P、3 1 6 K、3 1 7 P
、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R
、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P、3 4 3 E、3 4 3 H
、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 I 20
、3 7 6 M、3 7 6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N
、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M
、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y
、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K
、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V
、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y
、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 6 T、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T、4 3 8 W、4 4 0 K
、又は 4 4 2 K。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 の方法によって生成される変異モノクローナル抗体。

【請求項 3 5】

前記変異モノクローナル抗体の母体モノクローナル抗体に比べて減少した F c R n 結合親和性を有する変異モノクローナル抗体を生成する方法であって、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含むように前記母体モノクローナル抗体の F c 領域を設計することを含む方法。

2 3 8 L、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I
、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 0 K
、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 M、2 7 9 N
、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 A、2 8 3 D
、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 N、2 8 3 P
、2 8 3 Q、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F 40
、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 3 V、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 A、3 1 1 I
、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P、3 1 6 K、3 1 7 P
、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R
、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P、3 4 3 E、3 4 3 H
、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 I
、3 7 6 M、3 7 6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N
、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M
、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y
、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K
、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V 50

、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 K、 4 3 4 F、 4 3 4 G、 4 3 4 H、 4 3 4 W、 4 3 4 Y
 、 4 3 6 I、 4 3 6 L、 4 3 6 T、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 4 3 8 T、 4 3 8 W、 4 4 0 K
 、 又は 4 4 2 K。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 の方法によって生成される変異モノクローナル抗体。

【請求項 3 7】

変異モノクローナル抗体の母体モノクローナル抗体に比べて増大した C D C 反応を有する前記変異モノクローナル抗体を生成する方法であって、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含むように前記母体モノクローナル抗体の F c 領域を設計することを含む方法。

2 3 6 Y、 2 4 4 L、 2 4 7 A、 2 4 7 D、 2 4 7 E、 2 4 7 g、 2 4 7 N、 2 4 7 Q 10
 、 2 4 7 R、 2 4 7 S、 2 4 7 W、 2 4 8 F、 2 4 8 P、 2 4 8 Q、 2 4 8 W、 2 4 9 E
 、 2 4 9 L、 2 4 9 M、 2 4 9 N、 2 4 9 P、 2 4 9 Y、 2 5 0 K、 2 5 0 R、 2 5 1 F
 、 2 5 1 H、 2 5 1 I、 2 5 1 W、 2 5 4 A、 2 5 4 F、 2 5 4 K、 2 5 4 L、 2 5 4 M
 、 2 5 4 R、 2 5 4 Y、 2 5 5 K、 2 5 6 A、 2 5 6 G、 2 5 6 I、 2 5 6 L、 2 5 6 M
 、 2 5 6 P、 2 5 6 Q、 2 5 6 W、 2 5 6 Y、 2 6 0 S、 2 6 8 D、 2 7 9 Q、 2 7 9 S
 、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 0 K、 2 8 0 T、 2 8 3 F、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I
 、 2 8 3 K、 2 8 3 L、 2 8 3 M、 2 8 3 N、 2 8 3 P、 2 8 3 R、 2 8 3 S、 2 8 3 W
 、 2 9 2 L、 3 0 7 A、 3 0 7 M、 3 1 1 F、 3 1 1 I、 3 1 1 K、 3 1 1 L、 3 1 1 M
 、 3 1 1 T、 3 1 1 V、 3 1 1 W、 3 1 1 Y、 3 1 2 P、 3 1 4 F、 3 1 4 I、 3 1 4 V 20
 、 3 1 4 W、 3 1 5 F、 3 1 5 K、 3 1 5 L、 3 1 5 P、 3 1 5 R、 3 1 6 K、 3 1 7 P
 、 3 1 7 T、 3 1 8 N、 3 1 8 T、 3 3 2 A、 3 3 2 D、 3 3 2 E、 3 3 2 F、 3 3 2 G
 、 3 3 2 H、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 N、 3 3 2 Q、 3 3 2 S、 3 3 2 T、 3 3 2 V
 、 3 3 2 W、 3 3 2 Y、 3 3 9 D、 3 3 9 F、 3 3 9 G、 3 3 9 H、 3 3 9 I、 3 3 9 K
 、 3 3 9 N、 3 3 9 Q、 3 3 9 R、 3 3 9 S、 3 3 9 W、 3 3 9 Y、 3 4 1 D、 3 4 1 E
 、 3 4 1 F、 3 4 1 H、 3 4 1 I、 3 4 1 K、 3 4 1 L、 3 4 1 M、 3 4 1 N、 3 4 1 P
 、 3 4 1 Q、 3 4 1 R、 3 4 1 S、 3 4 1 T、 3 4 1 V、 3 4 1 W、 3 4 1 Y、 3 4 3 A
 、 3 4 3 D、 3 4 3 E、 3 4 3 G、 3 4 3 H、 3 4 3 K、 3 4 3 L、 3 4 3 M、 3 4 3 N
 、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 S、 3 4 3 T、 3 4 3 W、 3 4 3 Y、 3 7 3 D、 3 7 3 E
 、 3 7 3 F、 3 7 3 H、 3 7 3 I、 3 7 3 K、 3 7 3 L、 3 7 3 M、 3 7 3 N、 3 7 3 Q
 、 3 7 3 R、 3 7 3 T、 3 7 3 V、 3 7 3 W、 3 7 5 R、 3 7 6 A、 3 7 6 F、 3 7 6 G 30
 、 3 7 6 H、 3 7 6 L、 3 7 6 N、 3 7 6 P、 3 7 6 Q、 3 7 6 R、 3 7 6 S、 3 7 6 T
 、 3 7 6 V、 3 7 7 P、 3 7 9 N、 3 7 9 Q、 3 7 9 S、 3 7 9 T、 3 8 0 A、 3 8 0 N
 、 3 8 0 S、 3 8 0 T、 3 8 2 I、 3 8 2 L、 3 8 2 Q、 3 8 2 V、 3 8 6 K、 4 2 6 D
 、 4 2 6 L、 4 2 9 A、 4 2 9 F、 4 2 9 M、 4 3 0 A、 4 3 0 D、 4 3 0 F、 4 3 0 G
 、 4 3 0 H、 4 3 0 I、 4 3 0 K、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 P、 4 3 0 R
 、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V、 4 3 0 W、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 P、 4 3 2 R
 、 4 3 2 S、 4 3 4 W、 4 3 4 Y、 4 3 8 L、 4 3 8 W、 4 4 0 Q、 又は 4 4 0 Y。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 の方法によって生成される変異モノクローナル抗体。

【請求項 3 9】

変異モノクローナル抗体の母体モノクローナル抗体に比べて減少した C D C 反応を有する前記変異モノクローナル抗体を生成する方法であって、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含むように前記母体モノクローナル抗体の F c 領域を設計することを含む方法。

2 3 5 G、 2 3 5 S、 2 3 6 R、 2 3 7 E、 2 3 7 K、 2 3 7 N、 2 3 7 R、 2 3 8 A
 、 2 3 8 E、 2 3 8 G、 2 3 8 H、 2 3 8 I、 2 3 8 L、 2 3 8 V、 2 3 8 W、 2 3 8 Y
 、 2 4 5 R、 2 4 7 H、 2 4 7 I、 2 4 7 L、 2 4 7 T、 2 4 7 Y、 2 5 0 M、 2 5 2 Y
 、 2 5 4 D、 2 5 4 E、 2 5 4 I、 2 5 4 P、 2 5 4 Q、 2 5 4 T、 2 5 4 V、 2 5 5 N
 、 2 5 7 A、 2 5 7 I、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 7 V、 2 6 2 L、 2 6 4 S
 、 2 6 5 H、 2 6 5 Y、 2 6 7 G、 2 6 7 H、 2 6 7 I、 2 6 7 K、 2 6 8 K、 2 6 9 N
 、 2 6 9 Q、 2 7 0 G、 2 7 0 M、 2 7 0 N、 2 7 1 T、 2 7 2 H、 2 7 2 L、 2 7 2 N 50

、 2 9 2 A、 2 9 3 S、 3 0 1 W、 3 0 7 E、 3 1 1 E、 3 1 1 S、 3 1 6 F、 3 1 8 P
 、 3 2 7 T、 3 2 8 V、 3 2 9 Y、 3 3 0 K、 3 3 0 R、 3 3 2 K、 3 3 9 E、 3 3 9 M
 、 3 4 3 I、 3 7 3 S、 3 7 8 D、 3 8 0 D、 3 8 2 D、 3 8 2 F、 3 8 2 N、 3 8 2 P
 、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 3 8 5 E、 3 8 5 P、 4 2 3 N、 4 2 4 H
 、 4 2 4 M、又は 4 2 7 N。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 の方法によって生成される変異モノクローナル抗体。

【請求項 4 1】

変異ポリペプチドの母体ポリペプチドに比べて増大した血清半減期を有する前記変異ポリペプチドを生成する方法であって、

a) 以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む F c 領域をコードする核酸分子に作動可能に結合された前記母体ポリペプチドをコードする核酸分子から、前記変異ポリペプチドを発現することと、

b) 前記変異ポリペプチドを単離して精製することと、を含む方法。

2 3 8 L、 2 4 4 L、 2 4 5 R、 2 4 9 P、 2 5 2 Y、 2 5 6 P、 2 5 7 A、 2 5 7 I
 、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 7 V、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 7 0 K
 、 2 7 2 L、 2 7 2 R、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 G、 2 7 9 H、 2 7 9 M、 2 7 9 N
 、 2 7 9 Q、 2 7 9 R、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 3 A、 2 8 3 D
 、 2 8 3 F、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I、 2 8 3 K、 2 8 3 L、 2 8 3 N、 2 8 3 P
 、 2 8 3 Q、 2 8 3 R、 2 8 3 S、 2 8 3 T、 2 8 3 W、 2 8 3 Y、 2 8 5 N、 2 8 6 F
 、 2 8 8 N、 2 8 8 P、 2 9 3 V、 3 0 7 A、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 1 A、 3 1 1 I
 、 3 1 1 K、 3 1 1 L、 3 1 1 M、 3 1 1 V、 3 1 1 W、 3 1 2 P、 3 1 6 K、 3 1 7 P
 、 3 1 8 N、 3 1 8 T、 3 3 2 F、 3 3 2 H、 3 3 2 K、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 R
 、 3 3 2 S、 3 3 2 W、 3 3 9 N、 3 3 9 T、 3 3 9 W、 3 4 1 P、 3 4 3 E、 3 4 3 H
 、 3 4 3 K、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 T、 3 4 3 Y、 3 7 5 R、 3 7 6 G、 3 7 6 I
 、 3 7 6 M、 3 7 6 P、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 7 K、 3 7 8 D、 3 7 8 N、 3 8 0 N
 、 3 8 0 S、 3 8 0 T、 3 8 2 F、 3 8 2 H、 3 8 2 I、 3 8 2 K、 3 8 2 L、 3 8 2 M
 、 3 8 2 N、 3 8 2 Q、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y
 、 4 2 3 N、 4 2 7 N、 4 3 0 A、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H、 4 3 0 I、 4 3 0 K
 、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V
 、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 K、 4 3 4 F、 4 3 4 G、 4 3 4 H、 4 3 4 W、 4 3 4 Y
 、 4 3 6 I、 4 3 6 L、 4 3 6 T、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 4 3 8 T、 4 3 8 W、 4 4 0 K
 、又は 4 4 2 K。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 の方法によって生成される変異ポリペプチド。

【請求項 4 3】

変異ポリペプチドの母体ポリペプチドに比べて減少した血清半減期を有する前記変異ポリペプチドを生成する方法であって、

a) 以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む F c 領域をコードする核酸分子に作動可能に結合された前記母体ポリペプチドをコードする核酸分子から、前記変異ポリペプチドを発現することと、

b) 前記変異ポリペプチドを単離して精製することと、を含む方法。

2 3 8 L、 2 4 4 L、 2 4 5 R、 2 4 9 P、 2 5 2 Y、 2 5 6 P、 2 5 7 A、 2 5 7 I
 、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S、 2 5 7 V、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 7 0 K
 、 2 7 2 L、 2 7 2 R、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 G、 2 7 9 H、 2 7 9 M、 2 7 9 N
 、 2 7 9 Q、 2 7 9 R、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8 3 A、 2 8 3 D
 、 2 8 3 F、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I、 2 8 3 K、 2 8 3 L、 2 8 3 N、 2 8 3 P
 、 2 8 3 Q、 2 8 3 R、 2 8 3 S、 2 8 3 T、 2 8 3 W、 2 8 3 Y、 2 8 5 N、 2 8 6 F
 、 2 8 8 N、 2 8 8 P、 2 9 3 V、 3 0 7 A、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 1 A、 3 1 1 I
 、 3 1 1 K、 3 1 1 L、 3 1 1 M、 3 1 1 V、 3 1 1 W、 3 1 2 P、 3 1 6 K、 3 1 7 P

、 3 1 8 N、 3 1 8 T、 3 3 2 F、 3 3 2 H、 3 3 2 K、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 R
 、 3 3 2 S、 3 3 2 W、 3 3 9 N、 3 3 9 T、 3 3 9 W、 3 4 1 P、 3 4 3 E、 3 4 3 H
 、 3 4 3 K、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 T、 3 4 3 Y、 3 7 5 R、 3 7 6 G、 3 7 6 I
 、 3 7 6 M、 3 7 6 P、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 7 K、 3 7 8 D、 3 7 8 N、 3 8 0 N
 、 3 8 0 S、 3 8 0 T、 3 8 2 F、 3 8 2 H、 3 8 2 I、 3 8 2 K、 3 8 2 L、 3 8 2 M
 、 3 8 2 N、 3 8 2 Q、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y
 、 4 2 3 N、 4 2 7 N、 4 3 0 A、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H、 4 3 0 I、 4 3 0 K
 、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 Q、 4 3 0 R、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V
 、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 K、 4 3 4 F、 4 3 4 G、 4 3 4 H、 4 3 4 W、 4 3 4 Y
 、 4 3 6 I、 4 3 6 L、 4 3 6 T、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 4 3 8 T、 4 3 8 W、 4 4 0 K 10
 、 又は 4 4 2。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 の方法によって生成される変異ポリペプチド。

【請求項 4 5】

F c 領域に以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む変異 F c 領域をコードする核酸分子を含む単離核酸分子。

2 3 5 G、 2 3 5 R、 2 3 6 F、 2 3 6 R、 2 3 6 Y、 2 3 7 K、 2 3 7 N、 2 3 7 R
 、 2 3 8 E、 2 3 8 G、 2 3 8 H、 2 3 8 I、 2 3 8 L、 2 3 8 V、 2 3 8 W、 2 3 8 Y
 、 2 4 4 L、 2 4 5 R、 2 4 7 A、 2 4 7 D、 2 4 7 E、 2 4 7 F、 2 4 7 M、 2 4 7 N
 、 2 4 7 Q、 2 4 7 R、 2 4 7 S、 2 4 7 T、 2 4 7 W、 2 4 7 Y、 2 4 8 F、 2 4 8 P 20
 、 2 4 8 Q、 2 4 8 W、 2 4 9 L、 2 4 9 M、 2 4 9 N、 2 4 9 P、 2 4 9 Y、 2 5 1 H
 、 2 5 1 I、 2 5 1 W、 2 5 4 D、 2 5 4 E、 2 5 4 F、 2 5 4 G、 2 5 4 H、 2 5 4 I
 、 2 5 4 K、 2 5 4 L、 2 5 4 M、 2 5 4 N、 2 5 4 P、 2 5 4 Q、 2 5 4 R、 2 5 4 V
 、 2 5 4 W、 2 5 4 Y、 2 5 5 K、 2 5 5 N、 2 5 6 H、 2 5 6 I、 2 5 6 K、 2 5 6 L
 、 2 5 6 V、 2 5 6 W、 2 5 6 Y、 2 5 7 A、 2 5 7 I、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 S
 、 2 5 8 D、 2 6 0 S、 2 6 2 L、 2 6 4 S、 2 6 5 K、 2 6 5 S、 2 6 7 H、 2 6 7 I
 、 2 6 7 K、 2 6 8 K、 2 6 9 N、 2 6 9 Q、 2 7 1 T、 2 7 2 H、 2 7 2 K、 2 7 2 L
 、 2 7 2 R、 2 7 9 A、 2 7 9 D、 2 7 9 F、 2 7 9 G、 2 7 9 H、 2 7 9 I、 2 7 9 K
 、 2 7 9 L、 2 7 9 M、 2 7 9 N、 2 7 9 Q、 2 7 9 R、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W
 、 2 7 9 Y、 2 8 0 T、 2 8 3 F、 2 8 3 G、 2 8 3 H、 2 8 3 I、 2 8 3 K、 2 8 3 L 30
 、 2 8 3 M、 2 8 3 P、 2 8 3 R、 2 8 3 T、 2 8 3 W、 2 8 3 Y、 2 8 5 N、 2 8 6 F
 、 2 8 8 N、 2 8 8 P、 2 9 2 E、 2 9 2 F、 2 9 2 G、 2 9 2 I、 2 9 2 L、 2 9 3 S
 、 2 9 3 V、 3 0 1 W、 3 0 4 E、 3 0 7 E、 3 0 7 M、 3 1 2 P、 3 1 5 F、 3 1 5 K
 、 3 1 5 L、 3 1 5 P、 3 1 5 R、 3 1 6 F、 3 1 6 K、 3 1 7 P、 3 1 7 T、 3 1 8 N
 、 3 1 8 P、 3 1 8 T、 3 3 2 F、 3 3 2 G、 3 3 2 L、 3 3 2 M、 3 3 2 S、 3 3 2 V
 、 3 3 2 W、 3 3 9 D、 3 3 9 E、 3 3 9 F、 3 3 9 G、 3 3 9 H、 3 3 9 I、 3 3 9 K
 、 3 3 9 L、 3 3 9 M、 3 3 9 N、 3 3 9 Q、 3 3 9 R、 3 3 9 S、 3 3 9 W、 3 3 9 Y
 、 3 4 1 D、 3 4 1 E、 3 4 1 F、 3 4 1 H、 3 4 1 I、 3 4 1 K、 3 4 1 L、 3 4 1 M
 、 3 4 1 N、 3 4 1 P、 3 4 1 Q、 3 4 1 R、 3 4 1 S、 3 4 1 T、 3 4 1 V、 3 4 1 W 40
 、 3 4 1 Y、 3 4 3 A、 3 4 3 D、 3 4 3 E、 3 4 3 F、 3 4 3 G、 3 4 3 H、 3 4 3 I
 、 3 4 3 K、 3 4 3 L、 3 4 3 M、 3 4 3 N、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 S、 3 4 3 T
 、 3 4 3 V、 3 4 3 W、 3 4 3 Y、 3 7 3 D、 3 7 3 E、 3 7 3 F、 3 7 3 G、 3 7 3 H
 、 3 7 3 I、 3 7 3 K、 3 7 3 L、 3 7 3 M、 3 7 3 N、 3 7 3 Q、 3 7 3 R、 3 7 3 S
 、 3 7 3 T、 3 7 3 V、 3 7 3 W、 3 7 5 R、 3 7 6 E、 3 7 6 F、 3 7 6 G、 3 7 6 H
 、 3 7 6 I、 3 7 6 L、 3 7 6 M、 3 7 6 N、 3 7 6 P、 3 7 6 Q、 3 7 6 R、 3 7 6 S
 、 3 7 6 T、 3 7 6 V、 3 7 6 W、 3 7 6 Y、 3 7 7 G、 3 7 7 K、 3 7 7 P、 3 7 8 N
 、 3 7 9 N、 3 7 9 Q、 3 7 9 S、 3 7 9 T、 3 8 0 D、 3 8 0 N、 3 8 0 S、 3 8 0 T
 、 3 8 2 D、 3 8 2 F、 3 8 2 H、 3 8 2 I、 3 8 2 K、 3 8 2 L、 3 8 2 M、 3 8 2 N
 、 3 8 2 P、 3 8 2 Q、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y
 、 3 8 5 E、 3 8 5 P、 3 8 6 K、 4 2 3 N、 4 2 4 H、 4 2 4 M、 4 2 4 V、 4 2 6 D 50

、 4 2 6 L、4 2 7 N、4 2 9 A、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F
 、 4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P
 、 4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H
 、 4 3 1 K、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 8 G、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T
 、 4 3 8 W、4 3 9 E、4 3 9 H、4 3 9 Q、4 4 0 D、4 4 0 E、4 4 0 F、4 4 0 G
 、 4 4 0 H、4 4 0 I、4 4 0 K、4 4 0 L、4 4 0 M、4 4 0 Q、4 4 0 T、4 4 0 V
 、又は4 4 2 K。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載の単離核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 7】

前記ベクターが、発現ベクターである請求項 4 6 に記載のベクター。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4 9】

前記宿主細胞型が、CHO、COS、SP2/O、NSO、酵母、E. coli、及び任意の好ましい細胞種の誘導体又は子孫からなる群より選択される請求項 4 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 0】

請求項 1 ～ 7、2 5 ～ 2 8、4 2、又は 4 4 のいずれかに記載の変異ポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 5 1】

請求項 8 ～ 2 4、3 0、3 2、3 5、3 6、又は 3 8 のいずれかに記載の変異モノクローナル抗体を含む医薬組成物。

【請求項 5 2】

抗 CD 2 0 抗体であって、

(a) 配列番号 1 3 からなる軽鎖可変領域アミノ酸配列と、

(b) 配列番号 1 4 からなる重鎖可変領域アミノ酸配列と、

(c) 変異 Fc 領域が、2 4 7 I / 3 3 9 Q、2 4 7 I / 3 3 9 D、及び 3 7 8 D からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む母体 Fc 領域の変異体

を含む抗体。

【請求項 5 3】

Fc 異性体が、2 4 7 I / 3 3 9 Q である請求項 5 2 に記載の抗 CD 2 0 抗体。

【請求項 5 4】

Fc 異性体が、2 4 7 I / 3 3 9 D である請求項 5 2 に記載の抗 CD 2 0 抗体。

【請求項 5 5】

Fc 異性体が、3 7 8 D である請求項 5 2 に記載の抗 CD 2 0 抗体。

【請求項 5 6】

配列番号 2 9 からなる軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 3 1 からなる重鎖アミノ酸配列と、を含む請求項 5 3 に記載の抗 CD 2 0 抗体。

【請求項 5 7】

配列番号 2 9 からなる軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 3 3 からなる重鎖アミノ酸配列と、を含む請求項 5 4 に記載の抗 CD 2 0 抗体。

【請求項 5 8】

配列番号 2 9 からなる軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 3 5 からなる重鎖アミノ酸配列と、を含む請求項 5 5 に記載の抗 CD 2 0 抗体。

【請求項 5 9】

請求項 5 2 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗 CD 2 0 抗体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

本発明は、新規な変異Fc領域を含むポリペプチドに関する。具体的には、本発明の新規な変異Fc領域は、本願明細書において記載される少なくとも1つのアミノ酸置換で含み、アミノ酸置換が欠失している母体免疫グロブリンと比べて、本発明の変異Fc領域を含む免疫グロブリンにおけるエフェクター機能又は血清半減期を改変する。更に、本発明は、モノクローナル抗体のエフェクター機能を改変する方法、又は、本発明の変異Fc領域が作動可能な状態で付着されるポリペプチドの血清半減期を延長させる方法を提供する。ポリペプチド、タンパク質、特にモノクローナル抗体の治療的な使用が開示される。

【背景技術】

【0002】

ヒト治療法における使用において、米国で現在承認される少なくとも17種類のモノクローナル抗体が存在する。更に、例えば、移植拒絶、ガン、炎症性疾患、敗血症、腎炎、アルツハイマー疾患、アレルギー、糖尿病、自己免疫疾患、関節炎、多発性硬化症、及び、感染症を含む様々な疾患又は障害の治療のため、臨床試験中の数百種類のモノクローナル抗体、及び、前臨床前試験中の数千種類のモノクローナル抗体が存在する。治療用モノクローナル抗体の分野は、近年において急成長する位置づけとなっている。ワクチン後、抗体（又は免疫グロブリン「Ig」）は、2番目に多くの一般的な種類の臨床的に試験される生物薬剤を構成する（Stockwin, L. H. 他 Biochemical Society Transactions, 31:433-436, 2003）。

【0003】

実質的に、遺伝子工学は、治療用モノクローナル抗体の分野の成長に関与する。潜在する治療用モノクローナル抗体の効果は、抗体のタンパク質配列への適度な変化によって異なる。モノクローナル抗体の変換領域における単一アミノ酸変化は、抗体属性（例えばKon速度又はKoff速度）と同様、抗体が抗原エпитープに結合する親和性を改変する潜在性を有する。このようなアミノ酸変化は、治療用としてモノクローナル抗体の成功又は失敗を測定することができる。同様に、モノクローナル抗体のFc領域のアミノ酸配列における適度の変化は、Fc領域が作動可能な状態で結合される抗体のエフェクター機能の属性又はタンパク質の半減期において重大な変化を引き起こす。

【0004】

抗体のFc領域（つまり、CH2領域、CH3領域、及び一部のヒンジ領域にわたる抗体の重鎖のカルボキシ末端（図1参照））は、変異性において制限され、抗体が果たす生理的役割をもたらすのに関与する。抗体のFc領域に起因するエフェクター機能は、抗体の分類及びサブクラスによって異なり、かつ、（i）例えば、抗体を覆われた粒子の食細胞活動及び破壊、免疫複合体の除去、炎症伝達物質の放出、抗体の経胎盤伝達、並びに、免疫グロブリン産生の制御を含む、Fc領域を介して様々な生物反応を誘発する細胞上の特定のFc受容体（「FcR」）への抗体の結合と、（ii）Fc領域がC1q補体成分と結合することによって、標的細胞溶解現象を導く補体活性化の古典経路を開始する補体依存性細胞障害作用（「CDC」）と、（iii）特定のヒト免疫系細胞、例えば、Fcγ受容体を介した食細胞及びNK細胞が、免疫細胞上の特異抗体結合する受容体を介して抗体のFc領域に結合し、その後、抗体が結合する物質の破壊の信号を送る、抗体依存の細胞媒介性細胞障害反応（「ADCC」）と、及び、（iv）肥満細胞、好塩基球、及び、好酸球への結合と、を含む。Fc領域が特定のFcR（例えばFcRn）に結合するか、或いは、Fc領域がCDC又はADCCを媒介することができるレベルが治療用タンパク質、特に、モノクローナル抗体の有効性又は半減期を測定するための重要な要素である。

【0005】

ヒトIgGのFc領域におけるアミノ酸の詳細な修飾は、治療用タンパク質、特にモノクローナル抗体の開発に関連する構造機能相関情報を得る研究の活発な領域である（Fc領域が作動可能に結合されるポリペプチドの血清半減期の改変に関する米国特許第6,165,745号明細書及び国際公開第2004/035752号パンフレット、及び、修飾されたFc領域を含むモノクローナル抗体のエフェクター機能の改変に関する米国特許

10

20

30

40

50

第 6, 737, 056 号明細書及び国際公開第 2004/029207 号パンフレットを参照)。

【0006】

新規な治療用タンパク質(特にモノクローナル抗体)の開発は、対象とする抗体に所望の有益な属性を与えるように特定のアミノ酸改質によってFc領域を合理的に設計することによって利益をもたらす。Fc領域における同じ特定のアミノ酸改質によって、全てのモノクローナル抗体が治療用として改善されることが期待されるというわけでない。ある標的抗原と結合する治療用モノクローナル抗体は、特定のエフェクター機能における増加によって利益をもたらす一方、異なる標的抗原と結合する異なる治療用モノクローナル抗体が、異なるエフェクター機能の増加又は減少によって利益をもたらす。ある治療用モノクローナル抗体は、大きな親和性で特定のFc受容体と結合することによって利益をもたらす一方、別の抗体は、低い親和性においてFc受容体に結合し、速い速度で身体から除去することによって治療的に改善される。更にまた、特定のFc領域アミノ酸改質又は置換、及び、治療用抗体に利点をもたらす効果は、抗体が結合する抗原標的及び/又は抗体によって改善する疾患又は障害に依存する。

10

【0007】

抗体のFc領域に関連する特定のエフェクター機能を改変する方法及び組成物は、所望の属性を有する新規な治療用抗体を生成するとともに、既存の治療用抗体の属性を改善するのに必要である。変異Fc領域を有するモノクローナル抗体は、例えば、炎症性疾患、ガン、自己免疫不全、細胞信号伝達障害、及び感染症を含む様々な疾患又は障害を治療するために使用される。更に、血清半減期を増加させて少量の用量に抑えるか、或いは、血清半減期を減少させて身体から速く除去させるように促すといった、治療用タンパク質の血清半減期を改変する方法及び組成物は、治療用抗体のみならず他のタンパク質の産生の利点をもたらす。

20

【0008】

治療用タンパク質(特にモノクローナル抗体)の有効性を改善するために必要とされるものは、改善した属性を有する変異Fc領域である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、変異Fc領域(即ち、本願明細書に記載のアミノ酸置換を含むFc領域(例えば表1参照))を提供し、前記変異Fc領域を含むポリペプチドに有益な属性を与える。

30

【0010】

本発明の変異Fc領域を生成するアミノ酸置換の母体Fc領域のFcの位置は、279位、341位、343位、及び373位であり、Fc領域における残基の番号付け、つまり、位置番号は、KababのEUインデックスの番号付けである(本願明細書中の図2を参照)。本発明は、母体Fc領域の279位、341位、343位、又は373位、或いは、それらの組合せにおけるアミノ酸置換を含む変異Fc領域を提供する。母体Fc領域は、279位、341位、343位、及び373位以外の位置における変性のアミノ酸残基を任意に有する。ヒトIgGの位置における天然のアミノ酸残基は、バリン(279)、グリシン(341)、プロリン(343)、及びチロシン(373)である。

40

【0011】

本発明の全体にわたる好ましい実施形態において、母体Fc領域に存在して置換されるアミノ酸残基は、自然発生のアミノ酸残基である。特に明記しない限り、母体Fc領域は、天然又は変性のFc領域であり、好ましくはヒト起源又は実質的にヒト起源のFc領域である。母体Fc領域のアミノ酸配列は、好ましくは配列番号1、2、3、又は4で示される。好ましくは、母体Fc領域は、本発明の変異Fc領域を生成するために置換される位置に存在する天然のアミノ酸残基を有する。更に、全体にわたって、本願明細書に記載されているように、変異Fc領域は、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように修飾さ

50

れる母体Fc領域であることが理解される。更に、母体Fc領域が変異Fc領域を生成するために置換されるアミノ酸残基を含む、全長Fc又はその一部であると理解される。

【0012】

更なる本発明は、ポリペプチド（好ましくはモノクローナル抗体）を提供し、母体Fc領域と比較して、279位、341位、343位、又は373位において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む変異Fc領域（又はその機能性フラグメント）を含む。Fc位置である279位、341位、343位、又は373位において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む変異Fc領域は、変異Fc領域と同じ種類の天然のFc領域に存在するアミノ酸残基と比較して、少なくとも1つの付加的なアミノ酸置換をFc領域に更に含む。

【0013】

一実施形態において、変異Fc領域（即ち、母体Fc領域の変異体）は、以下から選択される少なくとも1、2、3、又はそれ以上のアミノ酸置換を含む。

235G、235R、236F、236R、236Y、237K、237N、237R
 、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y
 、244L、245R、247A、247D、247E、247F、247M、247N
 、247Q、247R、247S、247T、247W、247Y、248F、248P
 、248Q、248W、249L、249M、249N、249P、249Y、251H
 、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I
 、254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254V
 、254W、254Y、255K、255N、256H、256I、256K、256L
 、256V、256W、256Y、257A、257I、257M、257N、257S
 、258D、260S、262L、264S、265K、265S、267H、267I
 、267K、268K、269N、269Q、271T、272H、272K、272L
 、272R、279A、279D、279F、279G、279H、279I、279K
 、279L、279M、279N、279Q、279R、279S、279T、279W
 、279Y、280T、283F、283G、283H、283I、283K、283L
 、283M、283P、283R、283T、283W、283Y、285N、286F
 、288N、288P、292E、292F、292G、292I、292L、293S
 、293V、301W、304E、307E、307M、312P、315F、315K
 、315L、315P、315R、316F、316K、317P、317T、318N
 、318P、318T、332F、332G、332L、332M、332S、332V
 、332W、339D、339E、339F、339G、339H、339I、339K
 、339L、339M、339N、339Q、339R、339S、339W、339Y
 、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M
 、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W
 、341Y、343A、343D、343E、343F、343G、343H、343I
 、343K、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T
 、343V、343W、343Y、373D、373E、373F、373G、373H
 、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373S
 、373T、373V、373W、375R、376E、376F、376G、376H
 、376I、376L、376M、376N、376P、376Q、376R、376S
 、376T、376V、376W、376Y、377G、377K、377P、378N
 、379N、379Q、379S、379T、380D、380N、380S、380T
 、382D、382F、382H、382I、382K、382L、382M、382N
 、382P、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y
 、385E、385P、386K、423N、424H、424M、424V、426D
 、426L、427N、429A、429F、429M、430A、430D、430F
 、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430P
 、430Q、430R、430S、430T、430V、430W、430Y、431H
 、431K、431P、432R、432S、438G、438K、438L、438T

10

20

30

40

50

、438W、439E、439H、439Q、440D、440E、440F、440G
 、440H、440I、440K、440L、440M、440Q、440T、440V
 、又は442K。

【0014】

好ましい実施形態において、変異Fc領域は、以下から選択される少なくとも1、2、3、又はそれ以上のアミノ酸置換を含む。

235G、236F、236R、236Y、237K、237N、237R、238E
 、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、245R
 、247A、247D、247E、247F、247M、247N、247Q、247R
 、247T、247W、247Y、248F、248P、248Q、248W、249L 10
 、249M、249N、249P、249Y、251H、251I、251W、254D
 、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M
 、254N、254P、254Q、254R、254V、254W、254Y、255K
 、255N、256H、256I、256K、256L、256W、257A、257I
 、257M、257N、257S、258D、260S、262L、264S、265K
 、265S、267H、267I、267K、268K、269N、269Q、271T
 、272H、272K、272R、279A、279D、279G、279H、279N
 、279Q、279S、279T、279W、279Y、280T、283F、283H
 、283K、283M、283R、283W、285N、286F、288N、288P 20
 、292E、292G、292I、301W、304E、307E、307M、312P
 、315F、315L、315P、316F、317P、317T、318N、318P
 、318T、332L、332M、332R、332S、332W、339D、339F
 、339I、339K、339M、339N、339Q、339R、339S、339W
 、339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L
 、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V
 、341W、341Y、343D、343E、343G、343H、343K、343N
 、343Q、343R、343S、343T、343W、343Y、373D、373E
 、373G、373H、373I、373K、373L、373M、373Q、373R
 、373S、373T、373W、375R、376G、376N、376P、376Q
 、376R、376S、376T、376V、376W、376Y、377G、377K 30
 、377P、378D、378N、379N、379Q、379T、380N、380S
 、380T、382D、382F、382I、382K、382L、382Q、382R
 、382S、382T、382V、382W、382Y、385E、386K、423N
 、424H、424M、424V、426D、426L、427N、429A、429F
 、429M、430A、430D、430F、430G、430H、430I、430K
 、430L、430M、430N、430P、430Q、430R、430S、430T
 、430V、430W、430Y、431H、431K、431P、432R、432S
 、438K、438L、438T、438W、439E、440D、440I、又は440L。

【0015】

本発明の変異Fc領域は、好ましくは、本願明細書において記載される多くの実験法の1つを使用することを特徴とする。このような変異Fc領域は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体において改変したエフェクター機能又は改変した血清半減期、或いは、変異Fc領域が作動可能な状態で付着されるポリペプチドにおいて改変した血清半減期を示す。

【0016】

好ましくは、本発明の変異Fc領域の母体Fc領域は、IgG、IgA、IgE、IgM、及びIgDからなる群から選択されるヒト起源の天然又は生殖細胞系をコードしたFc領域、もしくはその多形性の変異体、或いは、その機能性フラグメントである。母体Fc領域は、好ましくはIgG Fc領域であり、より好ましくはIgG1、IgG3又は 50

I g G 4 F c 領域である。母体 F c 領域は、天然の F c 領域と比較して、本願明細書に記載される（つまり、表 1 に列挙される置換）以外の 1 つ以上の付加的なアミノ酸置換、特に、当該分野で公知、又は、米国特許第 6, 1 6 5, 7 4 5 号明細書又は米国特許第 6, 7 3 7, 0 5 6 号明細書、国際公開第 2 0 0 4 / 0 3 5 7 5 2 号パンフレット又は国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 9 2 0 7 号パンフレット（これらは全体において本願明細書に組み込まれる）に記述されるような 1 つ以上のアミノ酸置換を任意に含み、このようなアミノ酸置換もまた、母体 F c 領域に存在する場合、変異 F c 領域を生成するために、その後置換される位置にない限り、本発明の変異 F c 領域及び本発明の変異 F c 領域を含むポリペプチドにおける変異 F c 領域に存在する。

【0017】

10

本発明は、ポリペプチド、好ましくはモノクローナル抗体を提供し、本発明の変異 F c 領域、又はその機能性フラグメントを含む。好ましい実施形態において、本発明の変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、キメラ抗体である。より好ましい実施形態において、本発明の変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、抗体に存在するフレームワーク配列、及び、定常領域配列が、実質的にヒト起源であるヒト化抗体又はヒト抗体である。キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、好ましくは、全長抗体又は単鎖抗体である。本発明の変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体が、ヒト治療として使用される場合、F c 領域は、好ましくは、実質的にヒト起源である。

【0018】

20

好ましくは、本発明の変異 F c 領域を含む、或いは、本発明の変異 F c 領域が作動可能な状態で付着されるポリペプチド（つまり、「変異ポリペプチド」）は、母体 F c 領域と比較して、変異 F c 領域における少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有し、及び、前記変異 F c 領域の母体 F c 領域を含むポリペプチドと比較して改変したエフェクター機能又は血清半減期を呈し、「変異 F c 領域における少なくとも 1 つのアミノ酸置換」とは、(i) F c 領域の 2 7 9、3 4 1、3 4 3、又は 3 7 3 位における任意のアミノ酸置換、又は、(i i) F c 領域における、少なくとも 1 つの以下のアミノ酸置換：2 3 5 G、2 3 5 R、2 3 6 F、2 3 6 R、2 3 6 Y、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 7 A、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 R、2 4 7 S、2 4 7 T、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 N、2 4 9 P、2 4 9 Y、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 H、2 5 6 I、2 5 6 K、2 5 6 L、2 5 6 V、2 5 6 W、2 5 6 Y、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 K、2 6 5 S、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 1 T、2 7 2 H、2 7 2 K、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 F、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 I、2 7 9 K、2 7 9 L、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 0 T、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 M、2 8 3 P、2 8 3 R、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 2 E、2 9 2 F、2 9 2 G、2 9 2 I、2 9 2 L、2 9 3 S、2 9 3 V、3 0 1 W、3 0 4 E、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 2 P、3 1 5 F、3 1 5 K、3 1 5 L、3 1 5 P、3 1 5 R、3 1 6 F、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 7 T、3 1 8 N、3 1 8 P、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 G、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 S、3 3 2 V、3 3 2 W、3 3 9 D、3 3 9 E、3 3 9 F、3 3 9 G、3 3 9 H、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 L、3 3 9 M、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 3 9 W、3 3 9 Y、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 A、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 F、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 I、3 4 3 K、3 4 3 L

30

40

50

、 3 4 3 M、 3 4 3 N、 3 4 3 Q、 3 4 3 R、 3 4 3 S、 3 4 3 T、 3 4 3 V、 3 4 3 W
 、 3 4 3 Y、 3 7 3 D、 3 7 3 E、 3 7 3 F、 3 7 3 G、 3 7 3 H、 3 7 3 I、 3 7 3 K
 、 3 7 3 L、 3 7 3 M、 3 7 3 N、 3 7 3 Q、 3 7 3 R、 3 7 3 S、 3 7 3 T、 3 7 3 V
 、 3 7 3 W、 3 7 5 R、 3 7 6 E、 3 7 6 F、 3 7 6 G、 3 7 6 H、 3 7 6 I、 3 7 6 L
 、 3 7 6 M、 3 7 6 N、 3 7 6 P、 3 7 6 Q、 3 7 6 R、 3 7 6 S、 3 7 6 T、 3 7 6 V
 、 3 7 6 W、 3 7 6 Y、 3 7 7 G、 3 7 7 K、 3 7 7 P、 3 7 8 N、 3 7 9 N、 3 7 9 Q
 、 3 7 9 S、 3 7 9 T、 3 8 0 D、 3 8 0 N、 3 8 0 S、 3 8 0 T、 3 8 2 D、 3 8 2 F
 、 3 8 2 H、 3 8 2 I、 3 8 2 K、 3 8 2 L、 3 8 2 M、 3 8 2 N、 3 8 2 P、 3 8 2 Q
 、 3 8 2 R、 3 8 2 S、 3 8 2 T、 3 8 2 V、 3 8 2 W、 3 8 2 Y、 3 8 5 E、 3 8 5 P
 、 3 8 6 K、 4 2 3 N、 4 2 4 H、 4 2 4 M、 4 2 4 V、 4 2 6 D、 4 2 6 L、 4 2 7 N
 、 4 2 9 A、 4 2 9 F、 4 2 9 M、 4 3 0 A、 4 3 0 D、 4 3 0 F、 4 3 0 G、 4 3 0 H
 、 4 3 0 I、 4 3 0 K、 4 3 0 L、 4 3 0 M、 4 3 0 N、 4 3 0 P、 4 3 0 Q、 4 3 0 R
 、 4 3 0 S、 4 3 0 T、 4 3 0 V、 4 3 0 W、 4 3 0 Y、 4 3 1 H、 4 3 1 K、 4 3 1 P
 、 4 3 2 R、 4 3 2 S、 4 3 8 G、 4 3 8 K、 4 3 8 L、 4 3 8 T、 4 3 8 W、 4 3 9 E
 、 4 3 9 H、 4 3 9 Q、 4 4 0 D、 4 4 0 E、 4 4 0 F、 4 4 0 G、 4 4 0 H、 4 4 0 I
 、 4 4 0 K、 4 4 0 L、 4 4 0 M、 4 4 0 Q、 4 4 0 T、 4 4 0 V、 又は 4 4 2 K、 或い
 は、 (i i i) 上記の (i) 又は (i i) に列挙される少なくとも 2 つのアミノ酸置換、
 (i v) 上記の (i) 又は (i i) に列挙されていない少なくとも 1 つの F c 領域アミノ
 酸置換に加えて、上記の (i) 又は (i i) に列挙されている少なくとも 1、2、又は 3
 つのアミノ酸置換である。改変したエフェクター機能は、好ましくは、F c 領域（即ち、
 母体 F c 領域）においてアミノ酸置換を欠失する前記ポリペプチドに比べて、A D C C を
 増加、A D C C を減少、C D C を増加、C D C を減少、C 1 q 結合能を増加、C 1 q 結合
 能を減少、F c R（好ましくは F c R n）結合能を増加、又は F c R（好ましくは F c R
 n）結合能を減少させる。

【0019】

本発明は、F c 領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む変異 F c 領域
 を含むモノクローナル抗体を提供し、変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、母体 F
 c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大した A D C C を呈する。2 4 7 A、2 4 7
 F、2 4 7 M、2 4 7 T、2 4 7 V、2 4 7 Y、2 4 9 E、2 4 9 Y、2 5 4 F、2 5 4
 M、2 5 4 Y、2 5 6 A、2 5 8 D、2 7 9 A、2 8 3 A、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3
 M、2 8 3 R、2 8 8 N、2 9 2 A、3 1 1 A、3 1 1 D、3 1 1 N、3 1 1 T、3 1 1
 V、3 1 1 Y、3 1 5 L、3 1 8 N、3 1 8 P、3 1 8 T、3 1 8 V、3 3 2 T、3 3 2
 V、3 3 9 D、3 3 9 F、3 3 9 G、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 M、3 3 9 N、3 3 9
 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 3 9 T、3 7 6 A、3 7 6 V、3 7 7 G、3 7 7 K、3 7 9
 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 2 A、3 8 2 I、3 8 5 E、4 2 7 N、4 2 9 M、4 3 4
 W、4 3 6 I、4 4 0 G、4 4 0 H、4 4 0 I、又は 4 4 0 L、[好ましくは、2 4 7 A
 、2 4 7 F、2 4 7 M、2 4 7 T、2 4 7 V、2 4 7 Y、2 5 4 F、2 5 4 Y、2 5 8 D
 、2 7 9 A、2 8 3 M、2 8 8 N、2 9 2 A、3 1 1 D、3 1 1 N、3 1 1 T、3 1 5 L
 、3 1 8 N、3 1 8 P、3 1 8 T、3 1 8 V、3 3 9 D、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 M
 、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 7 6 A、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 9 N
 、3 8 0 N、3 8 2 A、4 4 0 I、又は 4 4 0 L]。

【0020】

本発明は、F c 領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含む変異 F c 領域
 を含むモノクローナル抗体を提供し、変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、母体 F
 c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少した A D C C 活性を呈する。2 3 5 Q、2
 3 5 R、2 3 5 S、2 3 6 F、2 3 6 R、2 3 6 Y、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2
 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2
 3 8 Y、2 4 7 G、2 4 7 R、2 4 9 L、2 4 9 P、2 5 0 K、2 5 0 M、2 5 0 R、2
 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 2 Y、2 5 4 L、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 T、2
 5 4 V、2 5 6 V、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2

60S、262L、264S、265H、265K、265S、267G、267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K、270M、270N、271T、272H、272K、272L、272N、272R、279D、279F、279K、279L、279W、283D、283F、283G、283H、283L、283W、283Y、285N、288P、292E、292F、292G、292I、293S、293V、301W、304E、307A、307E、307M、311F、311I、311K、311S、312P、314F、314I、314V、314W、315F、315P、316F、317P、327T、328V、329Y、332G、332K、332L、332R、332W、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341W、341Y、343A、343D、343E、343F、343G、343H、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343V、343W、343Y、373A、373D、373E、373F、373G、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373S、373T、373V、373W、375R、376A、376E、376F、376G、376H、376W、376Y、379Q、382D、382S、430H、430K、430N、430Q、430R、430W、432R、432S、434I、440D、440T、440V、又は442K、[好ましくは、235R、236F、236Y、237E、237K、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、247R、250K、251H、254T、257I、257M、257N、257S、257V、265H、265K、265S、267G、267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K、270M、270N、271T、272N、272R、288P、292E、301W、304E、316F、317P、327T、328V、329Y、332K、332R、341F、341I、341M、341P、341Q、341R、341T、341W、341Y、343W、373A、373E、373G、373S、376A、376W、432R、又は432S]。

【0021】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大したFcRnの結合親和性を呈する。238L、244L、245R、249P、252Y、256P、257A、257I、257M、257N、257S、257V、258D、260S、262L、270K、272L、272R、279A、279D、279G、279H、279M、279N、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、283A、283D、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283N、283P、283Q、283R、283S、283T、283W、283Y、285N、286F、288N、288P、293V、307E、307M、311A、311I、311K、311L、311M、311V、311W、312P、316K、317P、318N、318T、332F、332H、332K、332L、332M、332R、332S、332W、339N、339T、339W、341P、343E、343H、343K、343Q、343R、343T、343Y、375R、376G、376I、376M、376P、376T、376V、377K、378D、378N、380N、380S、380T、382F、382H、382I、382K、382L、382M、382N、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、423N、427N、430A、430F、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430Q、430R、430S、430T、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I、436L、436T、438K、438L、438T、438W、440K、又は442K、[好ましくは、245R、252Y、256P、257A、257I、257M、257

10

20

30

40

50

N、257S、257V、258D、260S、262L、279A、279D、279G、279H、279N、279Q、279S、279T、279W、279Y、283F、283H、283K、283R、285N、286F、307E、307M、311I、311K、311L、311M、312P、318N、318T、332S、339W、343E、343H、343K、343Q、343R、375R、377K、378D、378N、380S、380T、382F、382K、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、423N、427N、430A、430F、430H、430I、430L、430M、430N、430Q、430R、430S、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I、436L、438K、438L、又は438W】。

10

【0022】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少したFcRnの結合親和性を呈する。235Q、236Y、237K、237R、238E、238G、238H、238W、247A、247D、247E、247F、247G、247H、247I、247L、247M、247N、247Q、247R、247S、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249Y、251F、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256I、256K、256M、256R、256W、256Y、264S、265S、265Y、267G、267I、268D、268K、270A、270M、279I、279K、279L、280T、292E、292F、292G、292I、292L、311D、311E、311F、311G、311N、311R、311Y、315F、315K、315P、316F、317T、326W、327T、339E、339G、339L、339R、341D、341E、341F、341I、341K、341L、341M、341N、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343M、343V、343W、373A、373D、373G、373K、373L、373M、373N、373Q、373S、373T、373V、373W、376H、376L、376W、376Y、424M、424V、426D、429A、429F、429M、430D、430W、431P、432R、432S、439Q、440A、440D、440E、440F、又は440M、[好ましくは、237R、247D、247E、247F、247H、247I、247L、247M、247N、247Q、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248W、249L、249M、249Y、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254M、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256K、256M、256R、256W、265Y、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N、315F、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341I、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S】。

20

30

40

【0023】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大したCDC活性を呈する。236Y、244L、247A、247D、247E、247G、247N、247Q、247R、247S、247W、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249N、249P、249Y、251F、251H、251I、251W、25

50

4 A、2 5 4 F、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 R、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5
 6 A、2 5 6 G、2 5 6 I、2 5 6 L、2 5 6 M、2 5 6 P、2 5 6 Q、2 5 6 W、2 5
 6 Y、2 6 0 S、2 6 8 D、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 0 K、2 8
 0 T、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 M、2 8
 3 N、2 8 3 P、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 W、2 9 2 L、3 0 7 A、3 0 7 M、3 1
 1 F、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 T、3 1 1 V、3 1 1 W、3
 1 1 Y、3 1 2 P、3 1 4 F、3 1 4 I、3 1 4 V、3 1 4 W、3 1 4 Y、3 1 5 F、3
 1 5 K、3 1 5 L、3 1 5 P、3 1 5 R、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 7 T、3 1 8 N、3
 1 8 T、3 3 2 A、3 3 2 D、3 3 2 E、3 3 2 F、3 3 2 G、3 3 2 L、3 3 2 M、3
 3 2 Q、3 3 2 S、3 3 2 T、3 3 2 V、3 3 2 W、3 3 2 Y、3 3 9 D、3 3 9 F、3 10
 3 9 G、3 3 9 H、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3
 3 9 T、3 3 9 W、3 3 9 Y、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3
 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3
 4 1 T、3 4 1 V、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 A、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 G、3
 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 L、3 4 3 M、3 4 3 N、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3
 4 3 T、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 D、3 7 3 E、3 7 3 F、3 7 3 H、3 7 3 I、3
 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 T、3 7 3 V、3
 7 3 W、3 7 5 R、3 7 6 A、3 7 6 F、3 7 6 G、3 7 6 H、3 7 6 L、3 7 6 N、3
 7 6 P、3 7 6 Q、3 7 6 R、3 7 6 S、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 P、3 7 9 N、3
 7 9 Q、3 7 9 S、3 7 9 T、3 8 0 A、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 I、3 20
 8 2 L、3 8 2 Q、3 8 2 V、3 8 6 K、4 2 6 D、4 2 6 L、4 2 9 A、4 2 9 F、4
 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4
 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4
 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 4 W、4 3 4 Y、4
 3 8 L、4 3 8 W、4 4 0 Q、又は4 4 0 Y、[好ましくは、2 3 6 Y、2 4 8 F、2 4
 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 E、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 N、2 4 9 Y、2 5
 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 F、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 R、2 5
 4 Y、2 5 5 K、2 5 6 A、2 5 6 G、2 5 6 I、2 5 6 L、2 5 6 M、2 5 6 P、2 5
 6 Q、2 5 6 W、2 6 0 S、2 8 0 K、2 8 3 W、3 0 7 M、3 1 1 F、3 1 1 I、3 1
 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 T、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 1 Y、3 1 4 I、3 1 30
 4 V、3 1 4 W、3 1 4 Y、3 1 5 P、3 1 7 P、3 3 2 D、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3
 2 S、3 3 2 W、3 3 9 D、3 3 9 F、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 N、3 3 9 S、3 3
 9 W、3 3 9 Y、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4
 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4
 1 V、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4
 3 N、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 E、3 7
 3 F、3 7 3 H、3 7 3 I、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 T、3 7
 3 W、3 7 6 A、3 7 6 G、3 7 6 N、3 7 6 P、3 7 6 Q、3 7 6 R、3 7 6 S、3 7
 6 T、3 7 6 V、3 7 7 P、3 7 9 N、3 7 9 Q、3 7 9 T、3 8 2 I、3 8 2 L、3 8
 6 K、4 2 6 D、4 2 6 L、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F、4 3 40
 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P、4 3
 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 P、4 3
 4 Y、4 3 8 L、又は4 4 0 Y]。

【0024】

本発明は、F c 領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異F c 領域
 を含むモノクローナル抗体を提供し、変異F c 領域を含むモノクローナル抗体は、母体F
 c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少したCDC活性を呈する。2 3 5 G、2 3
 5 S、2 3 6 R、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 A、2 3 8 E、2 3
 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R、2 4
 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 T、2 4 7 Y、2 5 0 M、2 5 2 Y、2 5 4 D、2 5 50

4 E、2 5 4 I、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 5 N、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 H、2 6 5 Y、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、2 7 2 L、2 7 2 N、2 9 2 A、2 9 3 S、3 0 1 W、3 0 7 E、3 1 1 E、3 1 1 S、3 1 6 F、3 1 8 P、3 2 7 T、3 2 8 V、3 2 9 Y、3 3 0 K、3 3 0 R、3 3 2 E、3 3 2 M、3 4 3 I、3 7 3 S、3 7 8 D、3 8 0 D、3 8 2 D、3 8 2 F、3 8 2 N、3 8 2 P、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 W、3 8 2 Y、3 8 5 E、3 8 5 P、4 2 3 N、4 2 4 H、4 2 4 M、又は4 2 7 N
 [好ましくは、2 3 5 G、2 3 5 S、2 3 6 R、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 A、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 T、2 5 0 M、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、3 0 1 W、3 1 1 S、3 2 7 T、3 2 9 Y、3 3 0 K、3 7 8 D、3 8 5 E、4 2 3 N、又は4 2 4 H]。

10

【0025】

更に、本発明は、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を具現化し、前記抗体は、特にヒト標的抗原と結合する。好ましくは、標的抗原は、CD3、CD20、CD25、TNF(α)、Her2/neu、CD33、CD52、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA125、HLA-DR、TGF(β)、VEGF、GDF8、GDF11、グレリン、又は任意の前駆体、或いは、その機能性フラグメントから選択される。

20

【0026】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含む変異ポリペプチドを提供し、変異ポリペプチドは、母体ポリペプチド(即ち、変異ポリペプチドと同一のポリペプチドであるが、上記に列挙されるアミノ酸置換がない)に比べて増大した血清半減期を呈する。

2 3 8 L、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 0 K、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 A、2 8 3 D、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 N、2 8 3 P、2 8 3 Q、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 3 V、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 A、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 I、3 7 6 M、3 7 6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 6 T、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T、4 3 8 W、4 4 0 K、又は4 4 2 K、[好ましくは、2 4 5 R、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 F、2 8 3 H、2 8 3 K、2 8 3 R、2 8 5 N、2 8 6 F、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 2 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 S、

30

40

50

3 3 9 W、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 7 5 R、3 7 7 K、
3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 K、3 8 2 Q、3 8 2 R、
3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、
4 3 0 F、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、
4 3 0 S、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、
4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 8 K、4 3 8 L、又は4 3 8 W】。

【0 0 2 7】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含む変異ポリペプチドを提供し、変異ポリペプチドは、母体ポリペプチド（即ち、変異ポリペプチドと同一のポリペプチドであるが、上記に列挙されるアミノ酸置換がない）に比べて減少した血清半減期を呈する。2 3 5 Q、2 3 6 Y、2 3 7 K、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 W、2 4 7 A、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 G、2 4 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 R、2 4 7 S、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 A、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 E、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 Y、2 5 1 F、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 F、2 5 6 H、2 5 6 I、2 5 6 K、2 5 6 M、2 5 6 R、2 5 6 W、2 5 6 Y、2 6 4 S、2 6 5 S、2 6 5 Y、2 6 7 G、2 6 7 I、2 6 8 D、2 6 8 K、2 7 0 A、2 7 0 M、2 7 9 I、2 7 9 K、2 7 9 L、2 8 0 T、2 9 2 E、2 9 2 F、2 9 2 G、2 9 2 I、2 9 2 L、3 1 1 D、3 1 1 E、3 1 1 F、3 1 1 G、3 1 1 N、3 1 1 R、3 1 1 Y、3 1 5 F、3 1 5 K、3 1 5 P、3 1 6 F、3 1 7 T、3 2 6 W、3 2 7 T、3 3 9 E、3 3 9 G、3 3 9 L、3 3 9 R、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 M、3 4 3 V、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 D、3 7 3 G、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 S、3 7 3 T、3 7 3 V、3 7 3 W、3 7 6 H、3 7 6 L、3 7 6 W、3 7 6 Y、4 2 4 M、4 2 4 V、4 2 6 D、4 2 9 A、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 D、4 3 0 W、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 9 Q、4 4 0 D、4 4 0 E、4 4 0 F、又は4 4 0 M [好ましくは、2 3 7 R、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 H、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 A、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 Y、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 F、2 5 6 H、2 5 6 K、2 5 6 M、2 5 6 R、2 5 6 W、2 6 5 Y、2 8 0 T、2 9 2 G、2 9 2 I、3 1 1 D、3 1 1 E、3 1 1 G、3 1 1 N、3 1 5 F、3 1 5 P、3 1 6 T、3 1 7 T、3 2 7 T、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 L、3 4 1 Y、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 G、3 7 3 M、3 7 3 Q、3 7 6 W、3 7 6 Y、4 2 4 M、4 2 4 V、4 3 0 D、4 3 0 W、4 3 1 P、又は4 3 2 S]。

【0 0 2 8】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体（又はその機能性フラグメント）のADCC活性を増加させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。2 4 7 A、2 4 7 F、2 4 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 T、2 4 7 V、2 4 7 Y、2 4 9 E、2 4 9 Y、2 5 1 F、2 5 4 F、2 5 4 M、2 5 4 Y、2 5 6 A、2 5 6 M、2 5 8 D、2 6 8 D、2 6 8 E、2 7 9 A、2 8 0 A、2 8 0 K、2 8 3 A、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 M、2 8 3 R、2 8 8 N、2 9 2 A、3 1 1 A、3 1 1 D、3 1 1 N、3 1 1 T、3 1 1 V、3 1 1 Y、3 1 5 L、3 1 8 N、3 1 8 P、3 1 8 T、3 1 8 V、3 3 0 K、3 3 2 T、3 3 2 V、3 3 9 D、3 3 9 F、3 3

9 G、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 M、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 3 9 T、3 7 6 A、3 7 6 V、3 7 7 G、3 7 7 K、3 7 9 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 2 A、3 8 2 I、3 8 5 E、4 2 7 N、4 2 9 M、4 3 4 W、4 3 6 I、4 4 0 G、4 4 0 H、4 4 0 I、又は4 4 0 L [好ましくは、2 4 7 A、2 4 7 F、2 4 7 M、2 4 7 T、2 4 7 V、2 4 7 Y、2 5 4 F、2 5 4 Y、2 5 8 D、2 7 9 A、2 8 3 M、2 8 8 N、2 9 2 A、3 1 1 D、3 1 1 N、3 1 1 T、3 1 5 L、3 1 8 N、3 1 8 P、3 1 8 T、3 1 8 V、3 3 9 D、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 M、3 3 9 N、3 3 9 Q、3 3 9 R、3 3 9 S、3 7 6 A、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 9 N、3 8 0 N、3 8 2 A、4 4 0 I、又は4 4 0 L]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子に、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的な抗体をコードする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）と作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、（即ち、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の）変異Fc領域をコードする核酸に作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のADCC活性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することを含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より大きい（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上大きい）ADCC活性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを含む。本発明は、モノクローナル抗体又はその機能性フラグメントを更に具現化し、その方法によって生成される変異Fc領域を含む。

【0029】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体（又はその機能性フラグメント）のADCC活性を減少させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。2 3 5 Q、2 3 5 R、2 3 5 S、2 3 6 F、2 3 6 R、2 3 6 Y、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 7 G、2 4 7 R、2 4 9 L、2 4 9 P、2 5 0 K、2 5 0 M、2 5 0 R、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 2 Y、2 5 4 L、2 5 4 P、S 2 5 4 Q、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 6 V、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 0 S、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 H、2 6 5 K、2 6 5 S、2 6 7 G、S 2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 A、2 7 0 G、2 7 0 K、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、2 7 2 K、2 7 2 L、2 7 2 N、2 7 2 R、2 7 9 D、2 7 9 F、2 7 9 K、2 7 9 L、2 7 9 W、2 8 3 D、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 L、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 8 P、2 9 2 E、2 9 2 F、2 9 2 G、2 9 2 I、2 9 3 S、2 9 3 V、3 0 1 W、3 0 4 E、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 F、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 S、3 1 2 P、3 1 4 F、3 1 4 I、3 1 4 V、3 1 4 W、3 1 5 F、3 1 5 P、3 1 6 F、3 1 7 P、3 2 7 T、3 2 8 V、3 2 9 Y、3 3 2 G、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 R、3 3 2 W、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 A、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 F、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 L、3 4 3 M、3 4 3 N、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T、3 4 3 V、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 A、3 7 3 D、3 7 3 E、3 7 3 F、3 7 3 G、3 7 3 I、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 S、3 7 3 T、3 7 3 V、3 7 3 W、3 7 5 R、3 7 6 A、3 7 6 E、3 7 6 F、3 7 6 G、3 7 6 H、3 7 6 W、3 7 6 Y、3 7 9 Q、3 8 2 D、3 8 2 S、4 2 9 A、4 2 9 F、4 3 0 H、4 3 0 K、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 W、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 4 I、4 4 0 D、

4 4 0 T、4 4 0 V、又は4 4 2 K [好ましくは、2 3 5 R、2 3 6 F、2 3 6 R、2 3 6 Y、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 7 R、2 4 9 P、2 5 0 K、2 5 1 H、2 5 4 T、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 5 H、2 6 5 K、2 6 5 S、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 A、2 7 0 G、2 7 0 K、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 R、2 8 8 P、2 9 2 E、3 0 1 W、3 0 4 E、3 1 6 F、3 1 7 P、3 2 7 T、3 2 9 Y、3 3 2 K、3 3 2 R、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 M、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 T、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 E、3 7 3 G、3 7 3 S、3 7 6 W、4 2 9 A、4 3 2 R、又は4 3 2 S]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的な抗体をコードする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、（即ち、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の）変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のADCC活性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することも含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より少ない（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上少ない）ADCC活性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを更に含む。本発明はモノクローナル抗体又はその機能性フラグメントを更に具現化し、その方法によって生成される変異Fc領域を含む。

10

20

【0030】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体（又はその機能性フラグメント）のFcRn結合親和性を増加させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。2 3 8 L、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 0 K、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 A、2 8 3 D、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 N、2 8 3 P、2 8 3 Q、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 3 V、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 A、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 I、3 7 6 M、3 7 6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 6 T、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T、4 3 8 W、4 4 0 K、又は4 4 2 K [好ましくは、2 4 5 R、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 2 L、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 F、2 8 3 H、2 8 3 K、2 8 3 R、2 8 5 N、2 8 6 F、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 2 P、

30

40

50

3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 S、3 3 9 W、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、
3 4 3 R、3 7 5 R、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、
3 8 2 K、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、
4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 L、4 3 0 M、
4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、
4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 8 K、
4 3 8 L、又は4 3 8 W」。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、
上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように（例えば、母体Fc領域又は天然のFc
領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的な抗体をコードする核酸（例
えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、こ
の方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、（即ち、上記に列挙される少なく
とも1つのアミノ酸置換の導入後の）変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状態で
付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現
及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も
含む。方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異
Fc領域を含むモノクローナル抗体のFcRn結合親和性、及び母体Fc領域を含むモノ
クローナル抗体の活性を測定することを更に含む。方法は、母体Fc領域を含むモノク
ローナル抗体より大きい（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、1
8%、20%以上大きい）FcRn結合親和性を有する変異Fc領域を含むモノクローナ
ル抗体を選択することを更に含む。更なる本発明はモノクローナル抗体又はその機能性フ
ラグメントを具現化し、その方法によって生成される変異Fc領域を含む。

10

20

【0031】

一実施形態において、本発明は、ポリペプチド（好ましくは治療用ポリペプチド）のイン
ビボ血清半減期を増加させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含
む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。2 3 8 L、2 4 4 L
、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N
、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 0 K、2 7 2 L、2 7 2 R
、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R
、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 A、2 8 3 D、2 8 3 F、2 8 3 G
、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 N、2 8 3 P、2 8 3 Q、2 8 3 R
、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P
、2 9 3 V、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 A、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L
、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 8 N、3 1 8 T
、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R、3 3 2 S、3 3 2 W
、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q
、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 I、3 7 6 M、3 7 6 P
、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T
、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N、3 8 2 Q
、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N
、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M
、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H
、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L
、4 3 6 T、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T、4 3 8 W、4 4 0 K、又は4 4 2 K、[好
ましくは、2 4 5 R、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、
2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 2 L、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、
2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 F、2 8 3 H、
2 8 3 K、2 8 3 R、2 8 5 N、2 8 6 F、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 I、
3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 2 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 S、3 3 9 W、
3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 7 5 R、3 7 7 K、3 7 8 D、
3 7 8 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 K、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、

30

40

50

3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 8 K、4 3 8 L、又は4 3 8 W]。変異Fc領域をコードする核酸分子は、治療用タンパク質をコードする核酸分子に、作動可能な状態で結合される。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的なポリペプチドをコードする核酸（例えば、融合タンパク質の非Fc領域をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、非Fc融合パートナーをコードする核酸に上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸に、その後作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むポリペプチド、及び母体Fc領域を含むポリペプチドのインビボ血清半減期を測定することも含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドを選択することを更に含み、該ポリペプチドが、母体Fc領域を含むポリペプチドに比べて増加した（即ち、好ましくは、少なくとも5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上増加した）血清半減期を有する。本発明は、方法によって生成される変異Fc領域を含むポリペプチド（即ち、融合ポリペプチド）を更に具現化する。

10

20

【0032】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体（又はその機能性フラグメント）のFcRn結合親和性を減少させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を設計することを含む。2 3 5 Q、2 3 6 Y、2 3 7 K、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 W、2 4 7 A、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 G、2 4 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 R、2 4 7 S、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 A、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 E、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 Y、2 5 1 F、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 F、2 5 6 H、2 5 6 I、2 5 6 K、2 5 6 M、2 5 6 R、2 5 6 W、2 5 6 Y、2 6 4 S、2 6 5 S、2 6 5 Y、2 6 7 G、2 6 7 I、2 6 8 D、2 6 8 K、2 7 0 A、2 7 0 M、2 7 9 I、2 7 9 K、2 7 9 L、2 8 0 T、2 9 2 E、2 9 2 F、2 9 2 G、2 9 2 I、2 9 2 L、3 1 1 D、3 1 1 E、3 1 1 F、3 1 1 G、3 1 1 N、3 1 1 R、3 1 1 Y、3 1 5 F、3 1 5 K、3 1 5 P、3 1 6 F、3 1 7 T、3 2 6 W、3 2 7 T、3 3 9 E、3 3 9 G、3 3 9 L、3 3 9 R、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 M、3 4 3 V、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 D、3 7 3 G、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 S、3 7 3 T、3 7 3 V、3 7 3 W、3 7 6 H、3 7 6 L、3 7 6 W、3 7 6 Y、4 2 4 M、4 2 4 V、4 2 6 D、4 2 9 A、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 D、4 3 0 W、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 4 I、4 3 9 Q、4 4 0 A、4 4 0 D、4 4 0 E、4 4 0 F、又は4 4 0 M [好ましくは、2 3 7 R、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 H、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 A、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 Q、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 Y、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 R、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 F、2 5 6 H、2 5 6 K、2 5 6 M、2 5 6 R、2 5 6 W、2 6 5 Y、2 8 0 T、2 9 2 G、2 9 2 I、3 1 1 D、3 1 1 E、3 1 1 G、3 1 1 N、3 1 5 F

30

40

50

、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、(例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から)設計され、変異Fc領域をコードする核酸分子は、追加的な抗体配列をコードする核酸(例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列)に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のFcRn結合親和性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することも含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より少ない(即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上少ない)FcRn結合親和性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを更に含む。本発明は、その方法によって生成される(変異Fc領域を含む)モノクローナル抗体を更に具現化する。

【0033】

別の実施形態において、本発明は、ポリペプチド(好ましくは治療用ポリペプチド)のインビボ血清半減期を減少させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域をコードする核酸を設計することを含む。235Q、236Y、237K、237R、238E、238G、238H、238W、247A、247D、247E、247F、247G、247H、247I、247L、247M、247N、247Q、247R、247S、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249Y、251F、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256I、256K、256M、256R、256W、256Y、264S、265S、265Y、S267G、267I、268D、268K、270A、270M、279I、279K、279L、280T、292E、292F、292G、292I、292L、311D、311E、311F、311G、311N、311R、311Y、315F、315K、315P、316F、317T、326W、327T、339E、339G、339L、339R、341D、341E、341F、341I、341K、341L、341M、341N、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343M、343V、343W、373A、373D、373G、373K、373L、373M、373N、373Q、373S、373T、373V、373W、376H、376L、376W、376Y、424M、424V、426D、429A、429F、429M、430D、430W、431P、432R、432S、434I、439Q、440A、440D、440E、440F、又は440M [好ましくは、237R、247D、247E、247F、247H、247L、247M、247N、247Q、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248Q、249L、249M、249Y、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254M、254N、254P、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256K、256M、256R、256W、265Y、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N、315F、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W、376Y、424M、424V、430D、430

W、431P、又は432S]。Fc変異体領域をコードする核酸は、治療用タンパク質をコードする核酸に作動可能な状態で結合される。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、核酸分子は、追加的なポリペプチドをコードする核酸（例えば、融合タンパク質の非Fc領域をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、非Fc融合パートナーをコードする核酸に上記に列举される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸に、その後作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むポリペプチド、及び母体Fc領域を含むポリペプチドのインビボ血清半減期を測定することも含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドを選択することを更に含み、該ポリペプチドが、母体Fc領域を含むポリペプチドに比べて減少した（即ち、好ましくは、少なくとも5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上減少した）血清半減期を有する。本発明は、方法によって生成される変異Fc領域を含むポリペプチド（即ち、融合ポリペプチド）を更に具現化する。

【0034】

別の実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体のCDC活性を増加させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含むように抗体のFc領域を構築することを含む。236Y、244L、247A、247D、247E、247G、247N、247Q、247R、247S、247W、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249N、249P、249Y、250K、250R、251F、251H、251I、251W、254A、254F、254K、254L、254M、254R、254Y、255K、256A、256G、256I、256L、256M、256P、256Q、256W、256Y、260S、268D、279Q、279S、279W、279Y、280K、280T、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283M、283N、283P、283R、283S、283W、292L、307A、307M、311F、311I、311K、311L、311M、311T、311V、311W、311Y、312P、314F、314I、314V、314W、314Y、315F、315K、315L、315P、315R、316K、317P、317T、318N、318T、332A、332D、332E、332F、332G、332H、332L、332M、332N、332Q、332S、332T、332V、332W、332Y、339D、339F、339G、339H、339I、339K、339N、339Q、339R、339S、339T、339W、339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343A、343D、343E、343G、343H、343K、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343W、343Y、373D、373E、373F、373H、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373T、373V、373W、375R、376A、376F、376G、376H、376L、376N、376P、376Q、376R、376S、376T、376V、377P、379N、379Q、379S、379T、380A、380N、380S、380T、382I、382L、382Q、382V、386K、426D、426L、429A、429F、429M、430A、430D、430F、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430R、430S、430T、430V、430W、430Y、431H、431P、432R、432S、434W、434Y、438L、438W、440Q、又は440Y [好ましくは、236Y、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、24

10

20

30

40

50

9 N、2 4 9 Y、2 5 0 K、2 5 0 R、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 A、2 5
4 F、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 R、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 6 A、2 5
6 G、2 5 6 I、2 5 6 L、2 5 6 M、2 5 6 P、2 5 6 Q、2 5 6 W、2 6 0 S、2 8
0 K、2 8 3 W、3 0 7 M、3 1 1 F、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1
1 T、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 1 Y、3 1 4 I、3 1 4 V、3 1 4 W、3 1 4 Y、3 1
5 P、3 1 7 P、3 3 2 D、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 2 Y、3 3
9 D、3 3 9 F、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 N、3 3 9 S、3 3 9 T、3 3 9 W、3 3
9 Y、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4
1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4
1 W、3 4 1 Y、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 N、3 4
3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 D、3 7 3 E、3 7
3 H、3 7 3 I、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 T、3 7 3 W、3 7
6 A、3 7 6 G、3 7 6 N、3 7 6 P、3 7 6 Q、3 7 6 R、3 7 6 S、3 7 6 T、3 7
6 V、3 7 7 P、3 7 9 N、3 7 9 Q、3 7 9 T、3 8 2 I、3 8 2 L、3 8 6 K、4 2
6 D、4 2 6 L、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3
0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P、4 3 0 R、4 3
0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3
4 Y、4 3 8 L、又は4 4 0 Y]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分
子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体Fc領域又は
天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、核酸分子は、追加的な抗体をコー
ドする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着さ
れる。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、上記に列挙される
少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状
態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の
発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精
製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によ
って、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のCDC活性、及び母体Fc領域を含むモノ
クローナル抗体の活性を測定することも含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノク
ローナル抗体より大きい（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、1
8%、20%以上大きい）CDC活性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を
選択することを更に含む。本発明は、この方法によって生成される変異Fc領域を含むモ
ノクローナル抗体を更に具現化する。

【0035】

別の実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクロー
ナル抗体のCDC応答を減少させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つ
を含むように抗体のFc領域を構築することを含む。2 3 5 G、2 3 5 S、2 3 6 R、2
3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 A、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2
3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R、2 4 7 H、2 4 7 I、2
4 7 L、2 4 7 T、2 4 7 Y、2 5 0 M、2 5 2 Y、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 I、2
5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 5 N、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2
5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 H、2 6 5 Y、2 6 7 G、2
6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2
7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、2 7 2 L、2 7 2 N、2 9 2 A、2 9 3 S、3 0 1 W、3
0 7 E、3 1 1 E、3 1 1 S、3 1 6 F、3 1 8 P、3 2 7 T、3 2 8 V、3 2 9 Y、3
3 0 K、3 3 0 R、3 3 2 K、3 3 9 E、3 3 9 M、3 4 3 I、3 7 3 S、3 7 8 D、3
8 0 D、3 8 2 D、3 8 2 F、3 8 2 N、3 8 2 P、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 W、3
8 2 Y、3 8 5 E、3 8 5 P、4 2 3 N、4 2 4 H、4 2 4 M、又は4 2 7 N [好まし
くは、2 3 5 G、2 3 5 S、2 3 6 R、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3
8 A、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3
8 Y、2 4 5 R、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 T、2 5 0 M、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5

7 M、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、3 0 1 W、3 1 1 S、3 2 7 T、3 2 9 Y、3 3 0 K、3 3 0 R、3 7 8 D、3 8 5 E、4 2 3 N、又は 4 2 4 H]。この方法によって、変異 F c 領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体 F c 領域又は天然の F c 領域をコードする核酸分子から）設計され、核酸分子は、追加的な抗体をコードする核酸（例えば、I g 重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、上記に列挙される少なくとも 1 つのアミノ酸置換の導入後の変異 F c 領域をコードする核酸を作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体 F c 領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体の C D C 活性、及び母体 F c 領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することも含む。この方法は、母体 F c 領域を含むモノクローナル抗体より少ない（即ち、好ましくは、5 %、1 0 %、1 2 %、1 4 %、1 6 %、1 8 %、2 0 % 以上少ない）C D C 活性を有する変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体を選択することを更に含む。本発明は、この方法によって生成される変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体を更に具現化する。

10

【0 0 3 6】

別の実施形態において、本発明は、本発明の変異 F c 領域又はその機能性フラグメントをコードする核酸分子を含む単離核酸分子を提供する。より好ましくは、単離核酸分子は、本発明の変異 F c 領域を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。好ましくは、前記核酸によってコードされる変異 F c 領域ポリペプチドは、変異体の母体 F c 領域と比較して、表 1 に示すようなアミノ酸置換を有する。好ましくは、ポリペプチドはモノクローナル抗体であり、更に好ましくは、モノクローナル抗体は全長抗体又は単鎖抗体である。モノクローナル抗体は、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はヒトモノクローナル抗体である。

20

【0 0 3 7】

別の実施形態において、本発明はベクターを提供し、好ましくは、本発明の変異 F c 領域ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、組換え発現ベクター、酵母発現ベクター、又はレトロウイルス発現ベクターを提供する（但し、これらに制限されない）。

30

【0 0 3 8】

別の実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。好ましくは、本発明の宿主細胞は、本発明の核酸分子を含む 1 つ以上のベクター又はコンストラクトを含む。本発明の宿主細胞は、本発明のベクターが導入された（例えば、形質転換、形質導入、感染、トランスフェクション、エレクトロポレーションなどによる）細胞であり、前記ベクターは、本発明の変異 F c 領域ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。任意に、ベクターは、宿主細胞染色体に安定して組み込まれる。宿主細胞タイプは、哺乳類、細菌、植物、及び酵母細胞を含む。好ましくは、宿主細胞は、C H O 細胞、C O S 細胞、S P 2 / 0 細胞、N S 0 細胞、酵母細胞、又はあらゆる好ましい細胞種の誘導体又は子孫である。

40

【0 0 3 9】

別の実施形態において、本発明は、本発明の変異 F c 領域又はその機能性フラグメントを含むポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。好ましくは、ポリペプチドはモノクローナル抗体であり、より好ましくは治療用モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はヒトモノクローナル抗体である。あるいは、ポリペプチドは、本発明の変異 F c 領域が作動可能な状態で結合され、及び共発現することによって改変した血清半減期から利益がもたらされる抗体以外のポリペプチドである。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる担体を更に含む。前

50

記医薬組成物において、変異Fc領域を含むポリペプチドは有効成分である。好ましくは、医薬組成物は、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の相同又は実質的に相同な集団を含む。治療的に使用される医薬組成物は、好ましくは無菌であり、かつ、凍結乾燥される。

【0040】

本発明は、哺乳類、好ましくはヒトにおけるタンパク質の活性を抑制する方法は、治療的に有効量又は予防的に有効量の（前記哺乳類に本発明の変異Fc領域を含むポリペプチド（好ましくはモノクローナル抗体）を、それらを必要とする前記哺乳類に投与することを含む。好ましくは、変異Fc領域を含むポリペプチドは、抑制されるタンパク質の結合パートナーである。本発明は、抗原エпитープに本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体が結合して生じる細胞情報伝達の抑制によって、改善する疾患又は障害を治療又は予防する方法を提供し、このような治療又は予防を必要とする患者（例えばヒト）に、治療的又は予防的に有効量の本発明のモノクローナル抗体を投与することを含む。

10

【0041】

本発明は、抗原エпитープに本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体が結合して生じる細胞情報伝達の抑制によって、改善する疾患又は疾患を治療又は予防する方法を提供し、このような治療又は予防を必要とする患者（例えばヒト）に、治療上又は予防上有効量の本発明のモノクローナル抗体を投与することを含む。本発明は包装材料、および該包装材料内に包含された本発明の変異Fc領域ポリペプチドを含むポリペプチドを含む製品を具現化する。本発明は、本願明細書に記載の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体及び外因性のポリペプチドを含む組成物、並びに、生理的又は薬学的に許容できる担体又は希釈剤を更に具現化する。

20

【0042】

ある実施形態において、本発明は、i) 天然のヒトフレームワーク領域（「FR」）（例えば、自然発生のヒトフレームワークに対して改変されていない）、及び、ii) 変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する。ある実施形態において、前記未修飾のヒトフレームワークは、ヒト生殖細胞系フレームワークである。他の実施形態において、本発明は、ポリペプチドを含む組成物を提供し、ポリペプチドは、i) 少なくとも1つのランダム化CDR配列、及び、ii) 本発明の変異Fc領域を含む。他の実施形態において、本発明は、ポリペプチドを含む組成物を提供し、ポリペプチドは、i) 未修飾のヒトフレームワーク（例えば、ヒト生殖細胞系フレームワーク）、ii) 少なくとも1つのランダム化CDR配列、及び、iii) 本発明の変異Fc領域を含む。

30

【0043】

本発明は、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体外因性のポリペプチドの治療及び診断的な使用を意図し、本願明細書において開示される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

本願明細書及び本願請求の範囲全体において、免疫グロブリン中の重鎖（Fc領域）のアミノ酸残基に対する番号づけは、Kabata他、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) により、EUインデックスによる。「KabataによるEUインデックスフォーマット」とは、ヒトIgG抗体における残基の番号づけを意味し、本願明細書の図2に示される。例えば、438位において、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、及びマウスIgG3の全ては、Qアミノ酸を有し、マウスIgG1はIアミノ酸を有し、マウスIgG2aはTアミノ酸を有し、及び、マウスIgG2BはKアミノ酸を有する。更に、本願明細書において、置換は、置換が生じたアミノ酸位置番号、その後に母体Fc領域の同位置にあったアミノ酸に代替するアミノ酸が続いて指定される（例えば、249Gは、母体Fc領域の249位において置換されるグリシン残基を示す）。番号は、母体Fc領域がヒトIgG1であるか否かに

40

50

関わらずヒト I g G 1 の位置に言及する。母体 F c 領域がヒト I g G 1 でなく、ある位置でヒト I g G と共に整列する場合、番号は母体 F c 領域における相同性の位置に言及する。

【0045】

本願明細書で使用される場合において、「被験者」及び「患者」という用語は、本発明の変異 F c 領域を含むポリペプチドが治療的に使用される任意の動物に言及し、このような治療によって利益を享受するヒトのみならず他の哺乳類（例えば、ペット用動物（イヌ、ネコ等）、スポーツ用の動物（例えばウマ）、及び家畜動物（ウシ、ブタ、及びヒツジ）を含む。

【0046】

本願明細書で使用される場合において、「治療又は予防」という用語は、異常なレベルのタンパク質と関連し、タンパク質の活性又はレベルを改変することによって利益が得られる疾患又は障害に言及する。

【0047】

「単離された」という用語は、天然環境において回収された、少なくとも 1 つの混入核酸と同定及びその核酸から単離された核酸に関連して使用される。単離された核酸は天然において見られるのとは異なる型及び環境に存在する。したがって、単離核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。単離核酸分子は、通常、例えば、核酸分子がプラスミド又は染色体中の天然細胞とは異なる位置でポリペプチドを発現する、細胞中に含まれる核酸分子を含む。単離された核酸は、一本鎖又は二本鎖の状態が存在する。単離核酸分子がタンパク質を発現するために使用されるとき、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは最低限センス鎖又はコード鎖を含むが、センス鎖及びアンチセンス鎖（即ち、二本鎖である）を含んでもよい。

【0048】

核酸は、他の核酸分子と機能的な関係におかれた場合に、「作動可能に結合」又は「作動可能に付着」される。例えば、プロモーター又はエンハンサーがコード配列の転写に作用する場合、核酸のコード配列に作動可能な状態で結合されるか、又は、リボソーム結合部位が翻訳を容易にするために配置される場合、核酸のコード配列に作動可能な状態で結合される。変異 F c 領域をコードする核酸分子は、発現した融合タンパク質が、変異 F c 領域ポリペプチドに上流又は下流で付着する外因性のタンパク質又はその機能性フラグメントを含むように配置される場合、外因性のタンパク質（即ち、自然界に存在するように F c 領域を含まないタンパク質又はその機能性フラグメント）をコードする核酸分子に作動可能な状態で結合され、外因性のタンパク質は、変異 F c 領域ポリペプチドにすぐに付着されるか、或いは、あらゆる長さ及び組成のリンカー配列によって分離される。同様に、ポリペプチドが別のポリペプチドとの機能的な関係に配置されるとき、ポリペプチド（本願明細書において「タンパク質」と同義的に使用される）分子は、「作動可能に結合」又は「作動可能に付着」される。

【0049】

本願明細書で使用される場合において、「機能性フラグメント」という用語は、ポリペプチド又はタンパク質（例えば、変異 F c 領域又はモノクローナル抗体）に関して使用される場合、全長ポリペプチドの少なくとも 1 つの機能において保持するタンパク質のフラグメントに関連する。フラグメントは、6 つのアミノ酸から全長ポリペプチドの全アミノ酸配列から 1 つのアミノ酸を除く大きさにおいて様々である。本願明細書において定義されるように、本発明の変異 F c 領域ポリペプチドの機能性フラグメントは少なくとも 1 つの「アミノ酸置換」を保持する。変異 F c 領域ポリペプチドの機能性フラグメントは、F c 領域に関連する公知の少なくとも 1 つの機能（例えば、A D C C、C D C、F c 受容体への結合、C 1 q への結合、細胞表面レセプターの下流制御は、例えば、F c 領域が作動可能に付着されるポリペプチドのインビボ又はインビトロでの半減期を増加させる）を保持する。

【0050】

「精製された」又は「精製する」という用語は、サンプルから少なくとも1つの混入物の実質的な除去を意味する。例えば、抗原特異的な抗体は、少なくとも1つの混入する非免疫グロブリンタンパク質を完全又は実質的に（少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%以上、好ましくは、96%、97%、98%、又は99%）除去することにより精製することができ、また、それらは同一の抗原に結合しない免疫グロブリンを除去することにより精製することができる。非免疫グロブリンタンパク質及び／又は特定の抗原に結合しない免疫グロブリンを除去することにより、サンプル中の抗原特異的な免疫グロブリンの割合が増大する。他の例では、ポリペプチド（例えば免疫グロブリン）を細菌の宿主細胞中で発現させ、宿主細胞のタンパク質を完全又は実質的に除去して精製することにより、サンプル中のポリペプチドの割合が増大する。

10

【0051】

用語「天然」という用語は、ポリペプチド（例えばFc領域）に言及し、自然又は自然に発生する多型現象において共通に発生するポリペプチドのアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を、ポリペプチドが有するというを示すために本願明細書において使用する。天然ポリペプチド（例えば天然のFc領域）は、組換え手段によって生成されるか、又は自然発生源から単離される。

【0052】

本願明細書で使用される場合において、「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列及び特定の宿主生体で作動可能に結合されたコード配列の発現に必要な適当な核酸配列を含む組み換えDNA分子を意味する。

20

【0053】

本願明細書で使用される場合において、「宿主細胞」という用語は、インビトロ又はインビボのいずれかに存在する、任意の真核細胞及び原核細胞（例えば、大腸菌等の細菌、CHO細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、及び昆虫細胞）を意味する。例えば、宿主細胞はトランスジュニク動物中に存在するものでもよい。

【0054】

本願明細書で使用される場合において、「母体ポリペプチド」とは、変異体（変異ポリペプチド）を生成するために変更又は改変（例えばアミノ酸置換）されてもよいアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは、天然又は非天然のFc領域、つまり、自然発生するFc領域又は少なくとも一部又はアミノ酸配列の修飾を伴うFc領域を含む。ある実施形態において、母体ポリペプチドよりも長い、あるいは短い変異体が特に意図される。特に好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは、変異体と比べ機能（例えば、増大又は減少したエフェクター機能、レセプター結合等）の点で相違する。

30

【0055】

本願明細書で使用されている場合において、「母体ポリペプチドの変異体」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸置換により、母体ポリペプチドと異なるアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。ある実施形態において、変異体はFc領域の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%、或いは最も好ましくは少なくとも95%、97%、又は99%（つまり、Fc領域の「一部」）を含む。好ましい実施例において、母体ポリペプチドの変異Fc領域は母体ポリペプチドからの少なくとも1つのアミノ酸置換、Fc領域において行なわれる置換を含む。母体ポリペプチドは、天然ポリペプチドであってもなくてもよい。

40

【0056】

本願明細書で使用される場合において、「Fc領域」という用語は、（例えば図1に示したような）免疫グロブリン重鎖のC末端領域を意味する。「Fc領域」は、Fc領域の天然配列であってもよく、又は変異Fc領域であってもよい。広く受け入れられている免疫グロブリン重鎖におけるFc領域の境界は変動しうるが、ヒトIgG重鎖のFc領域は、通常226位のCys又は230位のProから、カルボキシル末端まで及ぶと定義さ

50

れている。ある実施形態において、変異体はF c領域の一部のみを含み、カルボキシル末端は含んでも含まなくてもよい。免疫グロブリンのF c領域は、例えば、図1に示すように通常2つの定常領域、C H 2及びC H 3を含んでいる。ある実施形態において、1又は複数の定常領域を含む変異体が意図されている。他の実施形態において、そのような定常領域を含まない（又はそのような定常領域の一部しか含まない）変異体が意図されている。

【0057】

ヒトI g GのF c領域の「C H 2領域」（「C γ 2」領域とも呼ばれる）は、通常231位付近のアミノ酸から340位付近のアミノ酸に至る。C H 2領域は、他の領域と緊密に対形成していない点で際立っている。2つのN結合性分岐糖鎖が、正常なI g G分子の2つのC H 2領域の間に介在する。

10

【0058】

ヒトI g GのF c領域の「C H 3領域」（「C γ 3」領域とも呼ばれる）は、一般にF c領域の341位付近のアミノ酸残基から447位付近のアミノ酸残基に至る、F c領域のC末端からC H 2領域までの残基の範囲である。

【0059】

「機能的なF c領域」は、天然の配列F c領域の「エフェクター機能」を保有する。本発明の変異F c領域を含むポリペプチドの少なくとも1つのエフェクター機能は、天然のF c領域又は変異体の母体F c領域を含むポリペプチドに関して増加又は減少する。エフェクター機能の例としては、C 1 qへの結合、補体依存性細胞毒性（C D C）、抗体依存細胞媒介性細胞毒性（A D C C）、食作用、細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター、B C R）の下方制御等が挙げられるが、これらに限定されない。そのようなエフェクター効果は、F c領域が結合領域（例えば抗体の可変領域）に作動可能に結合されることを必要とする場合もあり、種々のアッセイ（例えば、F c結合アッセイ、A D C Cアッセイ、C D Cアッセイ、全血又は部分血サンプルからの標的細胞の消失等）により評価することができる。

20

【0060】

「天然配列F c領域」又は「野生型F c領域」は、広く天然において見られるF c領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を意味する。天然配列ヒトF c領域の例を図2に示すが、これらには、天然配列ヒトI g G 1 F c領域（f及びa、zアロタイプ、つまり非Aアロタイプ及びAアロタイプ）、天然配列ヒトI g G 2 F c領域、天然配列ヒトI g G 3 F c領域、及び天然配列ヒトI g G 4 F c領域並びに天然に存在するこれらの変異体が含まれる。天然配列マウスF c領域も図2に示す。

30

【0061】

「変異F c領域」は、本願明細書で定義されるように、少なくとも1つの「アミノ酸置換」により天然配列F c領域（又はそのフラグメント）と異なるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態において、変異F c領域は、天然配列F c領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは、天然配列F c領域又は母体ポリペプチドのF c領域において、1、2、3、4、又は5のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5のアミノ酸置換を有する。他の実施形態において、変異F c領域は、本願明細書に開示される方法に従って生成され、この変異F c領域は選択した外因性のポリペプチド、例えば、レセプター又はリガンドの結合ドメインなどの抗体可変ドメイン又は非抗体ポリペプチドに融合することができる。

40

【0062】

本願明細書で使用される場合、ポリペプチドにおける「誘導体」という用語は、それを含むポリペプチド、及び、アミノ酸残基置換の導入によって改変したアミノ酸配列に言及する。本願明細書において使用する場合、「誘導体」という用語は、あらゆる種類の分子がポリペプチドへの共有結合することによって修飾されるポリペプチドに言及する。例えば、抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、P E G化、リン酸エステル化、アミド化、公知の保護基／封鎖基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンド又は他

50

のタンパク質に対する結合などによって修飾されるが、これらに制限されない。ポリペプチド誘導体は、特定の化学開裂、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含むがこれには限定されない当業者にとって公知の技術を使用し、化学修飾によって生成される。更に、ポリペプチド誘導体は、誘導元のポリペプチドと同様又は同一の機能を有する。本発明の変異Fc領域を含むポリペプチドは、本願明細書で定義されるように誘導体であると理解され、好ましくは、誘導体化はFc領域において発生する。

【0063】

ポリペプチド（例えばFc領域又はモノクローナル抗体）に関連して本願明細書で使用される場合、「実質的にヒト由来」は、ポリペプチドは、天然のヒトアミノポリペプチドと少なくとも80%、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、又はそれ以上、より好ましくは、少なくとも95%、95%、97%、98%、又は99%相同であるアミノ酸配列を有することを示す。

【0064】

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、Fc領域（例えば抗体のFc領域）に結合するレセプターを意味する。好ましいFcRは、天然の配列FcRである。更に、好ましいFcRは、IgG抗体と結合し（γレセプター）、FcγRI、FcγRII、FcγRIIサブクラスのレセプターを含み、このレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的にスプライスされた形態を含む。FcγRIIレセプターは、FcγRIIA（「活性化レセプター」）、及びFcγRIIB（「抑制化レセプター」）を含み、その細胞質ドメインにおいて主に異なる同様のアミノ酸配列を有する。FcRは、Ravetch及びKinetによって研究されている。Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel, 他, Immunomethods 4: 25-34 (1994); and de Haas 他, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)。別の好ましいFcRは、母体のIgGの胎児への移動に関与する新生児レセプター（FcRn）を含む（Guyer 他, J. Immunol. 117: 587 (1976) and Kim 他, J. Immunol. 24: 249 (1994)）。将来、特定されるFcRを含む他のFcRは、本願明細書において用語「FcR」に包含される。

【0065】

本願明細書で使用される場合において、「抗体依存細胞媒介性細胞毒性」及び「ADCC」という語句は、非特異的なFcRを発現した（例えば非特異的な）細胞障害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、標的細胞の溶解を起こす細胞に媒介された反応を意味する。ADCCを媒介する細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単球は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。

【0066】

本願明細書で使用される場合において、「エフェクター細胞」という語句は、1種又は複数のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす白血球（好ましくはヒト）を意味する。好ましくは、エフェクター細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介する白血球の例としては、PBMC、NK細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が挙げられる。エフェクター細胞は、天然供給源から（例えば血液又はPBMCから）単離されてもよい。

【0067】

「改変した」FcRn結合親和性を有する変異ポリペプチドは、pH 6.0のとき、その変異体の母体ポリペプチド又は天然配列Fc領域を有するポリペプチドと比べてFcR結合親和性は、強化（増大）又は減退（減少）してよい。FcRnに対し増大した結合又は結合性を示す変異ポリペプチドは、FcRと母体ポリペプチドよりも高い親和性で結合する。FcRnに対し減少した結合又は結合性を示す変異ポリペプチドは、FcRと母体ポリペプチドよりも低い親和性で結合する。FcRnに対し減少した結合性を示す変異体は、結合性をほとんど又は全く検知できず、例えば、母体ポリペプチドに比べ、0~20

%の結合性を有する。FcRnに対し「高い親和性」で結合する変異ポリペプチドは、母体ポリペプチドと比較して、結合アッセイにおいて変異ポリペプチドと母体ポリペプチドの量がほぼ同一で、その他の条件も同一な場合、1種のFcRnと母体抗体よりも高い結合親和性で結合する。例えば、高いFcRn結合親和性を有する変異ポリペプチドは、例えば、ELISAアッセイにおいて、FcRn結合親和性が、母体ポリペプチドと比べ、約1.10倍～100倍（より典型的には約1.2倍～約50倍）増加することを示す。

【0068】

本願明細書で使用される場合において、「アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸配列中に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を、他の「代替」アミノ酸残基に置き換えることを意味する。代替残基は、「天然に存在する（遺伝子によりコードされた）アミノ酸残基」であり、アラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン（Cys）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）ロイシン（Leu）、リジン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、スレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、及びバリン（Val）から選択されてもよい。1又は複数の天然に存在しないアミノ酸残基による置換も、本願明細書におけるアミノ酸置換の定義に包含される。「天然に存在しないアミノ酸残基」とは、上に挙げた天然に存在するアミノ酸残基以外の残基を意味し、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基と共有結合することができる。天然に存在しないアミノ酸の例としては、ノルロイシン、オミシン、ノルバリン、ホモセリン、及び本願明細書に参照として組み込まれるEllman他、Meth. Enzym. 202:301-336（1991）に記載のもの等の他のアミノ酸残基アナログが挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】

「アッセイシグナル」という用語は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出する任意の方法からの出力を意味し、比色アッセイからの吸光度、蛍光強度、又は1分あたりの分解速度が含まれるが、これらに限定されない。アッセイのフォーマットとして、ELISA、facs、又は他の方法を含んでもよい。「アッセイシグナル」の変化は、細胞の生存率及び／又は解離速度、結合速度、若しくは両者の変化を反映させることができる。「高いアッセイシグナル」とは、測定された出力の値が他の値よりも高いこと（例えば、変異体は、ELISAアッセイにおいて、母体ポリペプチドに比べて高い（大きい）値を示すことがある）を意味する。「より低い」アッセイシグナルとは、測定された出力の値が他の値よりも低いこと（例えば、変異体は、ELISAアッセイにおいて、母体ポリペプチドに比べてより低い（小さい）値を示すことがある）を意味する。

【0070】

「結合親和性」という用語は、個々のFcレセプター-Fc結合相互作用に関する解離平衡定数（濃度の単位で示される）を意味する。結合親和性は、解離速度（通常、秒⁻¹等の時間の逆数の単位で示される）を結合速度（通常、モル／秒等の単位、濃度／単位時間の単位で示される）で割った比に直接関係する。一般に、解離平衡定数の変化が、結合速度、解離速度、又は両者の変化によるものであるかについては、それらの値を（例えば、BIACORE又はSAPIDYNE測定によって）実験的に測定しないと、明確にすることはできない。

【0071】

本願明細書で使用される場合において、「ヒンジ領域」という用語は、ヒトIgG1のGlu216（216）からPro230にわたる、ヒトIgG1における一連のアミノ酸を意味する。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間S-S結合を同じ位置で形成する最初と最後のシステイン残基の位置を決定することにより、IgG1配列について整列することができる。

【0072】

「C1q（C1q）」とは、免疫グロブリンのFc領域に対する結合部位を含むポリペ

プチドを意味する。C1q (C1q) と2つのセリンプロテアーゼC1r及びC1sは、共に、CDC経路の第1成分である複合体C1を形成する。

【0073】

本願明細書で使用される場合において、「抗体」という用語は、「免疫グロブリン」又は「Ig」と同義であり、そして、最も広い意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多特異的 (multispecific)（例えば二特異的 (bispecific) 抗体、及び所望の生物学的活性又は機能的活性を示す任意の抗体のフラグメントを包含する。単鎖抗体、及びキメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又は霊長類化抗体 (CDRを移植された)、更に、キメラ抗体又はCDRを移植した単鎖抗体は、異なる種に由来する部分を含み、本発明及び「抗体」という用語に包含される。これらの抗体の部分は、従来技術によって、合成的に、化学的に結合することができ、また、遺伝子工学技術を使用して連続したタンパク質として調製することができる。例えば、キメラ抗体又はヒト化抗体の鎖をコードする核酸は、連続したタンパク質を生成するために発現させることができる。米国特許第4,816,567号明細書；欧州特許第0125023 B1号明細書；米国特許第4,816,397号明細書；欧州特許第0120694 B1号明細書；国際公開第86/01533号明細書；欧州特許第0194276 B1号明細書；米国特許第5,225,539号明細書；欧州特許第0239400 B1号明細書、及び米国特許第5,585,089号明細書、及び、米国特許第5,698,762号明細書を参照。また、単鎖抗体に関する、Newman, R. 他 BioTechnology, 10:1455-1460, 1993, regarding primatized antibody、及びLadner 他、米国特許第4,946,778号明細書、及び、Bird, R. E. 他, Science, 242:423-426, 1988も参照。Fc領域（又はその部分）を含む抗体の全ての形態は、「抗体」という用語で本願明細書において包含されると理解される。更にまた、抗体は、固相に固定され、及び／又は、公知技術の方法に従って異種化合物（例えば、エンザイム又は毒素）によって結合して検出可能な標識で標識化される。

【0074】

本願明細書で使用される場合において、「抗体のフラグメント」という用語は、完全な抗体の一部を意味する。抗体のフラグメントの例としては、直鎖抗体、一本鎖抗体分子、Fc又はFc'ペプチド、Fab及びFabフラグメント、及び抗体のフラグメントから形成される多特異的 (multispecific) 抗体が挙げられるが、これらに限定されない。抗体のフラグメントは、好ましくはヒンジ領域の少なくとも一部及び必要に応じてIgG重鎖のCH1領域を保持する。他の好ましい実施形態において、抗体のフラグメントはCH2領域の少なくとも一部又はCH2領域全体を含む。

【0075】

本願明細書で使用される場合において、「機能性フラグメント」という用語は、モノクローナル抗体に関して使用される場合、機能的活性を保持するモノクローナル抗体の一部を意味することが意図される。機能的活性は、例えば、抗原結合活性又は特異性、レセプター結合活性又は特異性、エフェクター機能活性などである。モノクローナル抗体の機能性フラグメントとしては、重鎖又は軽鎖単独及び、VL、FH及びFd等のそれらのフラグメント、Fv、Fab及びFab'等の一価フラグメント、F(ab')₂等の二価フラグメント、一本鎖Fv (scFv)、及びFcフラグメント等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの用語は、例えば、Harlowe and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.) ; Huston 他, Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Sker

ra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) 及び、Day, E. D., Advanced Immunochimistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990) に記載される。機能性フラグメントという用語は、例えば、プロテアーゼによるモノクローナル抗体の消化又は短縮、及び公知の組み換えDNA法により生成されたフラグメントを含むことが意図される。

【0076】

本願明細書で使用される場合、「フラグメント」という用語は、別のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5、15、20、25、40、50、70、90、100以上連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドに言及する。好ましい実施形態において、ポリペプチドのフラグメントは、全長ポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

10

【0077】

本願明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、1価、2価、又は多価の免疫グロブリンを含む。1価のキメラ抗体は、キメラ軽鎖とジスルフィド架橋を介して結合するキメラ重鎖によって形成される二量体である。2価のキメラ抗体は、少なくとも1つのジスルフィド架橋で結合される2つの重鎖-軽鎖二量体によって形成される四量体である。ヒトに用いられる抗体のキメラ重鎖は、非ヒト抗体の重鎖に由来する抗原結合性領域を含み、少なくとも一部のヒト重鎖定常領域（例えばCH1又はCH2）に結合される。ヒトに用いられる抗体のキメラ軽鎖は、非ヒト抗体の軽鎖に由来する抗原結合領域を含み、少なくとも一部のヒト軽鎖定常領域（CL）に結合される。また、抗体、同一又は異なる可変領域結合特性のキメラ重鎖、及び、キメラ軽鎖を有するフラグメント又は誘導体は、公知の方法に従って、個々のポリペプチド鎖の適切な結合によって調製することができる。本方法において、キメラ重鎖を発現する宿主は、キメラ軽鎖を発現する宿主から別々培養され、そして、免疫グロブリン鎖は、別々に回収及び結合される。あるいは、宿主は共培養され、培養液において自然に結合させることができ、その後、組み立てられた免疫グロブリン又はフラグメント又は両方が回収され、重鎖及び軽鎖が同一の宿主細胞において発現される。キメラ抗体を生成する方法は、公知技術である（米国特許第6,284,471号明細書；米国特許第5,807,715号明細書；米国特許第4,816,567号明細書；及び米国特許第4,816,397号明細書を参照）。

20

30

【0078】

本願明細書で使用される場合において、非ヒト（マウス等）抗体がヒト化した状態（つまり、ヒト化抗体）とは、非ヒト免疫グロブリンから誘導される最小限の配列を含む、あるいは全く含まない抗体を意味する。大部分は、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエント由来の超可変領域が、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類等の非ヒト種由来の、所望の特異性、親和性及び能力を有する超可変領域由来の残基（ドナー抗体）で置換される。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト由来の残基で置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体において見出されない残基を含んでもよい。これらの改変は、一般に抗体の特性を更に改善するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常は2つの可変領域のほぼ全体を含んでおり、超可変ループ（CDR）の全体又はほぼ全体は、非ヒト免疫グロブリンの同一部位に対応しており、FRの全体又はほぼ全体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト化抗体はまた、通常、ヒト免疫グロブリン由来のイニムノグロブリン（inimunoglobulin）の定常領域（Fc）の少なくとも一部を含む。ヒト化抗体を生成するために使用される例示的な方法は、米国特許第5,225,539号明細書に記載される。

40

【0079】

本願明細書で使用される場合において、「イムノアドヘシン」という用語は、外因性の「アドヘシン」タンパク質（例えば、レセプター、リガンド又は酵素）の結合領域を、免疫グロブリンの定常領域に結合させた抗体類似の分子を表す。構造的に、イムノアドヘシ

50

ンは、所望の結合特性を有し、抗体の抗原認識及び結合部位（抗原結合部位）とは異なる（「外因性の」）アドヘシンのアミノ酸配列と免疫グロブリン定常領域配列が融合した構造を含む。

【0080】

本願明細書で使用される場合において、「リガンド結合ドメイン」という用語は、任意の天然レセプター又は少なくとも対応する天然レセプターの定性的なりガンド結合能を保持したその誘導体を意味する。ある実施形態において、レセプターは、免疫グロブリンの超遺伝子族のメンバーと相同な細胞外ドメインを有する細胞表面ポリペプチドに由来する。特にこの定義に含まれる、免疫グロブリン超遺伝子族に属しない他のレセプターとして、特にチロシンキナーゼ活性を有するサイトカインレセプター（チロシンキナーゼレセプター）、ヘマトポイエチン及び神経成長因子スーパーファミリー、及び細胞接合分子（例えば、E-、L-、及びP-セレクトリン）がある。

10

【0081】

本願明細書で使用される場合において、「レセプター結合ドメイン」という用語は、任意のレセプターに対する天然のリガンドを意味し、細胞接合分子、又は、対応する天然のリガンドの少なくとも定性的な結合能を保持した天然のリガンドの任意の領域又は誘導体を意味する。

【0082】

本願明細書で使用される場合において、「抗体-イムノアドヘシンキメラ」という用語は、抗体の少なくとも1つの結合ドメインに少なくとも1つのイムノアドヘシンで結合する分子を含む。例としては、Berg他，PNAS（USA）88：4723-4727（1991）及びCharnow他，J. Immunol.，153：4268（1994）に記載の二特異性CD4-IgGキメラを含むが、これらに限定されない。

20

【0083】

本願明細書で使用される場合において、「単離した」ポリペプチドとは、同定及び単離され、かつ／又はその天然環境（environment）下での成分から回収されたものである。天然環境での混入成分は、ポリペプチドの診断又は治療用途への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質、又は非タンパク質性の溶質が含まれる。ある実施形態において、単離したポリペプチドは、（1）Lowry法により決定された場合にポリペプチドの95重量%、好ましくは99重量%を上回るまで、（2）スピニングカップシークエネーターを用いて、少なくとも15のN末端又は内部（internal）のアミノ酸配列を得るのに適当な程度に、又は（3）還元又は非還元条件下で、クマシーブルー又は銀染色を用いたSDS-pageで単一性を示すまで精製される。単離したポリペプチドは、ポリペプチドの天然環境の少なくとも1つの成分を含まないため、そのままでは組み換え細胞内のポリペプチドを含んでいる。しかし、通常単離したポリペプチドは、少なくとも1つの精製工程を経て調製される。

30

【0084】

本願明細書で使用される場合において、「治療」という用語は、治療的な処置及び予防又は防止の方法を意味する。治療を必要とする人には、すでに疾患を発症している人及び疾患を予防する必要がある人が含まれる。

40

【0085】

本願明細書で使用される場合において、「障害」及び「疾患」という用語は、同義的に使用され、変異ポリペプチド（本発明の変異体Fcを含むポリペプチド）を用いた治療により利益を享受することができる任意の状態を意味し、慢性及び急性の障害又は疾患（例えば、患者が特定の疾患にかかりやすくなるような病的状態）を含む。ある実施形態において、病気はガンである。ある実施形態において、「自己免疫疾患」という用語は、「自己免疫不全」という用語と同義的に使用され、被験者の細胞、組織及び／又は器官との被検者自身の免疫反応によって引き起こされる細胞損傷、組織損傷及び／又は臓器損傷を特徴とした被検者の症状に言及する。用語「炎症性疾患」は、用語「炎症性疾患」によって同義的に使用され、炎症を特徴とする被検者の症状に言及する。自己免疫不全は、炎症と

50

関連していてもいなくてもよい。更に、炎症は、自己免疫不全によって引き起こされてもなくてもよい。特定の疾患は、自己免疫疾患及び炎症性疾患の両方を特徴とする。

【0086】

本願明細書で使用される場合において、「ガン」及び「ガン性の」という用語は、典型的には、無秩序な細胞成長によって特徴づけられる哺乳類の生理学的状態を意味し、記述する。ガンの例としては、上皮性悪性腫瘍、リンパ腫、芽細胞種、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。より具体的には、それらのガンとしては、扁平上皮ガン、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、肺腺ガン、肺扁平上皮ガン、腹膜ガン、肝細胞ガン、胃ガン、膵臓ガン、グリア芽腫、子宮頸ガン、卵巣ガン、肝ガン、膀胱ガン、肝ガン、乳ガン、大腸ガン、結腸直腸ガン、子宮内膜又は子宮ガン、唾液腺ガン、腎臓ガン、肝臓ガン、前立腺ガン、外陰部ガン、甲状腺ガン、肝腫瘍、及び数種の頭部及び頸部ガンが挙げられる。本願明細書で使用される場合において、「標識」という用語は、ポリペプチドと直接又は間接的に結合する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身が検出可能なもの（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）であってもよく、酵素標識の場合には、検出可能な基質又は組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

10

【0087】

本願明細書で使用される場合において、「レセプター」という用語は、少なくとも1つのリガンドに結合することが可能なポリペプチドを意味する。好ましいレセプターは、細胞外リガンド結合ドメイン、及び、必要に応じて、他のドメイン（例えば、膜貫通ドメイン、細胞間ドメイン及び／又は膜アンカー）を有する細胞表面又は可溶性のレセプターである。本願明細書に記載のアッセイにより評価されるレセプターは、完全なレセプターでもよく、そのフラグメント又は誘導體（例えば、1又は複数の外因性ポリペプチドに融合した、レセプターの結合ドメインを有する融合タンパク質）でもよい。更に、結合能が評価されるレセプターは、細胞内にあってもよく、又は単離され、必要に応じてアッセイプレート又は他の固相に塗布されていてもよく、又は直接標識されプローブとして使用されてもよい。

20

【0088】

本願明細書で使用される場合において、「抗体応答性疾患」という用語は、抗体療法により少なくとも部分的に治療が可能であることが示される任意の疾患又は病状を意味する。そのような疾患又は病状の例としては、リンパ腫（RITUXANにより治療可能であることが示されている）、感染症（SYNAGISで治療可能であることが示されている呼吸器シンシチウムウイルス）、腎臓移植（ZENAPAXが有効であることが示されている）、クローン病及び関節リウマチ（REMICADEで治療可能であることが示されている）、乳ガン（HERCAPTINにより治療可能であることが示されている）、及び大腸ガン（EDRECOLOMABにより治療可能であることが示されている）が挙げられるが、これらに限定されない。本願明細書で使用される場合において、「イムノアドヘシン応答性疾患」という用語は、アドヘシン療法により少なくとも部分的に治療が可能であることが示される任意の疾患又は病状を意味する。

30

【0089】

本願明細書で使用される場合において、母体ポリペプチドよりも「ヒトエフェクター細胞の存在下で抗体依存細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を効率的に媒介する」変異ポリペプチドとは、インビトロ又はインビボにおいて、アッセイに用いた変異ポリペプチド及び母体抗体の量がほぼ同じである場合に、ADCCの媒介が顕著に有効なポリペプチドである。例えば、そのような変異体は、同一のADCCアッセイにおいて、母体ポリペプチドよりもあるADCCアッセイにおいてより多くの標的細胞の溶解を起こす。そのような変異体は、例えばADCCアッセイにより同定することができるが、ADCC活性を決定する他のアッセイ又は方法（例えば動物モデル）を用いてもよい。好ましい実施形態において、変異ポリペプチドは、母体ポリペプチドよりも、ADCCの媒介において約1.2倍、1.5倍、50倍、100倍、約500倍、又は約1000倍以上有効である。

40

【0090】

50

「抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患の症状」という用語は、通常、特定の疾患に関連するそれらの症状を意味する。例えば、症状は通常クローン病に関連する症状であり、腹痛、下痢、直腸出血、体重の減少、発熱、食欲の減退、脱水、貧血、膨張、線維症、腸管の炎症、及び栄養失調を含む。「症状が軽減するような条件下で」という語句は、任意の抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患の検出可能な症状における、任意の定性的又は定量的な減少を意味し、疾患からの回復速度における検出可能な影響（例えば体重の増加）、又は、通常特定の疾患に関連する少なくとも1つの疾患の軽減（例えば、抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患がクローン病の場合には、腹痛、下痢、直腸出血、体重の減少、発熱、食欲の減退、脱水、貧血、膨張、線維症、腸管の炎症、及び栄養失調の少なくとも1つの軽減）の症状を含むが、それらに限定されない。

10

【0091】

モノクローナル抗体及びレセプター

天然に存在する全長抗体（「免疫グロブリン」又は「Ig」）は、4つのペプチド鎖、ジスルフィド結合によって相互接続する2つの重（H）鎖（完全長では約50-70 kDa）及び2つの軽（L）鎖（完全長では約25 kDa）からなる免疫グロブリン分子である。各鎖のアミノ末端は、抗原認識に主に関与する約100-110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のC末端部は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を定義する。

【0092】

軽鎖は、 κ 又は λ として分類され、特定の定常領域を特徴とする。重鎖は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 又は ϵ として分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEとして定義する。各重鎖タイプは、特定の定常領域を特徴とする。

20

【0093】

各重鎖は、重鎖可変領域（本願明細書では「HCVR」）、及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、IgG、IgD、及び、IgAに関する3つのドメイン（CH1、CH2、及びCH3）、及び4つのドメイン（CH1、CH2、CH3、及びCH4）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本願明細書「LCVR」）、及び、軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン（CL）からなる。HCVR及びLCVR領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域に更に再分割され、そして、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる保護領域が点在する。各HCVR及びLCVRは、3つのCDR及び4つのFRからなり、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端を構成する。各ドメインに対するアミノ酸の帰属は、周知の規則に従う[Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]。特定の抗原と結合する抗体の機能的な能力は、集合的に6つのCDRで決定される。しかしながら、完全なFabより低い親和性であるにもかかわらず、抗原に関する特定の3つのCDRだけを含む単一の可変ドメインですら抗原を認識及び結合する能力を有する。

30

【0094】

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、公知技術のハイブリドーマ技術のみならず、組み換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術又はこのような容易な公知の技術の組合せを使用して生成することができる。本願明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、制限されないが、ハイブリドーマ技術で生成される抗体である。「モノクローナル抗体」は、例えば、あらゆる成熟核、原核生物、又はファージクローンを含む単一のコピー又はクローンに由来する抗体に言及し、かつ、その抗体が生成される方法に言及しない。「モノクローナル抗体」は完全（intact）（完全（complete））又は全長）な抗体、実質的に完全な抗体、抗体の機能性フラグメントであり、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体であってよい。

40

【0095】

50

「モノクローナル抗体」の集団は、相同又は実質的に相同な（又は純粋な）抗体集団に言及し、つまり、集団における抗体の少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、又はそれ以上、より好ましくは、少なくとも約97%又は98%、最も好ましくは少なくとも99%が同一であり、同じ抗原又はエピトープに対してE L I S A分析において拮抗する。

【0096】

本願明細書において使用する場合、「特異的に結合する」又は「選択的に結合する」という用語は、特異結合の対の片方は、その特異結合パートナー以外の分子に、有意に結合しない状態に言及する。また、この用語は、例えば、本発明の抗体の抗原結合性ドメインは、多くの抗原によって担持される特定のエピトープに特異的であり、抗原結合性ドメインを担持する特異抗体が、エピトープを担持する様々な抗原に結合する場合に適用できる。

10

【0097】

F c 領域は、酵素パラインでの消化によって生成される完全抗体（例えばI g G）の部分に言及する（図1を参照）。F c 領域は、C H 2 及びC H 3 ドメイン同様ヒンジ領域の部分からなる各鎖を有するホモ二量体である。F c 領域は、C H 3 ドメイン間のヒンジ領域間及び複数の非共有結合間で形成される鎖間ジスルフィド架橋による二量体である。I g Gは、身体のもっとも多い種類のI g であって、総免疫グロブリンのほぼ75%を構成し、血管内プール及び血管外プールの中に均等に分布する。I g Gは、抗原に一次応答の初期のステージにおいてほとんど生成されないが、二次応答において生成される抗体の主な形状である。

20

【0098】

上述したように、抗体には主としてC H 2 及びC H 3 領域が存在し、非抗原性の結合機能に参与する。また、これらの領域及びリンカーの部分は、通常、F c 領域として知られており、エフェクター分子の結合により媒介されるいくつかのエフェクター効果を有する。

【0099】

抗体のF c 領域に媒介されるエフェクター機能は、（1）抗体が抗原に結合した後に作用するエフェクター効果（これらの効果は、例えば、補体カスケード又はF c レセプター（F c R）を有する細胞に参与する）、及び（2）抗原への結合とは無関係に作用するエフェクター効果（これらの効果は、循環し続けること及びトランスサイトシスにより細胞間障壁を越えて輸送される能力によりもたらされる）の2つのカテゴリーに分類することができる。例えば、補体のC 1 q（C 1 q）成分の抗体への結合により補体系が活性化される。オプソニン化に続く、補体の活性化が細胞病原体の溶解にとって重要である。補体の活性化はまた、炎症応答を刺激し、自己免疫過敏にも参与する場合がある。更に、抗体はF c 領域を介して、抗体のF c 領域上のF c レセプター結合部位で、細胞上のF c Rに結合することにより細胞に結合する。I g G、I g E、I g A、及びI g Mを含む種々の抗体には、特異的な多くのF c Rが存在する。本発明は、いずれかの特定のメカニズムに限定されないが、細胞表面におけるF c Rへの抗体の結合は、抗体に覆われた粒子の吞噬及び破壊、免疫複合体の除去、キラー細胞による抗体で覆われた標的細胞の溶解（A D C C）、炎症性メディエータ、胎盤通過及び免疫グロブリンの産生の制御を含む多くの重要で多様な生物学的応答を引き起こす。

30

40

【0100】

いくつかの抗体のエフェクター機能は、抗体のF c 領域に結合するF c Rに媒介される。F c Rは、免疫グロブリンのアイソタイプに対する特異性によって定義され、I g G抗体に対するF c レセプターはF c γ R、I g Eに対するものはF c ϵ R、I g Aに対するものはF c α R等と呼ばれる。F c γ Rの3つのサブクラス、F c γ R I（C D 6 4）、F c γ R I I（C D 3 2）、F c γ R I I I（C D 1 6）が同定されている。

【0101】

F c γ Rのそれぞれのサブクラスは2つ又は3つの遺伝子によりコードされており、選

50

択的RNAスプライシングにより多重転写が起こり、FcγRIアイソフォームの幅広い多様性が存在する。FcγRIサブクラスをコードする3つの遺伝子（FcγRI A、FcγRI B及びFcγRI C）は、第1染色体長腕の1q21.1領域に一团となって存在しており、FcγRIIサブクラスをコードする3つの遺伝子（FcγRII A、FcγRII B及びFcγRII C）及びFcγRIIIサブクラスをコードする2つの遺伝子（FcγRIII A、及びFcγRIII B）は全て領域1q22に一团となって存在する。これらの異なるFcRサブタイプは、異なる細胞種において発現する（例えば、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)）。例えば、ヒトにおいて、FcγRIII Bは好中球のみに見られるが、FcγRIII Aはマクロファージ、単球、NK細胞、及びT細胞の亜集団において見られる。特に、FcγRIII Aは、ADCCに關与する細胞種の一つであるNK細胞に存在する。

10

【0102】

ヒトFcγRIII A（CD16）レセプターは、細胞外ドメインの158位に、この位置にフェニルアラニン又はバリンをコードする共通の多型を有する。FcγRIIIのV型対立遺伝子は、ヒトIgG1に対しF型対立遺伝子よりも高い親和性を有する。V158対立遺伝子はまた、ADCCを効率的に媒介する。臨床データは、RITUXANによる治療を行っている患者におけるFcγRIII Aの遺伝子型と、処置及び治療に対する応答との間に相関を示した。臨床及び分子レベルでの応答並びに進行時間は、FcγRIII A-158V遺伝子型（人口の約20%）と同型の患者が優れていることが示された。それに対して、異型又はより親和性の低いFcγRIII A-158F遺伝子型（人口の約80%）の患者の応答は鈍くなる。これらのデータは、ADCCを促進する158FのFc変異キャリアはガンの抗体治療の臨床での有効性を高める可能性があることを示唆する。遺伝子多型は、ヒトFcγRIII A（CD32）レセプターの、細胞外ドメインの131位にも存在し、ヒスチジン（H）又はアルギニン（R）のいずれかをコードする。131位における多型は、ヒトIgGに対する結合に影響を与えることが見出されている。最近のデータによれば、FcγRIII Aの131位における多型とRITUXANに対する臨床応答との間に相関が存在することが示されている。

20

【0103】

H131対立遺伝子と同型である患者は、他の2つの群よりも優位に高い応答速度を有する。FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIは、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）レセプターであり、FcγRIは細胞外ドメインに3つのIgSFドメインを有する一方、FcγRII及びFcγRIIIは、細胞外ドメインに2つのIgSFドメインしか有しない。他のタイプのFcレセプターは新生児Fcレセプター（FcRn）である。FcRnは、主要組織適合複合体（MHC）と構造的に同一であり、β2-マイクログロブリンと非共有結合したα鎖を含む。

30

【0104】

変異Fc領域

本発明は、変異ポリペプチド、変異ポリペプチドをコードする核酸配列、及び、変異ポリペプチドを生成する方法を提供する。好ましくは、本発明の変異ポリペプチドは、母体ポリペプチドと少なくとも1つのアミノ酸の修飾、好ましくはアミノ酸置換を有する点で異なる。「母体」、「野生型」、「出発物質となる」又は「非変異体」ポリペプチドは、好ましくは抗体Fc領域の少なくとも一部を含み、変異体ポリペプチドはFc領域の中で発生する。Fc領域を含む母体ポリペプチドは、Fc領域またはその部分を含むポリペプチドを生成する当該技術分野で用いられる手法を用いて調製することができる。好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは抗体である。しかし、母体ポリペプチドは、少なくともFc領域の一部を含む他のポリペプチド（例えばイムノアドヘシン）であってもよい。母体ポリペプチドのFc領域の部分は天然配列又は非天然配列のものであり、好ましくは、ヒト起源の天然配列である。ある実施形態において、変異Fc領域は（例えば、本願明細書に記載の方法によって）生成することができ、抗体の可変領域又はレセプター若

40

50

しくはリガンド、或いは治療用ポリペプチドの結合ドメイン等の選択された外因性のポリペプチドに融合させてもよい。

【0105】

好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは、Fc領域又はその機能部位を含む。一般的に、母体ポリペプチドのFc領域は天然配列Fc領域、及び好ましくはヒト天然配列Fc領域を含む。しかし、母体ポリペプチドのFc領域は、1又は複数のすでに存在する天然配列Fc領域からのアミノ酸配列の変更又は修飾（例えばアミノ酸置換）を有していてもよい。例えば、Fc領域のC1q（C1q）結合活性がすでに変更させられていてもよく、またFc領域のFcγR結合親和性に変更されてもよい。関連する変異Fc領域をコードする所望の変異Fc領域又は核酸は構築してから、変異Fc領域（例えば、抗体可変領域、外因性のタンパク質）の所望の融合パートナーに作動可能に付着されるように設計される。さらなる実施形態において、母体ポリペプチドのFc領域は仮想的（例えば、思想上のもの又はコンピューター若しくは紙面上に可視的に表現されたもの）であり、それは物理的に存在しないが、抗体技術者は所望の変異Fc領域のアミノ酸配列を決定し、その配列又は所望の変異Fc領域のアミノ酸配列のDNAコーディングを含むポリペプチドを生成することができる。しかし、好ましい実施形態において、母体ポリペプチドのFc領域をコードする核酸配列を得ることができ、この核酸配列を変更して変異Fc領域をコードする変異性核酸配列を生成することができる。

10

【0106】

母体ポリペプチド（又は単に変異Fc領域）の変異体をコードする核酸は、具体的な配列についての本願明細書の教示を用いて、公知の方法により調製することができる。これらの方法には、ポリペプチドをコードするすでに調製された核酸への部位特異的（又はオリゴヌクレオチド媒介性）突然変異誘発法、PCR突然変異誘発法（e.g., Vallente他, Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989)）、及びカセット式突然変異誘発法（e.g., Wells他, Gene 34:315-323 (1985)）が含まれるが、それらに限定されない。部位特異的突然変異誘発法は、変異体を調製するための好ましい方法である。この手法は当該技術において公知である（例えば、Carter他, Nucleic Acids Res. 13:4431-4443 (1985)）及びKunkel他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1987)を参照）。

20

30

【0107】

あるいは、又は更に、変異ポリペプチドをコードする所望のアミノ酸配列を決定することができ、このような変異ポリペプチド（即ち、本願明細書に記載されるように、アミノ酸置換からなる変異Fc領域を含むポリペプチド）のアミノ酸配列を合成的に生成することができる。これは、母体Fc領域が変異Fc領域の分子前駆体ではないが、代わりに、所望のアミノ酸置換の非存在下の母体に存在するFc領域のアミノ酸配列であった場合であるにもかかわらず、母体Fc領域の変異Fc領域であると未だに考慮される。

【0108】

母体ポリペプチドのアミノ酸配列は、インビトロ及び／又はインビボで変更された結合親和性又は活性を有し、かつ／又はインビトロ及び／又はインビボで変更されたADCCを有する変異Fc領域を生成するために修飾されてもよい。また、母体ポリペプチドのアミノ酸配列は、変更された補体結合特性及び／又は循環半減期を有する変異Fc領域を生成するために修飾されてもよい。

40

【0109】

Fc領域の生物学的性質の実質的な改変は、（a）例えば、シート又はヘリックスコンホメーションの置換された領域のポリペプチド骨格の構造、（b）標的部位における分子、又は側鎖全体における電荷又は疎水性、（d）糖質との相互作用、又は（e）ドメインの運動柔軟性を変化させる効果の点で有意に異なるアミノ酸置換を選択することにより達成される。天然に存在するアミノ酸残基は、共通の側鎖の性質に基づき、下記のように分類される。

50

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile
- (2) 中性かつ親水性：cys、ser、thr
- (3) 酸性：asp、glu
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg
- (5) 配向に影響を与える残基：gly、pro
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe

【0110】

非保存的置換により、これらの分類の1つに属するアミノ酸は他の分類に属するアミノ酸に交換される。保存的置換により、これらの分類の1つに属するアミノ酸は同一の分類に属するアミノ酸に交換される。

10

【0111】

以下の実施例で示されるように、改変した活性（エフェクター機能及び薬物動態）を有する変異Fc領域を設計することができる。例えば、Fc領域の1又は複数のアミノ酸残基を、ADCC活性又はCD活性或いはFcRn結合親和性を改変（例えば、増大又は減少）するために修飾することができる。好ましい実施例において、修飾は、本願明細書の表1のリストに記載される置換である。一般的に、ADCC活性に影響することを本願明細書で確認したFc領域の残基について、そのような変異Fc領域を生成するために1又は複数のアミノ酸置換を行う。好ましい実施形態において、1～約10以下のFc領域の残基を置換する。ここで、1又は複数のアミノ酸置換を有するFc領域は、好ましくは、母体Fc領域又は天然ヒトFcの配列の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%を保持する。

20

【0112】

母体Fc領域に適当なアミノ酸配列の修飾を導入することにより、（母体Fc領域と比較して）（a）ADCCをヒトエフェクター細胞の存在下で効率的又は非効率に媒介し、かつ／又は、（b）CDをヒトエフェクター細胞の存在下で効率的又は非効率に媒介し、かつ／又は、（c）C1qに、所望の親和性で結合し、かつ／又は、（d）Fcγレセプター（FcγR）又は新生児Fcレセプター（FcRn）に所望の親和性で結合することができる変異Fc領域を生成することができる。そのような変異Fc領域は、通常少なくとも1つのアミノ酸の修飾をFc領域に含む。好ましくは、修飾は、アミノ酸置換（より好ましくは、本願明細書の表1～9に列挙されるようなアミノ酸置換）である。

30

【0113】

好ましい実施形態において、母体ポリペプチドのFc領域は、ヒトFc領域又はその機能性フラグメント、例えば、天然ヒトFc領域IgG1（f及びa、zアロタイプ）、IgG2、IgG3、IgG4、及び任意の種について知られている又は発見された全てのアロタイプである。そのような領域は図2（配列番号1～8）及び図3（配列番号9～12）に示した配列を有する。

【0114】

ある実施形態において、増大したADCC活性を有する変異Fc領域を生成するために、母体ポリペプチドは、ADCCをすでに有するもの（例えば、母体ポリペプチドはヒトIgG1又はヒトIgG3のFc領域を含む）であることが好ましい。ある実施形態において、変異体は、母体ポリペプチドに比べて増大したADCC活性（例えば、本願明細書に記載されるADCC分析に従って母体に比べて大きなレベル）を有する。即ち、変異Fc領域から成っているモノクローナル抗体は、母体Fc領域或いは天然IgG1又はIgG3のFc領域配列からなるモノクローナル抗体に対して同一の環境、又は、変異Fc領域からなるモノクローナル抗体と同一の下で比較して増大したADCC活性を有する。

40

【0115】

好ましい実施形態において、アミノ酸置換はFc領域のCH2及び／又はCH3領域に導入される。好ましい実施形態において、これらの変異体を生成するためのテンプレートとして用いた母体ポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域を含む。

【0116】

50

ある実施形態において、増大したCD C活性を有する変異Fc領域を生成するために、母体ポリペプチドは、CD Cをすでに有していることが好ましい。ある実施形態において、変異体は、母体ポリペプチドに比べて増大したCD C活性（例えば、本願明細書に記載されるCD C分析に従って母体に比べて大きなレベル）を有する。即ち、変異Fc領域から成っているモノクローナル抗体は、母体Fc領域或いは天然Ig G1又はIg G3のFc領域配列からなるモノクローナル抗体に対して同一の環境、又は、変異Fc領域からなるモノクローナル抗体と同一の下で比較して増大したCD C活性を有する。

【0117】

上述の変異ポリペプチドには、望ましい又は意図されるポリペプチドの使用に応じて更に修飾を行ってもよい。そのような修飾には、例えば、アミノ酸配列のさらなる変更（アミノ酸配列の置換、挿入及び／又は欠失）、糖質の改変、外因性ポリペプチドとの融合及び／又は共有結合による修飾が含まれる。そのようなさらなる改変は、Fcレセプターとの結合及び／又はAD C C活性の変更をもたらす、本願明細書に開示したアミノ酸の修飾の前、同時、又は後に行うことができる。

【0118】

あるいは、又は更に、アミノ酸の修飾をC1 q（C1 q）との結合及び／又はFc領域のCD C機能を改変させる1又は複数のさらなるアミノ酸の修飾と組み合わせることが有用な場合がある。例えば、出発物質となったポリペプチドは、C1 q（C1 q）に結合することができず、かつ／又はCD Cを媒介できないが、本願明細書の教示に従い、これらのさらなるエフェクター機能を獲得するように改変することができる。更に、すでにC1 q（C1 q）結合能を有し、必要に応じてCD C媒介能をも更に有するポリペプチドを、これらの活性の一方又は両方を増大（或いは、減少）させるように改変することもできる。C1 q（C1 q）結合を変化させ、かつ／又はCD C活性を改変する特定のFc領域アミノ酸の修飾については、本願明細書（表2、7、8、及び10を参照）又は、国際公開第00/42072号パンフレットに記載される。

【0119】

上に開示したように、Fc領域又はその一部を、例えば、CD C活性及び／又はAD C C活性を改変することにより、エフェクター機能を変化させるようにデザインすることができる。例えば、改善したCD C活性及びAD C C活性を有する変異Fc領域を生成することができる。あるいは、エフェクター機能を減少させ、あるいは除去したい場合には、CD C活性及び／又はAD C C活性が減少した変異Fc領域を設計することができる。他の実施形態において、これらの活性の一方を増大させ、必要に応じて他方の活性を減少させ、例えば、増大したAD C C活性を有するがCD C活性が減少したFc領域変異体、及びその逆の変異Fc領域を生成することができる。更に、FcRn、プロテインA、及び／又は他のFc結合性タンパク質に対する結合親和性が改変した変異Fc領域を設計することができる。

【0120】

ある実施形態において、本発明は、母体ポリペプチドの変異体を含む組成物を提供し、前記変異体はFc領域を有し、Fc領域の中において少なくとも1つのアミノ酸の修飾を有する（例えば、Deisenhofer, Biochemistry, 20:2361-70, April 1981, 及びW00042072を参照）。他の実施形態において、本発明は、Fc領域を有する母体ポリペプチドの変異体を含む組成物を提供し、該変異体はFc領域において少なくとも1つの非表面残基のアミノ酸の修飾を含む。さらなる実施形態において、本発明は、Fc領域を有する母体ポリペプチドの変異体を含む組成物を提供し、該変異体は、Fc領域において、少なくとも1つの表面残基のアミノ酸の修飾及び少なくとも1つの非表面残基のアミノ酸の修飾の両方を含む。

【0121】

複合変異体

ある実施形態において、本発明の変異Fc領域は、2つ以上アミノ酸の修飾（例えば置換）からなる。このような複合変異体は、例えば、上記で詳述される（例えば、表1を参

10

20

30

40

50

照) アミノ酸置換、又は当該技術分野において公知の置換に加えて表 1 に列挙されるような 1 つ以上のアミノ酸置換の 2 つ以上を選択して生成される。

【0122】

表 10 に示した複合変異体及び他の複合変異体 (国際公開第 00/42072 号パンフレットに開示され、本願明細書において開示される組合せで使用する) は、所定の活性 (例えば、FcRn 結合活性、ADCC 活性、及び CDC 活性) について、種々のアッセイ (下記の実施例を参照) によりテストすることができる。こうして、有用な複合変異体を同定することができる。

【0123】

ある好ましい実施形態において、複数のアミノ酸置換は ADCC 活性を増大させる 1 つのアミノ酸置換、及び変異 Fc 領域を含むポリペプチドの新生児 Fc レセプター (FcRn) への結合親和性 (例えば、pH 6.0 における) を増大させる 1 つのアミノ酸の修飾を有する本発明の変性 Fc 領域において存在する。他の実施形態において、本発明の複合変異体は、本発明の少なくとも変異 Fc 領域の 1 つの表面残基のアミノ酸の修飾及び少なくとも 1 つの非表面残基のアミノ酸の修飾を含む。本発明の変異 Fc 領域のさらなる複合変異体は、本願明細書に記載の 2 又はそれ以上のアミノ酸置換、又は本願明細書に記載の少なくとも 1 つのアミノ酸の修飾、及び世界公開第 00/42072 号パンフレットに記載のアミノ酸の修飾を組み合わせることにより生成することができる。

【0124】

変異ポリペプチドのアッセイ

本発明は、Fc 領域変異体又は本発明の変異 Fc 領域を含むポリペプチドをスクリーニングする種々のアッセイを提供する。スクリーニングアッセイを、有用な変異体の発見及び検証のために用いることができる。例えば、複合変異体 (表 10 参照) をスクリーニングし、FcRn への結合が変化した、かつ/又は ADCC 活性が変化した、かつ/又は CDC 活性が変化した (例えば、ADCC 又は CDC 活性が増大又は減少した)、かつ/又は全血からの標的細胞 (例えば B 細胞) の除去能が改変を受けた変異体を見出すことができる。また、以下に述べるように、本発明のアッセイを用いて、(例えば、抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患の症状を有するヒト等の) 被験者に対する有用な治療効果を有する変異体を発見し検証することができる。種々のアッセイのタイプを用いて、変異体における母体ポリペプチドに対する任意の変更を評価することができる (国際公開第 00/42072 号パンフレットに記載のスクリーニングアッセイを参照)。他のアッセイの例は以下に示す。

【0125】

好ましい実施形態において、変異ポリペプチド、(つまり、本発明の変異 Fc 領域を含むポリペプチド) は、母体ポリペプチドと比べ (つまり、例えば、結合能は、好ましくは非変異ポリペプチドの約 20 分の 1、10 分の 1、7 分の 1、5 分の 1 より小さい) 特異抗原 (未改変の抗原結合領域又は改変を受けた抗原結合領域を介した) の結合能をほぼ保持するモノクローナル抗体である。変異ポリペプチドの抗原への結合能は、ELISA、蛍光活性化細胞分類 (FACS) 分析、又は放射性免疫沈降法 (RIA) 等の手法により決定することができ、例えば、FcR 結合アッセイは、本発明の変異体を評価するために使用される。例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIII、FcRn 等の Fc レセプターへの結合は、変異ポリペプチドを滴定し、結合した変異ポリペプチドを、ELISA のフォーマット (下記の実施例を参照) において特異的に変異ポリペプチドに結合する抗体を用いて測定することにより決定することができる。例えば、抗体を含む変異体について標準的な ELISA アッセイによりスクリーニングを行い、pH 6.0 及び pH 7.0 又は 7.4 における FcRn を決定する。ストレプトアビジン又はニュートラアビジンを塗布した固体表面を用いてビオチン標識した FcRn を、マウス又はヒト等の他の種から捕捉することができる。ブロッキングを行った後、変異ポリペプチド (例えば抗体) で捕捉したレセプターをバッファー中 pH 6.0 又は pH 7.0 で希釈し、インキュベートすることができる。次の工程において、ヒト抗体に特異的な分子 (

例えば、ヤギ (F a b ') 2 抗ヒト F a b 抗体と酵素のコンジュゲート) を加える。その後、基質を加え、p H 6 . 0 又は p H 7 . 0 又は 0 H 7 . 4 において固定化した F c R n への変異ポリペプチドの結合量を決定する。本アッセイの結果を母体 (非変異体) ポリペプチドの同一の F c R への結合能と比較することができる。他の好ましい実施形態において、(例えば、F c R n との) E L I S A を行い変異体のスクリーニングを行うための成分は、キットとして (例えば取扱説明書と共に) パッケージ化されている。

【0126】

また、A D C C アッセイは、本発明の変異体をスクリーニングするために使用される。A D C C アッセイはインビトロ及び／又はインビボで行うことができる。変異ポリペプチドの A D C C 活性の評価を行うために、A D C C アッセイを種々のエフェクター：標的比で行って (p e r f o n n e d) もよい。例示的な A D C C アッセイにおいて、次の標的抗原：C D 2 0、C D 2 2、C D 3 3、C D 4 0、C D 6 3、E G F レセプター、h e r - 2 レセプター、前立腺特異的膜抗原、L e w i s Y 糖質、G D 2 及び G D 3 ガングリオシド、l a m p - i、C O - 0 2 9、L 6、及び e p h A 2 のいずれかが発現した標的細胞系を用いることができる。エフェクター細胞は健康なドナーから (例えば、実験当日に) 得ることができ、P B M C は、H i s t o p a q u e (S i g m a 社製) を用いて精製することができる。その後、標的細胞を本発明の変異 F c 領域を含む I g G 変異体と、エフェクター細胞と、例えば、4 0 : 1、2 0 : 1、及び 1 0 : 1 のエフェクター：標的比で混合する前に、例えば 0 . 1 ~ 1 0 0 0 n g / m l で 3 0 分間ブレインキュベートする。その後、A D C C 活性を、損傷を受けた細胞の細胞質から上澄み中に放出された乳酸脱水素酵素 (L D H) 活性の測定に基づき、細胞の死及び溶解の定量を行うための C y t o t o x i c i t y D e t e c t i o n K i t (R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s 社製) を用いて、比色定量法により測定する。A D C C 活性は、クロムを導入した標的細胞のアッセイにより、細胞の死又は溶解の結果放出されたクロムを測定することによっても測定することができる。抗体非依存性細胞毒性は、抗体の非存在下で標的細胞及びエフェクター細胞由来の L D H 活性を測定することにより決定することができる。全放出量は、1 % T r i t o n - X を標的細胞及びエフェクター細胞に添加した後で測定することができる。標的細胞及びエフェクター細胞のインキュベーションは、最適化された時間 (0 . 5 4 ~ 1 8 時間)、3 7 °C、5 . 0 % C O 2 中で行い、次いでアッセイプレートの遠心分離を行うことにより行う (p e r f o n n e d) ことができる。その後上澄みを 9 6 ウェルプレートに移し、L D H 検出試薬を加え、3 0 分間 2 5 °C でインキュベートする。資料の吸光度は、4 9 0 n m でマイクロプレートリーダーを用いて測定することができる。細胞毒性の割合は、下式により計算することができる。

細胞毒性の割合 (%) = { (実験値 - 低対照値) / (高対照値 - 低対照値) } × 1 0 0

抗 C D - 2 0 及び変異体における細胞毒性の割合は、同量の R I T U X A N と直接比較することができ、相対有効性の測定値が得られる。例示的な A D C C アッセイにおいては、C D 2 0 抗原を過剰発現した S K W 6 . 4 細胞 (例えば、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n より購入) を、標的細胞源として用いることができる。このアッセイの多くの変形が知られている (例えば、Z u c k e r m a n 他、C R C C r i t R e v M i c r o b i o l 1 9 7 8 ; 7 (1) : 1 - 2 6 を参照) 。

【0127】

このようなアッセイに有用な細胞としては、ナチュラルキラー (N K) 細胞、マクロファージ、及び他の末 P B M C が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、又は更には、本発明の変異ポリペプチドの A D C C 活性は、インビボで、C l y n e s 他、P N A S (U S A) 9 5 : 6 5 2 - 6 5 6 (1 9 9 8) に開示されたような動物モデル等を用いて評価することができる。

【0128】

本発明の変異体は、補体の活性化によってもスクリーニングすることができる。補体の

活性化を評価するために、C D Cアッセイを行ってもよい（例えば、G a z z a n o - S a n t o r o 他, J. I m m u n o l. M e t h o d s, 2 0 2 : 1 6 3 (1 9 9 6)）を参照。）例えば、種々の濃度の変異ポリペプチド及びヒト補体をバッファーで希釈してもよい。変異ポリペプチドが結合する抗原が発現した細胞を、 1×10^6 個/mlの密度まで希釈することができる。変異ポリペプチド、希釈されたヒト補体、及び抗原を発現した細胞の混合物を、平底の組織培養用96ウェルプレートに加え、2時間、37℃、5%CO₂中でインキュベートし、補体依存性細胞溶解を促進する。その後、50μlのアラマブルー（Accumed International社製）をそれぞれのウェルに加え、37℃で州やインキュベートする。96ウェル蛍光光度計を用いて、励起波長530nm、発光波長590nmで吸光度の測定を行うことができる。結果は、相対蛍光単位（RFU）によって表される。サンプルの濃度は標準曲線により計算することができ、非変異ポリペプチドと比較した活性の割合を、対象となる変異ポリペプチドについて求めることができる。

10

【0129】

ある実施形態において、本発明の変異体は補体を活性化しない、又は、十分に活性しない。例えば、変異ポリペプチドは、本アッセイにおいて、変異を有しないIgG1Fc領域を有する対照抗体と比べ約0～10%のCDC活性を示す。好ましくは、変異体は上述のCDCアッセイにおいて全くCDC活性（例えば、バックグラウンドレベル以上の）を示さないように見える。他の実施形態において、本発明の変異体は、母体ポリペプチドと比べ増大したCDCを示す（例えば、好ましくは、IC50値の比較において、インビトロ又はインビボで約1.1、1.5、1.7、又は2～約100倍（又はそれ以上）に増大したCDC活性を示す）ことが見出される。

20

【0130】

本発明の変異ポリペプチドは、全血サンプルにおける標的細胞の消失によってもスクリーニングすることができる。例えば、種々の濃度のCD20標的特異性を有する変異ポリペプチドを、全血サンプルにおけるB細胞の消失についてfacsを用いてスクリーニングすることができる（Vugmeyer他, 2003 Cytometry 52A, 101-109）。新たに採取した血液を種々の濃度の変異ポリペプチドと37℃、5%CO₂中で4時間（時間は変化させてもよい）インキュベートする。インキュベート後、赤血球を製造者の説明書に従い、塩化アンモニウム試薬（Beckton-Dickinson、カタログ番号555899）により溶解し、蛍光標識を有するB細胞特異的な抗体（抗CD19抗体等）を用いて、facs法によりB細胞を検出する。結果は、未処理のサンプル又は無関係な（非消失性の）抗体とインキュベートしたサンプルのいずれかに対するB細胞の消失率（%）として表される。

30

【0131】

好ましい実施形態において、変異体はB細胞を母体ポリペプチドよりも効率的に消失させることができる。変異ポリペプチドは、B細胞を、例えば、母体ポリペプチドより約2倍以上、好ましくは約5倍以上消失させることができる。また、変異体は、B細胞の消失について高い能力を示すことができる。例えば、変異体は、母体ポリペプチドと同じ割合のB細胞を消失させるが、約1/5、好ましくは約1/10の抗体しか用いる必要がない。変異体に媒介される標的細胞の消失は、母体ポリペプチドと比べ、約2倍、3倍、5倍～約1000倍以上、好ましくは、約5倍～約1000倍に増大する。

40

【0132】

本発明の変異体は、インビボでもスクリーニングすることができる。任意のタイプのインビボアッセイを用いることができる。1つのタイプのアッセイの具体例について以下に示す。本例に示したアッセイにより、Fc変異体のインビボでの臨床前評価が可能になる。テストされる変異体は、何らかの活性を有することが知られている特定の抗体のFc領域に取り込まれてもよい。例えば、変異体を抗CD20IgGのFc領域に、変異誘発法により組み込むことができる。これにより、母体IgG及びFc変異性IgGをRITUXAN（腫瘍の縮小を促進することが知られている）と直接比較することが可能になる

50

。臨床前評価は、2つのフェーズ（薬物動態フェーズ及び薬力学フェーズ）により行うことができる。第1フェーズの薬物動態試験の目標は、Fc領域変異性IgG及びインビボ活性が既知の抗体（例えばRITUXAN）との間で、排出速度が相違するか否かを決定することである。排出速度が異なると、血清中のIgGの定常状態レベルが異なる。かくして、定常状態濃度の相違が検出された場合には、正確な比較が可能のように規格化しなければならない。第2フェーズの薬力学試験の目標は、Fc変異体の、この場合には腫瘍の成長に及ぼす効果を決定することである。RITUXANを用いた過去の試験では、単回投与が用いられ腫瘍の成長を完全に阻害した。この試験では定量的な違いを測定できないため、容量範囲を用いる必要がある。

【0133】

第1フェーズでのFc変異体、野生型の母体Fc、及びRITUXANの薬物動態の比較は、例えば、次の方法により行われる。まず、動物1頭あたり40μg（試験用に他の用量）を静脈注射し、IgGの血漿中濃度を、0、0.25、0.5、1、24、48、72、96、120、168、及び336時間後に定量する。データを、例えば、ゼロ遅延2-コンパートメント薬物動態モデル薬物動態プログラム（WinNonLin）によりフィッティングし、排出速度を用いることができる。排出速度を用いて、次の式により定常状態での血漿内濃度を定義することができる。

$$C = (\text{投与量}) / (\text{排出速度} \times \tau)$$

ここで、τは投与間隔、Cは定常状態での血漿内濃度を表す。薬物動態実験は、腫瘍を有しないマウスを、例えば、1つの時間ポイントあたり少なくとも5頭のマウスを用いて行うことができる。

【0134】

次のフェーズのために、下記の方法により例示的な動物モデルを用いることができる。CB17-SCIDマウスの右脇腹の皮下に、106個のRaji細胞を埋め込む。Fc変異体、野生型Fc、及びRITUXANの静脈注入を、埋め込み後すぐに開始し、腫瘍のサイズが直径2cmを超えるまで続行する。毎週月、水、金曜日に、腫瘍の長さ、幅、及び高さをノギスで測定することにより、腫瘍の体積を決定する（腫瘍の体積＝W×L×D）。腫瘍の体積－時間プロットより、腫瘍成長速度が得られ、薬力学計算が行なわれる。群毎に、少なくとも約10頭の動物を用いる必要がある。

【0135】

第2フェーズでの変異性Fc抗体、野生型の母体Fc、及びRITUXANの薬力学の比較は、次の方法により行われる。文献値に基づき、毎週10μg/gのRITUXANは、インビボで完全に腫瘍の成長を阻害する（Clynes他，Nat. Med. 6:443-6, 2000）。したがって、週当たりの用量範囲10μg/g、5μg/g、1μg/g、0.5μg/g、及び0μg/gについてテストすることができる。腫瘍の成長を50%阻害する定常状態での血漿中濃度を、定常状態での血漿中濃度及び効果の関係からグラフを用いて決定する。定常状態での血漿中濃度を、上述のように計算することができる。必要ならば、τをそれぞれの変異性Fc抗体及び野生株Fc抗体について、薬物動態特性に応じて調節し、RITUXANと同程度の定常状態での血漿中濃度を達成することができる。母体ポリペプチド（例えばFc野生株）と比較して、Fc変異体及びRITUXANの薬力学値が統計的に改善し、一般的に変異性Fc抗体の活性がインビボにおいて改善することを示す。

【0136】

変異性Fc抗体、野生型Fc、及びRITUXANのさらなる薬力学的比較は、カニクイザルを用いて文献記載の方法（Reff他，Blood, 83, 435-445, 1994）により行うことができる。末梢B細胞及びリンパ節B細胞の消失における用量反応を用いて、静脈投与及び／又は皮下投与されたFc変異体と、野生型Fc及びRITUXANの相対効果を比較することができる。母体ポリペプチド（例えばFc野生株）と比較して、Fc変異体及びRITUXANの薬力学値が統計的に改善し、一般的に変異性Fc抗体の活性がインビボにおいて改善することを示す。

10

20

30

40

50

【0137】

さらなる実施形態において、本発明の変異体（本発明の変異Fc領域を含むポリペプチド又はその機能的な部分）はスクリーニングされ、少なくとも2種類の種に対して治療的に有用な変異体が同定される。そのような変異体は、本願明細書で「複数種の改善した変異体」と呼ばれ、特にヒトに対する治療効果を有する変異体の同定に有用であり、動物モデルにおいても有効性を示す（又は有効性を示す傾向がある）。この点で、本発明は、動物モデルのデータが政府の監督官庁（例えば米国食品医薬品局）に提出した全てのヒトに対する試験結果を強く支持するため、ヒトに対する臨床試験で承認される見通しの高い変異体を同定する方法を提供する。

【0138】

ある実施形態において、複数種の改善した変異体は、まずヒトエフェクター細胞を用いたADCCアッセイを行い、改善した変異体を見出し、次いでマウス、ラット又は非ヒト霊長類エフェクター細胞を用いた第2のADCCアッセイを行い、複数種の改善した変異体である改善した変異体のサブセットを見出すことにより同定される。ある実施形態において、本発明は、a) i) 標的細胞、ii) 少なくともFc領域の一部を有する母体ポリペプチドの候補変異体で、候補変異体は、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、候補変異体は、標的細胞に対する細胞毒性を、第1の種（例えばヒト）のエフェクター細胞の存在下で母体ポリペプチドよりも効率的に媒介する候補変異体、及びiii) 第2の種（例えば、マウス、ラット又は非ヒト霊長類）のエフェクター細胞を提供すること、かつ、b) 組成物を候補変異体が標的細胞と結合することにより標的細胞に結合した候補変異体を生成させる条件下で標的細胞とインキュベートすること、c) 第2の種のエフェクター細胞を、候補変異体が結合した標的細胞と混合すること、並びに、d) 候補変異体に媒介された標的細胞に対する細胞毒性を測定することを含む、複数種の改善した変異体を同定する方法を提供する。

【0139】

ある実施形態において、該方法は、工程e) 候補変異体が第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞に対する細胞毒性を媒介するか否かを決定することを更に含む。ある実施形態において、該方法は、工程f) 候補変異体を、第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞に対する細胞毒性を媒介する複数種の改善した変異体として同定することを更に含む。好ましい実施形態において、同定された複数種の改善した変異体は、その後1又は複数種での動物アッセイによりスクリーニングされる。

【0140】

ある実施形態において、複数種の改善した変異体は、まずヒトの血液を用いた全血アッセイを行い、改善した変異体を見出し、次いでマウス、ラット又は非ヒト血液を用いた第2の全血アッセイを行い、複数種の改善した変異体である改善した変異体のサブセットを見出すことにより同定される。ある実施形態において、本発明は、a) i) 標的細胞、ii) 少なくともFc領域の一部を有する母体ポリペプチドの候補変異体で、候補変異体は、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、標的細胞の消失を、第1の種（例えばヒト）のエフェクター細胞の存在下で母体ポリペプチドよりも効率的に媒介し、及びiii) 第2の種（例えばマウス、ネズミ又は非人間的な霊長類）の血液、かつ、b) 組成物を候補変異体が標的細胞と結合することにより標的細胞に結合した候補変異体を生成させる条件下で標的細胞とインキュベートすること、c) 第2の種のエフェクター細胞を、候補変異体が結合した標的細胞と混合すること、並びに、d) 候補変異体に媒介された標的細胞の消失を測定することを含む、複数種の改善した変異体を同定する方法を提供する。ある実施形態において、該方法は、工程e) 候補変異体が第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞の消失を媒介するか否かを決定することを更に含む。ある実施形態において、該方法は、工程f) 候補変異体を、第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞の消失を媒介する複数種の改善した変異体として同定することを更に含む。好ましい実施形態に

において、同定された複数種の改善した変異体は、その後1又は複数種での動物アッセイによりスクリーニングされる。

【0141】

ある実施形態において、複数種の改善した変異体は、ヒトの成分（例えば、ヒト細胞、ヒトFcR）を用いた上述のいずれかのアッセイを行うことにより同定され、改善した変異体を同定し、その後、ヒト以外の成分（例えば、マウス細胞、マウスFcR）を用いた同様のアッセイ（あるいは異なるアッセイ）を行う。このようにして、ヒトに基づくアッセイ及び第2の種に基づくアッセイの両者において、上記の基準によく従い機能する変異体のサブセットを同定することができる。

【0142】

複数種の改善した変異体を同定するための方法の例は下記のとおりである。まず、IgGのFc領域の少なくとも一部をコードする核酸配列を、発現したアミノ酸配列は、少なくとも1つのアミノ酸が変化するように変異させ、それにより変異体を生成する。次に、この発現したIgG変異体は、ヒトPBMC又はサブセット（例えば、NK細胞又はマクロファージ）を用いたADCCアッセイにより評価される。増大したADCC活性が観測されると、変異体は、マウス又はラットPBMCを用いた第2のADCCアッセイによりスクリーニングされる。あるいは、又は更に、クローニングされたげっ歯類レセプター又は細胞系に結合する変異体を用いてアッセイを行うことができる。最後に、変異体について、複数種の改善した変異体であることを特徴づける、第2のアッセイにおける改善が観測された場合、変異体はマウス又はラットにおいてインビボでスクリーニングされる。

【0143】

変異Fc領域を含む分子の例

本発明の変異Fc領域は、大きな分子の一部であってもよい。大きな分子は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二特異性抗体、イムノアドヘシン等であってもよい。更に、本発明の変異Fc領域は、改変した（増加又は減少した）半減期を示す非抗体ポリペプチドに作動可能に付着される。このように、本発明の変異Fc領域は、広汎な用途を有することは明らかである。

【0144】

抗体を含む変異Fc領域

好ましい実施形態において、変異Fc領域を含む分子（例えばポリペプチド）は抗体である。抗体を生成する手法は、以下に述べるとおりである。

【0145】

(1) 抗原の選択及び調製

通常、変異Fc領域を含む分子が抗体である場合、抗体は、対象となる抗原に対する。好ましくは、抗原はポリペプチドであり、抗原分子の量又は活性の減少から利益がもたらされる疾患又は障害にかかっている哺乳類への抗体の投与は、該哺乳類に対して治療の利益をもたらす。しかし、非ポリペプチド抗原（ガンに関連する糖脂質抗原等；米国特許第5,091,178号明細書を参照）に対する抗体を用いることもできる。

【0146】

抗原の例としては、レニン、ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモン等の成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、リポタンパク質、 α - i -アンチトリプシン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、プロインスリン、卵胞刺激ホルモン、カルシトニン、黄体形成ホルモン、グルカゴン、因子VIIIC、因子IX、組織因子(TF)、及びフォンウィレブラント等の凝固因子、タンパク質C等の抗凝固因子、心房性ナトリウム利尿因子、肺サーファクタント、ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化因子等(t-PA)のプラスミノゲン活性化因子、ボンベシン、トロンビン、造血成長因子、腫瘍壊死因子- α 及び- β 、エンケファリナーゼ、RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)、ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1- α)、ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン、ミューラー管抑

制物質、リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、プロリラキシン、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、 β -ラクタマーゼ等の微生物タンパク質、DNase、IgE、CTLA-4等の細胞毒性T-リンパ球関連抗原(CTLA)、インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子(VEGF)、ホルモン又は成長因子のレセプター、タンパク質A又はD、リウマチ因子、骨誘導性神経栄養因子(BDNF)、ニュートロフィン-3、-4、-5、又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)、又は神経成長因子等の神経栄養因子、血小板誘導成長因子(PDGF)、 α FGF及び β FGF等の繊維芽細胞増殖因子、内皮成長因子(EGF)、TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、又はTGF-5等のTGF- α 及びTGF- β 、等の形質転換成長因子(TGF)、インスリン様成長因子-I及び-I1(IGF-I及びIGF-II)、des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質、CD3、CD4、CD8、CD19及びCD20等のCDタンパク質、エリスロポイエチン、骨誘導因子、イムノトキシン、骨形成タンパク質(BMP)、成長分化因子(例えばGDF8)インターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF等のコロニー刺激因子(CSF)、IL-1からIL-25までのインターロイキン(IL)、スーパーオキシドジスムターゼ、T25-細胞レセプター、表面膜タンパク質、分解促進因子、例えばAIDSエンベロープの一部等のウイルス性抗原、輸送タンパク質、ホーミングレセプター、アドレシン、調節タンパク質、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA4及びVCAM等のインテグリン、HER2、HER3又はHER4レセプター等のガン関連抗原、グレリン、アポトーシス経路の構成分子、及び上述のポリペプチドのフラグメント又は前駆体等の分子を含むがこれらに限定されない。

【0147】

好ましい抗原としては、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20及びCD34及び等のCDタンパク質、EGFレセプター、HER2、HER3又はHER4レセプター等のErbBレセプターファミリー、LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7インテグリン、及び α 5又はサブユニットの一方(例えば、抗CD11a、抗CD18、又は抗CD11b抗体)を含むXv/ β 3インテグリン等の細胞接着分子、VEGF等の成長因子、組織因子(TF)、 α インターフェロン(α -IFN)、GDF-8等の成長分化因子、IL-8等のインターロイキン、IgE、血液型抗原、f1k2/f1t3レセプター、肥満(OB)レセプター、mplレセプター、CTLA-4、タンパク質C、及びグレリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0148】

必要に応じて他の分子と結合した可溶性の抗原又はそのフラグメントを、抗体を形成するための抗原として用いることができる。レセプター、それらのフラグメント(例えば、レセプターの膜貫通領域)等の膜貫通分子を免疫抗原(irnmunogen)として用いることができる。あるいは、膜貫通分子を発現している細胞を抗原として用いることができる。そのような細胞は、天然の供給源(例えばガン細胞系)から誘導することであってもよく、又は組み換え手法により膜貫通タンパク質を発現させてもよい。抗体を調製するのに有用な他の抗原及びその型は、当業者にとって明らかである。

【0149】

(ii) ポリクローナル抗体

本発明は、変異Fc領域を有するポリクローナル抗体を提供する。例えば、改変したG1定常領域を含むヒト免疫グロブリンレパートリーを、免疫グロブリンを不活性化されたマウスに移植し、改変したFc領域を含むIgGレパートリーを発現したマウスを得ることができる(例えば、Mendez, MJ他, Nature Genetics 15:146(1997)を参照)。ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原及びアジュバントの頻回皮下注射(sc)又は腹腔内(ip)注射により動物内で発現する。関連抗原を、免疫する種に対する免疫原性を有するタンパク質(例えば、キーホールリンペット

10

20

30

40

50

ヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビター）に、二官能性又は誘導化剤（例えば、システイン残基で結合させる場合のマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル、リジン残基で結合させる場合のN-ヒドロキシスクシンイミド、グルタルアルデヒド、スクシニルアルデヒド、SOC12、又は $R1N=C=NR$ （式中、R及びR1は異なるアルキル基を表す））を用いて結合させることは有用である。

【0150】

一般的なウサギ又はマウスに対する免疫のプロトコルは、以下のとおりである。動物を抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して、例えば、 $100\mu g$ 又は $5\mu g$ （それぞれ、ウサギ及びマウスに対する量）のタンパク質又はコンジュゲートを3倍容の完全フロインドアジュバントと混合し、腹腔内の複数個所に注射することにより免疫する。1ヵ月後、動物を、元の量の $1/5$ 又は $1/10$ の完全フロインドアジュバント中のタンパク質又はコンジュゲートを腹腔内の複数個所に注射し免疫性を高める。7～14日後に動物から採血し、血清を抗体力価によりアッセイする。力価が一定値に達するまで動物の免疫性を高める。好ましくは、動物は同一の抗原のコンジュゲートであるが、異なるタンパク質及び／又は異なるクロスリンク試薬により結合させたコンジュゲートにより抗原性を高められる。コンジュゲートは、組み換え細胞の培養により、融合タンパク質として製造することもできる。更に、ミョウバン等の凝集剤を、免疫応答を高めるために好適に用いることができる。

【0151】

（iii）モノクローナル抗体

本発明は、変異Fc領域を有するモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler他、Nature, 256:495, 1975に記載の方法）又は組み換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照）を含む種々（number）の方法により製造することができる。

【0152】

ハイブリドーマ法では、マウス又はハムスター又はマカクザル等の適当な宿主動物を免疫し、免疫に用いるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する又は産生能を有するリンパ球を誘導する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。その後リンパ球を、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する。このようにして調製したハイブリドーマ細胞を接種し、好ましくは未融合の母体骨髓腫細胞の生存を阻害する1又は複数の物質を含む適当な培地で培養する。例えば、母体骨髓腫細胞が、酵素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（HGPR T又はHPR T）を欠く場合には、ハイブリドーマの培地には通常ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み（HAT培地）、これらの物質はHGPR T欠損細胞の成長を阻害する。

【0153】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、抗体産生細胞を選択することにより、安定した高レベルの抗体の産生を支え、HAT培地等の培地に感受性を有する。これらの中で、好ましい骨髓腫細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-1マウス、の腫瘍から誘導されたもの、及びAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2又はX63-Ag8-653細胞等のマウス骨髓腫系である。ヒト骨髓腫細胞及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系も、ヒトモノクローナル抗体の製造について記載されている（例えば、Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)）。

【0154】

ハイブリドーマ細胞を培養する培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生のためにアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗

体の結合特異性は、免疫沈降法、又は、R I A若しくは酵素共役免疫結合アッセイ E L I S A等のインビトロ結合アッセイによって決定される。ハイブリドーマ細胞が、所望の特異性、親和性及び／又は活性を有する抗体を産生することが同定されると、クローンは、限界希釈法によりサブクローンし、標準培地で培養することができる。この目的に好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地である。更に、ハイブリドーマ細胞は、インビボで、動物の腹水ガン細胞として培養することができる。サブクローンから分泌されるモノクローナル抗体は、培地、腹水、又は血清から、例えば、プロテインAセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製法により好適に単離される。

10

【0155】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来法（例えば、モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブの使用）により容易に単離及び配列決定することができる。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源としての機能を果たす。一旦単離されると、DNAを発現ベクターに組み込むことができ、その後、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又は骨髓腫細胞等の、他の免疫グロブリンを産生しない宿主細胞にトランスフェクトし、組み換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成物を得る。組み換え法による抗体の産生については、以下により詳細に説明する。

【0156】

ある実施形態において、抗体又は抗体のフラグメントは、例えば、McCafferty他、Nature, 348:552-554 (1990)に記載の手法を用いて生成された抗体ファージライブラリーから単離される。Clackson他、Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks他、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)には、それぞれ、マウス及びヒト抗体のファージライブラリーを用いた単離について記載されている。下記の文献には、チェーンシャフリング（Marks他、Biotechnology, 10:779-783 (1992)）、また、組み合わせ感染及びインビボ組み換えを、非常に大きいファージライブラリーを構築するための戦略として用いた高親和性（nM範囲）ヒト抗体の産生（例えば、Waterhouse他、Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)）について記載されている。このように、これらの手法及び同様の手法は、モノクローナル抗体の単離のための当該技術分野において公知の抗体ハイブリドーマ法の、実行可能な代替技術である。また、DNAは、例えば、相同なマウスの配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常領域をコードする配列を用いること（例えば、米国特許第4,816,567号明細書及びMorrison他、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)、又は免疫グロブリンをコードする配列に、非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全部又は一部を共有結合させることにより修飾することができる。

20

30

【0157】

通常、そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常領域の代わりに用いられ、又は、それらは、抗体の1つの抗原結合部位の可変領域の代わりに用いられ、キメラ抗原及び異なる抗原に対する特異性を有する他の抗原結合部位に対する特異性を有する1つの抗原結合部位を含む二価抗体が生成される。

40

【0158】

i v) ヒト化抗体及びヒト抗体

本発明は、本発明の変異Fc領域を有するヒト化抗体及びヒト抗体を提供する。好ましい実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列と共にヒト抗体由来でないアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、ヒト化抗体中のヒト配列はフレームワーク領域（FR）を含み、ヒト配列由来でない配列又は残基は、1又は複数のCDRを含む。FR及びCDRは、重鎖及びVL領域におけるアミノ酸残基の番号づけに基づいて定義可

50

能であることは注目すべきである。CDRという用語は、重鎖及び軽鎖の両者のポリペプチドの可変領域においてみられる非連続な抗原結合部位を意味する。これらの領域は、Kabataら(J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977))及びKabata他, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991); 以下「Kabata」という)、Chothiaら(J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); 以下「Chothia」という)、及びMacCallumら(J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); 以下「MacCallum」という)により定義され、これらの定義を互いに比較すると、重複やアミノ酸残基のサブセットが含まれる。それでもなお、これらの全ての定義を、単独で(例えば、Kabataの定義を)、あるいは組み合わせて(あくまで例示であるが、Kabata及びChothiaの定義の組み合わせ)用いることにより、抗体(ヒト化抗体を含む)のCDRを定義することは、本願明細書での用語の定義及び使用の範囲内に含まれる。

10

【0159】

また、「フレームワーク」という用語は、抗体可変領域について使用される場合、抗体可変領域内に含まれるがCDRの外にある全てのアミノ酸残基を意味する。したがって、可変領域フレームワークは、約100~120アミノ酸の長さを有するが、CDRの外に存在するアミノ酸のみを指す。「フレームワーク領域」という用語は、CDRにより隔てられたそれぞれのフレームワークのドメインを意味する。したがって、Kabataの定義によるVH領域及びCDRの具体例として、フレームワーク領域1(FR1)は、アミノ酸1~30を含む可変領域のドメインに相当し、フレームワーク領域2(FR2)は、アミノ酸36~49を含む可変領域のドメインに相当し、フレームワーク領域3(FR3)は、アミノ酸66~94を含む可変領域のドメインに相当し、フレームワーク領域4(FR4)は、アミノ酸103から可変領域のC末端までを含む可変領域のドメインに相当する。軽鎖可変領域におけるFRも、同じようにそれぞれの軽鎖可変領域のCDRによって隔てられている。同様に、Chothia又はMacCallumによるCDRの定義又はそれらのCDRの定義の任意の組み合わせを用いて、フレームワークの境界はCDRによって上述のようにして区分される。CDRについて複数の定義が存在するが、Kabataの定義によりCDRを定義するのが好ましい。

20

【0160】

ヒト化抗体中のヒト抗体に由来しない残基は、他の種(マウスが含まれるが、これに限定されない)から導入された、又は派生したものであってよく、あるいは、これらの配列は(例えば、ランダム化された核酸配列から生成された)ランダムアミノ酸配列であってもよく、これらは、ヒト化抗体配列に挿入される。上述したように、ヒト化抗体中のヒトアミノ酸配列は、好ましくは、FRであり、ヒト抗体由来でない残基は、(他の種から誘導されたものであれ、ランダムアミノ酸配列であれ)好ましくは、CDRに相当する。しかし、ある実施形態において、1又は複数のFRは、1又は複数の非ヒト由来アミノ酸配列を含んでいてもよい。他のヒトフレームワークへの改変又は修飾(例えば、非ヒト由来残基の導入)の場合、改変又は修飾されたFRを、他の種由来の修飾されたCDR又はランダムCDR配列に隣接させることが可能であるが、他の実施形態において、改変したFRは、他の種由来の改変したCDR配列又はランダムCDR配列に隣接しない。ある実施形態において、ヒト化抗体のフレームワーク配列は、完全にヒト由来(ヒトフレームワークに対するフレームワークの変更は行われない)である。好ましい実施形態において、ヒト化抗体のフレームワーク配列は、完全にヒト生殖細胞系由来(ヒト生殖細胞系フレームワークに対するフレームワークの変更は行われない)である。

30

40

【0161】

他の種由来の非ヒトアミノ酸残基、又はランダム配列は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、通常「インポート」可変領域から取り込まれる。ヒト化は、基本的にWinterらの方法(例えば、Jones他, Nature, 321:522-525 (1986)); Riechmann他, Nature, 332:323-327 (1988); V

50

erhoeijen他, Science, 239:1534-1536 (1988))に従い、ヒト抗体の対応するCD C配列を、げっ歯類(又は他の哺乳類)のCD R又はC R C配列に置換することにより行われる。また、完全なヒト可変領域よりもはるかに短い部分は、非ヒト種由来の対応する配列によって置換された抗体を生成することもできる(例えば米国特許第4, 816, 567号明細書)。実際に、ヒト化抗体は、通常、いくつかのCD R残基及び可能ならばいくつかのFR残基がげっ歯類抗体の対応する部位によって置換され、又は、上述のように、CD R配列がランダム配列によって置換されたヒト抗体である。非限定的な例示に過ぎないが、ドナーCD Rの抗体アクセプター可変領域フレームワークへの結合親和性を比較する方法が、国際公開第01/27160号パンフレット、及び米国特許出願第09/434, 870号明細書及び米国特許出願第09/982, 464号明細書に記載されている。

10

【0162】

ヒト可変領域(重鎖及び軽鎖)を、ヒト化抗体の作成のために選択することは、免疫原性の減少のために重要である。いわゆる「ベストフィット」法によると、ヒト化するげっ歯類抗体の可変領域の配列は、既知のヒト可変領域配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。げっ歯類配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として採用する(例えば、Sims他, J. Immunol., 151:2296 (1993), 及びChothia他, J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。他の方法においては、特定の軽鎖及び重鎖のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導された特定のフレームワークを用いる。同一のフレームワーク法を、いくつかの異なるヒト化抗体に用いることができる(例えば、Carter他, Proc. Natl. Acad. USA, 89:4285 (1992); Presta他, J. Immunol., 151:2623 (1993))。

20

【0163】

他の実施形態において、特定のヒト抗体フレームワークを「予備選択」する必要はない(最も相同性が高いヒトフレームワーク又はヒト化される所定の候補抗体と配列の同一性を有する配列を選択する必要がない)。これらの実施形態において、共通又は万能ヒトフレームワークを、1又は複数の非ヒトCD Rを受容するために用いることができる。好ましい実施形態において、1つの普遍的完全ヒトフレームワークを、候補抗体のフレームワーク配列との相同性に関わりなく、ヒト化される全ての抗体のフレームワークとして用いられる。このように、フレームワーク領域に改変を施さずにヒト化抗体を生成させることができる。この普遍的完全ヒトフレームワークは、1又は複数のCD R配列を受容することができる。1つの実施形態において、1又は複数のCD R配列は、他の種に由来する完全な抗体中の対応するCD Rと比べ修飾されている他の種(例えば、マウス又はネコ)に由来する抗体のCD R配列である(CD Rの導入及び普遍的ヒトフレームワーク(framework)に導入されたCD Rの修飾が同時である)。1又は複数のアミノ酸に対応する修飾は、他の種に由来する完全な抗体中の対応するCD Rと比べて(修飾されたCD Rにおいて)変化する。1つの実施形態において、CD R中の全てのアミノ酸残基はライブラリーに含まれるが、他の実施形態においては、CD Rのアミノ酸残基の全てがライブラリーに含まれるわけではない。他の実施形態において、1又は複数のCD R配列は、CD R配列を置換するランダム配列である。

30

40

【0164】

好ましい実施形態において、抗体は、抗原に対する高い親和性及び他の好ましい生物学的性質を保持したままヒト化される。ある実施形態において、ヒト化抗体の抗原に対する親和性は、対応する非ヒト化抗体、完全抗体又はそれらのフラグメント又は一部(例えばげっ歯類候補抗体)の親和性よりも高い。この点において、ある実施形態において、ヒト化抗体は母体配列の分析の過程で、母体配列及びヒト化配列の3次元モデルを用いた種々の仮想的なヒト化抗体により調製される。3次元免疫グロブリンモデルは広く入手可能であり、当業者によく知られている。可能性のある候補免疫グロブリン配列のコンホメーションの3次元構造を図示し表示するコンピュータープログラムが入手可能である。これら

50

の表示を検討することにより、候補免疫グロブリン配列の機能において残基が果たす可能性のある役割の解析、例えば、候補免疫グロブリンが抗原に結合する能力に影響を与える残基の解析が可能になる。このようにして、FR残基をレシピエントから選択して組み合わせることができ、標的に対する増大した親和性等の所望の抗体特性インポート配列が得られる。一般的に、CDR残基は直接的及び最も実質的に、抗原への結合に関与する。

【0165】

当業者によく知られた種々の具体的な方法を用いて、抗体CDR（又は抗体CDRの代わりにランダム配列）を抗体フレームワークに導入することができる（例えば、米国特許出願第09/434,879号明細書及び米国特許出願第09/982,464号明細書参照）。ある実施形態において、重複オリゴヌクレオチドを抗体遺伝子又はその一部（例えば、ヒト化抗体をコードする遺伝子）の合成に用いることができる。他の実施形態において、抗体テンプレートの変異発現は、Kunkelらの方法（上掲）により、例えば、修飾CDR又はランダム配列をCDRの代わりに用いることにより行うことができる。ある実施形態において、軽鎖及び重鎖可変領域を別個にヒト化し、その後ヒト化可変領域として共発現させる。他の実施形態において、ヒト化可変領域は、完全抗体の可変領域を形成する。ある実施形態において、ヒト化可変領域を含む完全抗体のFc領域は修飾を受けている（例えば、少なくとも1つのアミノ酸の修飾をFc領域において受けている）。例えば、ランダム化CDRによってヒト化され、フレームワークについて改変を受けていない抗体は、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含んでいてもよい。

【0166】

他の実施形態において、内在性の免疫グロブリン産生能を有しておらず、免疫するとヒト抗体の完全なレパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（マウス等）を用いる。例えば、キメラマウス又は生殖細胞系変異マウスにおいて、抗体の重鎖結合領域（JH）遺伝子の同型欠失により、内在性抗体の産生は完全に阻害されることが記述されている。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイをそのような生殖細胞系変異マウスに導入すると、抗原の攻撃に対しヒト抗体を産生する（例えば、Jakobovits他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551（1993）、及びJakobovits他, Nature, 362:255-258（1993））。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーからも誘導することができる（例えば、Hoogenboom他, J. Mol. Biol., 227:381（1991）、及びVaughan他, Nature Biotech 14:309（1996））。

【0167】

本発明は、本願明細書で列举されるような少なくとも1つのアミノ酸置換を（アミノ酸置換のないFc領域を有する母体ポリペプチドと比べて）Fc領域に含むヒト化抗体（及び抗体のフラグメント）を産生する方法を提供する。そのようなヒト化抗体を生成する他の方法について以下に述べる。本発明はまた、これらの方法により生成された抗体及び抗体のフラグメント組成物を提供する。以下に述べるヒト化方法、及び（例えば上述の）他のヒト化方法を本発明の変異Fc領域と組み合わせることができることは重要である。こうして、改変した独自のFc領域を有するヒト化抗体が、本発明にしたがって構築される。

【0168】

ある実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が提供され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、アクセプターのVH領域中のFRの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成する方法を含み、該FRの一部は、第2の参照配列と比べて修飾を受けておらず、第2のオリゴヌクレオチドの集団は、i) 修飾された第1のCDRの少なくとも一部をコードし、該第1のCDRは、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3からなる群か

ら選択され、該修飾された第1のCDRは、第1の参照配列中の対応するドナーのCDRと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、i i) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVH領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

【0169】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が提供され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、i i) K a b a t 及び C h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、アクセプターのVL領域中のFRの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成する方法を含み、該FRの一部は、第2の参照配列と比べて修飾を受けておらず、第2のオリゴヌクレオチドの集団は、i) 修飾された第1のCDRの少なくとも一部をコードし、該第1のCDRは、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3からなる群から選択され、該修飾された第1のCDRは、第1の参照配列中の対応するドナーのCDRと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、i i) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVL領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

【0170】

ある実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、

A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、i i) K a b a t 及び C h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、B) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、HC D R I (1)、HC D R 2、及びHC D R 3からなる群から選択される第1のCDRの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのCDRと比べて、修飾された第1のCDRは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、第2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのVH領域中のFRの一部をコードし、該FRの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、i i) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハイブリダイズすることができるCDRの1又は複数の部分をコードし、C) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させること、並びに、D) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVH領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

【0171】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が提供され、A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、i i) K a b a t 及び C h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのC

D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、B) 該方法は、a) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3からなる群から選択される第1のC D Rの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのC D Rと比べて、修飾された第1のC D Rは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのV L領域中のF Rの一部をコードし、該F Rの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、i i) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハリブリダイズすることができるC D Rの1又は複数の部分をコードし、C) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させること、並びに、D) 該方法は、改変したV L領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したV L領域をコードする核酸にコードされたF Rは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

10

【0172】

ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。ある実施形態において、該方法は、改変したV L領域をコードする核酸の集団を、V H領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。ある実施形態において、合成は化学合成を含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、工程(d)の処理は、ポリメラーゼで伸長することを含む。

20

【0173】

別の実施形態において、改変したV H領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV H領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及び、i i) 3つのC D Rを含み、第2の参照配列はV H領域を含み、b) 該方法は、改変したV H領域抗体の遺伝子配列の集団を合成する方法を含み、該改変したV H領域のF Rは、第2の参照配列のF Rと同一であり、改変した抗体の可変領域の少なくとも第1のC D Rは修飾され、修飾された該第1のC D Rは、第1の参照配列の対応するドナーC D Rと比べて、1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含む方法である。

【0174】

30

ある実施形態において、改変したV L領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及び、i i) 3つのC D Rを含み、第2の参照配列はF Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、b) 該方法は、改変したV L領域抗体の遺伝子配列の集団を合成する方法を含み、該改変したV L領域のF Rは、第2の参照配列のF Rと同一であり、改変した抗体のV L領域の少なくとも第1のC D Rは修飾され、修飾された該第1のC D Rは、第1の参照配列の対応するドナーC D Rと比べて、1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含む方法である。

【0175】

40

ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。ある実施形態において、該方法は、更に改変したV L領域をコードする核酸の集団を、V H領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、合成は重複オリゴヌクレオチドを使用することを含む。

【0176】

更に別の実施形態において、改変したV H領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、F Rを含むアクセプターのV H領域を含み、b) 該方法は、改変したV H領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したV H領域のF Rは、参照配列のF Rと同

50

一であり、改変した抗体の可変領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

【0177】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域を含み、b) 該方法は、改変したVL領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVL領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体のVL領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

【0178】

更に別の実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、

a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むヒトのアクセプターのVH領域を含み、

b) 該方法は、改変したVH領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVH領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体の可変領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

ある実施形態において、参照配列の表現は、電子的な形態をとる。

【0179】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むヒトのアクセプターのVL領域を含み、b) 該方法は、改変したVL領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVL領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体のVL領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

【0180】

ある実施形態において、参照配列の表現は、電子的な形態をとる。ある実施形態において、該方法は、更に改変したVL領域をコードする核酸の集団を、VH領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、合成において重複オリゴヌクレオチドを使用することを含む。ある実施形態において、CDRは、Kabattの定義により定義される。

【0181】

ある実施形態において、1又は複数のFRは、1又は複数の修飾されたCDRの導入と同時に修飾されている。他の実施形態において、修飾されたフレームワークは修飾されたCDRに隣接する。

【0182】

ある実施形態において、本発明は、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) Kabatt及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたVH領域中のFR又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該VH領域のFR又はその一部分は、アクセプターのフレームワーク領域の参照配列の位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したCDRをコードし、該改変したCDR又はその一部は、対応するドナーの

10

20

30

40

50

C D Rのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、i i) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したF Rの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したV H領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。別の実施形態において、該方法は、更に改変したV H領域をコードする核酸の集団を、V L領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。さらなる実施形態において、合成は化学合成を含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。好ましい実施形態において、1又は複数の改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団は、F c領域を含む抗体の一部であり、該F c領域は、F c領域を有する母体ポリペプチドと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

10

【0183】

別の実施形態において、本発明は、改変したV L領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及びi i) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたV L領域中のF R又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該V L領域のF R又はその一部分は、アクセプターのフレームワーク領域の参照配列の位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したC D Rをコードし、該改変したC D R又はその一部は、対応するドナーのC D Rのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、i i) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したF Rの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したV L領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。他の実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。更なる実施形態において、該方法は、更に改変したV L領域をコードする核酸の集団を、V H領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。

20

30

【0184】

ある実施形態において、該方法は、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV H領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及びi i) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV H領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたV H領域中のフレームワーク領域又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該V H領域のF R又はその一部分は、アクセプターのフレームワークの位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したC D Rをコードし、該改変したC D R又はその一部は、対応するドナーのC D Rのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるア

40

50

ミノ酸を含み、及び、i i) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下でDNAポリメラーゼを有する重複オリゴヌクレオチドを伸長することを含む方法である。

【0185】

更に別の実施形態において、本発明は、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、i i) K a b a t 及びC h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたVL領域中のFR又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該VL領域のFR又はその一部分は、アクセプターのFRの参照配列の位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したCDRをコードし、該改変したCDR又はその一部は、対応するドナーのCDRのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、i i) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下でDNAポリメラーゼを有する重複オリゴヌクレオチドを伸長することを含む方法である。

【0186】

ある実施形態において、1又は複数のフレームワーク領域は、1又は複数の修飾されたCDRの導入と同時に修飾されている。修飾されたCDRは、参照配列中の対応するCDRと比べ1又は複数のアミノ酸の修飾を含んでいてよい。ある実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びi i) K a b a t 及びC h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、i) オリゴヌクレオチドの第1の集団を合成することを含み、少なくとも1つの修飾されたCDRをコードし、該修飾されたCDRは、対応するドナーのCDRのアミノ酸配列と比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、i i) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、VHフレームワークの修飾された部分をコードするオリゴヌクレオチドを含み、修飾を受けた部分は、アクセプターのフレームワーク領域の参照配列と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークと比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部がハイブリダイズするような条件下で混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。更なる実施形態において、該方法は、更に改変したVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。さらなる実施形態において、アクセプターはヒトである。

【0187】

別の実施形態において、本発明は、改変したV L領域の集団をコードする核酸を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及び、i i) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、b) 該方法は、i) オリゴヌクレオチドの第1の集団を合成することを含み、少なくとも1つの修飾されたC D Rをコードし、該修飾されたC D Rは、対応するドナーのC D Rのアミノ酸配列と比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、i i) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、V Lフレームワークの修飾された部分をコードするオリゴヌクレオチドを含み、修飾を受けた部分は、アクセプターのF Rの参照配列と比べ1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークと比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部がハイブリダイズするような条件下で混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したV L領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。

【0188】

ある実施形態において、F c変異体及び改変した変異領域を含む抗体又は抗体のフラグメントを生成することができる。例えば、ある実施形態において、本発明は、改変したV H領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV H領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及びi i) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV H領域の配列を含み、b) 該方法は、A) アクセプターのV H領域中のF Rの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該F Rの一部は、第2の参照配列と比べて修飾されず、かつ、B) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、第1又は第2のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、i) 修飾された第1のC D Rの少なくとも一部をコードし、該第1のC D Rは、H C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3からなる群から選択され、該修飾された第1のC D Rは、第1の参照配列中の対応するドナーのC D Rと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、i i) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるF Rの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したV H領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したV H領域をコードする核酸にコードされたF Rは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。ある実施形態において、該方法は、更に改変したV H領域をコードする核酸の集団を、V L領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。

【0189】

別の実施形態において、本発明は、改変したV L領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及び、i i) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、b) 該方法は、a) アクセプターのV L領域中のF Rの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該F Rの一部は、第2の参照配列と比べて修飾

されず、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、第1又は第2のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、i) 修飾された第1のCDRの少なくとも一部をコードし、該第1のCDRは、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3からなる群から選択され、該修飾された第1のCDRは、第1の参照配列中の対応するドナーのCDRと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、ii) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVL領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

10

【0190】

別の実施形態において、本発明は、改変したVH領域の集団をコードする核酸を構築する方法を提供し、A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、B) 該方法は、a) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3からなる群から選択される第1のCDRの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのCDRと比べて、修飾された第1のCDRは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのVH領域中のFRの一部をコードし、該FRの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、ii) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハイブリダイズすることができるCDRの1又は複数の部分をコードし、C) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、D) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVH領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

20

30

【0191】

ある実施形態において、該方法は、更に改変したVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。

【0192】

別の実施形態において、本発明は、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、B) 該方法は、a) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3からなる群から選択される第1のCDRの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのCDRと比べて、修飾された第1のCDRは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのVL領域中のFRの一部をコードし、該FRの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、ii) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハイブリダイズすることができるCDRの1又は複数の部分をコードし、C) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、D) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される

40

50

条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したV L領域をコードする核酸にコードされたF Rは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

【0193】

他の実施形態において、本発明は、変異を有するヒト化抗体可変領域の結合親和性を向上させる方法を提供し、a) 該方法は、第1の変異を有するヒト化抗体の可変領域をコードする核酸配列を提供することを含み、該変異可変領域は、(i) 野生型ヒト抗体フレームワーク、(i i) 3つの非ヒト重鎖C D R、及び、(i i i) 3つ非ヒト軽鎖C D Rを含み、C D Rは、K a b a t及びC h o t h i aの組合せによって定義され、少なくとも1つの該軽鎖C D Rは、少なくとも1つの位置で少なくとも1つの異なるアミノ酸を有する変異を有する軽鎖C D Rであり、第1の変異を有するヒト化抗体の可変領域は、対応する変異を有さない抗体の可変領域より高い結合能を有し、b) 該方法は、第1の変異を有する抗体可変領域コードする核酸配列を、第2の変異を有するヒト化抗体可変領域がコードされるような条件下で変異させることを含み、第2の変異を有するヒト化抗体可変領域は、少なくとも更に1つの異なるアミノ酸を、変異を含むC D Rの少なくとも1つの位置に含み、さらなる変異は、最初の変異と共に、高い結合親和性をもたらす方法である。ある実施形態において、第1の変異を有するヒト化抗体の可変領域の変異を有する軽鎖C D Rは、C D R 3 (L C D R 3) である。

【0194】

他の実施形態において、第1の変異を有するヒト化抗体可変領域における少なくとも1つの非ヒト重鎖C D Rは、異なるアミノ酸が、対応する野生型非ヒトC D Rと比べ少なくとも1つの位置でコードされているような変異を含む。更なる実施形態において、重鎖C D R変異は、H C D R 3において行なわれる。

【0195】

ある実施形態において、本発明は、改変したV H領域核酸をコードする核酸の集団を構築すると共に、少なくとも1つのC D Rと少なくとも1つのF Rを同時に修飾する方法を提供し、

a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV H領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) 4つのF R及びi) K a b a t及びC h o t h i aを組み合わせて定義される3つのC D Rを含み、第2の参照アミノ酸配列は、K a b a t及びC h o t h i aを組み合わせて定義されるように、4つのF Rを含むアクセプターのV H領域の配列を含み、b) 該方法は、i) 修飾される各F Rために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾されたF R又はその部分をコードし、該修飾されたF R又はその部分は、アクセプターのV H領域の参照配列において対応するフレームワーク領域に比べて、1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更される該F R位置は、第1の参照配列のドナーのフレームワーク領域の位置と比べて、対応する位置において異なる第2の参照配列のアクセプターのフレームワーク位置の中から選択され、i i) 修飾される各C D Rのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾したC D R又はその部分をコードし、該修飾したC D Rは、対応するドナーのC D Rのアミノ酸配列と比べて1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、i i i) 天然及び修飾を受けていない各F Rのために、F Rをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、F R又はその部分は、第2の参照アクセプター配列の対応するF Rと同一の配列を有し、i v) 天然及び修飾を受けていない各C D Rのために、C D Rをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、C D R又はその部分は、第1の参照ドナー配列の対応するC D Rと同一の配列を有し、V H領域の隣接部分をコードする(i) ~ (i v) から、各オリゴヌクレオチドは、それらの末端において重複配列を有し、c) 該方法は、重複ヌクレオチドを精製するように、各オリゴヌクレオチドの重複配列のハイブリダイズを行なうという条件下において、各工程b) で合成されるオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドの集団を混合させることを含み、

d) 該方法は、改変したVH領域の集団をコードするヌクレオチドが形成される条件下で、重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態 (embodiment) において、参照配列の表現は、電子的な形態をとる。さらなる実施形態において、修飾を受けるフレームワーク領域は、HFR1、HFR2及びHFR3からなる群より選択される。他の実施形態において、修飾されるCDRは、HCDR3である。他の実施形態において、該方法は、更にVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程 (e) を更に含む。異なる実施形態において、該方法は、更にVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程 (e) を更に含む。

10

【0196】

他の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築すると共に、少なくとも1つのCDRと少なくとも1つのFRを同時に修飾する方法を提供し、該方法は、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) 4つのFR及びii) Kabat及びChothiaを組み合わせて定義される3つのCDRを含み、第2の参照アミノ酸配列は、Kabat及びChothiaを組み合わせて定義されるように、4つのFRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、i) 修飾される各FRのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾されたFR又はその部分をコードし、該修飾されたFR又はその部分は、アクセプターのVL領域の参照配列において対応するフレームワーク領域に比べて、1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更される該FR位置は、第1の参照配列のドナーのFR位置と比べて、対応する位置において異なる第2の参照配列のアクセプターのFR位置の中から選択され、かつ、ii) 修飾される各CDRのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾したCDR又はその部分をコードし、該修飾したCDRは、対応するドナーのCDRのアミノ酸配列と比べて1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、iii) 天然及び修飾を受けていない各FRのために、FRをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、FR又はその部分は、第2の参照アクセプター配列の対応するFRと同一の配列を有し、iv) 天然及び修飾を受けていない各CDRのために、CDRをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、CDR又はその部分は、第1の参照ドナー配列の対応するCDRと同一の配列を有し、(i)～(iv)のVL領域の隣接部分をコードする各オリゴヌクレオチドは、それらの末端において重複配列を有し、c) 該方法は、重複ヌクレオチドを精製するように、各オリゴヌクレオチドの重複配列のハイブリダイズを行なうという条件下において、各工程b) で合成されるオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドの集団を混合させることを含み、d) 該方法は、改変したVL領域の集団をコードするヌクレオチドが形成される条件下で、重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態において、該方法は、更にVL領域をコードする核酸の集団を、VH領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。

20

30

40

【0197】

(v) 多特異性抗体

本発明は、変異Fc領域を含む多特異性抗体を提供する。多特異性抗体は、少なくとも2種類の異なる抗原に対し結合特異性を有する。そのような分子は通常2種類の抗原にしか結合しないが(二特異性抗原、BsAb)、三特異性抗原等のさらなる特異性を有する抗体も、本願明細書で使用される場合においてこの表現に包含される。BsAbの例としては、一方の腕がガン細胞抗原を対象とし、他方の腕が細胞毒性誘発分子を対象とする、抗FcγRI/抗CD15、抗p185HER2/FcγRIII(CD16)、抗CD3/抗悪性B細胞(1D10)、抗CD3/抗p185HER2、抗CD3/抗p97、抗CD3/抗腎細胞ガン、抗CD3/抗OVCA3、抗CD3/L-DI(L-D

50

1) (抗大腸ガン)、抗CD3/抗メラニン細胞刺激ホルモン(hornone)アナログ、抗EGFレセプター/抗CD3、抗CD3/抗CAMA I (CAMA 1)、抗CD3/抗CD19、抗CD3/MoV18、抗神経細胞接着分子(NCAM)/抗CD3、抗葉酸結合タンパク質(FBP)/抗CD3、抗腫瘍関連抗原(AMOC-31)/抗CD3; 腫瘍抗原に特異的に結合する1本の腕と毒素に特異的に結合する1本の腕を有する抗サポリン/抗id-1等のBsAbs、抗CD22/抗サポリン、抗CD7/抗サポリン、抗CD38/抗サポリン、抗CEA/抗リシンA鎖、抗インターフェロン-α(IFN-α)/抗ハイブリドマイデオタイプ、抗CEA/抗ビンカアルカロイド酵素により活性化されたプロドラッグを変換するための抗CD30/抗アルカリホスファターゼ(リン酸マイトマイシンプロドラッグのマイトマイシンアルコールへの変換を触媒する)等のBsAb; 線維素溶解剤として使用可能な抗フィブリン/抗組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)等のBsAb、抗フィブリン/抗ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA); 細胞表面レセプターに対する免疫複合体を標的にする抗低密度リボタンパク質(LDL)/抗Fcレセプター(例えば、FcγRI、FcγRII又はFcγRIII)等のBsAb; 感染症の治療に用いられる抗CD3/抗単純ヘルペスウィルス(HSV)、抗T細胞レセプター: CD3複合体/抗インフルエンザ、抗FcγR/抗HIV等のBsAb; インビトロ又はインビボでの腫瘍の検出のための抗CEA/抗EOTUBE、抗CEA/抗DPTA、抗p185HER2/抗ハプテン等のBsAb; ワクチンのアジュバントとして用いられるBsAb; 及び治療のツールとして用いられる抗ウサギIgG/抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)/抗ホルモン、抗ソマトスタチン/抗物質P、抗HRP/抗FITC、抗CEA/抗p-ガラクトシダーゼ等のBsAbが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0198】

三特異性抗体の例としては、抗CD3/抗CD4/抗CD37、抗CD3/抗CD5/抗CD37及び抗CD3/抗CD8/抗CD37が挙げられるが、これらに限定されない。二特異性抗体は、全長抗体又は抗体のフラグメント(例えば、F(ab')₂二特異性抗体)として調製することができる。二特異性抗体を作成する方法は公知である。従来法による全長二特異性抗体の製造は、2つの分子鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現によるものである(例えば、Millstein他, Nature, 305: 537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の配列の任意の組み合わせにより、これらのハイブリドマ(クアドローマ)は、10の可能な異なる抗体分子の混合物を生成し、そのうち1つだけが正しい二特異性構造を有する。正しい分子の精製はアフィニティークロマトグラフィー工程により行うことができる。同様の方法は、国際公開第93/08829号パンフレット及びTraunecker他, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)。

30

【0199】

他のアプローチにおいて、所望の結合特異性を有する抗体の可変領域(抗体-抗原結合部位)を、免疫グロブリンの定常領域配列に融合させる。融合体は、好ましくは、ヒンジ、CH2及びCH3領域の少なくとも一部分を含む免疫グロブリンの重鎖定常領域を有する。軽鎖との結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を、融合体の少なくとも1つに有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体、及び、所望に応じて、免疫グロブリンの軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクター中に挿入され、適当な宿主生物中に共にトランスフェクションされる。このことにより、構築の際に3つのポリペプチドの割合が等しくない場合に最適の収率が得られる実施形態において、3つのポリペプチドの相互の割合を調節する上で多大な柔軟性がもたらされる。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖の同じ割合での発現の結果高い収率が得られる場合、又は発言の割合が顕著な影響を及ぼさない場合には、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクターに導入することができる。このアプローチの好ましい実施形態において、二特異性抗体は、一方の腕に存在する第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方の腕に存在するハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2

40

50

の結合特異性をもたらす) からなる (例えば、国際公開第 94/04690 号パンフレット参照)。国際公開第 96/27011 号パンフレットに記載の他のアプローチによると、一对の抗体分子の間のインターフェースを、組み換え培養細胞から回収されるヘテロダイマーの割合を最大化するように設計することができる。二特異性 (specific) 抗体はまた、架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の一方はアビジンに、他方はビオチンに結合していてもよい。

【0200】

B. イムノアドヘシン分子

本発明はまた、変異 Fc 領域を含むイムノアドヘシン分子を提供する。イムノアドヘシンをデザインする 1 つの方法は、アドヘシンの結合領域 (例えば、レセプターの細胞外ドメイン (ECD)) を免疫グロブリンの重鎖の Fc 領域 (例えば変異 Fc 領域) と結合させることである。通常、本発明のイムノアドヘシンを調製する場合、アドヘシンの結合ドメインをコードする核酸は、C 末端で免疫グロブリンの定常領域配列の N 末端をコードする核酸と融合するが、N 末端側での融合も可能である。

【0201】

通常、そのような融合体において、コードされたキメラポリペプチドは、少なくとも免疫グロブリンの重鎖定常領域中の機能的に活性なヒンジ、CH2 及び CH3 領域を保持する。融合は、定常領域中の Fc 領域の C 末端部分、又は重鎖 CH1 領域の N 末端付近若しくは軽鎖の対応する領域において行うこともできる。融合が行われた正確な位置は決定的に重要ではないが、イムノアドヘシンの生物学的活性、分泌、又は結合特性を最適化することができる特定の位置はよく知られており、その位置を選択することができる。

【0202】

ある実施形態において、アドヘシン配列は、免疫グロブリン G1 の変異 Fc 領域の N 末端に融合する。重鎖定常領域の全体がアドヘシン配列に融合することが可能である。しかし、好ましい実施形態において、IgG の Fc 領域を化学的に定義するパライン切断部位 (重鎖定常領域の最初の残基を 114 位とした場合における 216 位の残基) の丁度上流側であるヒンジ領域から開始される配列、又は他の免疫グロブリンの相同な部位が、融合において用いられる。ある好ましい実施形態において、アドヘシニアミノ酸配列は、IgG 重鎖の、(a) ヒンジ領域及び CH2 及び CH3、又は (b) CH1、ヒンジ、CH2、及び CH3 領域に融合する。ある実施形態において、イムノアドヘシンは二特異性である。あるいは、アドヘシン配列は、キメラ重鎖を含む免疫グロブリンが得られるように、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖配列の間に挿入されていてもよい。そのような実施形態において、アドヘシン配列は、免疫グロブリンの各腕において、ヒンジ領域及び CH2 領域の間、又は CH2 及び CH3 領域の間のいずれかで、免疫グロブリン重鎖の 3' 末端に融合していてもよい (例えば、Hoo genboom 他, Mol. Immunol. 28: 1027-1037 (1991) 参照)。

【0203】

本発明のイムノアドヘシンにおいて、免疫グロブリンの軽鎖の存在は必要とされていないが、免疫グロブリン軽鎖は、アドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合していてもよく、又は直接アドヘシンに融合していてもよい。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードする DNA は、通常アドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードする DNA と共発現される。分泌されると、ハイブリッド重鎖及び軽鎖は共有結合し、2 つのジスルフィド結合を有する免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含む免疫グロブリン様構造を提供する。このような構造の調製に適した方法は、例えば、米国特許第 4, 816, 567 号明細書に開示されている。

【0204】

好ましい実施形態において、イムノアドヘシンは、アドヘシンの一部分をインフレームにコードする cDNA 配列を免疫グロブリン cDNA 配列に融合させることにより構築される。しかし、ゲノムの免疫グロブリンフラグメントへの融合も用いることができる。一般に、後者のタイプの融合体は、発現のために Ig 制御配列を必要とする。IgG 重鎖定

常領域をコードする cDNA は、脾臓又は末梢血リンパ球から誘導された cDNA ライブラリーより公開された配列に基づいて、ハイブリダイゼーション又は PCR 手法により単離することができる。イムノアドヘシンの「アドヘシン」及び免疫グロブリン部位をコードする cDNA は、選択された宿主細胞において有効な発現を目的とするプラスミドベクターに連続的に挿入することができる。

【0205】

異性体ポリペプチドの改変した半減期

新生児 Fc レセプター「FcRn」は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の相同体であり、妊娠中に、母子間で IgG を移行させるだけでなく、IgG の血清半減期の制御にも関係する。最近の FcRn の研究においては、Ghetie, V and E. S. Ward, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000 を参照。FcRn は、pH 依存で IgG に結合し、この結合は、弱酸性の pH において発生し、pH 7.4 では発生しない。IgG は、FcRn を発現する細胞及びによって回収され、酸性のエンドソームが入ることによって FcRn-IgG 相互作用が発生すると仮定される。次に、IgG は、細胞表面に輸送されると、中性に近い pH で放出される。細胞での摂取後、FcRn に結合しない IgG は、リソソームコンパートメントに運ばれ、分解する。この形式によって一致するのは、増大した親和性を有する FcRn に結合する変異 Fc 領域は、少ない親和性を有する FcRn に結合する変異 Fc 領域より長い血清半減期を有するという仮説である。

【0206】

IgG 輸送体としての FcRn の役割は、FcRn に対して改変した親和性を有する変異 Fc 領域は、モノクローナル抗体内において、又は外因性のタンパク質、即ち、非抗体に作動可能に付着されるときに、治療上の有用性も有することを示す。被検者又は患者から急激に除去されることによって、又は胎盤膜全体に輸送されないことによって利益をもたらす治療用ポリペプチド、例えば、放射性標識されたポリペプチドは、減少した FcRn 結合能を示す Fc 領域が作動可能に付着されることによって利益をもたらす。また、長い血清半減期を有することによってより投与回数を減らすだけでよく、又は、胎盤膜を通して輸送することによって利益をもたらすポリペプチドは、増大された FcRn 結合能を示す Fc 領域 (表 2、5、及び 6 を参照) に、選択的に作動可能に付着される。Fc の特性の多数の組合せが意図される、例えば、増大された FcRn 結合能を有する Fc 領域は、CDC 又は ADC がほとんど又は全くない場合、増大した FcRn 結合能を有する Fc 領域は、表 2 に列挙される FcRn 結合能を増大する 1 又は複数の Fc アミノ酸置換を CDC 及び ACDD 活性を減少させるアミノ酸置換との組合せにおいて IgG1 の母体 Fc 領域に組み込むことによって生成される。

【0207】

母体ポリペプチドと比べて増大した FcRn 結合能を示す本発明の変異 Fc 領域が作動可能に付着されることによって増大した血清半減期から利益を享受する好ましいポリペプチドは、例えば、レニン；成長ホルモン；ヒト成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；グレリン；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポ蛋白質；インシュリン A 鎖；インシュリン B 鎖； $\alpha 1$ -抗トリプシン；PAI-1；プロインスリン；トロンボポエチン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；VILIC 因子、第 IX 因子、組織因子、及びフォンウィルブラント因子などの凝血因子；タンパク質 C などの抗-凝血因子；心房性ナトリウム (natrietic) 利尿因子；肺表面活性物質；ウロキナーゼ又は人尿又は組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) などのプラスミノゲン (plaminogen) アクチベーター活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血成長因子；IL-1~IL-10、IL-20 などのインターロイキン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；エンケファリナーゼ；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミューラー管抑制因子；リラキシン A 鎖；リラキシン軽鎖；プロリラキシン；マウスの性腺刺激ホルモン関連ペプチド； β -ラクタマーゼなどの微生物タンパク；Dnase；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞成長因子 (VEGF)；ホル

モン類又は成長因子のためのレセプター；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6（NT-3、NT-4、NT-5、NT-6）又はNGF-βなどの神経成長因子（カードィオトロフィン-1（CT-1）などのカードィオトロフィン（心筋細胞肥大因子））などの神経栄養因子；血小板由来成長因子（PDGR）；（例えばaFGF、及び、bFGF、上皮成長因子（EGF）又はそのレセプター）などの線維芽細胞成長因子；例えば、TGF-α、及び、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、又はTGF-β5を含むTGF-βなどのトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-I及び-II；des（1-3）-IGF-I（脳IGF-I）（IGF結合蛋白質）；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパク質；エリスロポイエチン；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形成医薬品（成長分化因子（例えばGDF-8））；インターフェロン-α、-β、及び-γのようなインターフェロン；コロニー形成刺激因子（CSF）、例えば、M-CSF；GM-CSF、及び、G-CSF；IgGの天然のFc領域を有さない抗-HER-2抗体；IgGの天然のFc領域を有さない抗-ニワトリ肉腫ウイルス抗体；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表層膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス抗原、例えば、HIV-1エンベロプタンパク質（protein）；輸送蛋白質；ホーミングレセプター；アドレシン；収縮調節蛋白；IgGの天然のFc領域を有さない抗体などの分子を含む哺乳類の治療用ポリペプチド、及び、上記のポリペプチドのいずれのフラグメント又は前駆体である。

10

【0208】

20

作動可能に付着されるポリペプチドにおいて改変した血清半減期（即ち、増大したFcRn結合能を）を示す本発明のアミノ酸置換からなる変異Fc領域は、好ましくは関連するポリペプチドのカルボキシ末端又はアミノ末端に作動可能に付着され、これにより融合タンパク質を生成する。

【0209】

変異Fc領域をコードする核酸配列

本発明はまた、変異Fc領域をコードする核酸配列と同様、Fc領域変異体をコードする核酸配列を含む組成物、ベクター、及び宿主細胞を提供する。本発明はまた、変異Fc領域を生成するための組み換え方法を提供する。

【0210】

30

一般に、組み換え法による変異体の生成のためには、変異体をコードする核酸配列を単離し、ベクターに挿入する。宿主細胞に、ベクターを用いてトランスフェクトすることができ、それにより核酸配列を増幅させ、かつ／又は変異体ペプチドを製造させることができる。本発明のペプチド変異体をコードする核酸配列を、従来法（例えば、変異体をコードする配列に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブの使用）により単離し、整列することができる。一般に、変異体をコードする核酸配列は、シグナル配列（例えば分泌性シグナル配列）、複製起点、少なくとも1つのマーカー遺伝子、エンハンサー、プロモーター、又は転写ターミネーター等の他の要素に作動可能に結合される。ある実施形態において、宿主細胞は変異体をコードする核酸により安定にトランスフェクトされ、特定の変異体を発現する細胞系を生成する。好ましい実施形態において、変異体は、CHO、NSO、Sp2/0、PER.C6、又はHEK293細胞内で発現される。組み換え方法は、周知の技術である。

40

【0211】

核酸配列は、変異Fc領域が生成されるように変異をしていてもよい。例えば、母体Fc領域をコードする核酸配列（例えば配列番号1～12）は、核酸配列が発現した場合に少なくとも1つのアミノ酸の改変が生じるように変異をしていてもよい。また、母体Fc領域の少なくとも一部分をコードする核酸配列は、少なくとも変異Fc領域の一部分を含むアミノ酸配列を産生するように変異をしていてもよい。

【0212】

ある実施形態において、コドンを用いた合成を用いて変異を有する配列を生成する。コ

50

ドンを用いた合成の例としては、例えば、米国特許第 5, 264, 563 号明細書、米国特許第 5, 523, 388 号明細書及び米国特許第 5, 808, 022 号明細書に記載の方法が挙げられる。要約すると、コドンを用いた合成は、別個の担体の上でモノマーを順次カップリングさせ、少なくとも 2 つの異なる連続配列 (t u p l e t) を生成する。カップリングは、別個の反応容器中で行うことができ、その後反応容器から担体を混合し、混合した担体を 2 つ以上の別個の反応容器に分別し、カップリング、混合及び分別工程を反応容器中で 1 又は複数回反復し、混合又は分別工程で修了する。更に、オリゴヌクレオチドを、担体から切り離すことができる。

【0213】

治療への使用及び製剤

ある実施形態において、本発明は変異体を含む治療用の製剤を提供する。本発明は、治療用組成物の特定の性質に限定されるものではない。例えば、そのような組成物は変異ポリペプチド (又はその一部分) を含むことができ、生理学的に許容される液体、ゲル、固体担体、希釈剤、アジュバント及び賦型剤、並びにこれらの組み合わせと共に提供される (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. 編 (1980) を参照)。

【0214】

更に、変異ポリペプチドは、サリチル酸塩、ステロイド、免疫抑制剤、抗体又は抗生物質を含むがこれらに限定されない他の治療剤と同時、前、又は後に用いることができる。本発明の変異体と共に用いることができる具体的な治療剤としては、アゾベンゼン化合物 (米国特許第 4, 312, 806 号明細書)、ベンジル置換ローダミン誘導体 (米国特許第 5, 216, 002 号明細書)、L-カルノシン亜鉛塩 (米国特許第 5, 238, 931 号明細書)、3-フェニル-5-カルボキシピラゾール及びイソチアゾール (米国特許第 5, 294, 630 号明細書)、IL-10 (米国特許第 5, 368, 854 号明細書)、キノリンロイコトリエン合成阻害剤 (米国特許第 5, 391, 555 号明細書)、2'-ハロー-2'-デオキシアデノシン (米国特許第 5, 506, 213 号明細書)、フェノール及びベンズアミド化合物 (米国特許第 5, 542, 439 号明細書)、トリブチリン (米国特許第 5, 569, 680 号明細書)、ある種のペプチド (米国特許第 5, 756, 449 号明細書)、 ω -3 ポリ不飽和酸 (米国特許第 5, 792, 795 号明細書)、VLA-4 ブロッカー (米国特許第 5, 932, 214 号明細書)、メタスルホ安息香酸プレドニソロン (米国特許第 5, 834, 021 号明細書)、サイトカイン抑制剤 (米国特許第 5, 888, 969 号明細書)、及びニコチン (米国特許第 5, 889, 028 号明細書) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0215】

変異ポリペプチドは、細胞の生存率又は増殖能力を減少させる薬剤と共に用いることができる。細胞の生存率又は増殖能力を減少させる薬剤は、例えば、DNA 合成の阻害、細胞分裂の阻害、アポトーシスの誘導、又は非アポトーシス誘導性の細胞の殺傷等の種々の経路により機能を果たすものであってもよい。細胞毒性薬及び細胞増殖抑制剤の具体例としては、ヨウシュヤマゴボウ抗菌タンパク質、アブリン、リシン、及びそれらの A 鎖、ドキソルビシン、シスプラチン、ヨウ素 131、イットリウム 90、レニウム 188、ビスマス 212、タキソール、5-フルオロウラシル、VP-16、プレオマイシン、メトトレキセート、ビンデシン、アドリアマイシン、ビンクリスチン、BCNU、マイトマイシン、及びシクロホスファミド、及び、TNF- α 、TNF- β 等のある種のサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。このように、細胞毒性薬及び細胞増殖抑制剤は、例えば、放射性元素、化学療法剤、タンパク質、及びレクチンを含んでいてもよい。

【0216】

治療用の組成物は、例えば、バインダー、充填剤、担体、保存料、安定化剤、乳化剤、緩衝剤、及び賦型剤等として、例えば、医薬品グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常用いられる添加物を含んでいてもよい。これらの組成物は、通常、1~95%の有効

10

20

30

40

50

成分、好ましくは、2～70%の有効成分を含む。

【0217】

本発明の変異ポリペプチドはまた、適用可能で生理学的に許容される希釈剤又は賦型剤と混合することもできる。好適な希釈剤又は賦型剤は、例えば、水、生理的食塩水、デキストロース、グリセロール等、及びこれらの組み合わせである。更に、所望により、組成物は保湿剤又は乳化剤、安定化剤又はpH調整剤等の微量の補助剤を含んでいてもよい。

【0218】

ある実施形態において、本発明の治療用組成物は、液体状の溶液又は懸濁液として、スプレーとして、又は固形剤のいずれかとして調製される。経口製剤は、通常、例えば、バインダー、充填剤、担体、保存料、安定化剤、乳化剤、緩衝剤、及び賦型剤等として、例えば、医薬品グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常用いられる添加物を含む。これらの組成物生物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放剤、又は粉末の形態をとり、通常、1～95%の有効成分、好ましくは、2～70%の有効成分を含む。本発明の治療用の組成物を投与するのに有用な経口用組成物の一例は、米国特許第5,643,602号明細書に記載されている。

【0219】

局所投与等の他の形態での投与に適した他の製剤としては、軟膏、チンキ剤、クリーム、ローション、経皮パッチ、及び座薬が挙げられる。軟膏及びクリームには、従来のバインダー、担体及び賦型剤は、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドを含んでいてもよい。全身投与法の一例は、米国特許第5,834,016号明細書に記載されている。他のリポソームを用いた投与法（例えば、米国特許第5,851,548号明細書及び米国特許第5,711,964号明細書を参照）を用いてもよい。

【0220】

製剤はまた、特定の治療への適応に対する、必要に応じて2種以上の活性化化合物を含んでいてもよく、好ましくは、それらは相補的な活性を有しており互いに悪影響を及ぼさない。そのような分子は、意図した目的に有効な量で好適に共存する。

【0221】

徐放調剤を調製することも可能である。徐放調剤の好適な例としては、変異ポリペプチドを含む固体の疎水性ポリマーからなる半透性マトリックスが挙げられ、マトリックスは、例えばフィルム、マイクロカプセル等の成型体の構造をとる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（メタクリル酸2-ヒドロキシエチル）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド、L-グルタミン酸及びL-グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性のエチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）生分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられるが、これらに限定されない。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール（glycolic）酸等のポリマーは、100日以上にわたり分子の放出を行うことを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短期間しか放出することができない。

【0222】

本発明の変異ポリペプチドは、被検者を治療するために使用される。そのような治療は、疾患にかかった被験者に投与してもよく、被験者（例えば、疾患にかかりやすい被験者）に予防的に投与してもよい。治療することができる健康状態の例としては、ガン（変異ポリペプチドが、例えば、HER2レセプター、CD20、又は血管内皮成長因子（VEGF）に結合する）、喘息等のアレルギー症状（抗IgE抗体に結合する）、及びLFA-1媒介性の病気（変異ポリペプチドは、例えば、抗LFA-I又は抗ICAM-I抗体である）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0223】

好ましい実施形態において、被験者の治療に用いられるポリペプチド変異体は、抗体又

はイムノアドヘシンを含む。また、好ましい実施形態において治療される疾患は、抗体又はイムノアドヘシンに応答する疾患である。抗体に応答する疾患及び病状の例としては、リンパ腫（抗CD20抗体であるRITUXANにより治療可能であることが示されている）、感染症（呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質を対象とする抗体であるSYNAGISにより治療可能であることが示されている）、腎移植（抗IL-2レセプター抗体であるZENAPAXが有効であることが示されている）、クローン病及び関節リウマチ（抗TNF α 抗体であるREMICADEにより治療可能であることが示されている）、乳ガン（抗HER2抗体であるHERCEPTINにより治療可能であることが示されている）、及び大腸ガン（抗17-1A（IA）抗体であるEDRECOLOMABにより治療可能であることが示されている）が挙げられるが、これらに限定されない。ガンを治療するために使用される変異ポリペプチドは、好ましくは、本発明のFc領域アミノ酸置換からなり、該ポリペプチドに増大したADCC活性及び又は増大したCDC活性を付与する。

10

【0224】

ある実施形態において、改善したADCC活性を有する変異ポリペプチドは、組織又は外来微生物の破壊又は除去が望ましい疾患又は障害の治療に用いられる。例えば、変異体はガン、炎症性疾患、感染（例えば、細菌、ウイルス、真菌又はイーストの感染）、及び組織の除去が望ましい他の健康状態（甲状腺腫等）の治療に用いることができる。他の実施形態において、変異ポリペプチドは、ADCC活性が減退する。そのような変異体は、長い半減期を有するFc領域を含むポリペプチドが望ましいが、ポリペプチドが望ましくないエフェクター機能を有しない方が好ましい場合において疾患又は障害の治療に用いることができる。例えば、Fc領域を含むポリペプチドは、抗組織因子（TF）抗体、抗IgE抗体、及び抗インテグリン抗体（例えば抗 α （ α ）437抗体）であってもよい。そのようなFc領域を含むポリペプチドの望ましい作用機構は、リガンドレセプター結合対をブロックすることであってもよい。更に、ADCC活性が減退したFc領域を含むポリペプチドは、アゴニスト抗体であってもよい。

20

【0225】

ガンを治療するために使用される変異ポリペプチドは、好ましくは、本発明のFc領域アミノ酸置換（例えば、本願明細書の表2を参照）からなり、該ポリペプチドに増大したADCC活性及び又は増大したCDC活性を付与する。

30

【0226】

本発明の変異ポリペプチドは、非経口、皮下、局所、腹膜内、肺内、及び鼻腔内、並びに病巣内投与（例えば、局所免疫抑制治療のため）等の任意の適当な方法により投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、及び皮下投与が含まれる。更に、ポリペプチド変異体は、特に、変異ポリペプチドの用量を減少させる場合にはパルス注入により好適に投与される。好ましくは、投与は注射により行われ、最も好ましくは、部位や投与が短期化長期化に応じて静脈又は皮下注射により行われる。

【0227】

疾患の予防又は治療のためのポリペプチド変異体の適切な用量は、疾患のタイプ、重篤度及び経過、変異ポリペプチドの投与が予防目的か治療目的か、これまでの治療、患者の病歴及びポリペプチド変異体に対する応答、並びに担当する医師の判断に依存する。変異ポリペプチドは、患者に対し、1度だけ又は一連の治療期間を通して適切に投与される。

40

【0228】

例えば、疾患のタイプ及び重篤度にもよるが、約1 μ g/kg～15mg/kg（例えば0.120mg/kg）の変異ポリペプチドが、患者に対し、例えば、1回又は複数回に分けて、又は連続注入によって投与される初期試験用量である。通常の1日用量は、上述の条件にもよるが、約1 μ g/kg～100mg/kg又はそれ以上の範囲内である。数日間又はそれ以上にわたる反復投与については、病状にもよるが、治療は症状が充分減少するか消失するまで継続される。この治療の進展は、従来の手法及びアッセイにより簡単にモニターすることができ、治療効果を達成するための用量の調節に利用することがで

50

きる。

【0229】

変異ポリペプチドのこれらの提案された量は、多くの治療的な裁量による。適切な投与量及び投与計画は、得られた結果となる。この内容において考慮される要因は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、病因、抗体の送達部位、特定の種類の抗体、投与方法、投与計画、及び医師にとって公知の他の要因である。

【0230】

治療上有効な変異ポリペプチドの投与量は、患者が治療を受けている疾患の症状を軽減させるために必要とされる用量レベルである。更に、治療上有効量は、遅延するか又は、疾患の発症、例えば、ガンの進行を遅延させるか、最小化するか、予防するのに十分な量の治療薬の量に言及する。治療上有効量は、治療薬（例えば変異ポリペプチド）の量に言及し、また、被検者の疾患の治療（t r a t m e n t）又は管理において治療的な利点を提供する治療薬の量に言及する。更に、本発明の治療薬に関する治療上の有効量は、治療薬単独の量、又は他の治療との組合せに言及し、治療又は被検者の疾患の管理において治療的な利点を提供する。変異ポリペプチドは、必ずしも必要ではないが、対象となる病気の治療に近年使用されている1又は複数の薬剤と共に必要に応じて調剤される。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する変異ポリペプチドの量、病気又は治療のタイプ、及び上述の他の因子に依存する。第1の予防薬又は治療薬（例えば本発明又はその機能性フラグメントの変異Fc領域からなる変異ポリペプチド又はポリペプチド）は、障害を持つ被験者に第2の予防薬又は治療薬を投与する前、同時、後に投与することができる。

【0231】

本発明の治療薬は、使用前に貯蔵用に凍結、凍結乾燥され、及び、適切な無菌の担体において再構成される。凍結乾燥及び再構成は、抗体活性損失の変化させる程度に行なうことができる。投薬量は、調製して補正する必要がある。通常、pH6～8が好ましい。

【0232】

モノクローナル抗体が結合する抗原は、有害である又はどの抗原の減少したレベルから利点を享受する、前記疾患の少なくとも1つ（例えばガン）を治療又は予防するための、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の使用は、本願明細書において意図される。前記疾患の少なくとも1つの治療用医薬の製造において使用される、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の使用は、本願明細書において意図される。

【0233】

本願明細書で使用される場合、用語「治療」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を得るということに言及する。その効果は、その疾患又は症状を完全に又は部分的に予防する観点から予防的であり、及び／又は、疾患及び／又は疾患に対する有害作用を部分的又は完全な治療の観点から治療的である。本願明細書において使用される場合、「治療」は、哺乳類、特にヒトにおいて疾患又は症状を治療する、本発明の化合物を投与することを含み、かつ、（a）それを有するように、疾患の素因を持つが、まだ罹患したと診断されていない被験者において、その疾患が発症するのを予防することと、（b）疾患を抑制、つまり、発現を抑制することと、（c）疾患又は障害の退行を引き起こすか、又は症状又はその症状の複雑化を緩和することを含む。薬剤投与計画を提供し、最適所望の反応（例えば治療反応又は予防反応）を調整する。例えば、1回の注入によって投与してもよく、数回に分けて時間ごとに投与してもよく、又は、投与量は治療的な状況の緊急性によって示されるように比例して増減させてもよい。

【0234】

抗CD20抗体

本発明の変異Fc領域から成っている抗CD20抗体は、本発明の範囲内において意図される（本願明細書における実施例4及び図4を参照）。一実施形態において、抗CD20抗体は、本発明の変異Fc領域又はその一部を含み、本願明細書の表1～10に列挙されるアミノ酸置換を含み、更に、配列番号13、14、15、又は16で表される配列を有するペプチドを含む。一実施形態において、抗CD20抗体は、本発明の変異Fc領域

又はその一部を含み、本願明細書の表 1 ～ 10 に列挙されるアミノ酸置換を含み、更に、

- a) 配列番号 13 及び配列番号 14；
- b) 配列番号 15 及び配列番号 16；
- c) 配列番号 17、18、19、20、21、及び 22；又は
- d) 配列番号 23、24、25、26、27、及び 28 で表される配列を有するペプチドを含む。

【0235】

更に好ましくは、抗 CD20 抗体は、本発明の変異 Fc 領域又はその一部を含み、

a) 247I 及び 339D；

b) 247I 及び 339Q、及び、

c) 378D からなる群から選択されるアミノ酸置換を含み、及び、

a) 配列番号 13 及び配列番号 14；

b) 配列番号 15 及び配列番号 16；

c) 配列番号 17、18、19、20、21、及び 22、かつ、

d) 配列番号 23、24、25、26、27、及び 28 からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。

【0236】

変異 Fc 領域の他の利用

本発明の変異体、及び変異体をコードする核酸配列は、多くの方法で使用する事ができる。例えば、本発明の変異体を薬剤のスクリーニングアッセイに使用することができる。例えば、候補化合物を、変異体を候補化合物と接触させ、候補化合物の変異体に対する結合能を決定することにより、Fc 領域のエフェクター機能を改変又は阻害する能力を評価することができる。変異体は、GST-変異体融合タンパク質を、グルタチオンを含むポリマービーズの表面に結合させる等の周知の方法により固定化することができる。GST 融合タンパク質をコードするキメラ DNA は、対象となる変異体をコードする DNA を GST のカルボキシル末端をコードする DNA に融合させることにより構築される（例えば、Smith 他、Gene, 67:31 (1988)）。融合コンストラクトは、その後、GST 融合タンパク質の発現がイソプロピルー f-D-チオガラクトピラノシド (ITPG) により誘導される適当な発現系（例えば大腸菌 XA90）に移される。ITPG による誘導により、融合タンパク質が可溶性の細胞性タンパク質の主成分として得られる。融合タンパク質は、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法により精製することができる。候補化合物の変異体への結合は、該化合物が 1 又は複数のエフェクター機能を阻害する能力と相関する。

【0237】

他のスクリーニング方法において、変異体又は選択された FcR のいずれかが、プラスチック製マイクロタイタープレート上への吸着又は GST 融合タンパク質のグルタチオンを含むポリマービーズ上への特異的な結合等の公知の方法により固定化される。例えば、GST-変異体は、グルタチオン-セファロースビーズ上に結合する。固定化した変異体を、その後 FcR 及び候補化合物と接触させる。結合していないペプチドを除去し、複合体を可溶化して分析し、結合した標識ペプチドの量を決定する。結合量の減少は、候補化合物が変異体と FcR との相互作用を阻害することを意味する。このスクリーニング方法は、増大した量の本発明の変異体を用いると特に有用である。この方法の変形法は、先に形成した変異体/Fc レセプター複合体を分解することが可能な化合物のスクリーニングを可能にする。例えば、ある実施形態において、FcR に結合した変異体を含む複合体を上述のように固定化し、候補化合物と接触させる。候補化合物による複合体の分解は、化合物がテストする変異体と FcR との相互作用を破壊又は阻害する能力と相関する。このようにして、（例えば、ヒトに対する）治療能力を有する化合物（例えば、自己免疫疾患等のヒトの疾患を治療するのに有用な化合物）を同定することができる。

【0238】

薬剤をスクリーニングするための他の手法は、変異体ペプチドに対する好適な結合親和性を有する化合物に対する高スループットのスクリーニング方法を提供し、国際公開第84/03564号パンフレットに詳細に記載されている。要約すると、多くの異なる小ペプチド供試化合物を、プラスチックのピン又は他の表面等の固体担体上で合成する。ペプチド供試化合物を変異体ペプチドと反応させ、洗浄する。結合したペプチドを、その後周知の方法により検出する。

【0239】

他の手法では、変異体ペプチドを対象とする抗体を用いる。変異体ペプチドに特異的に結合することができる抗体は、ある変異体との結合について供試化合物と拮抗する。このようにして、変異体ペプチドと1又は複数の抗原性決定基を共有する任意のペプチドの存在を、抗体を用いて検出することができる。

10

【0240】

本発明は、化合物をスクリーニングする他の多くの方法を意図する。上述の実施例は、単に用いることが可能な手法の範囲を説明するために示される。当業者にとって、多くの他のスクリーニング方法を用いることができることは認識される。

【0241】

特に、本発明は、少なくとも1つの変異Fc領域をコードする核酸がトランスフェクトされた細胞系の化合物の活性をスクリーニングするための使用を意図し、特に、高スループットの化合物の組み合わせライブラリー（例えば、104以上の化合物を含むライブラリー）からのスクリーニングを意図する。本発明の細胞系は、多くのスクリーニング方法において使用することができる。

20

【0242】

本発明の変異体は、アフィニティー精製剤として使用することができる。例えば、変異体をセファデックス又はろ紙等の固相上に、公知の方法を用いて固定することができる。固定化した変異体を、精製しようとする抗原を含むサンプルと接触させ、その後、サンプル中に含まれる、固定化したポリペプチド変異体に結合した精製しようとする抗原以外のほぼ全ての物質を除去する適当な溶媒で担体を洗浄する。最後に、担体を、pH 5.0のグリシンバッファー等の他の適当な溶媒で洗浄すると、変異ポリペプチドから抗原が切り離される。

【0243】

30

変異ポリペプチドはまた、診断アッセイ（例えば、細胞、組織、又は血清における、対象となる抗原の発現の検出）にも有用である。診断に応用するためには、変異体は通常検出可能な残基で標識されている（そのような標識は、上述のFc領域のアッセイにおいても有用である）。放射性同位体（例えば、³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I）、蛍光標識（例えば、希土類キレート（ユーロピウムキレート）又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、Lissamine、フィコエリスリン、並びにテキサスレッド）、及び種々の酵素-基質標識（例えば、米国特許第4,275,149号明細書参照）、及びルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、3-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素）、ヘテロ環オキシダーゼ（ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ等）を含むがこれらに限定されない多くの標識が利用可能である。酵素-基質の組み合わせとしては、例えば、（i）西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）と基質としての過酸化水素（染料の前駆体（例えば、o-フェニレンジアミン（OPD）又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））を酸化する）；（ii）アルカリホスファターゼ（AP）と、発色性基質としてリン酸p-ニトロフェニル；及び（iii）-D-ガラクトシダーゼ（R-D-Gai）と、発色性基質又は蛍光性基質が挙げられる。

40

50

【 0 2 4 4 】

本発明の変異体は、インビボでの診断アッセイにも使用することができる。例えば、変異ポリペプチドは、抗原又は抗原を発現している細胞の位置を、免疫シンチグラフィで特定できるように放射性元素で標識される。

【表 1 - 1】

表 1 F c 変異体

位置⁺ アミノ酸置換^{*}

235	G, R
236	F, R, Y
237	K, N, R
238	E, G, H, I, L, V, W, Y
244	L
245	R
247	A, D, E, F, M, N, Q, R, S, T, W, Y
248	F, P, Q, W
249	L, M, N, P, Y
251	H, I, W
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y
255	K, N
256	H, I, K, L, V, W, Y
257	A, I, M, N, S
258	D
260	S
262	L
264	S
265	K, S
267	H, I, K
268	K
269	N, Q
271	T
272	H, K, L, R
279	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
280	T
283	F, G, H, I, K, L, M, P, R, T, W, Y
286	F
288	N, P
292	E, F, G, I, L
293	S, V
301	W
304	E
307	E, M
312	P
315	F, K, L, P, R
316	F, K
317	P, T
318	N, P, T
332	F, G, L, M, S, V, W
339	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, W, Y
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
343	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
373	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

375	R	
376	E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
377	G, K, P	
378	D, N	
379	N, Q, S, T	
380	D, N, S, T	
382	D, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
385	E, P	10
386	K	
423	N	
424	H, M, V	
426	D, L	
427	N	
429	A, F, M	
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
431	H, K, P	
432	R, S	20
438	G, K, L, T, W	
439	E, H, Q	
440	D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, T, V	
442	K	

+ EU番号付けによるFcアミノ酸位

* 例えば、249位：249L、249M、249N、又は249Y

【表 2 - 1】

表 2 Fc 変異体：エフェクター機能の変化

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
235G						X
235Q		X		X		
235R		X				
235S		X				X
236F		X				
236R		X				X
236Y		X		X	X	
237E		X				X
237K		X		X		X
237N		X				X
237R		X		X		X
238A		X				X
238E		X		X		X
238G		X		X		X
238H		X		X		X
238I		X				X
238L		X	X			X
238V		X				X
238W		X		X		X
238Y		X		X		X
244L			X		X	
245R		X	X			X
247A	X			X	X	
247D				X	X	
247E				X	X	
247F	X			X		
247G		X		X	X	
247H	X			X		X
247I	X			X		X
247L	X			X		X
247M	X			X		
247N				X	X	
247Q				X	X	
247R		X		X	X	
247S				X	X	
247T	X					X
247V	X					
247W				X	X	
247Y	X			X		X
248A				X		
248F				X	X	
248P				X	X	
248Q				X	X	
248W				X	X	

10

20

30

40

【表 2 - 2】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
249E	X			X	X	
249L		X		X	X	
249M				X	X	
249N					X	
249P		X	X		X	
249Y	X			X	X	
250K		X			X	
250M		X	X			X
250R		X		X	X	
251F	X			X	X	
251H		X		X	X	
251I		X		X	X	
251W		X		X	X	
252Y		X	X			X
254A				X	X	
254D				X		X
254E				X		X
254F	X			X	X	
254G				X		
254H				X		
254I				X		X
254K				X	X	
254L		X		X	X	
254M	X			X	X	
254N				X		
254P		X		X		X
254Q		X		X		X
254R				X	X	
254T		X		X		X
254V		X		X		X
254W				X	X	
254Y	X			X	X	
255K				X	X	
255N				X		X
256A	X		X		X	
256F	X			X		
256G			X		X	
256H				X		
256I				X	X	
256K				X		
256L					X	
256M	X			X	X	
256P			X		X	
256Q				X	X	
256R				X		
256V		X				

10

20

30

40

【表 2 - 3】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
256W				X	X		
256Y				X	X		
257A		X	X			X	
257I		X	X			X	
257M		X	X			X	
257N		X	X			X	10
257S		X	X			X	
257V		X	X			X	
258D	X		X				
260S		X	X		X		
262L		X	X			X	
264S		X		X		X	
265H		X				X	
265K		X					
265S		X		X			
265Y		X		X		X	
267G		X		X		X	20
267H		X				X	
267I		X		X		X	
267K		X				X	
268D	X			X	X		
268E	X		X				
268K				X		X	
269N		X				X	
269Q		X				X	
270A		X		X		X	
270G		X				X	
270K		X	X			X	30
270M		X		X		X	
270N		X				X	
271T		X				X	
272H		X	X			X	
272K		X	X				
272L		X	X			X	
272N		X				X	
272R		X	X				
279A	X		X				
279D		X	X				
279F		X					40
279G			X				
279H			X				
279I				X			
279K		X		X			
279L		X		X			
279M			X				
279N			X				

【表 2 - 4】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
279Q			X		X		
279R			X				
279S			X		X		
279T			X				
279W		X	X		X		
279Y			X		X		10
280A	X			X			
280K	X				X		
280T				X	X		
283A	X		X				
283D		X	X				
283F		X	X		X		
283G		X	X		X		
283H		X	X		X		
283I	X		X		X		
283K	X		X		X		
283L		X	X		X		20
283M	X				X		
283N			X		X		
283P			X		X		
283Q			X				
283R	X		X		X		
283S			X		X		
283T			X				
283W		X	X		X		
283Y		X	X				
285N		X	X				
286F			X				30
288N	X		X				
288P		X	X				
292A	X					X	
292E		X		X			
292F		X		X			
292G		X		X			
292I		X		X			
292L				X	X		
293S		X				X	
293V		X	X				
301W		X				X	40
304E		X					
307A		X	X		X		
307E		X	X			X	
307M		X	X		X		
311A	X		X				
311D	X			X			
311E				X		X	

【表 2 - 5】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
311F		X		X	X		
311G				X			
311I		X	X		X		
311K		X	X		X		
311L			X		X		
311M			X		X		
311R				X	X		10
311N	X			X			
311S		X				X	
311T	X				X		
311V	X		X		X		
311W			X		X		
311Y	X			X	X		
312P		X	X		X		
314F		X		X	X		
314I		X			X		
314V		X		X	X		
314W		X		X	X		20
314Y					X		
315F		X		X	X		
315K				X	X		
315L	X				X		
315P		X		X	X		
315R					X		
316F		X		X		X	
316K			X		X		
317P		X	X		X		
317T				X	X		
318N	X		X		X		
318P	X					X	30
318T	X		X		X		
318V	X						
326W		X		X	X		
327T		X		X		X	
328V		X				X	
329Y		X				X	
330K	X					X	
330R						X	
332A					X		
332D	X				X		
332E	X				X		
332F			X		X		40
332G					X		
332H		X	X		X		
332K		X	X			X	
332L		X	X		X		

【表 2 - 6】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
332M			X		X	
332N					X	
332Q					X	
332R		X	X			
332S			X		X	
332T	X				X	
332V	X				X	
332W		X	X		X	
332Y					X	
339D	X				X	
339E				X		X
339F	X				X	
339G	X			X	X	
339H					X	
339I	X				X	
339K	X				X	
339L				X		
339M	X					X
339N	X		X		X	
339Q	X				X	
339R	X			X	X	
339S	X				X	
339T	X		X		X	
339W			X		X	
339Y					X	
341D		X		X	X	
341E		X		X	X	
341F		X		X	X	
341H		X			X	
341I		X		X	X	
341K		X		X	X	
341L		X		X	X	
341M		X		X	X	
341N		X		X	X	
341P		X	X		X	
341Q		X		X	X	
341R		X		X	X	
341S		X		X	X	
341T		X		X	X	
341V				X	X	
341W		X		X	X	
341Y		X		X	X	
343A		X			X	
343D		X			X	
343E		X	X		X	
343F		X				

10

20

30

40

【表 2 - 7】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
343G		X			X		
343H		X	X		X		
343I						X	
343K			X		X		
343L		X			X		
343M		X		X	X		10
343N		X			X		
343Q		X	X		X		
343R		X	X		X		
343S		X			X		
343T		X	X		X		
343V		X		X			
343W		X		X	X		
343Y		X	X		X		
373A		X		X			
373D		X		X	X		
373E		X			X		20
373F		X			X		
373G		X		X			
373H					X		
373I		X			X		
373K		X		X	X		
373L		X		X	X		
373M		X		X	X		
373N		X		X	X		
373Q		X		X	X		
373R		X			X		
373S		X		X		X	30
373T		X		X	X		
373V		X		X	X		
373W		X		X	X		
375R		X	X		X		
376A	X		X		X		
376E		X					
376F		X			X		
376G		X	X		X		
376H		X		X	X		
376I			X				
376L				X	X		40
376M			X				
376N					X		
376P			X		X		
376Q					X		
376R					X		
376S					X		
376T			X		X		

【表 2 - 8】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
376V	X		X		X		
376W		X		X			
376Y		X		X			
377G	X						
377K	X		X				
377P					X		
378D			X			X	10
378N			X				
379N	X				X		
379Q		X			X		
379S					X		
379T					X		
380A			X		X		
380D						X	
380N	X		X		X		
380S	X		X		X		
380T			X		X		
382A	X						20
382D		X				X	
382F	X		X			X	
382H			X				
382I	X		X		X		
382K			X				
382L			X		X		
382M			X				
382N			X			X	
382P						X	
382Q			X		X		
382R			X			X	30
382S		X	X			X	
382T			X				
382V			X		X		
382W			X			X	
382Y			X			X	
385E	X					X	
385P						X	
386K					X		
423N			X			X	
424H						X	
424M		X		X		X	40
424V				X			
426D				X	X		
426L					X		
427N	X		X			X	
429A		X		X	X		
429F		X		X	X		

【表 2 - 9】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
429M	X			X	X	
430A			X		X	
430D				X	X	
430F			X		X	
430G			X		X	
430H		X	X		X	
430I			X		X	
430K		X	X		X	
430L			X		X	
430M			X		X	
430N		X	X		X	
430P					X	
430Q		X	X			
430R		X	X		X	
430S			X		X	
430T			X		X	
430V			X		X	
430W		X		X	X	
430Y			X		X	
431H			X		X	
431K			X			
431P				X	X	
432R		X		X	X	
432S		X		X	X	
434G			X			X
434H			X			X
434I		X		X		X
434W	X		X		X	
434Y			X		X	
436I	X		X			X
436L			X			
436T			X			X
438G						X
438K			X			
438L			X		X	
438T			X			X
438W			X		X	
439E						X
439H						X
439Q				X		X
440A				X		X
440D		X		X		
440E				X		
440F				X		X
440G	X					X
440H	X		X			

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
440I	X					X
440K			X			X
440L	X		X			X
440M				X		X
440N						
440Q					X	
440R						
440T		X				
440V		X				
440W						
440Y					X	
442K		X	X			

* 抗CD20抗体、IgG1のFc領域において試験される変異体

【表 3】

表 3 増大したADCC

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
247	A, F, H, I, L, M, T, V, Y	
249	E, Y	
251	F	
254	F, M, Y	
256	A, M	
258	D	10
268	D, E	
279	A	
280	A, K	
283	A, I, K, M, R	
288	N	
292	A	
311	A, D, N, T, V, Y	
315	L	
318	N, P, T, V	20
330	K	
332	T, V	
339	D, F, G, I, K, M, N, Q, R, S, T	
376	A, V	
377	G, K	
379	N	
380	N, S	
382	A, I	
385	E	
427	N	30
429	M	
434	W	
436	I	
440	G, H, I, L	

⁺ EU番号付けによるFcアミノ酸位

^{*} 例えば、249位：249L、249M、249N、又は249Y

【表 4 - 1】

表 4 減少したADCC

位置⁺ アミノ酸置換*

235	Q, R, S	
236	F, R, Y	
237	E, K, N, R	
238	E, G, H, I, L, V, W, Y	
247	G, R	
249	L, P	10
250	K, M, R	
251	H, I, W	
252	Y	
254	L, P, Q, T, V	
256	V	
257	A, I, M, N, S, V	
260	S	
262	L	
264	S	
265	H, K, S	20
267	G, H, I, K	
269	N, Q	
270	A, G, K, M, N	
271	T	
272	H, K, L, N, R	
279	D, F, K, L, W	
283	D, F, G, H, L, T, W, Y	
285	N	
288	P	
292	E, F, G, I	
293	S, V	30
301	W	
304	E	
307	A, E, M	
311	F, I, K, S	
312	P	
314	F, I, V, W	
315	F, P	
316	F	
317	P	
327	T	40
328	V	
329	Y	
332	G, K, L, R, W	
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y	
343	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
373	A, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W	
375	R	

【表 4 - 2】

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]
376	A, E, F, G, H, W, Y
379	Q
382	D, S
429	A, F
430	H, K, N, Q, R, W
432	R, S
434	I
440	D, T, V
442	K

⁺ EU 番号付けによる F c アミノ酸位

【表 5】

表5 増大したFcRn結合能

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
238	L	
244	L	
245	R	
249	P	
252	Y	
256	P	10
257	A, I, M, N, S, V	
258	D	
260	S	
262	L	
270	K	
272	L, R	
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y	
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y	
285	N	
286	F	20
288	N, P	
293	V	
307	A, E, M	
311	A, I, K, L, M, V, W	
312	P	
316	K	
317	P	
318	N, T	
332	F, H, K, L, M, R, S, W	
339	N, T, W	30
341	P	
343	E, H, K, Q, R, T, Y	
375	R	
376	G, I, M, P, T, V	
377	K	
378	D, N	
380	N, S, T	
382	F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
423	N	
427	N	40
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y	
431	H, K	
434	F, G, H, W, Y	
436	I, L, T	
438	K, L, T, W	
440	K	
442	K	

⁺ EU番号付けによるFcアミノ酸位

【表 6】

表 6 減少した F c R n 結合能

位置⁺ アミノ酸置換*

235	Q	
236	Y	
237	K, R	
238	E, G, H, W	
247	A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, W, Y	10
248	A, F, P, Q, W	
249	E, L, M, Y	
251	F, H, I, W	
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y	
255	K, N	
256	F, H, I, K, M, R, W, Y	
264	S	
265	S, Y	
267	G, I	
268	D, K	20
270	A, M	
279	I, K, L	
280	T	
292	E, F, G, I, L	
311	D, E, F, G, N, R, Y	
315	F, K, P	
316	F	
317	T	
326	W	
327	T	30
339	E, G, L, R	
341	D, E, F, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
343	M, V, W	
373	A, D, G, K, L, M, N, Q, S, T, V, W	
376	H, L, W, Y	
424	M, V	
426	D	
429	A, F, M	
430	D, W	
431	P	40
432	R, S	
434	I	
439	Q	
440	A, D, E, F, M	

⁺ EU番号付けによる F c アミノ酸位

【表 7 - 1】

表 7 増大した CDC

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
236	Y	
244	L	
247	A, D, E, G, N, Q, R, S, W	
248	F, P, Q, W	
249	E, L, M, N, P, Y	
250	K, R	10
251	F, H, I, W	
254	A, F, K, L, M, R, Y	
255	K	
256	A, G, I, L, M, P, Q, W, Y	
260	S	
268	D	
279	Q, S, W, Y	
280	K, T	
283	F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, W	20
292	L	
307	A, M	
311	F, I, K, L, M, T, V, W, Y	
312	P	
314	F, I, V, W, Y	
315	F, K, L, P, R	
316	K	
317	P, T	
318	N, T	
332	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y	30
339	D, F, G, H, I, K, N, Q, R, S, T, W, Y	
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
343	A, D, E, G, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y	
373	D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W	
375	R	
376	A, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, T, V	
377	P	
379	N, Q, S, T	
380	A, N, S, T	
382	I, L, Q, V	40
386	K	

【表 7 - 2】

426	D, L
429	A, F, M
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
431	H, P
432	R, S
434	W, Y
438	L, W
440	Q, Y

10

+ EU番号付けによるF c アミノ酸位

【表 8】

表 8 減少した C D C

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
235	G, S	
236	R	
237	E, K, N, R	
238	A, E, G, H, I, L, V, W, Y	
245	R	
247	H, I, L, T, Y	10
250	M	
252	Y	
254	D, E, I, P, Q, T, V	
255	N	
257	A, I, M, N, S, V	
262	L	
264	S	
265	H, Y	
267	G, H, I, K	20
268	K	
269	N, Q	
270	G, M, N	
271	T	
272	H, L, N	
292	A	
293	S	
301	W	
307	E	
311	E, S	30
316	F	
318	P	
327	T	
328	V	
329	Y	
330	K, R	
332	E, M	
343	I	
373	S	
378	D	40
380	D	
382	D, F, N, P, R, S, W, Y	
385	E, P	
423	N	
424	H, M	
427	N	

⁺ EU番号付けによる F c アミノ酸位

【0245】

以下の実施例は、本発明の一つの好ましい実施形態及び側面を示し、より詳しく説明するためのものであり、これらの範囲を限定するものではない。

【0246】

A D C C アッセイにおける変異 F c 領域のスクリーニング

本実施例では、A D C C アッセイにおいて、どのように抗体（例えば抗 C D 2 0）に関連する変異 F c 領域をスクリーニングするかについて述べる。

【0247】

i. 抹消血単核細胞（P B M C）の単離

約 5 0 m L の抹消血を健康なドナーから採取し、p H 7. 0 リン酸緩衝生理食塩水（P B S）で 1 : 2 に希釈する。チューブを穏やかに回転させることにより溶液を混合する。約 1 2 m L の H i s t o p a q u e - 1 0 7 7（S i g m a 社カタログ番号 1 0 7 7 - 1）を希釈血液サンプルの下に注意深く加えて層状にした後、S o r v o l l 社製 R T 6 0 0 0 B 遠心器中で、バケットローターを、ブレーキをオフにして 1 0 0 0 r p m で 1 0 分間回転させ遠心分離する。グラジエントの上相を吸引して廃棄し、白色の P B M C を含む界面相を回収し、H a n k s ' B a l a n c e d S a l t S o l u t i o n（G i b c o 社カタログ番号 1 4 0 2 5 - 0 9 2）で 3 回洗浄する。洗浄した細胞ペレットを約 2 0 m L の、1 0 % ウシ胎児血清（F B S）（O m e g a S c i e n t i f i c 社カタログ番号 F B - 0 1）を含む R P M I 1 6 4 0 培地に懸濁させる。再懸濁させた P B M C を 2 つの T - 1 7 5 培養フラスコに分注し、3 0 m L の、1 0 % F B S を含む R P M I をそれぞれに加え、3 7 ° C において 5 % C O 2 インキュベーター中で終夜インキュベートする。翌日、非接着性の P B M C を 5 0 m L フアルコンチューブ中に回収後、上記と同様に遠心分離し、1 % F B S を含むフェノールレッド欠損 R P M I 中に再懸濁させる。少量の再懸濁細胞を 1 0 倍に希釈し、血球計でカウントする。残りの P B M C は、必要となるまでインキュベーターに保存する。

【0248】

i i. 標的細胞系（抗 C D 2 0 A D C C アッセイに特有）

C D 2 0 を発現した、W i l . 2 及び S K W 6 . 4 B 細胞系は、A T C C より入手し、推奨される条件で培養した。使用する 1 日前に細胞を 2 等分する。翌日、細胞数を 4×10^5 個 / m L に調節し、5 0 μ L ずつ 9 6 ウェル組織培養プレートに加える。

【0249】

i i i. I g G 希釈液

スクリーニングの前に、本発明の F c 変異体を含む I g G を発現させ、生成し、標準的な E L I S A を用いて定量する。一点法による A D C C 一次スクリーニングのために、I g G 変異体を、1 % P B S を含むフェノールレッド欠損 R P M I 培地中で 4 0 m g / m L に希釈する。アッセイに用いられる I g G の最終濃度を 4 倍に希釈する（最終濃度 1 0 n g / m L）。5 0 μ L の I g G 希釈液を標的細胞に加え、1 5 分間 3 7 ° C でインキュベートした後、オプソニン化された標的細胞にエフェクター細胞を加える。

【0250】

I g G の滴定を行うと、I g G 濃度は、約 0 . 0 0 1 ~ 1 μ g / m L の範囲で変化する。I g G 希釈液を、9 6 ウェルマイクロタイタープレート中で、1 % P B S を含むフェノールレッド欠損 R P M I 中のサンプルを希釈することにより調製する。希釈した I g G サンプルを、標的細胞を含むアッセイプレートに加える。

【0251】

i v. エフェクター細胞

P B M C の濃度を、エフェクター細胞：標的細胞比が、1 0 ~ 2 0 : 1（2 ~ 4 $\times 10^6$ 個 / m L）の範囲内となるよう調節する。1 0 0 μ L の再懸濁した P B M C をそれぞれのウェルのオプソニン化された標的細胞に加える。プレートを、5 % C O 2 の存在下 3 7 ° C で 3 ~ 4 時間インキュベートする。

【0252】

v. 乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出の検出

標的細胞の溶解を、損傷を受けた細胞の細胞質から上澄みへのLDH酵素の放出を検出することにより測定する。オプソニン化した標的細胞をエフェクター細胞とインキュベートした後、アッセイプレートを2000rpmで5分間遠心する。ペレット化した細胞及び破砕物を避けつつ、約75μLの細胞培養液の上澄みを注意深く取り去る。この上澄みを直接マイクロタイタープレートに加え、これに75μLのLDH検出試薬 (Roche社カタログ番号1644793) を加える。その後、プレートを約15～30分間インキュベートし、490nmにおける吸光度を、Molecular Devices Vmax Kinetic Microplate Readerにより読み取る。

【0253】

vi. データの解析

ADCCスクリーニングアッセイは、全て2回行った。それぞれのアッセイプレートは、自然溶解、IgG非存在下でのエフェクター細胞及び標的細胞の溶解、及び標的細胞の完全溶解のコントロール群を含む。標的細胞の完全溶解は、1% Triton-X100を標的細胞に加えることにより達成される。野生型コントロール群をそれぞれのアッセイプレートに含めておき、得られるADCCシグナルを平均する。自然分解コントロール群から得られるバックグラウンド値を、それぞれのサンプルから差し引く。希釈IgG液から得られるバックグラウンド値をそれぞれのサンプルから差し引く。データを、吸光度から、自然溶解及び完全溶解に対する特異的溶解の割合に変換する。特異的溶解の割合は、次の式により計算される。

(%特異的溶解) = (測定値A490 - バックグラウンドA490) / (最大A490 - バックグラウンドA490) × 100

ここで、バックグラウンドA490は、IgG非存在下でのエフェクター及び標的細胞、及び粗製IgG上澄み中に存在するLDH混入物によるIgGバックグラウンドの和 (supernatant) である。Fc変異体の活性の割合は、野生型コントロールの平均値に対して規格化される。2度のアッセイについての規格化された活性の割合は平均され、個々のサンプルについてそれぞれのアッセイプレート間の標準偏差を計算する。

【0254】

vii. 結果

相対ADCC特異性活性を表9 (一置換) 及び表10 (組合せ置換) に示す。この表に示したCDCの値は、本願明細書の実施例9の記載に従い得られたものであり、表9に示したFcRn結合アッセイの値は、本願明細書の実施例3の記載に従い得られたものである。更に、結果は、上記の表1及び2に示される。一置換単独より高いADCCを得た組合せ置換は、247F, 339D; 247I, 339D; 247L, 339D; 247L, 339T; 及び247I, 339Qである。単独でテストした場合に野生型ADCCより高いADCCを有するにも関わらず、野生型ADCCの80%以下のADCCであった組合せ置換は、247A, 339D; 247Y, 339H; 247I, 339I; 247T, 339I; 247L, 339N; 247A, 339Q; 及び247A, 339Rである。単独でテストした場合に野生型ADCCより高いADCCを有するにも関わらず、野生型ADCCの10%以下のADCCであった組合せ置換は、247I, 339I; 247T, 339I; 及び247L, 339Nである。

【表 9 - 1】

表 9

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn	pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	WT (a,z)	100			100		100		
L	235A	87	23.2		102	11.9	67	7.9	2
L	235E	80	17.4		87	16.2	48	35.8	2
L	235G	93	30.3		85	21.2	58	46.0	2
L	235Q	86	1.8		81	14.4	98	25.1	2
L	235R	45	10.5		93	34.1	110	13.8	2
L	235S	92	2.0		85	40.0	0	262.9	2
G	236F	0	942.1		88	7.9	0	283.3	2
G	236R	0	228.7		101	20.6	14	110.1	4
G	236Y	8	72.7		76	10.0	168	0.3	2
G	237E	0	89.2		93	35.0	36	28.8	4

【表 9 - 2】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
G	237K	0	113.3	78	12.8	12	136.0	4
G	237N	0	107.5	91	16.3	22	31.5	4
G	237R	0	81.3	56	60.6	28	10.5	4
P	238A	0	205.8	90	9.6	29	49.5	4
P	238E	0	20.6	76	6.7	24	101.0	4
P	238G	0	92.8	66	6.9	23	120.5	4
P	238H	0	48.9	72	11.4	11	206.3	4
P	238I	0	180.4	94	6.4	18	54.1	4
P	238L	0	37.4	115	13.6	34	50.1	4
P	238V	46	11.8	102	8.3	67	19.2	4
P	238W	0	66.6	87	5.4	23	103.4	4
P	238Y	0	34.0	74	15.8	16	288.8	4
P	244L	77	23.4	124	9.6	134	6.0	2
P	245R	62	15.0	188	7.2	42	5.3	2
P	247A	122	16.2	97	0.3	116	0.9	2
P	247D	95	23.4	54	2.8	131	1.1	2
P	247E	95	10.3	52	8.7	118	0.0	2
P	247F	144	18.8	6	1258.9	71	34.1	6
P	247G	82	16.1	75	4.2	137	0.9	2
P	247H	145	11.2	35	252.4	79	7.5	6
P	247I	140	22.9	79	30.7	22	198.3	6
P	247L	144	10.1	57	33.7	0	722.7	16
P	247M	127	21.0	18	1599.0	114	7.2	6
P	247N	91	37.2	41	38.7	109	4.0	2
P	247Q	103	8.5	26	294.3	137	3.7	4
P	247R	58	15.5	72	1.2	127	4.9	2
P	247S	106	38.6	81	15.0	130	2.6	2
P	247T	129	11.2	75	27.5	37	34.8	10
P	247V	120	13.5	Na	na	na	na	2
P	247W	102	6.5	0	1314.2	122	0.5	2
P	247Y	143	8.4	7	na	88	7.1	6
K	248A	100	5.4	15	179.9	102	2.4	2
K	248F	107	18.0	0	559.4	202	4.0	2
K	248P	103	9.1	34	99.4	226	1.3	2
K	248Q	101	0.5	38	89.3	174	17.9	2
K	248W	102	9.4	30	54.5	166	8.3	2
D	249E	110	6.7	78	22.4	258	16.1	4
D	249L	73	1.4	15	179.9	214	3.2	2
D	249M	101	9.6	50	4.5	163	1.2	2
D	249N	94	15.9	112	14.0	255	10.9	4
D	249P	56	4.0	138	21.0	119	0.2	2
D	249Y	110	8.8	41	28.3	170	6.6	2
T	250K	38	27.1	96	30.1	199	13.5	6
T	250M	78	11.0	165	7.4	47	6.6	4
T	250R	84	0.7	62	34.0	288	13.9	4
L	251F	125	6.0	64	47.6	160	16.6	10

10

20

30

40

【表 9 - 3】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
L	251H	59	11.6	46	5.6	167	22.7	2
L	251I	84	9.8	7	333.3	190	18.8	2
L	251W	95	2.9	0	na	161	17.3	2
M	252Y	61	5.8	964	27.9	62	46.1	4
I	253A	103	6.1	0	12.0	81	23.9	4
S	254A	99	20.1	7	733.0	139	11.2	4
S	254D	101	14.2	7	113.9	74	31.2	2
S	254E	102	3.8	6	107.9	72	35.2	2
S	254F	121	11.2	0	1087.4	206	14.4	6
S	254G	100	14.7	7	86.8	102	6.1	2
S	254H	108	20.0	0	74.3	85	22.0	4
S	254I	99	2.5	25	64.3	80	11.5	4
S	254K	109	14.8	9	77.2	137	6.1	2
S	254L	89	9.8	74	12.6	227	12.1	6
S	254M	89	11.9	0	212.1	248	13.4	6
S	254N	90	13.3	8	5.6	76	34.6	2
S	254P	78	17.7	3	141.4	75	25.2	2
S	254Q	84	12.6	9	121.2	74	25.2	2
S	254R	99	1.3	14	128.2	152	4.8	2
S	254T	54	51.9	32	34.7	75	12.1	2
S	254V	68	40.5	31	40.5	84	4.4	2
S	254W	98	6.0	0	116.1	188	7.7	6
S	254Y	117	9.4	0	129.1	211	15.7	6
R	255K	96	3.5	41	65.9	276	9.3	4
R	255N	84	17.7	27	162.7	81	18.1	2
T	256A	115	16.5	160	3.0	190	19.6	2
T	256D	97	5.3	544	10.6	86	23.2	6
T	256E	91	12.9	339	8.4	104	7.2	6
T	256F	119	3.3	5	435.0	128	26.6	2
T	256G	95	20.0	162	8.0	221	24.5	2
T	256H	103	6.3	26	6.1	91	11.9	2
T	256I	93	11.5	72	3.7	157	16.2	4
T	256K	100	6.7	31	20.6	92	20.2	2
T	256L	93	3.9	78	60.5	267	22.7	4
T	256M	122	17.4	35	78.9	200	14.8	10
T	256N	102	7.2	229	6.4	86	23.2	2
T	256P	109	11.8	190	6.1	260	11.8	8
T	256Q	100	17.2	64	14.2	152	11.3	4
T	256R	94	8.8	33	60.0	71	47.1	2
T	256S	103	5.3	169	3.1	101	15.9	2
T	256V	82	11.1	114	30.5	109	11.0	2
T	256W	96	8.5	14	84.5	170	14.4	4
T	256Y	97	7.2	68	18.6	127	18.0	2
P	257A	86	11.5	319	15.0	34	53.7	4
P	257I	54	16.4	1022	14.5	46	22.4	6
P	257M	26	11.0	835	19.1	48	48.4	4

10

20

30

40

【表 9 - 4】

位置及び WT* 変異体*		ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
P	257N	27	13.1	867	15.7	62	31.4	4
P	257S	28	28.8	184	6.8	46	30.1	4
P	257V	18	97.9	447	41.5	27	143.5	2
E	258D	115	7.0	361	20.5	110	9.6	4
T	260S	93	5.6	124	7.4	171	17.1	2
V	262L	61	2.9	525	15.1	30	48.0	2
V	264S	10	39.8	78	20.0	50	36.7	2
D	265H	8	118.9	79	36.1	81	0.5	2
D	265K	10	146.2	107	34.3	84	46.4	2
D	265S	9	106.3	66	28.9	103	13.3	2
D	265Y	3	7.6	33	88.8	62	21.5	2
S	267G	29	8.6	86	0.9	60	18.1	4
S	267H	0	48.4	86	16.8	47	41.1	4
S	267I	0	78.0	83	11.8	50	37.8	4
S	267K	0	73.3	102	14.2	26	47.1	4
H	268D	110	7.8	68	32.4	122	10.7	6
H	268E	110	8.3	126	17.8	100	8.4	8
H	268K	98	17.6	86	10.4	24	112.7	4
E	269N	23	74.0	92	17.0	30	69.4	4
E	269Q	47	3.6	98	3.5	22	82.8	4
D	270A	41	35.5	87	6.0	36	66.5	4
D	270G	0	102.2	108	16.5	37	21.8	4
D	270K	15	465.5	122	8.4	0	462.9	4
D	270M	49	19.2	81	5.2	25	606.9	4
D	270N	28	1185.2	94	8.2	34	103.7	4
P	271T	26	53.9	96	20.4	32	89.1	4
E	272H	73	13.6	157	23.0	53	34.8	2
E	272K	70	8.9	320	20.4	118	28.7	4
E	272L	78	21.1	129	3.9	71	3.1	2
E	272N	90	7.5	110	33.0	71	34.6	2
E	272R	50	2.1	351	3.3	102	1.2	2
V	279A	114	14.6	214	5.0	106	21.2	2
V	279D	87	12.1	367	0.3	98	8.5	2
V	279F	81	4.8	113	14.3	106	10.0	2
V	279G	98	2.4	256	11.6	109	18.0	2
V	279H	79	28.1	173	29.6	127	22.7	6
V	279I	101	1.6	83	1.3	100	21.0	2
V	279K	91	1.5	79	26.1	106	0.7	2
V	279L	96	3.0	78	13.9	100	5.7	2
V	279M	107	8.3	122	3.5	91	10.3	2
V	279N	102	32.0	204	19.5	85	50.2	6
V	279Q	85	28.3	181	8.0	139	8.1	6
V	279R	105	4.8	130	10.7	98	8.7	2
V	279S	94	29.8	242	18.3	122	16.7	6
V	279T	95	15.5	265	6.9	110	12.8	10
V	279W	68	24.8	162	22.8	125	10.5	6

10

20

30

40

【表 9 - 5】

位置及び

WT*	変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
V	279Y	82	26.8	139	8.6	144	13.2	6
D	280A	111	44.9	55	50.1	135	28.7	2
D	280K	137	47.6	120	27.2	192	33.5	2
D	280T	108	na	60	12.6	122	8.7	4
E	283A	107	2.1	126	0.2	96	17.9	2
E	283D	84	8.4	110	4.0	92	10.3	2
E	283F	74	0.1	168	38.6	127	20.4	2
E	283G	93	3.1	137	4.4	135	8.5	2
E	283H	87	6.1	206	6.5	123	15.9	2
E	283I	106	1.9	143	5.6	126	12.3	2
E	283K	109	5.8	246	5.1	133	8.0	2
E	283L	92	3.1	126	1.3	120	0.1	2
E	283M	112	7.4	95	13.8	120	2.4	2
E	283N	102	3.8	119	7.4	135	23.4	6
E	283P	97	11.9	136	3.9	118	11.8	4
E	283Q	95	5.3	117	8.0	122	22.9	2
E	283R	102	0.3	282	8.1	144	16.7	2
E	283S	91	1.5	143	11.1	119	12.3	2
E	283T	103	3.2	143	12.4	108	11.0	2
E	283W	90	2.8	117	2.1	159	1.3	2
E	283Y	81	6.7	142	4.1	136	17.2	2
H	285N	93	2.6	202	19.8	113	21.1	4
N	286F	107	7.1	307	32.3	108	16.1	4
K	288N	110	8.7	162	13.2	118	19.1	4
K	288P	45	1.1	119	3.0	116	15.7	2
R	292A	114	2.9	85	67.5	74	21.1	4
R	292E	35	21.4	65	48.5	92	32.1	2
R	292F	73	16.4	64	7.6	101	8.3	2
R	292G	94	2.5	60	35.9	119	32.8	2
R	292I	79	1.5	56	23.6	106	3.7	2
R	292L	96	3.9	68	40.0	123	7.2	2
E	293S	68	7.4	101	23.0	98	0.1	2
E	293V	73	12.5	127	18.0	107	24.0	2
R	301W	5	105.4	119	18.1	49	31.1	4
S	304E	24	32.9	101	8.7	122	11.3	2
T	307A	87	4.4	233	14.5	115	6.5	4
T	307E	88	7.9	492	34.6	81	2.4	4
T	307M	82	5.3	302	23.7	150	6.5	4
Q	311A	106	2.4	139	7.0	89	28.3	2
Q	311D	111	6.0	38	22.2	83	13.6	2
Q	311E	102	1.7	46	17.7	78	0.7	2
Q	311F	89	6.9	64	7.5	212	20.7	2
Q	311G	98	1.9	58	21.5	92	9.6	2
Q	311I	87	8.2	437	9.6	236	11.3	8
Q	311K	80	13.4	165	5.5	170	9.3	6
Q	311L	107	6.7	186	9.2	191	8.1	4

10

20

30

40

【表 9 - 6】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
Q	311M	97	7.2	387	15.0	252	16.3	6
Q	311N	115	1.9	54	10.5	126	23.3	2
Q	311P	99	8.0	89	300.5	172	67.9	4
Q	311R	96	8.5	14	84.5	170	14.4	2
Q	311S	86	8.8	97	10.5	0	92.8	2
Q	311T	111	10.2	131	14.0	168	23.4	2
Q	311V	108	1.7	558	19.5	240	23.3	4
Q	311W	104	8.2	215	2.8	251	18.7	4
Q	311Y	107	3.0	94	0.3	211	25.0	2
D	312P	97	1.4	546	16.1	148	11.6	2
L	314F	70	7.8	42	41.2	108	5.5	2
L	314I	83	13.0	86	22.7	184	14.2	4
L	314V	65	14.0	21	128.8	179	10.9	4
L	314W	79	11.0	5	80.2	190	2.0	4
L	314Y	87	13.6	64	81.4	238	3.2	4
N	315F	83	12.8	51	38.3	140	15.3	2
N	315K	108	3.5	88	10.2	148	8.2	2
N	315L	112	6.2	103	10.5	145	5.5	2
N	315P	62	10.2	14	289.1	231	9.1	4
N	315R	96	24.4	71	38.3	135	0.4	2
G	316F	54	26.0	34	72.4	81	10.0	2
G	316K	77	28.8	131	8.9	143	8.6	2
K	317P	54	21.5	145	1.6	190	4.7	4
K	317T	99	10.9	49	4.8	118	4.0	2
E	318N	123	7.2	216	7.5	120	7.0	4
E	318P	120	10.8	75	27.1	79	17.0	4
E	318T	109	5.7	304	56.8	118	10.5	4
E	318V	116	3.4	114	21.2	95	11.5	4
K	326W	74	17.9	93	5.7	214	9.7	2
A	327T	4	13.4	54	19.5	7	206.2	2
L	328V	76	3.2	101	6.3	56	13.9	4
P	329Y	53	41.5	107	13.2	25	90.3	4
A	330K	134	9.3	108	51.4	43	23.9	6
A	330R	103	5.5	121	39.4	31	36.6	6
I	332A	100	6.1	96	27.6	130	5.0	4
I	332D	143	3.1	78	33.7	151	11.5	6
I	332E	168	10.6	86	22.2	143	9.8	18
I	332F	97	14.5	108	3.4	149	11.0	4
I	332G	74	19.8	94	1.4	121	11.5	2
I	332H	82	4.3	129	1.1	150	11.5	2
I	332K	12	114.5	146	7.0	67	15.5	2
I	332L	94	0.9	127	2.6	154	5.1	2
I	332M	98	2.2	128	16.1	178	6.6	2
I	332N	95	15.3	92	16.1	137	5.1	4
I	332Q	99	8.4	98	7.9	148	8.5	6
I	332R	12	135.5	114	7.2	88	30.0	2

10

20

30

40

【表 9 - 7】

位置及び WT* 変異体*		ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
I	332S	96	4.9	263	64.1	177	16.5	2
I	332T	112	7.5	100	5.3	124	4.5	4
I	332V	109	1.1	115	19.5	147	25.1	2
I	332W	81	16.8	123	3.7	150	9.7	2
I	332Y	93	13.1	93	12.3	152	5.3	2
A	339D	131	10.4	80	26.4	183	20.3	6
A	339E	100	0.4	75	4.2	91	0.1	2
A	339F	104	3.3	120	24.6	217	8.5	6
A	339G	107	3.7	67	6.5	118	0.3	2
A	339H	114	23.4	107	10.0	136	0.5	2
A	339I	136	14.6	80	30.6	205	22.8	6
A	339K	129	24.2	83	29.0	201	21.0	6
A	339L	97	8.7	83	9.8	104	8.7	2
A	339M	115	6.8	111	7.2	57	8.8	2
A	339N	110	6.3	146	3.5	240	17.5	4
A	339Q	128	15.8	102	19.8	138	11.0	6
A	339R	117	14.4	82	13.4	128	2.1	2
A	339S	124	13.0	95	23.6	170	22.5	6
A	339T	142	14.2	138	6.2	220	20.2	10
A	339W	92	13.4	156	11.4	243	10.6	6
A	339Y	97	17.0	92	19.8	265	21.9	10
G	341D	62	6.9	52	37.8	172	3.5	2
G	341E	73	6.9	50	18.1	161	3.8	2
G	341F	24	100.8	52	41.9	227	14.7	6
G	341H	54	9.3	65	63.7	245	16.0	6
G	341I	44	15.5	36	17.2	173	5.3	2
G	341K	77	3.9	67	18.9	161	2.6	2
G	341L	64	24.3	54	19.8	171	4.2	2
G	341M	55	39.8	79	9.7	232	11.1	6
G	341N	83	9.1	53	17.0	162	9.5	2
G	341P	35	47.2	127	9.9	228	16.2	6
G	341Q	59	18.7	72	1.0	166	7.7	2
G	341R	59	14.9	78	7.4	168	7.5	2
G	341S	65	26.6	55	12.2	224	9.2	6
G	341T	0	866.0	68	54.0	176	10.0	2
G	341V	65	171.0	69	15.0	213	9.6	4
G	341W	14	25.8	76	8.9	178	8.7	2
G	341Y	26	24.5	54	5.2	184	14.3	2
P	343A	75	18.6	110	37.7	143	5.9	2
P	343D	69	11.5	102	7.9	157	18.3	2
P	343E	65	34.9	345	6.4	157	17.6	2
P	343F	74	20.6	89	13.0	99	1058.4	4
P	343G	75	29.1	110	14.9	244	11.1	6
P	343H	78	33.8	191	1.2	159	3.1	2
P	343I	92	26.8	114	16.7	86	10.5	2
P	343K	74	37.7	232	2.6	185	9.1	2

10

20

30

40

【表 9 - 8】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn	pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
P	343L	63	17.2		125	3.8	127	5.6	2
P	343M	60	35.1		83	13.7	134	18.7	4
P	343N	67	8.9		105	19.9	196	18.2	2
P	343Q	72	0.5		442	14.0	178	3.0	2
P	343R	94	1.3		198	10.4	179	9.9	4
P	343S	84	7.5		101	14.3	207	11.9	6
P	343T	69	4.2		126	16.1	151	4.4	2
P	343V	70	1.9		77	5.3	107	12.0	2
P	343W	48	22.3		56	6.4	194	17.9	2
P	343Y	63	9.9		112	7.2	270	14.4	6
Y	373A	56	3.7		33	15.0	121	28.7	2
Y	373D	74	17.7		74	32.5	227	10.2	6
Y	373E	41	23.6		106	20.8	151	19.5	2
Y	373F	76	2.6		110	12.7	117	1.0	2
Y	373G	39	21.6		38	25.4	75	33.7	2
Y	373H	79	34.2		100	13.9	169	8.2	4
Y	373I	65	9.0		73	14.0	154	6.4	2
Y	373K	76	12.2		70	2.9	246	6.9	6
Y	373L	76	21.4		66	17.0	189	6.2	6
Y	373M	78	1.2		53	25.8	115	3.2	2
Y	373N	64	21.5		61	23.3	148	12.1	2
Y	373Q	63	11.0		55	24.7	158	17.7	2
Y	373R	81	20.5		107	24.1	221	4.0	6
Y	373S	52	3.7		74	1.9	72	24.8	2
Y	373T	70	3.0		82	16.6	151	5.7	2
Y	373V	73	2.1		69	14.3	115	1.1	2
Y	373W	77	23.3		75	18.5	237	20.8	6
S	375R	69	10.9		595	15.9	166	1.1	2
D	376A	111	18.2		155	26.7	180	5.2	2
D	376E	85	12.3		82	29.5	98	13.5	2
D	376F	84	7.3		116	12.6	119	8.6	2
D	376G	73	3.1		135	3.9	164	0.6	2
D	376H	74	16.1		81	18.6	118	5.6	2
D	376I	100	14.1		144	7.2	101	50.5	10
D	376L	88	16.7		78	3.0	142	3.2	2
D	376M	86	21.6		129	1.4	91	15.1	2
D	376N	93	14.5		94	24.2	173	14.9	4
D	376P	85	15.1		203	12.9	153	19.6	6
D	376Q	88	5.0		116	22.7	176	19.9	4
D	376R	95	6.0		103	12.3	166	4.6	2
D	376S	85	21.4		134	27.3	209	25.3	2
D	376T	102	20.0		160	11.2	224	10.1	6
D	376V	112	8.1		251	15.0	210	11.1	12
D	376W	53	22.0		1	1719.9	89	34.8	2
D	376Y	78	4.2		53	25.8	98	39.9	2
I	377G	107	2.4		76	28.8	92	7.6	2

10

20

30

40

【表 9 - 9】

位置及び WT* 変異体*		ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
I	377K	117	10.0	167	27.7	90	11.3	4
I	377P	99	11.3	98	32.4	245	6.5	4
A	378D	98	6.6	163	13.9	19	91.9	6
A	378N	101	7.1	180	3.0	90	30.7	2
V	379N	96	19.5	74	39.0	204	5.5	4
V	379Q	113	3.2	85	27.3	218	4.1	4
V	379S	80	18.4	86	13.4	137	1.4	2
V	379T	101	16.6	109	14.9	237	2.2	4
E	380A	106	3.2	152	28.8	139	4.2	2
E	380D	102	2.1	73	44.2	78	0.7	2
E	380N	111	7.7	142	19.0	139	7.3	2
E	380S	110	8.5	230	24.1	131	0.1	2
E	380T	100	1.2	172	11.0	115	4.8	2
E	382A	110	6.0	103	7.8	82	29.6	2
E	382D	95	0.8	73	25.7	80	34.2	2
E	382F	121	13.8	222	16.6	67	28.2	6
E	382H	89	17.9	135	2.8	84	20.4	2
E	382I	109	6.4	131	6.2	219	5.4	6
E	382K	96	2.6	153	30.2	92	15.6	4
E	382L	93	16.5	126	11.1	156	7.7	2
E	382M	89	14.6	135	8.6	126	20.3	2
E	382N	99	1.1	137	5.2	69	4.5	2
E	382P	85	16.8	122	22.0	69	14.6	2
E	382Q	105	12.2	162	12.0	140	19.3	2
E	382R	104	8.4	165	2.7	85	3.0	4
E	382S	85	2.9	151	10.0	75	4.1	2
E	382T	89	10.2	172	5.2	109	30.0	2
E	382V	83	32.5	173	6.2	167	0.4	2
E	382W	97	10.5	172	5.2	73	1.9	2
E	382Y	105	11.5	188	14.5	78	3.3	4
G	385E	108	5.5	98	18.8	0	1586.3	2
G	385P	100	3.2	101	23.2	82	15.8	2
Q	386K	96	9.5	115	4.8	266	1.6	4
F	423N	107	8.5	158	2.1	48	27.5	2
S	424H	116	29.8	97	7.3	58	9.3	2
S	424M	91	3.5	60	60.0	75	14.4	2
S	424V	103	9.3	57	35.4	115	10.5	4
S	426D	105	24.3	65	10.0	318	12.7	4
S	426L	91	35.3	117	14.3	193	20.4	4
V	427N	108	5.5	192	5.9	64	23.1	2
H	429A	44	81.7	61	11.4	147	1.9	2
H	429F	70	11.1	77	16.5	288	12.8	4
H	429M	103	0.7	83	12.2	173	3.2	2
E	430A	100	8.3	179	6.6	204	7.1	2
E	430D	96	8.2	44	25.5	190	4.6	4
E	430F	111	13.0	218	19.4	203	8.1	2

10

20

30

40

【表 9 - 1 0】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn	pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
E	430G	97	7.8		131	10.6	252	7.5	6
E	430H	91	7.7		192	8.0	227	4.2	6
E	430I	87	19.3		308	6.6	297	17.2	6
E	430K	66	9.5		131	12.6	203	16.0	4
E	430L	98	33.3		242	8.7	263	10.6	6
E	430M	102	16.1		195	8.7	227	4.6	6
E	430N	82	24.6		171	13.0	162	2.2	2
E	430P	103	13.1		86	16.7	254	23.5	8
E	430Q	79	8.3		320	12.8	97	4.9	8
E	430R	75	7.5		249	6.6	227	7.9	8
E	430S	88	30.1		183	3.4	221	18.5	2
E	430T	82	22.9		137	23.7	249	8.2	6
E	430V	79	35.6		281	7.0	276	17.5	6
E	430W	78	8.3		11	95.0	171	5.4	2
E	430Y	77	44.5		126	12.5	231	na	2
A	431H	81	44.0		151	11.5	236	na	2
A	431K	98	26.6		176	4.4	113	25.0	2
A	431P	62	12.0		29	13.8	210	8.0	2
L	432R	58	23.1		38	15.6	175	13.3	2
L	432S	58	55.4		70	3.6	124	0.2	2
N	434F	na	na		1008	1.4	na	na	4
N	434G	105	17.9		358	20.2	26	128.9	4
N	434H	90	12.9		855	20.4	57	9.1	6
N	434I	81	9.3		6	725.4	73	8.9	2
N	434W	108	6.6		1335	18.8	138	1.7	2
N	434Y	106	7.7		1615	38.8	291	15.5	4
Y	436I	119	18.0		194	24.2	35	8.7	2
Y	436L	112	27.2		172	8.1	90	16.3	4
Y	436T	90	35.0		115	7.2	48	20.3	2
Q	438G	93	32.1		98	14.4	68	26.2	2
Q	438K	99	31.7		169	12.3	116	43.0	2
Q	438L	94	32.5		200	14.7	190	5.5	4
Q	438T	96	37.4		126	9.5	56	26.8	2
Q	438W	93	32.5		164	8.2	126	1.7	2
K	439E	103	28.9		94	9.0	53	40.3	2
K	439H	91	37.3		99	0.9	77	17.8	2
K	439Q	90	38.2		74	0.9	64	26.5	2
S	440A	79	42.3		82	2.0	85	22.5	2
S	440D	82	18.4		72	4.7	99	9.4	2
S	440E	104	4.0		73	2.8	87	35.3	2
S	440F	111	16.1		87	8.2	73	18.5	2
S	440G	106	1.9		101	8.1	83	8.5	2
S	440H	108	2.1		110	2.1	96	18.3	2
S	440I	121	1.9		96	6.2	86	2.6	2
S	440K	116	16.7		132	7.8	71	26.4	4
S	440L	112	6.4		126	2.2	77	4.5	4

10

20

30

40

【表 9 - 1 1】

位置及び

WT*	変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
S	440M	84	51.0	80	8.2	81	20.6	2
S	440N	78	34.3	82	25.4	108	15.8	2
S	440Q	73	43.1	81	33.5	132	16.6	2
S	440R	91	11.3	88	16.2	85	29.8	2
S	440T	89	2.1	71	39.0	115	17.4	2
S	440V	85	11.3	98	18.7	110	16.4	2
S	440W	114	17.6	85	13.8	132	14.8	2
S	440Y	109	6.8	100	14.2	224	14.1	16
S	442K	80	51.9	138	4.5	100	11.1	2

10

Na = 該当なし又は未実施

* 例えば、L 2 3 5 Aは、Fcを示し、Fcアミノ酸番号235（EU番号付けによる）に存在するロイシンは、アラニン残基で置換される

試験：Fc領域はIgG1 Fcであり、抗体は抗CD20抗体である

【表 10 - 1】

表 10 変異体の組合せ - A D C C

変異体	ADCC 平均値 (野生型の割合%)	CV%	n=
野生型	100	2.42	2
247A,339D	71.50	0.50	2
247F,339D	134.95	2.54	2
247H,339D	118.45	8.46	4
247I,339D	187.21	20.45	2
247L,339D	156.73	3.30	2
247T,339D	126.46	4.71	2
247Y,339D	121.93	4.58	2
247A,339H	125.35	0.60	2
247F,339H	101.54	4.53	2
247H,339H	114.24	4.91	2
247I,339H	126.94	5.22	2
247L,339H	120.92	2.44	2
247T,339H	97.96	5.71	2
247Y,339H	74.75	2.43	2
247A,339I	96.95	3.05	2
247F,339I	116.53	5.52	2
247H,339I	108.27	2.97	2
247I,339I	-4.07	-47.26	2
247L,339I	109.76	5.95	2
247T,339I	5.48	9.51	2
247Y,339I	100.84	9.58	2
247A,339K	86.90	13.51	2
247F,339K	105.85	10.11	2
247H,339K	97.59	7.67	2
247I,339K	97.41	14.89	2

10

20

30

【表 10 - 2】

変異体	ADCC平均値 (野生型の割合%)	CV%	n=
247L,339K	104.36	7.07	2
247T,339K	83.02	6.07	2
247Y,339K	95.79	3.69	2
332E	180.96	0.72	2
247A,339N	83.60	9.91	2
247F,339N	100.36	8.95	2
247H,339N	86.70	7.62	2
247I,339N	119.62	13.07	2
247T,339N	114.38	4.83	4
247Y,339N	113.18	1.50	2
332E	187.19	9.53	2
247A,339Q	69.94	8.45	2
247F,339Q	130.42	2.35	2
247H,339Q	138.96	1.32	2
247I,339Q	146.44	2.27	2
247L,339Q	140.50	4.58	2
247T,339Q	119.70	4.03	2
247Y,339Q	109.40	2.24	2
247A,339R	68.57	8.33	2
247F,339R	114.38	11.85	2
247H,339R	105.46	9.89	2
247I,339R	124.96	16.31	2
247L,339R	119.77	12.03	2
247T,339R	109.42	12.17	2
247Y,339R	98.58	13.09	2
247L,339T	148.48	7.08	4

w t = 野生型

C V % =

n = 測定及び平均したサンプルの数

10

20

30

【表 1 1】

表 1 1 増大したADCCを有する変異体の組合せ

Fc変異体	ADCC EC50 (ng/ml)
野生型	6.8
247L	2.2
330K	3.1
332E	1.5
339T	3.8
247L, 330K	1.5
247L, 332E	0.73
247L, 339T	2.0
330K, 332E	0.73
330K, 339T	2.0
332E, 339T	1.0
247L, 332E, 339T	0.75
247L, 330K, 332E	0.25
247L, 330K, 339T	1.5
330K, 332E, 339T	0.25
247L, 330K, 332E, 339T	0.25

* ADCC活性は、滴定曲線から計算する

10

20

【表 1 2】

表 1 2 変異体の組合せ

変異	ADCC	CV%	FcRn6.0	CV%	CDC	CV%	n=
野生型	100		100		100		
247H339D	118	8.5	N/D	N/D	N/D	N/D	4
247L251F330R332E	184	13.3	50	5.9	43	1.3	2
247L251F376I	77	29.7	61	8.7	124	11.3	2
247L332E	168	7.3	78	4.9	65	6.2	6
247L332E376I	137	8.1	74	8.0	76	4.3	4
247T339N	114	4.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
251F332E	147	12.4	72	2.2	196	2.6	6
251F332E376I	136	15.9	68	5.0	160	10.9	4
251F376I	114	8.1	66	2.9	102	9.4	4
256P311I	107	0.2	268	1.2	357	10.0	2
256P314Y332E440Y	146	3.1	86	19.5	190	4.5	2
256P314Y440Y	112	22.6	79	3.0	226	9.4	2
256P332E	174	16.3	121	8.2	189	3.9	4
256P332E440Y	184	25.4	117	6.5	230	10.0	2
256P430Q	109	2.6	150	5.3	354	3.3	4
256P434H	105	1.2	342	3.1	299	2.9	2
256P440Y	169	19.7	122	0.7	247	26.6	2
257I311I	52	7.7	409	3.9	61	6.7	2
257I311I434H	48	12.2	553	4.9	75	8.8	6
257I430Q	26	8.1	304	0.6	55	12.9	4
257I434H	67	7.0	472	6.3	61	14.0	2
268D332E	137	12.4	92	13.7	128	4.1	4
268E332E	178	5.3	88	2.0	160	4.7	4
272R279L	56	0.2	156	1.2	72	5.1	2
279A288N	107	3.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N311T318V	110	9.0	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318N	110	5.4	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318T	116	5.1	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318V	118	8.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A311T318T	110	7.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
288N311T318T	115	9.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
311T318T	107	5.3	N/D	N/D	N/D	N/D	4
314Y332E440Y	156	5.4	82	0.9	155	0.0	2
314Y440Y	125	12.7	78	8.5	108	2.6	2
330K332D	179	2.9	88	8.3	43	0.3	2
330K332E	202	5.6	94	0.0	42	1.0	2
330R332D	152	6.3	88	6.3	44	1.5	2
330R332E	161	4.3	94	2.1	59	4.0	4
332E376I	132	8.6	102	7.6	193	5.2	6
332E376V	139	1.9	132	3.5	261	8.6	6
332E440Y	203	13.0	94	5.7	159	5.9	4
343R345D	121	16.0	143	1.6	291	3.3	2
376V430Q	92	1.5	212	4.2	256	12.2	4
376V430R	84	2.7	188	9.1	191	1.0	2
376V434H	97	3.3	382	3.3	95	6.1	4

10

20

30

40

【表 1 3】

表 1 3 変異体の組合せ

変異	FcRn6.0	CV %	n=
野生型	100		
258D272R	382.8	8.2	2
258D283R	411.1	3.7	2
258D286F	445.0	1.7	2
258D307E	237.1	4.8	2
258D311I	522.0	7.0	2
258D376V	415.1	4.3	2
272R283R	439.3	21.7	2
272R286F	338.4	8.9	2
272R311I	396.1	14.4	2
272R376V	368.7	8.1	2
279D307E	522.4	8.8	2
283R307E	400.2	9.1	2
283R311I	531.3	6.1	2
283R376V	474.8	1.1	2
286F307E	431.2	3.8	2
286F311I	412.3	0.0	2
286F376V	348.9	1.5	2
307E376V	480.1	4.3	2
311I376V	413.5	39.1	2

10

20

【0 2 5 5】

実施例 2 - 変異体の C D C 活性の評価

本実施例では、どのようにして種々の変異 F c 領域の C D C 活性を決定したかについて述べる。

【0 2 5 6】

本アッセイは、R a m o s (R A # 1) 細胞 (A T C C 社カタログ番号 C R L - 1 5 9 6) 上のヒト補体 (Q u i d e l C o r p . , カタログ番号 A 1 1 3) を用いて行う。 R a m o s 細胞を、 1 0 % F B S を含む G i b c o 社製 R P M I 1 6 4 0 培地中 3 7 ° C 、 5 % C O 2 中で培養した。アッセイの前日に、 T 1 7 5 フラスコ中に細胞を 1 × 1 0 6 個接種する。翌日、細胞を、 1 % F B S を含むフェノールレッド欠損 R P M I 1 6 4 0 中に、 3 . 5 7 × 1 0 5 個 / m l となるよう再懸濁する。 C o s t e r 社製 3 9 1 7 平底プレート中に、 7 0 μ l / ウェルずつ細胞を分注した。滴定曲線を得るために、変異 F c 領域を有する I g G を R P M I 1 6 4 0 培地中 3 倍連続希釈法により調製する。一点法ライブラリースクリーニングアッセイを行うために、一時的に培地の上澄み中で発現させた I g G 変異体を、 m o c k 培地で 1 μ g / m l に規格化する。 3 0 μ l の変異性 I g G (最終濃度 2 0 0 n g / m l) 及び、 R M P I 1 6 4 0 + 1 % F B S で 1 : 5 に希釈したヒト補体 (Q u i d e l C o r p . , カタログ番号 A 1 1 3) 5 0 μ l を、標的細胞に加え、穏やかにピペッティングすることにより混合する。プレートを、 5 % C O 2 の存在下 3 7 ° C で 1 . 5 時間インキュベートする。 1 5 μ l / ウェルのアラマブルー (S e r o t e c 社カタログ番号 B U F 0 1 2 B) を加えた後、インキュベーションを終夜継続する。次に、 P e r k i n E l m e r 社製 E n V i s i o n 2 1 0 0 多標識リーダーを用いて、励起波長 5 6 0 n m 、発光波長 5 9 0 n m において蛍光シグナルを測定する。

30

40

【0 2 5 7】

i i . データの解析

一点法によるアッセイは、全て 2 回行う。それぞれのアッセイプレートは、 I g G 非存在下でのヒト補体による標的細胞の自然溶解、及び 1 % T r i t o n - X 1 0 0 存在下での標的細胞の完全溶解のコントロール群を含む。 3 つの野生型コントロール群をそれぞれ

50

のアッセイプレートに含めておき、得られるC D Cシグナルを平均する。自然分解コントロール群から得られるバックグラウンド値を、それぞれのサンプルから差し引く。データを、蛍光シグナルから、自然溶解及び完全溶解コントロール群に対する特異的溶解の割合に変換する。特異的溶解の割合は、次の式により計算される。

(%特異的溶解) = (蛍光シグナルの測定値 - 自然分解シグナル) / (最大分解シグナル - 自然分解シグナル) × 100

3つの野生型コントロール群の平均値に対するFc変異体の活性の割合を計算する。野生型コントロール群の平均値に対する2つのアッセイプレートについての活性の割合を平均し、それぞれのアッセイプレート間の標準偏差を計算する。

【0258】

実施例3 - FcRnの結合の評価

本実施例では、Fc新生児レセプター (FcRn) への変異Fc領域を有するIgGの結合に対するアッセイについて述べる。

【0259】

丸底96ウェルELISAプレート (Costar) を、50 µl / ウェルの2 µg / ml ニュートラビジン (Pierce Biotechnology 社カタログ番号31000) 50 mM炭酸バッファー (pH 9.3) 溶液を用いて、4 °Cで終夜コートした。結合していないニュートラビジンを除去し、プレートをPBST (0.1% Tween 20を含むPBS) で3回洗浄する。ビオチン標識した可溶性FcRnの2.5 µg / ml PBS溶液を、50 µl / ウェルずつ加え、室温で1時間インキュベートする。その後、75 µlのカゼインブロッキングバッファー (Pierce Biotechnology 社カタログ番号37528) をプレートに1時間加える。ELISAプレートをPBSTで洗浄し、50 µl / ウェルの変異性IgGでインキュベートする。滴定曲線を得るために、テストされるIgGをFcRn結合バッファー (100 mM NaPO₄, 0.05% Tween-20、種々のpH (6.0~7.4)) 中で3倍連続希釈法により調製する。一点法スクリーニングを行うために、一時的に培地の上澄み中で発現させた変異性IgGを、最終濃度50 ng / mlに規格化し、pHを、FcRn結合バッファーを用いて6.0に調整する。以下のステップにおいて、同様のpHのFcRn結合バッファーを用いてプレートの洗浄及び試薬の希釈を行なう。結合反応を室温で1時間行う。3回洗浄後、結合したIgGを、ヤギ (Fab') 2抗ヒトFab-HRPコンジュゲートを用いて1時間で検出する。HRP活性は、Pierce社のHRP基質 (Turbo TM B-ELISA、カタログ番号34022) を用いて、5~30分で明らかにする。50 µlの2 M H₂SO₄を加えて反応を停止させ、450 nmにおける吸光度を、VMAXマイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社製) を用いて測定する。

【0260】

実施例4 - 抗CD20-I332E Fc変異体によるヒトの治療

インビトロでの研究及びマウス腫瘍モデル (Clynes RA他, Nat Med. 6:443 (2000)) より、ADCCが、RITUXAN等の抗CD20抗体の抗ガン効果において役割を果たす証拠を得る。ヒト患者を、抗CD20-I332E Fc変異体抗体、又はRITUXANを用いて、Cartoon他, Blood 99:754 (2002) に開示された方法と同様の方法により治療してもよい。例えば、Ann-Arborの分類でステージII~IVの疾患を発症しており、少なくとも1つの測定可能な病巣を有し、GELFの基準による全身腫瘍組織量の低い患者には、4回の総用量が約375 mg / m²の、抗CD20-Fc変異体又はRITUXANを、静脈内注射により投与 (1日、8日、15日、及び22日間) することができる。一次有効性エンドポイントは、客観的奏功率、即ち、国際専門化委員会により最近提案された基準による完全寛解 (CR)、未確認完全寛解 (CrU)、又は部分寛解 (PR) に至った患者の割合である。臨床反応は、2月目 (M2) に評価することができる。患者の経過について1年経過時 (M12) において評価してもよい。

10

20

30

40

50

【0261】

I 3 3 2 E 変異体によりもたらされる増大された A D C C を定量できるように、効果 M 2 及び M 1 2 における、R I T U X A N 又は抗 C D 2 0 - F c 変異体で治療される患者の客観的奏功率を比較してもよい。同様の実施例を、他の抗 C D 2 0 変異体（例えば、表 1 ～ 1 0 に示した組み合わせ）について繰り返すこともできる。

【0262】

更に、変異体の向上した能力により、他の投与経路、注射の回数の減少、及び／又は少量の投与が可能になる。上記の明細書において言及される全ての出版物、及び、特許に記載された本発明の方法及びシステムの種々の改変及び変形は、当業者にとって、本発明の範囲及び精神から逸脱することのない明白なものであろう。本発明について特に好ましい実施形態と関連づけて記載したが、特許請求の範囲に記載の発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきものではない。実際、記載された本発明の実施形式に対する、化学、及び分子生物学又は関連する分野の当業者にとって明白な改変は、特許請求の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0263】

【図 1】種々の領域及び区分を表示した I g G 分子の略図を示す図である。

【図 2】ヒト I g G 1（非 a 型及びアロタイプを示す配列番号 1）、ヒト I g G 2（配列番号 2）、ヒト I g G 3（配列番号 3）、ヒト I g G 4（配列番号 4）、マウス I g G 1（配列番号 5）、マウス I g G 2 A（配列番号 6）、マウス I g G 2 B（配列番号 7）、マウス I g G 3（配列番号 8）を含む、母体 F c アミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図 3】ヒト I g G 1 の C H 2 領域（配列番号 9）、及び C H 3 領域（配列番号 1 0）、同じく f アロタイプ（配列番号 1 1）、及び a、z アロタイプ（配列番号 1 2）の配列を含む、C H 1、ヒンジ、C H 2、及び C H 3 領域を含むヒト I g G 1 の種々のアミノ酸配列を示す図である。

【図 4】（a）抗 C D 2 0 抗体の軽鎖可変領域（L C V R）（i）（配列番号 1 3）；（b）抗 C D 2 0 抗体の重鎖可変領域（H C V R）（i）（配列番号 1 4）；（c）抗 C D 2 0 抗体の L C V R（i i）（配列番号 1 5）；（d）抗 C D 2 0 抗体の H C V R（i i）（配列番号 1 6）内に含まれる様々なアミノ酸配列；（e）抗 C D 2 0 抗体の可変領域内に含まれるアミノ酸配列を示す（2 0 0 3 年 5 月 2 0 日に出願された米国特許仮出願第 6 0 / 4 7 1, 9 5 8 号明細書、及び、米国特許第 5, 8 4 3, 4 3 9 号明細書を参照。これらは本願明細書に組み込まれる）図である。

【図 5】（a）抗 C D 2 0 抗体 A M E 1 3 3 に関する全長軽鎖アミノ酸配列；（b）A M E 1 3 3 に関する全長軽鎖核酸配列を示す図である。

【図 6】抗 C D 2 0 抗体 A M E 1 3 3 の 3 つの好ましい変異体の全長重鎖のアミノ酸配列及び核酸配列を示す図である。具体的には、（a）2 4 7 I / 3 3 9 Q 変異体の全長重鎖のアミノ酸配列；（b）2 4 7 I / 3 3 9 Q 変異体の全長重鎖の核酸配列；（c）2 4 7 I / 3 3 9 D 変異体の全長重鎖のアミノ酸配列；（d）2 4 7 I / 3 3 9 D 変異体の全長重鎖の核酸配列；（e）3 7 8 D 変異体の全長重鎖のアミノ酸配列；（f）3 7 8 D 変異体の全長重鎖の核酸配列を示す図である。

10

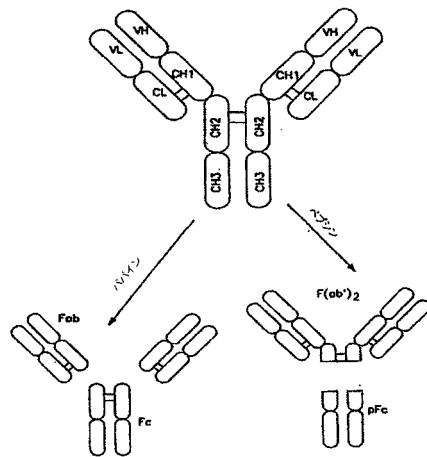
20

30

40

【図 2】

FIG. 2

[illegible]

【図 4】

FIG. 4

A. (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASSVP YIHWYQKPG QAPRLLIYAT
SALASGIPDR FSGSGSGTDF TLTISRLEPE DFAVYYCQOW LSNPTF

B. (SEQ ID NO: 14)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI`SCKGSGRTFT SYNMHWVRQM PGKGLEWMGA
IYPLTGDTSY NQKSKLQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARST
YVGGDNQFDV W

C. 抗CD20 LCVR (II) (SEQ ID NO: 15)

QIVLSQSPAI LSASPGKVT MTCRASSSVS YIHWFQQKPG SSPKPIYAT
SNLASGVFVR FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQW TSNPPTF

D. 抗CD20 HCVR (II) (SEQ ID NO: 16)

E. 抗CD20 (I)
 LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 17): RASSSVPIYIH
 LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 18): ATSSALAS
 LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 19): QQWLSNPPT

 HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 20): GRTPTSYNNMH
 HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 21): AIYPLGTDTSYNOKSKL
 HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 22): STYVGGDWQFDV

抗CD20 (II)

```
LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 23): RASSSVSYIH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 24): ATSNLAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 25): QQWTSNPPT
```

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 26): GYTFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 27): AIYPGNGDTSYNQKFKG
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 28): STYYGGDWYFNV

【図 5】

FIG. 5

A. SEQ ID NO:29: AME133に関する全長軽鎖アミノ酸配列

EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRSSSVFYIHVYQKQGAPRLLIYATLASGIPDR
FSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYQQWLSNPPTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIPPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDTSTLSLSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 下線部は定常領域を示す。

B. SEQ ID NO:30: AME133に関する全長軽鎖核酸配列

GAAATTGTGTTGACGCAGCTCTCCAGGCACCCGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCTCGCAGGGCCAGCTCAAGTGTACCGTACATCCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGC
CAGGCTCCCGAGGCTCCTCATCTATCCACATCCGCTCTGGCTTCTGGCATCCAGACAGG
TTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
GATTTTGCAGTGTATTACTGTAGCAGTGGCTGAGTAACCCACCCACTTTTGGCCAGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAAAACGAACTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAACTCGGTTAACTCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG
ACAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGCAAGTCACCATCAGGCGCTG
AGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTATG

【図 6 - 2】

FIG. 6

C. SEQ ID NO:33: AME133(2471/339D)変異体の全長重鎖の
アミノ酸配列

EVQLVQSGAEVKKPESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKLEWMAIYPLTGDTSY
NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTITVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKIDKTLTISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKQKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 下線部は定常領域；太文字は変異体を示す。

D. SEQ ID NO:34: AME133(2471/339D)変異体の全長重鎖の
核酸配列

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTCTCGGCCGTACATTTACCAAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGCTATTATTACCTTGCAGGGTGATACCTTCCTAC
AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTACCATCTCAGCGGACAAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACACCGTCCACCGTCTCC
TCAGCTTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACAGCGCGGTGCACACTTCCCGCTGTCTCTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGTTGAG
CCCAAAATCTTGAGCAAAACTCACACATGCCACCGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAATCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
CTTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGAGCAGTAC
AACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGGCTCTCACCGTCTCCGACCCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCCGAGCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGACAAAGGGCAGCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCTGCCCGCCATCCCGGGAC
GAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGGAGAACAACTACAAGACCAACCGCTCC
GTGCTGAGCTCCGACGGCTCTTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- 太文字と下線部は変異体を示す。

【図 6 - 1】

FIG. 6

A. SEQ ID NO:31: AME133(2471/339G)変異体の全長重鎖の
アミノ酸配列

EVQLVQSGAEVKKPESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKLEWMAIYPLTGDTSY
NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTITVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKIDKTLTISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKQKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 下線部は定常領域；太文字は変異体を示す。

B. SEQ ID NO:32: AME133(2471/339G)変異体の全長重鎖の
核酸配列

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTCTCGGCCGTACATTTACCAAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGCTATTATTACCTTGCAGGGTGATACCTTCTCTAC
AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTACCATCTCAGCGGACAAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACACCGTCCACCGTCTCC
TCAGCTTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACAGCGCGGTGCACACTTCCCGCTGTCTCTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGGTTGAG
CCCAAAATCTTGAGCAAAACTCACACATGCCACCGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAATCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
CTTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGAGCAGTAC
AACAGCAGCTACCGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
AAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCCGAGCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGACAAAGGGCAGCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCTGCGCCCATCCCGGGAC
GAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGGAGAACAACTACAAGACCAACCGCTCC
GTGCTGAGCTCCGACGGCTCTTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- 太文字と下線部は変異体を示す。

【図 6 - 3】

FIG. 6

E. SEQ ID NO:35: AME133(378D)変異体の全長重鎖のアミノ酸配列

EVQLVQSGAEVKKPESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKLEWMAIYPLTGDTSY
NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTITVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKIDKTLTISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKQKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 下線部は定常領域；太文字は変異体を示す。

F. SEQ ID NO:36: AME133(378D)変異体の全長重鎖の核酸配列

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTCTCGGCCGTACATTTACCAAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGCTATTATTACCTTGCAGGGTGATACCTTCTCTAC
AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTACCATCTCAGCGGACAAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACACCGTCCACCGTCTCC
TCAGCTTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCTCCAAAGACCACTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACAGCGCGGTGCACACTTCCCGCTGTCTCTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGGTTGAG
CCCAAAATCTTGAGCAAAACTCACACATGCCACCGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAATCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
CTTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGAGCAGTAC
AACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGGCTCTCACCGTCTCCGACCCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCCGAGCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGACAAAGGGCAGCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCTGCCCGCCATCCCGGGAC
GAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGGAGAACAACTACAAGACCAACCGCTCC
GTGCTGAGCTCCGACGGCTCTTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- 太文字と下線部は変異体を示す。

【配列表】

2012136541000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/609,101

(32)優先日 平成16年9月10日(2004.9.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/638,442

(32)優先日 平成16年12月23日(2004.12.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/643,718

(32)優先日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(74)代理人 100162695

弁理士 釜平 双美

(72)発明者 バレット・アラン

アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エンシニタス、サン・ディエゴ・ドライブ542番

(72)発明者 ウェイドン・ジャン

アメリカ合衆国94086カリフォルニア州サニーベイル、ナンバー3、アカラネス・ドライブ234番

(72)発明者 タン・イン

アメリカ合衆国92129カリフォルニア州サンディエゴ、パーク・ビレッジ・ロード7179番

(72)発明者 ジェフリー・ディーン・ワトキンス

アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エンシニタス、フォーチュナ・ランチ・ロード3442番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA54 CA02 GA25

4B064 AG27 BJ12 CA19 DA05

4C085 AA14 CC02 DD62 DD88 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06

GG08 GG10

4H045 AA11 CA42 DA76 EA29 FA74

【外国語明細書】

【0001】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

1

VARIANT Fc REGIONS**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to polypeptides comprising a novel, variant Fc region. Specifically, a novel, variant Fc region of the present invention comprises at least one amino acid substitution described herein that confers an altered effector function or altered serum half-life upon an immunoglobulin comprising the variant Fc region as compared to the parent immunoglobulin lacking that amino acid substitution. Furthermore, the invention provides a method for altering an effector function of a monoclonal antibody or extending the serum half-life of a polypeptide to which a variant Fc region of the invention is operably attached. Therapeutic uses of polypeptides, proteins, particularly monoclonal antibodies, comprising a variant Fc region of the invention are disclosed.

BACKGROUND OF THE INVENTION

There are at least seventeen monoclonal antibodies currently approved in the United States for use as human therapeutics. Additionally, there are several hundred monoclonal antibodies in clinical trials and thousands in pre-clinical testing for treatment of various diseases or disorders including, e.g., transplant rejection, cancer, inflammatory diseases, sepsis, nephritis, Alzheimer's disease, allergies, diabetes, autoimmune diseases, arthritis, multiple sclerosis, and infectious diseases. The field of therapeutic monoclonal antibodies is positioned for rapid growth in the coming years. After vaccines, antibodies (or immunoglobulins, "Ig") constitute the second most common type of biopharmaceutical agent being tested clinically (Stockwin, L.H. et al. *Biochemical Society Transactions*, 31:433-436, 2003).

Genetic engineering has contributed substantially to growth of the field of therapeutic monoclonal antibodies. The effectiveness of a potential therapeutic monoclonal antibody will often vary with modest changes to the protein sequence of the antibody. A single amino acid change in the variable region of a monoclonal antibody has the potential to alter the affinity with which the antibody binds the antigenic epitope, as well as antibody properties such as K_{on} rate or K_{off} rate. Such amino acid changes may

【0002】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

2

determine the success or failure of a monoclonal antibody as a therapeutic. Similarly, modest changes in the amino acid sequence of the Fc region of a monoclonal antibody may yield profound changes in the antibody's effector function properties or the half-life of a protein to which the Fc region is operably linked.

5 The Fc region of an antibody (i.e., the carboxy-terminal ends of the heavy chains of an antibody spanning domains CH2, CH3 and a portion of the hinge region (*see* Fig. 1)), is limited in variability and is involved in effecting the physiological roles played by the antibody. The effector functions attributable to the Fc region of an antibody vary with the class and subclass of antibody and include (i) binding of the antibody via the Fc
10 region to a specific Fc receptor ("FcR") on a cell which triggers various biological responses including, e.g., phagocytosis and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, release of inflammatory mediators, placental transfer of the antibody and control of immunoglobulin production, (ii) complement-dependent cytotoxicity ("CDC") in which the Fc region binds the C1q component of complement
15 and thereby initiates the classical pathway of complement activation which leads to lysis of the target, (iii) antibody dependent cell-mediated cytotoxicity ("ADCC") in which certain human immune system cells, e.g., phagocytes and NK cells, via an Fcγ receptor, bind to the Fc region of an antibody via specific antibody-binding receptors on the immune cells and subsequently signal destruction of the entity to which the antibody is
20 bound, and, (iv) binding to mast cells, basophils, and eosinophils. The affinity with which an Fc region can bind a particular FcR (e.g., FcRn), or the level with which an Fc region can mediate CDC or ADCC activity are important factors for determining the efficacy and half-life of therapeutic proteins, particularly monoclonal antibodies.

Particularized modification of amino acids in the Fc region of human IgG is an
25 active area of study yielding structure-function relationship information relevant to development of therapeutic proteins, particularly monoclonal antibodies (*see*, e.g., U.S. Patent 6,165,745 and PCT Publication No. WO2004/035752 regarding alteration of serum half-life of a polypeptide operably linked to an Fc region and U.S. Patent 6,737,056 and PCT Publication No. WO2004/029207 regarding alteration of an effector
30 function of a monoclonal antibody comprising a modified Fc region).

The development of novel therapeutic proteins, particularly monoclonal antibodies, would benefit from the ability to rationally design an Fc region with particular

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

3

amino acid modifications that confer a desired beneficial property upon the antibody of interest. All monoclonal antibodies would not be expected to be improved as a therapeutic due to the same particular amino acid modification in the Fc region. A therapeutic monoclonal antibody that binds one target antigen may benefit from an increase in a particular effector function while a different therapeutic monoclonal antibody that binds a different target antigen may benefit from an increase in a different effector function, or even a decrease. One therapeutic monoclonal antibody may benefit from the ability to bind a particular Fc receptor with greater affinity while another antibody may be improved as a therapeutic by binding that Fc receptor at a lower affinity and therefore being cleared from the body at a faster rate. Furthermore, a particular Fc region amino acid modification or substitution and resulting effect that would benefit a therapeutic antibody may depend upon the antigenic target to which the antibody binds and/or the disease or disorder to be ameliorated by the antibody.

Methods and compositions that alter particular effector functions associated with the Fc region of an antibody are necessary to improve the properties of existing therapeutic antibodies as well as to generate novel therapeutic antibodies with desired properties. Monoclonal antibodies with variant Fc regions may be used to treat various diseases or disorders including, e.g., inflammatory disorders, cancer, autoimmune disorders, cell-signalling disorders and infectious diseases. Additionally, methods and compositions that alter the serum half-life of a therapeutic protein, either increasing the half-life and thereby allowing for fewer doses or decreasing the half-life and thereby allowing for more rapid clearance from the body, would benefit the generation of therapeutic antibodies as well as other therapeutic proteins.

What is needed in order to improve the efficacy of a therapeutic protein, particularly a monoclonal antibody, are variant Fc regions with improved properties.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides variant Fc regions, i.e., Fc regions comprising an amino acid substitution described herein (e.g., *see* Table 1), that confer beneficial properties upon polypeptides comprising said variant Fc regions.

Fc positions of a parent Fc region at which any amino acid substitution may be made to generate a variant Fc region of the invention include positions 279, 341, 343 and

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

4

373 of the Fc region; wherein the numbering of the residues, i.e., their position number, in the Fc region is that of the EU index as in Kabat (*see* Fig. 2 herein). The present invention provides variant Fc regions comprising an amino acid substitution at position 279, 341, 343 or 373 of a parent Fc region, or any combination thereof. The parent Fc region may optionally have non-native amino acid residues at positions other than 279, 341, 343 and 373. The native amino acid residues at these positions for human IgG are valine (279), glycine (341), proline (343) and tyrosine (373).

In preferred embodiments throughout the present invention, the amino acid residue substituted for that present in the parent Fc region is a naturally occurring amino acid residue. Unless otherwise stated, the parent Fc region may be a native or non-native Fc region, preferably of human origin or substantially of human origin. The amino acid sequence of the parent Fc region is preferably that as shown in SEQ ID NOs: 1, 2, 3 or 4. Preferably the parent Fc region has a native amino acid residue present at the position which is to be substituted to generate a variant Fc region of the invention. Furthermore, throughout, it is understood that a variant Fc region is a parent Fc region modified to comprise at least one amino acid substitution as described herein. Additionally, it is understood that a parent Fc region may be a full-length Fc or a portion thereof comprising the amino acid residue to be substituted to generate the variant Fc region.

The present invention further provides polypeptides, preferably monoclonal antibodies, comprising a variant Fc region (or a functional fragment thereof) comprising at least one amino acid substitution at position 279, 341, 343 or 373 as compared to the parent Fc region. The variant Fc region comprising at least one amino acid substitution at Fc position 279, 341, 343 or 373 may further comprise at least one additional amino acid substitution in the Fc region as compared to the amino acid residue present in the native Fc region of the same type as the variant Fc region.

In one embodiment, a variant Fc region (i.e., a variant of a parent Fc region) comprises at least 1, 2, 3 or more amino acid substitutions selected from the following: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

5

256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S,
 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D,
 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W,
 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W,
 5 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 293S, 293V, 301W,
 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T,
 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F,
 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D,
 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T,
 10 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M,
 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H,
 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E,
 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V,
 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S,
 15 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S,
 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L,
 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M,
 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R,
 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G,
 20 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V or 442K.

In a preferred embodiment, a variant Fc region comprises at least 1, 2, 3 or more
 amino acid substitutions selected from the following: 235G, 236F, 236R, 236Y, 237K,
 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247A, 247D,
 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W,
 25 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H,
 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N,
 256H, 256I, 256K, 256L, 256W, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L,
 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272R,
 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283H,
 30 283K, 283M, 283R, 283W, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292G, 292I, 301W, 304E,
 307E, 307M, 312P, 315F, 315L, 315P, 316F, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332L,
 332M, 332R, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

6

339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q,
 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q,
 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M,
 373Q, 373R, 373S, 373T, 373W, 375R, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T,
 5 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378D, 378N, 379N, 379Q, 379T, 380N, 380S,
 380T, 382D, 382F, 382I, 382K, 382L, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y,
 385E, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A,
 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S,
 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438K, 438L, 438T, 438W,
 10 439E, 440D, 440I or 440L.

The variant Fc regions of the present invention are preferably characterized using one of more of the experimental methods described herein. Such variant Fc regions confer an altered effector function or altered serum half-life upon a monoclonal antibody that comprises the variant Fc region or an altered serum half-life upon a polypeptide to
 15 which the variant Fc region is operably attached.

Preferably the parent Fc region of a variant Fc region of the invention is a native or germline-encoded Fc region of human origin selected from the group consisting of IgG, IgA, IgE, IgM and IgD or a polymorphic variant thereof, or a functional fragment thereof. Preferably the parent Fc region is an IgG Fc region, and more preferably, an
 20 IgG1, IgG3, or IgG4 Fc region. The parent Fc region may optionally comprise one or more additional amino acid substitution(s) as compared to the native Fc region, other than those described herein (i.e., those substitutions listed in Table 1), particularly one or more amino acid substitutions known in the art or as described in U.S. Patents 6,165,745 or 6,737,056; or PCT Publication Nos. WO2004/035752 or WO2004/029207 (all of which
 25 are incorporated herein in their entirety); such amino acid substitution(s), if present in the parent Fc region, would then also be present in the variant Fc region of the invention and in a polypeptide comprising a variant Fc region of the invention, unless it was at a position subsequently substituted to generate the variant Fc region.

The invention provides a polypeptide, preferably a monoclonal antibody,
 30 comprising a variant Fc region of the invention, or a functional fragment thereof. In a preferred embodiment, a monoclonal antibody comprising a variant Fc region of the invention is a chimeric antibody. In a more preferred embodiment, a monoclonal

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

7

antibody comprising a variant Fc region of the invention is a humanized antibody or a human antibody in which framework sequence and constant region sequence present in the antibody is substantially of human origin. The chimeric, humanized or human antibody is preferably a full-length antibody or a single chain antibody. When a

5 monoclonal antibody comprising a variant Fc region of the invention is to be used as a human therapeutic, the Fc region is preferably substantially of human origin.

Preferably a polypeptide comprising, or operably attached to, a variant Fc region of the invention (i.e., "variant polypeptide") has at least one amino acid substitution in the variant Fc region as compared to the parent Fc region, and displays an altered effector

10 function or altered serum half-life as compared to that of the polypeptide comprising the parent Fc region of said variant Fc region, wherein the "at least one amino acid substitution in the variant Fc region" is (i) any amino acid substitution at position 279, 341, 343 or 373 of the Fc region or (ii) at least one of the following amino acid

15 substitutions in the Fc region: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S,

20 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R,

25 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D,

30 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S,

【 0 0 0 8 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

8

379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V or 442K, or (iii) at least two amino acid substitutions as listed in (i) or (ii) above, or (iv) at least 1, 2 or 3 amino acid substitutions as listed in (i) or (ii) above in addition to at least one Fc region amino acid substitution not listed in (i) or (ii) above. Preferably the altered effector function is an increase in ADCC, a decrease in ADCC, an increase in CDC, a decrease in CDC, an increase in C1q binding affinity, a decrease in C1q binding affinity, an increase in FcR (preferably FcRn) binding affinity or a decrease in FcR (preferably FcRn) binding affinity as compared to said polypeptide lacking the amino acid substitution in the Fc region (i.e., parent Fc region).

The invention provides a monoclonal antibody comprising a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 254F, 254M, 254Y, 256A, 258D, 279A, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I or 440L, [preferably 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I or 440L], wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays enhanced ADCC as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

The invention provides a monoclonal antibody comprising a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, 254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

9

270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 5 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 430H, 10 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V or 442K, [preferably 235R, 236F, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 250K, 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272N, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332K, 15 332R, 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376A, 376W, 432R or 432S], wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays diminished ADCC activity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

The invention provides a monoclonal antibody comprising a variant Fc region 20 comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 25 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 30 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K, [preferably 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S,

【 0 0 1 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

10

262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 5 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L or 438W] wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays enhanced FcRn binding affinity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

The invention provides a monoclonal antibody comprising a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 10 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 15 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 20 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F or 440M, [preferably 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 25 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P or 432S], wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays diminished FcRn binding affinity as 30 compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

The invention provides a monoclonal antibody comprising a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 236Y,

【 0 0 1 1 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

11

- 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332L, 332M, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q or 440Y, [preferably 236Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P, 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D, 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 434Y, 438L or 440Y] wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays enhanced CDC activity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

The invention provides a monoclonal antibody comprising a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235G,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

12

235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V,
 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I,
 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S,
 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T,
 5 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V,
 329Y, 330K, 330R, 332E, 332M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P,
 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M or 427N [preferably 235G,
 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V,
 238W, 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T, 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G,
 10 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 301W, 311S,
 327T, 329Y, 330K, 378D, 385E, 423N or 424H] wherein the monoclonal antibody
 comprising the variant Fc region displays diminished CDC activity as compared to the
 monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

The invention further embodies a monoclonal antibody comprising a variant Fc
 15 region of the invention, wherein said antibody specifically binds a human target antigen.
 Preferably the target antigen is selected from the group consisting of CD3, CD20, CD25,
 TNF α , Her2/neu, CD33, CD52, EGFR, EpCAM, MUC1, GD3, CEA, CA125, HLA-DR,
 TGF β , VEGF, GDF8, GDF11, ghrelin, or any precursor or functional fragment thereof.

The invention provides a variant polypeptide comprising a variant Fc region
 20 comprising at least one of the following amino acid substitution in the Fc region: 238L,
 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S,
 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S,
 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P,
 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M,
 25 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F,
 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H,
 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K,
 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q,
 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I,
 30 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F,
 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K,
 [preferably 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

13

262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L or 438W], wherein the variant polypeptide displays enhanced serum half-life as compared to the parent polypeptide (i.e., a polypeptide identical to the variant polypeptide but lacking the amino acid substitution listed hereinabove).

10 The invention provides a variant polypeptide comprising a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitution in the Fc region: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 15 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 20 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440D, 440E, 440F or 440M [preferably 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 25 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P or 432S], wherein the variant polypeptide 30 displays diminished serum half-life as compared to the parent polypeptide (i.e., a polypeptide identical to the variant polypeptide but lacking the amino acid substitution listed hereinabove).

【 0 0 1 4 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

14

In one embodiment the invention provides a method for increasing the ADCC activity of a monoclonal antibody, preferably a therapeutic monoclonal antibody (or functional fragment thereof), comprising engineering a nucleic acid comprising a nucleic acid encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid

5 substitutions: 247A, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 251F, 254F, 254M, 254Y, 256A, 256M, 258D, 268D, 268E, 279A, 280A, 280K, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 330K, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A,

10 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I or 440L [preferably 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I or 440L]. The nucleic acid molecule encoding the variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid

15 molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above either while the nucleic acid molecule is operably attached to additional antibody-encoding nucleic acid, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the remainder of the Ig heavy chain), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region (i.e., after

20 introduction of at least one amino acid substitution listed above) to additional antibody-encoding nucleic acid. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring ADCC activity of the

25 monoclonal antibody comprising the variant Fc region and of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a monoclonal antibody comprising a variant Fc region with ADCC activity greater than that of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region (i.e., enhanced, preferably by at least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%,

30 18%, 20% or more). The invention further embodies a monoclonal antibody, or functional fragment thereof, comprising a variant Fc region produced by the method.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

15

In one embodiment the invention provides a method for decreasing the ADCC activity of a monoclonal antibody, preferably a therapeutic monoclonal antibody (or functional fragment thereof), comprising engineering a nucleic acid comprising a nucleic acid encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid

5 substitutions: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, S254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, S267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N,

10 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283T, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A,

15 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 429A, 429F, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V or 442K [preferably 235R, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 249P, 250K,

20 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 329Y, 332K, 332R, 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376W, 429A, 432R or 432S]. The

25 nucleic acid molecule encoding the variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above either while the nucleic acid molecule is operably attached to additional antibody-encoding nucleic acid, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the remainder of the Ig heavy chain), or the method may further

30 comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region (i.e., after introduction of at least one amino acid substitution listed above) to additional antibody-encoding nucleic acid. The method may further comprise expression and

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

16

purification of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring ADCC activity of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region and of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a monoclonal antibody comprising a variant Fc region with ADCC activity less than that of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region (i.e., diminished, preferably by at least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a monoclonal antibody, or functional fragment thereof, comprising a variant Fc region produced by the method.

In one embodiment the invention provides a method for increasing the FcRn binding affinity of a monoclonal antibody, preferably a therapeutic monoclonal antibody (or functional fragment thereof), comprising engineering a nucleic acid comprising a nucleic acid encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K [preferably 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307A, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L or

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

17

- 438W]. The nucleic acid molecule encoding the variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above either while the nucleic acid molecule is operably attached to additional antibody-encoding nucleic acid, (e.g., the
- 5 nucleic acid sequence encoding the remainder of the Ig heavy chain), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region (i.e., after introduction of at least one amino acid substitution listed above) to additional antibody-encoding nucleic acid. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region. The
- 10 method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring FcRn binding affinity of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region and of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a monoclonal
- 15 antibody comprising a variant Fc region with FcRn binding affinity greater than the FcRn binding affinity of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region (i.e., enhanced, preferably by at least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a monoclonal antibody, or functional fragment thereof, comprising a variant Fc region produced by the method.
- 20 In one embodiment the invention provides a method for increasing the in vivo serum half-life of a polypeptide, preferably a therapeutic polypeptide, comprising engineering a nucleic acid comprising a nucleic acid encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K,
- 25 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K,
- 30 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K,

【 0 0 1 8 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

18

430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K, [preferably 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307A, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L or 438W]. The nucleic acid molecule encoding the variant Fc region may be operably linked to a nucleic acid molecule encoding a therapeutic protein. The nucleic acid molecule encoding a variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above while the nucleic acid molecule is operably attached to additional polypeptide-encoding nucleic acid, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the non-Fc region of the fusion protein), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region after introduction of the at least one amino acid substitution listed above to nucleic acid encoding a non-Fc fusion partner. The method may further comprise expression and purification of the polypeptide comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the polypeptide comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring in vivo serum half-life of the polypeptide comprising the variant Fc region and of the polypeptide comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a polypeptide comprising a variant Fc region wherein the polypeptide has increased in vivo serum half life as compared to that of the polypeptide comprising the parent Fc region (i.e., enhanced, preferably by at least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a polypeptide (i.e., a fusion polypeptide) comprising a variant Fc region produced by the method.

In one embodiment the invention provides a method for decreasing the FcRn binding affinity of a monoclonal antibody, preferably a therapeutic monoclonal antibody

【 0 0 1 9 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

19

- (or functional fragment thereof), comprising engineering a nucleic acid encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions:
- 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 434I, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F or 440M [preferably 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248R, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P or 432S]. The nucleic acid molecule encoding a variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above while the nucleic acid encoding the variant Fc region is operably attached to nucleic acid encoding additional antibody sequence, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the remainder of the Ig heavy chain), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region after introduction of the at least one amino acid substitution listed above to additional antibody-encoding nucleic acid. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring FcRn binding affinity of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region and of the

【 0 0 2 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

20

monoclonal antibody comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a monoclonal antibody comprising a variant Fc region with FcRn binding affinity less than that of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region (i.e., diminished, preferably by at least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a monoclonal antibody (comprising a variant Fc region) produced by the method.

In another embodiment the invention provides a method for decreasing the in vivo serum half-life of a polypeptide, preferably a therapeutic polypeptide, comprising engineering a nucleic acid encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 434I, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F or 440M [preferably 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248Q, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P or 432S]. The nucleic acid encoding the Fc variant region may be operably linked to nucleic acid encoding a therapeutic protein. The nucleic acid molecule encoding a variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above while the nucleic acid molecule is operably attached to additional polypeptide-

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

21

encoding nucleic acid, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the non-Fc region of the fusion protein), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region after introduction of the at least one amino acid substitution listed above to nucleic acid encoding a non-Fc fusion partner. The

5 method may further comprise expression and purification of the polypeptide comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the polypeptide comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring in vivo serum half-life of the polypeptide comprising the variant Fc region and

10 of the polypeptide comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a polypeptide comprising a variant Fc region wherein the polypeptide has decreased in vivo serum half life as compared to that of the polypeptide comprising the parent Fc region (i.e., diminished, preferably by at least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a polypeptide (i.e., a fusion polypeptide) comprising a variant

15 Fc region produced by the method.

In another embodiment the invention provides a method for increasing the CDC activity of a monoclonal antibody, preferably a therapeutic monoclonal antibody, comprising constructing the Fc region of the antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q,

20 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 250K, 250R, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T,

25 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332H, 332L, 332M, 332N, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A,

30 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

22

376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q or 440Y [preferably 236Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 250K, 250R, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P, 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373H, 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D, 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 434Y, 438L or 440Y]. The nucleic acid molecule encoding a variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above while the nucleic acid molecule is operably attached to additional antibody-encoding nucleic acid, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the remainder of the Ig heavy chain), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region after introduction of the at least one amino acid substitution listed above to additional antibody-encoding nucleic acid. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring CDC activity of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region and of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region by any method available in the art or as described herein. The method may further comprise selecting a monoclonal antibody comprising a variant Fc region with CDC activity greater than that of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region (i.e., enhanced, preferably by at

【 0 0 2 3 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

23

least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a monoclonal antibody comprising a variant Fc region produced by the method.

- In another embodiment the invention provides a method for decreasing the CDC response of a monoclonal antibody, preferably a therapeutic monoclonal antibody,
- 5 comprising constructing the Fc region of the antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K,
- 10 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332K, 339E, 339M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M or 427N [preferably 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T,
- 15 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 301W, 311S, 327T, 329Y, 330K, 330R, 378D, 385E, 423N or 424H]. The nucleic acid molecule encoding a variant Fc region may be engineered (e.g., from a nucleic acid molecule encoding a parent Fc region or a native Fc region) to comprise at least one amino acid substitution as listed above while the nucleic
- 20 acid molecule is operably attached to additional antibody-encoding nucleic acid, (e.g., the nucleic acid sequence encoding the remainder of the Ig heavy chain), or the method may further comprise subsequently operably attaching the nucleic acid encoding the variant Fc region after introduction of the at least one amino acid substitution listed above to additional antibody-encoding nucleic acid. The method may further comprise expression
- 25 and purification of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region. The method may further comprise expression and purification of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region. The method may further comprise measuring CDC activity of the monoclonal antibody comprising the variant Fc region and of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region by any method available in the art
- 30 or as described herein. The method may further comprise selecting a monoclonal antibody comprising a variant Fc region with CDC activity less than that of the monoclonal antibody comprising the parent Fc region (i.e., diminished, preferably by at

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

24

least 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% or more). The invention further embodies a monoclonal antibody comprising a variant Fc region produced by the method.

In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule that comprises a nucleic acid molecule that encodes a variant Fc region of the invention
5 or a functional fragment thereof. More preferably the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleic acid that encodes a polypeptide comprising a variant Fc region of the invention. Preferably the variant Fc region polypeptide encoded by said nucleic acid has an amino acid substitution as shown in Table 1 as compared to the parent Fc region of the variant. Preferably, the polypeptide is a monoclonal antibody, and even more preferably,
10 the monoclonal antibody is a full length antibody or a single-chain antibody. The monoclonal antibody may be a chimeric, humanized, or human monoclonal antibody.

In another embodiment, the invention provides a vector, preferably (but not limited to) a plasmid, a recombinant expression vector, a yeast expression vector, or a retroviral expression vector comprising a polynucleotide encoding a polypeptide
15 comprising a variant Fc region polypeptide of the invention.

In another embodiment, the invention provides a host cell comprising a nucleic acid molecule of the present invention. Preferably a host cell of the invention comprises one or more vectors or constructs comprising a nucleic acid molecule of the present invention. The host cell of the invention is a cell into which a vector of the invention has
20 been introduced (*e.g.*, via transformation, transduction, infection, transfection, electroporation and the like), said vector comprising a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a variant Fc region polypeptide of the invention. Optionally, the vector may be stably incorporated into the host cell chromosome. The host cell types include mammalian, bacterial, plant and yeast cells. Preferably the host cell is a CHO
25 cell, a COS cell, a SP2/0 cell, a NS0 cell, a yeast cell or a derivative or progeny of any preferred cell type.

In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a polypeptide comprising a variant Fc region of the invention, or functional fragment thereof. Preferably the polypeptide is a monoclonal antibody, even more
30 preferably, a therapeutic monoclonal antibody. The monoclonal antibody may be a chimeric, humanized, or human monoclonal antibody. Alternatively, the polypeptide may be a polypeptide other than an antibody which benefits from an altered serum half life

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

25

conferred upon the polypeptide by being operably linked to, and coexpressed with, a variant Fc region of the invention. The pharmaceutical composition of the invention may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier. In said pharmaceutical composition, the polypeptide comprising the variant Fc region is the active ingredient.

5 Preferably the pharmaceutical composition comprises a homogeneous or substantially homogeneous population of monoclonal antibody comprising a variant Fc region of the invention. The pharmaceutical composition for therapeutic use is preferably sterile and may be lyophilized.

The invention provides a method of inhibiting activity of a protein in a mammal, preferably a human, in need thereof comprising administering a therapeutically effective amount, or prophylactically effective amount, of a polypeptide (preferably a monoclonal antibody) comprising a variant Fc region of the invention to said mammal. Preferably, the polypeptide comprising the variant Fc region is a binding partner of the protein to be inhibited. The invention further provides a method of treating or preventing a disease or

10 disorder ameliorated by the inhibition of signal transduction resulting from the binding of a monoclonal antibody comprising a variant Fc region of the invention to its antigenic epitope that comprises administering to a patient (e.g., a human) in need of such treatment or prevention a therapeutically or prophylactically effective amount of a monoclonal antibody of the invention.

20 The invention embodies an article of manufacture comprising a packaging material and a polypeptide comprising a variant Fc region polypeptide of the invention contained within said packaging material. The invention further embodies compositions comprising monoclonal antibodies and heterologous polypeptides that comprise a variant Fc region described herein, and a physiologically or pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

In some embodiments, the present invention provides a polypeptide comprising:

i) an unmodified human framework region ("FR") (e.g., no alterations have been made to a naturally occurring human framework), and ii) a variant Fc region. In certain

embodiments, the unmodified human framework is a human germline framework. In

30 other embodiments, the present invention provides compositions comprising a polypeptide, wherein the polypeptide comprises: i) at least one randomized CDR sequence and ii) a variant Fc region of the invention. In further embodiments, the present

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

26

invention provides compositions comprising a polypeptide, wherein the polypeptide comprises: i) an unmodified human framework (e.g., human germline framework), ii) at least one randomized CDR sequence, and iii) a variant Fc region of the invention.

The present invention contemplates therapeutic and diagnostic uses for
 5 monoclonal antibodies heterologous polypeptides that comprise a variant Fc region of the invention, disclosed herein.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows a schematic representation of an IgG molecule with the various
 10 regions and sections labeled.

Figure 2 shows an alignment of various parental Fc amino acid sequences, including human IgG1 ((SEQ ID NO:1) with non-a and a allotypes shown), human IgG2 (SEQ ID NO:2), human IgG3 (SEQ ID NO:3), human IgG4 (SEQ ID NO:4), murine IgG1 (SEQ ID NO:5), murine IgG2A (SEQ ID NO:6), murine IgG2B (SEQ ID NO:7),
 15 and murine IgG3 (SEQ ID NO:8).

Figure 3 shows various amino acid sequences, including the CH2 region (SEQ ID NO:9), and CH3 region (SEQ ID NO: 10) of human IgG1, as well as an f allotype (SEQ ID NO: 11) and a, z allotype (SEQ ID NO:12) sequences of human IgG1 that include the CH1, hinge, CH2 and CH3 regions.

Figure 4 shows various amino acid sequences comprised within: (a) the Light Chain Variable Region (LCVR) of anti-CD20 antibody (I) (SEQ ID NO: 13); (b) Heavy Chain Variable Region (HCVR) of anti-CD20 antibody (I) (SEQ ID NO: 14); (c) LCVR of anti-CD20 antibody (II) (SEQ ID NO: 15); and HCVR of anti-CD20 antibody (II) (SEQ ID NO: 16). Fig. 4e shows amino acid sequences comprised within the variable
 25 region of an anti-CD20 antibody. (see U.S. provisional application 60/471,958, filed May 20, 2003 and U.S. Patent 5,843,439, both incorporated herein).

Figure 5a shows the complete light chain amino acid sequence for the anti-CD20 antibody AME 133. Figure 5b shows the complete light chain nucleic acid sequence for AME 133.

Figure 6 shows amino acid and nucleic acid sequences for the complete heavy chain of three preferred variants of the anti-CD20 antibody AME 133. Specifically, Figure 6a shows the amino acid sequence of the complete heavy chain of the 247I/339Q

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

27

variant. Figure 6b shows the nucleic acid sequence of the complete heavy chain of the 247I/339Q variant. Figure 6c shows the amino acid sequence of the complete heavy chain of the 247I/339D variant. Figure 6d shows the nucleic acid sequence of the complete heavy chain of the 247I/339D variant. Figure 6e shows the amino acid sequence of the complete heavy chain of the 378D variant. Figure 6f shows the nucleic acid sequence of the complete heavy chain of the 378D variant.

DETAILED DESCRIPTION

Throughout the present specification and claims, the numbering of the amino acid residues in an immunoglobulin heavy chain (Fc region) is that of the EU index as in Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). The "EU index as in Kabat" refers to the residue numbering of the human IgG antibody and is reflected herein in Fig. 2. For example, at position 438, human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and murine IgG3 all have a Q amino acid, while murine IgG1 has an I amino acid, murine IgG2a has a T amino acid, and murine IgG2B has a K amino acid. Furthermore, substitutions are named herein by the amino acid position number at which the substitution occurs followed by the amino acid substituted for that present in the parent Fc region at the same position (e.g., 249G indicates a glycine residue substituted for that present at position 249 of the parent Fc region). The number refers to the position in human IgG1 regardless of whether or not the parent Fc region is human IgG1; if the parent Fc region is not human IgG1, the number refers to the homologous position in the parent Fc region if it were aligned with human IgG1 at that position.

As used herein, the terms "subject" and "patient" refer to any animal in which a polypeptide comprising a variant Fc region of the invention may be used therapeutically including a human as well as other mammals (such as e.g., domestic animals (e.g., canine, feline), sports animals (e.g., equine) and food-source animals (e.g., bovine, porcine and ovine)) who may benefit from such therapy.

As used herein, "treating or preventing" refers to a disease or disorder associated with abnormal levels of a protein or benefited by altering an activity or level of a protein.

The term "isolated" when used in relation to a nucleic acid is a nucleic acid that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid with which it is

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

28

ordinarily associated in its natural source. Isolated nucleic acid is in a form or setting different from that in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in natural cells. An isolated nucleic acid molecule includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the polypeptide encoded therein where, for example, the nucleic acid molecule is in a plasmid or a chromosomal location different from that of natural cells. The isolated nucleic acid may be present in single-stranded or double-stranded form. When an isolated nucleic acid molecule is to be utilized to express a protein, the oligonucleotide or polynucleotide will contain at a minimum the sense or coding strand, but may contain both the sense and anti-sense strands (i.e., may be double-stranded).

A nucleic acid molecule is "operably linked" or "operably attached" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid molecule. For example, a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence of nucleic acid if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence of nucleic acid if it is positioned so as to facilitate translation. A nucleic acid molecule encoding a variant Fc region is operably linked to a nucleic acid molecule encoding a heterologous protein (i.e., a protein or functional fragment thereof which does not, as it exists in nature, comprise an Fc region) if it is positioned such that the expressed fusion protein comprises the heterologous protein or functional fragment thereof adjoined either upstream or downstream to the variant Fc region polypeptide; the heterologous protein may be immediately adjacent to the variant Fc region polypeptide or may be separated therefrom by a linker sequence of any length and composition. Likewise, a polypeptide (used synonymously herein with "protein") molecule is "operably linked" or "operably attached" when it is placed into a functional relationship with another polypeptide.

As used herein the term "functional fragment" when in reference to a polypeptide or protein (e.g., a variant Fc region, or a monoclonal antibody) refers to fragments of that protein which retain at least one function of the full-length polypeptide. The fragments may range in size from six amino acids to the entire amino acid sequence of the full-length polypeptide minus one amino acid. A functional fragment of a variant Fc region polypeptide of the present invention retains at least one "amino acid substitution" as herein defined. A functional fragment of a variant Fc region polypeptide retains at least

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

29

one function known in the art to be associated with the Fc region (e.g., ADCC, CDC, Fc receptor binding, C1q binding, down regulation of cell surface receptors or may, e.g., increase the *in vivo* or *in vitro* half-life of a polypeptide to which it is operably attached).

The term “purified” or “purify” refers to the substantial removal of at least one
5 contaminant from a sample. For example, an antigen-specific antibody may be purified by complete or substantial removal (at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, or more preferably at least 96%, 97%, 98% or 99%) of at least one contaminating non-immunoglobulin protein; it may also be purified by the removal of immunoglobulin
10 protein that does not bind to the same antigen. The removal of non-immunoglobulin proteins and/or the removal of immunoglobulins that do not bind a particular antigen results in an increase in the percent of antigen-specific immunoglobulins in the sample. In another example, a polypeptide (e.g., an immunoglobulin) expressed in bacterial host cells is purified by the complete or substantial removal of host cell proteins; the percent of the polypeptide is thereby increased in the sample.

15 The term “native” as it refers to a polypeptide (e.g., Fc region) is used herein to indicate that the polypeptide has an amino acid sequence consisting of the amino acid sequence of the polypeptide as it commonly occurs in nature or a naturally occurring polymorphism thereof. A native polypeptide (e.g., native Fc region) may be produced by recombinant means or may be isolated from a naturally occurring source.

20 The term “expression vector” as used herein refers to a recombinant DNA molecule containing a desired coding sequence and appropriate nucleic acid sequences necessary for the expression of the operably linked coding sequence in a particular host organism.

As used herein, the term “host cell” refers to any eukaryotic or prokaryotic cell
25 (e.g., bacterial cells such as *E. coli*, CHO cells, yeast cells, mammalian cells, avian cells, amphibian cells, plant cells, fish cells, and insect cells), whether located *in vitro* or *in situ*, or *in vivo*. For example, host cells may be located in a transgenic animal.

As used herein a “parent polypeptide” is a polypeptide comprising an amino acid sequence that may be changed or altered (e.g., an amino acid substitution) to produce a
30 variant (i.e., variant polypeptide). In preferred embodiments, the parent polypeptide comprises at least a portion of a native or non-native Fc region, i.e., a naturally occurring Fc region or an Fc region with at least one amino acid sequence modification. In some

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

30

embodiments, variants that are shorter or longer than the parent polypeptide are specifically contemplated. In particularly preferred embodiments, the parent polypeptide differs in function (e.g., enhanced or diminished effector function, receptor binding, *in vivo* or *in vitro* half-life, etc.) as compared to the variant.

5 As used herein, the term "variant of a parent polypeptide" refers to a polypeptide comprising an amino acid sequence that differs from that of the parent polypeptide by at least one amino acid substitution. In certain embodiments, the variant comprises at least 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% or 90% or most preferably at least 95%, 97% or 99% of an Fc region (i.e., a "portion" of the Fc region). In preferred
10 embodiments, a variant Fc region of a parent polypeptide comprises at least one amino acid substitution from the parent polypeptide, the substitution being in the Fc region. The parent polypeptide may or may not be a native polypeptide.

As used herein, the term "Fc region" refers to a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain (e.g., as shown in Fig. 1). The "Fc region" may be a native
15 sequence Fc region or a variant Fc region. Although the generally accepted boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. In some embodiments, variants comprise only portions of the Fc region and can include or not include the carboxy-terminus. The
20 Fc region of an immunoglobulin generally comprises two constant domains, CH2 and CH3, as shown, e.g., in Fig. 1. In some embodiments, variants having one or more of the constant domains are contemplated. In other embodiments, variants without such constant domains (or with only portions of such constant domains) are contemplated.

The "CH2 domain" of a human IgG Fc region (also referred to as "Cy2" domain)
25 usually extends from about amino acid 231 to about amino acid 340 (see Fig. 2). The CH2 domain is unique in that it is not closely paired with another domain. Two N-linked branched carbohydrate chains are interposed between the two CH2 domains of an intact native IgG molecule.

The "CH3 domain" of a human IgG Fc region (also referred to as "Cy3" domain)
30 generally is the stretch of residues C-terminal to a CH2 domain in an Fc region extending from about amino acid residue 341 to about amino acid residue 447 (see Fig. 2).

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

31

A "functional Fc region" possesses an "effector function" of a native sequence Fc region. At least one effector function of a polypeptide comprising a variant Fc region of the present invention may be enhanced or diminished with respect to a polypeptide comprising a native Fc region or the parent Fc region of the variant. Examples of effector functions include, but are not limited to: Clq binding; complement dependent cytotoxicity (CDC); Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g., B cell receptor; BCR), etc. Such effector functions may require the Fc region to be operably linked to a binding domain (e.g., an antibody variable domain) and can be assessed using various assays (e.g., Fc binding assay, ADCC assays, CDC assays, target cell depletion from whole or fractionated blood samples, etc.).

A "native sequence Fc region" or "wild type Fc region" refers to an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of an Fc region commonly found in nature. Exemplary native sequence human Fc regions are shown in Figure 2 and include a native sequence human IgG 1 Fc region. (f and a,z allotypes, i.e., non-A and A allotypes); native sequence human IgG2 Fc region; native sequence human IgG3 Fc region; and native sequence human IgG4 Fc region as well as naturally occurring variants thereof. Native sequence murine Fc regions are also shown in Figure 2.

A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence that differs from that of a native sequence Fc region (or fragment thereof) by virtue of at least one "amino acid substitution" as defined herein. In preferred embodiments, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc region or in the Fc region of a parent polypeptide, preferably 1, 2, 3, 4 or 5 amino acid substitutions in a native sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. In an alternative embodiment, a variant Fc region may be generated according to the methods herein disclosed and this variant Fc region can be fused to a heterologous polypeptide of choice, such as an antibody variable domain or a non-antibody polypeptide, e.g., binding domain of a receptor or ligand.

As used herein, the term "derivative" in the context of polypeptides refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence which has been altered by introduction of an amino acid residue substitution. The term "derivative" as used herein also refers to a polypeptide which has been modified by the covalent attachment of any

【 0 0 3 2 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

32

type of molecule to the polypeptide. For example, but not by way of limitation, an antibody may be modified, e.g., by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. A derivative polypeptide may be produced by chemical modifications using techniques known to those of skill in the art, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, metabolic synthesis of tunicamycin, etc. Further, a derivative polypeptide possesses a similar or identical function as the polypeptide from which it was derived. It is understood that a polypeptide comprising a variant Fc region of the present invention may be a derivative as defined herein, preferably the derivatization occurs within the Fc region.

“Substantially of human origin” as used herein in reference to a polypeptide (e.g., an Fc region or a monoclonal antibody), indicates the polypeptide has an amino acid sequence at least 80%, at least 85%, more preferably at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94% or even more preferably at least 95%, 95%, 97%, 98% or 99% homologous to that of a native human amino polypeptide.

The terms “Fc receptor” or “FcR” are used to describe a receptor that binds to an Fc region (e.g., the Fc region of an antibody). The preferred FcR is a native sequence FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an “activating receptor”) and FcγRIIB (an “inhibiting receptor”), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel, et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Another preferred FcR includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term “FcR” herein.

The phrase “antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” and “ADCC” refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells (e.g., nonspecific) that express FcRs (e.g., Natural Killer (“NK”) cells, neutrophils, and macrophages) recognize

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

33

bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cells. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII.

- As used herein, the phrase “effector cells” refers to leukocytes (preferably human) which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and perform ADCC effector function. Examples of leukocytes which mediate ADCC include PBMC, NK cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils. The effector cells may be isolated from a native source (e.g., from blood or PBMCs).
- A variant polypeptide with “altered” FcRn binding affinity is one which has either enhanced (i.e., increased, greater or higher) or diminished (i.e., reduced, decreased or lesser) FcRn binding affinity compared to the variant’s parent polypeptide or to a polypeptide comprising a native Fc region when measured at pH 6.0. A variant polypeptide which displays increased binding or increased binding affinity to an FcRn binds FcRn with greater affinity than the parent polypeptide. A variant polypeptide which displays decreased binding or decreased binding affinity to an FcRn, binds FcRn with lower affinity than its parent polypeptide. Such variants which display decreased binding to an FcRn may possess little or no appreciable binding to an FcRn, e.g., 0-20% binding to the FcRn compared to a parent polypeptide. A variant polypeptide which binds an FcRn with “enhanced affinity” as compared to its parent polypeptide, is one which binds FcRn with higher binding affinity than the parent polypeptide, when the amounts of variant polypeptide and parent polypeptide in a binding assay are essentially the same, and all other conditions are identical. For example, a variant polypeptide with enhanced FcRn binding affinity may display from about 1.10 fold to about 100 fold (more typically from about 1.2 fold to about 50 fold) increase in FcRn binding affinity compared to the parent polypeptide, where FcRn binding affinity is determined, for example, in an ELISA assay or other method available to one of ordinary skill in the art.

- As used herein, an “amino acid substitution” refers to the replacement of at least one existing amino acid residue in a given amino acid sequence with another different “replacement” amino acid residue. The replacement residue or residues may be “naturally occurring amino acid residues” (i.e., encoded by the genetic code) and selected from: alanine (Ala); arginine (Arg); asparagine (Asn); aspartic acid (Asp); cysteine (Cys);

【 0 0 3 4 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

34

glutamine (Gln); glutamic acid (Glu); glycine (Gly); histidine (His); isoleucine (Ile); leucine (Leu); lysine (Lys); methionine (Met); phenylalanine (Phe); proline (Pro); serine (Ser); threonine (Thr); tryptophan (Trp); tyrosine (Tyr); and valine (Val). Substitution with one or more non-naturally occurring amino acid residues is also encompassed by the definition of an amino acid substitution herein. A “non-naturally occurring amino acid residue” refers to a residue, other than those naturally occurring amino acid residues listed above, which is able to covalently bind adjacent amino acid residues (s) in a polypeptide chain. Examples of non-naturally occurring amino acid residues include norleucine, omithine, norvaline, homoserine and other amino acid residue analogues such as those described in Ellman et al. Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991).

The term “assay signal” refers to the output from any method of detecting protein-protein interactions, including but not limited to, absorbance measurements from colorimetric assays, fluorescent intensity, or disintegrations per minute. Assay formats could include ELISA, facs, or other methods. A change in the “assay signal” may reflect a change in cell viability and/or a change in the kinetic off-rate, the kinetic on-rate, or both. A “higher assay signal” refers to the measured output number being larger than another number (e.g., a variant may have a higher (larger) measured number in an ELISA assay as compared to the parent polypeptide). A “lower” assay signal refers to the measured output number being smaller than another number (e.g., a variant may have a lower (smaller) measured number in an ELISA assay as compared to the parent polypeptide).

The term “binding affinity” refers to the equilibrium dissociation constant (expressed in units of concentration) associated with each Fc receptor-Fc binding interaction. The binding affinity is directly related to the ratio of the kinetic off-rate (generally reported in units of inverse time, e.g., seconds⁻¹) divided by the kinetic on-rate (generally reported in units of concentration per unit time, e.g., molar /second). In general it is not possible to unequivocally state whether changes in equilibrium dissociation constants are due to differences in on-rates, off-rates or both unless each of these parameters are experimentally determined (e.g., by BIACORE or SAPIDYNE measurements).

As used herein, the term “hinge region” refers to the stretch of amino acids in human IgG1 stretching from Glu216 to Pro230 of human IgG1. Hinge regions of other

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

35

IgG isotypes may be aligned with the IgG1 sequence by placing the first and last cysteine residues forming inter-heavy chain S-S bonds in the same positions.

“Clq” is a polypeptide that includes a binding site for the Fc region of an immunoglobulin. Clq together with two serine proteases,Clr and Cls, forms the complex
5 Cl, the first component of the CDC pathway.

As used herein, the term “antibody” is used interchangeably with “immunoglobulin” or “Ig,” is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), and antibody fragments
10 so long as they exhibit the desired biological activity or functional activity. Single chain antibodies, and chimeric, human, humanized or primatized (CDR-grafted) antibodies, as well as chimeric or CDR-grafted single chain antibodies, and the like, comprising portions derived from different species, are also encompassed by the present invention and the term “antibody”. The various portions of these antibodies can be joined
15 together chemically by conventional techniques, synthetically, or can be prepared as a contiguous protein using genetic engineering techniques. For example, nucleic acids encoding a chimeric or humanized chain can be expressed to produce a contiguous protein. *See*, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567; European Patent No. 0,125,023 B1; U.S. Patent No. 4,816,397; European Patent No. 0,120,694 B1; WO 86/01533; European
20 Patent No. 0,194,276 B1; U.S. Patent No. 5,225, 539; European Patent No. 0,239,400 B1 and U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,698,762. *See also*, Newman, R. *et al.* *BioTechnology*, 10:1455-1460, 1993, regarding primatized antibody, and Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 4,946,778 and Bird, R.E. *et al.*, *Science*, 242:423-426, 1988, regarding single chain antibodies. It is understood that all forms of the antibodies comprising an Fc
25 region (or portion thereof) are encompassed herein within the term “antibody.” Furthermore, the antibody may be labeled with a detectable label, immobilized on a solid phase and/or conjugated with a heterologous compound (e.g., an enzyme or toxin) according to methods known in the art.

As used herein, the term “antibody fragments” refers to a portion of an intact
30 antibody. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, linear antibodies; single-chain antibody molecules; Fc or Fc' peptides, Fab and Fab fragments, and multispecific antibodies formed from antibody fragments. The antibody fragments

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

36

preferably retain at least part of the hinge and optionally the CH1 region of an IgG heavy chain. In other preferred embodiments, the antibody fragments comprise at least a portion of the CH2 region or the entire CH2 region.

As used herein, the term "functional fragment", when used in reference to a
5 monoclonal antibody, is intended to refer to a portion of the monoclonal antibody that still retains a functional activity. A functional activity can be, for example, antigen binding activity or specificity, receptor binding activity or specificity, effector function activity and the like. Monoclonal antibody functional fragments include, for example,
10 individual heavy or light chains and fragments thereof, such as VL, VH and Fd; monovalent fragments, such as Fv, Fab, and Fab'; bivalent fragments such as F(ab')₂; single chain Fv (scFv); and Fc fragments. Such terms are described in, for example, Harlowe and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R.A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., *Cell*
15 *Biophysics*, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) and in Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990). The term functional fragment is intended to include, for example, fragments produced by protease digestion or reduction of a monoclonal antibody and by recombinant DNA methods known to those skilled in the art.

20 As used herein, the term "fragment" refers to a polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 5, 15, 20, 25, 40, 50, 70, 90, 100 or more contiguous amino acid residues of the amino acid sequence of another polypeptide. In a preferred embodiment, a fragment of a polypeptide retains at least one function of the full-length polypeptide.

As used herein, the term "chimeric antibody" includes monovalent, divalent or
25 polyvalent immunoglobulins. A monovalent chimeric antibody is a dimer formed by a chimeric heavy chain associated through disulfide bridges with a chimeric light chain. A divalent chimeric antibody is a tetramer formed by two heavy chain-light chain dimers associated through at least one disulfide bridge. A chimeric heavy chain of an antibody for use in humans comprises an antigen-binding region derived from the heavy chain of a
30 non-human antibody, which is linked to at least a portion of a human heavy chain constant region, such as CH1 or CH2. A chimeric light chain of an antibody for use in humans comprises an antigen binding region derived from the light chain of a non-human

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

37

antibody, linked to at least a portion of a human light chain constant region (CL).

Antibodies, fragments or derivatives having chimeric heavy chains and light chains of the same or different variable region binding specificity, can also be prepared by appropriate association of the individual polypeptide chains, according to known method steps. With this approach, hosts expressing chimeric heavy chains are separately cultured from hosts expressing chimeric light chains, and the immunoglobulin chains are separately recovered and then associated. Alternatively, the hosts can be co-cultured and the chains allowed to associate spontaneously in the culture medium, followed by recovery of the assembled immunoglobulin or fragment or both the heavy and light chains can be expressed in the same host cell. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art (*see, e.g.,* U.S. Patent Nos.: 6,284,471; 5,807,715; 4,816,567; and 4,816,397).

As used herein, "humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies (i.e., humanized antibodies) are antibodies that contain minimal sequence, or no sequence, derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are generally made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops (CDRs) correspond to those of a nonhuman immunoglobulin and all or substantially all of the FR residues are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody may also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. An exemplary method used to generate humanized antibodies is described in U.S. Pat. 5,225,539.

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding domain of a heterologous "adhesin" protein (e.g., a receptor, ligand or enzyme) with an immunoglobulin constant domain. Structurally,

【 0 0 3 8 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

38

immunoadhesins comprise a fusion of the adhesin amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site (antigen combining site) of an antibody (i.e., is "heterologous") with an immunoglobulin constant domain sequence.

- 5 As used herein, the term "ligand binding domain" refers to any native receptor or any region or derivative thereof retaining at least a qualitative ligand binding ability of a corresponding native receptor. In certain embodiments, the receptor is from a cell-surface polypeptide having an extracellular domain that is homologous to a member of the immunoglobulin supergenefamily. Other receptors, which are not members of the
- 10 immunoglobulin supergenefamily but are nonetheless specifically covered by this definition, are receptors for cytokines, and in particular receptors with tyrosine kinase activity (receptor tyrosine kinases), members of the hematopoietin and nerve growth factor receptor superfamilies, and cell adhesion molecules (e.g., E-, L-, and P-selectins).

- As used herein, the term "receptor binding domain" refers to any native ligand for
- 15 a receptor, including, e.g., cell adhesion molecules, or any region or derivative of such native ligand retaining at least a qualitative receptor binding ability of a corresponding native ligand.

- As used herein, the term "antibody-immunoadhesin chimera" comprises a molecule that combines at least one binding domain of an antibody with at least one
- 20 immunoadhesin. Examples include, but are not limited to, the bispecific CD4-IgG chimeras described in Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) and Charnow et al., J. Immunol., 153:4268 (1994).

- As used herein, an "isolated" polypeptide is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant
- 25 components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In certain embodiments, the isolated polypeptide is purified (1) to greater than 95% by weight of polypeptides as determined by the Lowry method, and preferably, more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient
- 30 to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-page under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or silver stain. Isolated polypeptide

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

39

includes the polypeptide in situ within recombinant cells since at least one component of the polypeptide's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by a least one purification step.

As used herein, the term "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those subjects or patients in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented.

As used herein, the term "disorder" and "disease" are used interchangeably to refer to any condition that would benefit from treatment with a variant polypeptide (a polypeptide comprising a variant Fc region of the invention), including chronic and acute disorders or diseases (e.g., pathological conditions that predispose a patient to a particular disorder). In certain embodiments, the disorder is cancer. In certain embodiments, the term "autoimmune disease" is used interchangeably with the term "autoimmune disorder" to refer to a condition in a subject characterized by cellular, tissue and/or organ injury caused by an immunologic reaction of the subject to its own cells, tissues and/or organs. The term "inflammatory disease" is used interchangeably with the term "inflammatory disorder" to refer to a condition in a subject characterized by inflammation. Autoimmune disorders may or may not be associated with inflammation. Moreover, inflammation may or may not be caused by autoimmune disorder. Certain disorders may be characterized as both autoimmune and inflammatory disorders.

As used herein, the terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer. As used herein, the term "label" refers to a detectable compound or composition that is conjugated directly or indirectly to a polypeptide. The

【 0 0 4 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

40

label may itself be detectable (e.g., radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

As used herein, the term "receptor" refers to a polypeptide capable of binding at least one ligand. The preferred receptor is a cell-surface or soluble receptor having an extracellular ligand-binding domain and, optionally, other domains (e.g., transmembrane domain, intracellular domain and/or membrane anchor). A receptor to be evaluated in an assay described herein may be an intact receptor or a fragment or derivative thereof (e.g. a fusion protein comprising the binding domain of the receptor fused to one or more heterologous polypeptides). Moreover, the receptor to be evaluated for its binding properties may be present in a cell or isolated and optionally coated on an assay plate or some other solid phase or labeled directly and used as a probe.

As used herein, the term "antibody responsive disease" refers to any disease or medical condition that is shown to be treatable, at least in part, with antibody therapy. Examples of such diseases and medical conditions include, but are not limited to, lymphoma (shown to be treatable with RITUXAN), infectious disease (respiratory syncytia virus shown to be treatable with SYNAGIS), kidney transplant (ZENAPAX has shown to be helpful), Crohn's disease and rheumatoid arthritis (shown to be treatable with REMICADE), breast carcinoma (shown to be treatable with HERCEPTIN), and colon cancer (shown to be treatable with EDRECOLOMAB). As used herein, the term "immunoadhesin responsive disease" refers to any disease or medical condition that is shown to be treatable, at least in part, with immunoadhesin therapy.

As used herein a variant polypeptide that "mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in the presence of human effector cells more effectively" than a parent antibody is one which in vitro or in vivo is substantially more effective at mediating ADCC, when the amounts of variant polypeptide and parent antibody used in the assay are essentially the same. For example, such a variant causes a higher amount of target cell lysis in a given ADCC assay than the parent polypeptide in an identical ADCC assay. Such variants may be identified, for example, using an ADCC assay, but other assays or methods for determining ADCC activity may also be employed (e.g., animal models). In preferred embodiments, the variant polypeptide is from about 1.2, 1.3 or 1.4

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

41

fold, 1.5 fold, 50 fold, 100 fold, about 500 fold, or about 1000 fold more effective at mediating ADCC than the parent polypeptide.

The term "symptoms of an antibody or immunoadhesin responsive disease" refers to those symptoms generally associated with a particular disease. For example, the symptoms normally associated with Crohn's disease include: abdominal pain, diarrhea, rectal bleeding, weight loss, fever, loss of appetite, dehydration, anemia, distention, fibrosis, inflamed intestines and malnutrition. The phrase "under conditions such that the symptoms are reduced" refers to any degree of qualitative or quantitative reduction in detectable symptoms of any antibody or immunoadhesin responsive disease, including but not limited to, a detectable impact on the rate of recovery from disease (e.g., rate of weight gain), or the reduction of at least one of the symptoms normally associated with the particular disease (e.g., if the antibody or immunoadhesin responsive disease were Crohn's disease, a reduction in at least one of the following symptoms: abdominal pain, diarrhea, rectal bleeding, weight loss, fever, loss of appetite, dehydration, anemia, distention, fibrosis, inflamed intestines and malnutrition).

Monoclonal Antibodies and Receptors

A full-length antibody ("Immunoglobulin" or "Ig") as it exists naturally is an immunoglobulin molecule comprised of four peptide chains, two heavy (H) chains (about 50-70 kDa when full length) and two light (L) chains (about 25 kDa when full length) interconnected by disulfide bonds. The amino terminal portion of each chain includes a variable region of about 100-110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The carboxy-terminal portion of each chain defines a constant region primarily responsible for effector function.

Light chains are classified as kappa or lambda and characterized by a particular constant region. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, respectively. Each heavy chain type is characterized by a particular constant region.

Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (herein "HCVR") and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains (CH1, CH2, and CH3) for IgG, IgD, and IgA; and 4 domains (CH1, CH2, CH3, and CH4) for IgM and IgE. Each light chain is comprised of a light chain variable region

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

42

(herein "LCVR") and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The HCVR and LCVR regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDRs), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each

5 HCVR and LCVR is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance with well-known conventions [e.g., Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. The functional ability of an

10 antibody to bind a particular antigen is determined collectively by the six CDRs. However, even a single variable domain comprising only three CDRs specific for an antigen may have the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than a complete Fab.

Monoclonal antibodies of the invention can be produced using e.g., hybridoma

15 techniques well known in the art, as well as recombinant technologies, phage display technologies, synthetic technologies or combinations of such technologies readily known in the art. The term "monoclonal antibody" as used herein is not limited to antibodies produced through hybridoma technology. "Monoclonal antibody" refers to an antibody that is derived from a single copy or clone, including e.g., any eukaryotic, prokaryotic, or

20 phage clone, and not the method by which it is produced. A "monoclonal antibody" can be an intact (complete or full length) antibody, a substantially intact antibody, a functional fragment of an antibody, or it may be a chimeric antibody, human antibody, or humanized antibody.

A population of "monoclonal antibodies," refers to a homogeneous or

25 substantially homogeneous (or pure) antibody population (i.e., at least about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, more preferably at least about 97% or 98% or most preferably at least 99% of the antibodies in the population are identical and would compete in an ELISA assay for the same antigen or epitope.

The term "specifically binds" or "preferentially binds" as used herein refers to the

30 situation in which one member of a specific binding pair does not significantly bind to molecules other than its specific binding partner(s). The term is also applicable where e.g., an antigen-binding domain of an antibody of the invention is specific for a particular

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

43

epitope that is carried by a number of antigens, in which case the specific antibody carrying the antigen-binding domain will be able to bind to the various antigens carrying the epitope.

The Fc region refers to the portion of an intact antibody, e.g., IgG, generated by digestion with the enzyme papain (*see* Fig. 1). The Fc region is a homodimer with each chain being comprised of a portion of the hinge region as well as the CH2 and CH3 domains. The Fc region is a dimer due to interchain disulfide bridges formed between the hinge regions and multiple non-covalent bonds between the CH3 domains. IgG is the most abundant class of Ig in the body, constituting approximately 75% of the total immunoglobulin and distributed equally within the intravascular and extravascular pools. Very little IgG is produced during the early stages of the primary response to antigen but is the major form of antibody produced during the secondary response.

As described above, antibodies have regions, primarily the CH2 and CH3 regions, that are involved in non-antigen binding functions. Together, these regions and a portion of the linker sequence are generally known as the Fc region, and have several effector functions mediated by binding of effector molecules.

The effector functions mediated by the antibody Fc region can be divided into two categories: (1) effector functions that operate after the binding of antibody to an antigen (these functions involve, for example, the participation of the complement cascade or Fc receptor (FcR)-bearing cells); and (2) effector functions that operate independently of antigen binding (these functions confer, for example, persistence in the circulation and the ability to be transferred across cellular barriers by transcytosis). For example, binding of the C1q component of complement to antibodies activates the complement system. Following opsonization, activation of complement is important in the lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and may also be involved in autoimmune hypersensitivity. Further, antibodies bind to cells via the Fc region, with an Fc receptor binding site on the antibody Fc region binding to a FcR on a cell. There are a number of FcRs which are specific for different classes of antibody, including IgG, IgE, IgA and IgM. While the present invention is not limited to any particular mechanism, binding of antibody to FcR on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated

【 0 0 4 4 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

44

target cells by killer cells (ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer and control of immunoglobulin production.

Several antibody effector functions are mediated by FcRs, which bind the Fc region of an antibody. FcRs are defined by their specificity for immunoglobulin isotypes;

- 5 Fc receptors for IgG antibodies are referred to as FcγR, for IgE as FcεR, for IgA as FcαR and so on. Three subclasses of FcγR have been identified: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16).

Because each FcγR subclass is encoded by two or three genes, and alternative RNA splicing leads to multiple transcripts, a broad diversity in FcγR isoforms exists. The

- 10 three genes encoding the FcγRI subclass (FcγRIA, FcγRIB and FcγRIC) are clustered in region 1q21.1 of the long arm of chromosome 1; the genes encoding FcγRII isoforms (FcγRIIA, FcγRIIB and FcγRIIC) and the two genes encoding FcγRIII (FcγRIIIA and FcγRIIIB) are all clustered in region 1q22. These different FcR subtypes are expressed on different cell types (e.g., Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991)).

- 15 For example, in humans, FcγRIIIB is found only on neutrophils, whereas FcγRIIIA is found on macrophages, monocytes, NK cells, and a subpopulation of T-cells. Notably, FcγRIIIA is present on NK cells, one of the cell types implicated in ADCC.

Human FcγRIIIA (CD16) receptor has a common polymorphism at position 158 in its extracellular domain encoding either a phenylalanine or valine at this position. The

- 20 V allele of FcγRIIIA has higher affinity to human IgG1 than the F allele. The V158 allele also mediates ADCC more efficiently. Clinical data have shown a correlation between the genotype of FcγRIIIA receptor in patients undergoing Rituxan treatment and therapeutic response. Both clinical and molecular responses and time to progression were shown to be superior in patients homozygous for the FcγRIIIA-158V genotype

- 25 (approximately 20% of population). In contrast, patients heterozygous or homozygous for the lower affinity FcγRIIIA-158F genotype (approximately 80% of population) respond more poorly. These data suggest that Fc mutations that enhance ADCC activity of the 158F carriers might enhance the clinical efficacy of antibody-based therapy of cancer. A genetic polymorphism is also present in human FcγRIIA (CD32) receptor at
30 position 131 in its extracellular domain encoding either a histidine (H) or arginine (R) at this position. The polymorphism at position 131 has been found to affect its ability to

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

45

bind to human IgG. Recent data also show a correlation between the FcγRIIA position 131 polymorphism and clinical response to Rituxan. Patients homozygous for the H131 allele had a significantly higher response rate than the other 2 groups.

FcγRI, FcγRII and FcγRIII are immunoglobulin superfamily (IgSF) receptors;

- 5 FcγRI has three IgSF domains in its extracellular domain, while FcγRII and FcγRIII have only two IgSF domains in their extracellular domains. Another type of Fc receptor is the neonatal Fc receptor (FcRn). FcRn is structurally similar to major histocompatibility complex (MHC) and consists of an α-chain noncovalently bound to β2-microglobulin.

10 Variant Fc Regions

- The present invention provides variant polypeptides, nucleic acid sequences encoding the variant polypeptides, and methods for generating variant polypeptides. Preferably, the variant polypeptides of the present invention differ from a parent polypeptide by at least one amino acid modification, preferably an amino acid
- 15 substitution. A "parent", "wild type", "starting" or "nonvariant" polypeptide preferably comprises at least a portion of an antibody Fc region and the amino acid substitution in the variant polypeptide occurs within the Fc region. A parent polypeptide comprising an Fc region may be prepared using techniques available in the art for generating polypeptides comprising an Fc region or portion thereof. In preferred embodiments, the
- 20 parent polypeptide is an antibody. However, the parent polypeptide may be any other polypeptide comprising at least a portion of an Fc region (e.g., an immunoadhesin). The portion of Fc region in the parent polypeptide may be of a native or non-native sequence, preferably it is a native sequence of human origin. In certain embodiments, a variant Fc region may be generated (e.g., according to the methods disclosed herein) and can be
- 25 fused to a heterologous polypeptide of choice, such as an antibody variable domain or binding domain of a receptor or ligand, or any therapeutic polypeptide.

- In preferred embodiments, the parent polypeptide comprises an Fc region or functional portion thereof. Generally, the Fc region of the parent polypeptide will comprise a native sequence Fc region, and preferably a human native sequence Fc region.
- 30 However, the Fc region of the parent polypeptide may have one or more pre-existing amino acid sequence alterations or modifications (e.g., an amino acid substitution) from a native sequence Fc region. For example, the Clq binding activity of the Fc region may

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

46

have been previously altered or the FcγR binding affinity of the Fc region may have been altered. The desired variant Fc region or nucleic acid encoding the variant Fc region of interest may be constructed while not operably attached to the desired fusion partner of the variant Fc region, (e.g., an antibody variable region, a heterologous protein) and then subsequently engineered to be operably attached thereto. In further embodiments, the parent polypeptide Fc region is conceptual (e.g., mental thought or a visual representation on a computer or on paper) and, while it does not physically exist, the antibody engineer may decide upon a desired variant Fc region amino acid sequence and generate a polypeptide comprising that sequence or a DNA encoding the desired variant Fc region amino acid sequence. However, in preferred embodiments, a nucleic acid encoding an Fc region of a parent polypeptide is available and this nucleic acid sequence is altered to generate a variant nucleic acid sequence encoding the variant Fc region.

Nucleic acid encoding a variant of the parent polypeptide (or simply a variant Fc region) may be prepared by methods known in the art using the guidance of the present specification for particular sequences. These methods include, but are not limited to, preparation by site-directed (or oligonucleotide-mediated) mutagenesis, PCR mutagenesis (e.g., Vallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989), and cassette mutagenesis (e.g., Wells et al., Gene 34:315-323 (1985) of an earlier prepared nucleic acid encoding the polypeptide. Site-directed mutagenesis is a preferred method for preparing variants. This technique is well known in the art (*see*, e.g., Carter et al. Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443 (1985) and Kunkel et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1987)).

Alternatively, or additionally, the desired amino acid sequence encoding a variant polypeptide can be determined, and a nucleic acid sequence encoding such amino acid sequence of the variant polypeptide (i.e., polypeptide comprising a variant Fc region comprising an amino acid substitution as described herein) can be generated synthetically. This is still considered to be a variant Fc region of a parent Fc region even though the parent Fc region was not the molecular precursor of the variant Fc region but was instead the amino acid sequence of the Fc region present in the parent in the absence of the desired amino acid substitution.

The amino acid sequence of the parent polypeptide may be modified in order to generate a variant Fc region with altered Fc receptor binding affinity or activity in vitro and/or in vivo; and/or altered ADCC activity in vitro and/or in vivo; and/or altered CDC

【 0 0 4 7 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

47

activity in vitro and/or in vivo. The amino acid sequence of the parent polypeptide may also be modified in order to generate a variant Fc region with altered complement binding properties and/or circulation half-life.

- Substantial modifications in the biological properties of the Fc region may be accomplished by selecting amino acid substitutions that differ significantly in their effect on altering (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or the bulk of the side chain, (d) interaction with carbohydrate, or (e) flexibility of domain movement. Naturally occurring residues are divided into classes based on common side-chain properties:
- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
 - (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
 - (3) acidic: asp, glu;
 - (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
 - (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
 - (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for a member of another class. Conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another member of the same class.

- As is demonstrated in the Examples below, one can engineer a variant Fc region with altered activity (effector function(s) and/or pharmacokinetics). One may, for example, modify one or more amino acid residues of the Fc region in order to alter (e.g., increase or decrease) ADCC activity or CDC activity or FcRn binding affinity. In preferred embodiments, a modification is a substitution as listed in Table 1 herein.
- Generally, one will make an amino acid substitution at one or more of the Fc region residues identified herein as effecting ADCC activity in order to generate such a variant Fc region. In preferred embodiments, no more than one to about ten Fc region residues will be substituted. The Fc regions herein comprising one or more amino acid substitutions will preferably retain at least about 80%, and preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%, of the parent Fc region sequence or of a native human Fc region sequence.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

48

By introducing the appropriate amino acid sequence modification(s) in a parent Fc region, one can generate a variant Fc region which (when compared to the parent Fc region) (a) mediates ADCC in the presence of human effector cells more or less effectively and/or (b) mediates CDC in the presence of human complement more or less effectively and/or (c) binds C1q with a desired affinity and/or (d) binds an Fc gamma receptor (FcγR) or Fc neonatal receptor (FcRn) with a desired affinity. Such variant Fc regions will generally comprise at least one amino acid modification in the Fc region. Preferably the modification is an amino acid substitution, more preferably an amino acid substitution as listed in Tables 1-9 herein.

10 In preferred embodiments, the parent polypeptide Fc region is a human Fc region or functional fragment thereof, e.g., a native human Fc region human IgG1 (f and a,z allotypes), IgG2, IgG3, IgG4, and all allotypes known or discovered from any species. Such regions have native sequences such as, e.g., those shown in Fig. 2 (SEQ ID NOs: 1-8), and Fig. 3 (SEQ ID NOs: 9-12) herein.

15 In certain embodiments, in order to generate a variant Fc region with enhanced ADCC activity, the parent polypeptide preferably has pre-existing ADCC activity (e.g., the parent polypeptide comprises a human IgG1 or human IgG3 Fc region). In some embodiments, a variant has enhanced ADCC activity (e.g., greater levels as compared to the parent according to an ADCC assay described herein) as compared to the parent polypeptide, i.e., a monoclonal antibody comprising the variant Fc region has enhanced ADCC activity as compared under identical circumstances to a monoclonal antibody comprising the parent Fc region or a native IgG1 or IgG3 Fc region sequence but otherwise identical to the monoclonal antibody comprising the variant Fc region.

20 In preferred embodiments, amino acid substitution(s) are introduced into the CH2 and/or CH3 domains of a Fc region. In preferred embodiments, the parent Fc region used as the template to generate such variants comprises a human IgG Fc region.

25 In certain embodiments, in order to generate a variant Fc region with enhanced CDC activity, the parent polypeptide preferably has pre-existing CDC activity. In some embodiments, a variant has enhanced CDC activity (e.g., greater levels as compared to the parent according to an CDC assay described herein) as compared to the parent polypeptide, i.e., a monoclonal antibody comprising the variant Fc region has enhanced CDC activity as compared under identical circumstances to a monoclonal antibody

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

49

comprising the parent Fc region or a native IgG1 or IgG3 Fc region sequence but otherwise identical to the monoclonal antibody comprising the variant Fc region.

The variant polypeptides described herein may be subjected to further modifications, depending on the desired or intended use of the polypeptide. Such
5 modifications may involve, for example, further alteration of the amino acid sequence (substitution, insertion and/or deletion of amino acid residues), carbohydrate modifications, fusion to heterologous polypeptide(s) and/or covalent modifications. Such further modifications may be made prior to, simultaneously with, or following, the amino acid modification(s) disclosed herein which result in an alteration of Fc receptor binding
10 and/or ADCC activity and/or CDC activity.

Alternatively or additionally, it may be useful to combine amino acid modifications with one or more further amino acid modifications that alter Clq binding and/or CDC function of the Fc region. For example, the starting polypeptide may be unable to bind Clq and/or mediate CDC and may be modified according to the teachings
15 herein such that it acquires these further effector functions. Moreover, polypeptides with pre-existing Clq binding activity, optionally further having the ability to mediate CDC, may be modified such that one or both of these activities are enhanced (or alternatively, are diminished). Certain Fc region amino acid modifications that alter Clq binding and/or modify CDC activity are described herein (*see* Tables 2, 7, 8 and 10) and, for example, in
20 W00042072.

As disclosed above, one can design an Fc region or portion thereof with altered effector function, e.g., by modifying CDC activity and/or ADCC activity. For example, one can generate a variant Fc region with improved CDC activity and improved ADCC activity. Alternatively, where one desires that an effector function be reduced or ablated,
25 one may engineer a variant Fc region with reduced CDC activity and/or reduced ADCC activity. In other embodiments, one may increase only one of these activities, and optionally also reduce the other activity, e.g., to generate a variant Fc region with improved ADCC activity, but reduced CDC activity and vice versa. Additionally, one can engineer a variant Fc region with modified binding affinity to FcRn, protein A, and/or
30 other Fc binding proteins.

In some embodiments, the present invention provides compositions comprising a variant of a parent polypeptide, wherein the parent comprises an Fc region (or portion

【 0 0 5 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

50

thereof) and wherein the variant comprises at least one surface residue amino acid modification within the Fc region (*see, e.g.,* Deisenhofer, *Biochemistry*, 20:2361-70, April 1981, and W00042072). In other embodiments, the present invention provides compositions comprising a variant of a parent polypeptide having an Fc region, wherein
5 the variant comprises at least one non-surface residue amino acid modification in the Fc region. In further embodiments, the present invention comprises a variant of a parent polypeptide having an Fc region, wherein the variant comprises at least one surface amino acid modification and at least one non-surface amino acid modification, both in the Fc region.

10

Combination Variants

In some embodiments, a variant Fc region of the present invention comprises two or more amino acid modifications (*e.g.,* substitutions). Such combination variants may be produced, for example, by selecting two or more of the amino acid substitutions detailed
15 above (*e.g., see* Table 1), or one or more amino acid substitutions as listed in Table 1 in addition to a substitution known in art.

The combination variants shown in Table 10 and other combination variants (such as those substitutions disclosed in W00042072 uses in combination with those disclosed herein) may be tested for a given activity (*e.g.,* FcRn binding activity, ADCC activity,
20 and CDC activity) in a variety of assays (*see* examples below). In this regard, useful combination variants may be identified.

In certain preferred embodiments, the multiple amino acid substitutions present in a variant Fc region of the present invention has one amino acid substitution that increases ADCC activity, and one amino acid modification that increases neonatal Fc receptor
25 (FcRn) binding affinity (*e.g.,* at pH 6.0) of the polypeptide comprising the variant Fc region. In other embodiments, the combination variants of the present invention have one surface amino acid in a variant Fc region of the present invention, and one non-surface amino acid modification. Additional combination variants in the variant Fc regions of the present invention may be generated by combining two or more of the amino acid
30 substitutions described herein, or at least one of the amino acid substitutions described herein with those described in *e.g.,* W00042072.

【 0 0 5 1 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

51

Variant Polypeptide Assays

The present invention provides various assays for screening variant Fc regions or polypeptides comprising a variant Fc region of the invention. Screening assays may be used to find or confirm useful variants. For example, combination variants (*see, e.g.,* 5 Table 10) may be screened to find variants with altered FcR binding, and/or altered ADCC and/or altered CDC activity (e.g., increased or decreased ADCC or CDC activity) and/or modified ability to deplete target cells (B cells, for eg.) from whole blood. Also, as described below, the assays of the present invention may be employed to find or confirm variants that have beneficial therapeutic activity in a subject (e.g., such as a 10 human with symptoms of an antibody or immunoadhesin responsive disease). A variety of assay types may be employed to evaluate any change in a variant compared to the parent polypeptide (screening assays provided e.g., in W00042072). Further exemplary assays are described below.

In preferred embodiments, a variant polypeptide (i.e., polypeptide comprising a 15 variant Fc region of the present invention or functional portion thereof) is a monoclonal antibody that essentially retains the ability to specifically bind an antigen (via an unmodified antigen binding region or modified antigen binding region) as compared to the parent polypeptide (e.g., the binding capability is preferably less than 20 fold, 10 fold, 7 fold, or less than about 5 fold different than that of the parent polypeptide). The 20 binding capability of the variant polypeptide to antigen may be determined using techniques such as ELISA, fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis, or radioimmunoprecipitation (RIA), for example FcR binding assays may be employed to evaluate the variants of the present invention. For example, binding of Fc receptors such as FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII, FcRn, etc., can be measured by titrating a variant 25 polypeptide and measuring bound variant polypeptide using an antibody which binds to the variant polypeptide in an ELISA format (*see* Examples below). For example, a variant that comprises an antibody may be screened in a standard ELISA assay to determine binding to an FcRn at pH 6.0 and pH 7.0 or pH 7.4. A solid surface coated with streptavidin or neutravidin may be used to capture biotin labeled FcRn from any 30 species, such as mouse or human. After blocking, the capture receptor can be incubated with variant polypeptides (e.g., antibodies) diluted in buffers at pH 6.0 or pH 7.0. In the following step a molecule specific for human antibodies is added (e.g., goat (Fab')₂ anti-

【 0 0 5 2 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

52

human-Fab conjugated to an enzyme). Thereafter a substrate may be added in order to determine the amount of binding of the variant polypeptide to the immobilized FcRn at pH 6.0 or pH 7.0 or pH 7.4. The results of this assay can be compared to the parent (non-variant) polypeptide's ability to bind the same FcR. In other preferred embodiments, the components for carrying out an ELISA (e.g., with FcRn) to screen variants are packaged in a kit (e.g., with instructions for use).

An ADCC assay may also be employed to screen the variants of the present invention. ADCC assays may be performed in vitro or in vivo. To assess ADCC activity of a variant polypeptide an in vitro ADCC assay may be performed using varying effector:target ratios. An exemplary ADCC assay could use a target cell line expressing any of the following target antigens: CD20, CD22, CD33, CD40, CD63, EGF receptor, her-2 receptor, prostate-specific membrane antigen, LewisY carbohydrate, GD2 and GD3 gangliosides, lamp-i, CO-029, L6, and ephA2. Effector cells may be obtained from a healthy donor (e.g., on the day of the experiment) and PBMC purified using Histopaque (Sigma). Target cells are then preincubated with an IgG comprising a variant Fc region of the invention at, for example, 0.1 - 1,000 ng/ml for about 30 minutes prior to mixing with effector cells at effector:target ratios of, for example, 40:1, 20:1 and 10:1. ADCC activity may then be measured colorimetrically using a Cytotoxicity Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals) for the quantitation of cell death and lysis based upon the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol of damaged cells into the supernatant. ADCC activity may also be measured, for Chromium loaded target cell assays, by measuring the resulting Chromium 51 released. Antibody independent cellular cytotoxicity can be determined by measuring the LDH activity from target and effector cells in the absence of antibody. Total release may be measured following the addition of 1% Triton X-100 to the mixture of target and effector cells. Incubation of the target and effector cells may be performed for an optimized period of time (0.54-18 hours) at 37°C in 5.0 % CO₂ and then be followed by centrifugation of the assay plates. The supernatants may then be transferred to 96 well plates and incubated with LDH detection reagent for 30 minutes at 25°C. The sample absorbance may then be measured at 490 nm using a microplate reader. The percent cytotoxicity can then be calculated using the following equation: % cytotoxicity= experimental value - low control /high control - low control X 100%. The percent cytotoxicity of anti-CD20 and

【 0 0 5 3 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

53

variants can then be compared directly with equal amount of RITUXAN to provide a measurement of relative effectiveness. An exemplary ADCC assay could employ SKW6.4 cells over-expressing the CD20 antigen (e.g., purchased from the American Type Culture Collection) as the source of target cells. Many variations of this assay are
5 known in the art (e.g., Zuckerman et al., *CRC Crit Rev Microbiol* 1978;7(1):1-26).

Useful effector cells for such assays include, but are not limited to, NK cells, macrophages, and other PBMC. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the variant polypeptides of the present invention may be assessed in vivo, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)).

10 The variants of the present invention may also be screened for complement activation. To assess complement activation, a CDC assay may be performed (*See*, e.g., Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996)). For example, various concentrations of the variant polypeptide and human complement may be diluted with buffer. Cells which express the antigen to which the variant polypeptide binds may be
15 diluted to a density of 1×10^6 cells/ml. Mixtures of variant polypeptide, diluted human complement and cells expressing the antigen may be added to a flat bottom tissue culture 96 well plate and allowed to incubate for 2 hours at 37°C and 5% CO₂ to facilitate complement mediated cell lysis. Fifty microliters of alamar blue (Accumed International) may then be added to each well and incubated overnight at 37°C. The absorbance may be
20 measured using a 96-well fluorimeter with excitation at 530 nm and emission at 590 nm. The results may be expressed in relative fluorescence units (RFU). The sample concentrations may be computed from a standard curve and the percent activity as compared to nonvariant polypeptide may be reported for the variant polypeptide of interest.

25 In certain embodiments, variant polypeptides of the present invention do not activate complement or activate complement poorly. For example, a variant polypeptide displays about 0-10% CDC activity in this assay compared to a control antibody having a nonmutated IgG1 Fc region. Preferably the variant does not appear to have any CDC activity (e.g., above background) in the above CDC assay. In other embodiments, a
30 variant polypeptide of the present invention is found to have enhanced CDC compared to a parent polypeptide (e.g., preferably displaying about 1.1, 1.5, 1.7, or 2-fold to about

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

54

100-fold (or greater) enhancement in CDC activity in vitro or in vivo when the IC_{50} values are compared).

Variant polypeptides of the present invention may also be screened for depletion of target cells in a whole blood assay. For example, various concentrations of the variant polypeptide with CD20 target specificity can be screened for the depletion of B cells in a whole blood assay using facs (Vugmeyster et al., 2003 Cytometry 52A, 101-109):
Freshly drawn blood is incubated with varying concentrations of variant polypeptide at 37°C and 5% CO₂ for 4 hours (time can be varied). Following the incubation, red blood cells are lysed per manufacturer's directions with an ammonium chloride reagent (Beckton-Dickinson cat. #555899) and B cells are detected by facs using a fluorescent-labeled antibody specific for B cells (anti-CD 19, for example). The results may be expressed as percent depletion of B cells relative to either an untreated sample or a sample incubated with an irrelevant (non-depleting) antibody.

In preferred embodiments, a variant polypeptide depletes B cells more effectively than the parental polypeptide. A variant polypeptide may deplete B cells, for example, to about two-fold or greater extent than the parent polypeptide, and preferably about five-fold or more. Also, a variant may display greater potency in depleting B cells. For example, a variant may deplete the same percentage of B cells relative to parental polypeptide, but utilize about five-fold less, and preferably about 10-fold less antibody. Target cell depletion mediated by variants may be about 2-fold, 3-fold, 5-fold to about 1000-fold or greater, and preferably from about 5-fold to about 1000-fold improved compared to the parent polypeptide.

The variants of the present invention may also be screened in vivo. Any type of in vivo assay may be employed. A particular example of one type of assay is provided below. This exemplary assay allows for preclinical evaluation of Fc variants in vivo. A variant to be tested may be incorporated into the Fc region of a particular antibody known to have some activity. For example, a variant may be incorporated into the Fc region of an anti-CD20 IgG by mutagenesis. This allows a parental IgG and Fc variant IgG to be compared directly with RITUXAN (known to promote tumor regression). The preclinical evaluation may be done in 2 phases (a pharmacokinetic and pharmacodynamic phase). The goal of the Phase I pharmacokinetic studies is to determine if there are differences in the clearance rate between an Fc variant IgG and the antibody with known in vivo activity

【 0 0 5 5 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

55

(e.g., RITUXAN). Differences in clearance rate may cause differences in the steady-state level of IgG in serum. As such, if differences in steady-state concentrations are detected these should be normalized to enable accurate comparisons to be made. The goal of the Phase II pharmacodynamic studies is to determine the effect of the Fc mutations upon, in this case, tumor growth. Previous studies with RITUXAN used a single dose which completely inhibited tumor growth. Because this does not allow quantitative differences to be measured, a dose range should be employed.

Phase I pharmacokinetic comparison of an Fc variant, the wild type parental Fc, and RITUXAN may be performed, e.g., in the following manner. First, 40 μ g (or other dose to be tested) per animal may be injected intravenously and the plasma level of the IgG quantitated at 0, .25, .5, 1, 24, 48, 72, 96, 120, 168, and 336 hrs. The data may be fitted, for example, using a pharmacokinetic program (WinNonLin) using a zero lag two compartment pharmacokinetic model to obtain the clearance rate. Clearance rate may be used to define steady state plasma level with the following equation: $C = \text{Dose}/(\text{Clearance rate} \times T)$, where T is the interval between doses and C is the plasma level at steady state. Pharmacokinetic experiments may be performed in non-tumor bearing mice with, for example, a minimum of 5 mice per time point.

An exemplary animal model may be employed for the next phase in the following manner. The right flank of CB17-SCID mice may be implanted with 10^6 Raji cells subcutaneously. Intravenous bolus of the variant Fc antibody, the wild type Fc antibody, and RITUXAN may be commenced immediately after implantation and continued until the tumor size is greater than 2 cm in diameter. Tumor volume may be determined every Monday, Wednesday and Friday by measuring the length, width, and depth of the tumor using a caliper (tumor volume = $W \times L \times D$). A plot of tumor volume versus time will give the tumor growth rate for the pharmacodynamic calculation. A minimum of about 10 animals per group should be used.

Phase II pharmacodynamic comparison of the variant Fc antibody, the wild type Fc antibody, and RITUXAN may be performed in the following manner. Based on published data, RITUXAN at 10 μ g/g weekly completely inhibited tumor growth in vivo (Clynes et al., Nat. Med. 6:443-6, 2000). Therefore, a weekly dose range of 10 μ g/g, 5 μ g/g, 1 μ g/g, 0.5 μ g/g, and 0 μ g/g may be tested. The steady state plasma level at which tumor growth rate is inhibited by 50% may be graphically determined by the relationship

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

56

between steady state plasma level and effectiveness. The steady state plasma level may be calculated as described above. If necessary, τ may be adjusted accordingly for each variant Fc antibody and the wild type Fc antibody depending on their pharmacokinetic properties to achieve comparable steady state plasma level as RITUXAN. Statistical
5 improved pharmacodynamic values of the variant Fc antibody in comparison to the parental polypeptide (e.g., wild type Fc antibody) and RITUXAN will generally indicate that the variant Fc antibody confers improved activity *in vivo*.

Additional pharmacodynamic comparison of variant Fc antibodies, wild type Fc antibodies, and RITUXAN may be performed in cynomolgous monkeys as described
10 previously (Reff *et al.*, Blood 83, 435-445, 1994). A dose response for depletion of peripheral B cells and lymph node B cells may be used to compare the relative potencies of the Fc variants with wild type Fc and RITUXAN administered intravenously and/or subcutaneously. Statistical improved pharmacodynamic values of the Fc variant in comparison to the parental polypeptide (e.g., Fc wild type) and RITUXAN will generally
15 indicate that the variant Fc antibody confers improved activity *in vivo*.

In further embodiments, the variants (i.e., polypeptide comprising a variant Fc region of the invention, or functional portion thereof) of the present invention are screened such that variants that are useful for therapeutic use in at least two species are identified. Such variants are referred to herein as "dual-species improved variants", and
20 are particularly useful for identifying variants that are therapeutic in humans, and also demonstrate (or are likely to demonstrate) efficacy in an animal model. In this regard, the present invention provides methods for identifying variants that have a strong chance of being approved for human clinical testing since animal model data will likely support any human testing applications made to governmental regulatory agencies (e.g., U.S. Food
25 and Drug Administration).

In certain embodiments, dual-species improved variants are identified by first performing an ADCC assay using human effector cells to find improved variants, and then performing a second ADCC assay using mouse, rat, or non-human primate effector cells to identify a sub-set of the improved variants that are dual-species improved
30 variants. In some embodiments, the present invention provides methods for identifying dual-species improved variants, comprising: a) providing: i) target cells, ii) a composition comprising a candidate variant of a parent polypeptide having at least a portion of an Fc

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

57

region, wherein the candidate variant comprises at least one amino acid substitution in the Fc region, and wherein the candidate variant mediates target cell cytotoxicity in the presence of a first species (e.g., human) of effector cells more effectively than the parent polypeptide, and iii) second species (e.g., mouse, rat, or non-human primate) effector cells, and b) incubating the composition with the target cells under conditions such that the candidate variant binds the target cells thereby generating candidate variant bound target cells, c) mixing the second species effector cells with the candidate variant bound target cells, and d) measuring target cell cytotoxicity mediated by the candidate variant.

In certain embodiments, the method further comprises step e) determining if the candidate variant mediates target cell cytotoxicity in the presence of the second species effector cells more effectively than the parent polypeptide. In some embodiments, the method further comprises step f) identifying a candidate variant as a dual-species improved variant that mediates target cell cytotoxicity in the presence of the second species effector cells more effectively than the parent polypeptide. In preferred embodiments, the dual-species variants identified are then screened in vivo in one or more animal assays.

In certain embodiments, dual-species improved variants are identified by first performing a whole blood assay using human blood to find improved variants, and then performing a second whole blood assay using mouse, rat, or non-human primate blood to identify a sub-set of the improved variants that are dual-species improved variants. In some embodiments, the present invention provides methods for identifying dual-species improved variants, comprising: a) providing: i) target cells, ii) a composition comprising a candidate variant of a parent polypeptide having at least a portion of an Fc region, wherein the candidate variant comprises at least one amino acid substitution in the Fc region, and wherein the candidate variant mediates target cell depletion in the presence of a first species (e.g., human) blood more effectively than the parent polypeptide, and iii) second species (e.g., mouse, rat, or non-human primate) blood, and b) incubating the composition with the target cells under conditions such that the candidate variant binds the target cells thereby generating candidate variant bound target cells, c) mixing the second species blood with the candidate variant bound target cells, and d) measuring target cell depletion mediated by the candidate variant. In certain embodiments, the method further comprises step e) determining if the candidate variant mediates target cell

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

58

depletion in the presence of the second species blood more effectively than the parent polypeptide. In some embodiments, the method further comprises step f) identifying a candidate variant as a dual-species improved variant that mediates target cell depletion in the presence of the second species blood more effectively than the parent polypeptide. In preferred embodiments, the dual-species variants identified are then screened *in vivo* in one or more animal assays.

In certain embodiments, dual-species improved variants are identified by performing any of the assays above using human components (e.g., human cells, human FcR, etc.) to identify improved variants, and then running the same assay (or a different assay) with non-human animal components (e.g., mouse cells, mouse FcR, etc.). In this regard, a sub-set of variants that perform well according to a given criteria in both human based assays and a second species based assays can be identified.

An exemplary process for identifying dual-species improved variants is as follows. First, a nucleic acid sequence encoding at least a portion of an IgG Fc region is mutated such that the amino acid sequence expressed has at least one amino acid change, thereby generating a variant. This expressed IgG variant is then characterized in an ADCC assay using human PBMCs or a subset (NK cells or macrophages, for example). If enhanced ADCC activity is found, then the variant is screened in a second ADCC assay using mouse or rat PBMCs. Alternatively, or in addition, an assay can be performed with the variant for binding to cloned rodent receptors or cell lines. Finally, if the variant is found to be improved in the second assay, making it a dual-improved variant, then the variant is screened *in vivo* in mice or rats.

Exemplary Variant Fc Region Containing Molecules

The variant Fc regions of the present invention may be part of larger molecules. The larger molecules may be, for example, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, bispecific antibodies, immunoadhesins, etc. Additionally, a variant Fc region of the invention may be operably attached to a non-antibody polypeptide upon which it may confer an altered (increased or decreased) half life. As such, it is evident that there is a broad range of applications for the variant Fc regions of the present invention.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

59

Antibodies Containing Variant Fc Regions

In preferred embodiments, the variant Fc region containing molecule (e.g., polypeptide) is an antibody. Techniques for producing antibodies are described below.

5 *(i) Antigen selection and preparation*

Generally, when the variant Fc region containing molecule is an antibody, the antibody is directed against an antigen of interest. Preferably, the antigen is a polypeptide and administration of the antibody to a mammal suffering from a disease or disorder which would benefit from a decrease in amount or activity of the antigenic molecule can result in a therapeutic benefit in that mammal. However, antibodies directed against
 10 nonpolypeptide antigens (such as tumor associated glycolipid antigens; *see* U.S. Patent 5,091,178), may also be employed.

Exemplary antigens include, but are not limited to, molecules such as renin; a growth hormone, including human growth hormone and bovine growth hormone; growth
 15 hormone releasing factor; parathyroid hormone; thyroid stimulating hormone; lipoproteins; alpha-i-antitrypsin; insulin A-chain; insulin B-chain; proinsulin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagon; clotting factors such as factor VIIIc, factor IX, tissue factor (TF), and von Willebrands factor; anti-clotting factors such as Protein C; atrial natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen
 20 activator, such as urokinase or human urine or tissue-type plasminogen activator (t-PA); bombesin; thrombin; hemopoietic growth factor; tumor necrosis factor-alpha and -beta; enkephalinase; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); human macrophage inflammatory protein (MIP-1-alpha); a serum albumin such as human serum albumin; Muellerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-
 25 chain; prorelaxin; mouse gonadotropin-associated peptide; a microbial protein, such as beta-lactamase; DNase; IgE; a cytotoxic T-lymphocyte associated antigen (CTLA), such as CTLA-4; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); receptors for hormones or growth factors; protein A or D; rheumatoid factors; a neurotrophic factor such as bone-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3,-4,-5, or-6 (NT-3, NT-
 30 4, NT-5, or NT-6), or a nerve growth factor; platelet-derived growth factor (PDGF); fibroblast growth factor such as a FGF and ,FGF; epidermal growth factor (EGF); transforming growth factor (TGF) such as TGF-alpha and TGF beta, including TGF-1,

【 0 0 6 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

60

TGF-2, TGF-3, TGF-4, or TGF-5; insulin-like growth factor-I and-II (IGF-I and IGF-II); des (1-3)-IGF-I (brain IGF-I), insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins such as CD3, CD4, CD8, CD19 and CD20; erythropoietin; osteoinductive factors; immunotoxins; a bone morphogenetic protein (BMP); a growth differentiation factor (e.g., GDF8); an interferon such as interferon-alpha, -beta, and -gamma; colony stimulating factors (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, and G-CSF; interleukins (ILs), e.g., IL-1 to IL-25; superoxide dismutase; T-25 cell receptors; surface membrane proteins; decay accelerating factor; viral antigen such as, for example, a portion of the AIDS envelope; transport proteins; homing receptors; addressins; regulatory proteins; integrins such as CD11a, CD11b, CD11c, CD18, an ICAM, VLA4 and VCAM; a tumor associated antigen such as HER2, HER3 or HER4 receptor; ghrelin; a member of an apoptosis pathway; and fragments or precursors of any of the above-listed polypeptides.

Preferred antigens include, but are not limited to, CD proteins such as CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 and CD34; members of the ErbB receptor family such as the EGF receptor, HER2, HER3 or HER4 receptor; cell adhesion molecules such as LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, α 4/p7 integrin, and (Xv/p3 integrin including either a 5 or subunits thereof (e.g., anti-CD11a, anti-CD18 or anti-CD11b antibodies); growth factors such as VEGF; tissue factor (TF); alpha interferon (α -IFN); growth differentiation factors, e.g., GDF-8; an interleukin, such as IL-8; IgE; blood group antigens; flk2/flt3 receptor; obesity (OB) receptor; mpl receptor; CTLA-4; protein C and ghrelin.

Soluble antigens or fragments thereof, optionally conjugated to other molecules, can be used as immunogens for generating antibodies. For transmembrane molecules, such as receptors, fragments of these (e.g., the extracellular domain of a receptor) can be used as the immunogen. Alternatively, cells expressing the transmembrane molecule can be used as the immunogen. Such cells can be derived from a natural source (e.g., cancer cell lines) or may be cells which have been transformed by recombinant techniques to express the transmembrane molecule. Other antigens and forms thereof useful for preparing antibodies will be apparent to those in the art.

30 (ii) Polyclonal Antibodies

The present invention provides polyclonal antibodies with variant Fc regions. For example, a human immunoglobulin repertoire containing modified IgG1 constant regions

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

61

may be transplanted into immunoglobulin-inactivated mice, resulting in mice expressing an IgG repertoire containing modified Fc regions (*see, e.g., Mendez, MJ et al., Nature Genetics 15:146 (1997)*). Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an
5 adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized (e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor) using a bifunctional or derivitizing agent (e.g., maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester for conjugation through cystein residues, N-hydroxysuccinimide for conjugation through lysine residues,
10 glutaraldehyde, succinic anhydride, SOC12, or $R_1N=C=NR$, where R and R1 are different alkyl groups.

Examples of a general immunization protocol for a rabbit and mouse are as follows. Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, for example, 100 µg or 5 µg of the protein or conjugate (e.g.,
15 for a rabbit or mouse respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later the animals are boosted with 1/5 or 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to fourteen days later the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until
20 the titer plateaus. Preferably, the animal is boosted with the conjugate of the same antigen, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. In addition, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

25

(iii) *Monoclonal antibodies*

The present invention provides monoclonal antibodies with variant Fc regions. Monoclonal antibodies may be made in a number of ways, including using the hybridoma method (e.g., as described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495, 1975), or by recombinant
30 DNA methods (e.g., U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster or macaque monkey, is immunized to elicit lymphocytes that produce or are

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

62

capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized in vitro. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell. The hybridoma cells thus prepared are seeded and
5 grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances
10 prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-1 I mouse tumors
15 available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (e.g., Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)).

20 Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an in vitro binding assay, such as RIA or ELISA. After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity,
25 and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown in vivo as ascites tumors in an animal. The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional
30 immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

63

- DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA
- 5 may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Recombinant production of antibodies is described in more detail below.
- 10 In some embodiments, antibodies or antibody fragments are isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in, for example, McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent
- 15 publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.*, *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and in vivo recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (e.g., Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Thus, these techniques, and similar techniques, are viable alternatives to traditional
- 20 monoclonal antibody hybridoma techniques well known in the art for isolation of monoclonal antibodies. Also, the DNA may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy-and light-chain constant domains in place of the homologous murine sequences (e.g., U.S. Patent No. 4,816,567, and Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 81: 6851 (1984), or by covalently joining to the
- 25 immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide.

- Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one
- 30 antigen-combining site having specificity for an antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

64

(iv) Humanized and human antibodies

The present invention provides humanized and human antibodies with variant Fc Regions of the invention. In preferred embodiments, a humanized antibody comprises human antibody amino acid sequences together with amino acid residues that are not from a human antibody. In some embodiments, the human sequences in a humanized antibody comprise the framework regions ("FRs") and the sequences or residues that are not from a human antibody comprise one or more CDRs. It is worth noting that FRs and CDRs can be defined based on amino acid residue numbering in the heavy and VL regions. The term CDR is intended to mean the non-contiguous antigen combining sites found within the variable region of both heavy and light chain polypeptides. These regions have been defined by Kabat *et al.* (J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977) and Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991); "Kabat", Chothia *et al.* (J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); "Chothia" and MacCallum *et al.* (J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); "MacCallum", where the definitions include overlapping or subsets of amino acid residues when compared against each other. Nevertheless, the application of any of these definitions, alone (for example, the Kabat definition) or in combination (by way of example only, the combined definition of Kabat and Chothia) to refer to a CDR of an antibody (including a humanized antibody) is intended to be within the scope of the term as defined and used herein.

Also, the term "framework" when used in reference to an antibody variable region is intended to mean all amino acid residues outside the CDR regions within the variable region of an antibody. Therefore, a variable region framework is between about 100-120 amino acids in length but is intended to reference only those amino acids outside of the CDRs. The term "framework region" is intended to mean each domain of the framework that is separated by the CDRs. Therefore, for the specific example of a VH region and for the CDRs as defined by Kabat, framework region 1 (FR1) corresponds to the domain of the variable region encompassing amino acids 1-30; framework region 2 (FR2) corresponds to the domain of the variable region encompassing amino acids 36-49; region 3 (FR3) corresponds to the domain of the variable region encompassing amino acids 66-94, and region 4 (FR4) corresponds to the domain of the variable region from amino acid 103 to the end of the variable region. The FRs for the light chain are similarly separated by each of the light chain variable region CDRs. Similarly, using the definition of CDRs

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

65

by Chothia or MacCallum, or any combination of CDR definitions, the framework boundaries are separated by the respective CDR termini as described above.

Notwithstanding the multiple definitions of CDRs, in some embodiments, it is preferred to use the Kabat definition to define CDRs.

5 The residues in a humanized antibody that are not from a human antibody may be residues or sequences imported from or derived from another species (including but not limited to mouse), or these sequences may be random amino acid sequences (e.g., generated from randomized nucleic acid sequences), which are inserted into the humanized antibody sequence. As noted above, the human amino acid sequences in a
10 humanized antibody are preferably the FRs, while the residues which are not from a human antibody (whether derived from another-species or random amino acid sequences) preferably correspond to the CDRs. However, in some embodiments, one or more FRs may contain one or more non-human amino acid residues. In cases of alterations or modifications (e.g., by introduction of a non-human residue) to an otherwise human
15 framework, it is possible for the altered or modified FR to be adjacent to a modified CDR from another species or a random CDR sequence, while in other embodiments, an altered FR is not adjacent to an altered CDR sequence from another species or a random CDR sequence. In some embodiments, the framework sequences of a humanized antibody are entirely human (i.e., no framework changes are made to the human framework). In
20 preferred embodiments, the framework sequences of a humanized antibody are entirely human germline (i.e., no framework changes are made to the human germline framework).

Non-human amino acid residues from another species, or a random sequence, are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import"
25 variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (e.g., Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), by substituting rodent (or other mammal) CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Also, antibodies wherein substantially less than an intact
30 human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species may also be generated (e.g., U.S. patent 4,816,567). In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and

【 0 0 6 6 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

66

possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies, or, as noted above, in which CDR sequences have been substituted by random sequences. By way of non-limiting example only, methods for conferring donor CDR binding affinity onto an antibody acceptor variable region framework are described in
5 WO 01/27160 A1, and in U.S. patent application serial numbers 09/434,870 and 09/982,464.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody to be
10 humanized is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework (FR) for the humanized antibody (e.g., Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993), and Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies
15 of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (e.g., Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

In other embodiments, there is no need to "pre-select" a particular human antibody framework (i.e., there is no need to select a human framework with the closest
20 homology or sequence identity to a given candidate antibody to be humanized). In these embodiments, a common or universal human framework may be used to accept one or more non-human CDRs. In the preferred embodiment, a single universal, fully human framework is used as the framework for all antibodies to be humanized, regardless of its homology to the framework sequence(s) of the candidate antibodies. In this regard,
25 humanized antibodies may be generated without making any changes in the framework region. This universal, fully human framework can then accept one or more CDR sequences. In one embodiment, the one or more CDR sequences are CDR sequences from an antibody from another species (e.g., mouse or rat) which have been modified in comparison to the corresponding CDR in the intact antibody from the other species (i.e.,
30 there is simultaneous introduction of the CDR and modification of the CDR being introduced into the universal human framework). The modification corresponds to one or more amino acid changes (in the modified CDR) in comparison to the corresponding

【 0 0 6 7 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

67

CDR in the intact antibody from the other species. In one embodiment, all amino acid residues in the CDR are included in a library, while in other embodiments, not all of the CDR amino acid residues are included in a library. In another embodiment, the one or more CDR sequences are random sequences, which substitute for CDR sequences.

- 5 In preferred embodiments, antibodies are humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. In some embodiments, the affinity of the humanized antibody for the antigen is higher than the affinity of the corresponding non-humanized, intact antibody or fragment or portion thereof (e.g., the candidate rodent antibody). In this regard, in some embodiments, humanized antibodies
- 10 are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate
- 15 immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e., the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for
- 20 the target antigen (s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

- A variety of specific methods, well known to one of skill in the art, may be employed to introduce antibody CDRs (or random sequences substituting for antibody CDRs) into antibody frameworks (*see*, for example, U.S. applications 09/434,879 and
- 25 09/982,464). In some embodiments, overlapping oligos may be used to synthesize an antibody gene, or portion thereof (for example, a gene encoding a humanized antibody). In other embodiments, mutagenesis of an antibody template may be carried out using the methods of Kunkel (*infra*), for example to introduce a modified CDR or a random sequence to substitute for a CDR. In some embodiments, light and heavy chain variable
- 30 regions are humanized separately, and then co-expressed as a humanized variable region. In other embodiments, humanized variable regions make-up the variable region of an intact antibody. In some embodiments, the Fc region of the intact antibody comprising a

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

68

humanized variable region has been modified (e.g., at least one amino acid modification has been made in the Fc region). For example, an antibody that has been humanized with randomized CDR and no framework changes may comprise at least one amino acid modification in the Fc region.

5 In other embodiments, transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production are employed. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (JH) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous
10 antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge (*See, e.g., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993), and Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993).* Human antibodies can also be derived from phage-display libraries (e.g., Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 381
15 (1991), and Vaughan *et al.*, *Nature Biotech* 14: 309 (1996)).

The present invention provides methods for generating humanized antibodies (and antibody fragments) that comprise at least one amino acid substitution as listed in Table 1 herein, in the Fc region (as compared to a parental polypeptide comprising an Fc region without the amino acid substitution). Discussed below are additional methods for
20 generating such humanized antibodies. The present invention also provides compositions comprising the antibodies and antibody fragments generated by these methods. Importantly, the humanization methods discussed below, and other humanization methods (e.g., discussed above), may be combined with the variant Fc regions of the present invention. In this regard, humanized antibodies with altered, unique Fc regions
25 may be constructed according to the present invention.

In some embodiments, a method of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids is provided, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three
30 CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing first oligonucleotides encoding portions of the FRs of the acceptor VH

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

69

region, wherein the portions of the FRs when compared to the second reference sequence are unmodified; and a population of second oligonucleotides, each encoding i) at least a portion of a first CDR that has been modified, the first CDR selected from the group consisting of HCDR1, HCDR2 and HCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence and ii) one or more portions of unmodified FRs which are capable of hybridizing to the first oligonucleotides; c) mixing the first oligonucleotides with the population of second oligonucleotides as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VH region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.

In other embodiments, a method of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids is provided, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing first oligonucleotides encoding portions of the FRs of the acceptor VL region, wherein the portions of the FRs when compared to the second reference sequence are unmodified; and a population of second oligonucleotides, each encoding i) at least a portion of a first CDR that has been modified, the first CDR selected from the group consisting of LCDR1, LCDR2 and LCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence and ii) one or more portions of unmodified FRs which are capable of hybridizing to the first oligonucleotides; c) mixing the first oligonucleotides with the population of second oligonucleotides as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VL region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.

【 0 0 7 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

70

- In some embodiments, a method of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: A) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs;
- B) synthesizing a population of first oligonucleotides, each encoding at least a portion of a first CDR selected from the group consisting of HCDR1, HCDR2 and HCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence; and second oligonucleotides encoding i) portions of the FRs of the acceptor VH region, wherein the portions of the FRs when compared to the reference sequence are unmodified and ii) one or more portions of a CDR which are capable of hybridizing to the population of first oligonucleotides; C) mixing the population of first oligonucleotides with the second oligonucleotides as to create overlapping oligonucleotides; and D) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VH region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.
- In other embodiments, a method of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids is provided, comprising: A) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs;
- B) synthesizing a) a population of first oligonucleotides, each encoding at least a portion of a first CDR selected from the group consisting of LCDR1, LCDR2 and LCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence; and b) second oligonucleotides encoding i) portions of the FRs of the acceptor VL region, wherein the portions of the FRs when compared to the reference sequence are unmodified and ii) one or more portions of a CDR which are capable of hybridizing to the population

【 0 0 7 1 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

71

of first oligonucleotides; C) mixing the population of first oligonucleotides with the second oligonucleotides as to create overlapping oligonucleotides; and D) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VL region
5 encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.

In some embodiments, the representation of first and second reference sequences is in electronic form. In some embodiments, the method further comprises the step of
(e) coexpressing the population of altered VH region encoding nucleic acids with a light chain variable, region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of
10 altered heteromeric variable regions. In some embodiments, the synthesizing comprises chemically synthesizing. In some embodiments, the acceptor is human. In some embodiments, the treating of step (d) comprises extension by a polymerase.

In other embodiments, a method of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: a) providing a representation of first
15 and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs, the second reference sequence comprising a VH region; b) synthesizing a population of altered VH region antibody gene sequences, wherein the FRs of the altered VH regions are identical to the FRs of the second reference sequence and at least a first
20 CDR of the altered antibody variable regions has been modified, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR of the first reference sequence.

In some embodiments, a method of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: a) providing a representation of first
25 and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing a population of altered VL region antibody gene sequences, wherein the FRs of the altered VL regions are identical to the FRs of the
30 second reference sequence and at least a first CDR of the altered antibody VL region has been modified, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

72

more positions when compared to the corresponding donor CDR of the first reference sequence.

In some embodiments, the representation of first and second reference sequences is in electronic form. In some embodiments, the method further comprises the step of
5 coexpressing the population of altered VL region encoding nucleic acids with a VH region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions. In some embodiments, the acceptor is human. In some embodiments, the synthesizing involves the use of overlapping oligonucleotides.

In yet other embodiments, a method of constructing a population of altered VH
10 region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: a) providing a representation of a reference amino acid sequence, the reference sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing a population of altered VH region antibody gene sequences, wherein the FRs of the altered VH regions are identical to the FRs of the reference sequence and at least a first CDR of the altered antibody variable
15 regions comprises a random amino acid sequence.

In other embodiments, a method of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: a) providing a representation of a reference amino acid sequence, the reference sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing a population of altered VL region
20 antibody gene sequences, wherein the FRs of the altered VL regions are identical to the FRs of the reference sequence and at least a first CDR of the altered antibody VL regions comprises a random amino acid sequence.

In yet other embodiments, a method of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: a) providing a representation
25 of a reference amino acid sequence, the reference sequence comprising the sequence of a human acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing a population of altered VH region antibody gene sequences, wherein the FRs of the altered VH regions are identical to the FRs of the human reference sequence and at least a first CDR of the altered antibody variable regions comprises a random amino acid sequence. In some
30 embodiments, the representation of the human reference sequence is in electronic form.

In other embodiments, a method of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids is contemplated, comprising: a) providing a representation of a

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

73

reference amino acid sequence, the reference sequence comprising the sequence of a human acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing a population of altered VL region antibody gene sequences, wherein the FRs of the altered VL regions are identical to the FRs of the human reference sequence and at least a first CDR of the altered antibody VL regions comprises a random amino acid sequence.

In some embodiments, the representation of the reference sequence is in electronic form. In some embodiments, the method further comprises the step of coexpressing the population of altered VL region encoding nucleic acids with a VH region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions.

In some embodiments, the synthesizing involves the use of overlapping oligonucleotides. In some embodiments, the CDRs are defined by the Kabat definition.

In some embodiments, one or more FRs are modified simultaneously with the introduction of one or more modified CDRs. In other embodiments, the modified frameworks are adjacent to the modified CDRs.

In some embodiments, the present invention provides methods of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing a) a first population of oligonucleotides, comprising oligonucleotides encoding a modified VH region FR, or portion thereof, wherein the VH region FR, or portion thereof, contains a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the acceptor framework region reference sequence, wherein the framework positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework positions of the first reference sequence; and b) a second population of oligonucleotides, each encoding i) at least one modified CDR, or portion thereof, wherein the modified CDR, or portion thereof, comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence and ii) one or more portions of adjacent FRs which are capable of hybridizing to the first population of oligonucleotides;

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

74

and c) mixing the first and second populations of oligonucleotides so as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed. In certain embodiments, the representation of first and second reference sequences is in electronic form. In other embodiments, the methods further comprise the step of (e) coexpressing the population of altered VH region encoding nucleic acids with a VL region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions. In additional embodiments, the synthesizing comprises chemically synthesizing. In some embodiments, the acceptor is human. In preferred embodiments, the one or more of the diverse population of altered heteromeric variable regions are part of an antibody comprising an Fc region, wherein the Fc region comprises at least one amino acid substitution as compared to a parental polypeptide having an Fc region.

In other embodiments, the present invention provides methods of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing a) a first population of oligonucleotides, comprising oligonucleotides encoding a modified VL region FR, or portion thereof, wherein the VL region framework region, or portion thereof, contains a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the acceptor framework region reference sequence, wherein the framework positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework positions of the first reference sequence; and b) a second population of oligonucleotides, each encoding i) at least one modified CDR, or portion thereof, wherein the modified CDR, or portion thereof, comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence and ii) one or more portions of adjacent FRs which are capable of hybridizing to the first population of oligonucleotides; and c) mixing the first and second populations of oligonucleotides so as

【 0 0 7 5 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

75

to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed. In other embodiments, the representation of first and second reference sequences is in electronic form. In additional embodiments, the methods further comprise

5 the step of (e) coexpressing the population of altered VL region encoding nucleic acids with a heavy chain variable region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions.

In some embodiments, the methods comprise a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence

10 comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing a) a first population of oligonucleotides, comprising oligonucleotides encoding a modified VH region framework region, or

15 portion thereof, wherein the VH region FR, or portion thereof, contains a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the acceptor FR reference sequence wherein the framework positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework positions of the first

20 reference sequence; and b) a second population of oligonucleotides, each encoding i) at least one modified CDR, or portion thereof, wherein the modified CDR, or portion thereof, comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence and ii) one or more portions of adjacent FRs which are capable of hybridizing to the first population of oligonucleotides;

25 and c) mixing the first and second populations of oligonucleotides so as to create overlapping oligonucleotides; and d) extending the overlapping oligonucleotides with a DNA polymerase under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed.

In still other embodiments, the present invention provides methods of constructing

30 a population of altered VL region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

76

region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing a) a first population of oligonucleotides, comprising oligonucleotides encoding a modified VL region FR, or portion thereof, wherein the VL region FR, or portion thereof, contains a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the acceptor FR reference sequence, wherein the framework positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework positions of the first reference sequence; and b) a second population of oligonucleotides, each encoding i) at least one modified CDR, or portion thereof, wherein the modified CDR, or portion thereof, comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence and ii) one or more portions of adjacent FRs which are capable of hybridizing to the first population of oligonucleotides; and c) mixing the first and second populations of oligonucleotides so as to create overlapping oligonucleotides; and d) extending the overlapping oligonucleotides with a DNA polymerase under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed.

In some embodiments, one or more modifications are introduced into the framework, simultaneously with the introduction of one or more modified CDRs. The modified CDRs may comprise one or more amino acid alterations in comparison with the corresponding CDR of a reference sequence. In certain embodiments, the methods of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids, comprises: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing i) a first population of oligonucleotides, each encoding at least one modified CDR, wherein the modified CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence; and ii) a second population of oligonucleotides, comprising oligonucleotides encoding modified portions

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

77

- of a VH region framework, the modified portion containing a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the acceptor framework region reference sequence, wherein the framework positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework positions of the first reference sequence; c) mixing the first and second populations of oligonucleotides under conditions such that at least a portion of the oligonucleotides hybridize so as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed. In certain embodiments, the representation of first and second reference sequences is in electronic form. In further embodiments, the methods further comprise the step of (e) coexpressing the population of altered VH region encoding nucleic acids with a VL region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions. In other embodiments, the acceptor is human.
- In other embodiments, the present invention provides methods constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; b) synthesizing i) a first population of oligonucleotides, each encoding at least one modified CDR, wherein the modified CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence; and ii) a second population of oligonucleotides, comprising oligonucleotides encoding modified portions of a VL region framework, the modified portion containing a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the acceptor FR reference sequence, wherein the framework positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework positions of the first reference sequence; c) mixing the first and second populations of oligonucleotides under conditions such that at least a portion of the oligonucleotides hybridize so as to create overlapping oligonucleotides; and

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

78

d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed.

In certain embodiments, the antibodies or antibody fragments comprising an Fc variant and an altered heavy chain variant region may be generated. For example, in some
5 embodiments, the present invention provides methods of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and
10 ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; b) synthesizing A) first oligonucleotides encoding portions of the FRs of the acceptor VH region, wherein the portions of the FRs when compared to the second reference sequence are unmodified; and B) a population of second oligonucleotides, each encoding i) at least a portion of a first CDR that has been modified, the first CDR selected from the group
15 consisting of HCDR1, HCDR2 and HCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence and ii) one or more portions of unmodified FRs which are capable of hybridizing to the first oligonucleotides; c) mixing the first oligonucleotides with the population of second oligonucleotides as to create overlapping
20 oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VH region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence. In some embodiments, the methods further comprise the step of coexpressing the population of altered VH region encoding nucleic
25 acids with a VL region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions.

In other embodiments, the present invention provides methods of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference
30 sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VL

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

79

- region comprising FRs b) synthesizing a) first oligonucleotides encoding portions of the FRs of the acceptor VL region, wherein the portions of the FRs when compared to the second reference sequence are unmodified; and b) a population of second oligonucleotides, each encoding i) at least a portion of a first CDR that has been
- 5 modified, the first CDR selected from the group consisting of LCDR1, LCDR2 and LCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence and ii) one or more portions of unmodified FRs which are capable of hybridizing to the first oligonucleotides; c) mixing the first oligonucleotides with the
- 10 population of second oligonucleotides as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VL region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.
- 15 In other embodiments, the present invention provides methods of constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids, comprising: A) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat
- 20 and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising FRs; B) synthesizing a) a population of first oligonucleotides, each encoding at least a portion of a first CDR selected from the group consisting of HCDR1, HCDR2 and HCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first
- 25 reference sequence; and b) second oligonucleotides encoding i) portions of the FRs of the acceptor VH region, wherein the portions of the FRs when compared to the reference sequence are unmodified and ii) one or more portions of a CDR which are capable of hybridizing to the population of first oligonucleotides; C) mixing the population of first oligonucleotides with the second oligonucleotides as to create overlapping
- 30 oligonucleotides; and D) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleic acids is constructed, wherein the

【 0 0 8 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

80

FRs encoded by the altered VH region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.

In certain embodiments, the methods further comprise the step of coexpressing the population of altered VH region encoding nucleic acids with a VL region encoding
5 nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions.

In other embodiments, the present invention provides methods of constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids, comprising: A) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region
10 comprising i) FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising FRs; B) synthesizing a) a population of first oligonucleotides, each encoding at least a portion of a first CDR selected from the group consisting of LCDR1, LCDR2 and LCDR3, wherein the modified first CDR comprises a different amino acid at
15 one or more positions when compared to the corresponding donor CDRs of the first reference sequence; and b) second oligonucleotides encoding i) portions of the FRs of the acceptor VL region, wherein the portions of the FRs when compared to the reference sequence are unmodified and ii) one or more portions of a CDR which are capable of hybridizing to the population of first oligonucleotides; C) mixing the population of first
20 oligonucleotides with the second oligonucleotides as to create overlapping oligonucleotides; and D) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding nucleic acids is constructed, wherein the FRs encoded by the altered VL region encoding nucleic acids are unmodified with respect to the second reference sequence.

25 In other embodiments, the present invention provides methods of improving the binding affinity of a mutated humanized antibody variable region, comprising:
a) providing a nucleic acid sequence encoding a first mutated humanized antibody variable region, the mutated variable region comprising (i) a wild type human antibody framework, (ii) three non-human heavy chain CDRs, and (iii) three non-human light
30 chain CDRs, wherein the CDRs are defined by the combined definitions of Kabat and Chothia, wherein at least one of the light chain CDRs is a mutation-containing light chain CDR at least one different amino acid at at least one position when compared to the

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

81

corresponding wild type non-human CDR, and wherein the first mutated antibody variable region has a higher binding affinity than the corresponding non-mutated antibody variable region; b) mutating the nucleic acid sequence encoding the first mutated antibody variable region under conditions such that a second mutated humanized antibody variable region is encoded, the second mutated humanized antibody variable region comprising at least one additional different amino acid at least one position in the mutation-containing light chain CDR, the additional mutation in combination with the first mutation resulting in higher binding affinity. In some embodiments, the mutation-containing light chain CDR of the first mutated humanized antibody variable region is CDR3 (LCDR3).

10 In other embodiments, at least one of the non-human heavy chain CDRs of the first mutated humanized antibody variable region comprises a mutation, such that a different amino acid is encoded at at least one position when compared to the corresponding wild type non-human CDR. In additional embodiments, the heavy chain CDR mutation is in HCDR3.

15 In some embodiments, the present invention provides methods of simultaneously modifying at least one CDR and at least one FR while constructing a population of altered VH region encoding nucleic acids, comprising: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VH region, the donor variable region comprising
20 i) four FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VH region comprising four FRs, as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; b) synthesizing i) for every FR to be modified, a population of oligonucleotides, each encoding a modified FR, or portion thereof, the modified FR or
25 portion thereof, containing a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the corresponding framework region in the acceptor VH region reference sequence, wherein the FR positions that are changed are selected from among the acceptor framework positions of the second reference sequence that differ at the corresponding position compared to the donor framework region positions of the first
30 reference sequence; and ii) for every CDR to be modified, a population of oligonucleotides, each encoding a modified CDR, or portion thereof, wherein the modified CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

82

to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence; and iii) for each of any remaining and unmodified FRs, oligonucleotides encoding the FR, or portion thereof, having the same sequence as the corresponding FR of the second reference acceptor sequence; and iv) for each of any remaining and unmodified CDRs, oligonucleotides encoding the CDR, or portion thereof, having the same sequence as the corresponding CDR of the first reference donor sequence, wherein, individual oligonucleotides from (i) through (iv) which encode adjacent portions of the VH region have overlapping sequences at their termini; and c) mixing the oligonucleotides and populations of oligonucleotides synthesized in step b) under conditions such that the overlapping sequences of individual oligonucleotides hybridize so as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VH region encoding nucleotides is formed. In certain embodiments, the representation of first and second reference sequences is in electronic form. In further embodiments, the framework region to be modified is selected from the group consisting of HFR1, HFR2 and HFR3. In other embodiments, the CDR to be modified is HCDR3. In other embodiments, the method further comprises the step of e) coexpressing the population of VH region encoding nucleic acids with a VL region encoding nucleic acid so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions. In different embodiments, the method further comprises the step of e) coexpressing the population of VH region encoding nucleic acids with a population of VL region encoding nucleic acids so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions.

In other embodiments, the methods of simultaneously modifying at least one CDR and at least one FR while constructing a population of altered VL region encoding nucleic acids are employed, wherein said method comprises: a) providing a representation of first and second reference amino acid sequences, the first reference amino acid sequence comprising the sequence of a donor VL region, the donor variable region comprising i) four FRs and ii) three CDRs as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; the second reference amino acid sequence comprising the sequence of an acceptor VL region comprising four FRs, as defined by the combined definitions of Kabat and Chothia; b) synthesizing i) for every FR to be modified, a population of oligonucleotides, each encoding a modified FR, or portion thereof, the modified FR, or

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

83

portion thereof, containing a plurality of changed amino acids at one or more positions when compared to the corresponding framework region in the acceptor VL region reference sequence, wherein the FR positions that are changed are selected from among the acceptor FR positions of the second reference sequence that differ at the

5 corresponding position compared to the donor FR positions of the first reference sequence; and ii) for every CDR to be modified, a population of oligonucleotides, each encoding a modified CDR, or portion thereof, wherein the modified CDR comprises a different amino acid at one or more positions when compared to the corresponding donor CDR amino acid reference sequence; and iii) for each of any remaining and unmodified

10 FR regions, oligonucleotides encoding the FR, or portion thereof, having the same sequence as the corresponding FR of the second reference acceptor sequence; and iv) for each of any remaining and unmodified CDRs, oligonucleotides encoding the CDR, or portion thereof, having the same sequence as the corresponding CDR of the first reference donor sequence, wherein, individual oligonucleotides from (i) through (iv) which encode

15 adjacent portions of the VL region have overlapping sequences at their termini, and

c) mixing the oligonucleotides and populations of oligonucleotides synthesized in step b) under conditions such that the overlapping sequences of individual oligonucleotides hybridize so as to create overlapping oligonucleotides; and d) treating the overlapping oligonucleotides under conditions such that a population of altered VL region encoding

20 nucleotides is formed. In certain embodiments, the methods further comprise the step of coexpressing the population of VL region encoding nucleic acids with a population of VH region encoding nucleic acids so as to produce a diverse population of altered heteromeric variable regions.

25 (v) *Multispecific antibodies*

The present invention provides multispecific antibodies comprising a variant Fc region. Multispecific antibodies have binding specificities for at least two different antigens. While such molecules normally will only bind two antigens (i.e., bispecific antibodies, BsAbs), antibodies with additional specificities such as trispecific antibodies

30 are encompassed by this expression when used herein. Examples of BsAbs include, but are not limited to, those with one arm directed against a tumor cell antigen and the other arm directed against a cytotoxic trigger molecule such as anti-Fc γ RI/anti-CD 15, anti-pl

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

84

- 85HER2/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-malignant B-cell (D1D0), anti-CD3/anti-pl
85HER2, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-renal cell carcinoma, anti-CD3/anti-OVCAR-
3, antiCD3/L-D I (anti-colon carcinoma), anti-CD3/anti-melanocyte stimulating hormone
analog, anti EGF receptor/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMAI, anti-CD3/anti-CD19, anti-
5 CD3/MoV18, anti-neural cell adhesion molecule (NCAM)/anti-CD3, anti-folate binding
protein (FBP)/anti-CD3, anti-pan carcinoma associated antigen (AMOC-31)/anti-CD3;
BsAbs with one arm which binds specifically to a tumor antigen and one arm which binds
to a toxin such as anti-saporin/anti-id-1, antiCD22/anti-saporin, anti-CD7/anti-saporin,
anti-CD38/anti-saporin, anti-CEA/anti-ricin A chain, anti-interferon-α (IFN-α)/anti-
10 hybridoma idiotype, anti-CEA/anti-vinca alkaloid; BsAbs for converting enzyme
activated prodrugs such as anti-CD30/anti-alkaline phosphatase (which catalyzes
conversion of mitomycin phosphate prodrug to mitomycin alcohol); BsAbs which can be
used as fibrinolytic agents such as anti-fibrin/anti-tissue plasminogen activator (tPA),
anti-fibrin/antiurokinase-type plasminogen activator (uPA); BsAbs for targeting immune
15 complexes to cell surface receptors such as anti-low density lipoprotein (LDL)/anti-FcR
(e.g., FcγRI, FcγRII or FcγRIII); BsAbs for use in therapy of infectious diseases such as
anti-CD3/anti-herpes simplex virus (HSV), anti-T-cell receptor: CD3 complex/anti-
influenza, anti-FcγR/anti-HIV; BsAbs for tumor detection in vitro or in vivo such as anti-
CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-pl85HER2/anti-hapten; BsAbs as vaccine
20 adjuvants; and BsAbs as diagnostic tools such as anti-rabbit IgG/anti-ferritin, anti-horse
radish peroxidase (HRP)/anti-hormone, anti-somatostatin/anti-substance P, anti-
HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-p-galactosidase.

- Examples of trispecific antibodies include, but are not limited to, anti-CD3/anti-
CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 and anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.
25 Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments
(e.g., F(ab')₂ bispecific antibodies). Methods for making bispecific antibodies are known
in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the
coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains
have different specificities (e.g., Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Because
30 of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas
(quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which
only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule may be

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

85

performed by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

In another approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance. In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm (*see, e.g.*, WO 94/04690). According to another approach described in W096/27011 the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. specific antibodies also include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin.

B. Immunoadhesin Molecules

The present invention also provides immunoadhesin molecules comprising a variant Fc region. One type of immunoadhesin design combines the binding domain(s) of the adhesin (e.g., the extracellular domain (ECD) of a receptor) with the Fc region of an immunoglobulin heavy chain (e.g., a variant Fc region). Ordinarily, when preparing the immunoadhesins of the present invention, nucleic acid encoding the binding domain of

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

86

the adhesin will be fused C-terminally to nucleic acid encoding the N-terminus of an immunoglobulin constant domain sequence, however N-terminal fusions are also possible.

Typically, in such fusions the encoded chimeric polypeptide will retain at least
5 functionally active hinge, CH2 and CH3 domains of the constant region of an immunoglobulin heavy chain. Fusions are also made to the C-terminus of the Fc portion of a constant domain, or immediately N-terminal to the CH1 of the heavy chain or the corresponding region of the light chain. The precise site at which the fusion is made is not critical; particular sites are well known and may be selected in order to optimize the
10 biological activity, secretion, or binding characteristics of the immunoadhesin.

In some embodiments, the adhesin sequence is fused to the N-terminus of the variant Fc region of immunoglobulin G1 . It is possible to fuse the entire heavy chain constant region to the adhesin sequence. However, in preferred embodiments, a sequence beginning in the hinge region just upstream of the papain cleavage site which defines IgG
15 Fc chemically (i.e., residue 216, taking the first residue of heavy chain constant region to be 114), or analogous sites of other immunoglobulins is used in the fusion. In certain preferred embodiments, the adhesin amino acid sequence is fused to (a) the hinge region and CH2 and CH3 or (b) the CH1, hinge, CH2 and CH3 domains, of an IgG heavy chain. In some embodiments, the immunoadhesins are bispecific. Alternatively, the adhesin
20 sequences can be inserted between immunoglobulin heavy chain and light chain sequences, such that an immunoglobulin comprising a chimeric heavy chain is obtained. In such embodiments, the adhesin sequences may be fused to the 3' end of an immunoglobulin heavy chain in each arm of an immunoglobulin, either between the hinge and the CH2 domain, or between the CH2 and CH3 domains (*see, e.g.,*
25 Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991).

Although the presence of an immunoglobulin light chain is not required in the immunoadhesins of the present invention, an immunoglobulin light chain might be present either covalently associated to an adhesin-immunoglobulin heavy chain fusion polypeptide, or directly fused to the adhesin. In the former case, DNA encoding an
30 immunoglobulin light chain is typically coexpressed with the DNA encoding the adhesin-immunoglobulin heavy chain fusion protein. Upon secretion, the hybrid heavy chain and the light chain will be covalently associated to provide an immunoglobulin-like structure

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

87

comprising two disulfide-linked immunoglobulin heavy chain-light chain pairs. Methods suitable for the preparation of such structures are, for example, disclosed in U.S. Patent No. 4,816,567.

5 In preferred embodiments, immunoadhesins are constructed by fusing the cDNA sequence encoding the adhesin portion in-frame to an immunoglobulin cDNA sequence. However, fusion to genomic immunoglobulin fragments can also be used. Generally, the latter type of fusion requires the presence of Ig regulatory sequences for expression. cDNAs encoding IgG heavy chain constant regions can be isolated based on published sequences from cDNA libraries derived from spleen or peripheral blood lymphocytes, by
10 hybridization or by PCR techniques. The cDNAs encoding the "adhesin" and the immunoglobulin parts of the immunoadhesin may be inserted in tandem into a plasmid vector that directs efficient expression in the chosen host cells.

Altered Half Life of Variant Polypeptides

15 The neonatal Fc receptor "FcRn" is a major histocompatibility complex (MHC) homolog which not only delivers IgGs across the maternofetal barrier during gestation, but is also involved in the regulation of IgG serum half life. For a recent FcRn review *see* Ghetie, V and E.S. Ward, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766, 2000. FcRn binds to IgG in a pH-dependent manner with binding occurring at slightly acidic pHs and
20 little or no detectable binding at pH 7.4. It is postulated that IgGs are taken up by FcRn-expressing cells and enter acidic endosomes where the FcRn-IgG interaction occurs. Then the IgGs are transported to the cell surface and released at near neutral pH. IgGs that do not bind FcRn after uptake into cells enter lysosomal compartments and are degraded. Consistent with this model is the hypothesis that polypeptides comprising a
25 variant Fc region which binds to FcRn with increased affinity has a longer serum half life than those with a lesser affinity.

The role of FcRn as an IgG transporter indicates that variant Fc regions with altered affinity to FcRn may have therapeutic utility either in the context of a monoclonal antibody or when operably attached to a heterologous protein, i.e., a non-antibody.
30 Therapeutic polypeptides which would benefit by being cleared quickly from the subject or patient or by not being transported across a placental membrane, e.g., radiolabeled polypeptides, would benefit by being operably attached to an Fc region which displays

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

88

diminished FcRn binding affinity. Alternatively, polypeptides which would benefit from having a longer serum half life and therefore need to be administered fewer times or by being transported across a placental membrane would preferentially be operably attached to an Fc region which displays enhanced FcRn binding affinity (*see* Tables 2, 5 and 6).

- 5 Numerous combinations of Fc characteristics are contemplated, e.g., an Fc region with enhanced FcRn binding affinity but with little or no CDC or ADCC activity may be generated by incorporating one or more Fc amino acid substitutions which enhance FcRn binding affinity as listed in Table 2 into e.g., an IgG4 parent Fc region, or into an IgG1 parent Fc region in combination with amino acid substitution that diminish CDC and
- 10 ADCC activity.

- Preferred polypeptides which would benefit from an increased serum half life by being operably attached to a variant Fc region of the invention which displays enhanced FcRn binding affinity as compared to the parent polypeptide are mammalian therapeutic polypeptides including molecules such as, e.g., renin; a growth hormone; human growth
- 15 hormone; bovine growth hormone; growth hormone releasing factor; ghrelin; parathyroid hormone; thyroid stimulating hormone; lipoprotein; insulin A-chain; insulin B-chain; α 1-antitrypsin; PAI-1; proinsulin; thrombopoietin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagons; clotting factors such as factor VIIIc, factor IX, tissue factor, and von Willebrand's factor; anti-clotting factors such as Protein C; atrial
 - 20 natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen activator, such as urokinase or human urine or tissue-type plasminogen activator (t-PA); bombesin; thrombin; hemopoietic growth factor; interleukins, e.g., IL-1 to IL-10, IL-20; tumor necrosis factor-alpha and -beta; enkephalinase; a serum albumin such as human serum albumin; mullerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-chain; prorelaxin; mouse gonadotropin-associated
 - 25 peptide; a microbial protein, such as beta-lactamase; Dnase; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); receptors for hormones or growth factors; integrin; protein A or D; rheumatoid factors; a neurotrophic factor such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, -4, -5, or -6 (NT-3, NT-4, NT-5, or NT-6), or a nerve growth factor such as NGF-beta, cardiotrophins (cardiac hypertrophy factor)
 - 30 such as cardiotrophin-1 (CT-1); platelet-derived growth factor (PDGR); fibroblast growth factor such as aFGF and bFGF, epidermal growth factor (EGF) or its receptor; transforming growth factor (TGF) such as TGF-alpha and TGF-beta, including TGF- β 1,

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

89

TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 or TGF- β 5; insulin-like growth factor-I and -II; des(1-3)-IGF-I (brain IGF-I), insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins such as CD-3, CD-4, CD-8, and CD-19; erythropoietin; osteoinductive factors; immunotoxins; a bone morphogenetic protein, a growth differentiation factor (e.g., GDF-8); an interferon such as interferon-alpha, -beta, and -gamma; colony stimulating factors (CSFs), e.g., M-CSF; GM-CSF, and G-CSF; an anti-HER-2 antibody without a native Fc region of an IgG; an anti-RSV antibody without a native Fc region of an IgG; superoxide dismutase; T-cell receptors; surface membrane proteins; decay accelerating factor; viral antigen such as, for example, a portion of the HIV-1 envelop; transport protein; homing receptors; addressins; regulatory proteins; antibodies without a native Fc region of an IgG; and fragments or precursors of any of the above-listed polypeptides.

The variant Fc region comprising an amino acid substitution of the invention which confers an altered serum half-life on the polypeptide (i.e., enhanced FcRn binding affinity) to which it is operably attached is preferably operably attached to the carboxy- or amino-terminus of the polypeptide of interest thereby generating a fusion protein.

Nucleic Acid Sequences Encoding Variant Fc Regions

The present invention also provides nucleic acid sequences encoding variant Fc regions, as well as compositions, vectors, and host cells comprising nucleic acid sequences encoding variant Fc regions. The present invention also provides recombinant methods for producing variant Fc region.

Generally, for recombinant production of variants, nucleic acid encoding the variant is isolated and inserted into a vector. Host cells may be transfected with the vector, thereby allowing the nucleic acid sequence to be amplified, and/or the variant peptide produced. Nucleic acid sequences encoding the peptide variants of the present invention may be isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to nucleic acid encoding the variant). Generally, the nucleic acid sequence encoding the variant is operably linked to other elements, such as a signal sequence (e.g., secretory signal sequences), an origin of replication, at least one marker gene, an enhancer, a promoter, or a transcription terminator. In certain embodiments, host cells are stably transfected with nucleic acid encoding a variant to generate a cell line expressing a particular variant. In preferred

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

90

embodiments, the variants are expressed in CHO, NSO, Sp2/0, PER.C6, or HEK293 cells. Recombinant methods are well known in the art.

Nucleic acid sequences may be mutated such that variant Fc regions may be produced. For example, a nucleic acid sequence encoding a parental Fc region (e.g., SEQ ID NOs: 1-12) may be mutated such that at least one amino acid change results when the nucleic acid sequence is expressed. Also, nucleic acid sequences encoding at least a portion of a parental Fc region may be mutated to produce amino acid sequences comprising at least a portion of a variant Fc region.

In certain embodiments, codon-based synthesis is employed to generate mutated sequences. Examples of codon-based synthesis include, for example, those described in U.S. Patents 5,264,563, 5,523,388 and 5,808,022. Briefly, codon-based synthesis may be performed by sequentially coupling monomers on separate supports to form at least two different tuplets. The coupling may be performed in separate reaction vessels, then mixing the supports from the reaction vessels, and dividing the mixed supports into two or more separate reaction vessels, and repeating the coupling, mixing and dividing steps one or more times in the reaction vessels, ending with a mixing or dividing step. Additionally, the oligonucleotides can be cleaved from the supports.

Therapeutic Uses and Formulations

In some embodiments, the present invention provides therapeutic formulations comprising the variants described herein. It is not intended that the present invention be limited by the particular nature of the therapeutic composition. For example, such compositions can include a variant polypeptide (or portion thereof), provided together with physiologically tolerable liquids, gels, solid carriers, diluents, adjuvants and excipients, and combinations thereof (*See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)).

In addition, variant polypeptides may be used together with, prior to, or subsequent to other therapeutic agents, including, but not limited to, salicylates, steroids, immunosuppressants, antibodies or antibiotics. Particular therapeutic agents which may be used with the variants of the present invention include, but are not limited to, the following agents azobenzene compounds (U.S. Pat. No. 4,312,806), benzyl-substituted rhodamine derivatives (U.S. Pat. No. 5,216,002), zinc L-carnosine salts (U.S. Pat. No.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

91

5,238,931), 3-phenyl-5-carboxypyrazoles and isothiazoles (U.S. Pat. No. 5,294,630) IL-10 (U.S. Pat. No. 5,368,854), quinoline leukotriene synthesis inhibitors (U.S. Pat. No. 5,391,555), 2'-halo-2'-deoxyadenosine (U.S. Pat. No. 5,506,213), phenol and benzamide compounds (U.S. Pat. No. 5,552,439), tributyrin (U.S. Pat. No. 5,569,680), certain peptides (U.S. Pat. No. 5,756,449), omega-3 polyunsaturated acids (U.S. Pat. No. 5,792,795), VLA-4 blockers (U.S. Pat. No. 5,932,214), prednisolone metasulphobenzoate (U.S. Pat. No. 5,834,021), cytokine restraining agents (U.S. Pat. No. 5,888,969), and nicotine (U.S. Pat. No. 5,889,028).

Variant polypeptides may be used together with agents which reduce the viability or proliferative potential of a cell. Agents which reduce the viability or proliferative potential of a cell can function in a variety of ways including, for example, inhibiting DNA synthesis, inhibiting cell division, inducing apoptosis, or inducing non-apoptotic cell killing. Specific examples of cytotoxic and cytostatic agents, include but are not limited to, pokeweed antiviral protein, abrin, ricin, and each of their A chains, doxorubicin, cisplatin, iodine-131, yttrium-90, rhenium-188, bismuth-212, taxol, 5-fluorouracil VP-16, bleomycin, methotrexate, vindesine, adriamycin, vincristine, vinblastine, BCNU, mitomycin and cyclophosphamide and certain cytokines such as TNF- α and TNF- β . Thus, cytotoxic or cytostatic agents can include, for example, radionuclides, chemotherapeutic drugs, proteins, and lectins.

Therapeutic compositions may contain, for example, such normally employed additives as binders, fillers, carriers, preservatives, stabilizing agents, emulsifiers, buffers and excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions typically contain 1%-95% of active ingredient, preferably 2%-70% active ingredient.

The variant polypeptides of the present invention can also be mixed with diluents or excipients which are compatible and physiologically tolerable. Suitable diluents and excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, or the like, and combinations thereof. In addition, if desired, the compositions may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, stabilizing or pH buffering agents.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

92

In some embodiments, the therapeutic compositions of the present invention are prepared either as liquid solutions or suspensions, as sprays, or in solid forms. Oral formulations usually include such normally employed additives such as binders, fillers, carriers, preservatives, stabilizing agents, emulsifiers, buffers and excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations, or powders, and typically contain 1%-95% of active ingredient, preferably 2%-70%. One example of an oral composition useful for delivering the therapeutic compositions of the present invention is described in U.S. Pat. No. 5,643,602.

Additional formulations which are suitable for other modes of administration, such as topical administration, include salves, tinctures, creams, lotions, transdermal patches, and suppositories. For salves and creams, traditional binders, carriers and excipients may include, for example, polyalkylene glycols or triglycerides. One example of a topical delivery method is described in U.S. Pat. No. 5,834,016. Other liposomal delivery methods may also be employed (*See*, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,851,548 and 5,711,964).

The formulations may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

Sustained-release preparations may also be prepared. Suitable examples of sustained release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the variant polypeptide, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsule. Examples of sustained-release matrices include, but are not limited to, polyesters, hydrogels (for example, poly (2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly (vinylalcohol)), polylactides, copolymers of L-glutamic acid and γ -ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

93

.glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods.

The variant polypeptides of the present invention may be used to treat a subject. Such treatment may be administered to a subject with a disease, or may be administered prophylactically to a subject (e.g., to a subject predisposed to a disease). Example of conditions that may be treated include, but are not limited to, cancer (e.g., where the variant polypeptide binds the HER2 receptor, CD20 or vascular endothelial growth factor (VEGF)); allergic conditions such as asthma (with an anti-IgE antibody); and LFA-1-mediated disorders (e.g., where the variant polypeptide is an anti-LFA-I or anti-ICAM-I antibody) etc.

In preferred embodiments, the polypeptide variants used to treat subjects comprise antibodies or immunoadhesins. Also in preferred embodiments, the diseases treated are antibody or immunoadhesin responsive diseases. Examples of antibody responsive diseases include diseases and medical conditions such as: lymphoma (shown to be treatable with RITUXAN, an anti-CD20 antibody), infectious disease (shown to be treatable with SYNAGIS, an antibody directed to the F protein of respiratory syncytial virus), kidney transplant (ZENAPAX, an anti-IL-2 receptor antibody, has shown to be helpful), Crohn's disease and rheumatoid arthritis (shown to be treatable with REMICADE, an anti-TNF α antibody), breast carcinoma (shown to be treatable with HERCEPTIN, an anti-20 HER2 antibody), and colon cancer (shown to be treatable with EDRECOLOMAB, an anti-17-1A antibody). Variant polypeptides used for treating cancer would preferably comprise an Fc region amino acid substitution of the invention which confers enhanced ADCC activity and or enhanced CDC activity upon the polypeptide.

In some embodiments, a variant polypeptide with improved ADCC activity is employed in the treatment of diseases or disorders where destruction or elimination of tissue or foreign microorganisms is desired. For example, the variant may be used to treat cancer; inflammatory disorders; infections (e.g., bacterial, viral, fungal or yeast infections); and other conditions (such as goiter) where removal of tissue is desired. In other embodiments, the variant polypeptide has diminished ADCC activity. Such variants may be used to treat diseases or disorders where an Fc region-containing polypeptide with long half-life is desired, but the polypeptide preferably does not have

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

94

undesirable effector function(s). For example, the Fc region-containing polypeptide may be an anti-tissue factor (TF) antibody; anti-IgE antibody; and anti-integrin antibody (e.g., an anti- α 437 antibody). The desired mechanism of action of such Fc region-containing polypeptides may be to block ligand-receptor binding pairs. Moreover, the Fc-region
5 containing polypeptide with diminished ADCC activity may be an agonist antibody.

Variant polypeptides used for treating cancer would preferably comprise an Fc region amino acid substitution of the invention (*see*, e.g., Table 2 herein) which confers enhanced ADCC activity and or enhanced CDC activity upon the polypeptide.

The variant polypeptides of the present invention may be administered by any
10 suitable means, including parenteral, subcutaneous, topical, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, intralesional administration (e.g., for local immunosuppressive treatment). Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the polypeptide variant is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the
15 variant polypeptide. Preferably, the dosing is given by injections, most preferably intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of polypeptide variant will depend on the type of disease to be treated, the severity and course of the
20 disease, whether the variant polypeptide is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the polypeptide variant, and the discretion of the attending physician. The variant polypeptide is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

For example, depending on the type and severity of the disease, about 0.1 μ g/kg to
25 15 mg/kg (e.g., 0.120 mg/kg) of variant polypeptide is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 μ g/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the
30 treatment is sustained until the symptoms are sufficiently reduced or eliminated. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays, and may be used to adjust dosage to achieve a therapeutic effect.

【 0 0 9 5 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

95

These suggested amounts of variant polypeptide are subject to a great deal of therapeutic discretion. The key factor in selecting an appropriate dose and scheduling is the result obtained. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the antibody, the particular type of antibody, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners.

A therapeutically effective amount of a variant polypeptide to be administered is the dosage level required for a patient such that the symptoms of the disease being treated are reduced. Additionally, a therapeutically effective amount may refer to the amount of therapeutic agent sufficient to delay or minimize or prevent the onset of disease, e.g., delay or minimize or prevent the spread of cancer. A therapeutically effective amount may refer to the amount of therapeutic agent (e.g., variant polypeptide) may also refer to the amount of the therapeutic agent that provides a therapeutic benefit in the treatment or management of a disease in a subject. Further, a therapeutically effective amount with respect to a therapeutic agent of the invention refers to the amount of therapeutic agent alone, or in combination with other therapies, that provides a therapeutic benefit in the treatment or management of a disease in a subject. The variant polypeptide need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of variant polypeptide present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. A first prophylactic or therapeutic agent (e.g., variant polypeptide or polypeptide comprising a variant Fc region of the invention or functional fragment thereof) can be administered prior to, concomitantly with, or subsequent to the administration of a second prophylactic or therapeutic agent to a subject with a disorder.

Therapeutic agents of the invention may be frozen or lyophilized for storage and reconstituted in a suitable sterile carrier prior to use. Lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss. Dosages may have to be adjusted to compensate. Generally, pH between 6 and 8 is preferred.

The use of a monoclonal antibody comprising a variant Fc region of the present invention for treating or preventing of at least one of the aforementioned disorders (e.g., cancer) in which the antigen to which the monoclonal antibody binds is detrimental or

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

96

which benefits from decreased levels of the antigen is contemplated herein. Additionally, the use of an antibody comprising a variant Fc region of the present invention for use in the manufacture of a medicament for the treatment of at least one of the aforementioned disorders is contemplated.

5 As used herein, the terms "treatment", "treating", and the like, refer to obtaining a desired pharmacologic and/or physiologic effect. The effect may be prophylactic in terms of completely or partially preventing a disease or symptom thereof and/or may be therapeutic in terms of a partial or complete cure for a disease and/or adverse affect attributable to the disease. "Treatment", as used herein, includes administration of a
10 compound of the present invention for treatment of a disease or condition in a mammal, particularly in a human, and includes: (a) preventing the disease from occurring in a subject which may be predisposed to the disease but has not yet been diagnosed as having it; (b) inhibiting the disease, i.e., arresting its development; and (c) relieving the disease, i.e., causing regression of the disease or disorder or alleviating symptoms or
15 complications thereof. Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.

20

Anti-CD20 Antibodies

An anti-CD20 antibody comprising a variant Fc region of the present invention is contemplated to fall within the scope of the invention (*see*, e.g., Example 4 and Figure 4 herein). In one embodiment, an anti-CD20 antibody comprises a variant Fc region of the
25 invention, or portion thereof comprising the amino acid substitution, as listed in Tables 1-10 herein, the anti-CD20 antibody may further comprise a peptide with the sequence shown in SEQ ID NO: 13, 14, 15 or 16. In another embodiment, an anti-CD20 antibody comprises a variant Fc region of the invention, or portion thereof comprising the amino acid substitution, as listed in Tables 1-10 herein, and further comprises peptides with the
30 sequences shown in:

- a) SEQ ID NO: 13 and SEQ ID NO: 14;
- b) SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 16;

【 0 0 9 7 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

97

c) SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 and 22; or

d) SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 and 28.

More preferably, an anti-CD20 antibody of the invention comprises a variant Fc region, or portion thereof, comprising amino acid substitution(s) selected from the group

5 consisting of:

a) 247I and 339D;

b) 247I and 339Q; and

c) 378D;

and further comprises a variable region comprising polypeptides with the sequences

10 selected from the group consisting of:

a) SEQ ID NO: 13 and SEQ ID NO: 14;

b) SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 16;

c) SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 and 22; and

d) SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 and 28.

15

Additional Variant Fc Region Uses

The variants, and nucleic acid sequences encoding variants, of the present invention may be used in many ways. For example, variants of the present invention may be used in drug screening assays. For example, candidate compounds may be evaluated

20 for their ability to alter or interfere with Fc effector functions by contacting a variant with the candidate compound and determining binding of the candidate compound to the variant. The variant may be immobilized using methods known in the art such as binding a GST-variant fusion protein to a polymeric bead containing glutathione. A chimeric gene encoding a GST fusion protein is constructed by fusing DNA encoding the variant

25 of interest to the DNA encoding the carboxyl terminus of GST (*See, e.g., Smith et al., Gene* 67:31 [1988]). The fusion construct is then transformed into a suitable expression system (e.g., *E. coli* XA90) in which the expression of the GST fusion protein can be induced with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Induction with IPTG should yield the fusion protein as a major constituent of soluble, cellular proteins. The fusion

30 proteins can be purified by methods known to those skilled in the art, including purification by glutathione affinity chromatography. Binding of the candidate

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

98

compound to the variant is correlated with the ability of the compound to disrupt the one or more effector functions.

In another screening method, either the variant or a selected FcR is immobilized using methods known in the art, such as adsorption onto a plastic microtiter plate or specific binding of a GST-fusion protein to a polymeric bead containing glutathione. For example, GST-variant is bound to glutathione-Sepharose beads. The immobilized variant is then contacted with an FcR and a candidate compound. Unbound peptide is then removed and the complex solubilized and analyzed to determine the amount of bound labeled peptide. A decrease in binding is an indication that the candidate compound inhibits the interaction of variant with the FcR. This screening method is particularly useful with variants of the present invention that show an increased level of A variation of this method allows for the screening of compounds that are capable of disrupting a previously-formed variant/Fc receptor complex. For example, in some embodiments a complex comprising a variant bound to an FcR is immobilized as described above and contacted with a candidate compound. The dissolution of the complex by the candidate compound correlates with the ability of the compound to disrupt or inhibit the interaction between the variant being tested and the FcR being. In this regard, compounds with therapeutic potential (e.g., in humans) may be identified (e.g., compounds useful in treating human disease, such as autoimmune diseases).

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to variant peptides and is described in detail in WO 84/03564. Briefly, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are then reacted with variant peptides and washed. Bound variant peptides are then detected by methods well known in the art.

Another technique uses antibodies directed to variant peptides. Such antibodies capable of specifically binding to variant peptides compete with a test compound for binding to a given variant. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide that shares one or more antigenic determinants of the variant peptide.

The present invention contemplates many other means of screening compounds. The examples provided above are presented merely to illustrate a range of techniques

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

99

available. One of ordinary skill in the art will appreciate that many other screening methods can be used.

In particular, the present invention contemplates the use of cell lines transfected with nucleic acid encoding at least one variant Fc region for screening compounds for activity, and in particular to high throughput screening of compounds from combinatorial libraries (e.g., libraries containing greater than 10^4 compounds). The cell lines of the present invention can be used in a variety of screening methods.

The variants of the present invention may be used as an affinity purification agent. For example, the variant may be immobilized on a solid phase such a Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized variant is then contacted with a sample containing the antigen to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the antigen to be purified, which is bound to the immobilized polypeptide variant. Finally, the support is washed with another suitable solvent, such as glycine buffer, pH 5.0, that will release the antigen from the variant polypeptide.

The variant polypeptide may also be useful in diagnostic assays (e.g., for detecting expression of an antigen of interest in specific cells, tissues, or serum). For diagnostic applications, the variant will typically be labeled with a detectable moiety (such labels are also useful in the Fc region assays described above). Numerous labels are available, including, but not limited to, radioisotopes (e.g., ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , and ^{131}I), fluorescent labels (e.g., rare earth chelates (europium chelates) or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, Lissamine, phycoerythrin and Texas Red), and various enzyme-substrate labels (*see*, e.g., U.S. Patent No. 4,275,149), and luciferase, luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, malate dehydrogenase, urease, peroxidase such as horseradish peroxidase (HRPO), alkaline phosphatase, 3-galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases (e.g., glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), heterocyclic oxidases (such as uricase and xanthine oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase, and the like). Examples of enzyme-substrate combinations include, for example: (i) horseradish peroxidase (HRPO) with hydrogen peroxidase as a substrate, wherein the hydrogen peroxidase oxidizes a dye precursor (e.g., orthophenylene diamine (OPD) or 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine hydrochloride (TMB)); (ii) alkaline phosphatase (AP) with para-nitrophenyl phosphate as chromogenic substrate;

【 0 1 0 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

100

and (iii) -D-galactosidase (R-D-Gai) with a chromogenic substrate or fluorogenic substrate.

The variants of the present invention may also be used for in vivo diagnostic assays. For example, the variant polypeptide is labeled with a radionuclide so that the
5 antigen or cells expressing it can be localized using immunoscintigraphy.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

101

Table 1 Fc Variants

	<u>Position*</u>	<u>Amino Acid Substitution*</u>
	235	G, R
	236	F, R, Y
5	237	K, N, R
	238	E, G, H, I, L, V, W, Y
	244	L
	245	R
	247	A, D, E, F, M, N, Q, R, S, T, W, Y
10	248	F, P, Q, W
	249	L, M, N, P, Y
	251	H, I, W
	254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y
	255	K, N
15	256	H, I, K, L, V, W, Y
	257	A, I, M, N, S
	258	D
	260	S
	262	L
20	264	S
	265	K, S
	267	H, I, K
	268	K
	269	N, Q
25	271	T
	272	H, K, L, R
	279	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
	280	T
	283	F, G, H, I, K, L, M, P, R, T, W, Y
30	286	F
	288	N, P
	292	E, F, G, I, L
	293	S, V
	301	W
35	304	E
	307	E, M
	312	P
	315	F, K, L, P, R
	316	F, K
40	317	P, T
	318	N, P, T
	332	F, G, L, M, S, V, W
	339	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, W, Y
	341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
45	343	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
	373	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W
	375	R
	376	E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
	377	G, K, P
50	378	D, N
	379	N, Q, S, T

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

102

	380	D, N, S, T
	382	D, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
	385	E, P
	386	K
5	423	N
	424	H, M, V
	426	D, L
	427	N
	429	A, F, M
10	430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
	431	H, K, P
	432	R, S
	438	G, K, L, T, W
	439	E, H, Q
15	440	D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, T, V
	442	K

* Fc amino acid position according to EU numbering

* e.g., at position 249: 249L, 249M, 249N or 249Y

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

103

Table 2 Fc variants: effector function changes

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
235G						X
235Q		X		X		
235R		X				
235S		X				X
236F		X				
236R		X				X
236Y		X		X	X	
237E		X				X
237K		X		X		X
237N		X				X
237R		X		X		X
238A		X				X
238E		X		X		X
238G		X		X		X
238H		X		X		X
238I		X				X
238L		X	X			X
238V		X				X
238W		X		X		X
238Y		X		X		X
244L			X		X	
245R		X	X			X
247A	X			X	X	
247D				X	X	
247E				X	X	
247F	X			X		
247G		X		X	X	
247H	X			X		X
247I	X			X		X
247L	X			X		X
247M	X			X		
247N				X	X	
247Q				X	X	
247R		X		X	X	
247S				X	X	
247T	X					X
247V	X					
247W				X	X	
247Y	X			X		X
248A				X		
248F				X	X	
248P				X	X	
248Q				X	X	
248W				X	X	

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

104

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
249E	X			X	X	
249L		X		X	X	
249M				X	X	
249N					X	
249P		X	X		X	
249Y	X			X	X	
250K		X			X	
250M		X	X			X
250R		X		X	X	
251F	X			X	X	
251H		X		X	X	
251I		X		X	X	
251W		X		X	X	
252Y		X	X			X
254A				X	X	
254D				X		X
254E				X		X
254F	X			X	X	
254G				X		
254H				X		
254I				X		X
254K				X	X	
254L		X		X	X	
254M	X			X	X	
254N				X		
254P		X		X		X
254Q		X		X		X
254R				X	X	
254T		X		X		X
254V		X		X		X
254W				X	X	
254Y	X			X	X	
255K				X	X	
255N				X		X
256A	X		X		X	
256F	X			X		
256G			X		X	
256H				X		
256I				X	X	
256K				X		
256L					X	
256M	X			X	X	
256P			X		X	
256Q				X	X	
256R				X		
256V		X				

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

105

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
256W				X	X	
256Y				X	X	
257A		X	X			X
257I		X	X			X
257M		X	X			X
257N		X	X			X
257S		X	X			X
257V		X	X			X
258D	X		X			
260S		X	X		X	
262L		X	X			X
264S		X		X		X
265H		X				X
265K		X				
265S		X		X		
265Y		X		X		X
267G		X		X		X
267H		X				X
267I		X		X		X
267K		X				X
268D	X			X	X	
268E	X		X			
268K				X		X
269N		X				X
269Q		X				X
270A		X		X		X
270G		X				X
270K		X	X			X
270M		X		X		X
270N		X				X
271T		X				X
272H		X	X			X
272K		X	X			
272L		X	X			X
272N		X				X
272R		X	X			
279A	X		X			
279D		X	X			
279F		X				
279G			X			
279H			X			
279I				X		
279K		X		X		
279L		X		X		
279M			X			
279N			X			

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

106

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
279Q			X		X	
279R			X			
279S			X		X	
279T			X			
279W		X	X		X	
279Y			X		X	
280A	X			X		
280K	X				X	
280T				X	X	
283A	X		X			
283D		X	X			
283F		X	X		X	
283G		X	X		X	
283H		X	X		X	
283I	X		X		X	
283K	X		X		X	
283L		X	X		X	
283M	X				X	
283N			X		X	
283P			X		X	
283Q			X			
283R	X		X		X	
283S			X		X	
283T			X			
283W		X	X		X	
283Y		X	X			
285N		X	X			
286F			X			
288N	X		X			
288P		X	X			
292A	X					X
292E		X		X		
292F		X		X		
292G		X		X		
292I		X		X		
292L				X	X	
293S		X				X
293V		X	X			
301W		X				X
304E		X				
307A		X	X		X	
307E		X	X			X
307M		X	X		X	
311A	X		X			
311D	X			X		
311E				X		X

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

107

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
311F		X		X	X	
311G				X		
311I		X	X		X	
311K		X	X		X	
311L			X		X	
311M			X		X	
311R				X	X	
311N	X			X		
311S		X				X
311T	X				X	
311V	X		X		X	
311W			X		X	
311Y	X			X	X	
312P		X	X		X	
314F		X		X	X	
314I		X			X	
314V		X		X	X	
314W		X		X	X	
314Y					X	
315F		X		X	X	
315K				X	X	
315L	X				X	
315P		X		X	X	
315R					X	
316F		X		X		X
316K			X		X	
317P		X	X		X	
317T				X	X	
318N	X		X		X	
318P	X					X
318T	X		X		X	
318V	X					
326W		X		X	X	
327T		X		X		X
328V		X				X
329Y		X				X
330K	X					X
330R						X
332A					X	
332D	X				X	
332E	X				X	
332F			X		X	
332G					X	
332H		X	X		X	
332K		X	X			X
332L		X	X		X	

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

108

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
332M			X		X	
332N					X	
332Q					X	
332R		X	X			
332S			X		X	
332T	X				X	
332V	X				X	
332W		X	X		X	
332Y					X	
339D	X				X	
339E				X		X
339F	X				X	
339G	X			X	X	
339H					X	
339I	X				X	
339K	X				X	
339L				X		
339M	X					X
339N	X		X		X	
339Q	X				X	
339R	X			X	X	
339S	X				X	
339T	X		X		X	
339W			X		X	
339Y					X	
341D		X		X	X	
341E		X		X	X	
341F		X		X	X	
341H		X			X	
341I		X		X	X	
341K		X		X	X	
341L		X		X	X	
341M		X		X	X	
341N		X		X	X	
341P		X	X		X	
341Q		X		X	X	
341R		X		X	X	
341S		X		X	X	
341T		X		X	X	
341V				X	X	
341W		X		X	X	
341Y		X		X	X	
343A		X			X	
343D		X			X	
343E		X	X		X	
343F		X				

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

109

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
343G		X			X	
343H		X	X		X	
343I						X
343K			X		X	
343L		X			X	
343M		X		X	X	
343N		X			X	
343Q		X	X		X	
343R		X	X		X	
343S		X			X	
343T		X	X		X	
343V		X		X		
343W		X		X	X	
343Y		X	X		X	
373A		X		X		
373D		X		X	X	
373E		X			X	
373F		X			X	
373G		X		X		
373H					X	
373I		X			X	
373K		X		X	X	
373L		X		X	X	
373M		X		X	X	
373N		X		X	X	
373Q		X		X	X	
373R		X			X	
373S		X		X		X
373T		X		X	X	
373V		X		X	X	
373W		X		X	X	
375R		X	X		X	
376A	X		X		X	
376E		X				
376F		X			X	
376G		X	X		X	
376H		X		X	X	
376I			X			
376L				X	X	
376M			X			
376N					X	
376P			X		X	
376Q					X	
376R					X	
376S					X	
376T			X		X	

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

110

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
376V	X		X		X	
376W		X		X		
376Y		X		X		
377G	X					
377K	X		X			
377P					X	
378D			X			X
378N			X			
379N	X				X	
379Q		X			X	
379S					X	
379T					X	
380A			X		X	
380D						X
380N	X		X		X	
380S	X		X		X	
380T			X		X	
382A	X					
382D		X				X
382F	X		X			X
382H			X			
382I	X		X		X	
382K			X			
382L			X		X	
382M			X			
382N			X			X
382P						X
382Q			X		X	
382R			X			X
382S		X	X			X
382T			X			
382V			X		X	
382W			X			X
382Y			X			X
385E	X					X
385P						X
386K					X	
423N			X			X
424H						X
424M		X		X		X
424V				X		
426D				X	X	
426L					X	
427N	X		X			X
429A		X		X	X	
429F		X		X	X	

【 0 1 1 1 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

111

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
429M	X			X	X	
430A			X		X	
430D				X	X	
430F			X		X	
430G			X		X	
430H		X	X		X	
430I			X		X	
430K		X	X		X	
430L			X		X	
430M			X		X	
430N		X	X		X	
430P					X	
430Q		X	X			
430R		X	X		X	
430S			X		X	
430T			X		X	
430V			X		X	
430W		X		X	X	
430Y			X		X	
431H			X		X	
431K			X			
431P				X	X	
432R		X		X	X	
432S		X		X	X	
434G			X			X
434H			X			X
434I		X		X		X
434W	X		X		X	
434Y			X		X	
436I	X		X			X
436L			X			
436T			X			X
438G						X
438K			X			
438L			X		X	
438T			X			X
438W			X		X	
439E						X
439H						X
439Q				X		X
440A				X		X
440D		X		X		X
440E				X		
440F				X		X
440G	X					X
440H	X		X			

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

112

Variant*	ADCC enhanced	ADCC diminished	FcRn Binding enhanced	FcRn Binding diminished	CDC enhanced	CDC diminished
440I	X					X
440K			X			X
440L	X		X			X
440M				X		X
440N						
440Q					X	
440R						
440T		X				
440V		X				
440W						
440Y					X	
442K		X	X			

* Variants tested in anti-CD20 antibody, IgG1 Fc region

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

113

Table 3 **Enhanced ADCC**

	<u>Position⁺</u>	<u>Amino Acid Substitution[*]</u>
	247	A, F, H, I, L, M, T, V, Y
	249	E, Y
5	251	F
	254	F, M, Y
	256	A, M
	258	D
	268	D, E
10	279	A
	280	A, K
	283	A, I, K, M, R
	288	N
	292	A
15	311	A, D, N, T, V, Y
	315	L
	318	N, P, T, V
	330	K
	332	T, V
20	339	D, F, G, I, K, M, N, Q, R, S, T
	376	A, V
	377	G, K
	379	N
	380	N, S
25	382	A, I
	385	E
	427	N
	429	M
	434	W
30	436	I
	440	G, H, I, L

⁺Fc amino acid position according to EU numbering^{*}e.g., at position 249: 249E or 249Y

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

114

Table 4		Diminished ADCC
	Position [*]	Amino Acid Substitution
5	235	Q, R, S
	236	F, R, Y
	237	E, K, N, R
	238	E, G, H, I, L, V, W, Y
	247	G, R
10	249	L, P
	250	K, M, R
	251	H, I, W
	252	Y
	254	L, P, Q, T, V
15	256	V
	257	A, I, M, N, S, V
	260	S
	262	L
	264	S
20	265	H, K, S
	267	G, H, I, K
	269	N, Q
	270	A, G, K, M, N
	271	T
25	272	H, K, L, N, R
	279	D, F, K, L, W
	283	D, F, G, H, L, T, W, Y
	285	N
	288	P
30	292	E, F, G, I
	293	S, V
	301	W
	304	E
	307	A, E, M
35	311	F, I, K, S
	312	P
	314	F, I, V, W
	315	F, P
	316	F
40	317	P
	327	T
	328	V
	329	Y
	332	G, K, L, R, W
45	341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
	343	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
	373	A, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W
	375	R
	376	A, E, F, G, H, W, Y
50	379	Q
	382	D, S
	429	A, F
	430	H, K, N, Q, R, W
	432	R, S
55	434	I
	440	D, T, V
	442	K

^{*} Fc amino acid position according to EU numbering

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

115

Table 5 Enhanced FcRn Binding Affinity

	<u>Position*</u>	<u>Amino Acid Substitution</u>
	238	L
5	244	L
	245	R
	249	P
	252	Y
	256	P
10	257	A, I, M, N, S, V
	258	D
	260	S
	262	L
	270	K
15	272	L, R
	279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y
	283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
	285	N
	286	F
20	288	N, P
	293	V
	307	A, E, M
	311	A, I, K, L, M, V, W
	312	P
25	316	K
	317	P
	318	N, T
	332	F, H, K, L, M, R, S, W
	339	N, T, W
30	341	P
	343	E, H, K, Q, R, T, Y
	375	R
	376	G, I, M, P, T, V
	377	K
35	378	D, N
	380	N, S, T
	382	F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
	423	N
	427	N
40	430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
	431	H, K
	434	F, G, H, W, Y
	436	I, L, T
	438	K, L, T, W
45	440	K
	442	K

*Fc amino acid position according to EU numbering

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

116

Table 6 Diminished FcRn Binding Affinity

	<u>Position*</u>	<u>Amino Acid Substitution</u>
	235	Q
5	236	Y
	237	K, R
	238	E, G, H, W
	247	A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, W, Y
	248	A, F, P, Q, W
10	249	E, L, M, Y
	251	F, H, I, W
	254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
	255	K, N
	256	F, H, I, K, M, R, W, Y
15	264	S
	265	S, Y
	267	G, I
	268	D, K
	270	A, M
20	279	I, K, L
	280	T
	292	E, F, G, I, L
	311	D, E, F, G, N, R, Y
	315	F, K, P
25	316	F
	317	T
	326	W
	327	T
	339	E, G, L, R
30	341	D, E, F, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
	343	M, V, W
	373	A, D, G, K, L, M, N, Q, S, T, V, W
	376	H, L, W, Y
	424	M, V
35	426	D
	429	A, F, M
	430	D, W
	431	P
	432	R, S
40	434	I
	439	Q
	440	A, D, E, F, M

*Fc amino acid position according to EU numbering

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

117

Table 7 Enhanced CDC

	<u>Position[†]</u>	<u>Amino Acid Substitution</u>
	236	Y
5	244	L
	247	A, D, E, G, N, Q, R, S, W
	248	F, P, Q, W
	249	E, L, M, N, P, Y
	250	K, R
10	251	F, H, I, W
	254	A, F, K, L, M, R, Y
	255	K
	256	A, G, I, L, M, P, Q, W, Y
	260	S
15	268	D
	279	Q, S, W, Y
	280	K, T
	283	F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, W
	292	L
20	307	A, M
	311	F, I, K, L, M, T, V, W, Y
	312	P
	314	F, I, V, W, Y
	315	F, K, L, P, R
25	316	K
	317	P, T
	318	N, T
	332	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
	339	D, F, G, H, I, K, N, Q, R, S, T, W, Y
30	341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
	343	A, D, E, G, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
	373	D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W
	375	R
	376	A, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, T, V
35	377	P
	379	N, Q, S, T
	380	A, N, S, T
	382	I, L, Q, V
	386	K
40	426	D, L
	429	A, F, M
	430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
	431	H, P
	432	R, S
45	434	W, Y
	438	L, W
	440	Q, Y

[†]Fc amino acid position according to EU numbering

50

【 0 1 1 8 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

118

Table 8 Diminished CDC

	<u>Position*</u>	<u>Amino Acid Substitution</u>
	235	G, S
5	236	R
	237	E, K, N, R
	238	A, E, G, H, I, L, V, W, Y
	245	R
	247	H, I, L, T, Y
10	250	M
	252	Y
	254	D, E, I, P, Q, T, V
	255	N
	257	A, I, M, N, S, V
15	262	L
	264	S
	265	H, Y
	267	G, H, I, K
	268	K
20	269	N, Q
	270	G, M, N
	271	T
	272	H, L, N
	292	A
25	293	S
	301	W
	307	E
	311	E, S
	316	F
30	318	P
	327	T
	328	V
	329	Y
	330	K, R
35	332	E, M
	343	I
	373	S
	378	D
	380	D
40	382	D, F, N, P, R, S, W, Y
	385	E, P
	423	N
	424	H, M
	427	N
45	+ Fc amino acid position according to EU numbering	

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

119

Examples

The following examples are provided in order to demonstrate and further illustrate certain preferred embodiments and aspects of the present invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

5

EXAMPLE I - Screening variant Fc regions in ADCC Assays

This example describes how variant Fc regions, in the context of an antibody (e.g., anti-CD20) are screened in an ADCC assay.

i. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) isolation

10 About 50 ml of peripheral blood is obtained from a healthy donor and diluted 1:2 with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0. The solutions are mixed by gently swirling the tube. About 12 ml of Histopaque-1077 (Sigma Cat. No. 1077-1) is carefully layered underneath the diluted blood sample followed by centrifugation in a Sorvall RT6000B centrifuge with swinging bucket rotor at 1000 rpm for 10 min. with brake off.

15 The upper phase of the gradient is discarded by aspiration and the white-colored, PBMC-containing interphase collected and washed 3 times with Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco Cat. No. 14025-092). The washed cell pellet is suspended in about 20 ml RPMI 1640 media containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Omega Scientific Cat. No. FB-01). The resuspended PBMCs are split into two T-175 culture flasks, and 30 ml of RPMI

20 containing 10% FBS is added to each, followed by incubation overnight in a 37°C, 5% CO₂ incubator. The following day the nonadherent PBMCs are collected in 50 mL Falcon tubes, centrifuged as above and resuspended in RPMI containing 1% FBS lacking phenol red. A small portion of the resuspended cells are diluted 10-fold and counted using a hemocytometer. The remaining PBMCs are placed in the incubator until needed.

25

ii. Target cell line (specific for anti-CD20 ADCC assays)

Wil.2 and SKW6.4 CD20-expressing B-cell lines are obtainable from ATCC and grown as recommended. One day before use, the cells are split 2-fold. The next day the cell number is adjusted to 4×10^5 cells/ml and 50 μ l aliquots (20,000 cells/well) added to a 96-well tissue culture plate.

30

iii. IgG dilutions

Prior to screening, IgG comprising an Fc variant of the present invention is expressed, purified and quantitated using a standard ELISA. For primary single-point

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

120

ADCC screening, IgG variants are diluted to 40 ng/ml in RPMI media containing 1% FBS lacking phenol red. The final IgG concentration in the assay is diluted by 4-fold (i.e., 10 ng/ml final concentration). Fifty microliter aliquots of IgG are added to the target cells and incubated for about 15 minutes at 37°C prior to adding the effector cells to the opsonized target cells.

When IgG titrations are performed, IgG concentration is varied in the range from about 0.0001 to 1 µg/ml. IgG dilutions are prepared using a 96-well microtiter plate by diluting the samples in RPMI containing 1% FBS lacking phenol red. The diluted IgG samples are then added to the assay plate containing the target cells.

iv. Effector cells

The concentration of PBMCs are adjusted so effector-to-target ratio is in the range of 10-20:1 (i.e., $2-4 \times 10^6$ cells/ml). One hundred microliters of the resuspended PBMCs are added to each well of the opsonized target cells. The plates are incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 3-4 hours.

v. Lactate-dehydrogenase (LDH)-release detection

Target cell lysis is measured by detecting the release of LDH enzyme from the cytoplasm of damaged cells into the culture supernatant. Following incubation of the opsonized target cells with the effector cells, the assay plates are centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. About 75 µl of the cell culture supernatant is carefully removed while the pelleted cells and debris are avoided. This supernatant is added directly to a microtiter plate and to this is added 75 µl of LDH detection reagent (Roche Cat. No. 1 644 793). The plate is then incubated for approximately 15-30 min. and absorbance read at 490nm using a Molecular Devices Vmax Kinetic Microplate Reader.

vi. Data Analysis

All ADCC screening assays are performed in duplicate. Each assay plate contains controls for spontaneous target lysis, spontaneous effector plus target lysis in the absence of IgG and target cell total lysis. Target cell total lysis is achieved by addition of 1% Triton X-100 to the target cells. Wild type controls are included on each assay plate and the ADCC assay signal averaged. The background value, obtained from the spontaneous lysis controls, is subtracted from each sample. The background value, obtained from the diluted IgG, is subtracted from each sample. The data are converted from absorbance values to percentage of specific-lysis based upon the spontaneous and total lysis controls.

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

121

The percentage of specific-lysis is calculated from the following equation: percentage specific lysis = (experimental A490 - background A490)/(maximal A490 - background A490) X 100, where background A490 is the sum of the A490 obtained from the effector and target cells in the absence of IgG and the IgG background due to contaminating LDH present in the crude IgG supernatants. The percentage of the Fc variant activity is normalized relative to the averaged wild type controls. The percentage of the normalized activity for duplicate assay plates are averaged and the standard deviation between individual assay plates calculated for each sample.

vii. Results

The relative ADCC specific activity are shown in Tables 9 (single substitutions) and 10 (combinatorial substitutions) below. The CDC values reported in Table 9 are generated as described in Example 2 herein and the FcRn binding assay value reported in Table 9 are generated as described in Example 3 herein. Results are further summarized in Tables 1 and 2 above. Those combinatorial substitutions which yield a higher ADCC value than either single substitution alone are: 247F,339D; 247I, 339D; 247L,339D; 247L,339T; and 247I,339Q. Those combinatorial substitutions which yield ADCC lower than 80% that of wild-type ADCC even though they have higher than wild-type ADCC when tested alone are: 247A,339D; 247Y,339H; 247I,339I; 247T,339I; 247L,339N; 247A,339Q; and 247A,339R. Those combinatorial substitutions which yield ADCC lower than 10% that of wild-type ADCC even though they have higher than wild-type ADCC when tested alone are: 247I,339I; 247T,339I; and 247L,339N.

Table 9

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	WT (a,z)	100		100		100		
L	235A	87	23.2	102	11.9	67	7.9	2
L	235E	80	17.4	87	16.2	48	35.8	2
L	235G	93	30.3	85	21.2	58	46.0	2
L	235Q	86	1.8	81	14.4	98	25.1	2
L	235R	45	10.5	93	34.1	110	13.8	2
L	235S	92	2.0	85	40.0	0	262.9	2
G	236F	0	942.1	88	7.9	0	283.3	2
G	236R	0	228.7	101	20.6	14	110.1	4
G	236Y	8	72.7	76	10.0	168	0.3	2
G	237E	0	89.2	93	35.0	36	28.8	4

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

122

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
G	237K	0	113.3	78	12.8	12	136.0	4
G	237N	0	107.5	91	16.3	22	31.5	4
G	237R	0	81.3	56	60.6	28	10.5	4
P	238A	0	205.8	90	9.6	29	49.5	4
P	238E	0	20.6	76	6.7	24	101.0	4
P	238G	0	92.8	66	6.9	23	120.5	4
P	238H	0	48.9	72	11.4	11	206.3	4
P	238I	0	180.4	94	6.4	18	54.1	4
P	238L	0	37.4	115	13.6	34	50.1	4
P	238V	46	11.8	102	8.3	67	19.2	4
P	238W	0	66.6	87	5.4	23	103.4	4
P	238Y	0	34.0	74	15.8	16	288.8	4
P	244L	77	23.4	124	9.6	134	6.0	2
P	245R	62	15.0	188	7.2	42	5.3	2
P	247A	122	16.2	97	0.3	116	0.9	2
P	247D	95	23.4	54	2.8	131	1.1	2
P	247E	95	10.3	52	8.7	118	0.0	2
P	247F	144	18.8	6	1258.9	71	34.1	6
P	247G	82	16.1	75	4.2	137	0.9	2
P	247H	145	11.2	35	252.4	79	7.5	6
P	247I	140	22.9	79	30.7	22	198.3	6
P	247L	144	10.1	57	33.7	0	722.7	16
P	247M	127	21.0	18	1599.0	114	7.2	6
P	247N	91	37.2	41	38.7	109	4.0	2
P	247Q	103	8.5	26	294.3	137	3.7	4
P	247R	58	15.5	72	1.2	127	4.9	2
P	247S	106	38.6	81	15.0	130	2.6	2
P	247T	129	11.2	75	27.5	37	34.8	10
P	247V	120	13.5	Na	na	na	na	2
P	247W	102	6.5	0	1314.2	122	0.5	2
P	247Y	143	8.4	7	na	88	7.1	6
K	248A	100	5.4	15	179.9	102	2.4	2
K	248F	107	18.0	0	559.4	202	4.0	2
K	248P	103	9.1	34	99.4	226	1.3	2
K	248Q	101	0.5	38	89.3	174	17.9	2
K	248W	102	9.4	30	54.5	166	8.3	2
D	249E	110	6.7	78	22.4	258	16.1	4
D	249L	73	1.4	15	179.9	214	3.2	2
D	249M	101	9.6	50	4.5	163	1.2	2
D	249N	94	15.9	112	14.0	255	10.9	4
D	249P	56	4.0	138	21.0	119	0.2	2
D	249Y	110	8.8	41	28.3	170	6.6	2
T	250K	38	27.1	96	30.1	199	13.5	6
T	250M	78	11.0	165	7.4	47	6.6	4
T	250R	84	0.7	62	34.0	288	13.9	4
L	251F	125	6.0	64	47.6	160	16.6	10

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

123

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
L	251H	59	11.6	46	5.6	167	22.7	2
L	251I	84	9.8	7	333.3	190	18.8	2
L	251W	95	2.9	0	na	161	17.3	2
M	252Y	61	5.8	964	27.9	62	46.1	4
I	253A	103	6.1	0	12.0	81	23.9	4
S	254A	99	20.1	7	733.0	139	11.2	4
S	254D	101	14.2	7	113.9	74	31.2	2
S	254E	102	3.8	6	107.9	72	35.2	2
S	254F	121	11.2	0	1087.4	206	14.4	6
S	254G	100	14.7	7	86.8	102	6.1	2
S	254H	108	20.0	0	74.3	85	22.0	4
S	254I	99	2.5	25	64.3	80	11.5	4
S	254K	109	14.8	9	77.2	137	6.1	2
S	254L	89	9.8	74	12.6	227	12.1	6
S	254M	89	11.9	0	212.1	248	13.4	6
S	254N	90	13.3	8	5.6	76	34.6	2
S	254P	78	17.7	3	141.4	75	25.2	2
S	254Q	84	12.6	9	121.2	74	25.2	2
S	254R	99	1.3	14	128.2	152	4.8	2
S	254T	54	51.9	32	34.7	75	12.1	2
S	254V	68	40.5	31	40.5	84	4.4	2
S	254W	98	6.0	0	116.1	188	7.7	6
S	254Y	117	9.4	0	129.1	211	15.7	6
R	255K	96	3.5	41	65.9	276	9.3	4
R	255N	84	17.7	27	162.7	81	18.1	2
T	256A	115	16.5	160	3.0	190	19.6	2
T	256D	97	5.3	544	10.6	86	23.2	6
T	256E	91	12.9	339	8.4	104	7.2	6
T	256F	119	3.3	5	435.0	128	26.6	2
T	256G	95	20.0	162	8.0	221	24.5	2
T	256H	103	6.3	26	6.1	91	11.9	2
T	256I	93	11.5	72	3.7	157	16.2	4
T	256K	100	6.7	31	20.6	92	20.2	2
T	256L	93	3.9	78	60.5	267	22.7	4
T	256M	122	17.4	35	78.9	200	14.8	10
T	256N	102	7.2	229	6.4	86	23.2	2
T	256P	109	11.8	190	6.1	260	11.8	8
T	256Q	100	17.2	64	14.2	152	11.3	4
T	256R	94	8.8	33	60.0	71	47.1	2
T	256S	103	5.3	169	3.1	101	15.9	2
T	256V	82	11.1	114	30.5	109	11.0	2
T	256W	96	8.5	14	84.5	170	14.4	4
T	256Y	97	7.2	68	18.6	127	18.0	2
P	257A	86	11.5	319	15.0	34	53.7	4
P	257I	54	16.4	1022	14.5	46	22.4	6
P	257M	26	11.0	835	19.1	48	48.4	4

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

124

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
P	257N	27	13.1	867	15.7	62	31.4	4
P	257S	28	28.8	184	6.8	46	30.1	4
P	257V	18	97.9	447	41.5	27	143.5	2
E	258D	115	7.0	361	20.5	110	9.6	4
T	260S	93	5.6	124	7.4	171	17.1	2
V	262L	61	2.9	525	15.1	30	48.0	2
V	264S	10	39.8	78	20.0	50	36.7	2
D	265H	8	118.9	79	36.1	81	0.5	2
D	265K	10	146.2	107	34.3	84	46.4	2
D	265S	9	106.3	66	28.9	103	13.3	2
D	265Y	3	7.6	33	88.8	62	21.5	2
S	267G	29	8.6	86	0.9	60	18.1	4
S	267H	0	48.4	86	16.8	47	41.1	4
S	267I	0	78.0	83	11.8	50	37.8	4
S	267K	0	73.3	102	14.2	26	47.1	4
H	268D	110	7.8	68	32.4	122	10.7	6
H	268E	110	8.3	126	17.8	100	8.4	8
H	268K	98	17.6	86	10.4	24	112.7	4
E	269N	23	74.0	92	17.0	30	69.4	4
E	269Q	47	3.6	98	3.5	22	82.8	4
D	270A	41	35.5	87	6.0	36	66.5	4
D	270G	0	102.2	108	16.5	37	21.8	4
D	270K	15	465.5	122	8.4	0	462.9	4
D	270M	49	19.2	81	5.2	25	606.9	4
D	270N	28	1185.2	94	8.2	34	103.7	4
P	271T	26	53.9	96	20.4	32	89.1	4
E	272H	73	13.6	157	23.0	53	34.8	2
E	272K	70	8.9	320	20.4	118	28.7	4
E	272L	78	21.1	129	3.9	71	3.1	2
E	272N	90	7.5	110	33.0	71	34.6	2
E	272R	50	2.1	351	3.3	102	1.2	2
V	279A	114	14.6	214	5.0	106	21.2	2
V	279D	87	12.1	367	0.3	98	8.5	2
V	279F	81	4.8	113	14.3	106	10.0	2
V	279G	98	2.4	256	11.6	109	18.0	2
V	279H	79	28.1	173	29.6	127	22.7	6
V	279I	101	1.6	83	1.3	100	21.0	2
V	279K	91	1.5	79	26.1	106	0.7	2
V	279L	96	3.0	78	13.9	100	5.7	2
V	279M	107	8.3	122	3.5	91	10.3	2
V	279N	102	32.0	204	19.5	85	50.2	6
V	279Q	85	28.3	181	8.0	139	8.1	6
V	279R	105	4.8	130	10.7	98	8.7	2
V	279S	94	29.8	242	18.3	122	16.7	6
V	279T	95	15.5	265	6.9	110	12.8	10
V	279W	68	24.8	162	22.8	125	10.5	6

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

125

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
V	279Y	82	26.8	139	8.6	144	13.2	6
D	280A	111	44.9	55	50.1	135	28.7	2
D	280K	137	47.6	120	27.2	192	33.5	2
D	280T	108	na	60	12.6	122	8.7	4
E	283A	107	2.1	126	0.2	96	17.9	2
E	283D	84	8.4	110	4.0	92	10.3	2
E	283F	74	0.1	168	38.6	127	20.4	2
E	283G	93	3.1	137	4.4	135	8.5	2
E	283H	87	6.1	206	6.5	123	15.9	2
E	283I	106	1.9	143	5.6	126	12.3	2
E	283K	109	5.8	246	5.1	133	8.0	2
E	283L	92	3.1	126	1.3	120	0.1	2
E	283M	112	7.4	95	13.8	120	2.4	2
E	283N	102	3.8	119	7.4	135	23.4	6
E	283P	97	11.9	136	3.9	118	11.8	4
E	283Q	95	5.3	117	8.0	122	22.9	2
E	283R	102	0.3	282	8.1	144	16.7	2
E	283S	91	1.5	143	11.1	119	12.3	2
E	283T	103	3.2	143	12.4	108	11.0	2
E	283W	90	2.8	117	2.1	159	1.3	2
E	283Y	81	6.7	142	4.1	136	17.2	2
H	285N	93	2.6	202	19.8	113	21.1	4
N	286F	107	7.1	307	32.3	108	16.1	4
K	288N	110	8.7	162	13.2	118	19.1	4
K	288P	45	1.1	119	3.0	116	15.7	2
R	292A	114	2.9	85	67.5	74	21.1	4
R	292E	35	21.4	65	48.5	92	32.1	2
R	292F	73	16.4	64	7.6	101	8.3	2
R	292G	94	2.5	60	35.9	119	32.8	2
R	292I	79	1.5	56	23.6	106	3.7	2
R	292L	96	3.9	68	40.0	123	7.2	2
E	293S	68	7.4	101	23.0	98	0.1	2
E	293V	73	12.5	127	18.0	107	24.0	2
R	301W	5	105.4	119	18.1	49	31.1	4
S	304E	24	32.9	101	8.7	122	11.3	2
T	307A	87	4.4	233	14.5	115	6.5	4
T	307E	88	7.9	492	34.6	81	2.4	4
T	307M	82	5.3	302	23.7	150	6.5	4
Q	311A	106	2.4	139	7.0	89	28.3	2
Q	311D	111	6.0	38	22.2	83	13.6	2
Q	311E	102	1.7	46	17.7	78	0.7	2
Q	311F	89	6.9	64	7.5	212	20.7	2
Q	311G	98	1.9	58	21.5	92	9.6	2
Q	311I	87	8.2	437	9.6	236	11.3	8
Q	311K	80	13.4	165	5.5	170	9.3	6
Q	311L	107	6.7	186	9.2	191	8.1	4

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

126

Position and		ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
WT*	Variants*							
Q	311M	97	7.2	387	15.0	252	16.3	6
Q	311N	115	1.9	54	10.5	126	23.3	2
Q	311P	99	8.0	89	300.5	172	67.9	4
Q	311R	96	8.5	14	84.5	170	14.4	2
Q	311S	86	8.8	97	10.5	0	92.8	2
Q	311T	111	10.2	131	14.0	168	23.4	2
Q	311V	108	1.7	558	19.5	240	23.3	4
Q	311W	104	8.2	215	2.8	251	18.7	4
Q	311Y	107	3.0	94	0.3	211	25.0	2
D	312P	97	1.4	546	16.1	148	11.6	2
L	314F	70	7.8	42	41.2	108	5.5	2
L	314I	83	13.0	86	22.7	184	14.2	4
L	314V	65	14.0	21	128.8	179	10.9	4
L	314W	79	11.0	5	80.2	190	2.0	4
L	314Y	87	13.6	64	81.4	238	3.2	4
N	315F	83	12.8	51	38.3	140	15.3	2
N	315K	108	3.5	88	10.2	148	8.2	2
N	315L	112	6.2	103	10.5	145	5.5	2
N	315P	62	10.2	14	289.1	231	9.1	4
N	315R	96	24.4	71	38.3	135	0.4	2
G	316F	54	26.0	34	72.4	81	10.0	2
G	316K	77	28.8	131	8.9	143	8.6	2
K	317P	54	21.5	145	1.6	190	4.7	4
K	317T	99	10.9	49	4.8	118	4.0	2
E	318N	123	7.2	216	7.5	120	7.0	4
E	318P	120	10.8	75	27.1	79	17.0	4
E	318T	109	5.7	304	56.8	118	10.5	4
E	318V	116	3.4	114	21.2	95	11.5	4
K	326W	74	17.9	93	5.7	214	9.7	2
A	327T	4	13.4	54	19.5	7	206.2	2
L	328V	76	3.2	101	6.3	56	13.9	4
P	329Y	53	41.5	107	13.2	25	90.3	4
A	330K	134	9.3	108	51.4	43	23.9	6
A	330R	103	5.5	121	39.4	31	36.6	6
I	332A	100	6.1	96	27.6	130	5.0	4
I	332D	143	3.1	78	33.7	151	11.5	6
I	332E	168	10.6	86	22.2	143	9.8	18
I	332F	97	14.5	108	3.4	149	11.0	4
I	332G	74	19.8	94	1.4	121	11.5	2
I	332H	82	4.3	129	1.1	150	11.5	2
I	332K	12	114.5	146	7.0	67	15.5	2
I	332L	94	0.9	127	2.6	154	5.1	2
I	332M	98	2.2	128	16.1	178	6.6	2
I	332N	95	15.3	92	16.1	137	5.1	4
I	332Q	99	8.4	98	7.9	148	8.5	6
I	332R	12	135.5	114	7.2	88	30.0	2

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

127

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
I	332S	96	4.9	263	64.1	177	16.5	2
I	332T	112	7.5	100	5.3	124	4.5	4
I	332V	109	1.1	115	19.5	147	25.1	2
I	332W	81	16.8	123	3.7	150	9.7	2
I	332Y	93	13.1	93	12.3	152	5.3	2
A	339D	131	10.4	80	26.4	183	20.3	6
A	339E	100	0.4	75	4.2	91	0.1	2
A	339F	104	3.3	120	24.6	217	8.5	6
A	339G	107	3.7	67	6.5	118	0.3	2
A	339H	114	23.4	107	10.0	136	0.5	2
A	339I	136	14.6	80	30.6	205	22.8	6
A	339K	129	24.2	83	29.0	201	21.0	6
A	339L	97	8.7	83	9.8	104	8.7	2
A	339M	115	6.8	111	7.2	57	8.8	2
A	339N	110	6.3	146	3.5	240	17.5	4
A	339Q	128	15.8	102	19.8	138	11.0	6
A	339R	117	14.4	82	13.4	128	2.1	2
A	339S	124	13.0	95	23.6	170	22.5	6
A	339T	142	14.2	138	6.2	220	20.2	10
A	339W	92	13.4	156	11.4	243	10.6	6
A	339Y	97	17.0	92	19.8	265	21.9	10
G	341D	62	6.9	52	37.8	172	3.5	2
G	341E	73	6.9	50	18.1	161	3.8	2
G	341F	24	100.8	52	41.9	227	14.7	6
G	341H	54	9.3	65	63.7	245	16.0	6
G	341I	44	15.5	36	17.2	173	5.3	2
G	341K	77	3.9	67	18.9	161	2.6	2
G	341L	64	24.3	54	19.8	171	4.2	2
G	341M	55	39.8	79	9.7	232	11.1	6
G	341N	83	9.1	53	17.0	162	9.5	2
G	341P	35	47.2	127	9.9	228	16.2	6
G	341Q	59	18.7	72	1.0	166	7.7	2
G	341R	59	14.9	78	7.4	168	7.5	2
G	341S	65	26.6	55	12.2	224	9.2	6
G	341T	0	866.0	68	54.0	176	10.0	2
G	341V	65	171.0	69	15.0	213	9.6	4
G	341W	14	25.8	76	8.9	178	8.7	2
G	341Y	26	24.5	54	5.2	184	14.3	2
P	343A	75	18.6	110	37.7	143	5.9	2
P	343D	69	11.5	102	7.9	157	18.3	2
P	343E	65	34.9	345	6.4	157	17.6	2
P	343F	74	20.6	89	13.0	99	1058.4	4
P	343G	75	29.1	110	14.9	244	11.1	6
P	343H	78	33.8	191	1.2	159	3.1	2
P	343I	92	26.8	114	16.7	86	10.5	2
P	343K	74	37.7	232	2.6	185	9.1	2

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

128

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
P	343L	63	17.2	125	3.8	127	5.6	2
P	343M	60	35.1	83	13.7	134	18.7	4
P	343N	67	8.9	105	19.9	196	18.2	2
P	343Q	72	0.5	442	14.0	178	3.0	2
P	343R	94	1.3	198	10.4	179	9.9	4
P	343S	84	7.5	101	14.3	207	11.9	6
P	343T	69	4.2	126	16.1	151	4.4	2
P	343V	70	1.9	77	5.3	107	12.0	2
P	343W	48	22.3	56	6.4	194	17.9	2
P	343Y	63	9.9	112	7.2	270	14.4	6
Y	373A	56	3.7	33	15.0	121	28.7	2
Y	373D	74	17.7	74	32.5	227	10.2	6
Y	373E	41	23.6	106	20.8	151	19.5	2
Y	373F	76	2.6	110	12.7	117	1.0	2
Y	373G	39	21.6	38	25.4	75	33.7	2
Y	373H	79	34.2	100	13.9	169	8.2	4
Y	373I	65	9.0	73	14.0	154	6.4	2
Y	373K	76	12.2	70	2.9	246	6.9	6
Y	373L	76	21.4	66	17.0	189	6.2	6
Y	373M	78	1.2	53	25.8	115	3.2	2
Y	373N	64	21.5	61	23.3	148	12.1	2
Y	373Q	63	11.0	55	24.7	158	17.7	2
Y	373R	81	20.5	107	24.1	221	4.0	6
Y	373S	52	3.7	74	1.9	72	24.8	2
Y	373T	70	3.0	82	16.6	151	5.7	2
Y	373V	73	2.1	69	14.3	115	1.1	2
Y	373W	77	23.3	75	18.5	237	20.8	6
S	375R	69	10.9	595	15.9	166	1.1	2
D	376A	111	18.2	155	26.7	180	5.2	2
D	376E	85	12.3	82	29.5	98	13.5	2
D	376F	84	7.3	116	12.6	119	8.6	2
D	376G	73	3.1	135	3.9	164	0.6	2
D	376H	74	16.1	81	18.6	118	5.6	2
D	376I	100	14.1	144	7.2	101	50.5	10
D	376L	88	16.7	78	3.0	142	3.2	2
D	376M	86	21.6	129	1.4	91	15.1	2
D	376N	93	14.5	94	24.2	173	14.9	4
D	376P	85	15.1	203	12.9	153	19.6	6
D	376Q	88	5.0	116	22.7	176	19.9	4
D	376R	95	6.0	103	12.3	166	4.6	2
D	376S	85	21.4	134	27.3	209	25.3	2
D	376T	102	20.0	160	11.2	224	10.1	6
D	376V	112	8.1	251	15.0	210	11.1	12
D	376W	53	22.0	1	1719.9	89	34.8	2
D	376Y	78	4.2	53	25.8	98	39.9	2
I	377G	107	2.4	76	28.8	92	7.6	2

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

129

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
I	377K	117	10.0	167	27.7	90	11.3	4
I	377P	99	11.3	98	32.4	245	6.5	4
A	378D	98	6.6	163	13.9	19	91.9	6
A	378N	101	7.1	180	3.0	90	30.7	2
V	379N	96	19.5	74	39.0	204	5.5	4
V	379Q	113	3.2	85	27.3	218	4.1	4
V	379S	80	18.4	86	13.4	137	1.4	2
V	379T	101	16.6	109	14.9	237	2.2	4
E	380A	106	3.2	152	28.8	139	4.2	2
E	380D	102	2.1	73	44.2	78	0.7	2
E	380N	111	7.7	142	19.0	139	7.3	2
E	380S	110	8.5	230	24.1	131	0.1	2
E	380T	100	1.2	172	11.0	115	4.8	2
E	382A	110	6.0	103	7.8	82	29.6	2
E	382D	95	0.8	73	25.7	80	34.2	2
E	382F	121	13.8	222	16.6	67	28.2	6
E	382H	89	17.9	135	2.8	84	20.4	2
E	382I	109	6.4	131	6.2	219	5.4	6
E	382K	96	2.6	153	30.2	92	15.6	4
E	382L	93	16.5	126	11.1	156	7.7	2
E	382M	89	14.6	135	8.6	126	20.3	2
E	382N	99	1.1	137	5.2	69	4.5	2
E	382P	85	16.8	122	22.0	69	14.6	2
E	382Q	105	12.2	162	12.0	140	19.3	2
E	382R	104	8.4	165	2.7	85	3.0	4
E	382S	85	2.9	151	10.0	75	4.1	2
E	382T	89	10.2	172	5.2	109	30.0	2
E	382V	83	32.5	173	6.2	167	0.4	2
E	382W	97	10.5	172	5.2	73	1.9	2
E	382Y	105	11.5	188	14.5	78	3.3	4
G	385E	108	5.5	98	18.8	0	1586.3	2
G	385P	100	3.2	101	23.2	82	15.8	2
Q	386K	96	9.5	115	4.8	266	1.6	4
F	423N	107	8.5	158	2.1	48	27.5	2
S	424H	116	29.8	97	7.3	58	9.3	2
S	424M	91	3.5	60	60.0	75	14.4	2
S	424V	103	9.3	57	35.4	115	10.5	4
S	426D	105	24.3	65	10.0	318	12.7	4
S	426L	91	35.3	117	14.3	193	20.4	4
V	427N	108	5.5	192	5.9	64	23.1	2
H	429A	44	81.7	61	11.4	147	1.9	2
H	429F	70	11.1	77	16.5	288	12.8	4
H	429M	103	0.7	83	12.2	173	3.2	2
E	430A	100	8.3	179	6.6	204	7.1	2
E	430D	96	8.2	44	25.5	190	4.6	4
E	430F	111	13.0	218	19.4	203	8.1	2

【 0 1 3 0 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

130

Position and		ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
WT*	Variants*							
E	430G	97	7.8	131	10.6	252	7.5	6
E	430H	91	7.7	192	8.0	227	4.2	6
E	430I	87	19.3	308	6.6	297	17.2	6
E	430K	66	9.5	131	12.6	203	16.0	4
E	430L	98	33.3	242	8.7	263	10.6	6
E	430M	102	16.1	195	8.7	227	4.6	6
E	430N	82	24.6	171	13.0	162	2.2	2
E	430P	103	13.1	86	16.7	254	23.5	8
E	430Q	79	8.3	320	12.8	97	4.9	8
E	430R	75	7.5	249	6.6	227	7.9	8
E	430S	88	30.1	183	3.4	221	18.5	2
E	430T	82	22.9	137	23.7	249	8.2	6
E	430V	79	35.6	281	7.0	276	17.5	6
E	430W	78	8.3	11	95.0	171	5.4	2
E	430Y	77	44.5	126	12.5	231	na	2
A	431H	81	44.0	151	11.5	236	na	2
A	431K	98	26.6	176	4.4	113	25.0	2
A	431P	62	12.0	29	13.8	210	8.0	2
L	432R	58	23.1	38	15.6	175	13.3	2
L	432S	58	55.4	70	3.6	124	0.2	2
N	434F	na	na	1008	1.4	na	na	4
N	434G	105	17.9	358	20.2	26	128.9	4
N	434H	90	12.9	855	20.4	57	9.1	6
N	434I	81	9.3	6	725.4	73	8.9	2
N	434W	108	6.6	1335	18.8	138	1.7	2
N	434Y	106	7.7	1615	38.8	291	15.5	4
Y	436I	119	18.0	194	24.2	35	8.7	2
Y	436L	112	27.2	172	8.1	90	16.3	4
Y	436T	90	35.0	115	7.2	48	20.3	2
Q	438G	93	32.1	98	14.4	68	26.2	2
Q	438K	99	31.7	169	12.3	116	43.0	2
Q	438L	94	32.5	200	14.7	190	5.5	4
Q	438T	96	37.4	126	9.5	56	26.8	2
Q	438W	93	32.5	164	8.2	126	1.7	2
K	439E	103	28.9	94	9.0	53	40.3	2
K	439H	91	37.3	99	0.9	77	17.8	2
K	439Q	90	38.2	74	0.9	64	26.5	2
S	440A	79	42.3	82	2.0	85	22.5	2
S	440D	82	18.4	72	4.7	99	9.4	2
S	440E	104	4.0	73	2.8	87	35.3	2
S	440F	111	16.1	87	8.2	73	18.5	2
S	440G	106	1.9	101	8.1	83	8.5	2
S	440H	108	2.1	110	2.1	96	18.3	2
S	440I	121	1.9	96	6.2	86	2.6	2
S	440K	116	16.7	132	7.8	71	26.4	4
S	440L	112	6.4	126	2.2	77	4.5	4

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

131

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
S	440M	84	51.0	80	8.2	81	20.6	2
S	440N	78	34.3	82	25.4	108	15.8	2
S	440Q	73	43.1	81	33.5	132	16.6	2
S	440R	91	11.3	88	16.2	85	29.8	2
S	440T	89	2.1	71	39.0	115	17.4	2
S	440V	85	11.3	98	18.7	110	16.4	2
S	440W	114	17.6	85	13.8	132	14.8	2
S	440Y	109	6.8	100	14.2	224	14.1	16
S	442K	80	51.9	138	4.5	100	11.1	2

Na = not available or not done

*e.g., L235A indicates an Fc in which the leucine present at Fc amino acid number 235 (according to EU numbering) has been substituted with an alanine residue

tested here: the Fc region is an IgG1 Fc, the antibody is anti-CD20 antibody

5

Table 10 Combination Variants - ADCC

Variant	Average ADCC as % of wt	CV%	n=
Wild type	100	2.42	2
247A,339D	71.50	0.50	2
247F,339D	134.95	2.54	2
247H,339D	118.45	8.46	4
247I,339D	187.21	20.45	2
247L,339D	156.73	3.30	2
247T,339D	126.46	4.71	2
247Y,339D	121.93	4.58	2
247A,339H	125.35	0.60	2
247F,339H	101.54	4.53	2
247H,339H	114.24	4.91	2
247I,339H	126.94	5.22	2
247L,339H	120.92	2.44	2
247T,339H	97.96	5.71	2
247Y,339H	74.75	2.43	2
247A,339I	96.95	3.05	2
247F,339I	116.53	5.52	2
247H,339I	108.27	2.97	2
247I,339I	-4.07	-47.26	2
247L,339I	109.76	5.95	2
247T,339I	5.48	9.51	2
247Y,339I	100.84	9.58	2
247A,339K	86.90	13.51	2
247F,339K	105.85	10.11	2
247H,339K	97.59	7.67	2
247I,339K	97.41	14.89	2

【 0 1 3 2 】

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

132

Variant	Average ADCC as % of wt	CV%	n=
247L,339K	104.36	7.07	2
247T,339K	83.02	6.07	2
247Y,339K	95.79	3.69	2
332E	180.96	0.72	2
247A,339N	83.60	9.91	2
247F,339N	100.36	8.95	2
247H,339N	86.70	7.62	2
247I,339N	119.62	13.07	2
247T,339N	114.38	4.83	4
247Y,339N	113.18	1.50	2
332E	187.19	9.53	2
247A,339Q	69.94	8.45	2
247F,339Q	130.42	2.35	2
247H,339Q	138.96	1.32	2
247I,339Q	146.44	2.27	2
247L,339Q	140.50	4.58	2
247T,339Q	119.70	4.03	2
247Y,339Q	109.40	2.24	2
247A,339R	68.57	8.33	2
247F,339R	114.38	11.85	2
247H,339R	105.46	9.89	2
247I,339R	124.96	16.31	2
247L,339R	119.77	12.03	2
247T,339R	109.42	12.17	2
247Y,339R	98.58	13.09	2
247L,339T	148.48	7.08	4

wt = wild-type

CV% =

n = number of samples measured and averaged

5 Table 11 Combination Variants with ADCC Enhancement

Fc Variant	ADCC EC50 (ng/ml)
Wild type	6.8
247L	2.2
330K	3.1
332E	1.5
339T	3.8
247L, 330K	1.5
247L, 332E	0.73
247L, 339T	2.0
330K, 332E	0.73
330K, 339T	2.0

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

133

332E, 339T	1.0
247L, 332E, 339T	0.75
247L, 330K, 332E	0.25
247L, 330K, 339T	1.5
330K, 332E, 339T	0.25
247L, 330K, 332E, 339T	0.25

* ADCC activities were calculated from titration curves

Table 12 Combination Variants

Mutation	ADCC	CV%	FcRn6.0	CV%	CDC	CV%	n=
Wild Type	100		100		100		
247H339D	118	8.5	N/D	N/D	N/D	N/D	4
247L251F330R332E	184	13.3	50	5.9	43	1.3	2
247L251F376I	77	29.7	61	8.7	124	11.3	2
247L332E	168	7.3	78	4.9	65	6.2	6
247L332E376I	137	8.1	74	8.0	76	4.3	4
247T339N	114	4.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
251F332E	147	12.4	72	2.2	196	2.6	6
251F332E376I	136	15.9	68	5.0	160	10.9	4
251F376I	114	8.1	66	2.9	102	9.4	4
256P311I	107	0.2	268	1.2	357	10.0	2
256P314Y332E440Y	146	3.1	86	19.5	190	4.5	2
256P314Y440Y	112	22.6	79	3.0	226	9.4	2
256P332E	174	16.3	121	8.2	189	3.9	4
256P332E440Y	184	25.4	117	6.5	230	10.0	2
256P430Q	109	2.6	150	5.3	354	3.3	4
256P434H	105	1.2	342	3.1	299	2.9	2
256P440Y	169	19.7	122	0.7	247	26.6	2
257I311I	52	7.7	409	3.9	61	6.7	2
257I311I434H	48	12.2	553	4.9	75	8.8	6
257I430Q	26	8.1	304	0.6	55	12.9	4
257I434H	67	7.0	472	6.3	61	14.0	2
268D332E	137	12.4	92	13.7	128	4.1	4
268E332E	178	5.3	88	2.0	160	4.7	4
272R279L	56	0.2	156	1.2	72	5.1	2
279A288N	107	3.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N311T318V	110	9.0	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318N	110	5.4	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318T	116	5.1	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318V	118	8.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A311T318T	110	7.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
288N311T318T	115	9.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
311T318T	107	5.3	N/D	N/D	N/D	N/D	4
314Y332E440Y	156	5.4	82	0.9	155	0.0	2
314Y440Y	125	12.7	78	8.5	108	2.6	2
330K332D	179	2.9	88	8.3	43	0.3	2
330K332E	202	5.6	94	0.0	42	1.0	2
330R332D	152	6.3	88	6.3	44	1.5	2
330R332E	161	4.3	94	2.1	59	4.0	4
332E376I	132	8.6	102	7.6	193	5.2	6
332E376V	139	1.9	132	3.5	261	8.6	6

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

134

332E440Y	203	13.0	94	5.7	159	5.9	4
343R345D	121	16.0	143	1.6	291	3.3	2
376V430Q	92	1.5	212	4.2	256	12.2	4
376V430R	84	2.7	188	9.1	191	1.0	2
376V434H	97	3.3	382	3.3	95	6.1	4

Table 13 Combination Variants

Mutation	FcRn6.0	CV%	n=
Wild Type	100		
258D272R	382.8	8.2	2
258D283R	411.1	3.7	2
258D286F	445.0	1.7	2
258D307E	237.1	4.8	2
258D311I	522.0	7.0	2
258D376V	415.1	4.3	2
272R283R	439.3	21.7	2
272R286F	338.4	8.9	2
272R311I	396.1	14.4	2
272R376V	368.7	8.1	2
279D307E	522.4	8.8	2
283R307E	400.2	9.1	2
283R311I	531.3	6.1	2
283R376V	474.8	1.1	2
286F307E	431.2	3.8	2
286F311I	412.3	0.0	2
286F376V	348.9	1.5	2
307E376V	480.1	4.3	2
311I376V	413.5	39.1	2

5

Example 2 - Characterization of CDC Activity of Variants

This example describes how CDC activity of various variant Fc regions is determined.

- This assay is carried out using human complement (Quidel Corp., cat#AI 13) on
- 10 15 Ramos (RA #1) cell (ATCC Catalog No. CRL-1596). Ramos cells are cultured in Gibco RPMI1640 media containing 10% FBS at 37°C and 5% CO₂. The day before the assay, cells are seeded at 1×10^6 cells in a T175 flask. The following day, the cells are resuspended to 3.57×10^5 cells/ml in RPMI1640 without phenol red containing 1% FBS. Distribute 70 μ l cells per well to a Costar 3917 flat bottom plate. For titration curve, IgG
- 15 with a variant Fc region was prepared in a 3-fold serial dilution in RPMI1640 media. For single-point library screening assay, transiently expressed IgG variant in culture supernatant is normalized to 1 μ g/ml in mock media. Thirty microliter of variant IgG (i.e., 200 ng/ml final concentration) and 50 μ l of human complement (Quidel Corp., cat#A113)

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

135

1:5 diluted in RPMI 1640 + 1% FBS is added to the target cell and mixed well by gentle pipetting. The plates are incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 1.5 hours. After addition of 15 µl/well of Alamar Blue (Serotec, cat#BUF012B) the incubation continues overnight. Then the fluorescence signal is measured by PerkinElmer's
5 EnVision 2100 multilabel reader with excitation at 560 nm and emission at 590 nm.

ii. Data Analysis,

All single-point assays are performed in duplicate. Each assay plate contains controls for spontaneous target cell lysis by human complement in the absence of IgG and target cell maximal lysis in the presence of 1% Triton X-100. Three wild type controls
10 are included on each assay plate and the CDC assay signal averaged. The background value, obtained from the spontaneous lysis control, is subtracted from each sample. The data are converted from fluorescence signals to percentage of specific-lysis based upon spontaneous and maximal lysis controls. The percentage of specific-lysis is calculated from the following equation: percentage specific lysis = (experimental fluorescence signal
15 - spontaneous signal)/(maximal lysis signal - spontaneous signal) X 100. The percentage of Fc variant activity over the average of three wild type controls is then calculated. The percentage activities over wild type for duplicate assay plates are averaged and the standard deviation between individual assay plates is calculated.

20 Example 3 - Characterization of Binding to FcRn

This Example describes assays for Fc neonatal receptor (FcRn) binding to IgG with a variant Fc region.

A U-bottom 96-well ELISA plate is coated (Costar) with 50 µl/well of 2 µg/ml Neutravidin (Pierce Biotechnology, Cat#3 1000) in 50 mM Carbonate buffer (pH 9.3) at
25 4°C overnight. Unbound NeutraAvidin is removed and the plate is washed three times with PBST (PBS containing 0.1% Tween 20). Fifty microliters of biotin-labeled soluble FcRn at 2.5 µg/ml in PBS is applied per well and incubated at room temperature for 1 hr. Then 75 µl of casein blocking buffer (Pierce Biotechnology, Cat#37528) is added to the plate for 1 hour. The ELISA plate is then washed with PBST and incubated with 50
30 µl/well of variant IgG. For the titration curve, IgG to be tested is prepared by a 3-fold serial dilution in FcRn-binding buffer (100 mM NaPO₄, 0.05% Tween-20, optionally at

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

136

different pHs (from 6.0 to 7.4)). For single-point screening, transient expressed variant IgG in culture supernatant is normalized to a final concentration of 50 ng/ml and pH adjusted with FcRn binding buffer to 6.0. In the following steps, FcRn-binding buffer at corresponding pH is used to wash the plate and to dilute reagents. The binding reaction is carried out at room temperature for 1 hr. After three washes, bound IgG is detected by goat (Fab')₂ anti-human-Fab-HRP conjugate for 1 hr. HRP activity is developed in Pierce's HRP substrate (Turbo TMB-ELISA, Cat#34022) for 5-30 minutes. The reaction is stopped by addition of 50 µl of 2 M H₂SO₄ and the absorbance at 450nm is read with a VMAX microplate reader (Molecular Devices).

10

EXAMPLE 4 - Anti-CD20-I332E Fc Variant Human Therapy

In vitro studies and murine tumor models (Clynes RA, *et al.* Nat Med. 6:443 (2000)) provide evidence that ADCC plays a role in the anti-tumor effects of anti-CD20 antibodies, such as RITUXAN. Human patients may be treated with anti-CD20-I332E Fc variant antibodies or RITUXAN, in a manner similar to that disclosed in Cartron *et al.*, Blood 99:754 (2002). For example, patients presenting with stage II to IV disease according to the Ann-Arbor classification, having at least one measurable disease site, and low tumor burden according to the GELF criteria, could be treated with a total of four approximately 375 mg/m² doses of an anti-CD20-Fc variant or with RITUXAN administered by intravenous infusion (days 1, 8, 15, and 22). The primary efficacy end point is the objective response rate, i.e., the proportion of patients achieving either complete remission (CR), unconfirmed CR (Cru), or partial response (PR) according to criteria recently proposed by an international expert committee. Clinical response may be evaluated at month two (M2). Patients may also be evaluated for progression at 1 year (M12).

25

The objective response rates at M2 and M12 for patients treated with RITUXAN or anti-CD20-Fc variant can be compared such that the improved ADCC activities provided by an Fc variant may be quantified. This same example could be repeated with other anti-CD20 variants (*see, e.g.,* Tables 1-10 herein).

30

Additionally, the enhanced potency of the variants may permit different routes of administration, less frequent injections, and/or administration of smaller doses. All publications and patents mentioned in the above specification. Various modifications and

WO 2006/020114

PCT/US2005/025276

137

variations of the described method and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, 5 various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in chemistry, and molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

X 16877.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Applied Molecular Evolution (AME)
 <120> Variant Fc Regions
 <130> X16877
 <140> US 60/643,718
 <141> 2005-01-13
 <150> US 60/638,442
 <151> 2004-12-23
 <150> US 60/609,101
 <151> 2004-10-09
 <150> US 60/604,339
 <151> 2004-08-25
 <150> US 60/602,953
 <151> 2004-08-19
 <150> US 60/598,855
 <151> 2004-04-08
 <160> 36
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110

X 16877.ST25.txt

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 2
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110

X 16877.ST25.txt
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 3
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
 35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

X 16877.ST25.txt

115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160

Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 4
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 115 120 125

X 16877.ST25.txt

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

<210> 5
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 5

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 35 40 45

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 65 70 75 80

Cys Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 85 90 95

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
 100 105 110

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
 115 120 125

X 16877.ST25.txt

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
 130 135 140

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
 145 150 155 160

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
 165 170 175

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
 180 185 190

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 195 200 205

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 6
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 6

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 35 40 45

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 65 70 75 80

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 85 90 95

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 100 105 110

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 115 120 125

X 16877.ST25.txt
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 130 135 140

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 145 150 155 160

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 165 170 175

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 195 200 205

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 210 215

<210> 7
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 7

Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 35 40 45

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser His Leu Pro Ile Gln
 65 70 75 80

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 85 90 95

Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 100 105 110

Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln
 115 120 125

Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn

Page 8

X 16877.ST25.txt

Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln
 145 150 155 160

Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe
 165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu
 180 185 190

Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr
 195 200 205

Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 9
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

X 16877.ST25.txt

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

X 16877.ST25.txt

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Tyr Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 12
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

X 16877.ST25.txt

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

X 16877.ST25.txt

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe

<210> 14
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

X 16877.ST25.txt

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
50 55 60

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp
100 105 110

<210> 15

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

X 16877.ST25.txt

Phe

<210> 16
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ala Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp
 100 105 110

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 17

Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

X 16877.ST25.txt

<400> 18

Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser Lys
1 5 10 15

Leu

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val
1 5 10

X 16877.ST25.txt

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 23

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 24

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 25

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 26

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
1 5 10

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

X 16877.ST25.txt

<223> Synthetic Construct

<400> 27

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 1 5 10

<210> 29

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

X 16877.ST25.txt

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 30
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 30
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagctc aagtgtaccg tacatccact ggtaccagca gaaacctggc 120
 caggctccca ggctcctcat ctatgccaca tccgctctgg cttctggcat cccagacagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagact ggagcctgaa 240
 gattttgcag tgtattactg tcagcagtgg ctgagtaacc caccacttt tggccagggg 300
 accaagctgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagt gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 31
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial

X 16877.ST25.txt

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
50 55 60

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

X 16877.ST25.txt

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Gln Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 32
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

X 16877.ST25.txt

<223> Synthetic Construct

<400> 32

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcactgggt gcgccagatg      120
cccggaag gcttgagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac      180
aatcagaagt cgaaactcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact      300
tacgtgggcg gtgactggca gttcgatgtc tggggcaagg ggaccacggc caccgtctcc      360
tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag      660
cccaaatttt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg      720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa atcaaggaca ccctcatgat ctcccgacc      780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1020
tccaaacaga aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggac     1080
gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcctgggtc aaggcttcta tcccagcgac     1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga                                1356

```

<210> 33

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1          5          10          15

```

X 16877.ST25.txt

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
 50 55 60

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

X 16877.ST25.txt

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Asp Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 34
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 34
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcactgggt ggcgcagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac 180
 aatcagaagt cgaaactcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

X 16877.ST25.txt

```

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact 300
tacgtgggcg gtgactggca gttcgaatgc tggggcaagg ggaccacggt caccgtctcc 360
tcagcctcca ccaaggggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
gggggacacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 660
cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa atcaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780
cctgagggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaagg ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagaca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgagg 1080
gagctgacca agaaccagg cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1356

```

<210> 35
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
 50 55 60

X 16877.ST25.txt

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

X 16877.ST25.txt

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Asp Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 36
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 36
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcactgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac 180
 aatcagaagt cgaaactcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact 300
 tacgtgggcg gtgactggca gttcgatgtc tggggcaagg ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

X 16877.ST25.txt

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag	600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag	660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	720
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc	780
cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggac	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac	1140
atcgacgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc ctcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtccc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac	1320
acgcagaaga gcctctcctt gtctccgggt aaatga	1356

We Claim:

1. A polypeptide comprising a variant of a parent Fc region or portion thereof, wherein the variant Fc region or portion thereof comprises an amino acid substitution at one or more of amino acid positions 279, 341, 343 or 373 of the Fc region as compared to that present in the parent Fc region.

2. A polypeptide comprising a variant of a parent Fc region, wherein the variant Fc region comprises at least one of the following amino acid substitutions: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M,

430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V or 442K.

3. The polypeptide of claim 2, wherein the variant Fc region comprises at least one of the following amino acid substitutions: 235G, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256W, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283H, 283K, 283M, 283R, 283W, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292G, 292I, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315L, 315P, 316F, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373W, 375R, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378D, 378N, 379N, 379Q, 379T, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382I, 382K, 382L, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 440D, 440I or 440L.
4. The polypeptide of any of claims 1 to 3, wherein the parent Fc region is a native Fc region.

5. The polypeptide of any of claims 1 to 4, wherein the parent Fc region is an IgG Fc region, substantially an IgG Fc region, or a portion thereof.
6. The polypeptide of claim 5, wherein the parent Fc region is an IgG1, IgG3 or IgG4 Fc region, substantially an IgG1, IgG3 or IgG4 Fc region, or a portion thereof.
7. The polypeptide of any of claims 1 to 6, wherein the polypeptide is a monoclonal antibody.
8. The monoclonal antibody of claim 12, wherein the monoclonal antibody is a chimeric, humanized or human monoclonal antibody.
9. The monoclonal antibody of claim 12 or 13, wherein the monoclonal antibody is a full-length antibody or a single chain monoclonal antibody.
10. A monoclonal antibody comprising a variant of a parent Fc region, wherein the monoclonal antibody comprises at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 254F, 254M, 254Y, 256A, 258D, 279A, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I or 440L, wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays enhanced ADCC as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.
11. The monoclonal antibody of claim 10 comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I or 440L.

12. A monoclonal antibody comprising a variant of a parent Fc region, wherein the monoclonal antibody comprises at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, 254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283T, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V or 442K, wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays diminished ADCC as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.
13. The monoclonal antibody of claim 12 comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235R, 236F, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 250K, 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272N, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332K, 332R, 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376W, 432R or 432S.

14. A monoclonal antibody comprising a variant of a parent Fc region, wherein the monoclonal antibody comprises at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K, wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays enhanced FcRn binding affinity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.
15. The monoclonal antibody of claim 14 comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434I, 434J, 434K, 434L, 434M, 434N, 434O, 434P, 434Q, 434R, 434S, 434T, 434U, 434V, 434W, 434X, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L or 438W.
16. A monoclonal antibody comprising a variant of a parent Fc region, wherein the monoclonal antibody comprises at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q,

247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373D, 373G, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F or 440M, wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays diminished FcRn binding affinity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

17. The monoclonal antibody of claim 16 comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P or 432S.
18. A monoclonal antibody comprising a variant of a parent Fc region, wherein the monoclonal antibody comprises at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K,

283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332L, 332M, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 438L, 438W, 434Y, 438L, 438W, 440Q or 440Y, wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays enhanced CDC activity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.

19. The monoclonal antibody of claim 18, comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 236Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P, 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D, 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 434Y, 438L or 440Y.

20. A monoclonal antibody comprising a variant of a parent Fc region, wherein the monoclonal antibody comprises at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235G, 236R, 235S, 237K, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332E, 332M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M or 427N, wherein the monoclonal antibody comprising the variant Fc region displays diminished CDC activity as compared to the monoclonal antibody comprising the parent Fc region.
21. The monoclonal antibody of claim 20, comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T, 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 301W, 311S, 327T, 329Y, 330K, 378D, 385E, 423N or 424H.
22. The monoclonal antibody of any of claims 10 to 21, wherein the monoclonal antibody is a chimeric, humanized or human monoclonal antibody.
23. The monoclonal antibody of any of claims 10 to 22, wherein the monoclonal antibody is a full-length antibody or a single chain monoclonal antibody.
24. The monoclonal antibody of any of claims 7 to 23, wherein said antibody specifically binds a human target antigen selected from the group consisting of CD3, CD20, CD25, TNF α , Her2/neu, CD33, CD52, EGFR, EpCAM, MUC1,

GD3, CEA, CA125, HLA-DR, TGF β , VEGF, GDF8, GDF11, ghrelin, or any precursor or functional fragment thereof.

25. The polypeptide of any of claims 1 to 7, comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K, wherein the polypeptide comprising the variant Fc region displays enhanced serum half-life as compared to the polypeptide comprising the parent Fc region.

26. The polypeptide of claim 25, comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L or 438W.

27. The polypeptide of any of claims 1 to 7, comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G,

238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 246R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440D, 440E, 440F or 440M, wherein the polypeptide comprising the variant Fc region displays diminished serum half-life as compared to the polypeptide comprising the parent Fc region.

28. The polypeptide of claim 27, comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P or 432S.

29. A process of producing a variant monoclonal antibody with enhanced ADCC response as compared to the parent monoclonal antibody of said variant monoclonal antibody, comprising engineering the Fc region of the parent monoclonal antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 247A, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247T, 247Y, 249E, 249Y, 251F, 254F, 254M, 254Y, 256A, 256M, 258D, 268D, 268E, 279A, 280A, 280K, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 330K, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G,

339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I or 440L.

30. A variant monoclonal antibody produced by the process of claim 29.

31. A process of producing a variant monoclonal antibody with diminished ADCC response as compared to the parent monoclonal antibody of said variant monoclonal antibody, comprising engineering the Fc region of the parent monoclonal antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, 254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283T, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 429A, 429F, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V or 442K.

32. A variant monoclonal antibody produced by the process of claim 31.

33. A process of producing a variant monoclonal antibody with enhanced FcRn binding affinity as compared to the parent monoclonal antibody of said variant monoclonal antibody, comprising engineering the Fc region of the parent

monoclonal antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K.

34. A variant monoclonal antibody produced by the process of claim 33.

35. A process of producing a variant monoclonal antibody with diminished FcRn binding affinity as compared to the parent monoclonal antibody of said variant monoclonal antibody, comprising engineering the Fc region of the parent monoclonal antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H,

431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K.

36. A variant monoclonal antibody produced by the process of claim 35.

37. A process of producing a variant monoclonal antibody with enhanced CDC response as compared to the parent monoclonal antibody of said variant monoclonal antibody, comprising engineering the Fc region of the parent monoclonal antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247g, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 250K, 250R, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332H, 332L, 332M, 332N, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q or 440Y.

38. A variant monoclonal antibody produced by the process of claim 37.

39. A process of producing a variant monoclonal antibody with diminished CDC response as compared to the parent monoclonal antibody of said variant monoclonal antibody, comprising engineering the Fc region of the parent monoclonal antibody to comprise at least one of the following amino acid substitutions: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332K, 339E, 339M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M or 427N.
40. A variant monoclonal antibody produced by the process of claim 39.
41. A process of producing a variant polypeptide with enhanced serum half-life as compared to the parent polypeptide of said variant polypeptide, comprising:
- a) expressing the variant polypeptide from a nucleic acid molecule encoding said parent polypeptide operably linked to a nucleic acid molecule encoding a Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A,

430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442K.

b) isolating and purifying the variant polypeptide.

42. A variant polypeptide produced by the process of claim 41.

43. A process of producing a variant polypeptide with diminished serum half-life as compared to the parent polypeptide of said variant polypeptide, comprising:

a) expressing the variant polypeptide from a nucleic acid molecule encoding said parent polypeptide operably linked to a nucleic acid molecule encoding a Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K or 442; and

b) isolating and purifying the variant polypeptide.

44. A variant polypeptide produced by the process of claim 43.

45. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid molecule encoding a variant Fc region comprising at least one of the following amino acid substitutions in the Fc region: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V or 442K.
46. A vector comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 45.

47. The vector of claim 46, wherein the vector is an expression vector.
48. A host cell comprising the vector of claim 47.
49. The host cell of claim 48, wherein the host cell type is selected from the group consisting of CHO, COS, SP2/0, NSO, yeast, E.coli or a derivative or progeny of any preferred cell type.
50. A pharmaceutical composition comprising the variant polypeptide of any one of claims 1-7, 25-28, 42 or 44.
51. A pharmaceutical composition comprising the variant monoclonal antibody of any one of claims 8-24, 30, 32, 35, 36 or 38.
52. An anti-CD20 antibody comprising:
- (a) a light chain variable region amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:13;
 - (b) a heavy chain variable region amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:14; and
 - (c) a variant of a parent Fc region wherein the variant Fc region comprises an amino acid substitution selected from the group consisting of 247I/339Q, 247I/339D, and 378D.
53. The anti-CD20 antibody of Claim 52, wherein the Fc variant is 247I/339Q.
54. The anti-CD20 antibody of Claim 52, wherein the Fc variant is 247I/339D.
55. The anti-CD20 antibody of Claim 52, wherein the Fc variant is 378D.
56. The anti-CD20 antibody of Claim 53, comprising a light chain amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:29 and a heavy chain amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:31.

57. The anti-CD20 antibody of Claim 54, comprising a light chain amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:29 and a heavy chain amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:33.

5

58. The anti-CD20 antibody of Claim 55, comprising a light chain amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:29 and a heavy chain amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:35.

10 59. A pharmaceutical composition comprising the anti-CD20 antibody of any one of Claims 52-58.

Abstract: The present invention provides polypeptides, particularly therapeutic antibodies, comprising a novel, variant Fc region. Furthermore the invention provides variant Fc regions which confer an altered effector function or altered serum half life upon a polypeptide to which it is operable attached.

FIG. 1

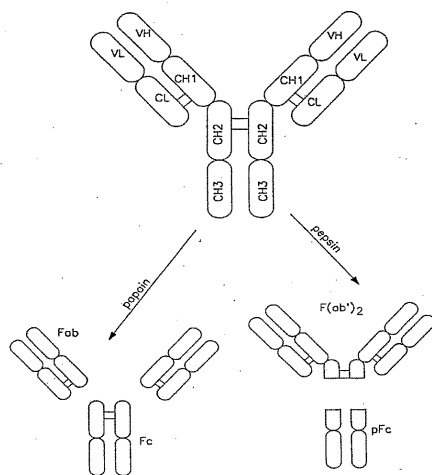


FIG. 2

230	hum19g1	PAPELLGGSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV	280	DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	hum19g2	PAP-PVAGSFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	hum19g3	PAPELLGGSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	hum19g4	PAPELLGGSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	mur19g1	---TVSEVSSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	mur19g2A	PAPELLGGSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	mur19g2B	PAPELLGGSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
	mur19g3	PAPELLGGSVFLPPKPKDTLMSITPTVTCVVDVSHEDPEVKENMTV		DOVEVHNAKTPREQFNSTFRVSVTLVLDQMLNGKEKCKVKNKALP
330	hum19g1	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV	380	EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	hum19g2	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	hum19g3	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	hum19g4	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	mur19g1	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	mur19g2A	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	mur19g2B	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
	mur19g3	APIETIKSKAGQPREPQVTLPPSRREMTKNQVSLCIVKGFTPSDIAV		EWESNQPPNNYKTPPPMLDSGSPFLYSLKLTVDKSRWQGVFSCSWH
430	hum19g1	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:1)	
	hum19g2	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:2)	
	hum19g3	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:3)	
	hum19g4	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:4)	
	mur19g1	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:5)	
	mur19g2A	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:6)	
	mur19g2B	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:7)	
	mur19g3	EALNNHYTKQKSLSGSK	(SEQ ID NO:8)	

FIG. 3

A. Parental CH2 (SEQ ID NO:9)

APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK

B. Parental CH3 (SEQ ID NO:10)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

C. Parental. Polypeptide (f allotype) (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG
PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRW
QQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

D. Parental Polypeptide (a, z allotype) (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG
PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRW
QQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

FIG. 5

A. SEQ ID NO:29: AME 133 complete light chain amino acid sequence

EIVLTQSPGTL¹SLSPGERATL²SCRASSSVPIYHWYQQKPGQAPRLLIYAT³SALASGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQWLSNPPTFGQGT⁴LEIKRTVAAPS⁵VFIFPPS
DEQLKSGTASV⁶CLLNFPY⁷PREAKVQ⁸WVDNALQ⁹SGNSQ¹⁰ESVTEQ¹¹DSK¹²ST¹³YSL¹⁴TL¹⁵
SKADY¹⁶EKH¹⁷KVY¹⁸ACEV¹⁹T²⁰Q²¹LS²²SPV²³TK²⁴SNR²⁵GE²⁶C

- Constant Region is underlined

B. SEQ ID NO:30: AME 133 complete light chain nucleic acid sequence

GAAATTGTTGACGAGCTCTCCAGGACCCCTGCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCTGACAGGCGCAGCTCAAGTGTACCGTACATCCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGC
CAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGCCACATCCGCTCTGGCTTCTGGCATCCCAGACAGG
TTCAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACAGCTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
GATTTTGAGTGTATTACTGTGACAGTGGCTGAGTAAACCCACCACTTTGGCCAGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCTCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAATCTGGAAGTGGCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCCAATCGGGTAACTCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTACGAGCAGCCCTGACGCTG
AGCAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCATCAGGCGCTG
AGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

FIG. 4

A. (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGT¹LSLSPGERAT²LSCRASSSVPIYHWYQQKPGQAPRLLIYAT³
SALASGIPDR⁴FSGSGSGTD⁵FTLTISRLEPE⁶DAVYYCQW⁷LSNPPT⁸F

B. (SEQ ID NO: 14)

EVQLVQSGAE¹VKKPGESLKI²SCKSGSRFT³SYNMHWVRQM⁴PGKGLEWMGA
IYPLTGDTSY⁵NQKSKLQVTI⁶SADKSISTAY⁷LQWSSLKASD⁸TAMYYCARST⁹
YVGGDWQFDV¹⁰W

C. Anti-CD20 LCVR (II) (SEQ ID NO: 15)

QIVLSQSPAI¹LSASPGKVT²MTCRASSSVSYIHWYQQKPG³SSPKPWIIAT⁴
SNLASGVPVR⁵FSGSGSGTSY⁶SLTISRVEAE⁷DAATYYCQW⁸TSNPPT⁹F

D. Anti-CD20 HCVR (II) (SEQ ID NO: 16)

QVQLQQPGAE¹LVKAGASVKM²SCKASGYTFT³SYNMHWVQK⁴PGRGLEWIGA
IYPGNGDTSY⁵NQKFKGKATL⁶TADKSSSTAY⁷MLSSLTSED⁸SAVYYCARST⁹
YVGGDWYFNV¹⁰W

E. Anti-CD20 (I)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 17): RASSSVPIYH

LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 18): ATSALAS

LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 19): QQWLSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 20): GRTFTSYNMH

HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 21): AIYPLTGDTSYNQKSKL

HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 22): STYVGGDWQFDV

Anti-CD20 (II)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 23): RASSSVSYIH

LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 24): ATSNLAS

LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 25): QQWTSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 26): GYTFTSYNMH

HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 27): AIYPGNGDTSYNQKFKG

HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 28): STYVGGDWYFNV

FIG. 6

A. SEQ ID NO:31: AME 133 (247I/339Q variant) complete heavy chain amino acid sequence

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISKCKSGSRFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSTYVGGDWQFDVWVGKTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSR
WQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

- Constant Region is underlined; variants are bolded

B. SEQ ID NO:32: AME 133 (247I/339Q variant) complete heavy chain nucleic acid sequence

GAGGTGACGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAGAGCCGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTCTGGCCGTACATTTACAGTTTACAAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGGAAGGCTGGAGTGGATGGGGGCTATTATCCCTTGACGGGTGATCTCTCTAC
AATCAGAGTGCAGAACTCCAGGTACCATCTCAGCCGACAGTCCATCAGCAGCCGCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCTGAGGCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGATC
TACGTGGSCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCAAGGTACCGTCTCC
CAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCTCCAGAGCAGCTCT
GGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAGCCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACAGCGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTCAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACGTCGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGGTTGAG
CCCAATCTTGTGACAAACTCACATGCCCCACCGTGCCCGAGCAGCTGAACTCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAATCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACC
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGAGCGCGTGGAGTGATATGCGAAGCAAGCCCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCAGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTTCCCGTCTGACAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCGCATCGAGAAACCATC
TCCAAACAGAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGACACCTGCCCCATCCCGGAC
GAGTGTACCAAGAACCGGTGACCTGACCTGGTCAAGGCTTCTATCCCGAGCAC
ATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAGCACTACAAGACCAAGCCCTCC
GTGCTGGACTCCGAGCGCTCTTCTCTCTATAGCAAGCTACCGTGGACAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAGCTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACACCACTAC
ACGCAAGAGAGCTCTCTCTGCTCCGGGTAAATGA

- Variants are bolded and underlined

FIG. 6

C. SEQ ID NO:33: AME 133 (247I/339D) variant complete heavy chain amino acid sequence

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKDKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- Constant Region is underlined; variants are bolded

D. SEQ ID NO:34: AME 133 (247I/339D) variant complete heavy chain nucleic acid sequence

GAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAAGGTTCTGGCCGTACATTACACAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCGGGGAAAGGCTTGGAGTGGATGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACCTCTTAC
 AATCAGAAGTCGAACTCCAGGTACCATCTCAGCCGACAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCTTCGACACCGCCATGATATTCTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGCGAGTTCGATGCTCGGGCAAGGGGACACCGGTACCGTCTCC
 TCAGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCT
 GGGGACACAGCGGCCCTGGGTGCTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACACGCGGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAG
 ACCTACATCTGCAAGCTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA**AAT**CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGAAC
 CCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCTCTCACCGTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTCAAGTGCAGGCTCTCCAA**CA**AAGCCCTCCAGCCCTCATCGAGAAAACATC
 TCCAAAG**GAC**CAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCCGGAC
 GAGCTGACCAAGAACCCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCACGCGAC
 ATCCCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAAGACACCGCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGACGTCTTCTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

- Variants are bolded and underlined

FIG. 6

E. SEQ ID NO:35: AME 133 (378D) variant complete heavy chain amino acid sequence

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIDVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- Constant Region is underlined; variant is bolded

F. SEQ ID NO:36: AME 133 (378D) variant complete heavy chain nucleic acid sequence

GAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAAGGTTCTGGCCGTACATTACACAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCGGGGAAAGGCTTGGAGTGGATGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACCTCTTAC
 AATCAGAAGTCGAACTCCAGGTACCATCTCAGCCGACAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCTTCGACACCGCCATGATATTCTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGCGAGTTCGATGCTCGGGCAAGGGGACACCGGTACCGTCTCC
 TCAGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCT
 TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAGCGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAG
 ACCTACATCTGCAAGCTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA**CA**AGGACACCCCTCATGATCTCCCGAAC
 CCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCTCTCACCGTCTGACACCAAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTCAAGTGCAGGCTCTCCAA**CA**AAGCCCTCCAGCCCTCATCGAGAAAACATC
 TCCAAAG**GAC**CAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCCGGAC
 GAGCTGACCAAGAACCCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCACGCGAC
 ATCCCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAAGACACCGCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGACGTCTTCTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

- Variant is bolded and underlined