(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4511035号
(P4511035)

(45)発行日　平成22年7月28日(2010.7.28)　(24)登録日　平成22年5月14日(2010.5.14)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C07K 16/34	(2006.01)	C07K	16/34	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102

請求項の数 25　(全 37 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-548374 (P2000-548374)
(86)(22)出願日　平成11年5月7日 (1999.5.7)
(65)公表番号　特表2002-514406 (P2002-514406A)
(43)公表日　平成14年5月21日 (2002.5.21)
(86)国際出願番号　PCT/GB1999/001441
(87)国際公開番号　WO1999/058572
(87)国際公開日　平成11年11月18日 (1999.11.18)
審査請求日　平成18年4月19日 (2006.4.19)
(31)優先権主張番号　9809951.8
(32)優先日　平成10年5月8日 (1998.5.8)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(73)特許権者　503372842
ケンブリッジ　エンタープライズ　リミティド
イギリス国，シービー２　１ティーエヌ，ケンブリッジ，トリニティー　レーン，ジ　オールド　スクールズ
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100092624
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人　100108903
弁理士　中村　和広
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】補体仲介溶解を誘発しない免疫グロブリン由来の結合分子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換え抗体であって：
（ｉ）標的分子に結合することができる、抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片、及び
（ii）ヒト免疫グロブリン重鎖の不変ドメインに少なくとも９０％相同であるアミノ酸配列をもつエフェクタードメイン、
を含み；上記組換え抗体は、有意な補体依存性溶解、又は上記標的の細胞仲介破壊を誘発せずに、上記標的分子に結合することができ、
ここで前記エフェクタードメインが、
－ＦｃγＲＩＩｂに特異的に結合することができ、かつ、
－ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ４から成る群から選ばれる２以上のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメイン由来であるキメラドメインを含むエフェクタードメインであり、そして
ここで、上記キメラドメインは、ＥＵナンバリング・システムに従って上記位置に、以下のアミノ酸ブロック：２３３Ｐ、２３４Ｖ、２３５Ａ、及び２３６Ｇ、並びに３２７Ｇ、３３０Ｓ、及び３３１Ｓを有するヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインであり、かつ、上記修飾されたアミノ酸をもつヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２又はＩｇＧ４からのC_H ２配列（残基２３１－３４０）に少なくとも９８％同一である、前記組換え抗体。
【請求項２】
前記エフェクタードメインが、図１７中に示すＧ１Δａｃ又はＧ４Δｃであって当該分

子を実質的に無効アロタイプにするさらなる修飾を場合により含むものから選ばれる、請求項１に記載の組換え抗体。

【請求項３】

前記エフェクタードメインが、図１７中に示すＧ１Δａｃ又はＧ４Δｃから選ばれる、請求項２に記載の組換え抗体。

【請求項４】

組換え抗体であって：

（ｉ）標的分子に結合することができる、抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片、及び

（ii）ヒト免疫グロブリン重鎖の不変ドメインに少なくとも９０％相同であるアミノ酸配列をもつエフェクタードメイン、

を含み；上記組換え抗体は、有意な補体依存性溶解、又は上記標的の細胞仲介破壊を誘発せずに、上記標的分子に結合することができ、

ここで前記エフェクタードメインが、

－ＦｃγＲＩＩｂに特異的に結合することができ、かつ、

－ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ４から成る群から選ばれる２以上のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメイン由来であるキメラドメインを含むエフェクタードメインであり、そして

ここで、上記キメラドメインは、ＥＵナンバリング・システムに従って上記位置に、以下のアミノ酸ブロック：２３３Ｐ、２３４Ｖ、２３５Ａ、及び２３６位に残基なし、並びに３２７Ｇ、３３０Ｓ、及び３３１Ｓを有するヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインであり、かつ、上記修飾されたアミノ酸をもつヒトＩｇＧ１又はＩｇＧ２からのC_H ２配列（残基２３１－３４０）に少なくとも９８％同一である、前記組換え抗体。

【請求項５】

前記エフェクタードメインが、図１７中に示すＧ１Δａｂ又はＧ２Δａであって当該分子を実質的に無効アロタイプにするさらなる修飾を場合により含むものから選ばれる、請求項４に記載の組換え抗体。

【請求項６】

前記エフェクタードメインが、図１７中に示すＧ１Δａｂ又はＧ２Δａから選ばれる、請求項５に記載の組換え抗体。

【請求項７】

前記エフェクタードメインは、前記C_H ２ドメインの少なくとも１の領域内の少なくとも１のアミノ酸が、第２の異なるヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインからの対応のアミノ酸に修飾されているところの第１のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインに由来し、かつ、

ここで、前記エフェクタードメインは、上記第１又は第２のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインに比較して、ＦｃγＲ１、ＦｃγＲＩＩａ又はＦｃγＲＩＩＩについての低下したアフィニティーを、そして低下した補体溶解仲介能力を有する、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換え抗体。

【請求項８】

前記抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片は、前記エフェクタードメインに対して異なる源に由来する、請求項１～７のいずれか１項に記載の組換え抗体。

【請求項９】

前記抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片が、赤血球のＲｈＤ抗原；血小板のＨＰＡアロ抗原；好中球抗原；Ｔ－細胞レセプター；インテグリン；糸状体基底膜（ＧＢＭ）コラーゲン；Ｄｅｒ　Ｐ１；ＨＰＡ－１ａ；ＶＡＰ－１；ラミニン（ｌａｍｉｎｉｎ）；ルテラン（ｌｕｔｈｅｒａｎ）；血小板糖タンパクＶＩ；血小球糖タンパクＩａ／ＩＩａ；の中のいずれかに結合することができる、請求項１～８のいずれか１項に記載の組換え抗体。

【請求項１０】

前記抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片が、ＣＡＭＰＡＴＨ－１及びＦＯＧ１；ＯＫＴ３；Ｂ２（抗－ＨＰＡ－１ａ）；ＶＡＰ－１；ネズミ抗－α３（ＩＶ）ＮＣ１；ＹＴＨ１

２．５（ＣＤ３）；２Ｃ７（抗－Ｄｅｒ　ｐＩ）；抗－ラミニン；抗－ルテラン；の抗原結合部位又はＦａｂ断片から選ばれる、請求項９に記載の組換え抗体。

【請求項１１】

請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換え抗体のエフェクタードメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸。

【請求項１２】

前記ヌクレオチド配列が、請求項１～１１のいずれか１項に記載の組換え抗体をコードする、請求項１１に記載の核酸。

【請求項１３】

複製可能なベクターである、請求項１１又は１２に記載の核酸。

【請求項１４】

前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能な状態で連結されている、請求項１３に記載の核酸。

【請求項１５】

請求項１３又は１４に記載の核酸を含むか又はそれにより形質転換されている宿主細胞。

【請求項１６】

C_H ２ドメインの少なくとも１の領域内の２，３又は４のアミノ酸が第２のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインからのアミノ酸に対応するように、第１のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２をコードするヌクレオチド配列を修飾するステップを含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換え抗体の製造方法であって、上記領域がＥＵナンバリング・システムに従う残基２３３～２３６、及び３２７～３３１と番号付けされた２つの別個の領域から選ばれ、かつ、ここで各場合において上記ヒト免疫グロブリンがＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ４から成る群から選ばれる、前記製造方法。

【請求項１７】

前記C_H ２ドメインの１領域内の２アミノ酸が第２のヒト免疫グロブリン重鎖C_H ２ドメインからの対応アミノ酸に修飾されている、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

標的分子を前記抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片に結合させるための、請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換え抗体のインビトロにおける使用。

【請求項１９】

前記エフェクタードメインがＦｃγＲＩＩｂに特異的に結合し、その結合が、Ｂ細胞活性化；肥満細胞の脱顆粒化；食作用（ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ）；の内の１以上の阻害を引き起こす、請求項１８に記載の使用。

【請求項２０】

前記標的分子への第２の結合分子の結合を、防止、阻害、又は他の方法で妨害するための、請求項１８に記載の使用。

【請求項２１】

前記第２の結合分子が抗体である、請求項２０に記載の使用。

【請求項２２】

前記標的分子が、赤血球のＲｈＤ抗原；血小板のＨＰＡアロ抗原；好中球抗原；Ｔ－細胞レセプター；インテグリン；ＧＢＭコラーゲン；Ｄｅｒ　Ｐ１；ＨＰＡ－１ａ；ＶＡＰ－１；ラミニン；ルテラン；血小板糖タンパクＶＩ；血小板糖タンパクＩａ／ＩＩａ；から成る群から選ばれる、請求項２０又は２１に記載の使用。

【請求項２３】

疾患に関して患者を治療するための医薬の製造における請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換え抗体の使用であって、該組換え抗体の抗原結合部位又はＦａｂ断片は、該疾患に関する標的分子に結合するように該治療において使用され、ここで、該疾患及び標的分子は、以下の：

（ｉ）移植片対宿主疾患又は宿主対移植片疾患又は臓器移植拒絶又は骨髄移植拒絶又は

自己免疫脈管炎又は関節炎又は喘息、ここで、標的分子は、Ｔ細胞受容体である；
（ｉｉ）自己免疫溶血性貧血又は自己免疫血小板減少症、ここで、標的分子は、赤血球Ｒｈｅｓｕｓ抗原Ｄ，Ｃ，ｃ，Ｅ，ｅ、Ｋｅｌｌ（Ｋ１）抗原、血小板糖タンパクＧＰＩＩｂ／ＩＩＩａ、ＧＰＩｂ／ＩＸ／Ｖである；
（ｉｉｉ）胎児／新生児アロ免疫血小板減少症、ここで、標的分子は、血小板糖タンパクＩＩＩａ上のヒト血小板抗原（ＨＰＡ）－１ａである；
（ｉｖ）ハウス・ダスト・ダニ・アレルギー、ここで、標的分子は、ハウス・ダスト・ダニ・ダーマトファゴイデス・プテロニシナス（Dermatophagoides pteronyssinus)のＤｅｒ　Ｐ１タンパク質である；
（ｖ）クローン病、ここで、標的分子は、ＶＡＰ－１である；
（ｖｉ）新生児溶血性疾患（ＨＤＮ）、ここで、標的分子は、赤血球Ｒｈｅｓｕｓ抗原Ｄ，Ｃ，ｃ，Ｅ，ｅ、又はＫｅｌｌ（Ｋ１）抗原である；
（ｖｉｉ）グッドパスチャー症候群（Ｇｏｏｄｐａｓｔｕｒｅｓ）、ここで、標的分子は、α３（ＩＶ）コラーゲンの非コラーゲン（ＮＣ１）ドメインである；
（ｖｉｉｉ）鎌状赤血球性貧血、ここで、標的分子は、トロンボスポンジン、ラミニン、ルテランである；
（ｉｘ）冠状動脈閉塞、ここで、標的分子は、インテグリンα２β１（血小板糖タンパクＩａ／ＩＩａ）、非インテグリン血小板糖タンパクＶＩである；
である、前記使用。
【請求項２４】
前記医薬が、出生前の胎児である患者に投与されるためのものであり、そして該医薬は、該患者の母親に、投与される、請求項２３に記載の使用。
【請求項２５】
医薬として許容される担体に加えて、請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換え抗体、又は請求項１２～１４のいずれか１項に記載の核酸を含む、医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
技術分野
本発明は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）重鎖の修飾された不変領域に由来するアミノ酸配列を有する結合性ポリペプチドに関する。本発明は、さらに、上記ポリペプチドの製造のための方法及び物、並びにそれを使用する方法及び物に関する。
【０００２】
従来技術
免疫グロブリン
免疫グロブリンは、感染に対して宿主を防禦することを助ける糖タンパク質である。それらは、一般に、重鎖と軽鎖から成り、それらのＮ－末端ドメインは、抗原に結合することができる可変又はＶドメインを形成する。このＶドメインは、免疫グロブリンのクラス（そしてしばしばサブクラス〔アイソタイプ〕、及びアロタイプ〔イソアロタイプ〕）を定める不変又はＣ－末端ドメインと会合している。
【０００３】
従って、哺乳動物種においては、免疫グロブリンは、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、及びＩｇＥとして存在する。ＩｇＧクラスは、次に、ヒトにおいて４つのサブクラス（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）として存在する。ＩｇＧ内のＣ－ドメインは、３つのドメインＣγＩ、Ｃγ２、とＣγ３を含み、これらは、上記サブクラスの間で酷似している（９０％のホモロジー）。Ｃγ１とＣγ２ドメインはヒンジにより連結されている。上記サブクラスの役割は、種間で変化するようである。
【０００４】
Ｃ－ドメインは免疫グロブリンのさまざまなエフェクター作用に責任を負っていることが知られている（詳しくは、Clark (1997)“ＩｇＧ　Effector Mechanisms”in “Antibody Engineering”Ed. Capra, Pub. Chem. Immunol, Basel, Kurger, Vol 65 pp 88-110を参

照のこと）。
簡単に言えば、ＩｇＧの働きは、一般に、ＩｇのＦｃ領域と、しばしばエフェクター細胞上にある、Ｆｃγレセプター（ＦｃγＲ）又は他の結合分子との間の相互作用を介して達成される。これは、そのエフェクター細胞が、それらの可変（Ｖ）領域を通して抗体がそれに結合されるところの標的細胞を殺すことを誘発する。また、可溶性抗体に対する抗体は、免疫複合体の取り込み（オプソニン化（ｏｐｓｏｎｉｓａｔｉｏｎ））又はエフェクター細胞の誘発及びサイトカインの放出をもたらす、ＦｃγＲに標的化された免疫複合体を形成するかもしれない。
【０００５】
ヒトにおいては、ＦｃγＲの３つのクラスが特徴付けられてきた。但し、状況は、多レセプター形態の発生によりさらに複雑になっている。これらの３つのクラスは：
（ｉ）ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）は高アフィニティーをもってモノマーＩｇＧに結合し、そしてマクロファージ、単球、そしてしばしば好中球及びエオシン好性白血球上に発現される。
【０００６】
（ii）ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）は、中～低アフィニティーをもって複合体化したＩｇＧに結合し、そして広く発現される。これらのレセプターは、２つの重要なタイプ、ＦｃγＲＩＩａとＦｃγＲＩＩｂに分けられる。
上記レセプターの“ａ”型は、殺生に関与する多くの細胞（例えば、マクロファージ、単球、好中球）上に存在し、そして上記殺生プロセスを活性化することができるようであり、そして２つの別個の対立遺伝子として生じる。
【０００７】
上記“ｂ”型は、阻害性プロセスにおける役割を演じているようであり、そしてＢ－細胞、マクロファージ、及び肥満細胞及びエオシン好性白血球上に存在する。Ｂ－細胞上では、それは、さらなる免疫グロブリンの製造、及び例えばＩｇＥクラスへのアイソタイプ・スイシチングを抑制するよう働いているようである。マクロファージ上では、ｂ型は、ＦｃγＲＩＩａを通して仲介されるとき、食作用を阻害するように働く。エオシン好性白血球及び肥満細胞上では、ｂ型は、その別個のレセプターに結合するＩｇＥを通して上記細胞の活性化を抑制するように働くことができる。
【０００８】
（iii)ＥｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）は、中～低アフィニティーをもってＩｇＧに結合し、そして２つのタイプとして存在する。ＦｃγＲＩＩＩａは、ＮＫ細胞、マクロファージ、エオシン好性白血球及びいくつかの単球、並びにＴ細胞上に存在し、そしてＡＤＣＣを仲介する。ＦｃγＲＩＩＩｂは、好中球上で高発現される。両タイプは、異なるアロタイプ形態をもつ。
【０００９】
ＦｃγＲへの結合に加えて、ＩｇＧ抗体は補体を活性化することができ、そしてこれも細胞溶解、オプソニン化又はサイトカイン放出及び炎症をもたらすことができる。Ｆｃ領域は、（いわゆる“ＦｃＲｎ”を介しての）新生児へのＩｇＧの輸送；増加した半減期（これもＦｃＲｎ型レセプターを介して行われると信じられている－Ghetie and Ward(1997) Immunology Today 18, 592-598参照）及び自己凝集のような特性をも仲介する。Ｆｃ領域は、（その相互作用がＦｃＲｎの結合に類似しているようであるところの）プロテインＡとプロテインＧとの相互作用をも担っている。
【００１０】
免疫グロブリンの操作
先に討議したＦｃ仲介特性の多くは、天然又は人工的に構築された抗体において望ましいものであることができる。しかしながら、特に、細胞殺生、又はサイトカイン放出、及び得られた炎症が不適当であり、そして、不所望である場合もある。
【００１１】
しかしながら、等しく、特定のＦｃ仲介機能、例えば、長い血漿半減期を保持することが

望ましいかもしれない。
例えば、ヒトＩｇＧ４は補体を活性化せず、そしてヒトＩｇＧ２は高アフィニティーＦｃγＲＩレセプターに結合しないことが知られており、そしてそれ故、いくつかの状況下、これらは先に使用されてきた（ＴＮＦレセプター融合タンパク質はＩｇＧ４　Ｆｃを用いて作られた）。
【００１２】
しかしながら、ヒト・サブクラスは、たぶんＦｃγＲのいくつかの形態の存在に因り、全ての状況において、関連のＦｃエフェクター誘発機能又は補体活性化の全てを欠いていない。従って、例えば、ＩｇＧ４はある人々において抗体依存性細胞性細胞毒性（antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)）を誘発することができ、そしてＩｇＧ２はＦｃγＲＩＩａレセプターの１の対立遺伝子型に結合し、そしてまた補体を活性化する。
【００１３】
機能に決定的な残基を置換するために上記Ｆｃ配列を突然変異させるための他のアプローチが行われてきた。特定の標的残基が同定され、そして公表されてきた（Ｃｌａｒｋ　１９９７によるレビュー、前掲を見よ。）これらは、C_H ２ドメイン内の保存された部位に付着されたＮ－結合炭水化物、低ヒンジ領域内の特定の残基（例えば、ＥＬＬＧＧＰ配列）、及び３３１位にあるプロリン残基、及び３１８－３２２位にあるＥ－ｘ－ｋ－ｘ－ｋ配列を含む。最近の１例は、Cole et al (1997) Journal of Immunology 159, 3613-3621により開示されている。上記開示中、残基２３４、２３５、と２３７はアラニンに（又は２３５の場合、しばしばＧｌｕに）突然変異されている。しかしながら、これらは全て、ヒトＩｇＧにおいてこれらの位置における通常の残基であり、これ故、このような不適当なアミノ酸の存在は、Ｆｃをより免疫原性又は抗原性にすることができ、そしてまた特定の望ましいＦｃ機能の損失を導くこともできる。
【００１４】
再び、この戦略は、治療用の無糖化されたＣＤ３抗体の構築（Routledge et al, 1993 Eur J Immunol 23 : 403-411参照；UK PA 9206422.9をも参照）のために、そして阻害性ＣＤ１８抗体のために、使用されてきた。しかしながら、ここでの１の欠点は、この新たな組換え構築物が異常な配列をもち、そして外来物としてその免疫系により認識され、そして拒絶されることができるということである。無糖化された（ａｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ）抗体は、阻害性レセプターＦｃＲＩＩｂへの結合性をも欠いている。一方、この結合性の維持はいくつかの適用のために有利であることができる。
【００１５】
免疫グロブリンを修飾する他のアプローチであって、抗原ＣＤ５２についての結合アフィニティーをもつヒト化ＩｇＧ１抗体ＣＡＭＰＡＴＨ１Ｈのアロタイプの修飾について討議しているものが、ＷＯ９２／１６５６２（Lynxvale Ltd）中に開示されている。ＣＤ５２抗原は、ヒト・リンパ球及び単球上に存在し、そしてＴ及びＢ細胞リンパ腫及び白血病、臓器及び骨髄移植受容者の免疫抑制、そしてまたいくつかの自己免疫及び関連障害、例えばリウマチ様関節炎及び全身性脈管炎の治療のための治療剤として使用されてきた。
【００１６】
ＷＯ９５／０５４６８（Lynxvale Ltd）も、所望の結合性又は他のエフェクター作用をもつＩｇ（又は誘導体）のアロタイプの決定基の修飾について開示した。
以上から、所望の特性を保持又は強化しながら、不所望の効果を低減するようなＦｃ領域の操作を容易にするであろう方法又は物（材料）の提供が、本技術分野にとっての貢献となるであろうということが分かる。
【００１７】
本発明の開示
本願発明者らは、非天然のヒト擬似Ｆｃ配列を含むキメラ・ポリペプチドであるが、補体を活性化せず、又はＦｃγＲを通じての細胞毒性活性化を誘発しないものを作製するために、ヒトＩｇＧサブクラス配列の新規の組合せを使用した。同時に、特定の所望のＩｇＧ特性が保持された。例えば、上記ポリペプチドは、“非ヒト”アミノ酸を含有せず、そし

てそれ故、低減された免疫原性をもつようである。さらに、それらは、未だ、プロテインＡに結合し、このことは、ＦｃＲｎ（新生児Ｆｃレセプター）との相互作用を通して、ヒト胎盤を横切ることができるということと矛盾しない。

【００１８】

それにより上記配列が開発されたやり方、及び特定の証明された特性を、以下、より詳細に討議する。しかしながら、簡単に言えば、本願発明者らは、３つの異なるＩｇＧ配列（１、２、と４）に基づく多数の構築物を配合した。上記抗体の関連領域は、ホモロジーを共有するけれども、それらは、長さの点で正確には一致せず、それ故、天然配列からの活性を保持する誘導体配列を生成するプロセスを複雑にしている。構築した抗体を、モデル抗原系ＲｈＤ（Ｆｏｇ１）とＣＤ５２（ＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈ）の文脈においてそれらの対照親抗体と比較した。驚ろくべきことに、多数の配列を、上記親分子内には存在しない活性の必要な組合せを用いて、開発した。一般には、これらは、（一般に、２、３又は４アミノ酸）を含む１以上の領域又はブロックを含んでいた。そしてこれは、異なるサブクラスからの対応の領域と一致していた。着目の２つの特定の領域又はブロックは２３３－２３６と３２７、３３０、３３１であった。

【００１９】

従って、本願発明の第１の側面においては、（ｉ）標的分子に結合することができる結合ドメイン、及び（ii）ヒト免疫グロブリン重鎖の不変ドメインの全部又は一部に実質的に相同であるアミノ酸配列をもつエフェクター・ドメインを含むポリペプチド結合分子であって；上記結合分子が有意な補体依存性溶解、又は標的の細胞仲介破壊を誘発せずに標的分子に結合することができることを特徴とし、そして好ましくは、それにより、上記エフェクター・ドメインがＦｃＲｎ又はＦｃγＲＩＩｂ、より好ましくはＦｃＲｎとＦｃγＲＩＩｂの両者に特異的に結合することができる、前記結合分子が開示される。

【００２０】

ＦｃＲｎの特異的結合は、プロテインＡに特異的に結合することができる能力により証明されることができる。

従って、本願発明に係る結合分子は、（例えば、“ブロッキング”抗体の文脈において）改良された臨床特性をもつ。これは、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａとＦｃγＲＩＩＩについての低減されたアフィニティーをもつがプロテインＡ（そしてこれ故、ＦｃＲｎ、これ故、新生児の輸送及び高い半減期を許容する）及び／又はＦｃγＲＩＩｂに結合する能力を保持する、Ｆｃ由来エフェクター・ドメインを提供することにより達成される。従って、ＩｇＧ内のＦｃＲｎに結合することに責任を負う残基は、本願発明の分子内の天然Ｆｃ領域に関して修飾される必要はない。

【００２１】

一般に、（それがそれから得られるところの１のＦｃ領域に比較して）上記レセプターＦｃγＲＩについて上記エフェクター領域がもつところのアフィニティーにおける低下は、好ましい態様においては、１００倍以上のオーダーをもつことができる。先に討議した特定の低アフィニティー・レセプターについては、アフィニティーにおける低下は、より小さく、例えば、約２～１０倍であることができる。但し、最も好ましい態様においては、それは、５００倍程の高いものであることができるであろう。一般に、（以下により詳細に説明するように）化学発光アッセイにおける活性における対応の低下は、３０～３００倍程の高いものであることができる。この低下された補体活性は、５０倍のオーダーであることができる。ＡＤＣＣについての対応の数値は、より高く、例えば、１０，０００倍であることができる。しかしながら、当業者は、上記の（低下した）活性の組合せが、その正確な低下レベルに拘らず、特定の適用において未だ有益であることができるということを理解するであろう。

【００２２】

ＩｇＧ１／ＩｇＧ２とＩｇＧ１／ＩｇＧ４キメラが過去に調製されたけれども（例えば、Morgan et al (1995) Immunology 86 : 319-324、又はChappel et al (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 : 9036-9040、又はGreenwood et al (1993) Eur J Immunol 23 : 1098-

1104を参照のこと）、これらのいずれも、本願発明の結合分子の有する特性の組合せをもつことは示されていない。

【００２３】

上記結合分子のさまざまな働きは、例えば、以下に開示する方法、又はそれらに類似の方法を使用することにより、当業者により無理なく評価されることができる。例えば、ＦｃγＲ結合特性は、直接的に、又は例えば、単球の化学発光を誘発する無能力を通して、間接的に評価されることができる。

特に、（一般にＣ１ｑ分子についての低下したアフィニティーを通じてであろう）有意な補体依存性溶解を誘発する無能力は、補体成分の存在下で標的細胞からのＣＲ－５１放出により、例えば、（以下に説明するように）血漿の形態で、計測されることができ、それにより、上記結合分子は、５％未満の、好ましくは２％未満の特異的標的細胞溶解を引き起こす。

【００２４】

同様に、標的の細胞仲介破壊は、好適な細胞毒性細胞、例えば、（以下に説明するような）血液単核エフェクター細胞の存在下、標的細胞からのＣＲ－５１放出により評価されることができ、それにより上記結合分子は、５％未満、好ましくは２％未満の標的細胞溶解を引き起こす。

直接計測の代替手段として、機能性は、機能的免疫グロブリンにおける上記特性を阻害する能力により推定される。例えば、細胞の補体溶解に対して保護効果を提供することにより、又は（例えば、ＡＤＣＣにより）細胞を殺すことにより、又は感化された細胞に対する単球の応答を阻害することによる。

【００２５】

本願発明の上記側面の１の好ましい態様においては、上記エフェクター・ドメインは、ヒトＩｇＧ１、Ｇ２又はＧ４からのC_H ２配列に実質的に相同なアミノ酸配列であって、ＥＵナンバリング・システムに関して番号付けされた、言及する位置における以下の修飾（アミノ酸置換又は欠失）の中の１以上を含むものを含む（Kabat et al “Sequences of proteins of immunological interest”. Bethesda, US Dapartment of Health and Human Services, NIH, 1991）：

位置	アミノ酸
２３３	P
２３４	V
２３５	A
２３６	（残基なし）又はG
３２７	G
３３０	S
３３１	S

。

【００２６】

好ましい態様においては、上記置換は、２３３－２３６及び／又は３２７、３３０、３３１の“ブロック（ｂｌｏｃｋｓ）”において行われている。従って、C_H ２ドメイン内の突然変異された領域は、それに上記置換された残基が由来するところのサブクラスに１００％相同であり、それにより、上記領域が免疫系についてＢ細胞又はＴ細胞エピトープを提示するであろうという傾向を低下させるであろう。

【００２７】

上述の特徴をもつＩｇＧ１、ＩｇＧ２、又はＩｇＧ４に基づくいくつかの突然変異体免疫グロブリンが、調製されており、そして要求された特性をもつことが示されている。個々の残基の突然変異のいくつかが従来技術の結合分子内で作られたけれども、先に特定した組合せは、その達成された機能性の存在の故に、新規である。

【００２８】

上記結合分子の好ましい形態を、以下、詳細に討議する；

エフェクター・ドメイン
本ペプチドは、ヒト免疫グロブリンの不変領域、好ましくはＩｇＧのＣ－ドメインの全部又は一部に実質的に相同なアミノ酸配列をもつエフェクター・ドメインを含む。
【００２９】
ヒトＣ領域についての多くの配列が公表されている；例えば、Ｃｌａｒｋ（１９９７）前掲を参照のこと。ヒト免疫グロブリン重鎖についての他の配列は、ヒトＩｇγ－１鎖Ｃ領域については受託番号Ａ９３４３３、Ｂ９０５６３、Ａ９０５６４、Ｂ９１６６８、Ａ９１７２３、及びＡ０２１４６の下、ヒトＩｇγ－２鎖Ｃ領域については受託番号Ａ９３９０６、Ａ９２８０９、Ａ９０７５２、Ａ９３１３２、Ａ０２１４８の下、ヒトＩｇγ－４鎖Ｃ領域については受託番号Ａ９０９３３、Ａ９０２４９、Ａ０２１５０の下、そしてヒトＩｇγ－３鎖Ｃ領域については受託番号Ａ２３５１１の下、Ｌａｓｅｒｇｅｎｅソフトウェア（DNAStar Limited, London UK）を使用して、Ｓｗｉｓｓ　Ｐｏｒｔ及びＰＩＲデータベースから得られることができる。
【００３０】
ホモロジー（又は同一性、又は類似性）は、いずれかの便利な方法により評価されることができる。ホモロジーは、エードするヌクレオチド配列の又はコードされたアミノ酸配列のレベルにおいて存在することができる。“実質的に相同（ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ　ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ）”とは、含まれたアミノ酸配列が、対照免疫グロブリンと、少なくとも約５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％のホモロジー、最も好ましくは少なくとも約９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％のホモロジーを共有することを意味する。
【００３１】
類似性又はホモロジーは、本分野において標準的に使用されている、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403-10の、ＴＢＬＡＳＴＮプログラムにより定められ、かつ、決定されるようなものであることができ、そしてこれは、Wisconsin Package, Version 8, September 1994 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711）の一部である、好ましい標準的なプログラム、ＢｅｓｔＦｉｔであることができる。ＢｅｓｔＦｉｔは、２つの配列の間の類似性をもつ最高のセグメントの最適な整列を作り出す。最適な整列は、Smith and Watermanの局所ホモロジー・アルゴリズムを使用してマッチの数を最大化するようにギャップを挿入することにより見つけられる。
【００３２】
この評価は、本願発明の分子を認識するために、活性の必要な組合せを評価するとともに、当業者に無理なく行われることができる。
ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩＩａ、及びＦｃγＲＩＩＩｂについての低下したアフィニティーをもつことに加えて、“阻害性”レセプターＦｃγＲＩＩｂに結合する能力が上記エフェクター分子によりある程度保持又は所有されており、そして好ましくは、ＦｃγＲＩＩａレセプターについてそのアフィニティーよりも高く、そしてより好ましくは、それがそれに由来するところの親Ｉｇドメインのアフィニティーと同等のものであることが望ましい。
【００３３】
本願発明者により得られた結果は、発明者らが開発した結合分子が上記特性をもつことを示している。これまで、ＦｃγＲＩＩａとＦｃγＲＩＩｂへのＦｃ領域の結合が独立して操作されることができるであろうということは、本分野において認められていない。この能力は、上記結合分子の治療的潜在能力を増加させることにおいて（プロテインＡへの結合能力により示されるような）他の要求される機能を補償することができる。
【００３４】
特に、多くの刊行物が、ＦｃγＲＩＩｂが細胞プロセスの阻害において演じている重要な役割を強調してきた（Daeron et al, 1995 Immunity 3 (5) : 635-46 ; Van den Herik et al, 1995 Blood 85 (8) : 2201-11 ; Sarmay et al, 1996 Immunol Lett 54 (2-3) : 9

3-100 ; Fong et al, 1996 Immunol Lett 54 (2-3) : 83-91 ; Sarmay et al, 1996 J Biol Chem 271 (48) : 30499-504 ; Unkeless & Jin, 1997 Curr Opin Immunol 9 (3) : 338-43 ; Isakov, 1997 Immunol Res 16 (1) : 85-100 ; Hunter et al, 1998 Blood 91 (5) : 1762-8 ; Malbec et al, 1998 J Immunol 160 (4) : 1647-58 ; Clynes et al, 1999 J Exp Med 189 (1) : 179-85を参照のこと）。上記研究者らは、他のレセプターに架橋されるとき、ＦｃγＲＩＩｂが、他のレセプターからのシグナル伝達を阻害し、それによりＢ細胞活性化、肥満細胞脱顆粒化、及びマクロファージによる食作用の如きプロセスを阻害することができることを示した。

【００３５】

従って、上記活性を保持している本願発明の結合分子は、不所望の抗体－抗原（例えば、自己抗原又はアロ抗原）と競合し、そして競合的に阻害するだけでなく、例えば、Ｂ細胞活性化の阻害によるさらなる自己抗体又はアロ抗体の産生を防止することにより、上記プロセスを非競合的に阻害するために、使用されることができるであろう。上記阻害効果についての他の例示的適用を、アレルギー及び喘息治療（肥満細胞の脱顆粒の阻害）、並びに抗－ＲｈＤ分子（食作用の阻害）に関して、以下に討議する。

【００３６】

好ましくは、エフェクター・ドメインは、それ自体、ヒト免疫グロブリンの不変領域、より好ましくはＩｇＧのＣ－ドメインから得られる。

好ましくは、含まれるアミノ酸配列は、先に討議した修飾アミノ酸をもつ、ヒトＩｇＧ１、Ｇ２又はＧ４からのC_H ２配列（すなわち、凡そ残基２３１～３４０）に実質的に相同である。

【００３７】

最も好ましいC_H ２配列を図７中に示す。特にそれぞれ、Ｇ１Δａｂ、Ｇ２Δａ、又はＧ１Δａｃと命名されたものである。

上記配列の中のいずれかも、本願発明の分子内の、天然又は修飾C_H ３及び天然又は修飾ヒンジ領域、に加えて場合によりC_H １配列と、併合され（例えば、連続して配置され）ることができる。

【００３８】

しかしながら、エフェクター・ドメインの他の部分（又は上記分子の他のドメイン）が天然の配列を含むという要求は存在しないということが当業者に認められるであろう。特に、本明細書中に開示される配列修飾を、要求される活性が保持される限り、他のもの、例えば、上記刊行物から選ばれたものと併合することが望ましい。当業者は、（例えば、アミノ酸の付加、挿入、欠失又は置換により）さらに修飾されたエフェクター・ドメインを含む結合分子が本発明の範囲内にあることを理解するであろう。

【００３９】

特に好ましいものは、“無効アロタイプ（ｎｕｌｌ　ａｌｌｏｔｙｐｅ）”配列、例えば、アロタイプ残基が他のヒトＩｇＧサブクラス分子内に存在するものにマッチするように突然変異されているＩｇＧ重鎖由来配列（ＷＯ９２／１６５６２参照）であることができる。これは、いずれかの個体により外来物と見られる配列を真似ることができる。

【００４０】

結合ドメイン及び標的分子

上記ペプチド分子は、標的分子に結合することができる結合ドメインを含む。上記結合ドメインは、好ましくは他のポリペプチドであるであろうがいずれの標的（例えば、炭水化物、脂質（例えば、リン脂質）又は核酸）であることができる標的分子と相互作用する能力を有するであろう。好ましくは、上記相互作用は特異的であろう。結合ドメインは、上記エフェクター・ドメインと同じ源又は異なる源から得られることができる。

【００４１】

例えば、エフェクター・ドメインは一般に抗体から得られるが、結合ドメインは、他の分子、例えば、酵素、ホルモン、レセプター（細胞結合又は循環）、サイトカイン又は（抗体に特異的に結合する）抗原について特異性を有するいずれの分子からも得られることが

できる。
好ましくは、それは、抗体の全部又は一部あるいはその誘導体、特に抗体の天然又は修飾可変ドメインを含む。従って、本願発明に係る結合分子は、ゲッ歯類又はカメリデ（ｃａｍｅｌｉｄａｅ）（ＷＯ９４／２５５９１参照）由来の抗体の結合ドメイン及び先に討議したようなヒト免疫グロブリン重鎖を提供することができる。
【００４２】
同じく好ましいものは、１以上のタイプの結合ドメインをもの分子、例えば、２特異的抗体（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ９２／０９９６５参照）であることができる。これらの場合においては、１の“アーム（ａｒｍ）”が標的細胞に結合し、そして他のアームが第２細胞に結合して上記標的の殺生を誘発する。このような場合、所望の結果を妨害するさらなる細胞を他の方法で活性化するかもしれない、エフェクター部分に対するインパクトを最小化することが望ましい。この“アーム”自体（すなわち、結合ドメイン）は、以下さらに詳細に討議するように、Ｉｇドメイン（例えば、Ｆａｂ）に基づくか、又は融合タンパク質におけるような他のタンパク質からのものであることができる。
【００４３】
上記結合分子は、会合、例えば、共有結合その他（例えば、疎水相互作用、イオン相互作用、又はスルフィド橋を介してのリンク）において、２以上のポリペプチド鎖を含むことができる。例えば、それは、エフェクター・ドメインを含む重鎖とともに軽鎖を含むことができる。いずれかの適当な軽鎖を使用することができる。例えば、最も一般的なカッパ軽鎖アロタイプは、一般集団内のＫｍ（３）である。それ故、この一般的なカッパ軽鎖アロタイプを使用することが望ましい。なぜなら、その集団の比較的少数がそれを外来物として見るであろうからである。
【００４４】
典型的には、上記標的は、細胞上に存在する抗原、又はそれについて抗体が競合するところの可溶性リガンドをもつレセプターであろう。
これは、治療用標的として選択されることができ、これにより、例えば、それと競合し又はそれから不所望の抗体を追い出すために、先に討議した特性をもつ分子とそれを結合させることが望ましい。あるいは、細胞仲介破壊、抗体誘発炎症又は補体溶解を引き起こさずに、標的分子に結合すること自体が望ましい。等しく、エフェクター・ドメインは、主に、輸送及び／又は改良された血漿半減期の仲介において働くことができる。このような場合、結合ドメインと標的分子は、これらの品質から利益を受けるであろういずれかの系であることができる。
【００４５】
本願発明の結合分子が（いくつかの点で）不活性なＦｃ領域をもつ治療用抗体として使用されることができるであろうような適用の選択を以下に述べる：
１）胎児／新生児の血液細胞上の抗原性エピトープについての母親ＩｇＧアロ抗体との競合
胎児血液細胞のアロ免疫障害は、共通の病因をもつ。胎児赤血球、顆粒球又は血小板上の父親から受け継いだ抗原に対する、母親によるＩｇＧアロ抗体の合成が存在する。この後に、上記アロ抗体の胎盤を経由する輸送が続く。胎児又は新生児においては、関連細胞の循環レベルにおける臨床的に有意な降下を導くことができる、抗体被覆された胎児血液細胞の破壊が存在する。関連エピトープに対する治療用抗体であるが、破壊を誘発しないＦｃをもつものは、胎児細胞への結合について母親抗体と競合することができ、こうしてそれらの破壊を阻害する。
【００４６】
赤血球アロ抗原に対する抗体は胎児及び新生児の溶血性疾患を導く
最も重要な赤血球アロ抗原は、ＰｈｅｓｕｓとＫｅｌｌ血液型系内にある。ＲｈＤ抗原に因る溶血性疾患の発生率は生後の予防の導入以来劇的に低下したが、最初の妊娠の間の母親の敏感化（ｓｅｎｓｉｔｉｓａｔｉｏｎ）に因り未だに生じている。他のＲｈｅｓｕｓ抗原（Ｃ、ｃ、Ｅ、ｅ）も、Ｋｅｌｌ（Ｋ１）抗原に対する抗体がそうであるように、溶

血性疾患を引き起こすことができ、これは、さらに、胎児骨髄中の造血を弱める。

【００４７】

重度に罹患した胎児のための最近の治療法は、抗原陰性の赤血球の定期的な子宮内輸注から成る。非特異的免疫グロブリンの注入は、この症状において有効であると示されていない。新生児における貧血及び高ビリルビン血症は交換輸注及び／又は光線療法を要求することができる。（Ｆｏｇ－１と命名された）ＲｈＤ特異性をもつ不活性Ｆｃ構築物を使用した実験は、エフェクター・メカニズム（化学発光及びＡＤＣＣにより検出されるような単球の活性化）を誘発するそれらの失敗を証明し、そして重要には、ポリクローナル抗－Ｄを含有するヒト血清により誘発される化学発光及びＡＤＣＣを阻害することをも示した。ＡＤＣＣと化学発光（ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ）は、インビボにおける赤血球破壊を予想することが先に示されている。先に公表された研究は、ＲｈＤタンパク質上のエピトープについて、ヒト抗－Ｄ血清の大部分と競合するＦｏｇ－１の能力をも証明している。

【００４８】

血小板アロ抗原に対する抗体は胎児及び新生児アロ免疫血小板減少症を導く

最も関係の深い抗原は、ヒト血小板抗原（ＨＰＡ）－１ａである。ＨＰＡ－１ａ抗体は、３５０の正常妊娠の中の１と複合体を形成し、そして１２００の胎児中の１において重度の血小板減少症を導く。治療のための最近のオプションは、（０．５％／手順の胎児死亡のリスクを伴う）ＨＰＡ－１ａ陰性血小板の一週間の輸注、並びに変動し、かつ、予測できない効果をもつ、母親に与えられる高投与量の静脈内免疫グロブリン、である。ＨＰＡ－１ａは、血小板糖タンパクＩＩＩａ（ＧＰＩＩＩａ）上の単一のエピトープにより定められ、そしてこのエピトープを認識する一本鎖Ｆｖは、University of Cambridge Division of Transfusion Medicine (Griffin HM, Ouwehand WH. A human monoclonal antibody specific for the Leucine-33 (PA^{A1}, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. Blood 1995 ; 86 : 4430-4436)において入手可能である。ヒト血小板への、上記構築物に基づく抗体の結合は、ヒト抗－ＨＰＡ－１ａ－血清により阻害されることが示されている。この阻害は、最も重篤な病気に関係した、高力価の特異的抗体を含む血清について最も一貫していた。これは、組換え抗体と血清抗体が、血小板上の同一エピトープに結合することを示している。

【００４９】

上記の適用、及び以下のものにおいては、競合結合効果に加えて、本願発明の治療用抗体は、ＦｃγＲＩＩｂを通じて有益な阻害効果を誘発することもできる。

２）自己抗原上のエピトープについての自己抗体との競合

自己抗体仲介血液細胞破壊

温暖ＩｇＧ自己抗体による溶血性貧血と自己抗体による血小板減少血症は、血液細胞破壊の共有のメカニズムをもつ。両者において、自己抗体は、自己抗体の選択されたレパートリー（赤血球上のＲｈとＫ、及び血小板上のＧＰＩＩｂ／ＩＩＩａ、ＧＰＩｂ／ＩＸ／Ｖ）を標的にする。自己抗体の結合は、血液細胞の寿命を短くして、それぞれ、貧血と血小板減少血症を導く。赤血球自己抗体と血小板自己抗体はそれらの対応の抗原上の限定された数のＢ細胞エピトープを標的にしないようではない。これらのエピトープに対する組換え可変ドメイン抗体は、Ｖ遺伝子ファージ表示（ｄｉｓｐｌａｙ）技術により作製されることができる。関連エピトープに対する治療用抗体であるが不活性Ｆｃをもつものは、その自己抗原についてその患者血液細胞自己抗体と競合することができる、こうして、血液細胞の破壊を阻害するであろう。

【００５０】

グッドパスチャー（Ｇｏｏｄ　ｐａｓｔｕｒｅ’ｓ）症候群（抗－糸状体基底膜〔ＧＢＭ〕疾患）

これは、速く進行する糸状体腎炎の主原因であり、開始から数週間又は数ヶ月後の肺出血及び未明腎不全を導く。慣用の治療法は、それ自体、致死性の日和見真菌及びウイルス感染により合併されることができる、集中的な血漿交換及び免疫抑制療法と併合された透析

に依存する。この疾患が自己抗体に仲介され、そしてその自己抗原がIV型コラーゲン、ＧＢＭの主要成分に局在化されているという歴然とした証拠が在る。ＧＢＭ疾患における自己抗体がα３（IV）－鎖の非コラーゲン（ＮＣ１）ドメインに結合することが示されている。この配列をコードする遺伝子（ＣＯＬ４Ａ３）はクローン化され、そして配列決定されている。我々は、有害な抗－ＧＢＭ自己抗体の効果が、α３（IV）ＮＣ１上の免疫優性エピトープを標的にし、そして設計により、生物学的に不活性なＦｃドメインを備えている、モノクローナルＩｇＧ競合分子により中和されることができるということを仮定した。我々は、免疫優性なα３（IV）ＮＣ１エピトープに結合するが古典的なエフェクター作用を欠いた組換えキメラＩｇＧ抗体を開発する。我々は、これを達成することができる。なぜなら、ネズミ抗－α３（IV）ＮＣ１の可変ドメインをコードする遺伝子が開発されており、かつ、特徴付けられているからである（Pusey CD et al, Lab Invest 1987, 56 : 23-31及びRoss CN et al, Lab Invest 1996, 74 ; 1051-1059)。

【００５１】

再び、競合結合効果に加えて、本願発明に係る治療用抗体は、ＦｃγＲＩＩｂを通じて有益な阻害効果を誘発することもできる。

３）アレルギー及び喘息

アレルギーと喘息は、一般的な環境抗原、例えば、花粉からのタンパク質、ハウス・ダスト・ダニ、及び多くの他の一般的抗原の源であって、１例がハウス・ダスト・ダニ・ダーマトファゴイデス・プテロニシナス（Dermatophagoides pteronyssinus）のＤｅｒ　Ｐ１タンパク質であるものに対する不適当な免疫応答から生じる。罹患した個体は、特にＩｇＥクラスの高レベルの免疫グロブリンを作り出す。これらのＩｇＥ抗体は、肥満細胞及びエオシン好性白血球上の高アフィニティーＦｃ－エプシロンＲＩレセプターに結合することができる。アレルゲンによる、レセプター結合ＩｇＥの架橋形成は、細胞と脱顆粒化の活性化をもたらす。これは、アナフィラキシー反応の結果として重度の兆候又はさらには死を引き起こすことができる多数の炎症仲介物質を放出する。ブロッキング抗体の２つの作用機構が予見されることができるであろう。第１に、不活性Ｆｃ領域をもつＩｇＧ抗体は、ＩｇＥへのアレルゲン結合について競合することができるであろう。これは、ＩｇＥの架橋を妨害し、そしてこれ故細胞の活性化を防止するであろう。このメカニズムについては、不活性ＦｃをもつＩｇＧ抗体は、ＩｇＥと、アレルゲンの結合について直接的に競合しなければならないであろう。

【００５２】

第２の重要なメカニズムは、ＦｃγＲＩＩｂレセプターを通じてのネガティブ・シグナリングの役割を包含するであろう。ＦｃガンマＲＩＩＢとＦｃエプシロンＲＩの架橋は、通常、ＦｃエプシロンＲＩレセプターだけが架橋されるときに見られる活性化シグナルの阻害をもたらす。従って、ＦｃガンマＲＩＩｂについてのＦｃ結合能力及びアレルゲンについての抗原特異性をもつＩｇＧ抗体の導入は、ＩｇＥ被覆された肥満細胞とエオシン好性白血球の活性化の阻害をもたらすことができるであろう。このために、また、ＩｇＧ抗体は、それが、両者が同時にアレルゲンに結合することができるようにＩｇＥに対する異なる部位によりアレルゲンに結合する場合に、その強い負の影響を仲介するであろう。

【００５３】

４）炎症性疾患、例えば、クローン（Ｃｒｏｈｎ’ｓ）病

Ｔ－リンパ球、好中球、及びＮＫ細胞を含む、免疫細胞（白血球）の慢性状態の活性化の結果として病因を生じさせるようである、免疫系の多数の障害がある。この慢性活性化は、通常、罹患組織内への活性化細胞の連続的転移による炎症状態として見られる。組織内へ転移するためには、細胞は炎症仲介物質を受容し、かつ、それに応答し、そして次に、接着分子が血管壁をライニングする細胞にまず接着できるようにし、そして次に血管壁の細胞間と組織内に転移することができるように、接着分子を調節しなければならない。白血球の表面上の接着分子又は血管壁をライニングする活性化上皮細胞上の対応リガンドをブロッキングすることにより、この炎症サイクルを停止させることができるはずである。このような活性化抗原はＶＡＰ－１であり、そしてこの分子に結合する不活性Ｆｃをもつ

抗体は、炎症部位における白血球接着と転移を防いで慢性活性化のサイクルを壊すはずである。

【００５４】

５）リガンド／レセプター相互作用の阻害

鎌状赤血球疾患

グルタミン酸がバリンで置換されていることを特徴とするヒト・ヘモグロビンの変異についてのホモ接合性（ＨｂＳＳ）は、慢性溶血とその分子が脱酸素状態におけるタクトイド（ｔａｃｔｏｉｄ）形成を経験する傾向を導く。これは、局在化領域内の鎌状“危機”を導く微小循環において鎌状形態を採用する赤血球を導く。これらは、（骨、肺、脳又は腹内）で血栓性であり、再生不良性、溶血性であり、又は脾臓及び肝臓中の塊状の赤血球の壊死巣分離（ｓｅｑｕｅｓｔｒａｔｉｏｎ）に関連することができる。上記の危機の間、赤血球は内皮細胞に接着すると推定される。この接着プロセスは、それらの対応リガンドとのいくつかのレセプターの相互作用に基づく。主要な接着経路の中の２は、Ｌｕｔｈｅｒａｎとラミニン（ｌａｍｉｎｉｎ）の間の相互作用、及びトロンボスポンジン（ｔｈｒｏｍｂｏｓｐｏｎｄｉｎ）と未定の赤血球膜脂質の間の相互作用である。動物実験において、我々は、トロンボスポンジンに対する組換えヒト可変ドメイン抗体が内皮細胞への鎌状赤血球細胞の接着を減少させるという証拠を得た。我々は、ラミニンとの相互作用を遮断するルテラン（Ｌｕｔｈｅｒａｎ）のラミニン結合ドメイン（膜近位ドメイン）に対する同様の組換え可変ドメイン抗体が、Ｖ遺伝子ファージ・ディスプレイにより開発されることができると推定する。これらの可変ドメイン抗体断片は、赤血球破壊を引き起こさずに、内皮細胞への鎌状赤血球の接着を妨害することができる治療用抗体を作製するために、不活性Ｆｃドメインを提供されることができる。

【００５５】

血小板コラーゲン・レセプターの抗体仲介ブロッキング

我々は、２つのレセプターが、内皮下コラーゲンによる血小板活性化、血栓開始事件；作用において主に接着と我々は見るところの、インテグリン$\alpha_2\beta_1$（血小板糖タンパクＩａ／ＩＩａ）、並びに活性化、先行する分泌及び凝集にとって不可欠である、非インテグリン糖タンパク質ＶＩ（ＧｐＶＩ）にとって決定的であるという実質的な証拠をもっている。組換えヒト抗体は、各レセプター内の異なるドメインを認識するＶ遺伝子ファージ・ディスプレイにより作製されることができ、そしてこれらは、コラーゲン・ベースの抗血栓療法のための不活性Ｆｃドメインをもつリード抗体を作製するために使用されることができる。これらは、冠状血栓症、血管形成術後の再狭窄及びバイパス移植に関連する血栓合併症の軽減において使用されることができる。

【００５６】

６）モノクローナル抗体は、細胞の働きを遮断するためにときどき使用され、例えば、ＯＫＴ３は、Ｔ細胞レセプターを遮断することによりＴ細胞を免疫抑制するために使用され、そしてＣＤ１８抗体は、インテグリン分子を通じての細胞－細胞接着を防止するために使用される。しかしながら、ＦｃレセプターへのＦｃの結合は、サイトカイン放出と炎症の刺激を通じて重度の副作用を誘発することができる。

【００５７】

７）抗体Ｆｃ領域は、長い生物学的半減期をもつ融合分子を与えるために他の組換えタンパク質にときどき付着される。従って、ＴＮＦレセプターは、可溶性ＴＮＦの効果を阻害する分子を形成するためにヒトＩｇＧ４　Ｆｃに付着されており、そしてＣＴＬＡ４は、ＩｇＧ　Ｆｃとの融合タンパク質として作られており、そして細胞表面上のＢ７コレセプター（ＣＴＬＡ４のためのリガンド）分子を通じてのシグナリングをブロックするために使用されている。しかしながら、再び、融合タンパク質のＦｃによるサイトカイン誘発は望ましくない。

【００５８】

特に討議される場合、先に討議された適用のタイプに適当なＶドメイン、又は他の結合領域は、当業者に周知となるであろう。例えば、ＣＤ３結合ドメイン（例えば、ＹＴＨ１２

．５）は、Routledge et al (1981) Eur J Immunol 21, 2717-2725、及びBolt et al (1993) Eur J Immunol 23, 403-411により開示されている。ＣＤ５２結合ドメイン（例えば、ＣＡＭＰＡＴＨ－１）はRiechmann et al (1998) Nature 322, 323-327により開示されている。ＶＡＰ－１結合ドメインは、Salmi et al (1993) J Exp Med 178 : 2250-60、及びSmith et al (1998) J Exp Med 188 : 17-27により開示されている。Ｄｅｒ　ｐ　Ｉドメイン（例えば、２Ｃ７）は、McElveen et al (1998) Clin Exp Allergy 28, 1427-1434により開示されている。

【００５９】

従って、Ｆｃレセプターに結合せず、そして殺生を誘発しない、かつ、補体を活性化しないが標的分子に結合する、結合分子は、副作用を最小化するために上記実施例の全てにおいて使用されることができるであろう。特に、このような“ブロッキング”抗体は、上記１～５の症状において導入されることができるであろうし、そして天然抗体による不所望の破壊を防止することができるであろう。同一ブロッキング・タイプのＦｃ領域は、上記６におけるＣＤ３又はＣＤ１８抗体の如き組換え抗体のための又は上記７における融合のためのＦｃとしての、使用のために選ばれるＦｃ領域であろう。

【００６０】

上記結合及びエフェクター・ドメインは、いずれかの好適な方法により併合されることができる。例えば、ドメインは、側鎖を通して共有結合されることができる。あるいは、システイン残基の化学的還元により生じるフルフヒドリル基は、抗体ドメインを架橋するために使用されてきた（Rhind, ＳＫ (1990) ＥＰ 0385601 Cross-linked antibodies and processes for their preparation）。最終的に、炭水化物基の化学的修飾は、架橋目的のための反応性基を生成するために使用されてきた。これらの方法は、当業者に利用可能な標準的な技術である。それらは、結合ポリペプチドが非タンパク質部分又は基を含む態様において、特に適用されることができる。

【００６１】

一般に、融合タンパク質の形態で上記結合分子を発現させるために組換え技術を使用することがより適当である。このアプローチを使用する方法及び材料は、以下に述べるように、本願発明のさらなる側面を形成する。

核酸

本願発明の１の側面においては、上記のような結合分子をコードする核酸が開示される。

【００６２】

本願発明に係る核酸配列は、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、（イントロンを含む）ゲノムＤＮＡ、及び修飾核酸又は核酸アナログ（例えば、ペプチド核酸）を包含することができる。ＤＮＡ配列が、例えば、図面を参照して、特定されるとき、別段の定めなき場合、それが生じる場合、ＴがＵで置換されるＲＮＡ等価物が包含される。

【００６３】

本願発明に係る核酸分子は、それらの天然環境から単離及び／又は精製されて、実質的に純粋又は均質な形態で、又は起源種の他の核酸を含有しないで又は実質的に含有しないで、提供されることができる。本願明細書中に使用されるとき、用語“単離された”とは、上記可能性の全てを包含する。

上記核酸分子は、全体的に又は部分的に合成されることができる。特に、天然において存在しない（隣接して生じない）核酸配列が連結されている又は他の方法で人工的に併合されているという点で、それらは組換えであることができる。あるいは、それらは、例えば、自動化された合成装置を使用して、直接、合成されたものであることができる。

【００６４】

さらなる側面においては、上記核酸配列を含む、核酸構築物、例えば、複製可能なベクターが開示される。

本願発明に係る核酸を含むベクターは、特に、そのベクターが、そのゲノム内への組換えのための細胞内に上記核酸を導入するために使用される場合、プロモーター又は他の調節配列を含む必要はない。

【００６５】
好ましくは、上記ベクター内の核酸は、宿主細胞、例えば、微生物（例えば、細菌、酵母、糸状菌）又は真核（例えば、昆虫、植物、哺乳動物）細胞内の転写のための、適当なプロモーター又は他の調節要素の制御下にあり、そしてそれに作用可能な状態で連結される。
特に、上記ベクターは、宿主における又は宿主細胞の選択を可能にするための遺伝子（例えば、ｇｐｔ）、及びその宿主にとって適当な１以上のエンハンサーを含むことができる。
【００６６】
上記ベクターは、多数の宿主内で働く２作用性発現ベクターであることができる。ゲノムＤＮＡの場合、これは、それ自身のプロモーター又は他の調節要素を含むことができ、そしてｃＤＮＡの場合、これは、宿主細胞内での発現のための、適当なプロモーター又は他の調節要素の制御下にあることができる。
“プロモーター”とは、下流に（すなわち、２本鎖ＤＮＡのセンス鎖について３’方向）に作用可能な状態で連結されたＤＮＡの転写を、それから開始させることができるところのヌクレオチド配列をいう。プロモーターは、場合により誘導プロモーターであることができる。
【００６７】
“作用可能な状態で連結された”とは、プロモーターから開始されるべき転写のために、同一核酸分子の一部として連結され、好適に配置され、かつ、配向されていることを意味する。プロモーターに作用可能な状態で連結されたＤＮＡは、そのプロモーターの“転写開始調節Ｆ”にある。
従って、本願発明のこの側面は、本願発明により提供されたヌクレオチド配列に作用可能な状態で連結されたプロモーターを含む、遺伝子構築物、好ましくは複製可能なベクターを提供する。
【００６８】
一般的に言えば、当業者は、組換え遺伝子発現のために、ベクターを構築し、そしてプロトコールをデザインすることを十分にすることができる。好適なベクターであって、プロモーター配列を含む適当な調節配列ターミネーター断片、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、そして適宜、その他の配列を含むものが、選ばれ又は構築されることができる。さらに詳細には、例えば、Molecular Cloning : a Laboratory Manual : 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。
【００６９】
核酸の操作、例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、細胞内へのＤＮＡの導入、及び遺伝子発現、並びにタンパク質の分析のための多くの知られた技術及びプロトコールが、詳細に、Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992中に記載されている。Sambrook et al.とAusubel et al.の開示を本願明細書中に援用する。
【００７０】
宿主細胞及び方法。
先に定義した発現ベクターにより形質転換された細胞も本願発明に包含される。上記結合分子を含有する細胞培養物（好ましくはゲッ歯類）及び、細胞培養産物も提供される。
本願発明に係る結合分子の製法であって：
（ｉ）結合ドメインをコードする核酸を、エフェクター・ドメインをコードする核酸と併合して、核酸構築物を形成し；
（ii）好適な宿主細胞内での上記構築物の発現を生じさせ又は可能にする、
を含むものも提供される。
【００７１】
構築物を製造するための併合は、当業者に知られた便利な方法、例えば、断片（例えば、

制限断片）の連結又は例えば、ＰＣＲを使用した１以上の増幅工程における異なる鋳型の使用であることができる。
抗体（そしてこれ故、結合ドメイン）を製造する方法は、好適な標点タンパク質又はその断片による哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ又はサル）を免疫化することを含む。抗体は、本分野に知られたさまざまな技術を使用して免疫感作された動物から得られることができ、そして、好ましくは、着目の抗原への抗体の結合を用いてスクリーニングされるかもしれない。
【００７２】
例えば、ウエスタン・ブロッティング技術又は免疫沈降を使用することができる（Armitage et al, 1992, Nature 357 : 80-82）。
キメラ抗体のクローニング及び発現は、ＥＰ－Ａ－０１２０６９４及びＥＰ－Ａ－０１２５０２３中に記載されている。
エフェクター・ドメインをコードする核酸は、本願の開示に照らして、位置指定突然変異誘発：例えば、本願明細書中又は公表された刊行物中に開示された方法（例えば、ＷＯ９２／１６５６２又はＷＯ９５／０５４６８、両者Lynxvale Ltdを参照のこと）により、作られることができる。
【００７３】
他の側面
標的分子への第２結合分子の結合を、防止し、阻害し、又は他の方法で妨害するための、本願発明の結合分子の使用も、提供される。これは、治療的に関連のある標的抗原又は細胞からの抗体との競合、又は置替を含むことができる。
本願発明は、組換えにより作られるかどうかに拘らず、上記のような結合分子を含む試薬をも提供する。
【００７４】
本願発明は、上記のような結合分子に加え、医薬として許容される担体を含む医薬製剤をも提供する。
本願発明は、上記医薬製剤を、患者に、又はその後その患者に戻されるところの、患者から取り出されたサンプル（例えば、血液サンプル）に、投与することを含む、患者の治療方法をも提供する。特に、以下の疾患：移植片対宿主疾患；宿主対移植片疾患；臓器移植拒絶；骨髄移植拒絶；自己免疫；アロ免疫；アレルギー；慢性又は急性の炎症状疾患の治療方法が提供される。
【００７５】
本願発明は、上記のような結合分子をコードする核酸の発現を生じさせ又は可能にして、それにより上記結合分子が患者においてインビボにおいてその効果を発揮することを含む、患者の治療方法をも提供する。一般に、発現は患者内で生じ、その患者が出生前の胎児である特別な状況下では、その患者の母親内で、生じるであろう。
【００７６】
免疫応答を修飾するための医薬、特に先に討議した疾患の治療のための医薬の製造における上記結合分子の使用も提供される。
本願発明がさらに詳しく理解されるために、これから、より詳細に、限定によらず例示のみを目的として、実施例を記載する。本願発明の範囲内にある他の態様は、上記実施例に照らして、当業者に想到されるであろう。
一般的材料および方法
発現ベクターの構成
IgG1定常部のための出発点は、変性されたポリリンカーを含むベクターM13tg131のバージョン(version)におけるアロタイプG1m（1,17）のヒトIgG1定常部遺伝子であった（クラーク(Clark)、M.R.：WO 92/16562）。かくして2.3kbのIgG1挿入断片は、5'末端にBamHI部位を有し、BamHI部位に隣接してHindIII部位を含む。ポリアデニル化のシグナルの下流にある3'末端では、以下の部位が5'から3'への順序で生じる：SphI、NotI、BglII、BamHI。ヒトIgG2定常部遺伝子は、M13tg131におけるHindIII－SphIフラグメントとして得られ、Hin

dIII部位は、HindIIIで消化し、垂下がっている末端を満たし、かつ末端を共に再び連結することによって壊された。このベクターのSalI－SphIフラグメントはクローン化されて、上記したIgG1ベクターにおいて等価のフラグメントを置き換えた。ヒトIgG4定常部遺伝子は、M13tg131においてHindIII－SmaIフラグメントとして得られ、HindIII部位は壊された。SmaI部位は、CH3エキソンの3'末端とポリアデニル化部位との間に生じるので、ポリアデニル化部位は、IgG1ベクターからのSmaIフラグメントを加えることによって修復され、これは、IgG1遺伝子における等価のSmaI部位と、ポリリンカーにおける遺伝子の下流のSmaI部位との間からのDNAを含む。

【００７７】

最初の手順は、変異体エキソン配列の交換を容易にするために、CH1およびヒンジエキソンの間にXbaI制限部位を、ヒンジおよびCH2エキソンの間にXhoI部位を、かつCH2およびCH3エキソンの間にKpnI部位を導入することであった。これは、予め行われたIgG1およびIgG4遺伝子の操作と同様であった（グリーンウッド(Greenwood), J.,クラーク(Clark), M.およびワルドマン(Waldmann), H. (1993)ヒトIgG抗体エフェクター機能に含まれる構造モティーフ(Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions)。Eur. J. Immunol. 23, 1098-1104）。

【００７８】

テンプレートDNAを提供するために、E.coli RZ1032を、上記したM13で感染させ、ssDNAを製造した。この株は、dut⁻ung⁻であるので、製造されたssDNAは、チミジンの代わりに幾らかのウリジンを含まなければならない。

変異を導入するために使用したオリゴヌクレオチドは次のようであった：

ヒンジおよびCH2エキソンの間

MO10 5' GGA TGC AGG CTA CTC GAG GGC ACC TG 3'

CH2およびCH3エキソンの間

MO11 5' TGT CCA TGT GGC CCT GGT ACC CCA CGG GT 3'

CH1およびヒンジエキソンの間

MO12 5' GAG CCT GCT TCC TCT AGA CAC CCT CCC T 3'。

制限部位に下線を引いてある。

【００７９】

70mMのTris HCl pH7.6中の25 pmolのオリゴヌクレオチドおよび5uの T4ポリヌクレオチドキナーゼ(nbl)、10 mMの$MgCl_2$、100mMのKCl、5 mMのDTT、0.5mg/ml BSA、1mMのATPを含む50μl反応で、オリゴヌクレオチドをリン酸化した。反応は、37℃で1時間インキュベートし、70℃で５分間加熱した。

変異原性のオリゴヌクレオチドをテンプレートDNAに対してアニールするために、500ngのウリジン含有DNAおよび1pmolの各リン酸化されたオリゴヌクレオチドを、20μlの40mM Tris HCl pH7.5、20mMの$MgCl_2$、50mMのNaCl中で80℃にて５分間インキュベートし、そして37℃にゆっくりと冷却させた。同じ緩衝液を用いて体積を30μlに増加させ、DTTを加えて7mMに、ATPを1mMに、ならびに、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPをそれぞれ250μMにした。5uの T7 DNAポリメラーゼ（変性されていない、ユナイテッドステイツバイオケミカル(United States Biochemical)）および0.5uのT4 DNAリガーゼ（ギブコ(Gibco) BRL）を加え、反応を室温で16時間インキュベートして、変異体鎖を合成した。DNAをエタノール沈殿させ、50μlの20mM Tris HCl pH8.0、0.1mMのEDTA、1mMのDTT、0.1mg/mlのBSAに溶解し、1uのウラシルDNAグリコシラーゼ（ニューイングランドバイオラブス(New England Biolabs)）を加えた。37℃で２時間インキュベートした後、50μlの400mM NaOHを加え、反応を室温に５分間保持して、DNAのテンプレート鎖を断片化した。DNAをエタノール沈殿させ、H_2Oに溶解し、E.coli TG1へと形質転換した。複製形(RF)DNAが、得られるM13クローンの選択のために作られ、必要とされるXbaI、XhoIおよびKpnI制限部位を含むクローンを見つけるために消化された。IgG1およびIgG4ベクターのために適当なクローンが得られたが、MO12は、IgG2ベクターにおいてミスアニールであると思われたので、このオリゴヌクレオチドなしで（CH1およびヒンジエキソンの間の部位はこれらの実験のために必要でなか

ったので）IgG2について変異誘発を繰り返した。各ベクターについて、エキソンのDNA配列を、配列決定によって確認した。

【００８０】

アミノ酸位置327、330および331におけるCH2の変化（Δa変異）は、次のオリゴヌクレオチドを用いて導入されるべきものであった：-

MO22BACK（コード鎖）：

5' TCT CCA ACA AAG GCC TCC CGT CCT CCA TCG AGA AAA 3'

MO22（相補鎖）：

5' TTT TCT CGA TGG AGG ACG GGA GGC CTT TGT TGG AGA 3'

アミノ酸位置233～236におけるCH2の変化（ΔbおよびΔc変異）は、次のオリゴヌクレオチドを用いて導入されるべきものであった：-

MO7BACK（コード鎖およびエンコードΔc変異）：

5' TCC TCA GCA CCT CCA GTC GCG GGG GGA CCG TCA GTC 3'

MO21（相補鎖およびエンコードΔb変異）：

5' GAC TGA CGG TCC CGC GAC TGG AGG TGC TGA GGA 3'

変異は、オリゴヌクレオチドMO11およびMO10BACKをまた必要とするオーバラップ拡張(extension) PCRによって導入されるべきものであった：

5' CAG GTG CCC TCG AGT AGC CTG CAT CC 3'。

XhoI制限部位が下線を引かれている。

【００８１】

Δa変異のために、PCRの第１組は、MO22とMO10BACKで、かつMO22BACKとMO11で増幅した、IgG1およびIgG2テンプレートを使用した。ΔbおよびΔc変異のために、PCRの第１組は、MO21とMO10BACKで、かつMO7BACKとMO11で増幅した、IgG1およびIgG4テンプレートを使用した。最終生成物において、MO21で開始した鎖に由来するDNAはΔb変異を有し、MO22BACKに由来するDNAはΔc変異を有する。各PCRは、50μlの10mM Tris HCl pH8.85中の約30ngのM13tg131＋定常部ssDNA、25pmolの各オリゴヌクレオチドおよび1uのPwo DNAポリメラーゼ（ベーリンガーマンハイム(Boehringer Mannheim)）、25mMのKCl、5mMの$(NH_4)_2SO_4$、2 mMの$MgSO_4$ならびに250μMの各dATG、dCTP、dGTPおよびdTTPを含んでいた。反応を、94℃で30秒間；50℃で30秒間；72℃で60秒間、次いで72℃で5分間の14サイクルに供して、終わらせた。期待した大きさの生成物DNAを示すバンドを、低融点アガロースから削り取り、100μlのH_2O中に溶かした。各変異について、２つの初期のPCR生成物を、オーバーラップ拡張PCRによって一緒に結合した。溶解したゲルスライスの全部で約４μlを、初期PCR生成物が等モル量であるように、25pmolの各MO10BACKおよびMO11および上記したような他の成分と混合した。アニール温度を50℃から48℃に下げたこと以外は上記したようにして、18サイクルにわたってPCRを行った。全部のCH2エキソンを含む、得られた生成物を精製し、XhoIおよびKpnIで消化した。上記したように余分の(extra)制限部位を含む、変異させたM13tg131＋定常部ベクターのRF DNAを、XhoIおよびKpnIで消化して存在するCH2 DNAを除去し、変異体CH2領域を連結した。DNA試料をE.coli TG1へ形質転換した。典型的なクローンのDNAを配列決定して、正確に変異された定常部を同定した。

【００８２】

ΔaおよびΔbの両方またはΔcを有するIgG1ベクターを得るために、Δa変異を示すDNAを、上記したようにΔbおよびΔc変異を導入するための第２ラウンドのPCRのためにテンプレートとして使用した。

IgG1、IgG2およびIgG4野生型および変異した定常部遺伝子を、BamHI‐NotIフラグメントとしてRF DNAからそれぞれ摘出し、変性されたCAMPATH Hu4VH HuIgG1 pSVgptベクターへとクローン化して（クラーク(Clark), M.R.：上記したようなリンクスベール結合分子(Lynxvale Binding Molecules as above)）、存在する定常部を置き換えた。得られるベクターは、設計されたpSVgptCAMPATHHu4VHHuIgG1Δa等であった。ベクターはまた、哺乳動物細胞における選択を可能にするためのgpt遺伝子、ネズミ免疫グロブリン重鎖エンハンサーおよびCAMPATH-1 Hu4VH 可変領域DNAを含み、それで、哺乳動物細胞に発現されること

ができる完全な重鎖遺伝子を有する。CAMPATH-1のヒトに適応された(humanized)軽鎖遺伝子が、発現ベクターCAMPATH HuVL pSVneoに存在する（ライヒマン(Reichmann), L., クラーク(Clark), M.R., ワルドマン(Waldmann), H.およびウィンター(Winter), G. (1988) Nature 332, 323-327）。

【００８３】

Fog1可変領域DNA（バイ(Bye), J.M., カーター(Carter), C., クイ(Cui), Y., ゴリック(Gorick), B.D., ソングシビライ(Songsivilai), S., ウィンター(Winter), G., ヒューズ-ジョーンズ(Hughes-Jones), N.C., およびマークス(Marks), J.D. (1992)ヒトモノクローナル抗‐Rh(D)抗体の生殖細胞系列可変領域遺伝子セグメント派生体(Germline variable region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rd(D) antibodies), J. Clin. Invest. 90, 2481-2490）が、ベクターpHEN1に得られた。それらは、次のオリゴヌクレオチドを用いて、PCRによって増幅された：-

FOG1VHBACK 5' TCC ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTG CAT CTA CAG CAG 3'
FOG1VHFOR 5' GAG GTT GTA AGG ACT CAC CTG AGG AGA CGG TGA CCG T 3'
FOG1VKBACK 5' TCC ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG 3'
FOG1VKFOR 5' GAG GTT GTA AGG ACT CAC GTT TGA TCT CCA GCT TGG T 3'

プロモーターおよびシグナルペプチドをエンコードするDNAを含むベクターM13VHPCR1（オーランディ(Orlandi), R., グッソー(Gussow), D.H., ジョーンズ(Jones), P.T.およびウィンター(Winter), G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833）における挿入物の5'部分を、ユニバーサルM13逆プライマー(universal M13 reverse primer)およびVO3：

5' GGA GTG GAC ACC TGT GGA GA 3'

を用いて増幅し、DNA（M13VHPCR1におけるV_Hの3'、かつV_H‐C_Hイントロンの5'末端を示している）をユニバーサルM13 -40プライマーおよびVO4：

5' GTG AGT CCT TAC AAC CTC TC 3'

を用いたPCRによって得た。DNAのこれら２つのセグメントを、上記したようにして、オーバーラップ拡張PCRによって、Fog-1 V_HおよびFog-1 V_K増幅したDNAの両方に連続して結合した。Fog-1 V_Hに対して内部のBamHI制限部位は、エンコードされたアミノ酸を変えることなしに認識部位を除去したオリゴヌクレオチドを用いて同じ方法によって欠失された。完全なPCR生成物を、HindIII‐BamHIフラグメントおよびそれらの確認されたDNA配列としてM13mp19へクローン化した。

【００８４】

Fog-1 V_Hを含むHindIII‐BamHIフラグメントを使用して、上記したpSVgptベクターにおいてCAMPATH-1 V_Hを含むフラグメントを置き換え、設計された発現ベクター、pSVgptFog1VHHuIgG2等を与えた。IgG1ベクターについて、定常部DNAの5'末端での余分の(extra)HindIII制限部位は、HindIII‐BamHI可変領域フラグメントを簡単に交換することが可能ではなかったことを意味した。その代わり、関連したpSVgptCAMPATHHu4VHHuIgG1ベクターを、HindIIIで消化した。HindIII部位を欠失し、BamHI部位を加えるように設計されたリンカーを、切断末端に連結した。次に、DNAをBamHIおよびNotIで消化し、それで、定常部を分離することができ、これらはpSVgptFog1VHHuIgG2へクローン化されてIgG2定常部を置き換えた。

【００８５】

Fog-1 V_Kを含むHindIII‐BamHIフラグメントを、すでにネズミ免疫グロブリン重鎖エンハンサーおよびヒトκ定常部遺伝子を含むベクターpSVhyg-HuCK（オーランディ(Orlandi)ら、1989）へ移した。得られる発現ベクターは、pSVhygFog1VKHuCKと呼ばれた。

抗体の製造

10μgの各重鎖発現ベクターおよび20μgの関連する軽鎖発現ベクターを、PvuIでの消化によって線状にし、50μlのH_2O中で合わせた。非分泌ラット骨髄腫細胞系の細胞（YB2/0）を、５％ウシ胎児血清(FBS)を有するイスコブ(Iscove)の変性ダルベコー(Dulbecco)培地(IMDM)中で、半集密状態(semi-confluency)まで増殖した。10^7細胞を遠心分離によって集め、0.5mlの培地に再懸濁し、ジーンパルサーキュベット(GenePulser cuvette)（バイオ

ラッド(BioRad)）に移した。DNAを加え、混合物を氷上で５分間インキュベートした。細胞は、960μF／170Vのパルスを１回与えられ、氷に15分間戻された後、20mlのIMDM＋10％FBSのフラスコ中に置かれた。37℃にて、5％CO_2で、加湿した大気中でインキュベートした。24時間後、体積を２倍にし、ミコフェノール酸を添加して0.8μg/mlに、かつキサンチンを添加して250μg/mlにすることによって、培地を選択的にした。細胞を、２つの96－ウエルプレートに一定分量ずつ分けた。選択を適用後約18日に、コロニーが見えるようになり、上清を、ELISAによってIgGの存在についてアッセイした。簡単には、ミクロタイタープレートのウエルをヤギ抗－ヒトIgG（Fc-特異的抗体（シグマ(Sigma)））で被覆し、次いで、上清の５倍希釈でインキュベートした。結合した抗体を、HRPO－結合したヤギ抗－ヒトκ抗体（セララブ(Seralab)）でインキュベートし、o-フェニレンジアミン基質でのアッセイを展開することによって、検出した。最高量の抗体を含むウエルからの細胞を展開し、ストックを低温保存した。

【００８６】

最高量のAbを分泌する細胞系を500mlのIMDM＋２％FBS中に展開して、抗体精製のための飽和した上清を与えた。上清を遠心分離によって透明にし、0.1M Tris HCl pH8.0にした。プロテインA－アガロース（シグマ(Sigma)）を加え、混合物を4℃で16時間撹拌した。アガロースビーズをカラムに集め、0.1M Tris HCl pH8.0で、次いで10mM Tris HCl pH8.0で洗浄した。抗体を、1ml分量の0.1Mグリシンp H3.0を用いて、1M Tris HCl pH8.0の100μl試料中へと溶出し、有意量のタンパク質を含む画分を、A_{280nm}の読みから同定した。これらの画分をPBSに対して透析し、フィルター滅菌し、A_{280nm}再測定をして、およその抗体濃度を得た（濃度＝A_{280nm}x0.714mg/ml）。

【００８７】

抗体の純度および完全性(integrity)を、12.5％のアクリルアミドを用いて、還元SDS-PAGEによって確認した。濃度は、捕獲試薬(capture reagent)としてヤギ抗－ヒトκ抗体（セララブ(Seralab)）および、ビオチニル化(biotinylated) ヤギ抗－ヒトκ抗体（シグマ(Sigma)）を使用したELISA、次いで、検出のためにExtrAvidin-HRPO（シグマ(Sigma)）でチェックした。これは、重鎖の性質が、得られる結合のレベルに影響を与えそうもないことを意味した。

FcγRIトランスフェクタントのロゼット形成

洗浄したR_2R_2 RBCを、Ab試料と共に、96ウエルのプレート中のPBS 100ml中で、室温にて１時間インキュベートした。RBCを３回洗浄し、PBSに再懸濁させ、そして、FcγRI cDNA、B2KA（S. ゴーマン(Gorman)およびG.ヘイル(Hale)、未公開）を発現するトランスフェクタントと共に、37℃にて40分間インキュベートし、96ウエルのプレート中で増殖させた。上清を捨て、ウエルを１回洗浄して過剰のRBCを除去した。各ウエルについて、200 B2KA細胞を試験し、RBCロゼットを有する数を書きとめた。トリプルのウエルについて、平均の百分率および標準偏差ををプロットした。あるいは、感作したRBCおよびB2KA細胞をミクロ遠心分離管中で混合し、ペレット化し、静かに再懸濁させた後、顕微鏡スライドへ移した。FcγRトランスフェクタントの蛍光染色

FcγRI cDNA、B2KAおよび3T3+FcγRIa+γ-鎖（ファン アーグト(van Urgt), M.J., ハイエネン(Heijnen), I.A.F.M., カペル(Capel), P.J.,パーク(Park), S.Y., ラ(Ra), C., サイトウ(Saito), T., フェルビーク(Verbeek), J.S.およびファン デ ウィンケル(van de Winkel), J.G.J. (1996) FcR γ-鎖が、イン ビボでのヒトFcγRI(CD64)の表面発現および機能の両方のために不可欠である（FcR γ-chain is essential for both surface expression and function of human FcγRI (CD64) in vivo）。Blood、87、3593-3599）を発現するトランスフェクタントを、細胞解離緩衝液（ギブコ(Gibco) BRL）での処理の後に、0.1％(w/v)のNaN_3、0.1％(w/v)のBSA（洗浄緩衝液）を含むリン酸緩衝塩水中の単一細胞懸濁液として得た。細胞を、96ウエルのプレート中に10^5細胞／ウエルでペレット化し、CAMPATH-1またはFog-1 Abの100μl希釈に懸濁させ、氷上で30分間インキュベートした。細胞を、150μl／ウエル洗浄緩衝液で３回洗浄し、20μg/mlビオチン-結合ヤギ抗-ヒトκ-鎖 Ab（シグマ）を用いて、次いで20μg/mlExtrAvidin-FITC（シグマ）を用い

て、同様にインキュベートした。最後の洗浄後、細胞を1%(v/v)ホルムアルデヒドを含む100μlの洗浄緩衝液中に固定した。FcγRIの表面発現を、CD64 mAb（セロテク(Serotec)）およびFITC結合ヤギおよびマウスIgG Ab（シグマ）で染色することによって確認した。蛍光強度を、FACScan（ベクトン　ディッキンソン(Becton Dickinson)）で測定した。

【００８８】

FcγRII、3T6 + FcγRIIa 131H/H、3T6 + FcγRIIa 131R/R[ワーマーダム(Warmerdam), P.A.M., ファン　デ　ウィンケル(van de Winkel), J.G.J., ゴセリン(Gosselin), E.J., およびカペル(Capel), P.J.A. (1990) ヒトFcγレセプターII(CD32)の多形のための分子的基礎(Molecular basis for a polymorphism of human Fcγ receptor II(CD32))、J. Exp. Med. 172, 19-25；ワーマーダム(Warmerdam), P.A.M.,ファン　デ　ウィンケル(van de Winkel), J.G.J.,フラグ(Vlug), A.,ウェスターダール(Westerdaal), N.A.C. およびカペル(Capel), P.J.A. (1991)　ヒトFcγレセプターIIの第２のIg様ドメインにおける１つのアミノ酸が、ヒトIgG2結合のために不可欠である(A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fcγ receptor II is critical for human IgG2 binding)。J. Immunol. 147, 1338-1343）]および3T6 + FcγRIIb1*［ワーマーダム(Warmerdam), P.A.M., ファン　デン　ヘリク‐オーディーク(van den Herik-Oudijk), I.E., パレン(Parren), P.W.H.I., ウェスターダール(Westerdaal), N.A.C.,ファン　デ　ウィンケル(van de Winkel), J.G.J. およびカペル(Capel), P.J.A. (1993)、Int. Immunol. 5, 239-247］を有するトランスフェクタントについては、細胞と共にインキュベートする前に、抗体を複合化した。FcγRIIa 131H/Hについては、抗体を、等モル量のヤギF(ab')$_2$抗ヒトκ（セララブ(Seralab)）と混合し、37℃で１時間インキュベートした。次に、複合体を細胞と混合し、抗体の検出がFITC-結合ロバ抗ヤギIgG（セロテック(Serotec)）であったこと以外は上記のようにしてアッセイを続けた。FcγRIIa 131R/Rについては、等モル量のFITC-結合ヤギF(ab')$_2$抗ヒトκ（セララブ(Seralab)）を用いて複合体を作り、FcγRIIb1*については、等モル量の、FITC-結合したものとラベルしていないヤギF(ab')$_2$抗ヒトκの1:1混合物を用いて複合体を作った。かくして、これらのレセプターのために、唯1つのインキュベーション段階しか必要でなかった。

【００８９】

FcγRIIIb、CHO + FcγRIIIb NA1またはNA2（バックス(Bux), J., キセル(Kissel), K., ホフマン(Hofmann), C.およびサントソ(Santoso), S. (1999)　顆粒球抗体の検出のための対立遺伝子特異的組換えFcガンマレセプターIIIb抗原の使用(The use of allele-specific recombinant Fc gamma receptor IIIb antigens for the detection of granulocyte antibodies)。Blood 93, 357-362）を有するトランスフェクタントについて、上記の3T6 + FcγRIIa 131H/H細胞について記載したようにして、染色を行った。

赤血球感作

グループO R_1R_1 RBCをPBS中で洗浄し、RPMI + 10% FBS中に、最終濃度5%v/vにて再懸濁させた。10μlの細胞を、V底のウエルプレート中の50μlのmAbまたはRPMI/FBSに加え、37℃にて60分間インキュベートした。幾つかの実験においては、mAbをRPMI/FBSで一連希釈して、ある範囲の赤血球結合IgGを達成した。競合実験においては、赤血球を、25μlの競争するmAbと25μlの野生型mAbとの混合物、または25μlのアロ抗体を含む血清中で感作した。感作後、細胞を200μl体積のPBSで４回洗浄し、50μlのRPMI/FBSに再懸濁させた（最終濃度＝1% v/v）。全ての実験において、一定分量の細胞（E-IgG）を、化学発光(CL)アッセイにおいて使用し、一定分量をフローサイトメトリーによってアッセイして、赤血球結合IgGの量を測定した。

化学発光アッセイ

PBMCを、密度勾配遠心分離によって、EDTA-抗凝固血液（６人の正常ドナーからプールしたもの）から分離した。PBMCを、1%グロブリン不含有BSAを含むPBSで４回洗浄した後、25%のRPMIおよび2.5%のFBSを含むハンクス培養塩溶液(Hank's Balanced Salt Solution)(HBSS)に2 x 10^6/mlで再懸濁させた。一定量（100μl）を96個の平底白色不透明プレートに分配し、空気中５%のCO_2の加湿大気中で37℃にて２時間インキュベートした。次に、

プレートをルミノメータ(luminometer)（アンサス　ルーシー　１(Anthos Lucy 1)、ラブテク　インターナショナル(Labtech International)、ウクフィールド(Uckfield),英国）中に置き、４ｘ10^{-4} Mルミノール（シグマ）を含むHBSS　100μｌおよび20μｌのE-IgGを各ウエルに加えた。次にCL応答を、37℃にて60分間監視した。

赤血球結合IgGの測定

25μｌ一定分量のE-IgGをV底ウエルプレートに移し、PBSで１回洗浄し、遠心分離してペレット化し、50μｌのF(ab)$_2$ FITC-抗IgG（PBS/1%BSA中に1/30に希釈した）中に再懸濁させた。室温で30分後、細胞を、200μｌのPBS/BSAで１回洗浄し、フローサイトメトリー（EPICS　XL-MCL、コールター　エレクトロニクス(Coulter Electronics)、ルトン(Luton)、英国）によって分析するまで、氷上に保持した。平均チャネル(channel)蛍光を記録した。

【００９０】

平均チャネル蛍光を、5% v/v R_1R_1細胞100μｌをヒトモノクローナルIgG1抗D(BRAD-5)の連続２倍希釈900μｌに加えることによって準備した標準曲線の使用によってIgG分子／細胞に変換した。感作された赤血球をPBS/BSAで３回洗浄し、PBS/BSA中１%v/vに再懸濁させた。25μｌの一定分量を取り、上記したフローサイトメトリーによって分析した。残った赤血球を数え、遠心分離してペレット化し、Triton X-100を含む緩衝液中に溶解し、溶解物中のIgGを、クンペル(Kumpel)（クンペル(Kumpel), B.M. (1990)、赤血球結合免疫グロブリンの定量のための簡単なアイソトープによらない方法(A simple non-isotopic method for the quantitation of red cell-bound immunoglobulin)。Vox Sanguinis, 59, 34-39）による上記したELISAにより測定した。赤血球当たりの結合したIgG分子の数を、IgG濃度および、各溶解物が製造された赤血球の数から導き出した。次に、標準曲線をプロットして、蛍光強度と赤血球当たりの結合したIgG分子の数とを比較した。

抗体のCAMPATH-1シリーズによって媒介される補体溶解

健康なボランティアからの100mlの静脈血を脱繊維素し(defibrinated)、成分を、Ficoll-Paque Plus（ファルマシア(Pharmacia)）を用いた密度勾配遠心分離によって分離した。血清および単核細胞層を、新しいチューブに取った。細胞を、イスコブ(Iscove)の変性ダルベコー(Dulbecco)培地(IMDM)中に希釈し、遠心分離によって集めた。１つのペレットに合わせ、これを200μｌのIMDM中に再懸濁させながら、細胞をIMDM中で２回洗浄した。900μCiのクロム[^{51}Cr]酸ナトリウムを加え,細胞を37℃にて40分間インキュベートした。10mlのIMDMを加え、細胞をペレット化した。細胞を２回洗浄し、IMDM中に再懸濁して約6 ｘ 10^6細胞/mlにした。50μｌの一定分量の標識した細胞を、96ウエルプレートのウエル中の50μｌのIMDM中の抗体試料に加えた。IMDMで1:1に希釈した保有血清100μｌを、各ウエルに加え、プレートを37℃にて１時間インキュベートした。プレートを遠心分離し、上清を採取し、放出された^{51}Crの相対量を、γ-カウンターで測定した。自発的放出の量が、抗体を加えない試料から得られ、放出のために利用可能な^{51}Crの全量の尺度を、細胞を再懸濁した後に採取した同様の試料から見出した。%特異的^{51}Cr放出を、次式から計算した：

【００９１】

【数１】

$$\frac{\text{（試料のカウント－自発のカウント）}}{\text{（全カウント－自発のカウント）}} \times 100$$

【００９２】

トリプルの試料の平均および標準偏差をプロットした。

補体溶解の阻害のために、抗体試料は、一定量（6.25μg/ml最終濃度）のCAMPATH-1 G1および増加する量のCAMMPATH-1 G2Δaを含んでいた。

抗体のCAMPATH-1シリーズによって媒介されるADCC
抹消血単核細胞を、上記のようにして調製した。洗浄後、細胞を、5%FBSを補ったIMDM中に再懸濁させ、CD3抗体で被覆しておいたフラスコに移した。細胞を、37℃、5%CO_2にて３日間増殖させた。５％の細胞を、標的細胞として使用するために^{51}Crで標識し、洗浄し、IMDM + 5% FBS中に、6 x 10^5細胞/mlで再懸濁させた。50μlの一定分量を、IMDM + 5% FBS中の抗体試料50μl を含む96ウエルプレートのウエルに加えた。標的細胞および抗体を37℃にて１時間インキュベートし、担体としてRBSを加え、細胞をペレット化した。細胞をIMDM中で２回洗浄した。残った単核細胞を遠心分離によって集め、IMDM + 5% FBS中に、4 x 10^6細胞/mlで再懸濁させ、150μlを、プロセスにおいて標的細胞を際懸濁させている各ウエルに加えた。これによって、エフェクター：標的の比20:1が得られる。細胞を静かに遠心分離し、組織培養インキュベーター中に６時間置いた。上清を採取し、特異的^{51}Cr放出を、上記のようにして測定した。ダブルの試料についての特異的放出の平均値を、最終抗体濃度に対してプロットした。
実施例１－抗体の生成および基本的特性決定
エフェクター機能を除去するために選ばれた変異を表１（図15）に示す。IgG1およびIgG2遺伝子に作られたΔa変異は、位置327、330および331にIgG4残基を導入する。同様に、233～236の位置でのIgG2残基が、IgG1およびIgG4に導入されたが、IgG2は、他のサブクラスがグリシン残基を有する236に欠失を有するので、変異は、G236を省略（Δb）または含んで（Δc）なされた。
【００９３】
野生型または変異体定常部遺伝子に関連するCAMPATH-1または Fog-1 V_H DNAの発現を可能にするベクターを、適当な軽鎖発現ベクターを用いてラット骨髄腫細胞へ同時トランスフェクションした。安定なトランスフェクタントを分離し、拡張し(expanded)、AbをプロテインＡ‐アガロースで上清から精製した。
CAMPATH-1Hは、補体および細胞媒介溶解をイン　ビトロ(in vitro)で研究するために良好な標的化系を提供するので、CAMPATH-1Hを選択した。
【００９４】
Fog-1 Abについては、精製後、沈殿が形成したが、これをフィルター滅菌によって除去すれば、それ以上沈殿は認められなかった。Ab濃度は、280nmでの吸収から見積られ、存在するκ鎖の相対量を測定するELISAに従って、必要なところで調整された。Abは、還元SDS-PAGEに供された。各試料は、約25および55kDaの明白な分子量を有する２つのバンドを示し、これらの分子量は、軽鎖および重鎖の予想される大きさを示す。各Abシリーズの重鎖間に識別できる大きさの差はなかったが、Fog-1 Abの両方の鎖は、それらのCAMPATH-1の片割れより幾分小さいと思われた。各シリーズ内の重鎖が同じ明白な分子量を有すると思われるという事実は、変異が、タンパク質のグリコシル化において、いかなる大きな差異をも引き起こさなかったことを示す。CAMPATH-1特異性を有するAbについては、精製後の収量は、0.6～9μg/ml上清の範囲で変化し、それに対して、可溶性Fog-1 Abの収量は、3～20μg/mlであった。抗体の２つのシリーズについて精製収量の順位に相関関係はなく、これは、どの変異もAbの生成またはそれらのプロテインＡを結合する能力に影響を及ぼさなかったことを示唆する。
【００９５】
Abの２つのシリーズの特異性を次に試験した。CAMPATH-1 Abは、抗CAMPATH-1イディオタイプmAb、YID13.9の結合において、臨床等級のCAMPATH-1Hと競合することが示された。Fog-1 Abは、架橋試薬として抗ヒトIgG Abの存在中でRhD^+ RBCを凝集することができた。同様に、RhD^+ RBCを異なるAbで被覆し、かつ架橋Abとして抗-G1m(a)、抗-IgG2または抗-IgG4 Abを用いて、凝集パターンを見ることによって、Fog-1 AbのIgGサブクラスを試験した。結果は、抗体が正しいサブクラスを有することを示した。次に、Fog-1 IgG1および抗-G1m(a)によるRhD^+ RBCの凝集、Fog-1 IgG2および抗-IgG2による凝集ならびにFog-1 IgG4および抗-IgG4による凝集を、CAMPATH-1シリーズからの過剰のAbの存在中で行った。CAMPATH-1 Abは、それらがFog-1 Abとして同じサブクラスを有する場合にのみ、架橋試薬と競合

し、かくしてそれらのサブクラスを照合することによって、凝集を阻害することができた。

実施例２－FcγRI結合

細胞当たり約30,000のRhD部位を有するRBC（R_2R_2）を、ある範囲の濃度にわたる11のFog-1 Abのそれぞれで被覆し、ヒトFcγRI発現トランスフェクタント（B2KA）に加え、ウエル中で増殖させた。インキュベーション後、過剰のRBCを洗い落とし、RBCによってロゼット形成したB2KA細胞のパーセンテージを記録した（図１）。IgG4残基が位置327、330および331に含まれる、G1およびG1Δaについては、同様のレベルのロゼット形成が達成され、最大の半分のロゼット形成が、RBCをAbで約0.1μg/mlにて被覆したときに生じ、この濃度では、Fog-1 AbはRhD部位のおよそ３分の１を占めると予想される。同じレベルのロゼット形成を得るためには、G4のもう少し高い濃度が必要とされた。ΔbおよびΔc変異を含むG1およびG4 AbまたはG2 Abで被覆したRBCを用いたときには、ロゼットは形成されなかった。図１に示された実験においては、試験した最高の被覆濃度は10mg/mlであり、RhD部位の約90％占有に相当すると予想された。80mg/mlまでの被覆濃度を用い、本質的にRhD部位を飽和させて、実験を繰り返し、G2および、DbまたはDc変異を含み従ってIgG2残基をより低いヒンジ領域に挿入したAbについてはなお、ロゼットは見られなかった。このことは、RBCがこの抗原について最大の密度でこれらのAbで被覆されたときでさえ、ロゼット形成のためにIgG/FcγgRI相互作用が不充分であったことを示す。

【００９６】

顕微鏡スライドの上でロゼットを観察する前に、感作したRBCおよびB2KA細胞を共に遠心分離すると、ウエル中でインキュベートした細胞より高い割合のロゼットを与えることがわかり、よってこの方法が、ロゼット形成の阻害を調べるのに使用された。B2KA細胞と混合する前に、R_2R_2 RBCを、1mg/mlのFog-1 G1と異なる量のFog-1 G2DaまたはFog-1 G4Dbとの混合物で被覆した。1μg/mlのFog-1 G1のみを使用したときに、被覆されたRBCがB2KA細胞の95％でロゼットを形成し、それに対して、64mg/mlのG2ΔaまたはG4Δbの存在中での感作は完全にロゼット形成を破壊した（データは示されていない）。

【００９７】

その表面にFcγRI cDNAを発現する、２つの異なる細胞系への、両方のシリーズからのAbの結合を、蛍光染色によって測定した。図２は典型的な実験を示す。CD64 Abを用いて検出した、表面発現したFcγRIのレベルは、B2KA系についてより3T3トランスフェクタントについて高く、これは、Fcによる結合を測定するときに得られたより高いシグナルに反映する。両方のシリーズについて、G1およびG1Δa Abは、同じ明らかな親和性でレセプターに結合し、位置327、330および331における変異が相互作用に有意には影響を及ぼさなかったことを示す。G4 Abの結合は、G1およびG1Δa Abの結合より約３倍低い。G2 Abまたはどの他の変異Abについても、わずかの結合しか見られず、IgG1およびIgG4におけるΔbおよびΔc変異は、FcγRIへの結合を、少なくとも10^4倍だけ減らすのに十分であったことを示唆する。蛍光のレベルが、バックグラウンドと比べられ、またはΔb変異を有する等価のAbと比べられるなら、Δc変異を含むAb、特にG1Δcは、試験した最高の濃度で、少ない程度のFcγRIへの結合を示した。最高濃度のCAMPATH-1 AbおよびB2KA細胞について図３に示したように、蛍光強度ヒストグラムがかぶせられるなら、G1およびG1ΔaについてのプロットがＯ一致する。G1ΔbおよびG1Δc Abについてのヒストグラム間には、はっきりした差異がある。

実施例３－化学発光により測定されるFcγRI誘発(triggering)

FcγRI/IIによる機能活性を測定するために、単核細胞の、Fog-1シリーズからの Abで感作されたRBCへの化学発光(CL)応答を測定し、RBC当たりに結合したAb分子の数に対してプロットした（図４）。より高い量のAbを用いて、G1およびG1Δa Ab間の差異がみられるが、両方共、Ab濃度の全範囲にわたってG4 Abより高い応答を与える。G1Δc Abによって有意の誘発(triggering)が達成され、G1ΔacおよびG4Δcによって、より少ない範囲に誘発が達成されるが、他のAbはどのような応答をも与えない。

【００９８】

先の節からFcγRIの誘発に不充分であると知られていたAbを、増加する濃度で、一定量のFog-1 G1と混合し、RBCを感作するのに使用した。RBCに対するCL応答を図５に示す。G1のみを滴定した(titering)ときに得られたものに対するCL応答を比較することによって、８つのAbのうちの６つが、変異体がそれらの相対濃度に比例して、RBCからの活性G1を置き換えることが想定されるなら、予想される範囲まで、反応を阻害することが明らかである。G2については、阻害効果は、約３倍多いG2が、同じ量の阻害を与えるのに必要とされることにおいて遅らされる。G1Δcは、応答がゼロまで減らされないこと以外は、他の変異体とほぼ同じ範囲まで阻害する。

【００９９】

イン　ビボ(in vivo)の病理学の厳しさを予想することにおいて化学発光の有用性を論じた２つの論文は、ハドレー(Hadley)（1995）、輸血薬概説(Transfusion Medicine Reviews) 9:302-313およびハドレー(Hadley)ら(1998)、Br J Obstet Gynaecol 105:231-234である。

これらのアッセイにおいて、BRAD-5モノクローナル抗体の対照により生成された30％を超える化学発光の結果は、HDNにおけるイン　ビボ(in vivo)の病理学を予言するものである。かくして、30％より下のレベルに阻止することができるそれらの抗体は治療のために適当でなければならない。

【０１００】

変異体Abの１つ、Fog-1 G2Δaを、臨床的に重要なAbを含む血清に対するCL応答を阻害する能力について試験した。血清は、抗-RhD Abまたは抗C+Dを含み、阻害剤の不在下で、この規模で30％より大きいCL応答を与え、これは、新生児のひどい血液(haemolytic)疾患の表示であり、子宮内輸血に必要がある。血清は、異なる濃度のG2Δaと混合され、混合物を、RBCを感作するのに使用し、単核細胞の応答を測定した（図６）。G2Δa Abの添加は、すべての５つの抗-RhD 血清の故に、CL信号を30％削減より下に減らした。これを達成するのに必要とされたAbの量は、16～260μg/mlで変化し、この範囲はたぶん、血清中の抗-RhD Abの異なっている量および親和性を反映する。２つの対照血清がある。抗κ血清は、G2Δaによって少しも阻止されることができない。というのは、その反応性は、RBC上の異なる抗原の方を向いているからである。抗-C+D血清の活性の一部だけが、G2Δaによって阻害されることができた。

実施例４－補体溶解における活性

図７は、G1およびG2 CAMPATH-1抗体になされたすべての変異が、補体溶解を媒介する能力を劇的に減少させたことを示す。一定量のG1および異なる量のG2Δaを用いてアッセイを行ったときには（図８）、G2Δa抗体は、CAMPATH-1 G1による殺PBMCを阻止することができた。

実施例５－ADCCにおける活性

ヒトPBMCを標的細胞として使用して、CAMPATH-1抗体について（図９）、およびRhD^+ RBCを標的細胞として使用して、Fog-1抗体について（図10および10b）、ADCCを媒介する能力を測定した。図９は、ADCCにおけるCAMPATH-1抗体の混合能力を示し、変異体のいくつかは、非常に低い活性を有する。図10および10bは、Fog-1抗体の変異体である、G1Δab、G1Δac、G2Δa、G4ΔbおよびG4Δcが、どのような殺RBCをも維持することができなかったことを示す。図10においては、G2またはG4で感作されたRBCのいくらかの溶解がみられるが、これらの抗体は、図10bのアッセイにおいて明らかな活性を有さない。このことは、溶解の程度がエフェクター細胞のドナーに依存し、異なる時間に同じドナーから採取したエフェクター細胞を用いたときでさえ変わり得るという観察を立証する。しかしながら、先に挙げた変異体については、ある範囲のエフェクター細胞ドナーを試験したが、バックグラウンドレベルより上の活性は認められなかった。

【０１０１】

Fog-1抗体のいつくかを、Fog-1 G1によって（図11および11b）および抗-RhD血清の臨床試料によって（図12）、RhD^+ RBCのADCCを阻害する試みのために使用した。図は、RBC感作の前に活性な抗体と混合したときに、試験した抗体のすべてがADCCを阻害することができ

たことを示す。Fog-1変異体抗体であるG1Δb、G1Δab、G1Δac、G4ΔbおよびG4Δcは、ADCCの阻止に特に有効であった。

実施例６－FcγRII結合

図13、13bおよび14は、Fog-1シリーズからの抗体の複合体の、それぞれFcγRIIa 131H/H、FcγRIIa 131R/RおよびFcγRIIb1*を有する細胞への結合を示す。個々の抗体分子についての低い親和性によりこれらのレセプターへの結合を測定するときには、抗体複合体を形成することが必要である。FcγRIIa 131H/Hは、IgG2抗体が強く結合することが期待されるFcγRIIa のアロタイプであり、事実、G1およびG2は、強い結合活性を示す（図13）。これら２つの抗体への変異の付加は、結合のレベルを段々減少させ、G1ΔcおよびG1Δac抗体は、G4抗体によって示される結合のバックグラウンドレベルしか有さない。図13bは、FcγRIIa の131Rアロタイプに結合するときに、抗体が異なる相対活性を有するが、野生型G1抗体に対して作られた変異は再びレセプターへの結合を減らすことを示す。抗体のすべてが、架橋$F(ab')_2$のみ、または$F(ab')_2$と複合化した非グリコシル(aglycosyl)IgG1抗体の負の対照試料より多い、阻害レセプターFcγRIIb1*への結合を有意に示す（図14）。ほとんどの変異体の結合が、対応する野生型抗体に比べて減少されるが、幾らかの変異体は、野生型G1抗体により示された結合の２倍以内の結合を示す。

実施例６ｂ－FcgRIII結合

図14bおよび14cは、Fog-1シリーズからの抗体の複合体の、それぞれアロタイプNA1およびNA2のFcγRIIIbを有する細胞への結合を示す。両方のアロタイプについて、G1抗体について結合が見られ、より少ない程度で、G1ΔaおよびG1Δc抗体について結合が見られる。他の変異体抗体については結合が観察されない。というのは、これらは、架橋$F(ab')_2$のみ、または$F(ab')_2$と複合化した非グリコシル(aglycosyl)IgG1抗体の負の対照試料に対して同様のレベルの蛍光を示すからである。

実施例７－抗-HPA-1a抗体の製造

抗-HPA-1a scFvのV_HおよびVλ（グリフィン(Griffin), H.M.およびオウエハンド(Ouwehand), W.H. (1995)Ｖ遺伝子ファージ提示ライブラリーからの血小板糖タンパク質IIIaのロイシン－33形に特異的なヒトモノクローナル抗体(A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 form of the platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library)。 Blood 86, 4430-4436）を増幅し、それぞれを、ベクターM13VHPCR1（オーランディ(Orlandi)ら、1989）からのリーダー配列に、先に記載したオーバーラップ拡張(overlap extension)PCRによって付けた。DNA（M13VHPCR1におけるV_Hの3'末端およびV_H－ C_Hイントロンの5'末端を示している）を、リーダー／V_HDNAに同様に結合した。生成物をHindIII- BamHIフラグメントとしてIgG1およびIgG2発現ベクターへクローン化して、存在する可変領域フラグメントを置き換え、ベクターpSVgptB2VHHuIgG1およびpSVgptB2VHHuIgG2を与えた。

【０１０２】

リーダー／VλDNAを、存在する発現ベクター（ルートレッジ(Routledge), E.G., ロイド(Lloyd), I., ゴーマン(Gorman), S.D., クラーク(Clark), M.およびワルドマン(Waldmann), H. 1991, Eur. J. Immunol. 21:2717）から採取したKern-Oz-アロタイプ（ラビッツ(Rabbitts), T.H., フォースター(Forster), H.およびマシューズ(Matthews), J.G. 1983. Mol. Biol. Med. 1:11）のヒトλ鎖定常部DNAに、フレームで結合した。全λ遺伝子を、HindIII- BamHIフラグメントとしてM13へクローン化し、pSVhyg-HuCK（オーランディ(Orlandi)ら、1989）からのネズミ重鎖エンハンサーを、アダプターを用いて遺伝子の5'末端に付加し、それで全挿入物を、BamHIフラグメントとしてpSV2neo（サウザン(Southern), P. J.およびベルグ(Berg), P. 1982 J. Mol. Appl. Genet. 1:327）に移すことができた。ベクターは、pSVneoB2VλHuCλに設計された。

【０１０３】

発現ベクターを、ラット骨髄腫細胞系YB2/0へトランスフェクションし、トランスフェクタントを選択し、抗体を上記したようにして精製した。これらのB2IgG1およびB2IgG2抗体は、対照抗体として使用することができる。

好ましいヌル(null)定常部が選択されたなら、B2 VH HindIII-BamHIフラグメントを、適当な定常部遺伝子を有する発現ベクターに導入することができ、存在する可変領域フラグメントを置き換えることができる。重鎖発現ベクターを次に、pSVneoB2VλHuCλと共に骨髄腫細胞へ同時トランスフェクションする(co-transfected)ことができ、抗体を使用のために精製することができる。

実施例８－結合分子の治療上の使用

本発明に従う治療分子は、HPA-laアロ免疫化(alloimmunisation)によって悪化した妊娠を治療するために、例えば母親への静脈内投与、それによって、胎盤移動（例えば、FcRnによって）をあてにして、胎児に治療上の投与量を与えることによって、使用することができる。

【０１０４】

代替的な方法は、経皮的さい帯管サンプリング(umbilical vessel sampling)による、胎児への直接投与である。この方法は、適合性血小板輸血をするために、FAITにおいて近年行われている。輸血した血小板の短い生存の故に、この方法は、妊娠の過程中多数回繰り返さなければならないことがある。しかしそれは危険であり、0.5%／方法の胎児を失う危険を伴う。

【０１０５】

しかしながら、治療的抗体の胎児への投与は、もっと低い投与量が必要とされるようであるという利点を有し、したがって、血小板輸血と共に本発明の分子を用いた組み合わせのアプローチが、治療の第１段階として考えられ得る。このアプローチは、分娩前のさらなる血小板輸血の必要性を減らす、またはなくすことができる。

まとめ

抗体の活性を表２（図16）にまとめる。わかるように、FcγRI、FcγRIIa 131H/H、FcγRIIa 131R/R、FcγRIIIb NA1およびFcγRIIIb NA2に結合する能力を減らされた結合分子が製造され、この分子は、単核細胞化学発光を誘発することができず、補体溶解を媒介することができず、かつADCCにおいて活性でない。しかしながら、この結合分子は、阻害レセプターFcγRIIbへの結合を保持する。エフェクター機能、例えばCH2ドメインにおいてグリコシル化部位を除去して非グリコシル抗体を作る機能をノックアウトするために予め使用された他の変異はまた、望ましくないといえるこのレセプターへの結合を除去することができる。

【０１０６】

選ばれた変異体が、Fog-1 G1による、FcγRIを有する細胞のロゼット形成；Fog-1 G1感作したRBCへの単核細胞の応答；ポリクローナル抗-RhD感作したRBCへの単核細胞の応答；CAMPATH-1 G1での補体溶解による殺PBMC；Fog-1 G1でのADCCによる殺RBC； ポリクローナル抗-RhD血清でのADCCによる殺RBCを完全に阻害することができると示された。

【０１０７】

ここでの結果は、異なるサブクラスに対応させるために、IgG CH2ドメインにおける１つの残基をさえ変えることによって、異なる活性をもたらすことができることを証明する。かくして、DbおよびDc変異体の３つの対、G1ΔbとG1Δc、G1ΔabとG1Δac、G4ΔbとG4Δcについて。各対内で、抗体は、G236の不在（Δb）または存在（Δc）によってのみ異なる。しかしながら、ここで測定された機能のほとんどについて、ΔbおよびΔc抗体は異なる活性を有する。Db変異体は、FcγRIIa 131H/Hへの結合においてより活性であり、それに対してDc変異体は、FcγRI結合、FcγRIIIb NA1およびNA2結合、単核細胞活性化ならびにADCCにおいてより活性である。ΔbおよびΔc変異が作られる領域は、より低いヒンジまたは、ヒンジ結合領域として知られており、広げられた構造を有するようであり、ヒンジをCH2ドメインの残りに連結する。この領域からの残基の付加または欠失は、CH2ドメインの残りにおけるレセプター相互作用部位に関してより低いヒンジ残基の配列をたぶん変える。

【０１０８】

しかしながら、変異の効果は、野生型抗体活性からいつも予想できるわけではないが、変

異が存在する新しい状況（IgGの「混合された」サブクラスに基づく）による。１つの例は、IgG2抗体の活性がIgG1より約３倍しか低くないが、IgG2残基のIgG1への導入（G1Δbおよびg1Δc）が溶解を除去する、補体溶解のアッセイにある。同様に、IgG1およびIgG2は、FcγRIIa 131Hへの等しい結合を示すが、G1ΔbおよびG1Δcの活性は、それぞれ50倍および10倍低い。図９および10のADCCアッセイにおいては、IgG2およびIgG4は、同様の低いが測定可能なレベルの溶解を与える。IgG2およびIgG4の間の残基を置換すると、ならびにIgG1へと置換すると、活性を減らす。これらのデータは、異なるヒトIgGサブクラスの野生型抗体および、たぶん変異体抗体は、活性を誘発するために他の分子への結合において異なる残基を使用することができることを示唆する。

【図面の簡単な説明】

【図１】　Ｆｏｇ－１抗体により被覆されたＲＢＣによるＦＣγＲＩ担持細胞のロゼット形成。R_2 R_2 を一定範囲の抗体濃度におけるＦｏｇ－１抗体でコートし、９６－ウェル・プレート内で培養されたＢ２ＫＡ細胞と一緒にインキュベートし、そしてＲＢＣのロセット（ｒｏｓｅｔｔｅｓ）をもつＢ２ＫＡ細胞のパーセンテージを測定した。誤差バーは、３連ウェルについての標準偏差値を示す。突然変異体、Ｆｏｇ－１　Ｇ１Δｂ、Ｇ１Δｃ、Ｇ１Δａｂ、Ｇ１Δａｃ、Ｇ２Δａ、Ｇ４Δｂ、及びＧ４Δｃについては、Ｇ２についてと同様（図示する）、いずれのコーティング濃度においても、Ｂ２ＫＡ細胞とＲＢＣの間に、ロゼット形成はなかった。

【図２】　ＦＣγＲＩ担持細胞の蛍光染色。ＦＣγＲＩトランスフェクト体細胞系、Ｂ２ＫＡ（ａとｂ）及び３Ｔ３＋ＦＣγＲＩ＋γ－鎖（ｃとｄ）を、ＣＡＭＰＡＴＨ－１（ａとｃ）又はＦｏｇ－１（ｂとｄ）シリーズの抗体、ビオチン化抗－ヒトＫ抗体、及びＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎ－ＦＩＴＣとともに順番にインキュベートした。蛍光強度を１００００事件について計測し、そして蛍光の幾何平均チャンネルをプロットした。

【図３】　蛍光染色されたＦｃγＲＩ担持細胞のヒストグラム図。Ｂ２ＫＡ細胞を、上記ＣＡＭＰＡＴＨ－１シリーズからの１００μｇ／ml抗体を使用して図２におけるように染色した。各蛍光チャンネル内に降ちる細胞の数を示すヒストグラム・プロットを、代表的な抗体について重層した。

【図４】　Ｆｏｇ－１シリーズの抗体により感作されたＲＢＣに対するヒト単球のＣＬ応答。R_1 R_1　ＲＢＣを一定レンジの濃度を超える抗体でコートした。細胞当りに結合した抗体分子の数、及び上記ＲＢＣへの単球のＣＬ応答を、上記のように各サンプルについて測定した。

【図５】　他のＦｏｇ－１抗体による、Ｆｏｇ－１　Ｇ１に因るＣＬの阻害。ＲＢＣを、２μｇ／mlのＦｏｇ－１　Ｇ１で感作し、そして異なる濃度のＦｏｇ－１　Ａｂを図示する。これらＡｂは、図４における低ＣＬ応答を与えた。単球のＣＬ応答を計測した。２μｇ／ml　Ｇ１単独に因る応答を、１００％とした。

【図６】　Ｆｏｇ－１　Ｇ２Δａによる臨床血清に対するＣＬ応答の阻害。ＲＢＣを、一定量のＦｏｇ－１　Ｇ１（２０μｇ／ml）又は臨床的に関連のある血清、及び異なる量のＦｏｇ－１　Ｇ２Δａで感作した。１００％応答を、標準量のＢＲＡＤ５を用いて達成した。Ｆｏｇ－１　Ｇ２Δａの非存在下、その％応答は、Ｇ１：１５０％、血清Ａ：１４２％、血清Ｂ：２６５％、血清Ｃ：２００％、血清Ｄ：１６３％、血清Ｅ：９４％、抗－Ｃ＋Ｄ血清：２５９％、そして抗－Ｋ血清：１１９％であった。

【図７】　ＣＡＭＰＡＴＨ－１シリーズの抗体により仲介された補体溶解。ヒトＰＢＭＣを、^{51}Ｃｒでラベルし、そして補体源としての血清の存在下、上記抗体とともにインキュベートした。この％特異的Ｃｒ放出を、溶解発生の尺度としてプロットした。

【図８】　ＣＡＭＰＡＴＨ－１　Ｇ１により仲介される補体溶解のＣＡＭＰＡＴＨ－１　Ｇ２Δａによる阻害。補体溶解を、図７に示すものと同様に行った。但し、上記サンプルは、一定量（６．２５μｇ／mlの最終濃度）のＣＡＭＰＡＴＨ－１　Ｇ１と増加量のＣＡＭＰＡＴＨ－１　Ｇ２Δａを含有していた。

【図９】　ＣＡＭＰＡＴＨ－１シリーズの抗体により仲介されるＡＤＣＣ。ヒトＰＢＭＣを^{51}Ｃｒでラベルし、そして抗体とともにインキュベートした。洗浄後、上記細胞を、２

０：１のエフェクター：標的比で、エフェクター細胞として働く、さらなるＰＢＭＣとともにインキュベートした。％特異的Ｃｒ放出を、溶解発生の尺度としてプロットする。
【図１０ａ】　Ｆｏｇ－１シリーズの抗体により仲介されるＲｈＤ$^{+}$ ＲＢＣのＡＤＣＣ。
【図１０ｂ】　Ｆｏｇ－１シリーズの抗体により仲介されるＲｈＤ$^{+}$ ＲＢＣのＡＤＣＣ。
【図１１ａ】　２ng／mgにおいてＦｏｇ－１　Ｇ１により仲介されたＲｈＤ$^{+}$ ＲＢＣのＡＤＣＣのＦｏｇ－１抗体による阻害。
【図１１ｂ】　Ｆｏｇ－１　Ｇ１により仲介されるＲｈＤ$^{+}$ ＲＢＣのＡＤＣＣのＦｏｇ－１抗体の阻害。ＲＢＣを、一定量のＦｏｇ－１　Ｇ１（２ng／ml）及び異なる濃度の阻害抗体から成る、抗体混合物中で感作した。
【図１２】　３ng／mgにおいてポリクローナル抗－ＲｈＤにより仲介されたＲｈＤ$^{+}$ ＲＢＣのＡＤＣＣのＦｏｇ－１抗体による阻害。
【図１３ａ】　ＦｃγＲＩＩａ　１３１Ｈ／Ｈ担持細胞の蛍光染色。トランスフェクト体系３Ｔ６＋ＦＣγＲＩＩａ　１３１Ｈ／Ｈの細胞を、ヤギＦ（ａｂ’）$_2$ 抗－ヒトＫと複合体を形成したＦｏｇ－１抗体とともに、そして次にＦＩＴＣ抱合ロバ抗－ヤギＩｇＧとともにインキュベートした。蛍光強度を１００００事件について計測し、そして蛍光の幾何平均チャンネルをプロットした。
【図１３ｂ】　ＦｃγＲＩＩａ　１３１Ｒ／Ｒ担持細胞の蛍光染色。トランスフェクト体系３Ｔ６＋ＦｃγＲＩＩａ　１３１Ｒ／Ｒの細胞を、ＦＩＴＣ－抱合ヤギＦ（ａｂ’）$_2$ 抗－ヒトＫと複合体を形成したＦｏｇ－１抗体と共にインキュベートした。蛍光強度を１０，０００事件について計測し、そして蛍光の幾何平均チャンネルをプロットした。
【図１４ａ】　ＦｃγＲＩＩｂ１* －担持細胞の蛍光染色。本実験を、トランスフェクト体系３Ｔ６＋ＦｃγＲＩＩｂ１* を使用して、そしてＦＩＴＣ－抱合及び非標識ヤギＦ（ａｂ’）$_2$ 抗－ヒトＫの混合物を使用して上記Ｆｏｇ－１抗体を複合体形成して、図１３ｂにおけるように行った。
【図１４ｂ】　ＦｃγＲＩＩＩｂ　ＮＡ１－担持細胞の蛍光染色。本実験を、トランスフェクト体系ＣＨＯ＋ＦｃγＲＩＩＩｂ　ＮＡ１を使用して図１３におけるように行った。
【図１４ｃ】　ＦｃγＲＩＩＩｂ　ＮＡ２－担持細胞の蛍光染色。本実験を、トランスフェクト体系ＣＨＯ＋ＦｃγＲＩＩＩｂ　ＮＡ２を使用して図１３におけるように行った。
【図１５】　本図は、野生型Ｇ１、Ｇ２、及びＧ４配列について上記突然変異を比較する表１を示す。
【図１６】　本図は、抗体活性のまとめである、表２を示す。
【図１７】　本図は、Ｇ１Δａｂ、Ｇ２Δａ、Ｇ１Δａｃと名付けられたものを含む、特定の修飾された配列、及び野生型のC_H ２配列を示す。

【図１】

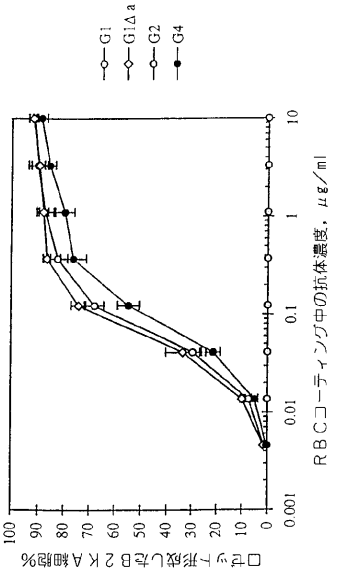
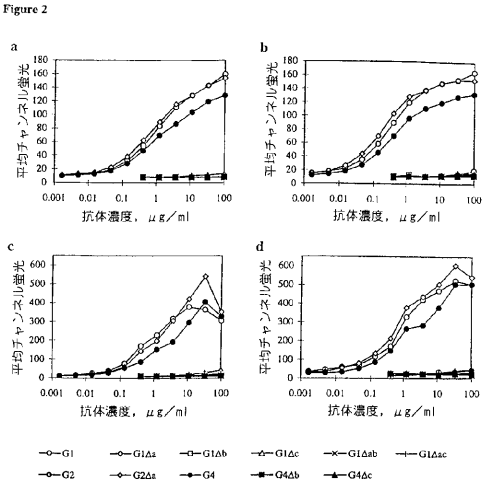


Figure 1

【図２】



【図３】

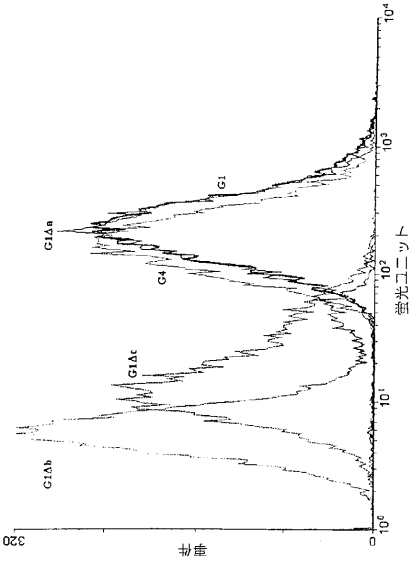


Figure 3

【図４】

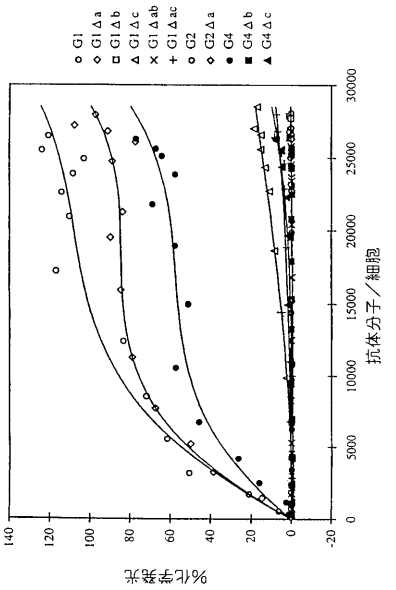
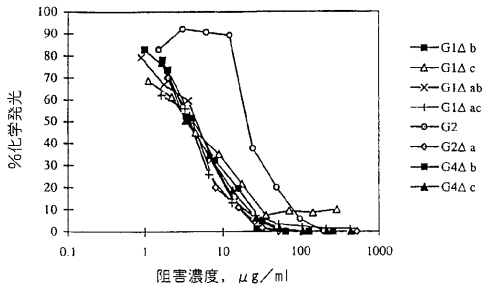


Figure 4

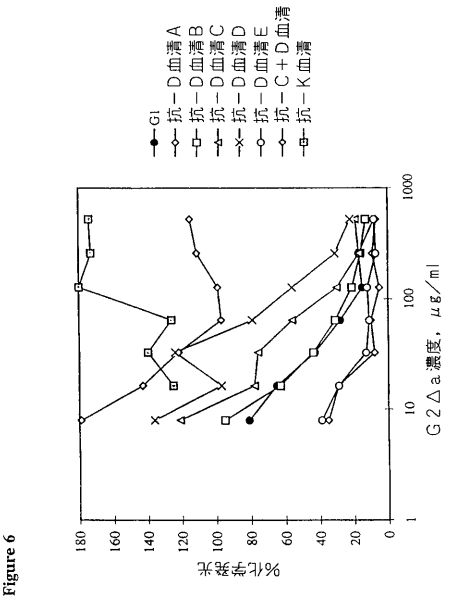
【図５】

Figure 5



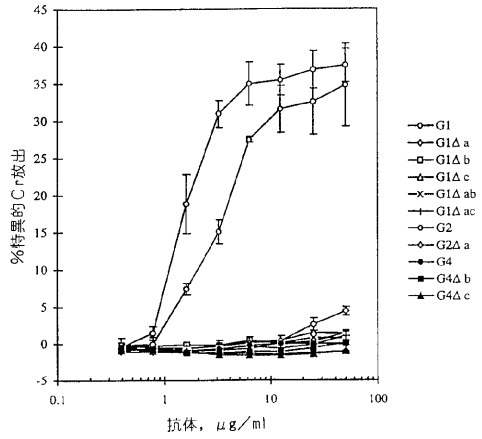
【図６】

Figure 6



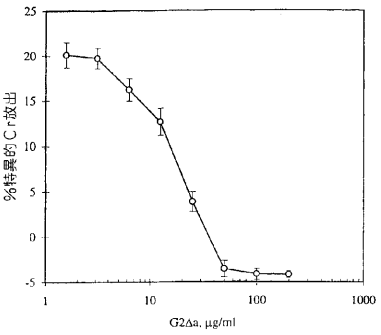
【図７】

Figure 7



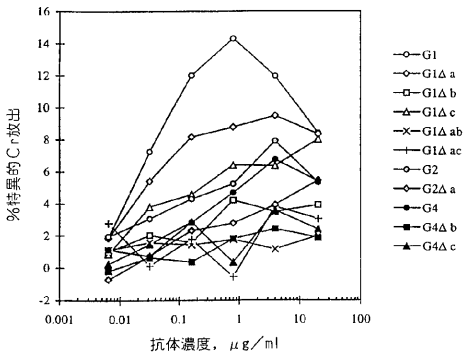
【図８】

Figure 8



【図９】

Figure 9



【図１０ａ】

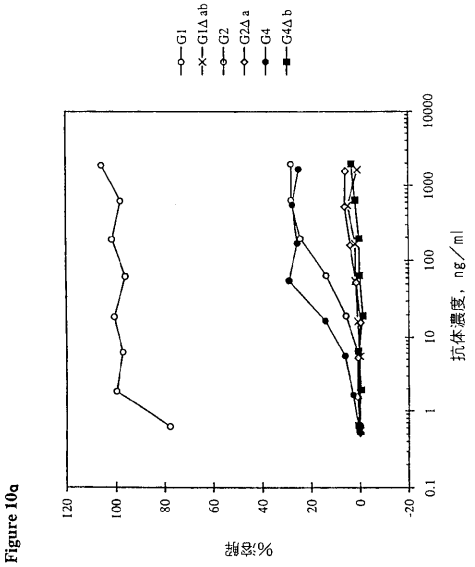


Figure 10a

【図１０ｂ】

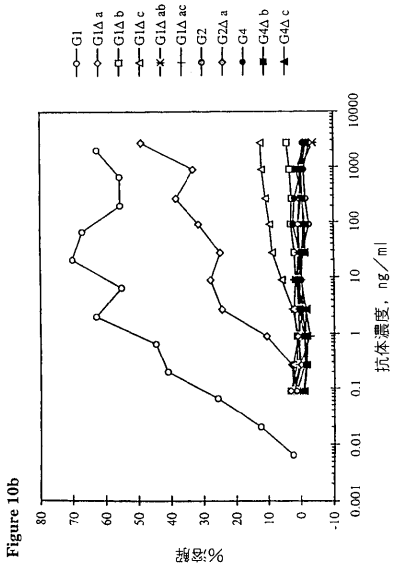


Figure 10b

【図１１ａ】

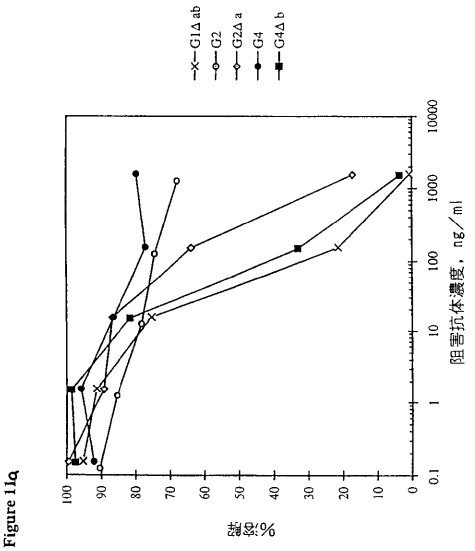
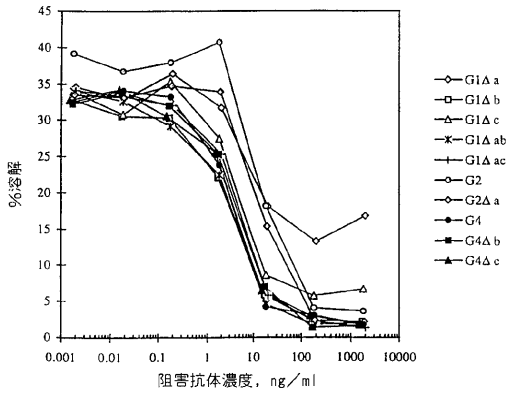


Figure 11a

【図１１ｂ】

Figure 11b



【図１２】

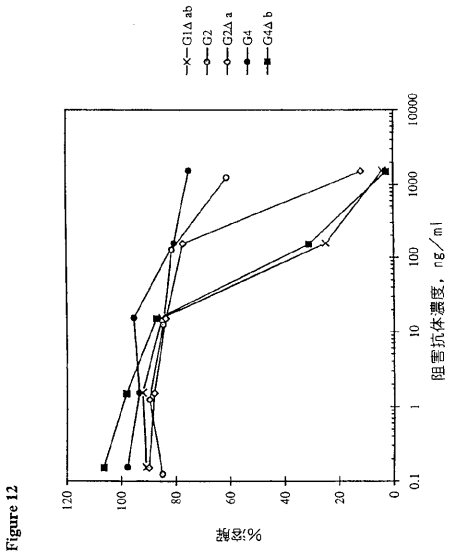
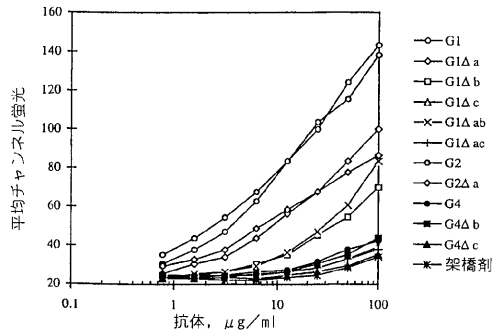


Figure 12

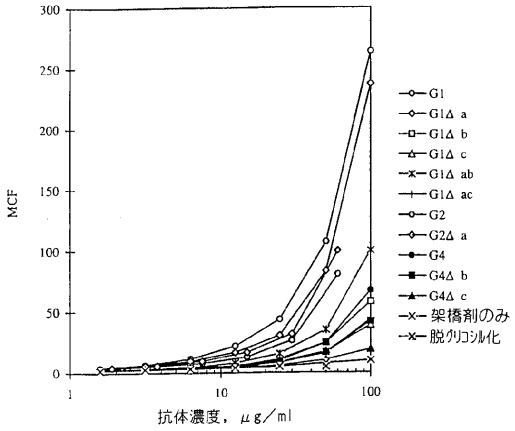
【図１３ａ】

Figure 13a

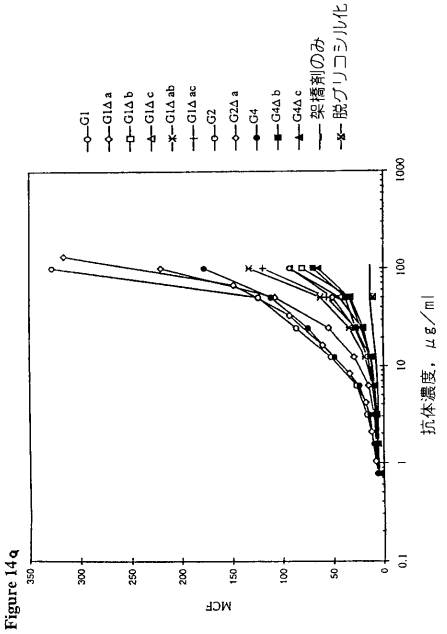


【図１３ｂ】

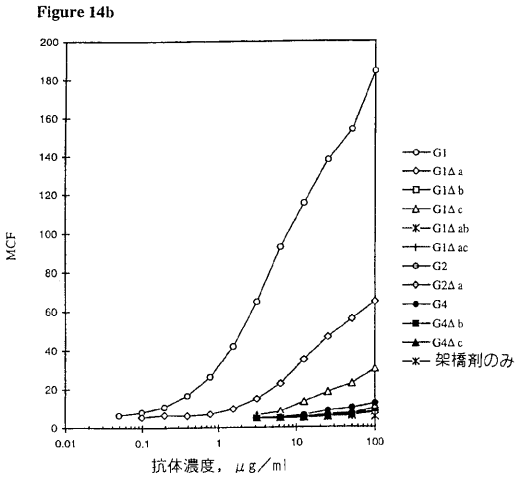
Figure 13b



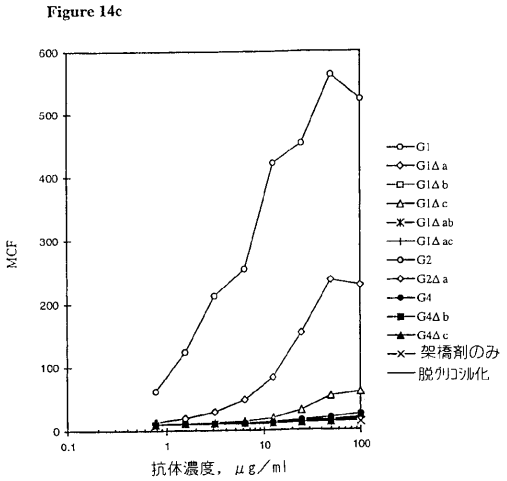
【図１４ａ】



【図１４ｂ】



【図１４ｃ】



【図１５】

Figure 15

表１
野生型Ｇ１，Ｇ２及びＧ４抗体について行われた突然変異の比較

抗体	233	234	235	236	327	330	331
G1	E	L	L	G	A	A	P
G1Δa	E	L	L	G	G	S	S
G1Δb	P	V	A	-	A	A	P
G1Δc	P	V	A	G	A	A	P
G1Δab	P	V	A	-	G	S	S
G1Δac	P	V	A	G	G	S	S
G2	P	V	A	-	G	A	P
G2Δa	P	V	A	-	G	S	S
G4	E	F	L	G	G	S	S
G4Δb	P	V	A	-	G	S	S
G4Δc	P	V	A	G	G	S	S

【図１６】

Figure 16

アッセイ系	シリーズ	G1	G1da	G1db	G1dc	G1dab	G1dac	G2	G2da	G4	G4db	G4dc
FcγRI: ロゼッティング	E	+++	+++	–	–/+	–	–/+	–	–	++	–	–/+
FcγRI: 蛍光染色	C/F	+++	+++	–	–/+	–	–/+	–	–	++	–	–/+
FcγRIIa H/H: 蛍光染色	C/F	+++	++	+	–/+	+	–/+	+++	++	–/+	–/+	–
FcγRIIa R/R: 蛍光染色	F	+++	+++	+/–	+/–	+	+/–	++	++	+/–	+/–	–/+
FcγRIIb/c*: 蛍光染色	F	++++	++++	+	+	++	++	+	+++	+++	+	+
FcγRIIb NA1: ロゼッティング	F	++	+	+/–	+/–	–/+	–/+	+/–				
FcγRIIb NA1: 蛍光染色	F	+++	++	–	+	–	–	–	–	–	+/–	–
FcγRIIb NA2: 蛍光染色	F	+++	++	–	+	–	–	–	–	–	+/–	–
FcγRIII: 化学発光	F	+++	++	–	+/–	–/+	–/+	–/+	–	–	+	–/+
補体溶解	C	+++	+/–	–/+	–/+	–/+	–/+	++	–	–	–	–
ADCC	C	+++	++	+/–	+	–	–/+	+	+/–	+	–	–/+
ADCC	F	++++	+++	+	++	–	–	+/–	–/+	+/–	–	–

アッセイにおけるG1活性の阻害

	シリーズ	G1	G1a	G1b	G1c	G1ab	G1ac	G2	G2a	G4	G4b	G4c
FcγRI: ロゼッティング	F								+		+	
FcγRII: 化学発光	F			+++	++	+++	+++	+	+++		+++	+++
補体溶解	C								+			
ADCC	F		–	++	+	++	++	–	+	–	++	++

シリーズ
+++, ++, +又は+ アッセイに応じた活性の相対レベル
+/– バックグラウンドを僅かに超える低レベルの活性
–/+ バックグラウンドを僅かに超える低レベルの活性
– テストせず
blank テストされたCAMPATH－１(C)又はFog－１(F)抗体

【図１７】

親抗体及び突然変異抗体の全長C_H2配列

Figure 17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12P	***21/08***	***(2006.01)***	C12P	21/08	
A61K	***31/713***	***(2006.01)***	A61K	31/713	
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	39/395	Y
A61P	*7/04*	*(2006.01)*	A61P	7/04	
A61P	*7/06*	*(2006.01)*	A61P	7/06	
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	9/10	
A61P	*11/06*	*(2006.01)*	A61P	11/06	
A61P	*19/02*	*(2006.01)*	A61P	19/02	
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00	
A61P	*37/06*	*(2006.01)*	A61P	37/06	
A61P	*37/08*	*(2006.01)*	A61P	37/08	

(74)代理人 100081330
弁理士 樋口 外治
(72)発明者 アーマー，キャスリン レスリー
イギリス国，ケンブリッジ シービー１ ５エルユー，ウエスト ラッティング，ハイ ストリート ４３
(72)発明者 クラーク，マイケル ロナルド
イギリス国，ケンブリッジ シービー４ ３ピーティー，リッチモンド ロード １２４
(72)発明者 ウィリアムソン，ローナ マクリード
イギリス国，ケンブリッジ シービー２ ５キューディー，ハーストン，ハイ ストリート １５７

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表平０６－５１０６５９（ＪＰ，Ａ）
Immunology，１９９５年，Vol.86，p.319-324
The Journal of Immunology，２０００年，Vol.164，p.5313-5318
The Journal of Immunology，１９９１年，Vol.147，p.2657-2662
The EMBO Journal，１９９９年，Vol.18，p.1095-1103
Eur. J. Immunol.，１９９３年，Vol.23，p.1098-1104
PNAS，１９９１年，Vol.88，p.9036-9040
Molecular Immunology，１９９７年，Vol.34，p.441-452

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)