

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-516320
(P2024-516320A)

(43)公表日 令和6年4月12日(2024.4.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全57頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-568549(P2023-568549)			(71)出願人	519274183
(86)(22)出願日	令和4年5月6日(2022.5.6)				イノベント バイオロジクス (スーチョウ) カンパニー, リミティド
(85)翻訳文提出日	令和6年1月5日(2024.1.5)				中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/091187				2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ, トンピン ストリート
(87)国際公開番号	WO2022/233320				1 6 8
(87)国際公開日	令和4年11月10日(2022.11.10)			(74)代理人	100099759
(31)優先権主張番号	202110495363.7				弁理士 青木 篤
(32)優先日	令和3年5月7日(2021.5.7)			(74)代理人	100123582
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	202210436873.1			(74)代理人	100117019
(32)優先日	令和4年4月25日(2022.4.25)				弁理士 渡辺 陽一
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			(74)代理人	100141977
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				弁理士 中島 勝
			最終頁に続く		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 F c 受容体への結合が改変された F c 変異体

(57)【要約】

本発明は、F c γ RまたはC 1 qへの結合を低減した、修飾された免疫グロブリン定常領域 (F c) 変異分子に関し、当該分子は、生体内で望ましくないA D C Cおよび／またはA D C Pおよび／またはC D Cエフェクター機能を顕著に低減させることができる。また、本発明は、さらに前記F c 変異分子の使用、前記変異分子を含む融合タンパク質およびその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト野生型 F c 領域と比較して、1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む F c 変異体であって、前記修飾は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位、2 3 4 位、2 3 5 位、もしくは 3 3 0 位から選択される、F c 変異体。

【請求項 2】

以下のような修飾を含む、請求項 1 に記載の F c 変異体：

1) K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位のアミノ酸の欠失 (Δ 3 2 9)、あるいは

2) K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位および 3 3 0 位のアミノ酸の欠失 (Δ 3 2 9 および Δ 3 3 0) を含む、あるいは

4) K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた Δ 3 2 9 + A 3 3 0 G または Δ 3 2 9 + S 3 3 0 G の修飾、あるいは

5) K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + Δ 3 2 9、V 2 3 4 A + Δ 3 2 9 または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + Δ 3 2 9 の修飾、あるいは

6) K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + Δ 3 2 9 + Δ 3 3 0、V 2 3 4 A + Δ 3 2 9 + Δ 3 3 0 または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + Δ 3 2 9 + Δ 3 3 0 の修飾、あるいは

7) K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + Δ 3 2 9、V 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9、V 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + Δ 3 2 9、F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + Δ 3 2 9 または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9 の修飾。

【請求項 3】

ヒト I g G 型 F c 変異体であり、好ましくは I g G 1 型、I g G 2 型、または I g G 4 型 F c 変異体である、請求項 1 または 2 に記載の F c 変異体。

【請求項 4】

以下のような配列を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の F c 変異体：

1) 配列番号 2 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

2) 配列番号 3 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

3) 配列番号 4 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

4) 配列番号 5 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

5) 配列番号 6 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

6) 配列番号 7 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、また

18) 配列番号22のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該

50

配列からなるもの、あるいは

19) 配列番号23のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

20) 配列番号24のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

21) 配列番号25のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

10

22) 配列番号27のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

23) 配列番号28のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

20

24) 配列番号29のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

25) 配列番号30のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

26) 配列番号31のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

30

27) 配列番号32のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

28) 配列番号33のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの。

40

【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のFc変異体を含む、ポリペプチド。

【請求項6】

抗体分子であり、好ましくは、前記抗体分子はIgGクラス抗体分子である、請求項5に記載のポリペプチド。

【請求項7】

以下のような重鎖および軽鎖を含む、請求項6に記載のFc変異体を含む抗体分子：

1) 配列番号2に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは

2) 配列番号3に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは

50

3) 配列番号 4 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは
 4) 配列番号 5 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは
 5) 配列番号 6 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは
 6) 配列番号 7 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは
 7) 配列番号 8 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは
 8) 配列番号 11 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

9) 配列番号 12 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

10) 配列番号 13 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

11) 配列番号 14 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

12) 配列番号 15 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

13) 配列番号 16 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

14) 配列番号 17 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

15) 配列番号 19 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

16) 配列番号 20 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

17) 配列番号 21 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

18) 配列番号 22 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

19) 配列番号 23 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

20) 配列番号 24 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

21) 配列番号 25 に示される重鎖および配列番号 9 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

22) 配列番号 27 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

23) 配列番号 28 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

24) 配列番号 29 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

25) 配列番号 30 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

26) 配列番号 31 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

27) 配列番号 32 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの、あるいは

28) 配列番号 33 に示される重鎖および配列番号 34 に示される軽鎖を含むもの。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の Fc 変異体、または請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド、および薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の F c 変異体の、A D C C、A D C P または C D C エフェクター機能を低減または除去することにおける、使用。

【請求項 1 0】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の F c 変異体、または請求項 5～7 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 1 2】

請求項 1 0 に記載の核酸分子または請求項 1 1 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 1 3】

対象の腫瘍を治療する方法であって、有効量の請求項 8 に記載の医薬組成物または請求項 1～4 のいずれか一項に記載の F c 変異体、もしくは請求項 5～7 のいずれか一項に記載のポリペプチドを、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 1 4】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の F c 変異体、請求項 5～7 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、キット。

【請求項 1 5】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の F c 変異体、または請求項 5～7 のいずれか一項に記載のポリペプチドを調製する方法であって、適切な条件下で、請求項 1 2 に記載の宿主細胞において、請求項 1 0 に記載の核酸分子または請求項 1 1 に記載のベクターを発現させることを含み、場合により、前記方法は、発現された F c 変異体またはポリペプチドを回収することをさらに含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、一般に、免疫学および抗体工学の分野に関し、具体的には、I g G 免疫グロブリンの変異体、その調製方法およびその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

近年の治療用抗体の開発に伴い、研究者は、一方では新たな標的の探索と発見を継続し、他方では、その有益な効果を高めるかまたは増強するために、創薬可能な抗体に対してアップグレード改造を継続して行い、ここで、研究の焦点の 1 つは、抗体 F c 領域に対する改造に集中している。

【0 0 0 3】

周知のように、抗体の F c 領域は抗原結合活性がないが、抗体が細胞表面の F c 受容体と相互作用する部位であるため、抗体のエフェクター機能に対して重要な役割を果たし、F c 領域は異なる F c 受容体との相互作用により、抗体が多様なエフェクター機能、例えば、抗体は抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 (A D C C)、抗体依存性細胞貪食作用 (A D C P)、補体依存性細胞傷害 (C D C) を発揮することができる。A D C C、A D C P、C D C エフェクター機能に関して、腫瘍細胞または病原体上に発現する抗原を認識して悪性細胞を除去することを標的とする抗体に対しては、効果的に、さらには強化された A D C C、A D C P、C D C エフェクター機能は、抗体の治療効果に寄与するが、例えば、T 細胞上に発現する抗原に対して細胞表面受容体／サイトカインまたは免疫調節を遮断することを標的とする抗体に対しては、A D C C、A D C P、C D C エフェクター機能を低減さらには除去することはしばしば必要とされ、これは、標的細胞表面抗原の抗体が、免疫細胞に不要な免疫刺激および関連するエフェクター機能ならびに補体活性化を誘発して不利な結果をもたらすからであり、この点は、特に、標的細胞の低損失が必要とされる免疫チェックポイント阻害剤抗体に対しては、特に重要である。

【0 0 0 4】

ヒト I g G サブクラス (I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4) は異なる免

10

20

30

40

50

疫機能を有し、例えば、異なるサブクラスのIgG抗体は異なるADCC活性を有し、他のサブクラスと比較して、IgG1とIgG3は比較的強いADCC活性を有し、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4は、抗体依存性細胞貪食作用(ADCP)を有する。治療用抗体およびFc融合構築物は、多くの場合、所望の局所細胞または組織を破壊または損傷することができなく、標的リガンド機能領域を標的および活性化または中和する必要があるため、実際の生産用途では、Fcエフェクター機能を低減または除去する(例えば、ADCCおよび/またはADCP活性を低減または除去すること、CDC活性を低減または除去すること)Fc変異体を求める実際の要求が常に存在しており、本出願はこの要求を満たす。

【0005】

10

既存の文献報告によると、Fc領域の一部のアミノ酸変異は、ADCCおよび/またはADCP活性を低減または除去する効果、CDC活性を低減または除去する効果が奏する可能性があり、例えばXENCORのпатентファミリーUS8734791B2、US10183999B2、US8883147B2、RocheのпатентファミリーCN103476795Bなど、多数はADCCおよびCDC活性を低減させる効果を有するが、ADCCおよびCDC効果を完全に除去する変異は比較的まれであり、本出願は野生型Fcアミノ酸配列を標的化改造することにより、ADCCおよびCDC効果を完全に除去するFc変異分子を取得する。

【発明の概要】

【0006】

20

本発明は、操作改造された抗体または抗体ベースの治療薬に使用可能な、修飾された免疫グロブリン定常領域(Fc領域)の変異分子を提供する。

【0007】

本出願に開示された変異および/またはそれらの組み合わせをFc領域に含めることにより、野生型Fc領域を含む分子と比較して、本出願の変異Fc領域を含む抗体、抗体ベースの治療薬、および変異Fc領域を含む他の分子は、FcγRまたはC1qへの結合作用が極めて低減され、これにより、望ましくないADCCおよび/またはADCPおよび/またはCDCエフェクター機能は、生体内で顕著に低減される。さらに、本出願に開示されたFc変異は、本出願の変異Fc領域を含む抗体、抗体ベースの治療薬、および変異Fc領域を含む他の分子がFcRnに結合する能力に影響を与えず、したがって、対応する分子の半減期に影響を与えない。したがって、本出願は、特定の変異を有するFc領域ポリペプチド分子、低減または除去されたADCCおよび/またはADCPおよび/またはCDCエフェクター機能を有するが、依然としてFcRnに結合する能力を保持している前記の変異Fc領域を含む抗体分子または類似の構造分子を提供する。

30

【0008】

第1の態様では、本出願は、異なる修飾を有するFc変異体を提供し、野生型Fc領域と比較して、当該Fc変異体はFc受容体および/またはC1qに対する親和性の低下を示し、ひいては当該Fc変異体によって誘導されるADCC、CDCおよびADCPエフェクター機能を低減または除去する。一実施形態では、Fc変異体によって誘導されるADCC、CDCおよびADCPエフェクター機能は、対応する野生型によって誘導されるADCC、CDCおよびADCPエフェクター機能の少なくとも80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%もしくは完全に除去されるまで低減される。

40

【0009】

一実施形態では、本出願で提供されるFc変異体は、1つまたは複数のアミノ酸欠失を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供されるFc変異体は、KabattのEUIンデックスにしたがって番号付けされた329位のアミノ酸の欠失(Δ329)を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供されるFc変異体と対応する野生型Fcとの相違は、KabattのEUIンデックスにしたがって番号付けされた329位の欠失(Δ329)にある。別の具体的な実施形態では、本出願で提供されるFc変異体は、Kabatt

50

の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位および 3 3 0 位のアミノ酸の欠失 ($\Delta 3 2 9$ および $\Delta 3 3 0$) を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体と対応する野生型 F c との相違は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位および 3 3 0 位の欠失 ($\Delta 3 2 9$ および $\Delta 3 3 0$) にある。

【0010】

一実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 2 3 4 位および / または 2 3 5 位のアミノ酸の置換を含み、ここで、2 3 4 位の L、V、F および / または 2 3 5 位の L は、それぞれ A、V、L、および I で置換されている。一好ましい実施形態では、前記 F c 変異体は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A、V 2 3 4 A、または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体と対応する野生型 F c との相違は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A、V 2 3 4 A または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A にある。

10

【0011】

一実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、1 つまたは複数のアミノ酸欠失および 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位のアミノ酸の欠失および 3 3 0 位の置換を含み、ここで、3 3 0 位は、G、D または Q で置換されている。一好ましい実施形態では、前記 F c 変異体は、 $\Delta 3 2 9 + A 3 3 0 G$ または $\Delta 3 2 9 + S 3 3 0 G$ を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体と対応する野生型 F c との相違は、 $\Delta 3 2 9 + A 3 3 0 G$ または $\Delta 3 2 9 + S 3 3 0 G$ にある。

20

【0012】

一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位のアミノ酸の欠失および 2 3 4 位と 2 3 5 位のアミノ酸の置換を含み、ここで、2 3 4 位の L、V、F および / または 2 3 5 位の L は、それぞれ A、V、L、および I で置換されている。一好ましい実施形態では、前記 F c 変異体は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9$ 、V 2 3 4 A + $\Delta 3 2 9$ 、または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9$ を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体と対応する野生型 F c との相違は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9$ 、V 2 3 4 A + $\Delta 3 2 9$ 、または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9$ にある。

30

【0013】

別の具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位と 3 3 0 位のアミノ酸の欠失および 2 3 4 位と 2 3 5 位のアミノ酸の置換を含み、ここで、2 3 4 位の L、V、F および / または 2 3 5 位の L は、それぞれ A、V、L、および I で置換されている。一好ましい実施形態では、前記 F c 変異体は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9 + \Delta 3 3 0$ 、V 2 3 4 A + $\Delta 3 2 9 + \Delta 3 3 0$ 、または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9 + \Delta 3 3 0$ を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体と対応する野生型 F c との相違は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9 + \Delta 3 3 0$ 、V 2 3 4 A + $\Delta 3 2 9 + \Delta 3 3 0$ 、または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + $\Delta 3 2 9 + \Delta 3 3 0$ にある。

40

【0014】

別の具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体は、K a b a t の E U インデックスにしたがって番号付けされた 3 2 9 位のアミノ酸の欠失および 2 3 4 位、2 3 5 位、3 3 0 位のアミノ酸の置換を含み、ここで、2 3 4 位の L、V、F および / または 2 3 5 位の L は、それぞれ A、V、L、および I で置換されており、3 3 0 位は、G、D、または Q で置換されている。一好ましい実施形態では、前記 F c 変異体は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + $\Delta 3 2 9$ 、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + $\Delta 3 2 9$ 、V 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + $\Delta 3 2 9$ 、V 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + $\Delta 3 2 9$ 、F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + $\Delta 3 2 9$ 、または F 2 3 4 A + L 2

50

3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9を含む。一具体的な実施形態では、本出願で提供される F c 変異体と対応する野生型 F c との相違は、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9、L 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + Δ 3 2 9、V 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9、V 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + Δ 3 2 9、F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + S 3 3 0 G + Δ 3 2 9、または F 2 3 4 A + L 2 3 5 A + A 3 3 0 G + Δ 3 2 9 にある。

【0015】

いくつかの実施形態では、本発明で提供される F c 変異体は、I g G 1 型 F c 変異体であり、対応する野生型 F c 領域と比較して、前記変異体は、低減、さらには除去された F c γ R に結合する能力を有する。別のいくつかの実施形態では、本発明で提供される F c 変異体は I g G 2 型、I g G 3 型、および I g G 4 型 F c 変異体であり、対応する野生型 F c 領域と比較して、前記変異体は、低減、さらには除去された F c γ R に結合する能力を有する。好ましくは、本発明で提供される F c 変異体は、F c R n に結合する能力を保持する。

10

【0016】

本出願で開示される F c 変異体は、A D C C / A D C P / C D C エフェクター機能を低減さらには除去する必要がある任意の場面、例えば、A D C C / A D C P / C D C エフェクター機能の低減さらには除去が望まれる任意の種類の抗体分子、類似の抗体構造を有する分子において、プラットフォーム構成要素として適用することができる。

【0017】

一実施形態では、前記 F c 変異体は実質的に I g G 配列に基づき、一好ましい実施形態では、前記 F c 変異体は実質的にヒト I g G 配列に基づき、別の実施形態では、前記 F c 変異体は実質的にヒト I g G 1 配列に基づく。

20

【0018】

別の実施形態では、前記 F c 変異体は、他の修飾、例えば、免疫原性を低下させ、安定性、溶解性、機能および臨床的利益を向上させるための従来技術で知られている他の修飾をさらに含み得る。

【0019】

一具体的な実施形態では、F c 変異体は以下の配列を含む：

1) 配列番号 2 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

30

2) 配列番号 3 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

3) 配列番号 4 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

40

4) 配列番号 5 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

5) 配列番号 6 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

6) 配列番号 7 の E U インデックスによる 2 2 1 位～4 4 7 位のアミノ酸の配列、また

50

18) 配列番号22のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該

50

配列からなるもの、あるいは

19) 配列番号23のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

20) 配列番号24のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

21) 配列番号25のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

22) 配列番号27のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

23) 配列番号28のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

24) 配列番号29のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

25) 配列番号30のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

26) 配列番号31のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

27) 配列番号32のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの、あるいは

28) 配列番号33のEUインデックスによる221位～447位のアミノ酸の配列、または当該配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにはより高い同一性を有するアミノ酸配列、または当該配列からなるもの。

【0020】

第2の態様では、本発明は、第1の態様に記載のFc変異体を含むポリペプチドを提供し、野生型Fc領域を含むポリペプチドと比較して、前記ポリペプチドは、低減または除去されたADCCおよび／またはADCPおよび／またはCDCエフェクター機能を有し、好ましくは、前記ポリペプチドは、ADCCおよび／またはADCPおよび／またはCDC効果を引き起こさない。一具体的な実施形態では、前記ポリペプチドは、延長された半減期を同時に有する。一実施形態では、第1の態様に記載のFc変異体を含むポリペプチドによって誘導されるADCC、CDCおよびADCPエフェクター機能は、対応する野生型を含むポリペプチドによって誘導されるADCC、CDCおよびADCPエフェク

10

20

30

40

50

ター機能の少なくとも80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%もしくは完全に除去されるまで低減される。

【0021】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは抗体分子であり、好ましくは、前記抗体分子はIgGクラスの抗体分子である。別の実施形態では、前記抗体分子は、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体融合体である。対応する野生型抗体分子と比較して、本出願で得られた前記Fc変異体を含む抗体分子は、FcγRとの結合能力が低減、さらには除去されており、したがって、低減または除去されたADCCおよび／またはADCPおよび／またはCDCエフェクター機能を有する。

【0022】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、Fc変異体に有効に連結された1つまたは複数の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、前記融合パートナーは通常、任意のタンパク質または小分子、例えば、任意の抗体の可変領域、受容体の標的結合領域、接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン、ケモカイン、もしくはいくつかの他のタンパク質またはタンパク質ドメインであってもよい。一実施形態では、前記融合タンパク質は、例えばイムノアドヘシンである。

【0023】

一実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた329位のアミノ酸の欠失(Δ329)を含む、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。別の具体的な実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた329位および330位のアミノ酸の欠失(Δ329およびΔ330)を含む、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。

【0024】

一実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた234位および／または235位のアミノ酸の置換を含み、ここで、234位のL、V、Fおよび／または235位のLは、それぞれA、V、L、およびIで置換されている、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。一好ましい実施形態では、前記IgG抗体は、L234A+L235A、V234A、またはF234A+L235Aを含む。

【0025】

一実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた329位のアミノ酸の欠失および330位の置換を含み、ここで、330位は、G、DまたはQで置換されている、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。一好ましい実施形態では、前記IgG抗体はΔ329+A330GまたはΔ329+S330Gを含む。

【0026】

一実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた329位のアミノ酸の欠失および234位と235位のアミノ酸の置換を含み、ここで、234位のL、V、Fおよび／または235位のLは、それぞれA、V、L、およびIで置換されている、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。一好ましい実施形態では、前記IgG抗体は、L234A+L235A+Δ329、V234A+Δ329、またはF234A+L235A+Δ329を含む。

【0027】

一実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた329位と330位のアミノ酸の欠失および234位と235位のアミノ酸の置換を含み、ここで、234位のL、V、Fおよび／または235位のLは、それぞれA、V、L、およびIで置換されている、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。一好ましい実施形態では、前記IgG抗体は、L234A+L235A+Δ329+Δ330、V234A+Δ329+Δ330、またはF234A+L235A+Δ329+Δ330を含む。

【0028】

一実施形態では、本出願は、KabattのEUインデックスにしたがって番号付けされた329位のアミノ酸の欠失および234位、235位、330位のアミノ酸の置換を含

10

20

30

40

50

み、ここで、234位のL、V、Fおよび／または235位のLは、それぞれA、V、L、およびIで置換されており、330位は、G、D、またはQで置換されている、Fc変異体を含むIgG抗体を提供する。一好ましい実施形態では、前記IgG抗体は、L234A+L235A+A330G+Δ329、L234A+L235A+S330G+Δ329、V234A+L235A+A330G+Δ329、V234A+L235A+S330G+Δ329、F234A+L235A+S330G+Δ329、またはF234A+L235A+A330G+Δ329を含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、本発明で提供されるIgG抗体は、IgG1型抗体であり、対応する野生型抗体と比較して、前記抗体は、低減、さらには除去されたFcγRに結合する能力を有する。別のいくつかの実施形態では、本発明で提供されるIgG抗体は、IgG2型、IgG3型、IgG4型抗体であり、対応する野生型抗体と比較して、前記抗体は、低減、さらには除去されたFcγRに結合する能力を有する。好ましくは、本発明で提供される抗体は、FcRnに結合する能力を保持する。

【0030】

いくつかの実施形態において、前記抗体分子は、抗claudin18.2のIgG抗体である。

【0031】

一具体的な実施形態では、本発明で提供されるFc変異体を含むIgG抗体は、以下のような重鎖および軽鎖を含む：

- 1) 配列番号2に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 2) 配列番号3に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 3) 配列番号4に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 4) 配列番号5に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 5) 配列番号6に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 6) 配列番号7に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 7) 配列番号8に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 8) 配列番号11に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 9) 配列番号12に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 10) 配列番号13に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 11) 配列番号14に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 12) 配列番号15に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 13) 配列番号16に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 14) 配列番号17に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 15) 配列番号19に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 16) 配列番号20に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 17) 配列番号21に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 18) 配列番号22に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは
- 19) 配列番号23に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、あるいは

10

20

30

40

50

いは

20) 配列番号24に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

21) 配列番号25に示される重鎖および配列番号9に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

22) 配列番号27に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

23) 配列番号28に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

24) 配列番号29に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

25) 配列番号30に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

26) 配列番号31に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

27) 配列番号32に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの、ある

いは

28) 配列番号33に示される重鎖および配列番号34に示される軽鎖を含むもの。

【0032】

別の実施形態では、本出願で提供される前記Fc変異体を含むポリペプチドド（例えば、抗体）は、Fc領域に、他の修飾、例えば、ポリペプチド（例えば、抗体）の免疫原性を低下させ、半減期を増加させ、安定性、溶解性、機能および臨床的利益を向上させるための従来技術で知られている他の修飾をさらに含み得る。

【0033】

別の実施形態では、本出願で提供される前記Fc変異体を含む抗体は、従来技術で知られている異なる標的抗原に対する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有する。当業者は、従来技術で知られている重鎖可変領域および軽鎖可変領域を本出願に開示されたFc変異体上に容易にグラフトして、所望の特性（例えば、低減または除去されたADCCおよび／またはADCPおよび／またはCDCエフェクター機能）を有する抗体の変異体を得ることができる。

【0034】

第3の態様では、本発明は、第2の態様に記載のポリペプチドおよび薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、前記医薬組成物は、本発明に記載のFc変異体を有する抗体分子を含む。一実施形態では、前記医薬組成物は、本発明に記載のFc変異体を有するIgG抗体を含む。別の実施形態では、前記医薬組成物は、本発明に記載のFc変異体を有するIgG1型抗体、IgG2型抗体、IgG3型抗体、またはIgG4型抗体を含む。

【0035】

第4の態様では、本発明は、本出願に記載のFc領域修飾により、抗体のADCC／ADCP／CDCエフェクター機能を低減または除去し、かつ半減期を保持、さらには増加させる方法を提供する。一実施形態では、ADCC／ADCP／CDCエフェクター機能を低減または除去するために必要な抗体Fc領域に対して本出願に開示された1つまたは複数の修飾を行うことにより、抗体のADCC／ADCP／CDCエフェクター機能を低減または除去する。

【0036】

第5の態様では、本発明は、Fc変異体の医薬の調製における使用を提供する。一実施形態では、前記医薬は免疫療法、免疫補助療法に使用される。一実施形態では、前記医薬は、低減または除去されたADCCおよび／またはADCPおよび／またはCDCエフェクター機能の作用を有する。一具体的な実施形態では、例えば、前記医薬は、本出願のFc変異体を含む融合タンパク質、例えば、IL-2Fc融合タンパク質である。別の具体

10

20

30

40

50

的な実施形態では、例えば、前記医薬は、A D C C / A D C P / C D C エフェクター機能を低減または除去する作用を有する、本出願の F c 変異体を含む免疫細胞表面分子を標的とする抗体である。別の実施形態では、前記医薬は、対象の腫瘍を治療するために使用され、例えば、一実施形態では、前記医薬は、A D C C / A D C P / C D C 作用を活性化することなく、半減期を延長して患者の免疫細胞を活性化し、これにより、抗腫瘍効果を達成する。

【0037】

第6の態様では、本発明は、対象の疾患を治療する方法であって、本出願に記載の F c 変異体を含む、対応する疾患に対する有効量の医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、前記疾患は、免疫療法または免疫補助療法を必要とする疾患である。エフェクター機能の除去は、細胞表面分子を標的とする抗体、特に免疫細胞上の抗体にとって有利である。一実施形態では、本発明は、対象の疾患を治療する方法であって、本出願に記載の F c 変異体を含む、対応する免疫細胞上の抗原に対する有効量の抗体を対象に投与することを含む方法を提供する。

10

【0038】

第7の態様では、本発明は、本出願に開示される F c 変異体、前記 F c 変異体を含むポリペプチド、または前記 F c 変異体を含む免疫グロブリン分子を含むキットを提供する。一実施形態では、本発明は、機能性分子（例えば、酵素、抗原、受容体、リガンド、サイトカインなど）と F c とを融合させることによって融合タンパク質の安定性を向上させることができるだけでなく、フローサイトメトリー、免疫組織化、インビトロ活性検出、およびタンパク質マイクロアレイ検出などの非臨床分野で使用可能な検出キットを提供する。

20

【0039】

本出願で提供される具体的な F c 変異を有する抗体分子は、低減または除去された A D C C、A D C P および C D C エフェクター機能を有するが、F c R n に結合する能力は依然として保持しているため、改良型抗体変異体として使用でき、抗体の治療効果を高めるだけでなく、抗体の安全性、安定性および低免疫原性も確保する。驚くべきことに、F c 領域の329位のプロリン残基を欠失させることにより、F c 領域の受容体 F c γ R I I I、F c γ R I I、F c γ R I、および C 1 q への結合が顕著に低減し、これにより、A D C C、A D C P、および C D C 活性が顕著に低減または除去されることが判明した。さらに、F c 領域の P r o 3 2 9 と、例えば A 3 3 0 欠失、A 3 3 0 G、L 2 3 4 A および L 2 3 5 A からなる群から選択される1つまたは複数との組み合わせ変異は、受容体 F c γ R I I I、F c γ R I I、F c γ R I、C 1 q への結合の顕著な低減をもたらし、これにより、A D C C、A D C P、および C D C 活性が顕著に低減または除去される。

30

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】ヒト I g G 1 F c および ヒト C D 1 6 A の結晶構造である（P D B : 3 S G J）。

【図2a】図2は、本発明の F c 変異体と各種 F c γ R の結合の状況を示す図であり、図2aは、F c 変異体と C D 1 6 A（F 1 7 6）の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

40

【図2b】F c 変異体と C D 1 6 A（V 1 7 6）の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2c】F c 変異体と C D 1 6 B（N A 1）の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2d】F c 変異体と C D 1 6 B（N A 2）の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2e】F c 変異体と C D 3 2 A（H 1 6 7）の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2f】F c 変異体と C D 3 2 A（R 1 6 7）の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2g】F c 変異体と C D 3 2 B の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2h】F c 変異体と C D 6 4 の結合曲線であり（p H 7 . 4）、

【図2i】F c 変異体と F c R n の p H 6 . 0 での結合曲線であり、

【図2j】F c 変異体と F c R n の p H 7 . 0 での結合曲線であり、

【図2k】F c 変異体と C 1 q の結合および解離曲線である。

50

【図 3 a】図 3 は、バイオレイヤー干渉技術に基づいて測定した F c 変異体と各種の F c y R の結合の状況を示しており、ここで、溶液には 200 nM の抗体が含まれている。図 3 a は、F c 変異体と CD16A (V176) の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 b】F c 変異体と CD16A (F176) の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 c】F c 変異体と CD16B (NA1) の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 d】F c 変異体と CD16B (NA2) の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 e】F c 変異体と CD32A (H167) の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 f】F c 変異体と CD32A (R167) の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 g】F c 変異体と CD32B の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 h】F c 変異体と CD64 の結合曲線であり (pH 7.4)、
【図 3 i】F c 変異体と FcRn の pH 6.0 での結合曲線である。
【図 4】抗体の ADCC 活性を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0041】

発明の詳細な説明

明確に反対すると指定しない限り、本発明における実施は、本分野の技術的な日常化学、生物化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換え DNA 技術、遺伝学、免疫学と細胞生物学の方法を用いる。これらの方法の説明は、例えば、Sambrook ら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 3 版、2001) ; Sambrook ら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版、1989) ; Maniatis ら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982) ; Ausubel ら、*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley と Sons、2008 年 7 月に更新) ; Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub. Associates と Wiley-Interscience ; Glover、*DNA Cloning: A Practical Approach*、vol. I & II (IRL Press、Oxford、1985) ; Anand、*Techniques for the Analysis of Complex Genomes*、(Academic Press、New York、1992) ; Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins、Eds.、1984) ; Perbal、*A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984) ; Harlow と Lane、*Antibodies*、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、1998) *Current Protocols in Immunology* (Q. E. Coligan、A. M. Kruisbeek、D. H. Margulies、E. M. Shevach と W. Strober、eds.、1991) ; *Annual Review of Immunology* ; および *Advances in Immunology* のような定期刊行物専門書を参照する。

20

30

40

【0042】

定義

以下、本発明を詳細に説明するに先立ち、本明細書に記載される特定の方法学、形態または試薬が変更され得るため、本発明はそれらに限定されるものではないことが理解すべきである。また、本発明に使用される用語は、具体的な実施形態を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲を限定しようとは意図せず、本発明の範囲は、特許請求の範囲のみによって限定されると理解すべきである。特に定義のない限り、本明細書に使用される技術・科学用語は、当業者による通常の理解と同じ意味を有する。

【0043】

50

本明細書を解釈するために次の定義が使用され、また、適切であるならば、単数形で使用される用語には複数形が含まれてもよく、その逆も同様である。本明細書に使用される用語は、具体的な実施形態を説明するためのものに過ぎず、限定するためのものではないと理解しなければならない。

【0044】

用語「約」は、数字または数値とともに使用される場合、下限として指定された数字または数値より5%小さく、上限として指定された数字または数値より5%大きい範囲内の数字または数値をカバーすることを意味する。

【0045】

用語「かつ／または」は、2つまたは複数のオプションの接続に使用される場合、オプションのうちのいずれか1項またはオプションのうちのいずれか2項もしくは複数項を指すと理解すべきである。

【0046】

用語「含有する」または「含む」は、前記要素、整数またはステップを含むが、任意の他の要素、整数またはステップを排除しないことを意味する。本明細書において、用語「含有する」または「含む」が使用される場合、特に断りのない限り、前記他の要素、整数またはステップの組合せの場合も包含する。例えば、ある具体的な配列を「含む」抗体可変領域が言及される場合、この具体的な配列からなる抗体可変領域を包含することも意図する。

【0047】

用語「抗体」は、本明細書で最も広い意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、単鎖抗体、完全な抗体または所望の抗原結合活性を示す抗体断片を含むが、これらに限定されない、多種の抗体構造物を包含する。完全な抗体は通常、少なくとも2つの完全長重鎖および2つの完全長軽鎖を含むが、いくつかの場合では、比較的少ない鎖を含み、例えばラクダに天然に存在する抗体は重鎖のみを含む場合がある。

【0048】

本明細書に使用されるように、用語「結合」および「特異的結合」は、抗体の結合作用が抗原に対して選択的であり、かつ望ましくない相互作用または非特異的相互作用と区別できることを意味する。特定の抗原に対する抗体の結合能力は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、表面プラズモン共鳴法（SPR）、またはバイオフィルム層光学干渉技術（ForteBio）、もしくは当分野で知られている他の通常結合測定法により測定することができる。例えば、SPRにおいて、抗体は、約 1×10^{-7} 以下のKD、約 1×10^{-8} 以下のKD、約 1×10^{-9} 以下のKD、約 1×10^{-10} 以下のKD、約 1×10^{-11} 以下のKDで、BCMAまたはCD3に結合すると、当該抗体は、「BCMAまたはCD3に特異的に結合する」抗体である。しかし、ヒトBCMAまたはCD3に特異的に結合する抗体は、他の種由来のBCMAまたはCD3タンパク質と交差反応性を有し得る。例えば、ヒトBCMAまたはCD3に特異的な抗体は、いくつかの実施形態では、カニクイザルBCMAまたはCD3と交差反応し得る。交差反応性を測定する方法は、実施例に記載される方法、および本分野で知られている標準的な測定法、例えば、光干渉による生体測定法、またはフローサイトメトリー技術を含む。

【0049】

用語「Kabattの可変ドメイン残基の番号付け方式」、「Kabattの番号付けシステム」または「Kabattによるアミノ酸位置の番号付け方式」およびそれらのバリエーションとは、Kabattらによる抗体重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメイン編集のための番号付けシステムを指す（Kabattら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.（1991）を参照）。Kabattの番号付けシステムは通常、抗体の可変ドメイン中の残基（およそ1位～107位の軽鎖残基および1位

10

20

30

40

50

～113位の重鎖残基)に適用される。

【0050】

用語「EU番号付けシステム」、「KabattのEUインデックスのように」または「EUインデックス」は、一般に、免疫グロブリン重鎖の定常領域内の残基に適用される(例えば、Kabattら、前記記載を参照)。本明細書において特に断りのない限り、本明細書の抗体可変ドメイン中の残基番号付けはKabatt番号付けシステムの残基番号付けにしたがって、抗体定常ドメイン中の残基番号付けはEU番号付けシステムの残基番号付け方式にしたがう。

【0051】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体Fc領域(天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因して抗体アイソタイプによって変化する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用(ADCC)、抗体依存性細胞貪食作用(ADCP)、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)のダウンレギュレート、B細胞活性化などを含む。

【0052】

用語「エフェクター細胞」とは、1つまたは複数のFcRを発現し、エフェクター機能を発揮する細胞、例えば、FcγRIIIAを発現し、ADCCエフェクター機能を発揮する細胞を指し、一実施形態では、ADCC機能を媒介する細胞は、例えば、NK細胞、末梢血単核細胞、単球、細胞傷害性T細胞、好中球細胞である。エフェクター細胞は、血液などの天然環境に由来し得る。

【0053】

用語「抗体依存性細胞介在性細胞傷害性」または「ADCC」とは、細胞媒介性免疫応答を指し、ここで、一部の細胞傷害性細胞の表面に存在するFc受容体が標的細胞上に結合する抗体を認識し、これにより、細胞傷害性細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、免疫系のエフェクター細胞を活性化して標的細胞を溶解する。典型的なADCC作用はナチュラルキラー細胞(NK)によって媒介され、マクロファージ、好中球、および好酸球(eosinophil cells)もADCC作用を媒介できる。例えば、好酸球(eosinophil cells)は、ADCC作用により一部の特定の寄生虫を殺すことができる。

【0054】

用語「抗体依存性細胞貪食」または「ADCP」とは、標的細胞に結合する抗体がマクロファージ表面上のFcγRIIIaに結合することによってマクロファージの活性化が誘導され、これにより標的細胞が内在化し、ファゴソームによって酸性化分解される、細胞応答を指す。ADCPは、FcγRIIIaおよびFcγRIによっても媒介され得るが、その割合は比較的小さい。

【0055】

補体系は、一連のタンパク質からなる先天性免疫系の一部である。補体系のタンパク質は「補体」と呼ばれ、略語記号C1、C2、C3などで表され、ヒトや脊椎動物の血清、組織液中に存在する、熱に弱い活性化された酵素活性を有するタンパク質のグループである。C1qは補体依存性細胞傷害(CDC)経路の第1の成分であり、6つの抗体に結合できるが、補体カスケードを活性化するには2つのIgGに結合するだけで十分である。

【0056】

用語「補体依存性細胞傷害性」または「CDC」とは、補体が関与する細胞傷害作用を指し、ここで、標的に結合する抗体のFcエフェクタードメインが一連の補体カスケード反応を活性化し、標的細胞膜に穴を形成し、これにより、標的細胞を死滅させる。

【0057】

用語「Fc領域」とは、天然配列Fc領域および変異体Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を指す。ヒトIgG重鎖のFc領域は、通常、そのCys226またはPro230位のアミノ酸残基からカルボキシル末端までのセグメントとして定義され、Fc領域のC末端447位のリジン残基(EU番号付けシステムによる)は存在または

10

20

30

40

50

欠失してもよい。したがって、完全な抗体組成物は、すべてのK447残基が除去される抗体の集団、K447残基が除去されていない抗体の集団、またはK447残基を有する抗体とK447残基を有さない抗体が混在する抗体の集団を含み得る。

【0058】

一部の実施形態では、免疫グロブリンのFc領域は、2つの定常ドメイン、すなわちCH2およびCH3を含み、別のいくつかの実施形態では、免疫グロブリンのFc領域は、3つの定常ドメイン、すなわちCH2、CH3およびCH4を含む。

【0059】

IgGのFcγ受容体またはC1qへの結合は、ヒンジ領域およびCH2ドメインに位置する残基に依存する。CH2ドメインの2つの領域は、FcγRと補体C1qの結合に対して重要であり、IgG2とIgG4において唯一の配列を有する。ヒトIgG1およびIgG2における233位～236位の残基の置換、ならびにヒトIgG4における327位、330位、および331位の残基の置換は、ADCCおよびCDC活性を大幅に低減させることがすでに示された(Armourら、Eur. J. Immunol. 29(8)、1999、2613-2624; Shieldsら、J. Biol. Chem. 276(9)、2001、6591-6604)。さらに、Idusogieらは、K322を含む異なる位置でのアラニン置換が補体活性化を顕著に低減させることが判明した(Idusogie EEら、J. Immunol 164(8)、2000、4178-84)。

【0060】

「機能性Fc領域」および「機能的Fc領域」などの類似の用語は、互換的に使用されてもよく、野生型Fc領域のエフェクター機能を有するFc領域を指す。

【0061】

「変異Fc領域」、「Fc突然変異体」、「変異を有するFc領域」、「突然変異Fc領域」、「Fc領域変異体」、「Fc変異体」、「変異体Fc領域」および「突然変異のFc領域」などの類似の用語は、互換的に使用されてもよく、天然配列Fc領域／野生型Fc領域と区別する少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むFc領域を指す。

【0062】

いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、天然配列Fc領域のアミノ酸配列と、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または付加が異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、野生型IgGのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する。いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、野生型IgGのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、野生型抗体のFc領域において1つまたは複数のアミノ酸置換および1つまたは複数のアミノ酸欠失を有する。いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、少なくとも1つまたは2つの本明細書に記載のFc領域のアミノ酸欠失を有する。いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、少なくとも1つ、2つ、3つもしくはそれ以上の本明細書に記載のFc領域のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、変異Fc領域は、少なくとも1つ、2つ、3つもしくはそれ以上の本明細書に記載のFc領域のアミノ酸置換、および少なくとも1つ、2つの本明細書に記載のFc領域欠失を有する。いくつかの実施形態では、変異体Fc領域は、野生型Fc領域および／または親Fc領域と少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の相同性を有する。

【0063】

「Fc受容体」または「FcR」とは、抗体Fc領域に結合する分子を指す。いくつかの実施形態では、FcRは天然のヒトFcRである。いくつかの実施形態では、FcRは、IgG抗体に結合する受容体、すなわちFcγRであり、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、およびFcγRIII(CD16)の3つの受容体を含み、ならびにこれらの受容体の対立遺伝子変異体および可変スプライシング形式を含む。FcγRII受容体はFcγRIIAおよびFcγRIIBを含み、FcγRIII受容体はF

c y R I I I A および F c y R I I I B を含む。

【0064】

受容体機能に応じて、F c y R は活性化型受容体 (F c y R I、F c y R I I A、F c y R I I C、F c y R I I I A、F c y R I I I B であって、C D 6 4、C D 3 2 A、C D 3 2 C、C D 1 6 A、C D 1 6 B と呼ばれる) と抑制型受容体 (F c y R I I B、C D 3 2 B と呼ばれる) に分類することができる。活性化型受容体は、その細胞質ドメインにおいて免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif、または I T A M) を含み、当該モチーフは活性化シグナルを伝達し、細胞活性化の作用を促進し、抑制型受容体は、その細胞質ドメインにおいて免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ ((Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif、または I T I M)) を含み、当該モチーフは細胞活性化の作用を阻害する。活性化性 F c y R のエフェクター機能は主に A D C C、A D C P、および抗原提示を含み、これに対して、抑制性 F c y R のエフェクター機能は主に抑制、清掃などの機能を有する。F c y R I I B は、ヒトおよびマウスで発現される唯一の阻害性 F c y R であり、腫瘍を直接標的とする抗体において、F c y R I I B の発現は抗体の治療効果の低下と関連する。

10

【0065】

異なる F c y R は、異なる細胞発現プロファイルを有し、例えば、F c y R I I I A (C D 1 6 A) はマクロファージ、単球、ナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) などの細胞ですべて発現する。F c y R I I I A 受容体は、N K 細胞上に発現する唯一の受容体であり、A D C C 機能を媒介することができる。

20

【0066】

用語「F c R」は、細胞膜の表面に位置する I g G 抗体受容体である新生児受容体 (F c R n) をさらに含む。F c R n は、母体 I g G を胎児に移し、インビボでの免疫グロブリンの定常状態の調節を担う。F c R n は I g G の F c 部分に結合して、I g G 分子がリソソームによって溶解されるのを阻止することができ、I g G のインビボ半減期を延長する効果を奏し、I g G のインビボ輸送、維持、および分布代謝に関与することができる。

【0067】

I g G 1 ~ I g G 4 サブクラスは、F c 受容体に結合する能力が異なり、異なる F c y R に対して、I g G 1 および I g G 3 は普遍的なリガンドであり、すべての F c y R に結合し、強力な A D C C 作用を有する。I g G 2 または I g G 4 は通常、「不活性」I g G サブクラスとも呼ばれ、両方のサブクラスを使用することで免疫活性化効果を回避することができる。実際、多くのモノクローナル抗体は、A D C C 効果を回避するために、抗体のバックボーンとして I g G 4 を選択する。しかし、I g G 2 および I g G 4 は完全に「不活性」ではなく、それぞれ活性化型 F c y R I I a - H 1 3 1 および F c y R I に結合し、これにより好中球の活性化を開始することができる。

30

【0068】

さらに、実際の状況では、I g G 1 サブクラスによる A D C C 効果を低減する必要がある。従来技術では、I g G 1 の「L A L A」(L 2 3 4 A + L 2 3 5 A) 変異が広く使用されており、当該変異は、F c y R に対する抗体 F c 領域の結合親和性を 1 0 0 倍低減させることができる。本出願で得られた F c 変異体は、「L A L A」変異と比較して F c y R に対する結合親和性が低いため、A D C C の作用がより強く低減された。

40

【0069】

A D C C / A D C P / C D C が関与する文脈において、「低減された A D C C および / または A D C P および / または C D C エフェクター機能」または「低減された A D C C / A D C P / C D C エフェクター機能」および類似の表現とは、対応する野生型によって引き起こされる A D C C および / または A D C P および / または C D C エフェクター機能の数値と比較して、本出願に記載の F c 変異体、F c 変異体を含むポリペプチドなどによって引き起こされる A D C C および / または A D C P および / または C D C エフェクター機

50

能の数値は、当業者であれば、対応する生物学的状況において統計的に有意であると考え
るほど十分に高い低減を有することを指す。例えば、一部の実施形態では、前記2つの数
値の低減は、例えば、約10%超、約20%超、約30%超、約40%超、約50%超、
約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、もしくは約100%超、さらにはそれ
以上である。

【0070】

「アミノ酸置換」とは、所定の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、別の異なる「置換」アミノ酸残基に置換することを指す。

【0071】

用語「保存的置換」とは、1つのアミノ酸が同じクラス内の別のアミノ酸によって置換
され、例えば、1つの酸性アミノ酸が別の酸性アミノ酸によって置換され、1つの塩基性
アミノ酸が別の塩基性アミノ酸によって置換され、または1つの中性アミノ酸が別の中性
アミノ酸によって置換されたことを指す。例示的な置換は下記の表に示す通りである：

【0072】

【化1】

元の残基	例示的な置換	好ましい保存的置換
A l a (A)	V a l ; L e u ; I l e	V a l
A r g (R)	L y s ; G l n ; A s n	L y s
A s n (N)	G l n ; H i s ; A s p , L y s ; A r g	G l n
A s p (D)	G l u ; A s n	G l u
C y s (C)	S e r ; A l a	S e r
G l n (Q)	A s n ; G l u	A s n
G l u (E)	A s p ; G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n ; G l n ; L y s ; A r g	A r g
I l e (I)	L e u , V a l , M e t , A l a , P h e , ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン , I l e , V a l , M e t , A l a , P h e	I l e
L y s (K)	A r g ; G l n ; A s n	A r g
M e t (M)	L e u ; P h e ; I l e	L e u
P h e (F)	T r p ; L e u ; V a l ; I l e ; A l a ; T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l ; S e r	S e r
T r p (W)	T y r ; P h e	T y r
T y r (Y)	T r p ; P h e ; T h r ; S e r	P h e
V a l (V)	I l e , L e u , M e t , P h e , A l a , ノルロイシン	L e u

【0073】

共通の側鎖特性に従って、(1)疎水性：I l e、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；(2)中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；(3)酸性度：A s p、G l u；(4)塩基性：H i s、L y s、A r g；(5)鎖の配向に影響を与える残基：G l y、P r o；(6)芳香族：T r p、T y r、P h eにグループ化する。非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換する必要がある。

【0074】

「アミノ酸欠失」とは、所定のアミノ酸配列から少なくとも1つのアミノ酸残基を除去することを指す。

【0075】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」と「宿主細胞培養物」は、交換して使用されてもよく、外因性核酸が導入された細胞を指し、この細胞の子孫を含む。宿主細胞は、「形質転換体」と「形質転換細胞」を含み、初代形質転換細胞および継代数に関係なくそれに由来する子孫を含む。子孫は、核酸の内容において親細胞とは全く同じではない可能性があり、変異を含んでもよい。本明細書では、初代形質転換細胞からスクリーニングまたは選択された同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫を含む。

【0076】

以下のように、配列間の配列同一性を算出する。

【0077】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセンテージを決定するために、前記配列を最適比較のためにアラインメントを行う（例えば、最適アラインメントのために第1と第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方もしくは両方にギャップを導入してもよく、あるいは比較のために、非相同配列を捨ててもよい）。一好ましい実施形態では、比較のために、アラインメントされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、60%、さらに好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応の位置での同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されている場合、前記分子はこの位置において同一である。

【0078】

数学アルゴリズムにより、2つの配列間の配列比較および同一性パーセンテージの計算を実現することができる。一好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセンテージは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに統合されたNeedlemanおよびWunsch（（1970）J. Mol. Biol. 48:444-453）アルゴリズム（<http://www.gcg.com>にて取得可能）により、Blossum 62行列若しくはPAM250行列、およびギャップ重み16、14、12、10、8、6もしくは4と長さ重み1、2、3、4、5もしくは6を用いて決定される。別の好ましい実施形態では、GCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラム（<http://www.gcg.com>にて取得可能）により、NWsgapdna.CMP行列、およびギャップ重み40、50、60、70もしくは80と長さ重み1、2、3、4、5もしくは6を用いて、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセンテージを決定する。特に好ましいパラメータセット（および特に断りのない限り使用すべき1つのパラメータセット）は、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、およびフレームシフトギャップペナルティ5のBlossum 62スコアリング行列を採用する。

【0079】

また、PAM120加重余り表、ギャップ長ペナルティ12、ギャップペナルティ4を利用して、ALIGNプログラム（2.0版）に統合されたE. MeyersとW. Millerアルゴリズム（（1989）CABIOS、4:11-17）により、2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間の同一性パーセンテージを決定してもよい。

10

20

30

40

50

【0080】

抗体の標的抗原

本発明によって提供されるFc変異体を含む抗体は、例えば、サイトカイン、膜結合因子、酵素、受容体、リガンド、病原体およびその毒素、ウイルス粒子、腫瘍関連因子、シグナル伝達経路メンバー分子などの標的抗原に属するタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフおよび／またはエピトープを含むがこれらに限定されない任意の抗原を標的とすることができる。適切な抗原は、目的の用途によって異なる。抗癌治療に対しては、癌細胞内で発現が制限されている標的を有することが望ましい。抗体治療に特に適していることが証明されている一部の標的は、シグナル伝達機能を有するものである。他の治療抗体は、受容体とその共役リガンドとの間の結合を阻害することにより、受容体のシグナル伝達を遮断することによってその作用を発揮する。

10

【0081】

臨床試験のために承認されている、または開発中の多くの抗体は、本発明のFc変異体から恩恵を受ける可能性がある。したがって、これらの抗体の可変領域は、本出願に開示されるFc変異体と統合して、改良された優れた特性を有する製品を形成することができる。一実施形態では、本出願に開示されたFc変異体は、例えば、それらの重鎖可変領域に融合されて、ヒト化抗体、親和性成熟抗体、操作された抗体に組み込むことができる。

【0082】

Fc領域の他の修飾

従来技術においてすでに開示された様々な方法を使用して、本出願で提供されるFc変異体、Fc変異体を含む融合タンパク質（例えば抗体）などに対して、さらなる修飾、例えば免疫原性を低減させ、安定性、溶解性、機能および臨床的利益を向上させるための他の修飾を行うことができる。このような修飾は、例えば、血清半減期を延長する可能性がある位置252、位置254および位置256における修飾を含むが、これらに限定されない。

20

【実施例】

【0083】

実施例

以下の実施例を用いて本発明をさらに説明するが、実施例は、限定ではなく、説明することで記載され、当業者は、様々な変更を行うことができると理解すべきである。

30

【0084】

明確に反対すると指定しない限り、本発明における実施は、本分野の技術的な日常化学、生物化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、遺伝学、免疫学と細胞生物学の方法を用いる。

【0085】

実施例1．Fc変異体の設計

抗体Fc領域とFc受容体との相互作用が悪影響を生じ得ることを考慮して、モノクローナル抗体の使用においてFc領域のエフェクター機能（例えば、ADCC、CDC）を除去する必要がある場合がある。例えば、IgG1サブクラス抗体の場合、主にFc領域を介してFcγRIIIAに結合することによってADCC機能を実現する。ADCCおよびCDC機能を低減させる必要があるIgG1サブクラス抗体の場合、そのFc領域を改造してFcγ受容体への結合を低減させる必要がある。したがって、本実施例は、ヒトIgG1FcとFcγRの共結晶構造に基づいて、ヒトIgG1FcとFcγRとの相互作用の重要な部位を検討し、それがFcγRとの相互作用を低減するために対応するFc変異体を設計した。

40

【0086】

ヒトIgG1FcおよびヒトCD16A（FcγRIII）の結晶構造（PDB：3SGJ）を図1に示し、ここで、Fcの2つのセグメント、P232-V240およびN325-E333がCD16Aエピトープの結合部位を構成し、Fcのアミノ酸P329は、CD16Aのアミノ酸W90およびW113との間で形成されるπ結合が相互作用し、

50

それらの相互結合界面における重要なアミノ酸である。この重要なセグメントとアミノ酸に基づいて、発明者らは、分子間の作用界面に基づいて表 1 に示すような F c 変異体を設計した。

【 0 0 8 7 】

本実施例では、信达製薬（I n n o v e n t B i o l o g i c s , I n c . ）の内部スクリーニングを通じて取得されたヒト c l a u d i n 1 8 . 2 タンパク質に対する I g G 1 モノクローナル抗体（F c m u t - 0 1 ）を例示として、関連する設計と研究を実施した。すなわち、親および対照としての F c m u t - 0 1 に基づいて、表 1 に示す一連の F c の異なる変異を有する変異体（F c m u t - 0 2 ~ F c m u t - 0 2 4 ）が得られた。F c m u t - 2 5 は H e r c e p t i n （G e n e n t e c h ）であり、F c m u t - 2 6 ~ F c m u t 3 2 は H e r c e p t i n の F c に対して行う異なる改造である。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. Fc 変異体の設計

分子名称	Fc サブタイプ	配列番号		Fc 変異部位 (Kabat の EU インデックスによる)			
		重鎖	軽鎖	234	235	329	330
Fcmut-01	IgG1-WT	配列番号 1	配列番号 9	L	L	P	A
Fcmut-02	IgG1-mut	配列番号 2	配列番号 9	L	L	欠失	A
Fcmut-03	IgG1-mut	配列番号 3	配列番号 9	L	L	欠失	G
Fcmut-04	IgG1-mut	配列番号 4	配列番号 9	L	L	欠失	欠失
Fcmut-05	IgG1-mut	配列番号 5	配列番号 9	A	A	P	A
Fcmut-06	IgG1-mut	配列番号 6	配列番号 9	A	A	欠失	A
Fcmut-07	IgG1-mut	配列番号 7	配列番号 9	A	A	欠失	G
Fcmut-08	IgG1-mut	配列番号 8	配列番号 9	A	A	欠失	欠失
Fcmut-09	IgG2-WT	配列番号 10	配列番号 9	V	A	P	A
Fcmut-10	IgG2-mut	配列番号 11	配列番号 9	V	A	欠失	A
Fcmut-11	IgG2-mut	配列番号 12	配列番号 9	V	A	欠失	G
Fcmut-12	IgG2-mut	配列番号 13	配列番号 9	V	A	欠失	欠失
Fcmut-13	IgG2-mut	配列番号 14	配列番号 9	A	A	P	A
Fcmut-14	IgG2-mut	配列番号 15	配列番号 9	A	A	欠失	A
Fcmut-15	IgG2-mut	配列番号 16	配列番号 9	A	A	欠失	G
Fcmut-16	IgG2-mut	配列番号 17	配列番号 9	A	A	欠失	欠失
Fcmut-17	IgG4-S228P	配列番号 18	配列番号 9	F	L	P	S
Fcmut-18	IgG4-mut	配列番号 19	配列番号 9	F	L	欠失	S
Fcmut-19	IgG4-mut	配列番号 20	配列番号 9	F	L	欠失	G
Fcmut-20	IgG4-mut	配列番号 21	配列番号 9	F	L	欠失	欠失
Fcmut-21	IgG4-mut	配列番号 22	配列番号 9	A	A	P	S
Fcmut-22	IgG4-mut	配列番号 23	配列番号 9	A	A	欠失	S
Fcmut-23	IgG4-mut	配列番号 24	配列番号 9	A	A	欠失	G
Fcmut-24	IgG4-mut	配列番号 25	配列番号 9	A	A	欠失	欠失
Fcmut-25	IgG1-WT	配列番号 26	配列番号 34	L	L	P	A
Fcmut-26	IgG1-mut	配列番号 27	配列番号 34	L	L	欠失	A
Fcmut-27	IgG1-mut	配列番号 28	配列番号 34	L	L	欠失	G
Fcmut-28	IgG1-mut	配列番号 29	配列番号 34	L	L	欠失	欠失
Fcmut-29	IgG1-mut	配列番号 30	配列番号 34	A	A	P	A
Fcmut-30	IgG1-mut	配列番号 31	配列番号 34	A	A	欠失	A
Fcmut-31	IgG1-mut	配列番号 32	配列番号 34	A	A	欠失	G
Fcmut-32	IgG1-mut	配列番号 33	配列番号 34	A	A	欠失	欠失

【0089】

実施例 2：Fc 変異を有する抗体の発現と精製

プラスミド構築：通常の実験方法に従って、前記重鎖 Fc 変異および軽鎖のヌクレオチド配列を取得し、それぞれ p c D N A 3.1 ベクターにクローニングして各プラスミドを得た。

【0090】

タンパク質の発現と精製

一過性トランスフェクションプラスミドの調製：1/10 (トランスフェクション容量で計算する) の血清低減培地 Opti-MEM™ (Gibco、製品番号 31985-

070)を取り、プラスミド混合物(50ug/50mL、重鎖と軽鎖の質量比は1:1である)を加え、プラスミド含有Opti-MEMTM培地を新しい50mL遠沈管に濾過して、濾過したPEI(1g/L、Polysciences)を当該遠沈管に加え(質量比(プラスミド:PEI)=1:3)、均一に混合し、20分間静置した。

【0091】

細胞トランスフェクション:前記で得られたDNA/PEI混合物をExp293細胞(Gibco)に軽くてしなやかに注ぎ、均一に混合し、37℃、8%CO₂の条件で14時間トランスフェクトし、その後、トランスフェクトされた細胞の体積でそれぞれ、0.1%のバルプロ酸ナトリウム塩(VPA)(2.2M、Sigma)を追加し、2.5%のグルコース(200g/L、Sigma)および2.5%Feed溶液(1g/LのPhytone Peptone+1g/LのDifco Select Phytone)を追加し、細胞を再び37℃、8%CO₂で7日間培養した。

【0092】

精製産物:培養後の細胞培養液を4000rpmで50分間遠心分離し、上清を収集し、プレバックカラムHitrap Mabselect Sure(GE、11-0034-95)を使用して上清を精製した。具体的な操作は以下の通りである:精製前に5倍カラム体積の平衡液(20mMのTris、150mMのNaCl、pH7.2)で充填カラムを平衡化し、収集した上清をカラムに通し、さらに10倍カラム体積の平衡液で充填カラムを洗浄し、非特異的に結合するタンパク質を除去し、5倍カラム体積の溶出緩衝液(100mMのクエン酸ナトリウム、pH3.5)で充填物を洗い流し、溶出液を収集した。2MのTrisで溶離液のpHを6.0に調整し、濃度を測定して精製の抗体産物を得た。

【0093】

収集した抗体産物を限外濾過によって濃縮してPBS(Gibco、70011-044)に交換した後、superdex200 increase(GE、10/300GL、10245605)でさらに単離して精製し、モノマーの溶出ピークを収集し、カラムの平衡化および溶出緩衝液はPBS(Gibco、70011-044)であった。

【0094】

実施例3.Fc変異体とFc受容体の親和性測定

一、SPR法によるFc変異体を有する抗体の親和性の測定

本発明で得られたFc変異体を有する抗体とヒトFcγRとの結合を表面プラズモン共鳴(SPR)により測定する場合、各抗体変異体とFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIbおよびFcRnとの平衡解離定数(KD)を具体的に検出した。SPRの原理により、偏光ビームがプリズムの端面に一定の角度で入射すると、プリズムと金膜の界面で表面プラズモン波が発生し、金属膜内の自由電子の共鳴、すなわち表面プラズモン共鳴を引き起こす。分析する時、まずセンシングチップの表面に一層の生体分子認識フィルムを固定し、次に測定対象の試料がチップ表面を流れ、チップ表面の生体分子認識膜と相互作用可能な分子が試料中に存在すると、金膜表面の屈折率変化を引き起こし、最終的にSPR角度の変化につながり、SPR角度の変化を検出することにより、被分析物の親和力、動力学定数などの情報を得た。

【0095】

本実施例は、実施例2で得られたFc領域変異を有する抗体とヒトFcγRのKDをBiacore(Cytiva、T200)で測定し、具体的な方法は以下の通りである:抗ヒスチジン抗体がカップリングしたチップ表面に、ヒスチジntag含有FcγRおよびFcRnタンパク質(各Fc受容体についての情報は下記の表2を参照)を捕獲し、次いで、チップ表面タンパク質と移動相中の抗体との間の結合および解離を検出することにより、親和性および動力学定数を得た。この方法は、チップの調製および親和性の検出を含む。測定プロセスは、10倍に希釈した10×HBS-EP+(BR-1006-69、Cytiva)を実験緩衝液として使用した。

【0096】

【表 2】

表 2. 検出のための受容体情報

受容体名称	タグ	製品番号	メーカー
ヒトFcγRIIIB/CD16B (NA1)	his	CDB-H5227	Acro
ヒトFcγRIIIB/CD16B (NA2)	his	CDB-H5222	Acro
ヒトFcRn/FCGRT&B2Mヘテロ二量体タンパク質	His, Strep II	FCM-H5286	Acro
ヒトFcγRIIIA/CD16A (V176) タンパク質	his	CD8-H52H4	Acro
ヒトFcγRIIIA/CD16A (F176) タンパク質	his	CDA-H5220	Acro
ヒトCD32A/FCGR2Aタンパク質 (167his)	his	10374-H27H1	SINO
ヒトCD32A/FCGR2Aタンパク質 (167Arg)	his	10374-H27H	SINO
ヒトCD32B/FCGR2Bタンパク質	his	10259-H08H	SINO
ヒトCD64/FCGR1Aタンパク質	his	10256-H08S-B	SINO

【0097】

メーカーの仕様に基づいて、具体的な方法は次の通りである：

チップ調製：アミノカップリングキット（BR-1006-33、Cytiva）およびヒスチジン捕獲キット（28995056、Cytiva）を使用して、ヒスチジン捕獲キット内の抗ヒスチジン抗体をCM5チップ（29-1496-03、Cytiva）の表面にカップリングし、カップリング後、1Mのエタノールアミンを注入して残りの活性化部位をブロックした。

【0098】

親和性検出：各サイクルは、受容体の捕獲、本出願のFc領域変異を有する一定濃度の抗体への結合、およびチップの再生を含む。勾配希釈した各抗体変異体溶液（FcγRsに結合する時、希釈勾配は0nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM、200nM、400nMであり、FcRnに結合する時、希釈勾配は0nM、50nM、100nM、200nM、400nM、800nM、1600nMである）は、低濃度から高濃度の順で、それぞれ各親和性検出サイクルを完了した。各サイクルにおいて、抗体変異体溶液を30μL/分の流速でチップ表面に流し、結合時間が60秒、解離時間が60秒であった。最後に、10mMのGlycine pH1.5（BR-1003-54、Cytiva）を使用してチップを再生した。得られたデータは、Biacore T200分析ソフトウェア（バージョン番号3.1）を使用して、分析1：1結合または定常状態分析モデルを使用して分析し、対応する結果を得た。

【0099】

以下の表3は、本研究における各抗体変異体の各Fc受容体に対する親和性データを示し、図2は、対応する分子のフィッティング曲線を示す。

【0100】

この結果から、本研究の対照抗体として、IgG1野生型Fcmut-01抗体はCD64に対して高い親和性を有し、 K_D 値は $1.07E-09$ であり、CD32Aの2つのサブタイプであるH167およびR167にいずれも結合し、 K_D 値はそれぞれ $2.01E-07$ および $4.60E-08$ であり、CD16Aの2つのサブタイプであるF176およびV176に対する親和性はそれぞれ $1.57E-07$ および $2.44E-08$ であり、これに対して、CD16B（NA1）、CD16B（NA2）、およびCD32Bに

対しは弱い結合であることがわかった。

【0101】

変異体 F c m u t - 0 5 が C D 1 6 A (V 1 7 6) に対して比較的弱い親和性 (3 . 0 6 E - 0 7) を有すること以外、他の F c 変異を有する抗体分子は、いずれも C D 1 6 A (F 1 7 6) 、 C D 1 6 A (V 1 7 6) 、 C D 1 6 B (N A 1) 、 C D 1 6 B (N A 2) 、 C D 3 2 A (H 1 6 7) 、 C D 3 2 A (R 1 6 7) 、および C D 3 2 B に結合しなかった。野生型 I g G 1 と強い結合を有する C D 6 4 については、変異型 F c m u t - 0 6 / 0 7 / 0 8 は、すべて C D 6 4 に結合しなかったが、F c m u t - 0 2 / 0 3 / 0 4 / 0 5 の C D 6 4 への結合も大幅に低減し、対照 F c m u t - 0 1 と比較して、それぞれ 8 . 7 倍、1 2 . 9 倍、1 4 . 0 2 倍、5 0 . 7 5 倍弱化された。また、F c m u t - 2 6 ~ F c m u t - 3 2 でも類似の結果を示し、F c m u t - 2 5 と比較して、F c m u t - 2 9 以外の他の F c 変異を有する抗体分子は、いずれも C D 1 6 A (F 1 7 6) 、 C D 1 6 A (V 1 7 6) 、 C D 1 6 B (N A 1) 、 C D 1 6 B (N A 2) 、 C D 3 2 A (H 1 6 7) 、 C D 3 2 A (R 1 6 7) 、および C D 3 2 B に結合しなかった。

10

【0102】

F 1 7 6 および V 1 7 6 は C D 1 6 A の主要な遺伝子型であり、結晶構造により、C D 1 6 A の 1 7 6 位のアミノ酸は F c との結合領域に位置するため、C D 1 6 A と F c の親和性に重要な影響があることがわかった。本出願で得られた F c 変異体は、実質的に C D 1 6 A の遺伝子型 F 1 7 6 および V 1 7 6 と相互作用しないため、本出願で得られた F c 変異体は、実質的にすべての機能性 C D 1 6 A と相互作用せず、これにより A D C C 効果を誘発しないことが示された。したがって、本出願の F c 変異体を含むタンパク質分子 (例えば、抗体) 分子は、実質的に A D C C エフェクター機能を有さない。

20

【0103】

抗体の F c 領域は、p H 中性条件下では F c R n に結合せず、酸性条件下でのみ結合することが知られており、これは、抗体分子が比較的長い半減期を有する主要なメカニズムであった。検出でわかるように、対照抗体 F c m u t - 0 1 は、p H 6 . 0 で F c R n に対する親和性が 3 . 8 6 E - 0 7 であるが、p H 7 . 0 の条件で F c R n に結合せず、本研究で得られた F c 変異を有する抗体分子は、同じ条件下で対照抗体 F c m u t - 0 1 と一致しており (図 2 i 、図 2 j) 、本研究で得られた F c 変異体が F c R n への結合に影響を与えないことが示された。

30

【0104】

F c R n はインビボの様々な細胞で発現され、F c R n の F c 領域への結合は p H 依存性であり、p H 6 . 0 付近の弱酸性でのみ結合し、中性 p H では結合しないため、対応する抗体の半減期を延長することができる。本出願の実験データは、抗体が有する F c 領域変異が抗体分子の F c R n への結合に影響を及ぼさないことを示し、したがって、F c R n は依然として本出願の抗体変異体のインビボ半減期を延長することができる。

【0105】

本出願で得られた抗体変異体は C D 3 2 B に結合せず、抗体の F c 領域を変異させることで抗体の治療効果を高めることができることが示された。

【0106】

従来技術で広く使用されている「L A L A」変異 (F c m u t - 0 5) は、抗体 F c 領域の F c γ R に対する結合親和性を 1 0 0 倍低減させた。本出願で得られた F c 変異体は、「L A L A」変異と比較して F c γ R に対する結合親和性が低いため、A D C C の作用がより強く低減された。

40

【0107】

野生型 I g G 2 および I g G 4 は A D C C 効果が弱いか、または A D C C 効果がないため、A D C C 効果を回避することが望まれる多くの抗体分子は、生産中に I g G 2 サブタイプまたは I g G 4 サブタイプの F c 領域を選択した。しかし、場合によっては、I g G 2 サブタイプまたは I g G 4 サブタイプの A D C C エフェクター機能をさらに低減させることが依然として望ましい。このため、出願人は、I g G 2 および I g G 4 サブタイプの

50

Fc領域の対応する部位（表1を参照）に対して対応する変異を行った後、それが様々なFcRに結合する状況をさらに検討した。データは、本出願の対応する変異を含むIgG2サブタイプまたはIgG4サブタイプのFc変異体は、野生型Fcと比較してFcγRへの結合を弱めることを示した。

【0108】

【表3】

表3. Fc変異体とFc受容体の結合定数

patent -ID	CD16A (F176)	CD16A (V176)	CD16B (NA1)	CD16B (NA2)	CD32A (H167)	CD32A (R167)	CD32 B	CD64	FcRn (6.0)	FcRn (7.0)
Fcmut-01	1.57E-07	2.44E-08	weak	weak	2.01E-07	4.60E-08	weak	1.07E-09	3.86E-07	N. B.
Fcmut-02	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	9.31E-09	4.47E-07	N. B.
Fcmut-03	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	1.38E-08	3.17E-07	N. B.
Fcmut-04	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	1.50E-08	5.05E-07	N. B.
Fcmut-05	N. B.	3.06E-07	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	5.43E-08	4.19E-07	N. B.
Fcmut-06	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	2.84E-07	N. B.
Fcmut-07	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	3.74E-07	N. B.
Fcmut-08	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	N. B.	4.02E-07	N. B.

N. B. : 結合しない

【0109】

二、バイオレイヤー干渉技術による本発明のFc変異体のFc受容体への結合の測定
バイオレイヤー干渉法（BLI）を使用して、ヒトFc受容体に対する本発明のFc変異体の結合親和性（KD）を測定した。

【0110】

実験開始の半時間前に、試料数に応じて、適切な数のHIS1Kセンサー（18-5120、Sartorius）をSD緩衝液（1xPBS、0.1%BSA、0.05%Tween（登録商標）-20）に浸漬し、FcRnに結合する時、実験で使用する緩衝液を、10mMのHEPES、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%のP20、pH6.0に変更した。抗体を200nMに希釈し、Fc受容体（試料情報については表2を参照）を100nMに希釈した。

【0111】

200μLのSD緩衝液、200μLの標識抗体溶液、および200μLのFc受容体を96ウェル黒色ポリスチレンマイクロプレート（Greiner、655209）に加えた。Fortebio Octet Red96eを使用して検出を行い、試料の位置に応じてプレートをレイアウトし、センサーの位置を選択した。機器設定パラメータは次の通りである：実行ステップ：平衡ベースライン120秒、固定化Fc受容体100秒、平衡ベースライン120秒、抗体結合60秒、および解離60秒を実行し、回転速度は1000rpm、温度は30℃であった。実験が完了した後、Fortebio Octet分析ソフトウェアを使用してKD値を分析した。

【0112】

結果を下記の表4および図3に示す。Fcmut-25と比較して、Fcmut-29以外の他のFc変異を有する抗体分子は、いずれもCD16A（F176）、CD16A

(V176)、CD16B (NA1)、CD16B (NA2) に結合しなかった。変異体 Fcmut-26/27/28/29/30/31/32 変異体は、CD32A H167、CD32A R167、CD32B に結合しなかった。変異体 Fcmut-30/31/32 は、いずれも CD64 に結合しかつたが、Fcmut-/26/27/28/29 の CD64 への結合も大幅に低減した。

【0113】

Fc-25 は HER2 に結合する抗体であり、その抗体の定常領域は野生型の IgG1 配列であり、結果から、P329 の削除は Fc gamma 受容体への分子の結合を低減することができるが、FcRn (pH6.0) への結合は影響を受けないことがわかった。

10

【0114】

【表4a】

表4a. 変異体のHIS1Kセンサー上のCD16A V176への結合

Sample ID	Response	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Fc-25	0.297	9.43E-08	1.64E+05	1.54E-02
Fc-26	0.0029	N. B		
Fc-27	0.007	N. B		
Fc-28	0.0156	N. B		
Fc-29	0.0909	1.55E-07	1.43E+05	2.22E-02
Fc-30	0.0211	N. B		
Fc-31	0.0241	N. B		
Fc-32	0.0141	N. B		

20

【表4b】

表4b. 変異体のHIS1Kセンサー上のCD16A F176への結合

Sample ID	Response	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Fc-25	0.1082	1.02E-07	1.98E+05	2.01E-02
Fc-26	0.0018	N. B		
Fc-27	0.0023	N. B		
Fc-28	0.0118	N. B		
Fc-29	0.0439	2.06E-07	1.72E+05	3.54E-02
Fc-30	0.0232	N. B		
Fc-31	0.0262	N. B		
Fc-32	0.0166	N. B		

30

40

50

【表 4 c】

表 4 c. 変異体の H I S 1 K センサー上の C D 1 6 B N A 1 への結合

S a m p l e I D	R e s p o n s e	K D (M)	k o n (1/Ms)	k d i s (1/s)
F c - 2 5	0. 0 5 3 1	6. 4 5 E - 0 7	7. 7 4 E + 0 4	4. 9 9 E - 0 2
F c - 2 6	- 0. 0 0 2	N. B		
F c - 2 7	0. 0 0 1 7	N. B		
F c - 2 8	0. 0 1 1 5	N. B		
F c - 2 9	0. 0 3 4 6	2. 2 1 E - 0 7	2. 3 5 E + 0 5	5. 2 1 E - 0 2
F c - 3 0	0. 0 2 0 4	N. B		
F c - 3 1	0. 0 2 8	N. B		
F c - 3 2	0. 0 1 8 4	N. B		

10

【表 4 d】

表 4 d. 変異体の H I S 1 K センサー上の C D 1 6 B N A 2 への結合

S a m p l e I D	R e s p o n s e	K D (M)	k o n (1/Ms)	k d i s (1/s)
F c - 2 5	0. 0 8 0 1	1. 0 5 E - 0 6	5. 4 0 E + 0 4	5. 6 8 E - 0 2
F c - 2 6	- 0. 0 0 2 2	N. B		
F c - 2 7	0. 0 0 3 7	N. B		
F c - 2 8	0. 0 1 0 3	N. B		
F c - 2 9	0. 0 3 3 1	4. 8 2 E - 0 7	1. 5 0 E + 0 5	7. 2 3 E - 0 2
F c - 3 0	0. 0 2 4	N. B		
F c - 3 1	0. 0 2 6 9	N. B		
F c - 3 2	0. 0 1 7 2	N. B		

20

【表 4 e】

表 4 e. 変異体の H I S 1 K センサー上の C D 3 2 A H 1 6 7 への結合

S a m p l e I D	R e s p o n s e	K D (M)	k o n (1/Ms)	k d i s (1/s)
F c - 2 5	0. 2 1 2 4	6. 1 2 E - 0 6	1. 1 1 E + 0 4	6. 8 1 E - 0 2
F c - 2 6	0. 0 0 5 8	N. B		
F c - 2 7	0. 0 0 5 8	N. B		
F c - 2 8	0. 0 1 4 2	N. B		
F c - 2 9	0. 0 3 0 1	N. B		
F c - 3 0	0. 0 1 7 1	N. B		
F c - 3 1	0. 0 2 1 4	N. B		
F c - 3 2	0. 0 0 9 7	N. B		

30

40

50

【表 4 f】

表 4 f. 変異体の H I S 1 K センサー上の C D 3 2 A R 1 6 7 への結合

S a m p l e I D	R e s p o n s e	K D (M)	k o n (1/Ms)	k d i s (1/s)
F c - 2 5	0. 1 6 1 5	4. 2 8 E - 0 6	1. 6 6 E + 0 4	7. 1 3 E - 0 2
F c - 2 6	0. 0 0 4 4	N. B		
F c - 2 7	0. 0 0 2 8	N. B		
F c - 2 8	0. 0 0 8 9	N. B		
F c - 2 9	0. 0 2 9 3	N. B		
F c - 3 0	0. 0 1 8 1	N. B		
F c - 3 1	0. 0 1 9 9	N. B		
F c - 3 2	0. 0 0 9 9	N. B		

10

【表 4 g】

表 4 g. 変異体の H I S 1 K センサー上の C D 3 2 B への結合

S a m p l e I D	R e s p o n s e	K D (M)	k o n (1/Ms)	k d i s (1/s)
F c - 2 5	0. 0 7 9 9	2. 5 7 E - 0 7	2. 1 8 E + 0 5	5. 6 1 E - 0 2
F c - 2 6	-0. 0 0 3	N. B		
F c - 2 7	-0. 0 0 3 7	N. B		
F c - 2 8	0. 0 0 6 6	N. B		
F c - 2 9	0. 0 2 6 9	N. B		
F c - 3 0	0. 0 1 7 1	N. B		
F c - 3 1	0. 0 2 1 4	N. B		
F c - 3 2	0. 0 0 8 3	N. B		

20

【表 4 h】

表 4 h. 変異体の H I S 1 K センサー上の C D 6 4 への結合

S a m p l e I D	R e s p o n s e	K D (M)	k o n (1/Ms)	k d i s (1/s)
F c - 2 5	0. 8 9 3 2	9. 4 8 E - 0 9	2. 9 2 E + 0 5	2. 7 7 E - 0 3
F c - 2 6	0. 6 4 7 7	5. 3 3 E - 0 8	2. 6 3 E + 0 5	1. 4 0 E - 0 2
F c - 2 7	0. 4 3 2 6	1. 1 3 E - 0 7	3. 1 5 E + 0 5	3. 5 6 E - 0 2
F c - 2 8	0. 5 1 4 4	4. 6 6 E - 0 8	2. 3 7 E + 0 5	1. 1 0 E - 0 2
F c - 2 9	0. 2 2 8 7	4. 4 5 E - 0 8	3. 6 1 E + 0 5	1. 6 1 E - 0 2
F c - 3 0	0. 0 2 0 2	N. B		
F c - 3 1	0. 0 2 7 4	N. B		
F c - 3 2	0. 0 1 6 2	N. B		

30

40

【表 4 i】

表 4 i. 変異体の H I S 1 K センサー上の F c R n への結合

Sample ID	Response	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Fc-25	0.2392	2.84E-08	4.30E+05	1.22E-02
Fc-26	0.3488	5.09E-08	4.19E+05	2.13E-02
Fc-27	0.2855	6.23E-08	4.57E+05	2.84E-02
Fc-28	0.3545	4.55E-08	3.80E+05	1.73E-02
Fc-29	0.6114	3.28E-08	4.26E+05	1.40E-02
Fc-30	0.4914	2.21E-08	4.49E+05	9.93E-03
Fc-31	0.5716	2.58E-08	4.34E+05	1.12E-02
Fc-32	0.4803	2.39E-08	4.44E+05	1.06E-02

10

【0115】

実験例 4. バイオレイヤー干渉技術による本発明の F c 変異体の C 1 q に対する親和性の測定

抗体の F c と C 1 q との親和性の強弱は、抗体が CDC エフェクター機能を有するか否かを直接決定するため、本実施例では、各 F c 変異体の C 1 q に対する親和性を測定することにより、当該 F c 変異体が CDC エフェクター機能を有するか否かを判断した。

20

【0116】

バイオレイヤー干渉法 (BLI) を使用して、ヒト C 1 q に対する本発明の抗体の結合親和性 (KD) を測定した。BLI 法による親和性の測定は、従来の方法 (Estep、Pら、High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs、2013. 5 (2) : p270-8) で行われた。

【0117】

まず、EZ-Link TMSulfo-NHS-LC-Biotin (21327、Thermo Scientific) を使用してビオチンと抗体をモル比 3 : 1 で混合した後、静置してビオチン標識を行い、遠心分離して標識されていないビオチンを除去し、抗体を PBS 溶液に等体積置換した。

30

【0118】

実験開始の半時間前に、試料数に応じて、適切な数の SA センサー (Fortebio、18-5019) を SD 緩衝液 (1xPBS、0.1%BSA、0.05%Tween (登録商標)-20) に浸漬した。抗体を約 100 nM に希釈し、C 1 q (A099、Complement Technology) を 40 nM に希釈した。

【0119】

200 μL の SD 緩衝液、200 μL の標識抗体溶液、および 200 μL の C 1 q 抗原を 96 ウェル黒色ポリスチレンマイクロプレート (Greiner、655209) に加えた。Fortebio Octet Red 96e を使用して検出を行い、試料の位置に応じてプレートをレイアウトし、センサーの位置を選択した。機器設定パラメータは次の通りである：実行ステップ：ベースライン、試料添加～3 nm、ベースライン、会合 (Kon) および解離 (Kdis) を実行し、各ステップの実行時間は試料の結合および解離速度に依存し、回転速度は 1000 rpm、温度は 30 °C であった。実験が完了した後、ForteBio Octet 分析ソフトウェアを使用して KD 値を分析し、座標軸データをエクスポートして、Graphpad Prism 8 ソフトウェアを使用してプロットした。

40

【0120】

結果は表 5 および図 2 k に示しように、Fcmut-01 のみが C 1 q に結合可能であ

50

り、親和性は 2.02×10^{-8} であり、Fcmut-2～Fcmut-8はすべてC1qに結合しなかった。本研究のFc変異体は、FcとC1qの結合を弱めるか、または阻止することができ、したがって、抗体のCDCエフェクター機能を低減または除去できることが示された。対応する野生型対照と比較して、Fcmut-10～Fcmut-16、Fcmut-18～Fcmut-24も同様に、C1qに結合しなかった。また、Fcmut-25と比較して、Fcmut-26～Fcmut-32も同様に、C1qに結合しなかった。

【0121】

【表5】

表5. Fc変異体のC1qに対する親和性

試料	抗原	応答 (nm)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
Fcmut-01	C1q	0.1582	2.02×10^{-8}	3.67×10^6	7.41×10^{-2}
Fcmut-02		0.0007	結合しない		
Fcmut-03		0.0016	結合しない		
Fcmut-04		-0.0027	結合しない		
Fcmut-05		-0.0033	結合しない		
Fcmut-06		-0.0035	結合しない		
Fcmut-07		-0.0134	結合しない		
Fcmut-08		0.0004	結合しない		

【0122】

実験例5. バイオレイヤー干渉技術による本発明の抗体と抗原との親和性の測定

以下の内容を除き、実施例4に記載の方法と同じBLI法を用いて親和性の検出を行った。

【0123】

実験開始の半時間前に、試料数に応じて、適切な数のAHC (Fortebio、18-5060) センサーをSD緩衝液 (1xPBS、0.1%BSA、0.05%Tween (登録商標)-20) に浸漬した。抗体およびClaudin18.2 (cp0007、Genscript) をそれぞれ100nMに希釈した。

【0124】

200μLのSD緩衝液、200μLの抗体、および200μLのClaudin18.2抗原をそれぞれ96ウェル黒色ポリスチレンマイクロプレート (Greiner、655209) に加えた。Fortebio Octet Red96eを使用して検出を行い、試料の位置に応じてプレートをレイアウトし、センサーの位置を選択した。機器設定パラメータは次の通りである：実行ステップ：ベースライン、試料添加、ベースライン、会合 (Kon) および解離 (Kdis) を実行し、各ステップの実行時間は試料の結合および解離速度に依存し、回転速度は1000rpm、温度は30℃であった。実験が完了した後、Fortebio Octet分析ソフトウェアを使用してKD値を分析した。

【0125】

結果を表6に示し、Fcmut-02～08および抗原のKD値は、Fcmut-01および抗原のKD値と同程度であるため、本発明に開示されたFc領域における具体的な変異は、対応する抗体とその抗原の親和性に影響を及ぼさず、ひいては本発明のFc変異体を含む抗体は、それ自体の抗原親和性を保持することが示された。

【0126】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6. 抗体と抗原の親和性

試料	抗原	応答 (nm)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
Fcmut-01	Claudin 18.2	0.1493	3.32E-09	6.02E+04	2.00E-04
Fcmut-02		0.138	2.73E-09	7.32E+04	2.00E-04
Fcmut-03		0.1496	2.90E-09	6.90E+04	2.00E-04
Fcmut-04		0.1462	2.83E-09	7.07E+04	2.00E-04
Fcmut-05		0.153	3.17E-09	6.32E+04	2.00E-04
Fcmut-06		0.1444	2.44E-09	8.19E+04	2.00E-04
Fcmut-07		0.1538	2.47E-09	8.09E+04	2.00E-04
Fcmut-08		0.1517	2.41E-09	8.29E+04	2.00E-04

10

【0127】

実施例 6. 抗体媒介による ADCC 効果

FcγRによって媒介される主要なエフェクター機能の1つは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 (ADCC) であり、NK細胞およびマクロファージ上の FcγRIIIA (CD16A) によって媒介された。前記実施例において本出願で得られた Fc 変異を有する抗体の Fc 受容体に対する親和性を研究した後、本実施例では、前記抗体変異体の ADCCエフェクター機能を引き続き検討した。

20

【0128】

本実施例では、Promega社の Jurkat-ADCCNF-AT luciferaseエフェクター細胞株 (以下、ADCCエフェクター細胞と略称する) を使用して、NF-ATシグナルの活性化状況を検出することにより、抗体の ADCC 活性を検出した。実験手順は具体的に以下の通りである。

【0129】

1) 細胞の準備

ヒト claudin 18.2 を表面過剰発現する細胞 DANG-18.2 (CLS Cell Lines Service) および ADCCエフェクター細胞に対して細胞計数を行った: 遠心分離して細胞 DANG-18.2 および ADCCエフェクター細胞の上清を除去し、細胞を PBS 溶液で 2 回洗浄し、そして細胞を検出培地 (5% の低 IgG 血清を含む 1640 培地 (Gibco)) で再懸濁し、ADCCエフェクター細胞の濃度を 6×10^6 個/mL に調整し、DANG-18.2 細胞の濃度を 1×10^6 個/mL に調整した。

30

【0130】

2) プレーティング: 標的細胞 DANG-18.2 を 96 ウェルプレートにウェル当たり 25 μL でプレーティングした。

【0131】

3) 段階希釈した本発明の抗体を添加した: Fc 領域変異を有する各抗体試料および対照試料の開始濃度は表 7 に示すようであり、そして 3 倍希釈を行って合計 10 個の希釈勾配を得、それぞれウェルプレートに順次にウェル当たり 25 μL 添加した。

40

【0132】

【表 7】

表 7. 抗体の開始濃度

タンパク質の名称	Fcmut-01	Fcmut-02	Fcmut-03	Fcmut-04	Fcmut-05	Fcmut-06	Fcmut-07	Fcmut-08
開始ウェルタンパク質濃度 (μg/mL)	30	300	300	300	300	300	300	300

50

【0133】

4) ADCCEフェクター細胞を各ウェルプレートに、ウェル当たり25μLずつ添加した。

【0134】

5) 37℃のインキュベーター中で12時間インキュベートした。

【0135】

6) 96ウェルプレートを取り出し、室温で10分間置き、各ウェルに解凍したLuciferase試験試薬(Bio-Glo™ Luciferase assay reagent)を75μL加えた。マイクロプレートリーダーで検出し、GraphPadソフトウェアで濃度依存性曲線をフィッティングした。

10

【0136】

試験結果を図4に示すように、対照抗体Fcmut-01は野生型IgG1モノクローナル抗体のFc領域を有し、標的細胞(DANG-18.2)上の抗原に結合することでADCCEフェクター細胞のNF-ATシグナルを効果的に活性化でき、これによりADCCEの下流シグナル伝達経路を活性化し、当該抗体が優れたADCCE殺傷能力を有することが示された。しかし、本出願で得られたFc領域変異を有する他の抗体は、非常に弱い又はほとんどないADCCE効果を示し、具体的には、変異体Fcmut-05(L234AおよびL235A変異を有する)は、対照Fcmut-01より10倍高い濃度で非常に弱いADCCE活性を示したが、他の変異体は、Fcmut-01より10倍高い濃度でもADCCE活性を有さず、本出願で得られたFc領域変異を有する抗体分子のADCCE

20

【0137】

従来技術によれば、Fc領域に対してLALA変異を行うことにより抗体のADCCE効果が顕著に低減されることが知られているが、本実施例の結果から、LALA変異と比較して、本出願で得られたFc変異体はADCCE効果に対する低減効果がより大きいことが示された。

【0138】

本出願が抗体Fc領域の329位、330位、234位、もしくは235位の1つまたは複数のアミノ酸に対して変異修飾(例えば、欠失、置換)を行うことによって得られた抗体変異体は、ADCCEフェクター機能を実質的に除去させ、これにより、前記アミノ酸の位置は、抗体のADCCE/ADCPフェクター機能にとって重要であることが示された。標的抗体が実際の要求においてADCCE/ADCPフェクター機能を回避する必要がある場合、当業者は、本出願に開示された内容にしたがって、Fc領域の329位、330位、234位、もしくは235位の1つまたは複数のアミノ酸に対して対応する修飾を行うことを選択でき、これにより実際の技術的效果を奏した。具体的には、抗体Fc領域の329位のアミノ酸の欠失、329位~330位のアミノ酸の欠失、329位のアミノ酸の欠失、および320位のアミノ酸の置換、ならびに前記修飾とLALA修飾(L234A+L235A)との組み合わせ適用を考慮することができ、これにより、ADCCE/ADCPフェクター機能を除去する抗体分子を得た。

30

40

【図面】
【図 1】

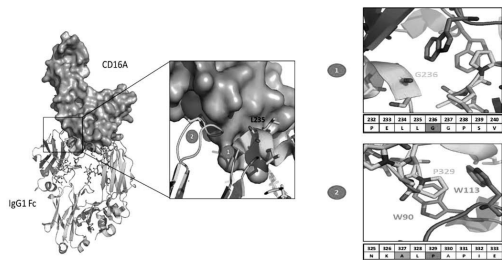


図1：ヒトIgG1FcとヒトCD16Aの結晶構造（PDB：3SGJ）

【図 2 a】

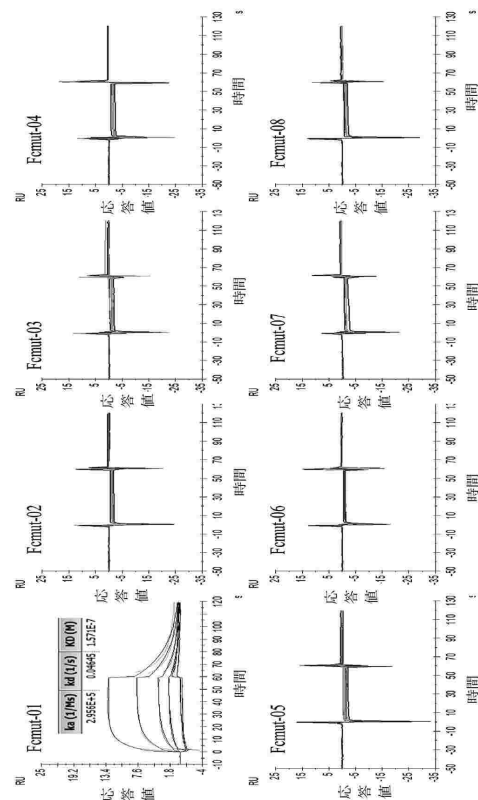


図 2 a

10

20

30

40

50

【図 2 b】

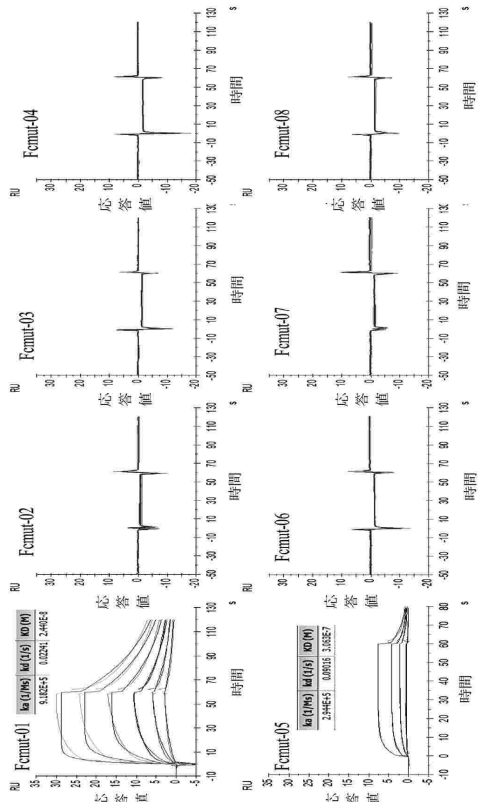


図 2 b

【図 2 c】

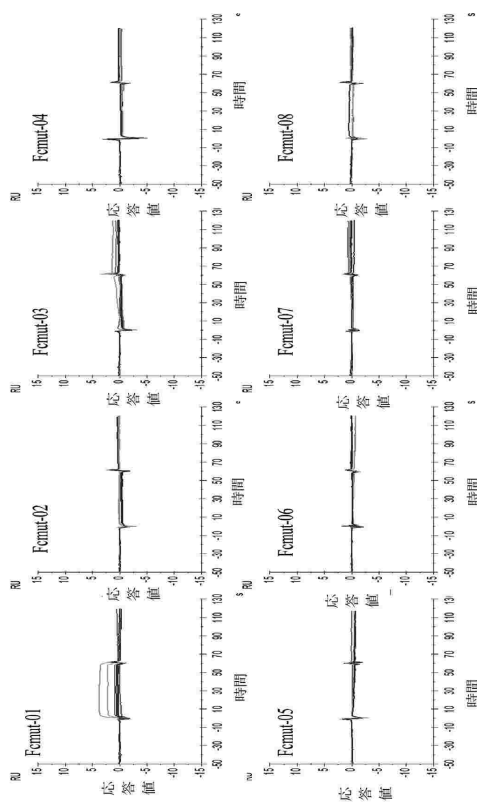


図 2 c

【図 2 d】

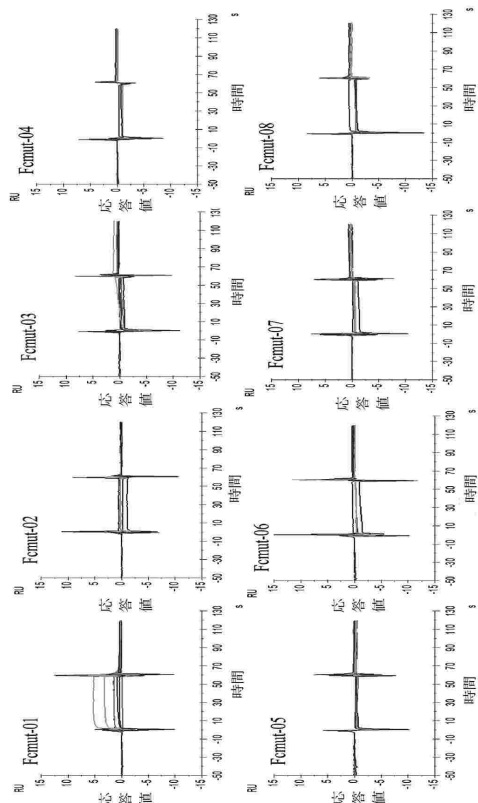


図 2 d

【図 2 e】

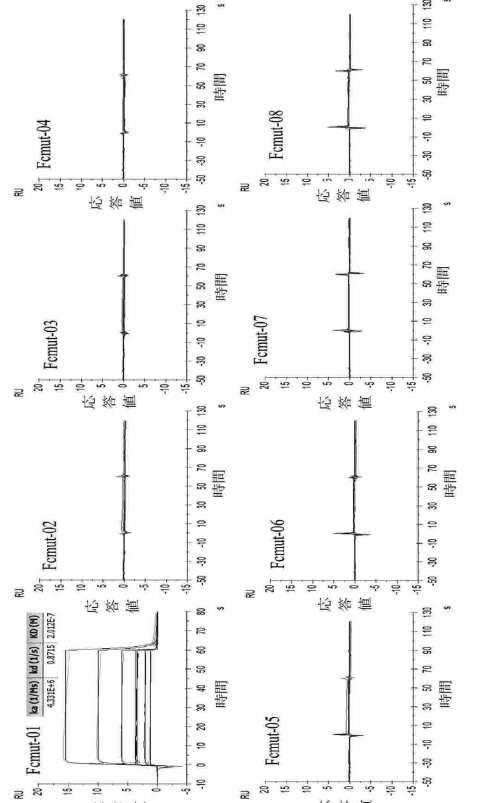


図 2 e

10

20

30

40

50

【図 2 f】

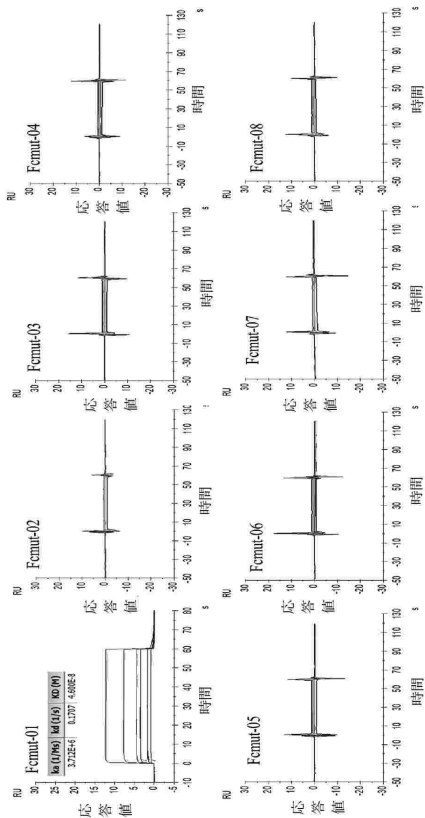


図 2 f

【図 2 g】

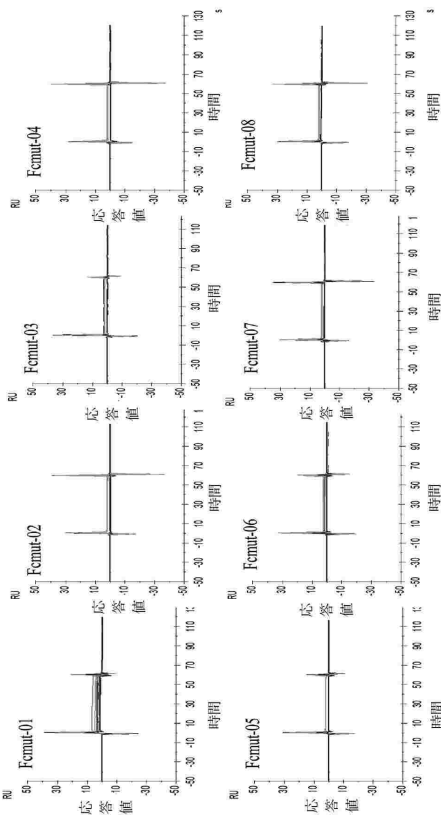


図 2 g

【図 2 h】

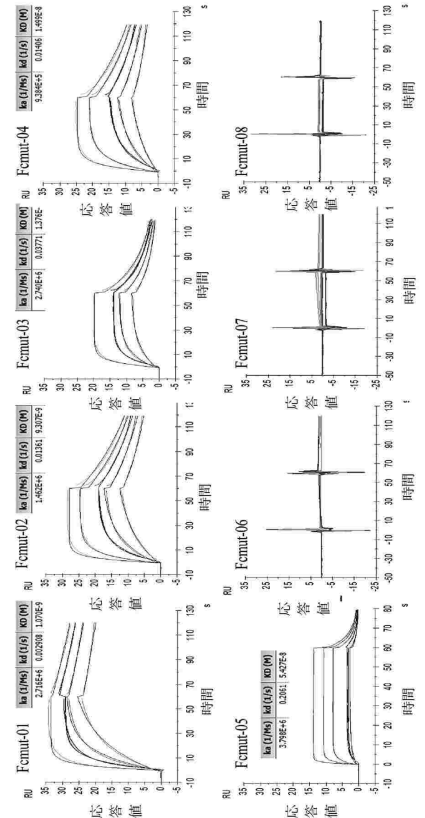


図 2 h

【図 2 i】

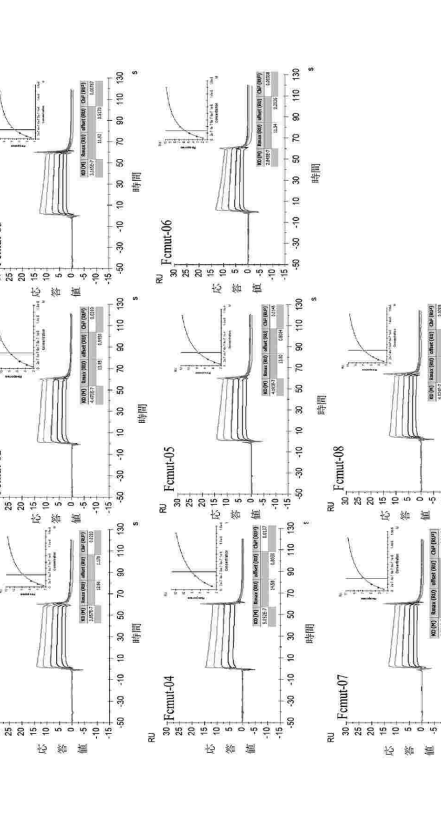


図 2 i

10

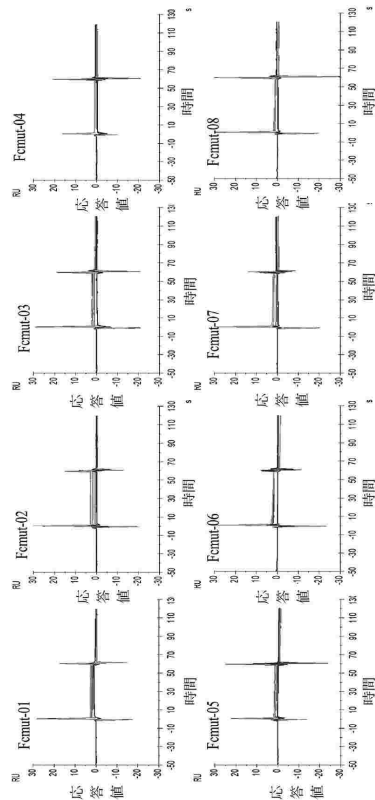
20

30

40

50

【図 2 j】



【図 2 k】

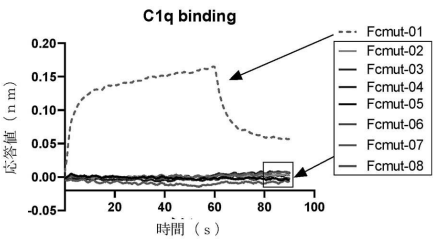
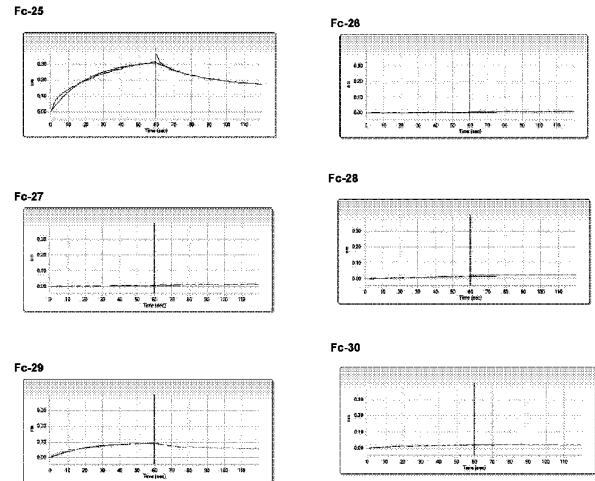


図 2 k

図 2 j

【図 3 a】



【図 3 a - 1】

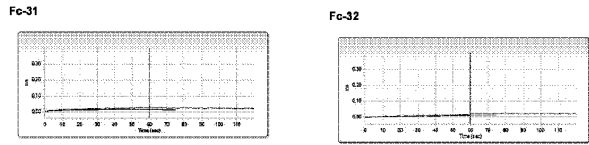


図 3a

10

20

30

40

50

【図 3 b】

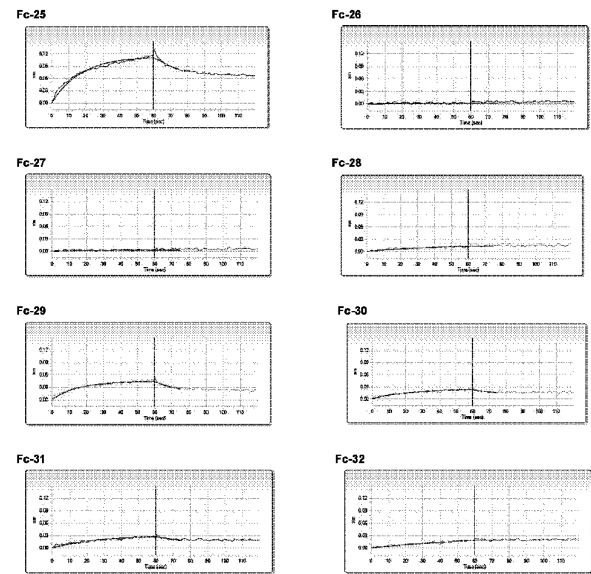


图 3b

【図 3 c】

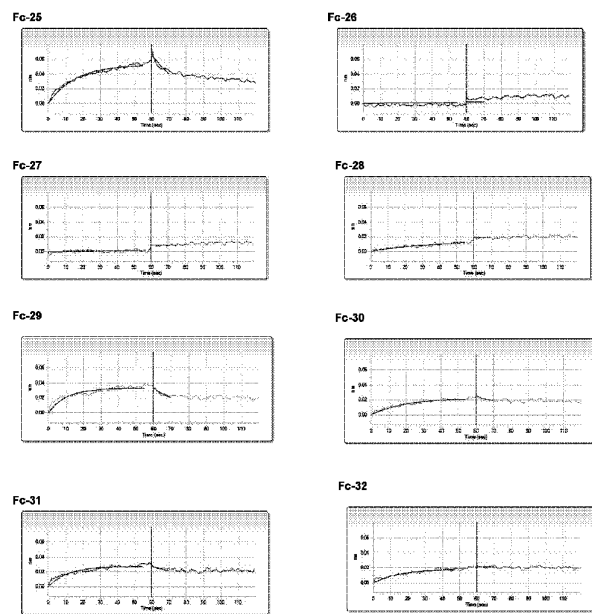
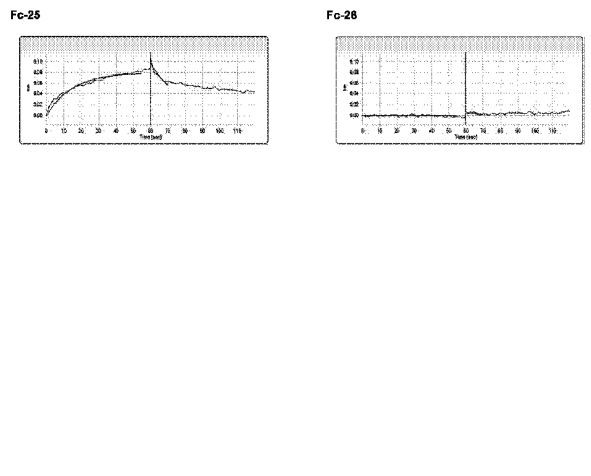


图 3c

【図 3 d】



【図 3 d - 1】

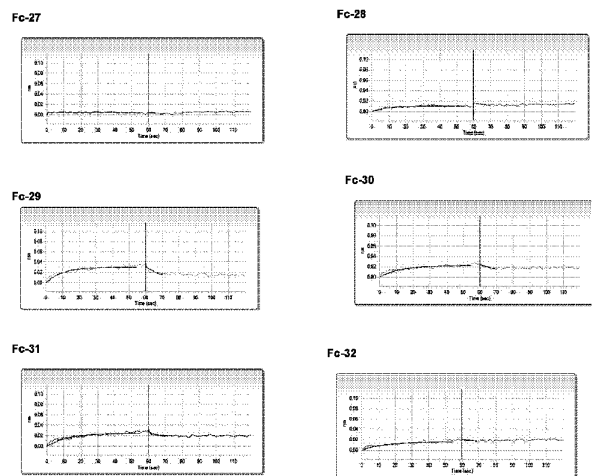


图 3d

10

20

30

40

50

【図 3 e】

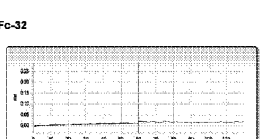
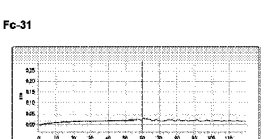
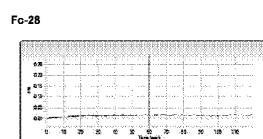
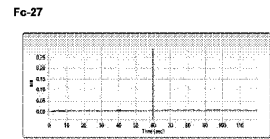
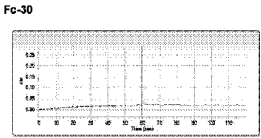
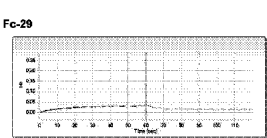
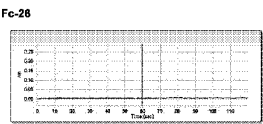
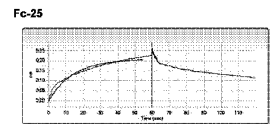


図 3e

【図 3 f】

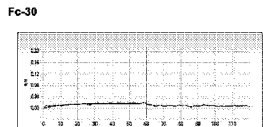
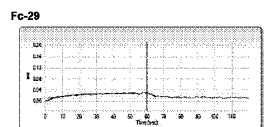
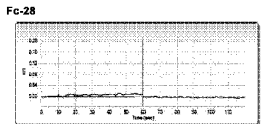
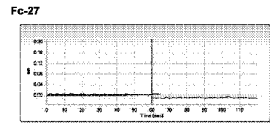
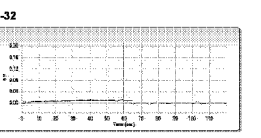
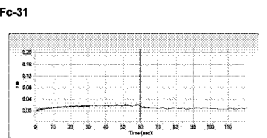
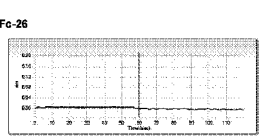
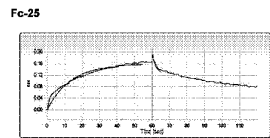


図 3f

【図 3 f - 1】

【図 3 g】

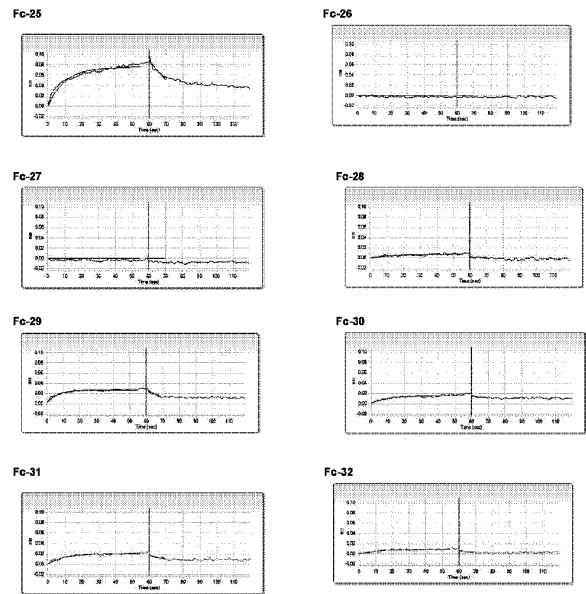


图 3g

【図 3 h】

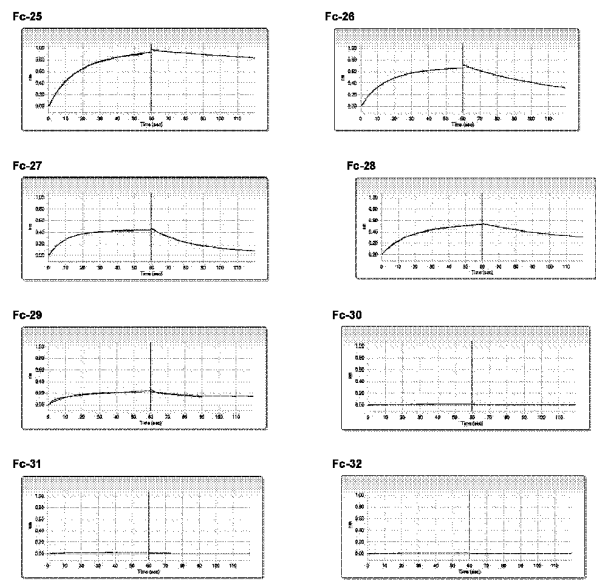
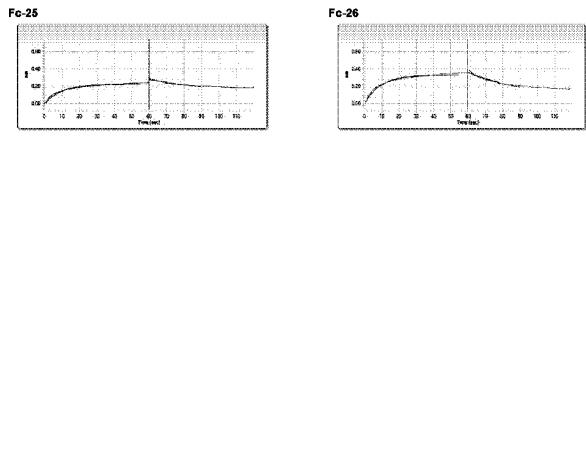


图 3h

【図 3 i】



【図 3 i - 1】

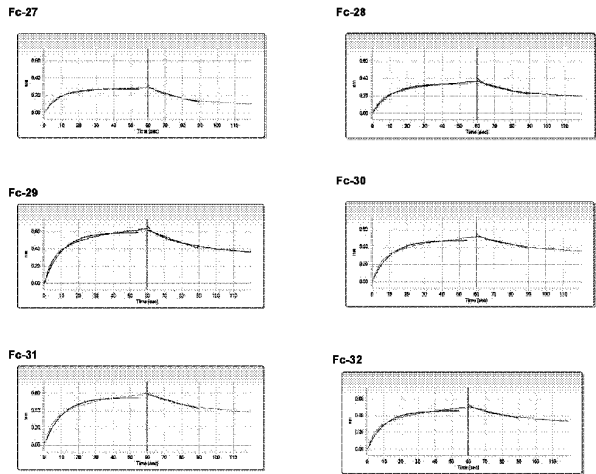


图 3i

10

20

30

40

50

【 図 4 】

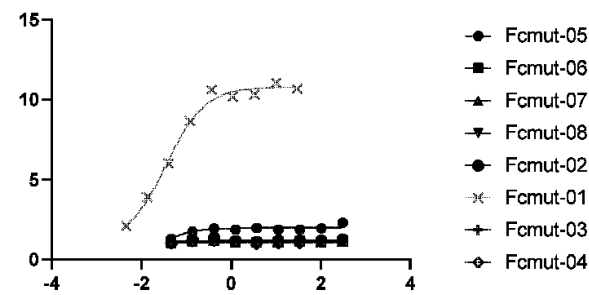


图 4

【 配 列 表 】

2 0 2 4 5 1 6 3 2 0 0 0 0 0 0 1 . a p p

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/091187
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/00(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, IPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval Ssystem, NCBI, EMBL, STN: Fc, ADCC, ADCP, CDC, 第329位, 第234位, 第235位, 第330位, 缺失, 取代, Δ329, L234A, F234A, V234A, L235A, Δ330, A330G, S330G, SEQ ID NOs: 2-33		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108713027 A (JANSSEN BIOTECHNOLOGY INC.) 26 October 2018 (2018-10-26) claims 1 and 27-57, and description, paragraphs 0437-0457	1-15
Y	CN 108713027 A (JANSSEN BIOTECHNOLOGY INC.) 26 October 2018 (2018-10-26) claims 1 and 27-57, and description, paragraphs 0437-0457	2-15
X	CN 101987870 A (XENCOR INC.) 23 March 2011 (2011-03-23) description, paragraphs 0023 and 0032-0036	1-15
Y	CN 101987870 A (XENCOR INC.) 23 March 2011 (2011-03-23) description, paragraphs 0023 and 0032-0036	2-15
X	CN 109963871 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02 July 2019 (2019-07-02) claims 95-107, and p. 106, the last paragraph, SEQ ID NO: 244	1-15
Y	CN 109963871 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02 July 2019 (2019-07-02) claims 95-107, and p. 106, the last paragraph, SEQ ID NO: 244	2-15
X	CN 104395339 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 04 March 2015 (2015-03-04) claims 1-8, and descriptions 0085-0096	1-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2022		Date of mailing of the international search report 02 August 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/091187

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104395339 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 04 March 2015 (2015-03-04) claims 1-8, and descriptions 0085-0096	2-15
A	WO 2004092219 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC. et al.) 28 October 2004 (2004-10-28) entire document	1-15
A	WO 2020039321 A2 (PFIZER INC.) 27 February 2020 (2020-02-27) entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/091187	
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:			10
			20
			30
			40
			50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/091187

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **9,13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The technical solution of claim 9 relates to "a use of the Fc mutant according to any one of claims 1-4 in reducing or eliminating an ADCC, ADCP or CDC effector function". Claim 13 relates to "a method for treating a tumor in a subject", belonging to the subject matter as defined in PCT Rule 39(iv).
However, in the present search report, a search was conducted on the basis of a use of the Fc mutant or a polypeptide comprising the Fc mutant in the preparation of a drug for reducing or eliminating an ADCC, ADCP or CDC effector function or treating a tumor in a subject.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/091187

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108713027	A	26 October 2018	KR	20180087430	A	01 August 2018
				EP	3390453	A2	24 October 2018
				US	2018355043	A1	13 December 2018
				BR	112018012344	A2	04 December 2018
				AU	2016371034	A1	31 May 2018
				WO	2017106684	A2	22 June 2017
				MA	44072	A	24 October 2018
				CA	3008819	A1	22 June 2017
				JP	2019502698	A	31 January 2019
CN	101987870	A	23 March 2011	EP	1919950	A1	14 May 2008
				JP	2008505174	A	21 February 2008
				EP	2940043	A1	04 November 2015
				AU	2005272993	A1	23 February 2006
				EP	2471813	A1	04 July 2012
				ES	2530340	T3	02 March 2015
				EP	3342782	A1	04 July 2018
				IL	179048	D0	08 March 2007
				BR	PI0510674	A	26 December 2007
				WO	2006019447	A1	23 February 2006
				CA	2565961	A1	23 February 2006
				CN	103351434	A	16 October 2013
				JP	2011188869	A	29 September 2011
				CN	103172731	A	26 June 2013
				KR	20070029190	A	13 March 2007
				CN	101014619	A	08 August 2007
				SI	2471813	T1	31 March 2015
				PL	2471813	T3	30 September 2015
				DK	2471813	T3	02 March 2015
CN	109963871	A	02 July 2019	US	2022064315	A1	03 March 2022
				EP	3494139	A1	12 June 2019
				WO	2018027204	A1	08 February 2018
				JP	2019530434	A	24 October 2019
				TW	201808991	A	16 March 2018
				US	2018057598	A1	01 March 2018
				AR	109298	A1	14 November 2018
CN	104395339	A	04 March 2015	CN	110256567	A	20 September 2019
				HK	1207864	A1	12 February 2016
				KR	20150023889	A	05 March 2015
				EP	2867253	A1	06 May 2015
				ES	2597228	T3	17 January 2017
				WO	2014001324	A1	03 January 2014
				RU	2015100230	A	10 August 2016
				US	2019002570	A1	03 January 2019
				BR	112014032193	A2	27 June 2017
				JP	2015527981	A	24 September 2015
				US	2015232561	A1	20 August 2015
				CA	2871880	A1	03 January 2014
				MX	2014014801	A	12 February 2015
WO	2004092219	A2	28 October 2004	DK	1615955	T3	10 December 2012
				SI	1615955	T1	31 January 2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/091187

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				PL	1615955	T3		29 March 2013	
				EP	1615955	A2		18 January 2006	
				MX	PA05010902	A		31 May 2006	
				KR	20060022231	A		09 March 2006	
				CA	2522331	A1		28 October 2004	
				BR	PI0409269	A		28 March 2006	
				AU	2004231078	A1		28 October 2004	
				CY	1113400	T1		22 June 2016	
				PT	1615955	E		10 December 2012	
				ES	2394088	T3		17 January 2013	
				US	2005032114	A1		10 February 2005	
WO	2020039321	A2	27 February 2020	JP	2021526847	A		11 October 2021	
				TW	202021619	A		16 June 2020	
				PH	12021550337	A1		04 October 2021	
				EP	3841121	A2		30 June 2021	
				AU	2019323790	A1		11 March 2021	
				CO	2021001893	A2		08 March 2021	
				CA	3109905	A1		27 February 2020	
				BR	112021003173	A2		11 May 2021	
				PE	20211412	A1		02 August 2021	
				US	2020055930	A1		20 February 2020	
				IL	280963	D0		29 April 2021	
				SG	11202101502Y	A		30 March 2021	
				KR	20210049840	A		06 May 2021	
				CN	112912395	A		04 June 2021	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/091187
A. 主题的分类 C07K 16/00(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用)) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: Fc, ADCC, ADCP, CDC, 第329位, 第234位, 第235位, 第330位, 缺失, 取代, Δ 329, L234A, F234A, V234A, L235A, Δ 330, A330G, S330G, SEQ ID NOs: 2-33		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 108713027 A (詹森生物科技公司) 2018年10月26日 (2018 - 10 - 26) 权利要求1, 27-57, 说明书第0437-0457段	1-15
Y	CN 108713027 A (詹森生物科技公司) 2018年10月26日 (2018 - 10 - 26) 权利要求1, 27-57, 说明书第0437-0457段	2-15
X	CN 101987870 A (赞科股份有限公司) 2011年3月23日 (2011 - 03 - 23) 说明书第0023, 0032-0036段	1-15
Y	CN 101987870 A (赞科股份有限公司) 2011年3月23日 (2011 - 03 - 23) 说明书第0023, 0032-0036段	2-15
X	CN 109963871 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 权95-107, 106页最后一段, SEQ ID NO: 244	1-15
Y	CN 109963871 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 权95-107, 106页最后一段, SEQ ID NO: 244	2-15
X	CN 104395339 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2015年3月4日 (2015 - 03 - 04) 权利要求1-8, 说明书第0085-0096	1-15
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件,或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布,与申请不相抵触,但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件,单独考虑该文件,认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件,当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2022年7月21日		国际检索报告邮寄日期 2022年8月2日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张蕾 电话号码 86-(10)-53962037

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/091187
G. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 104395339 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2015年3月4日 (2015 - 03 - 04) 权利要求1-8, 说明书第0085-0096	2-15
A	WO 2004092219 A2 (PROTEIN DESIGN LABS, INC. 等) 2004年10月28日 (2004 - 10 - 28) 全文	1-15
A	WO 2020039321 A2 (PFIZER INC.) 2020年2月27日 (2020 - 02 - 27) 全文	1-15

国际申请号

PCT/CN2022/091187

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的：
☒ 附件C/ST. 25文本文件形式
☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的：
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
☐ 附件C/ST. 25文本文件形式（细则13之三. 1(a)）
☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段）
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

10

20

30

40

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/091187
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：		
1.	☒ 权利要求： 9, 13 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： [1] 权利要求9的技术方案涉及“权利要求1-4任一项所述的Fc突变体在减少或者消除ADCC、ADCP或CDC效应子功能中的用途”，权利要求13涉及“一种治疗受试者的肿瘤的方法”，属于PCT细则第39条(iv)规定的主题，但是本检索报告基于所述Fc突变体或包含所述Fc变体的多肽在制备减少或者消除ADCC、ADCP或CDC效应子功能或治疗受试者中的肿瘤的藥物中的用途进行检索。	10
2.	☐ 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：	
3.	☐ 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/091187

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108713027	A	2018年10月26日	KR	20180087430	A	2018年8月1日
				EP	3390453	A2	2018年10月24日
				US	2018355043	A1	2018年12月13日
				BR	112018012344	A2	2018年12月4日
				AU	2016371034	A1	2018年5月31日
				WO	2017106684	A2	2017年6月22日
				MA	44072	A	2018年10月24日
				CA	3008819	A1	2017年6月22日
				JP	2019502698	A	2019年1月31日
CN	101987870	A	2011年3月23日	EP	1919950	A1	2008年5月14日
				JP	2008505174	A	2008年2月21日
				EP	2940043	A1	2015年11月4日
				AU	2005272993	A1	2006年2月23日
				EP	2471813	A1	2012年7月4日
				ES	2530340	T3	2015年3月2日
				EP	3342782	A1	2018年7月4日
				IL	179048	DO	2007年3月8日
				BR	PI0510674	A	2007年12月26日
				WO	2006019447	A1	2006年2月23日
				CA	2565961	A1	2006年2月23日
				CN	103351434	A	2013年10月16日
				JP	2011188869	A	2011年9月29日
				CN	103172731	A	2013年6月26日
				KR	20070029190	A	2007年3月13日
				CN	101014619	A	2007年8月8日
				SI	2471813	T1	2015年3月31日
CN	109963871	A	2019年7月2日	US	2022064315	A1	2022年3月3日
				EP	3494139	A1	2019年6月12日
				WO	2018027204	A1	2018年2月8日
				JP	2019530434	A	2019年10月24日
				TW	201808991	A	2018年3月16日
CN	104395339	A	2015年3月4日	US	2018057598	A1	2018年3月1日
				AR	109298	A1	2018年11月14日
				CN	110256567	A	2019年9月20日
				HK	1207864	A1	2016年2月12日
				KR	20150023889	A	2015年3月5日
				EP	2867253	A1	2015年5月6日
				ES	2597228	T3	2017年1月17日
				WO	2014001324	A1	2014年1月3日
				RU	2015100230	A	2016年8月10日
				US	2019002570	A1	2019年1月3日
				BR	112014032193	A2	2017年6月27日
				JP	2015527981	A	2015年9月24日
				US	2015232561	A1	2015年8月20日
WO	2004092219	A2	2004年10月28日	CA	2871880	A1	2014年1月3日
				MX	2014014801	A	2015年2月12日
DK	1615955	T3	2012年12月10日				

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2022/091187			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
				SI	1615955	T1	2013年1月31日
				PL	1615955	T3	2013年3月29日
				EP	1615955	A2	2006年1月18日
				MX	PA05010902	A	2006年5月31日
				KR	20060022231	A	2006年3月9日
				CA	2522331	A1	2004年10月28日
				BR	PI0409269	A	2006年3月28日
				AU	2004231078	A1	2004年10月28日
				CY	1113400	T1	2016年6月22日
				PT	1615955	E	2012年12月10日
				ES	2394088	T3	2013年1月17日
				US	2005032114	A1	2005年2月10日
WO	2020039321	A2	2020年2月27日	JP	2021526847	A	2021年10月11日
				TW	202021619	A	2020年6月16日
				PH	12021550337	A1	2021年10月4日
				EP	3841121	A2	2021年6月30日
				AU	2019323790	A1	2021年3月11日
				CO	2021001893	A2	2021年3月8日
				CA	3109905	A1	2020年2月27日
				BR	112021003173	A2	2021年5月11日
				PE	20211412	A1	2021年8月2日
				US	2020055930	A1	2020年2月20日
				IL	280963	D0	2021年4月29日
				SG	11202101502Y	A	2021年3月30日
				KR	20210049840	A	2021年5月6日
				CN	112912395	A	2021年6月4日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード (参考)

C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	M

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

(74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則

(74)代理人 100203828
弁理士 喜多村 久美

(72)発明者 フー フォンケン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8

(72)発明者 チョウ ショアイシアン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8

(72)発明者 ウー チーハイ
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8

F ターム (参考) 4B065 AA94Y AB01 BA02 CA24
4C085 AA14 BB11 BB36 CC23 EE01
4H045 AA11 BA09 CA42 DA75 EA22 FA74