

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6230257号
(P6230257)

(45) 発行日 平成29年11月15日 (2017.11.15)

(24) 登録日 平成29年10月27日 (2017.10.27)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
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

請求項の数 24 外国語出願 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-85174 (P2013-85174)	(73) 特許権者	509012625
(22) 出願日	平成25年4月15日 (2013.4.15)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2010-131026 (P2010-131026)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
原出願日	平成12年1月14日 (2000.1.14)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(65) 公開番号	特開2013-166770 (P2013-166770A)	(74) 代理人	110002077
(43) 公開日	平成25年8月29日 (2013.8.29)		園田・小林特許業務法人
審査請求日	平成25年5月9日 (2013.5.9)	(72) 発明者	プレスタ, レナード, ジー
審査番号	不服2016-11022 (P2016-11022/J1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
審査請求日	平成28年7月21日 (2016.7.21)		09, サン フランシスコ, ガウ ス
(31) 優先権主張番号	60/116,023		トリート 1900 206号室
(32) 優先日	平成11年1月15日 (1999.1.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変化したエフェクター機能を有するポリペプチド変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含む抗体であって、F c 領域のアミノ酸位置 265 又は 269 の一以上にアミノ酸置換を含み、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、抗体。

【請求項 2】

F c 領域に一つのアミノ酸置換を含む請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

そこに挙げられたアミノ酸位置の二つのアミノ酸置換を含む請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

位置 265 のアミノ酸置換を含む請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

位置 265 のアミノ酸置換からなる請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 6】

位置 265 のアミノ酸が A l a で置換されている請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

位置 265 のアミノ酸が A s n 又は G l u で置換されている請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の抗体。

10

20

【請求項 8】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含む抗体であって、F c 領域のアミノ酸位置 2 6 5、2 6 9、2 7 0、2 9 7 又は 3 2 7 の二以上にアミノ酸置換を含み、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、抗体。

【請求項 9】

位置 2 6 5 及び 2 9 7 にアミノ酸置換を含む請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 0】

血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) と結合する請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の抗体。

10

【請求項 1 1】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含む抗体であって、F c 領域のアミノ酸位置 2 6 5 又は 2 6 9 の一以上のアミノ酸残基が A l a で置換されており、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、抗体。

【請求項 1 2】

位置 2 6 5 のアミノ酸残基が A l a で置換されている請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) と結合する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含み、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) と結合する抗体であって、F c 領域のアミノ酸位置 2 6 5 又は 2 6 9 の一以上にアミノ酸置換を含み、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、抗体。

20

【請求項 1 5】

F c 領域の位置 2 6 5 にアミノ酸置換を含む請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

位置 2 6 5 のアミノ酸が A l a で置換されている請求項 1 4 又は 1 5 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含むイムノアドヘンシンであって、F c 領域のアミノ酸位置 2 6 5 又は 2 6 9 の一以上にアミノ酸置換を含み、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、イムノアドヘンシン。

30

【請求項 1 8】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含むイムノアドヘンシンであって、F c 領域のアミノ酸位置 2 6 5、2 6 9、2 7 0、2 9 7 又は 3 2 7 の二以上にアミノ酸置換を含み、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、イムノアドヘンシン。

40

【請求項 1 9】

変異体ヒト I g G 1 の F c 領域を含むイムノアドヘンシンであって、F c 領域のアミノ酸位置 2 6 5 又は 2 6 9 の一以上のアミノ酸残基が A l a で置換されており、天然配列ヒト F c 領域と比較して減少した結合親和性で F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I と結合し、F c 領域の残基の番号付けはカバットの E U インデックスのものである、イムノアドヘンシン。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 6 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 1 7 から 1 9 の何れか一項に記載のイムノアドヘンシンをコードする核酸。

【請求項 2 1】

50

請求項 20 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 22】

請求項 21 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 17 から 19 の何れか一項に記載のイムノアドヘシンをコードする核酸を含むベクターを含む宿主細胞を培養する工程を含む、請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 17 から 19 の何れか一項に記載のイムノアドヘシンを製造するための方法。

【請求項 24】

宿主細胞により発現された抗体又はイムノアドヘシンを回収する工程を更に含む請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、Fc 領域を含むポリペプチド変異体に関する。より詳細には、本発明は、非変異ポリペプチドのFc 領域における一又は複数のアミノ酸置換により改変されたエフェクター機能を有するFc 領域含有ポリペプチドに関する。

【0002】

(発明の背景)

抗体は、特定の抗原に特異的結合性を示すタンパク質である。天然抗体は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一な重(H)鎖とからなり、約150,000ダルトンの異種四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合するが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変化する。また各重鎖及び軽鎖も規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は一端に可変ドメイン(V_H)、それに続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は一端に可変ドメイン(V_L)、他端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと並び、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

用語「可変」とは、可変ドメインの或る部分が抗体間で配列が広範囲相違し、各特定の抗体のその特定抗原への結合特異性を決定しているという事実を指す。しかしながら、可変性は抗体の可変領域に均一に分布しているのではない。それは、軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方において相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存される部分はフレームワーク(枠)領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きなβ-シート配置をとり、3つのCDRに接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、β-シート構造の一部を形成することもある。各鎖のCDRはFR領域により他の鎖からのCDRとともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。

【0003】

定常領域は、抗体の抗原への結合に直接含まれないが、種々のエフェクター機能を発揮する。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、抗体又は免疫グロブリンは異なるクラスに分類される。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、これらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4；IgA1及びIgA2に分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常領域は、各々α、δ、ε、γ及びμと呼ばれる。種々のヒト免疫グロブリンクラスの中で、ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgMのみが補体を活性化することが知られている。

天然IgG1構造の模式図を図1に提示し、天然抗体分子の種々の部分を示した。抗体

10

20

30

40

50

のパパイン消化は、F a bと呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生成し、各々が単一の抗原結合部位を持ち、残りの「F c」断片という名称は、それが容易に結晶化する可能性を反映している。ヒト I g G F c 領域の結晶構造は同定されている (Deisenhofer, Biochemistry 20: 236102370 (1981))。ヒト I g G 分子において、F c 領域はN-末端からC y s 2 2 6 へのパパイン切断によって生成される。F c 領域は抗体のエフェクター機能の中心である。

抗体F c 領域に媒介されるエフェクター機能は2つの範疇：(1) 抗体が抗原に結合した後には作用するエフェクター機能 (これらの機能は、補体カスケード又はF c レセプター (F c R) 含有細胞の参加を含む)；及び(2) 抗原結合に無関係に作用するエフェクター機能 (これらの機能は、循環の持続性及びトランスサイトーシス(transcytosis)により細胞障壁を横切って輸送される能力を付与する)に分けられる。Ward及びGhetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995)。

10

抗体の必要な抗原への結合は、外来抗原の内因性標的 (例えばレセプター又はリガンド) に対する結合を防止することのできる中和効果を有するが、結合のみでは外来抗原を除去することはできない。外来抗原の除去及び／又は破壊を効果的にするため、抗体に、その抗原に対するより高い親和性、及び有効なエフェクター機能を与えるべきである。

【0004】

F c レセプター (F c R) 結合

抗体又は抗体-抗原複合体と免疫系細胞との相互作用は、抗体依存性細胞障害活性 (A D C C) 及び補体媒介障害活性 (C D C) などを含む、様々な反応に影響を与える (Daeron . Annu. Rev. Immuno. 15:203-234 (1997); Ward and Ghetie, Therapeutic Immunol. 2: 77-94 (1995); Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)を参照)。

20

いくつかの抗体のエフェクター機能は、抗体のF c 領域に結合するF c レセプター (F c R s) によって媒介される。F c R s は、イムノグロブリン アイソタイプに対する特異性により定義される；I g G 抗体に対するF c レセプターは、F c γ R と、I g E に対してはF c ϵ R と、I g A に対してはF c α R などのように、呼ばれている。F c γ R の3つのサブタイプは同定されており：F c γ R I (C D 6 4), F c γ R I I (C D 3 2), F c γ R I I I (C D 1 6) などである。それぞれのF c γ R サブクラスは、2または3つの遺伝子によってコードされており、さらに、選択的スプライシングにより、複数種の転写産物が生じるため、F c γ R アイソフォームには広い多様性が存在する。3つの遺伝子がコードするF c γ R I サブクラス (F c γ R I A, F c γ R I B, F c γ R I C) は、第1染色体の長腕の1 q 2 1. 1 領域にクラスターとして存在している。F c γ R I I アイソフォームをコードする遺伝子 (F c γ R I I A, F c γ R I I B, F c γ R I I C) とF c γ R I I I をコードする2つの遺伝子 (F c γ R I I I A, F c γ R I I I B) はすべて1 q 2 2 領域にクラスターとして存在している。これらの異なるF c R サブタイプは異なる型の細胞上で発現されている (Ravetch and Kinet, Annu.Rev.immunol. 9 :457-492 (1991))。例えば、F c γ R I I I B は好中球上のみ見出され、F c γ R I I I 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)、ある種のT細胞上に見出される。特に、F c γ R I I I A は、A D C C に関係する細胞型であるN K 細胞上に存在する唯一のF c γ R である。

30

40

【0005】

F c γ R I, F c γ R I I とF c γ R I I I は、免疫グロブリンスーパーファミリー (I g S F) レセプターを形成している。F c γ R I は、細胞外領域に3つのI g S F 領域を有し、一方、F c γ R I I とF c γ R I I I は、細胞外領域に2つのI g S F 領域のみを有している。

他のタイプのF c レセプターは、新生児性のF c レセプター (F c R n) である。F c R n は、主要組織適合遺伝子複合体と構造上類似しており、 β 2-マクログロブリンと非共有結合的に結合する α -鎖により構成されている。

【0006】

これまでに、F c γ R に対するヒトおよびマウス抗体の結合部位は、233から239のアミ

50

ノ酸を含む、いわゆる「低ヒンジ領域」に位置付けされている (Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) におけるのと同じ E U インデックスのものである)。Woof et al. Molec. Immunol. 23:319-330(1986); Duncan et al. Nature 332:563 (1988); Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483-1491 (1991); canppel et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 88:9036-9040 (1991)。233から239番目のアミノ酸のうち、238番目のプロリンと239番目のセリンが結合に関与している可能性が指摘されているが、これら2つの残基の可能性については、置換、欠失により完全には確認されていない。

F c γ R との結合に関与していることがすでに指摘されている他の領域は：ヒト F c γ R I に対しては、316番目のグリシンから338番目のリジン (ヒト I g G) (アミノ酸配列からの類似性のみで、置換突然変異より確認されていない)、(Woof et al. Molec. Immunol. 23:319-330(1986)) ; ヒト F c γ R I II に対しては、274番目のリジンから301番目のアルギニン (ヒト I g G1) (ペプチドを基に) (Sarmay et al. Molec. Immunol. 21:43-51(1984)) ; ヒト F c γ R I II に対しては、407番目のチロシンから416番目のアルギニン (ヒト I g G) (ペプチドを基に) (Gergely et al. Biochem. Soc. Trans. 12:739-743(1984)) ; 同様に、マウス F c γ R I I に対しては、297番目のアスパラギンから318番目のグルタミン酸 (マウス I g G2b) (Lund et al. Molec. Immunol. 29:53-59(1992)) である。

I g G3の331番目のプロリンがセリンに置換され、この変異体の標的細胞に対する親和性を解析された。その親和性は変異を導入していない I g G3に比べて1/6以下になったが、F c γ R I との結合において331番目のプロリンが関与している可能性を示唆している (Morrison et al., Immunologist, 2:119-124 (1994); Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483-91 (1991))。

【0007】

C1q 結合

C1q 及び2つのセリンプロテアーゼ、C1r 及び C1s は、補体依存性細胞毒性 (CDC) 経路の第1の成分である複合体 C1 を形成する。C1q は約 460,000 の分子量を持つ6個の分子であり、6つのカラーゲン様「茎」が6つの球状頭領域に結合したチューリップのブーケのような構造を持つ。Burton 及び Woof, Advances in Immunol. 51: 1-84 (1992)。補体カスケードを活性化するためには、C1q が I g G1、I g G2、又は I g G3 の少なくとも2つに結合する必要があるが (共通するのは I g G4 が補体を活性化しないこと)、I g M の1分子のみが抗原性標的に結合する。Ward 及び Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995) 第80頁。

化学修飾及び結晶学的研究の結果に基づいて、Burton 等 (Nature, 288: 338-344 (1989)) は、I g G 上の補助成分 C1q は C H2 ドメインの少なくとも2つの (C-末端) β 鎖を含むと提唱した。Burton は後に (Molec. Immunol., 22(3): 161-206 (1985))、アミノ酸残基 318 から 337 を含む領域が補体固定化に含まれることを示唆した。

Duncan 及び Winter (Nature 332: 738-40 (1988)) は、部位指向性突然変異誘発を用いて、G l u 318、L y s 320 及び L y s 322 が C1q の結合部位を形成すると報告した。Duncan 及び Winter のデータは、マウス I g G2b アイソタイプのモルモット C1q への結合試験から得られたものである。G l u 318、L y s 320 及び L y s 322 残基の C1q の結合における役割は、これら3つの残基を含む短い合成ペプチドの補体媒介溶解を阻害する能力により確認された。類似の結果は、1997年7月15日に発行された米国特許第5,648,260号及び1997年4月29日に発行された米国特許第5,624,821号に記載されている。

【0008】

残基 P r o 331 は、ヒト I g G サブクラスの補体媒介細胞溶解を行う能力の分析により C1q 結合に含まれていた。I g G4 における S e r 331 から P r o 331 への変異は、補体を活性化する能力を付与する (Tao 等, J. Exp. Med., 178: 661-667 (1993); Brekke 等, Eur. J. Immunol., 24: 2542-47 (1994))。

Winterグループのデータ、及びTao等及びBrekke等の論文の比較から、Ghetieは、彼らの概説記事において、C1qの結合には少なくとも2つの異なる領域が含まれ：一方は、Glu318、Lys320及びLys322残基を持つCH2ドメインのβ鎖上にあり、他方は同じβ鎖の極近傍に位置する折り返し点（ターン）にあり、位置331に鍵となるアミノ酸残基を含んでいる。

他の報告は、低いヒンジ領域に位置するヒトIgG1残基Lys235、及びGly237が補体固定化及び活性化において重要な役割を果たすことを示唆した。Xu等, J. Immunol. 150: 152A (要約)(1993)。1994年12月12日に発行されたW094/29351は、ヒトIgG1のC1qとFcRとの結合に必要なアミノ酸残基はCH2ドメインのN-末端領域、即ち残基231から238に局在化することを報告している。

さらに、IgGのC1qに結合する及び補体を活性化する能力も、（通常はAsn297で固着されている）2つのCH2ドメインの間に位置する炭水化物部分の存在、不存在又は修飾に依存することが報告された。Ward及びGhetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995), 第81頁。

【0009】

（発明の概要）

本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチド変異体に関し、その変異体は、ヒトエフェクター細胞存在下において、親ポリペプチドよりも効果的に抗体依存性細胞傷害を媒介し、もしくはFcガンマレセプター（FcγR）に対しより良好な結合親和性を有し、Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸置換を含む。例えば、ポリペプチド変異体は、抗体もしくはイムノアドヘシンから構成され得る。好ましくは親ポリペプチドのFc領域は、ヒトのFc領域から構成される。（例えば、親ポリペプチドはヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域を含んでよい）。ポリペプチド変異体は、好ましくはIgGのFc領域におけるアミノ酸位置256、290、298、312、326、330、333、334、360、378、もしくは430の一又は複数においてアミノ酸置換を含み、前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUIンデックスのものである。

さらに本発明は、改変されたFcガンマレセプター（FcγR）に対する結合親和性を持つFc領域の変異体を提供するが、その変異体は、Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438もしくは439の一又は複数においてアミノ酸置換を含み、前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUIンデックスのものである。好ましくは変異体のFc領域は、ヒトのFc領域から構成される。（例えば、変異体はヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域を含んでよい）。

この点に関連し、前述した技術のうち、親ポリペプチドがヒトではなくマウスFc領域を有する実施において、ここで同定したものと異なるアミノ酸残基がFcRとの結合に影響を与えると考えられてきたことについて、言及しておく。例えば、マウスIgG2b/マウスFcγRII系において、IgGのグルタミン酸318番は、FcRとの結合に重要であるということが見出されたが（Lund et al. Molec. Immunol. 27(1):53-59 (1992)）、その一方でヒトIgG/ヒトFcγRII系においては、318番目のグルタミン酸をアラニンに変更してもその結合力に対して、影響を与えなかった（以下の表6）。

【0010】

ある実施態様において、変更されたFcγR結合活性を持つポリペプチド変異体は、FcγRに対する親和性の低下を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、

249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、373、376、382、414、416、419、434、435、437、438もしくは439の一又は複数においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

例えば、ポリペプチド変異体は、FcγRIに対する親和性の低下を示す可能性があり、Fc領域のアミノ酸位置238、265、269、270、327、もしくは329の一又は複数においてアミノ酸置換を含むであろう。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

10

ポリペプチド変異体は、FcγRIIに対する親和性の低下を示す可能性があり、Fc領域のアミノ酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、382、414、416、419、435、438もしくは439の一又は複数においてアミノ酸置換を含むであろう。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

興味のあるポリペプチド変異体は、FcγRIIIに対する親和性の低下を示す可能性があり、Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、340、373、376、382、388、389、416、436、435、もしくは437の一又は複数においてアミノ酸置換を含むであろう。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

20

【0011】

他の実施態様において、変化したFcγRとの結合親和性を有するポリペプチド変異体は、FcγRに対して向上した親和性を示し、Fc領域のアミノ酸位置255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、298、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、333、334、337、340、360、378、398、もしくは430の一又は複数においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

30

例えば、ポリペプチド変異体は、FcγRIIIに対して増強した親和性を示す可能性があり、また、場合によっては、FcγRIIに対して減少した結合能を示す可能性がある。典型的には、そのような変異体はFc領域のアミノ酸位置298および/もしくは333においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

ポリペプチド変異体は、FcγRIIに対して向上した親和性を示す可能性があり、Fc領域のアミノ酸位置255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、337、340、378、398、もしくは430の一又は複数においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。このようなFcγRIIに対して向上した親和性を示す変異体は、さらに付随的に、FcγRIIIに対して減少した結合能を示す。例えば、Fc領域のアミノ酸位置268、272、298、301、322、もしくは340の一又は複数においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

40

【0012】

さらに本発明は、新生児性の改変されたFcレセプター結合親和性を有するFc領域の変異体から成るポリペプチドを提供する。ポリペプチド変異体は、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288

50

、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439もしくは447の一又は複数においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。このようなFcレセプター (FcRn) に対して減少した親和性を示す変異体は、Fc領域のアミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439、もしくは447の一又は複数においてアミノ酸置換を含む。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。あるいは、前述のポリペプチド変異体は、Fcレセプター (FcRn) に対して向上した親和性を示す可能性があり、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、もしくは434の一又は複数においてアミノ酸置換を含むであろう。前記Fc領域における番号付けはKabataにおけるのと同じEUインデックスのものである。

10

【0013】

また本発明は、ポリペプチド変異体と生理学のもしくは薬学的に許容される担体又は希釈剤を含んでなる組成物も提供する。この潜在的に治療用の組成物は、無菌であり凍結乾燥されていてもよい。

【0014】

20

ここで開示されたポリペプチド変異体の診断及び治療用途が考慮される。一つの診断的応用において、本発明は、対象とする抗原の存在を測定するための方法を提供し、それは、抗原を含有することが疑われる試料をポリペプチド変異体に曝し、ポリペプチド変異体の試料への結合性を測定することを含む。一つの治療的応用においては、疾病または疾患に罹患し、もしくは事前に曝された哺乳動物の治療方法を提供し、それは、本明細書において開示する有効量のポリペプチド変異体、もしくはポリペプチド変異体と薬学的に許容される担体を含んだ形で構成される組成物を、その哺乳動物に投与することを含む。

さらに本発明は、ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸；場合によっては、形質転換された宿主細胞に認識されるコントロール配列に作用可能に結合した核酸を挿入したベクター；ベクターを含んでいる宿主細胞；核酸からタンパク質を発現させ、場合によっては宿主細胞培地から（例えば、宿主細胞培養媒質から）ポリペプチド変異体を回収するために、宿主細胞を培養することを包含するような、ポリペプチド変異体の製造方法を提供する。

30

また本発明は、改変されたFcレセプター (FcR) 結合親和性、もしくは改変された抗体依存性細胞傷害活性を有する変異体Fc領域を作製する方法を提供し、以下より構成される：

(a) 変異体Fc領域を産生するために、親ポリペプチドのFc領域に一又は複数においてアミノ酸置換を導入すること；

(b) 変異体Fc領域のFcレセプター (FcR) に対する結合力を測定する、もしくは変異体Fc領域の抗体依存性細胞傷害を測定すること；

40

この方法の過程 (b) には、インビトロにおいて、変異体Fc領域の一または複数のFcレセプター (FcRs) に対する結合能を測定することが含まれる。さらにその方法により、結果的に改善されたFcレセプター (FcR) との結合親和性、もしくは改善された抗体依存性細胞傷害活性を有する変異体Fc領域を同定することができる。この方法の過程 (b) で、Fc領域のFcRに対する結合能を測定する場合において、FcRsは、例えば、ヒトFcガンマレセプターIII (FcγRIII) であってもよい。方法の過程 (b) で、変異体Fc領域の少なくとも2つの異なるFcRに対する結合能を測定する場合において、調べられるFcRsは、好ましくは、ヒトFcガンマレセプターII (FcγRII) とヒトFcガンマレセプターIII (FcγRIII) を含むのが好ましい。

【0015】

50

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

本明細書と特許請求の範囲を通して、I g G重鎖中の残基の番号付けは、ここに出典を明示して取り込まれるKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のE Uインデックスのものである。「KabatのE Uインデックス」とはヒトI g G 1 E U抗体の残基番号付けを意味する。

「親ポリペプチド」は、ここに開示した一又は複数のF c領域修飾を欠くき、及び、ここに開示したポリペプチド変異体と比較してエフェクター機能が異なるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドである。親ポリペプチドは天然のアミノ酸配列であるF c領域又は(例えば付加、欠失及び/又は置換のような)アミノ酸配列の修飾を持つF c領域を含みうる。

「F c領域」という用語は、図1に示されているようなI g G重鎖のC末端領域を定義するために使用される。「F c領域」は、天然アミノ酸配列であるF c領域、又は修飾を持つアミノ酸配列であるF c領域含みうる。イムノグロブリン重鎖のF c領域の境界は変化するかも知れないが、ヒトI g G重鎖F c領域はC y s 2 2 6またはP r o 2 3 0の位置のアミノ酸残基からカルボキシル末端まで伸展すると定義される。イムノグロブリンのF c領域は、図1に示すように、二つの定常ドメイン、C H 2及びC H 3を含む。

ヒトI g G F c領域の「C H 2」ドメイン(「C y 2」ドメインとも呼ばれる)は通常アミノ酸2 3 1からアミノ酸3 4 0まで伸展する。C H 2ドメインは、他のドメインと密接には対をなさないという点で独特である。むしろ、二つのN-結合分岐炭水化物鎖が未変性の天然I g G分子の二つのC H 2ドメインの間に介在されている。炭水化物はドメインドメイン対形成に対する代替物を提供し、C H 2ドメインを安定化させるのに役立つと推測されてきた。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)。

「C H 3」ドメインは、F c領域におけるカルボキシル末端からC H 2領域まで伸展する。(すなわち、I g Gのアミノ酸3 4 1からおおよそアミノ酸4 4 7まで伸展する。

「機能的なF c領域」は、天然配列のF c領域が有するエフェクター機能を保持する。典型的なエフェクター機能は、C 1 q結合；補体媒介障害活性、F cレセプター結合、抗体依存性細胞障害活性(A D C C)；貪食作用、細胞表面レセプター(すなわち、B細胞レセプター)の低減下などである。このようなエフェクターの機能は、一般に、F c領域が結合領域(つまり、抗体の可変領域)に結合するのに必要とされており、ここで実施例として開示する様々はアッセイを用いることで評価することが可能である。

「天然配列を有するF c領域」は、天然に見出されるF c領域と同一のアミノ酸配列を包含する。天然のアミノ酸配列を有するヒトF c領域は、図2 3に示してあるが、この配列には、天然のヒトI g G 1 F c領域(非A-およびA-アロタイプ)が含まれる；天然のアミノ酸配列を有するヒトI g G 2 F c領域；天然のアミノ酸配列を有するヒトI g G 3 F c領域；天然のアミノ酸配列を有するヒトI g G 4 F c領域、同様に、そこから自然に生じる変異体等も含まれる。天然のアミノ酸配列を有するマウスF c領域は図2 2 Aに示してある。

「変異体F c領域」は、ここで定義するような少なくとも一つの「アミノ酸修飾」により、天然のアミノ酸配列を持つF c領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。特に、変異体F c領域には、天然配列のF c領域もしくは親ペプチドのF c領域と比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換が存在する。例えば、天然配列のF c領域又は親鎖のF c領域において、おおよそ1から10、多くの場合、おおよそ1から5ののアミノ酸の置換が存在する。ここで言う変異体F c領域は、好ましくは少なくとも80%以上の相同性を天然配列のF c領域および/又は親ペプチドのF c領域との間に有するか、さらに好ましくは、90%以上の相同性を、さらに好ましくは少なくとも95%の相同性を有するものであろう

「相同性」とは、最大の相同率を実現するために、必要ならばギャップを導入して、対応の配列と比較整列させた場合、変異体のアミノ酸配列における同一のアミノ酸の割合と

10

20

30

40

50

して定義する。比較配列の方法およびコンピュータープログラムは本技術分野においてよく知られているものである。そのようなコンピュータープログラムの一つは、ジェネテック、インコーポレイテッドにより著作された「整列2」で、1991年12月10日にアメリカ合衆国、著作権局（Washington, DC 20559）に利用者資料伴に提出された。

【0016】

「Fc領域を含んだポリペプチド」という言葉は、Fc領域を含むような抗体もしくはイムノアドヘンシン（下記記載の定義を参照）のようなポリペプチドのことを指す。

「Fcレセプター」もしくは「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を指す。好適なヒトFcRは、天然の配列の事である。さらに、好適なFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）と結合するもので、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIサブクラスを含み、それらの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされたものも含まれる。FcγRII受容体には、FcγRIIA（「活性型受容体」）、FcγRIIB（「阻害型受容体」）が含まれ、主として細胞質領域は異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型受容体FcγRIIAは、細胞質領域にチロシン依存性免疫受容体活性化モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif ;ITAM）を含んでいる。阻害型受容体FcγRIIBは、細胞質領域にチロシン依存性免疫受容体阻害性モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ;ITIM）を含んでいる（M. in Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)）。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); de Haas et al., J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に総説されている。他のFcRs、ここでは、将来的に同定されるものも含めて、「FcR」という言葉によって包含される。また、「FcR」という言葉は、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性受容体「FcRn」（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) Kim et al., J. Immunol.24:249 (1994)、）も含まれる。

【0017】

「抗体依存性細胞傷害」および「ADCC」は、細胞が媒介する反応のことを指し、この反応において、FcRsを発現している非特異的傷害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、マクロファージ）が、標的細胞を認識してその結果、標的細胞の溶解を引き起こす。ADCCを媒介する主要な細胞うち、NK細胞はFcγRIIIのみを発現するのに対し、単球は、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991) の464ページの表3に要約されている。

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又はそれ以上のFcRsを発現し、エフェクターとしての機能を発揮する白血球のことである。その細胞が少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を発揮することが望ましい。ADCCを媒介する細胞の例として、抹消血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞、好中球、が含まれるが、PBMCsとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然の材料（例えば、ここで述べるように、血液やPMBCs）から単離してもよい。

【0018】

「改変された」FcR結合親和性およびADCC活性を有するポリペプチド変異体とは、親ポリペプチドもしくは天然の配列を有するFc領域と比較して強化または減弱化されたFcR結合活性および/もしくはADCC活性を持つ変異体である。FcRに対して「増強した結合能を示す」ポリペプチド変異体とは、少なくとも親ポリペプチドよりはより強く結合する変異体のことである。FcRに対して「減弱した結合能を示す」ポリペプチド変異体は、少なくとも親ポリペプチドよりは弱く結合する。このようなFcRに対して減弱化した結合能を示す変異体は、ほとんど感知できないくらいの弱い結合能（例えば、天然配列のIgG Fc領域と比較して0-20%のFcR結合能、または、ここで示される例のように）しか有していない可能性がある

【0019】

親ポリペプチドよりも「より良好な親和性」を持つFcRと結合するポリペプチド変異体は、ポリペプチド変異体および親ポリペプチドの量を本質的に同じくしてアッセイを行った時、親ポリペプチドよりも本質的により強い結合親和性により、前述したFcRsの一又はそれ以上のものと結合するものである。例えば、改善されたFcR結合能を有するポリペプチド変異体は、約1.15倍から100倍の結合能を示す可能性がある（例えば、ここで開示される例としてFcR結合親和性が測定された際、親ペプチドと比較してFcR結合能が約1.2倍から50倍改善されている）。

【0020】

親ポリペプチドよりも効果的に「抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介する」ポリペプチド変異体は、アッセイにおいて用いるポリペプチド変異体と親ポリペプチドの量を本質的に同一にする時、インビトロもしくはインビボにおいて実質的により効果的にADCCを媒介する変異体のことである。一般にそのような変異体は、ここで開示する試験管内でのADCCアッセイを用いる事で同定する事ができるであろう。しかし、ADCCを測定するその他のアッセイもしくは方法（例えば、動物モデルによるアッセイ）なども考慮すべき方法である。好適な変異体は、約1.5倍から100倍（例えば、ここで開示しているアッセイにおいては、親ポリペプチドより約2倍から15倍の活性を持つ）の活性を有する。

【0021】

「アミノ酸修飾」とは、すでに決定されているアミノ酸の配列における変異のことを指す。典型的な修飾には、アミノ酸の置換、挿入および/もしくは欠失が含まれる。ここでの好適なアミノ酸修飾は、置換である。

特定位置、例えば、Fc領域「におけるアミノ酸修飾」とは、特定されたアミノ酸残基の置換もしくは欠失、または特定されたアミノ酸残基の隣接位置に少なくとも一つのアミノ酸を挿入することを指す。特定されたアミノ酸残基の「隣接位置」への挿入とは、1または2残基以内の挿入を意味する。その挿入は、特定された残基のN末端側、もしくはC末端側の場合があり得る。

【0022】

「アミノ酸置換」とは、すでに決定されているアミノ酸配列に存在する少なくとも1アミノ酸残基を他の異なる「置換」アミノ酸残基で置き換えることを指す。置換残基もしくは、残基群は「天然に存在するアミノ酸」（即ち、遺伝コードでコードされるもの）で良く、アラニン（Ala）；アルギニン（Arg）；アスパラギン（Asn）；アスパラギン酸（Asp）；システイン（Cys）；グルタミン（Gln）；グルタミン酸（Glu）；グリシン（Gly）；ヒスチジン（His）；イソロイシン（Ile）；ロイシン（Leu）；リジン（Lys）；メチオニン（Met）；フェニルアラニン（Phe）；プロリン（Pro）；セリン（Ser）；トレオニン（Thr）；トリプトファン（Trp）；チロシン（Tyr）；およびバリン（Val）。好適には、置換アミノ酸はシステインではない。ここでのアミノ酸置換の定義には、一又はそれ以上の非天然型アミノ酸残基の置換も含める。「非天然型アミノ酸残基」とは、上述した天然アミノ酸以外のアミノ酸で、ポリペプチド鎖においてアミノ酸残基（群）に隣接して共有結合し得るものを指す。非天然型アミノ酸の例には、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、およびその他Ellman et al. Meth,Enzym. 202:301-336 (1991)に記載されているようなアミノ酸類似体が含まれる。非天然型アミノ酸残基を産生するためには、Noren et al. Science 244:182 (1989)およびEllamn et al. supra,の方法を利用することができる。要するに、これらの方法はインビトロにおける転写、翻訳に先立って非天然型アミノ酸にでサプレッサー tRNAを化学的活性化に関する方法である。

【0023】

「アミノ酸挿入」とは、すでに決定されているアミノ酸配列の中に少なくとも1つアミノ酸を取り込ませることである。挿入は通常1または2のアミノ酸残基の挿入により構成されるが、本出願においては、より長い「ペプチド挿入」（例えば、約3から5、さらには約10アミノ酸残基の挿入）を考慮する。挿入された残基（群）は、上述した天然存在もしくは非天然存在アミノ酸である。

「アミノ酸欠失」とは既に決定されているアミノ酸配列から少なくとも1アミノ酸を除去することを意味する。

【0024】

「ヒンジ領域」はヒトIgG1のGlu216～Pro230の伸展として一般に定義されている(Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985))。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間S-S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を同じ位置に配することにより、IgG1と整合させられうる。

Fc領域の「低ヒンジ領域」は、通常、カルボキシル末端からヒンジ領域（すなわち、233番目のアミノ酸残基から239番目のアミノ酸残基）までの伸展として定義されている。本発明に先立ち、FcγRとの結合には、一般に、IgG Fc領域の低ヒンジ領域が寄与しているとされていた。

10

「C1q」は免疫グロブリンのFc領域に対する結合部位を含むポリペプチドである。C1qは二つのセリンプロテアーゼC1r及びC1sと共に、補体依存性細胞毒性(CDC)経路の最初の成分である複合体C1を形成する。ヒトC1qは例えばQuidel, San Diego, CAから商業的に購入可能である。

「結合ドメイン」なる用語は、他の分子に結合するポリペプチドの領域を意味する。FcRの場合には、結合ドメインはFc領域の結合の原因であるそのポリペプチド鎖の一部(例えばそのα鎖)を含みうる。一つの有用な結合ドメインはFcRα鎖の細胞外ドメインである。

【0025】

20

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、特にモノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体(例えば、二重特異的抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限りは抗体断片を包含している。

本発明の目的に対して定義されるところの「抗体断片」は、それらが、アミノ酸残基322、329及び331を含むIgG免疫グロブリン重鎖の定常ドメインのCH2領域を少なくとも保持している限り、一般に無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む、無傷の抗体の一部を含み、単独であるいは他の抗体断片と組み合わせて、選択された抗原を特異的に結合させる能力を有する。抗体断片の例には、線状抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から生成される多重特異的抗体が含まれる。抗体断片は好ましくは少なくともヒンジの部分及び場合によってはIgG重鎖のCH1領域を保持する。より好ましくは、抗体断片はIgG重鎖の全定常領域を保持し、IgG軽鎖を含む。

30

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を称する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対応する。更に、異なる決定基(エピトープ)に対応する異なる抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対応する。「モノクローナル」との形容は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の性質を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature, 256:495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって作ることができる(例えば米国特許第4,816,567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いてファージライブラリから作成することもできる。

40

【0026】

ここに記載のモノクローナル抗体は、特に、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種から由来するか、特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である一方、鎖の残りが、他の種から由来するか、他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、並びにそれらが所望の生物活性を示す限りはその抗体の断片を含む(米国特許第4,816,567号；及び

50

Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分においてヒト化抗体はレシピエントの高頻度可変領域からの残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び能力を有する霊長類などの非ヒト(ドナー抗体)の高頻度可変領域からの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのF_vフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域又はドメイン(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細については、Jones等, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332:323-329 (1988);及びPresta, Curr. Op. Struct. Bio 1, 2:593-596 (1992)を参照されたい。

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性を生じる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び/又は「高頻度可変ループ」からの残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。「フレームワーク」又は「FR」残基はここに定義した高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0027】

ここで使用される場合、「イムノアドヘシン」という用語は、異種性「接着」タンパク質(例えば、レセプター、リガンド又は酵素)の「結合ドメイン」を免疫グロブリン定常ドメインと組み合わせた抗体様分子を示す。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位(抗原結合部位)以外の所望の結合特異性を持つ接着アミノ酸配列及び免疫グロブリン定常ドメイン配列の融合を含んでなる。

ここで使用される「リガンド結合ドメイン」という用語は、対応する未変性のレセプターの定性的リガンド結合能を少なくとも保持している任意の未変性の細胞表面レセプター又はその任意の領域又は誘導体を意味する。特定の実施態様では、レセプターは免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーに対して相同である細胞外ドメインを有する細胞表面ポリペプチドからのものである。他のレセプターは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーではないが、それにもかかわらずこの定義により特にカバーされるものであり、サイトカインに対するレセプター、特にチロシンキナーゼ活性を持つレセプター(レセプターチロシンキナーゼ)、造血素及び神経成長因子レセプタースーパーファミリーのメンバー、及び細胞接着分子、例えば(E-, L-及びP-)セ렉チンである。

「レセプター結合ドメイン」という用語は、細胞接着分子を含む、レセプターに対する任意の未変性のリガンド、又は対応する未変性のリガンドの定性的なレセプター結合能を少なくとも保持するそのような未変性のリガンドの任意の領域又は誘導体を示すために使用される。この定義は、なかでも、上述のレセプターに対するリガンド由来の結合配列を特に含む。

「抗体-イムノアドヘシンキメラ」は、(ここに定義した)抗体の少なくとも一つの結合ドメインを少なくとも一つの(本出願において定義した)イムノアドヘシンと組み合わせた分子を含む。抗体-イムノアドヘシンキメラの例は、Berg等, PNAS (USA) 88:4723-4727 (

1991)及びChamow等, J. Immunol. 153:4268 (1994)に記載された二重特異的C D 4 - I g Gキメラである。

【0028】

「単離された」ポリペプチドは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分は、ポリペプチドの診断又は治療への使用を妨害しうる物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様においては、ポリペプチドは、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、95重量%のポリペプチドより多くなるほど、最も好ましくは99重量%より多くなるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分なまで、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分なまで精製される。ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離されたポリペプチドには、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

10

【0029】

「治療」とは、医療的治療および予防的もしくは防止的手段の事を意味する。治療を必要としている対象には、疾患を予防すべき対象のみならず、すでに疾患が発症している対象も含まれる。

「疾患」とは、ポリペプチド変異体による処置の恩恵を受け得る全ての状態を意味する。これには、哺乳動物にとって問題になっている疾患の素因となる病理学的な状態を含む、慢性的および急性の疾病もしくは疾患をも意味する。1実施例において、疾患とはガンである。

20

【0030】

「ガン」および「ガン性の」という言葉は、無秩序な細胞増殖により、典型的に特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態を意味もしくは著す。ガンの例には、癌腫、リンパ腺腫、芽細胞腫、肉腫、白血病などが含まれるが、これらに限定されるものではない。そのようなガンにおいてさらに特有の例には、扁平細胞腫、小細胞型肺ガン、非小細胞型肺ガン、肺腺癌、肺性扁平細胞腫、腹膜性癌、肝細胞癌、胃腸管癌、すい臓癌、グリフ芽細胞腫、子宮頸癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、大腸癌、結腸癌、子宮内膜もしくは子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌腫、および様々なタイプの頭部、頸部癌を含む。

30

【0031】

「HER2発現性癌」とは、HER2受容体タンパク質をその細胞表面に発現しているため、抗HER2抗体が結合することができると細胞由来の癌である(Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985)およびYamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (ジーンバンクアクセッション番号はX03363))。

【0032】

ここで使用される「標識」なる語句は、ポリペプチドに直接的に又は間接的に抱合した検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自体が検出可能(例えば、放射性標識又は蛍光標識)であり得、あるいは酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変化を触媒しうる。

40

【0033】

「単離された」核酸分子は、同定され、ポリペプチド核酸の天然供給源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にある核酸を通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合されたコ

50

ード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適な対照配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアダニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合され」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に寄与するプレタンパク質として発現されているならそのポリペプチドのDNAに作用可能に結合されている；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならばコード配列に作用可能に結合されている；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるならコード配列と作用可能に結合されている。一般的に、「作用可能に結合される」とは、結合されたDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにある。しかし、エンハンサーは必ずしも近接しているわけではない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、通常的手法にしたがって、合成されたオリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

「細胞」、「株化細胞」及び「細胞培養」は相互に交換可能な意味で用いられ、その全ての用語は子孫を含むものと理解される。従って、「形質転換体」あるいは「形質転換細胞」は、最初の対象細胞及び何度培養が継代されたかに関わらず最初のものから誘導された培養を含む。また、全ての子孫が、意図的な変異あるいは意図しない変異の影響で、正確に同一のDNAを有するわけではないことも理解すべきである。本来の形質転換細胞についてスクリーニングしたものと同一機能又は生物活性を有する変異体子孫が含まれる。命名を区別することが意図されている場合は、文脈から明らかであろう。

【0034】

ここで用いられる「分子複合体」という用語は二又はそれ以上の異種性分子(例えばポリペプチド)が互いに(好ましくは非共有結合的に)結合する場合に生じる比較的安定な構造を意味する。ここで好適な分子複合体は免疫複合体である。

「免疫複合体」は、少なくとも一つの標的分子と少なくとも一つの異種性Fc領域含有ポリペプチドが互いに結合してより大きな分子量の複合体を形成する場合に生じる比較的安定した構造を意味する。免疫複合体の例は抗原-抗体凝集体及び標的分子-イムノアドヘシン凝集体である。ここで使用される「免疫複合体」という用語は、特に断らない限り、エキソビボ複合体(すなわち、自然に見出されうるものの型又はセッティング以外のもの)を意味する。しかしながら、免疫複合体は、例えば哺乳動物における免疫複合体のクリアランスを評価するために哺乳動物に投与することができる。

「標的分子」という用語は、異種性分子により結合され得、異種性分子に対する一又は複数の結合部位を有する分子、通常はポリペプチドを意味する。「結合部位」という用語は他の分子が結合しうる分子の領域を意味する。ここに記載の「第1の標的分子」は、少なくとも二つの被分析物分子が第1の標的分子に結合可能であるような、被分析物(例えばFc領域含有ポリペプチド)に対する少なくとも二つの異なった結合部位(例えば2から5の別個の結合部位)を含む。本発明の好適な実施態様では、二又はそれ以上の結合部位が同一である(例えば標的分子がポリペプチドである場合は同じアミノ酸配列を有する)。以下の実施例1では、第1の標的分子はIgEであり、Fc領域含有ポリペプチド(抗IgE抗体、E27)が結合するそのFc領域に二つの別個の結合部位をそのFc領域に有していた。他の第1の標的分子は実質的に同一なモノマー(例えばニューロトロフィン、IL8及びVEGF)の二量体を含む二又はそれ以上の実質的に同一のポリペプチド鎖(例えば抗体又はイムノアドヘシン)を含むポリペプチドである。「第2の標的分子」は、少なくとも二つの第1の標的分子が第2の標的分子に結合しうるように第1の標的分子に対する少なくとも二つの別個の結合部位(例えば2～5の別個の結合部位)を含む。好ましくは、二又はそれ以上の結合部位は同一である(例えば標的分子がポリペプチドである場合は同じアミノ酸配列を有する)。実施例2において、第2の標的分子はVEGFであり、IgE抗体の変域ドメインが結合しうる一対の別個の結合部位を有する。他の第2の標

的分子も考えられ、例えば実質的に同一なモノマーの他の二量体(例えばニューロトロフィン又はIL8)あるいは二又はそれ以上の実質的に同一なドメインを含むポリペプチド(例えば、抗体又はイムノアドヘシン)が考えられる。

【0035】

「被分析物」は分析される物質である。好適な分析物はFcレセプターに結合するその能力を分析するFc領域含有ポリペプチドである。

「レセプター(受容体)」は少なくとも一つのリガンドを結合しうるポリペプチドである。好適なレセプターは細胞外リガンド結合ドメイン及び場合によっては他のドメイン(例えば、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン及び／又は膜アンカー)を有する細胞表面レセプターである。ここに記載されるアッセイ法で評価されるレセプターは無傷のレセプター又はその断片又は誘導体(例えば一又は複数の異種性ポリペプチドに融合したレセプターの結合ドメインを含む融合タンパク質)でありうる。更に、その結合特性が評価されるレセプターは細胞中に存在するか、単離され、場合によってはアッセイプレート又は他の固相にコーティングされうる。

「低親和性レセプター」という語句は対象のリガンドに対して弱い結合親和性を有するレセプター、例えば約50nMの結合定数又はそれより悪い親和性を有するものを示す。低親和性レセプターの例にはFcγRII及びFcγRIIIが含まれる。

【0036】

II. 発明の実施の形態

ここに記載の発明は、ポリペプチド変異体を製造するための方法に関する、「親」、「出発」又は「非変異体」ポリペプチドが、Fc領域を含むポリペプチドを産生するために従来から利用できる方法を使用して調製される。本発明の好適な実施態様では、ポリペプチドは抗体であり、抗体を産生するための方法の例は次のセクションで更に詳細に説明する。しかし、ポリペプチドは、例えばイムノアドヘシンのようなFc領域を含む任意の他のポリペプチドでありうる。イムノアドヘシンを製造する方法は以下に更に詳細に説明する。

これに換わる実施態様において、Fc領域の変異体はここで開示の方法に従って産生され、「Fc領域の変異体」は、選択した異種のポリペプチド、例えば抗体分子の可変領域もしくはレセプターやリガンドとの結合領域と融合させることも可能である。

親ポリペプチドはFc領域を含んでいる。一般的に、親ポリペプチドのFc領域は天然の配列により構成され、好ましくはヒトの天然配列のFc領域である。しかしながら、親ポリペプチドのFc領域には、天然のFc領域配列から変更もしくは修飾された一又はそれ以上の既存のアミノ酸配列が存在するかもしれない。例えば、Fc領域のC1q結合活性は既に変更されている可能性がある(他のタイプのFc領域修飾については、以下により詳しく記述する)。更なる実施例において、親ポリペプチドのFc領域は「概念的」ではあり、その領域は物理的に存在はしなくても、抗体技術者にとって望ましいFc領域の変異体のアミノ酸配列を決定し、望ましいFc領域の変異体のアミノ酸配列もしくはそれをコードするDNA配列を作製することが可能である。

【0037】

しかしながら、本発明の好適な実施態様において、親ポリペプチドのFc領域をコードする核酸は入手可能であり、この核酸配列はFc領域の変異体をコードする変異体核酸配列を作製するために変更可能である。

出発ポリペプチドのアミノ酸配列変異体をコードするDNAは、従来から公知の様々な方法により調製される。これらの方法には、これに限定されるものではないが、部位指向性(又はオリゴヌクレオチド媒介)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びポリペプチドをコードする前もって調製されたDNAのカセット突然変異による調製が含まれる。

部位特異的突然変異誘発は、置換変異体を調製するための好適な方法である。この方法は従来からよく知られている(例えば、Carter等, Nucl. Acids. Res., 13:4331-4443(1985)及びKunkel等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1987)を参照されたい)。簡潔に言えば、DNAの部位特異的突然変異誘発を実施するには、出発DNAがそのような

出発DNAの一本鎖に所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドを先ずハイブリダイズすることにより改変される。ハイブリダイゼーション後にDNAポリメラーゼが、プライマーとしてハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドを使用し、テンプレートとして出発DNAの一本鎖を使用して、完全な第2ストランドを合成するために使用される。しかして、所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドが得られた二本鎖DNAに導入される。

PCR突然変異誘発もまた出発ポリペプチドのアミノ酸配列変異体を製造するために好適である。Higuchi等, PCR Protocols, pp. 177-183 (Academic Press, 1990);及びVallette等, Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989)を参照されたい。簡潔に述べれば、少量のテンプレートDNAがPCRの出発材料として使用される場合、テンプレートDNAにおける対応する領域とは配列が僅かに異なるプライマーを使用して、プライマーがテンプレートと異なる位置でのみテンプレート配列と異なる比較的多量の特異的NA断片を産生することができる。

【0038】

変異体を調製する他の方法であるカセット突然変異誘発は、Wells等, Gene 34:315-323 (1985)により記載された方法に基づく。出発材料は変異される出発ポリペプチドDNAを含んでなるプラスミド(又は他のベクター)である。変異される出発DNAのコドンが同定される。同定される変異部位の各側に独特な制限エンドヌクレアーゼ部位がなければならない。そのような制限部位が存在しない場合は、出発ポリペプチドDNAの適切な位置にそれを導入するために上述したオリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法を使用してこれを産生しうる。プラスミドDNAはこれらの部位で切断されてそれを線形化する。制限部位間のDNA配列をコードするが所望の変異を含んでいる二本鎖オリゴヌクレオチドは常套的な手順を使用して合成され、そこでは、オリゴヌクレオチドの二本のストランドが別個に合成され、ついで標準的な方法を使用して共にハイブリダイズされる。この二本鎖オリゴヌクレオチドはカセットと呼ばれる。このカセットは線形化されたプラスミドの末端と適合性である5'及び3'末端を有するように設計され、プラスミドに直接に結合できる。しかして、このプラスミドは変異DNA配列を含んでいる。

あるいは、又は付加的に、ポリペプチド変異体をコードする所望のアミノ酸配列を決定することができ、そのようなアミノ酸配列変異体をコードする核酸配列を合成的に生成することができる。

【0039】

親ポリペプチドのアミノ酸配列は、変更されたFcレセプターとの結合親和性もしくはインビトロおよび/もしくはインビボにおける活性、および/もしくは変更された抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を有するFc領域の変異体を産生するために修飾される。一般に、修飾には、一又はそれ以上のアミノ酸置換を伴う。一実施態様では、置換された残基は、図22Aに示されているFc領域の天然アミノ酸配列において、相当(置換残基の位置に)する位置に存在するアミノ酸のいずれも一致しない。例えば、発明の本実施態様に従うと、IgG3もしくはIgG1のFc領域における331番目のプロリンはセリン(ヒトIgG4の天然配列において見出される対応する位置に整列された残基)以外の残基と置換される。ある実施態様においては、置換残基によって置き換えられた親ポリペプチド中の残基はアラニンではなく、および/もしくはFc領域の339番目アラニンではない。アミノ酸置換において、好ましくは親ポリペプチドにおける残基はアラニンで置き換えられている。しかしながら、本発明においては、それ以外のアミノ酸による親ポリペプチド中の置換が考慮されている。例えば、置換は「保存的置換」でもよい。このような保存的置換は「好適な置換」と題して、表1に示してある。さらに本質的な変化は、表1に示す好適な置換ではない、一又はそれ以上の「模範的な置換」を行うことにより達成され得る。

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

【0040】

F c 領域の生物学的活性において本質的な修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又はヘリックス構造、(b) 標的部位もしくは(c) 側鎖全体における分子の電荷又は疎水性、を維持する効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に存在する残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

非保存的置換は、これらの分類の一に属するアミノ酸を他の分類のアミノ酸に交換することが必要であろう。保存的および非保存的なアミノ酸置換は以下の表8において例示してある。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された(非

10

20

30

40

50

保存) 部位に導入されうる。

【0041】

実施例4に示す通り、一又は複数のFcRsに対して変更された結合親和性をもつFc領域の変異体を作することが可能である。例に示すように、種々のクラスのFc領域変異体を作製され得る(例えば、以下に示す表に要約されているように)。Fc領域の変異体が一以上のアミノ酸置換を有する場合、一般に(必ずしもというわけではないが)、望ましい結果に到達するためには同クラスにおけるアミノ酸置換が併用される。

表 2

Fc領域変異体のクラス

クラス	FcR 結合特性	Fc領域置換の位置
1A	全てのFcγRへの低下した結合性	238, 265, 269, 270, 297*, 327, 329
1B	FcγRII及びFcγRIII両方への低下した結合性	239, 294, 295, 303, 338, 373, 376, 416, 435
2	FcγRII及びFcγRIII両方への向上した結合性	256, 290, 312, 326, 330, 339#, 378, 430
3	FcγRIIへの向上した結合性 及び FcγRIII結合性に影響なし	255, 258, 267, 276, 280, 283, 285, 286, 305, 307, 309, 315, 320, 331, 337, 398
4	FcγRIIへの向上した結合性 及び FcγRIIIへの低下した結合性	268, 272, 301, 322, 340
5	FcγRIIへの低下した結合性 及び FcγRIII結合性に影響なし	292, 324, 335, 414, 419, 438, 439
6	FcγRIIへの低下した結合性 及び FcγRIIIへの向上した結合性	298, 333
7	FcγRII結合性に影響なし 及び FcγRIIIへの低下した結合性	248, 249, 252, 254, 278, 289, 293, 296, 338, 382, 388, 389, 434, 437
8	FcγRII結合性に影響なし 及び FcγRIIIへの向上した結合性	334, 360

*脱グリコシル化形

#好ましくは、他のFc領域修飾(例えば、ここに記載のもの)と組み合わせる。

【0042】

アミノ酸置換以外にも、改変したエフェクター効果を有するFc領域の変異体を産生するために、親Fc領域のアミノ酸配列において、本発明においては他の修飾も考慮する。例えば、FcRとの結合性を低下させるためにFc領域の一又は複数のアミノ酸残基を欠失する可能性もある。一般的に、そのようなFc領域の変異体を作製するためには、FcR結合能に影響を与えるものとして本発明において同定された残基(以下の例4を参照)の一又は複数の欠失を行う。一般に、Fc領域の残基のうち高々1から約10残基が、本発明の実施態様に従って欠失されるにすぎない。ここに示す一又は複数のアミノ酸欠失を含むFc領域は、親ポリペプチドFc領域または天然に存在するヒトFc領域の配列の、好ましくは少なくとも約80%、好ましくは90%、さらに好ましくは95%が保持され得るだろう。

【0043】

アミノ酸挿入型Fc領域変異体を作製することも可能であり、その変異体は改変されたエフェクター効果を有する。例えば、FcRとの結合に影響することが、本発明において同定された一又は複数のFc領域の位置に隣接して少なくとも1のアミノ酸(例えば、1または2のアミノ酸残基、一般には多くても10残基)を導入する。「隣接」とは、ここで同定されたFc領域残基と1ないし2アミノ酸残基以内を意味する。そのようなFc領域の変

10

20

30

40

50

異体は、向上もしくは減少したFcR結合能および/もしくはADCC活性を示す可能性がある。そのような挿入型変異体を作製するために、FcRの結合領域（例えば、注目しているFcRの細胞外領域）を含んだポリペプチドとの共結晶化構造や、改善したFcR結合能を有するFc領域の変異体を合理的に構築するため、アミノ酸残基（群）が挿入されたFc領域（例えば、Deisenhofer, Biochemistry 21(9):2361-2370 (1981); および Bumeister et al., Nature 342:379-383 (1994)を参照のこと）を評価することもあり得る。そのような挿入は、一般に、Fc領域の二次構造上（例えば、βシートのような）にではなく、Fc領域のループ構造上に行われる。

【0044】

親ポリペプチドのFc領域に適当なアミノ酸修飾を導入することにより、（a）ヒトエフエクター細胞の存在下で抗体依存性細胞傷害（ADCC）をより効果的に媒介する、および/もしくは（b）親ポリペプチドよりも、より強い親和性でFcガンマ受容体（FcγR）と結合するような、Fc領域の変異体を作出することができる。そのようなFc領域の変異体は、一般に、少なくとも一アミノ酸修飾をFc領域に含むであろう。併用されたアミノ酸修飾は、特に好ましいと考えられる。例えば、ここでのFc領域の変異体は、2, 3, 4, 5個所等の様々な置換（例えば、ここで同定された特異的なFc領域の位置）を含み得る。

好ましくは、親ポリペプチドFc領域はヒトFc領域である、例えば、ヒトIgG1（Aおよび非A アロタイプ）、IgG2、IgG3、もしくはIgG4のFc領域。そのような配列は、図23に示してある。

【0045】

向上したADCC活性を有するFc領域を作製するために、親ポリペプチドは従来から存在するADCC活性を有するのが好ましく、例えば、IgG1もしくはヒトIgG3のFc領域を含む。一実施態様において、改善されたADCC活性を有する変異体は、本質的に、天然配列のIgG1もしくはIgG3のFc領域と変異体の抗原結合領域を有する抗体よりも効果的なADCCを引き起こす。好ましくは、変異体は、Fc領域のアミノ酸位置298、333、および334の位置において2もしくは3残基置換を含む、もしくはそのような置換残基により本来的に構成される。最も好ましくは、298、333、334の位置のアミノ酸残基が（例えば、アラニンに）置換される場合である。さらに、改善されたADCC活性を持つFc領域の変異体を産生するためには、一般に、FcγRII（ADCCを引き起こすのに重要なFcRであると考えられている）に対する改善された結合親和性を持つFc領域の変異体を設計し得るだろう。例えば、そのような変異体を作製するために、一又は複数のアミノ酸位置256、290、298、312、326、330、333、334、360、378、および430において、親Fc領域にアミノ酸の修飾（例えば、置換）を導入することが可能である。さらに、FcγRIIIに対して改善された結合親和性を持つ変異体は、FcγRII、とりわけ、阻害性FcγRIIB受容体に対して、低下した結合親和性を有するかもしれない。

ここで示す実験は、CH2領域がFcR結合活性にとって重要であることを示唆しているため、アミノ酸修飾は、好適には、Fc領域のCH2領域に導入される。さらに、上述技術中の教示と異なり、即時の適用においては、ヒンジ領域以外のFc領域の一部に修飾を導入することも考慮する。

改変されたFcガンマ受容体（FcγR）結合親和性もしくは結合活性を持つIgGのFc領域変異体を産生するための修飾に対して有用なFc領域のアミノ酸位置は、238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438もしくは439の一又は複数においてアミノ

酸置換を含む。好ましくは、そのような変異体を産生する鋳型として使用される親ポリペプチドのFc領域は、ヒトIgGFc領域を含む。331番目のアミノ酸が置換される場合、親Fc領域は、好ましくは、ヒトIgGの天然配列を含まないか、あるいは331番目のアミノ酸に変異を含むFc領域の変異体が、好ましくは、FcRの例えばFcγRIIに対する増強された結合能を示す。

【0046】

FcγRIに対して減少した結合能を持つFc領域の変異体を産生するためには、Fc領域の238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、280、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438もしくは439の一又は複数においてアミノ酸修飾を導入するであろう。

10

FcγRIIに対して減少した結合能を示す変異体は、238、265、269、270、327、もしくは329の一又は複数においてFc領域のアミノ酸修飾により構成されるものを含む。

FcγRIIに対して減少した結合能を示す変異体は、238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438、もしくは439の一又は複数においてFc領域のアミノ酸修飾により構成されるものを含む。

20

FcγRIIIに対して減少した結合能を示すFc領域の変異体は、238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、298、301、303、322、327、329、333、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435、もしくは437の一又は複数においてFc領域のアミノ酸修飾により構成されるものを含む。

一又は複数のFcγRsに対して改善した結合能を示す変異体も、作製することができる。そのようなFc領域の変異体は、Fc領域の一又は複数の位置255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、298、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、333、334、337、340、360、378、398、もしくは430におけるアミノ酸修飾により構成される。

30

例えば、FcγRIに対して改善した結合能を示す変異体はFcγRIIIに対する増強した結合能を、場合によっては、FcγRIIに対して減少した結合能をさらに、示す可能性がある。その変異体は、例示すると、Fc領域の298もしくは/または333の位置にアミノ酸修飾を含む。

FcγRIIに対して増強した結合能を示すFc領域の変異体は、255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、337、340、378、398、もしくは430の一又は複数の位置におけるFc領域アミノ酸修飾により構成されるものを含む。そのような変異体は、さらにFcγRIIIに対する減少した結合能を示す。例えば、それらは、268、272、298、301、322、もしくは340の一または複数の位置にFc領域アミノ酸修飾を含む。

40

【0047】

FcγRIに対する結合能を改変させることが好ましい場合、ここでは、新生児性のレセプター(FcRn)に対する改変された親和結合性を持つFc領域の変異体についても考慮する。FcRnに対して改善された親和性を持つFc領域の変異体は、血清中においてより長い半減期を持つことが予想される。そして、投与されたポリペプチドが長い半減期で存在することが望まれるような哺乳動物を治療する方法において(例えば、慢性的な疾病もしくは疾患)、そのような分子は、有用な適用性を持つであろう。これに反して、F

50

c R nに対する減少した結合親和性を持つF c領域の変異体は、より短い半減期を持つことが期待される。そして、そのような分子は、例えば、より短い循環時間の方が効果的（生体内の画像診断法もしくは長時間血流中において循環していると毒性のある副作用を示すようなポリペプチドなど）であるような哺乳動物に対して投与され得る。減少したF c R n結合親和性を持つF c領域の変異体は、胎盤を通過することは稀であろうと予想される。従って、そのような変異体は、妊娠中の女性の疾患もしくは疾病の治療において有用であろう。

F c R nに対して改変された親和性を持つF c領域の変異体は、238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439、もしくは447の一又は複数におけるF c領域アミノ酸修飾により構成されるものを含む。F c R nに対して減少した結合能を示す変異体は、一般に、252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439、もしくは447の一又は複数におけるF c領域アミノ酸修飾により構成され；F c R nに対する増強した結合能を示す変異体は、通常、238、256、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、もしくは434の一又は複数におけるF c領域アミノ酸修飾により構成される。

【0048】

前述のように調製されたポリペプチド変異体は、しばしばポリペプチドの目的とされる使用法に依存するが、さらなる修飾を施し得る。そのような修飾は、アミノ酸配列のさらなる改変（アミノ酸配列の置換、挿入および/もしくは欠失）、異種性のポリペプチドとの融合および/もしくは共有結合性の修飾が含まれる。このような「さらなる修飾」は、F cレセプター結合能および/もしくはA D C C活性の改変に帰着するような上記開示のアミノ酸修飾に先立って、もしくは同時にもしくは引き続いて導入し得る。一実施態様においては、ここに示すF c領域修飾と本出願中の「関連する技術」の項において挙げた参考文献中に開示されたF c領域の置換とを併用する。

場合によっては、もしくは付加的に、上記の修飾とF c領域のC1q結合能および/または補体依存性細胞毒性を変化させるような、一又は複数のさらなるアミノ酸修飾を併用することは、有効であり得る。

【0049】

ここで特に興味のある出発ポリペプチドは、通常はC1qに結合し、補体依存性細胞毒性(CDC)を示すものである。ここに記載したさらなるアミノ酸置換は、一般に出発ポリペプチドがC1qに結合し、及び/又はその補体依存性細胞毒性機能を改変する能力を改変し、例えばこれらのエフェクター機能を低減し、好ましくは破壊することに役立つであろう。しかしながら、改善されたエフェクター機能を持つ一又は複数の記載された位置での置換を含むポリペプチドがここで考えられる。例えば、出発ポリペプチドはC1qに結合できず及び/又はCDCを媒介できず、これらあのエフェクター機能を獲得するようにここに記載した教唆に従って修飾されうる。更に、予め存在するC1q結合活性を持ち、場合によってはCDCを媒介する能力を更に有するポリペプチドが、これらの活性の一方又は両方が向上させられるように修飾されうる。

改変されたC1q結合能及び/もしくは、補体依存性細胞毒性(CDC)を持つF c領域を産生するためには、修飾されるアミノ酸の位置は、一般に重鎖の位置270、322、326、327、329、331、333及び334から選択され、ここでI g G重鎖における残基の番号付けはKabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載されたようなE Uインデックスのものである。一実施態様において、上記同定された8個の残基のうち1個のみが、改変されたC1q結合能及び/もしくは補体依存性細胞毒性(CDC)機能を持つポリペプチド変異体を製造するために変更されている。好まし

くは、実際には270、329もしくは322の位置のアミノ酸残基のみが変更されている。場合によっては、上記同定されたアミノ酸のうち2もしくはそれ以上の位置が修飾されている。もし、置換が併用された場合、一般に、ヒトC1q結合能を向上させるような修飾（例えば、326、327、333、および334）、もしくは、C1q結合能を減少させるような修飾（例えば、270、322、329、および331）、が併用される。その後の実施例においては、4つ全ての位置（例えば、270、322、329、および331）が置換され得る。好ましくは、インビトロもしくはインビボにおいて、向上されたC1q結合能および好ましく改善されたCDC活性を持つポリペプチドを産生するために、326、327、333、もしくは334の位置における2または3もしくは全てのさらなる置換が併用され、場合によっては、他のFc領域の置換を伴う。

10

【0050】

プロリンはヒトIgG'sの329位に保存される。この残基は好ましくはアラニンで置換されるが、例えばセリン、スレオニン、アスパラギン、グリシン又はバリンのような任意の他のアミノ酸での置換も考えられる。

プロリンはヒトIgG1、IgG2およびIgG3の331位に保存されるがIgG4(331位にはセリン残基を有する)では保存されない。残基331は好ましくはアラニン又は他のアミノ酸、例えばセリン(IgG4以外のIgG領域に対して)、グリシン又はバリンにより置換される。

リジン322はヒトIgGsにおいて保存され、この残基は好ましくはアラニン残基により置換されるが、任意の他のアミノ酸残基、例えばセリン、スレオニン、グリシン又はバリンによる置換も考えられる。

20

D270はヒトIgGsにおいて保存され、この残基は、例えばアラニン、セリン、スレオニン、グリシン、バリン、又はリジンのような他のアミノ酸残基により置換されうる。

K326もまたヒトIgGsにおいて保存される。この残基は、限定されるものではないが、バリン、グルタミン酸、アラニン、グリシン、アスパラギン酸、メチオニン、又はトリプトファンを含む他の残基により置換され得、トリプトファンが好ましい。

同様に、E333もまたヒトIgGsにおいて保存される。E333は、好ましくは、より小さい側鎖容積を持つアミノ酸残基、例えばバリン、グリシン、アラニン又はセリンにより置換され、セリンが好ましい。

30

K334はヒトIgGsにおいて保存され、アラニンのような他の残基又はその他の残基で置換されうる。

ヒトIgG1及びIgG3において残基327はアラニンである。改善されたC1q結合を持つ変異体を生成するためには、このアラニンがグリシンのような他の残基と置換される。IgG2及びIgG4において、残基327はグリシンであり、これはC1q結合を破壊するためにアラニン(又は他の残基)により置換されうる。

上記に開示したように、改変されたエフェクター機能を持つFc領域を構築することができる(例えば、C1q結合能及び/もしくはFcR結合能を修飾したり、CDC活性及び/もしくはADCC活性を変更することによる)。例えば、改善されたC1q結合能およびFcγRIII結合能を有するFc領域の変異体を;例えば、改善されたADCC活性およびCDC活性の両方を有する変異体、を産生することができる。場合により、エフェクター効果が軽減され、もしくは除去される事を望む場合には、減少したCDC活性および/もしくはADCC活性を持つFc領域の変異体を設計することが可能である。他の実施態様においては、これらの活性のうち1のみを増強し、場合によっては、他の活性を減少させる(例えば、ADCC活性は向上されCDC活性は減少されるようなFc領域の変異体を産生すること)事ができ得る。

40

【0051】

更なるアミノ酸配列の修飾については、ポリペプチド変異体の正しい高次構造を維持することに関与しないシステイン残基を、一般にはセリンと置換して、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止することも可能である。

50

他のタイプのアミノ酸置換はポリペプチドのグリコシル化パターンを改変するものである。これは、ポリペプチド中に見出される一又は複数の炭水化物部分を除去し、及び／又はポリペプチド中に見出されない一又は複数のグリコシル化部位を付加することによって、達成される。ポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN-結合かO-結合である。N-結合はアスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付着を意味する。Xがプロリン以外のアミノ酸であるアスパラギン-X-スレオニンのトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的付着に対する認識配列である。しかし、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が創製される。O-結合グリコシル化は、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた使用しうるが、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの付着を意味する。ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列が一又は複数の上述のトリペプチド配列(N-結合グリコシル化部位に対するもの)を含むようにこれを改変することにより簡便に達成される。改変は、(O-結合グリコシル化に対する)原ポリペプチドの配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加又は置換によりまたなされる。例示的なグリコシル化変異体は重鎖の残基A s n 2 9 7のアミノ酸置換を有している。

【0052】

さらに、クラス、サブクラスあるいはFc領域のアロタイプは、所望の異なるクラス、サブクラス、アロタイプにより相同性の高いアミノ酸配列を持つFc領域を産生するために、一又は複数の更なるアミノ酸置換によって改変され得る。例えば、マウスのFc領域は、よりヒトのFc領域に相同性の高い配列を作製するために改変され得る；ヒト非AアロタイプIgG1Fc領域は、AアロタイプIgG1Fc領域などを得るために修飾され得る。一実施態様において、FcR結合能および/もしくはADCC活性を改変するアミノ酸修飾は、Fc領域のCH2ドメインに導入され、CH3ドメインは、欠失されているか、もしくは他の二量体化ドメインにより置換されている。しかしながら、好適には、CH3ドメインが保持されている（ここで開示されているようにエフェクター機能を変化させるようなアミノ酸修飾を除く）。

【0053】

ポリペプチド変異体は出発ポリペプチドと比較した生物活性の任意の変化を評価するための一又は複数のアッセイにかけることができる。

好ましくは、ポリペプチド変異体は、非変異体ポリペプチドと比較して抗原結合能を本質的に保持し、すなわち、その結合能は非変異体ポリペプチドの約1/20程は悪くない（例えば、約1/5倍までは悪くない）。ポリペプチド変異体の結合能は、例えば蛍光標式細胞分取(FACS)分析又は放射免疫沈降(RIA)のような技術を使用して定量することができる。

FcRに結合するポリペプチド変異体の能力もまた評価しうる。FcRがFcレセプター、例えばFcγRI又はFcRnもしくはFcγRIIA-V158に対して高親和性である場合、モノマーポリペプチド変異体を滴定し、標準的なELISA型式でポリペプチド変異体に特異的に結合する抗体を使用して結合ポリペプチド変異体を測定することにより、結合を測定することができる(以下の実施例2を参照されたい)。低親和性FcRsに対する他のFcR結合アッセイは、実施例1および実施例4において説明する

【0054】

ポリペプチド変異体のADCC活性を評価するために、実施例4において記述されているようなインビトロにおけるADCCアッセイは、様々はエフェクター：標的物質の比率を用いることにより実施することができる。そのようなアッセイにおいて有用な「エフェクター細胞」には、抹消血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは場合によっては、ポリペプチド変異体のADCC活性はインビボにおいて評価することが可能である(例えば、Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデル)。

C1qに結合し補体依存性細胞毒性(CDC)を媒介する変異体の能力を評価することが

できる。

C1q結合を定量するためには、C1q結合ELISAを実施することができる。簡潔に言えば、コーティングバッファーに入れたポリペプチド変異体又は出発ポリペプチド(対照)を4℃で一晩かけてアッセイプレートに塗布する。ついでプレートを洗浄し、ブロックする。洗浄に続いて、一定分量のヒトC1qを各ウェルに添加し室温で2時間インキュベートする。更なる洗浄に続いて、100μlのヒツジ抗-補体C1qペルオキシダーゼ抱合体抗体を各ウェルに添加し室温で1時間インキュベートする。プレートを再び洗浄バッファーで洗浄し、OPD(O-フェニレンジアミンジヒドロクロリド(シグマ))を含む100μlの基質バッファーを各ウェルに添加してよい。黄色の出現により観察される酸化反応を30分行わせ、100μlの4.5NのH₂SO₄の添加により停止させる。ついで(492-405)nmで吸光度を読み取る。

10

ポリペプチド変異体の例はこのアッセイで「C1q結合に有意な減少」を示すものである。これは、約100μg/mlのポリペプチド変異体が、非変異IgG1のFc領域を持つ100μg/mlの対照抗体と比較して約50倍かそれ以上のC1q結合の減少を示すことを意味する。最も好適な実施態様では、ポリペプチド変異体は「C1qを結合しない」、すなわち100μg/mlのポリペプチド変異体は100μg/mlの対照抗体と比較して約100倍かそれ以上のC1q結合の減少を示す。

変異体の他の例は、「親ポリペプチドよりもヒトC1qに対してより良好な結合親和性を有する」ものである。そのような分子は、例えば、親ポリペプチドに比較して約2倍又はそれ以上、好ましくは約5倍又はそれ以上のヒトC1q結合の改善を示しうる(例えばこれらの二分子に対してのIC₅₀値で)。例えば、ヒトC1qは、親ポリペプチドと比較して約2倍から約500倍、好ましくは約2倍又は約5倍から約1000倍改善される。

20

【0055】

補体の活性化を評価するために、補体依存性細胞毒性(CDC)アッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。簡潔に言えば、様々の濃度のポリペプチド変異体とヒト補体がバッファーで希釈される。ポリペプチド変異体が結合する抗原を発現する細胞を~1x10⁶細胞/mlの密度まで希釈する。ポリペプチド変異体、希釈ヒト補体及び抗原発現細胞の混合物を平底組織培養96ウェルプレートに添加し、37℃と5%のCO₂で2時間インキュベートさせ、補体媒介細胞溶解を促進する。ついで、50μlのアラマーブルー(Accumed International)を各ウェルに添加して37℃で一晩インキュベートする。530nmでの励起と590nmでの発光を伴う96ウェルのフルオロメータを使用して吸光度を測定する。結果は相対蛍光単位(RFU)で表現される。試料濃度は標準曲線から算定することができ、非変異体ポリペプチドと比較した活性パーセントが興味あるポリペプチド変異体に対して報告される。

30

更に他の変異体の例は、「補体を活性化しない」ものである。例えば、ポリペプチド変異体の0.6μg/mlは、非変異IgG1のFc領域を有する0.6μg/mlの対照抗体と比較してこのアッセイで約0-10%のCDC活性を示す。好ましくは変異体は上記のCDCアッセイではCDC活性を有するとは思われない。

40

本発明はまた親ポリペプチドと比較してCDCが増加したポリペプチド変異体、例えば、(比較される各分子のIC₅₀値で)インビトロ又はインビボで約2倍から約100倍のCDC活性の改善を示すものに関する。

【0056】

A. レセプター結合アッセイ及び免疫複合体

例えばFcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA及びFcγRIIIBに対する場合のように、マイクロモルの範囲で、レセプターに対する被分析物の親和性が比較的弱い場合において、興味ある被分析物のレセプターへの結合を定量するのに特に有用であるレセプター結合アッセイ法がここに開発された。該方法は、非複合化被分析物と比較して興味のあるレセプターに対して改善された結合力を有する分子複合体の生成を含む。

50

好適な分子複合体は、(a) Fc領域含有ポリペプチド(例えば、抗体又はイムノアドヘシン)；(b) Fc領域含有ポリペプチドに対して少なくとも二つの結合部位を含む第1の標的分子；及び(c)第1の標的分子に対して少なくとも二つの結合部位を含む第2の標的分子、を含んでなる免疫複合体である。

下記の実施例1では、Fc領域含有ポリペプチドは抗-IgE抗体、例えば、E27抗体(図4A-4B)である。E27は、1:1のモル比でヒトIgEと混合されると、三つのE27分子と三つのIgE分子とからなる安定な六量体を形成する。以下の実施例1において、「第1標的分子」は、抗VEGF抗体のFab部分がヒトIgEのFc部分に融合したIgEのキメラ型であり、「第2標的分子」はFabが結合する抗原(すなわち、VEGF)である。IgEの各分子は二つのVEGF分子に結合する。VEGFはまたVEGF一分子当たりIgE二分子に結合する。2:1のモル比で組み換えヒトVEGFがIgE:E27六量体に付加された場合、六量体はIgE:VEGF相互作用を介してより大きな分子量の複合体に連鎖される(図5)。得られる免疫複合体の抗IgE抗体のFc領域は、未複合化抗IgE又は抗IgE:IgE六量体の何れよりも高い結合力をもってFcRに結合する。

レセプター結合実験法に使用される分子複合体の他の型も考えられる。Fc領域含有ポリペプチド:第1標的分子の組み合わせのみを含む例には、イムノアドヘシン:リガンドの組み合わせ、例えばVEGFレセプター(KDR)-イムノアドヘシン:VEGF及び全長二重特異性抗体(bsAb):第1標的分子が含まれる。Fc領域含有ポリペプチド:第1標的分子:第2標的分子の組み合わせの更なる例には、非阻止抗体:可溶性レセプター:リガンドの組み合わせ、例えば抗Trk抗体:可溶性Trkレセプター:ニューロトロフィンが含まれる(Urfer等, J. Biol. Chem. 273(10):5829-5840 (1998))。

レセプター結合アッセイにおける使用とは別に、上述の免疫複合体はFc領域含有ポリペプチド機能の評価及び免疫複合体のインビボでのクリアランスを含む更なる用途を有している。従って、免疫複合体は哺乳動物に投与され(例えば臨床前動物実験)、その半減期等々が評価される。

【0057】

レセプター結合を定量するには、興味のあるレセプターの結合ドメインを少なくとも含むポリペプチド(例えばFcRのαサブユニットの細胞外ドメイン)を固相、例えばアッセイプレート上に塗布する。レセプターの結合ドメインだけあるいはレセプター融合タンパク質を標準的な手法を使用してプレートに塗布する。レセプター融合タンパク質の例には、レセプター-グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質、レセプター-キチン結合ドメイン融合タンパク質、レセプター-ヘキサHisタグ融合タンパク質(それぞれ、グルタチオン、キチン、及びニッケル被覆プレートに塗布)が含まれる。あるいは、捕獲分子をアッセイプレートに被覆し、融合タンパク質の非レセプター部分を介してレセプター-融合タンパク質を結合するために使用することができる。例には、レセプター-ヘキサHis尾部融合を捕獲するために使用されるアッセイプレートに被覆された抗ヘキサHis F(ab')₂又はレセプター-GST融合を捕捉するために使用されるアッセイプレートに被覆された抗GST抗体が含まれる。他の実施態様では、レセプターの結合ドメインを少なくとも発現する細胞の結合性が評価される。細胞は、興味あるFcRを発現する天然に生じる造血細胞でありえ、又はFcRをコードする核酸又は試験細胞の表面に結合ドメインが発現されるようにその結合ドメインで形質転換されうる。

上述した免疫複合体はレセプター被覆プレートに添加され、分析物がレセプターに結合するように十分な時間インキュベートされる。ついで、プレートを洗浄して未結合複合体を除去し、既知の方法によって被分析物の結合性を検出することができる。例えば、結合性は、被分析物に特異的に結合し、場合によっては検出可能な標識とコンジュゲートする試薬(例えば抗体又はその断片)を使用して検出することができる(検出可能な標識とそれをポリペプチドにコンジュゲートさせる方法は、「ポリペプチド変異体の非治療的用途」と題された下記のコラムにおいて記載される)。

【0058】

簡便さの点から、アッセイキット、すなわち、興味のあるレセプターに結合する分析物の能力を検査する際に分析物と組み合わせられる試薬の包装した組み合わせとして、試薬を提供することができる。キットの成分は一般には予め決められた比で提供される。キットは第1標的分子及び／又は第2標的分子を提供し、場合によってはこれらは共に複合化されている。キットは更にレセプター又はその結合ドメイン(例えばFcRのαサブユニットの細胞外ドメイン)で被覆されたアッセイプレートを含むことができる。通常は、酵素標識で直接又は間接に標識された、他の試薬、例えば検査される分析物に特異的に結合する抗体がまたキットに提供される。検出可能な標識が酵素である場合は、キットは基質及び酵素によって必要とされる補助因子(例えば、検出可能なクロモフォア又はフルオロフォアを提供する基質前駆体)を含むであろう。また、他の添加物、例えば安定剤、バッファー(例えばアッセイ及び／又は洗浄溶解バッファー)等々が含まれうる。様々な試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度をもたらしために広く変化させられうる。特に、試薬は、適切な濃度を有する試薬溶液を解凍時に提供する賦形剤を含む、通常は凍結乾燥された乾燥粉末として提供されうる。キットはまた好適にはアッセイを実施するための指示書を含む。

【0059】

B. 抗体の調製

本発明の好適な実施態様において、ここでの教唆に従って改変されるFc領域含有ポリペプチドは抗体である。抗体を生産する技術は以下の通りである。

(i) 抗原の選択と調製

ポリペプチドが抗体である場合、それは興味のある抗原に対するものである。好ましくは、抗原は生物学的に重要なポリペプチドであり、病気又は疾患に罹っている哺乳動物への抗体の投与によりその哺乳動物に治療的恩恵が生じうる。しかし、非ポリペプチド抗原に対する抗体(例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第5091178号参照)もまた考えられる。

抗原がポリペプチドである場合、それは膜貫通分子(例えば、レセプター)あるいはリガンド、例えば成長因子でありうる。抗原の例には、例えば、レニン；ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク；α-1-アンチトリプシン；インシュリンA-鎖；インシュリンB-鎖；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子VIIIC、因子IX、組織因子、及びvon Willebrands因子等の凝固因子；プロテインC等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界面活性剤；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化剤(t-PA)等のプラスミノゲン活性化剤；ボンベシン；トロンビン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子-α及び-β；エンケファリナーゼ；RANTES(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1-α)；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ミューラー阻害物質；リラキシンA-鎖；リラキシンB-鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；ベーターラクタマーゼ等の微生物タンパク質；DNアーゼ；IGE；CTLA-4のような細胞毒性Tリンパ球関連抗原(CTLA)；

インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子(VEGF)；ホルモン又は成長因子のレセプター；プロテインA又はD；リウマチ因子；脳誘導神経向性因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)、又はNGF-β等の神経成長因子等の神経成長因子；血小板誘導成長因子(PDGF)；aFGF及びbFGF等の繊維芽成長因子；表皮成長因子(EGF)；TGF-α及びTGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、又はTGF-β5を含む、TGF-βのようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インシュリン様成長因子-I及び-II(IGF-I及びIGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インシュリン様成長因子結合タンパク質；CD3、CD4、CD8、CD19及びCD20等のCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質(BMP)；イン

ターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（C S F s）、例えば、M-C S F、GM-S C F、及びG-C S F；インターロイキン（I L）、例えば、I L-1からI L-10；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス性抗原、例えばA I D Sエンベロープの一部等；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン(addressin)；調節タンパク質；インテグリン、例えばC D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c、C D 1 8、I C A M、V L A -4及びV C A M；腫瘍関連抗原、例えばH E R 2、H E R 3又はH E R 4レセプター；及び上に列挙したポリペプチドの何れかの断片が含まれる。

【0060】

本発明により包含される抗体に対する好適な分子標的には、C Dタンパク質、例えばC D 3、C D 4、C D 8、C D 1 9、C D 2 0及びC D 3 4；E r b Bレセプターファミリーのメンバー、例えばH E R 2、H E R 3又はH E R 4レセプター；細胞接着分子、例えばL F A-1、M a c 1、p 1 5 0.9 5、V L A-4、I C A M-1、V C A M及びその α 又は β サブユニットを何れか含む α v / β 3インテグリン(例えば、抗C D 1 1 a、抗C D 1 8又は抗C D 1 1 b抗体)；成長因子、例えばV E G F；I g E；血液型抗原；f l k 2 / f l t 3レセプター；肥満(O B)レセプター；m p lレセプター；C T L A-4；プロテインC等々が含まれる。

他の分子と場合によっては抱合していてもよい、可溶型抗原又はその断片を、抗体を産生するための免疫原として使用することができる。レセプターのような膜貫通分子に対しては、これらの断片(例えば、レセプターの細胞外ドメイン)を免疫原として使用することができる。あるいは、膜貫通分子を発現する細胞を免疫原として使用することもできる。そのような細胞は天然源(例えば、癌株化細胞)から取り出すことができ、又は膜貫通分子を発現するために組み換え法により形質転換された細胞でありうる。抗体の調製に対して有用な他の抗原とその型は当業者には明らかであろう。

【0061】

(ii)ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(s c)又は腹腔内(i p)注射することにより、動物に産生される。免疫化されている種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C l₂、又はR¹ N = C = N R(ここで、RとR¹は異なったアルキル基である)を使用して、関連抗原を抱合させることが有用である。

動物を、例えばタンパク質又は抱合体100 μ g又は5 μ g(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1 / 5ないし1 / 10のペプチド又は抱合体を用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原の抱合体であるが、異なったタンパク質に抱合させた、及び／又は異なった架橋剤を介して抱合させた抱合体で追加免疫する。抱合体はまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0062】

(iii)モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えD N A法(米国特許第4,816,567号)によって作成することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスター

10

20

30

40

50

もしくはマカクザルを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプ

10

テリン、及びチミジンを含有するであろう(HAT培地)。
好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーグ・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックヴィル、メリーランド、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

20

【0063】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水症腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

30

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

モノクローナル抗体をコードするDNAは、常法を用いて(例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体の組換え生産は以下に更に詳細に説明する。

40

【0064】

更なる実施態様において、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marks等, J.Mol.Biol., 222:5

50

81-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は鎖シャッフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生産(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266 (1993))を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

DNAはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常部のコード化配列を、相同的マウス配列の代わりに置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrison等, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることにより、修飾することができる。

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常部を置換し、又は抗体の1個の抗原結合部位の定常部を置換して、抗原に対する特異性を有する1個の抗原結合部位、及び異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0065】

(iv)ヒト化およびヒト抗体

ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された一又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「移入」残基と呼ばれ、これは典型的には「移入」可変ドメインから取られている。ヒト化は、本質的にはウィンターと共同研究者の方法(Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven等, Science, 239:1534-1536 (1988))に従って、齧歯類CDR又はCDR配列でヒト抗体の対応配列を置換することにより、実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質上小さい部分が非ヒト種由来の対応配列によって置換されているキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際、ヒト化抗体は、典型的には、幾つかのCDR残基及びことによると幾つかのFR残基が、齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

ヒト化抗体の作成に使用される軽鎖と重鎖両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク(FR)として受け入れる(Sims等, J.Immunol., 151:2296 (1993); Chothiaら, J.Mol.Biol., 196:901 (1987))。もう一つの方法は、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用するものである。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用することができる(Carter等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J.Immunol., 151:2623 (1993))。

【0066】

更に、抗体は、抗原に対する高親和性及び他の望ましい生物学的性質を保持したままヒト化することが重要である。この目的を達成するため、好ましい方法によれば、親配列及び様々な概念的ヒト化生成物を、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いて分析する工程によって、ヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用でき、当業者には良く知られている。選ばれた候補免疫グロブリン配列の可能な三次元コンホメーション構造を例示し表示するコンピュータープログラムが利用できる。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能な役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原を結合させる能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにしてレシピエント及び移入配列からのFR残基を選択し、結びつけることができ、所望の抗体の特性、例えば標的抗原に対する親和性の増加が達成される。一般に、CDR残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合への影響に関与する。

別法として、免疫時に内因性免疫グロブリンの産生なしにヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが今は可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすということが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスでのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらすであろう。例えば、Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggerman等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 及びDuchosal等, Nature 355:258 (1992)を参照されたい。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリから取り出すこともできる(Hoogenboom等, J.Mol.Biol., 227:381 (1991); Marks等, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan等, Nature Biotech 14:309 (1996))。

【0067】

(v)多重特異性抗体

多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対する結合特異性を有する。このような分子は通常は二つの抗原を結合させるのみであるが(すなわち、二重特異性抗体、BsAbs)、三重特異性抗体のような更なる特異性を持つ抗体もここで使用される場合この表現に包含される。BsAbの例には、一方の腕が腫瘍細胞抗原に向けられ他方の腕が細胞毒性トリガー分子に向けられたもの、例えば抗-FcγRI/抗-CD15、抗-p185^{HER2}/FcγRIII(CD16)、抗-CD3/抗-悪性B細胞(1D10)、抗-CD3/抗-p185^{HER2}、抗-CD3/抗-p97、抗-CD3/抗-腎臓細胞癌腫、抗-CD3/抗-OVCAR-3、抗-CD3/L-D1(抗-大腸ガン腫)、抗-CD3/抗-メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗-EGFレセプター/抗-CD3、抗-CD3/抗-CAMA1、抗-CD3/抗-CD19、抗-CD3/MoV18、抗-神経細胞接着分子(NCAM)/抗-CD3、抗-葉酸塩結合タンパク質(FBP)/抗-CD3、抗-全癌腫随伴抗原(AMOC-31)/抗-CD3; 腫瘍抗原に特異的に結合する一つの腕と毒素に結合する一つの腕を持つBsAb、例えば、抗-サポリン/抗-Id-1、抗-CD22/抗-サポリン、抗-CD7/抗-サポリン、抗-CD38/抗-サポリン、抗-CEA/抗-リシンA鎖、抗-インターフェロンα(IFN-α)/抗-ハイブリドマイディオタイプ、抗-CEA/抗-ピンカアルカロイド; (マイトマイシンホスフェートのマイトマイシンアルコールへの転換を触媒する)抗-CD30/抗-アルカリホスファターゼのような酵素活性化プロドラッグを転換するためのBsAb; 抗-フィブリン/抗-組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)、抗-フィブリン/抗-ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)のような線維素溶解剤として使用することができるBsAb; 抗-低密度リポタンパク質(LDL)/抗-Fcレセプター(例えばFcγRI、FcγRII又はFcγRIII)のような細胞表面レセプターへ免疫複合体をターゲットイングするためのBsAb; 抗-CD3/抗-単純ヘルペスウィルス(HSV)、抗-T細胞レセプター:CD3複合体/抗-インフルエンザ、抗-FcγR/抗-HIVのような感染性疾患の治療に使用されるBsAb; 抗-CEA/抗-EOTUBE、抗-CEA/抗-DPTA、抗-p185^{HER2}/抗-ハプテンのようなインビトロ又はインビボでの腫瘍検出のためのBsAb; ワクチンアジュバントとしてのBsAb; 及び抗-ウサギIgG/抗-フェリチン、抗-セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)/抗-ホルモン、抗-ソマトスタチン/抗-サブスタンスP、抗-HRP/抗-FITC、抗-CEA/抗-βガラクトシダーゼのような診断ツールとしてのBsAbが含まれる。三重特異性抗体の例には、抗-CD3/抗-CD4/抗-CD37、抗-CD3/抗-CD5/抗-CD37及び抗-CD3/抗-CD8/抗-CD37が含まれる。二重特異性抗体は全長抗体又は抗体断片(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

【0068】

二重特異性抗体を作成する方法は当分野において既知である。全長二重特異性抗体の伝統的な組換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの該鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539 (1983))。免疫

グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第WO 93/08829号及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

異なったアプローチ法によると、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を、免疫グロブリン不変ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常部との融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、そして、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、作成に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率を提供する態様において、三つのポリペプチドフラグメントの相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又は、その比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

このアプローチ法の好適な実施態様において、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方の腕のハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方の腕のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)で構成される。二重特異性分子の半分しか免疫グロブリン軽鎖がないことで容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体を作製する更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。国際公開WO 96/27011号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置換される。大きな側鎖と同じ又はより小さいサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(アラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモ二量体のような不要の他の最終産物に対してヘテロ二量体の収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0069】

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロ抱合体抗体」もまた含む。例えば、ヘテロ抱合体の抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞を標的とするため(米国特許第4,676,980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(WO 91/00360, WO 92/00373, 及びEP 03089)。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

ここで興味のあるポリペプチドは好ましくは抗体であるが、ここに記載した方法に従って修飾できる他のFc領域含有ポリペプチドも考えられる。そのような分子の例はイムノアドヘシンである。

【0070】

C. イムノアドヘシンの調製

最も簡単で最も直接的なイムノアドヘシンの設計は、アドヘシンの結合ドメイン(例えば、レセプターの細胞外ドメイン(ECD))を免疫グロブリン重鎖のFc領域と組み合わ

10

20

30

40

50

せるものである。通常は、本発明のイムノアドヘシンを調製する場合、アドヘシンの結合ドメインをコードする核酸を、免疫グロブリン定常ドメイン配列のN末端をコードする核酸にC末端的に融合されるが、N末端融合もまた可能である。

典型的には、そのような融合において、コード化されるキメラポリペプチドは免疫グロブリン重鎖の定常ドメインの機能的に活性なヒンジ、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ ドメインを保持する。融合はまた定常ドメインのFc領域のC末端、又は重鎖の $C_H 1$ 又は軽鎖の対応する領域にN末端に直ぐになされる。融合がなされる正確な部位は重要なものではない；特定の部位がよく知られており、イムノアドヘシンの生物活性、分泌、又は結合特性を最適化するために選択されうる。

好適な実施態様では、アドヘシン配列が免疫グロブリン G_1 (IgG_1)のFc領域のN末端に融合される。アドヘシン配列に重鎖定常領域全体を融合させることができる。しかし、より好ましくは、 IgG のFcを化学的に定めるパパイン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域に始まる配列(すなわち、重鎖定常領域の最初の残基を114として残基216)、又は他の免疫グロブリンの類似部位が融合において使用される。特に好適な実施態様では、アドヘシニアミノ酸配列は IgG 重鎖の(a)ヒンジ領域及び $C_H 2$ 及び $C_H 3$ 又は(b) $C_H 1$ 、ヒンジ、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ ドメインに融合される。

【0071】

二重特異的イムノアドヘシンについては、イムノアドヘシンは多量体として、特にヘテロ二量体又はヘテロ四量体として組み立てられる。一般には、これらの組み立てられた免疫グロブリンは既知の単位構造を有している。基本的な四鎖構造単位は IgG 、 IgD 及び IgE が存在する型である。四鎖単位はより高分子量の免疫グロブリンにおいて繰り返される； IgM は一般にジスルフィド結合によって一緒に保持される四つの基本単位の五量体として存在する。 IgG グロブリン、そして時折 IgG グロブリンが血清中に多量体型で存在しうる。多量体の場合、四つの単位の各々は同じでも異なってもよい。

ここに記載した範囲内の様々な組み立てられたイムノアドヘシンの例は以下に概略的に模式化される：

- (a) $AC_L - AC_L$ ；
- (b) $AC_H - (AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, \text{又は} V_L C_L - AC_H)$ ；
- (c) $AC_L - AC_H - (AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, \text{又は} V_L C_L - V_H C_H)$ ；
- (d) $AC_L - V_H C_H - (AC_H, \text{又は} AC_L - V_H C_H, \text{又は} V_L C_L - AC_H)$ ；
- (e) $V_L C_L - AC_H - (AC_L - V_H C_H, \text{又は} V_L C_L - AC_H)$ ；及び
- (f) $(A - Y)_n - (V_L C_L - V_H C_H)_2$ ；

ここで、各Aは同一又は異なったアドヘシニアミノ酸配列を示し；

V_L は免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；

V_H は免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；

C_L は免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；

C_H は免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

nは1より大きい整数であり；

Yは共有結合架橋剤の残基を示す。

簡潔のため、先の構造はキーとなる特徴を示しているのみである；これらは、免疫グロブリンの結合する(J)又は他のドメインを示していないしジスルフィド結合も示していない。しかし、そのようなドメインが結合活性に対して必要である場合は、それらを構築して、免疫グロブリン分子にそれらが占める通常的位置に存在させることができる。

あるいは、アドヘシン配列は、キメラ重鎖を含んでなる免疫グロブリンが得られるように、免疫グロブリン重鎖と軽鎖配列の間に挿入することができる。この実施態様では、アドヘシン配列は免疫グロブリンの各アームの免疫グロブリンの重鎖の3'末端に、ヒンジと $CH 2$ ドメインの間、又は $CH 2$ と $CH 3$ ドメインの間の何れかで融合される。同様な作成物がHoogenboom等, Mol. Immunol. 28:1027-1037(1991)によって報告されている。

免疫グロブリン軽鎖の存在は本発明のイムノアドヘシンにおいて必要ではないけれども

、免疫グロブリン軽鎖はアドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合的に結合するか、アドヘシンに直接的に融合されるかもしれない。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは典型的にはアドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードするDNAと同時に発現される。分泌時に雑種重鎖及び軽鎖が共有結合的に結合されて、二つのジスルフィド結合免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含んでなる免疫グロブリン様構造を提供する。そのような構造の調製に好適な方法は、例えば1989年3月28日に発行された米国特許第4,816,567号に開示されている。

イムノアドヘシンは最も簡便には免疫グロブリンcDNA配列にインフレイムでアドヘシン部分をコードするcDNA配列を融合させることにより構築される。しかし、ゲノム免疫グロブリン断片への融合もまた使用することができる(例えば、Aruffo等,Cell61:1303-1313(1990);及びStamenkovic等,Cell66:1133-1144(1991)を参照されたい)。融合の後者のタイプは、発現に対してIg調節配列の存在を必要とする。IgG重鎖定常領域をコードするcDNAは、脾臓又は抹消血リンパ球から取り出されたcDNAライブラリーからの刊行された配列に基づいて、ハイブリダイゼーションにより、又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)法により単離することができる。「アドヘシン」をコードするcDNAとイムノアドヘシンの免疫グロブリンが、選ばれた宿主細胞において効率的な発現を指示するプラスミドベクター内にタンデムに挿入される。

【0072】

D. ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明はまたここに開示したポリペプチド変異体をコードしている単離された核酸、該核酸を含むベクター及び宿主細胞、及びポリペプチド変異体の生産に対する組換え方法を提供する。

ポリペプチド変異体の組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター内に挿入される。ポリペプチド変異体をコードするDNAは直ぐに単離され、通常の手法(例えば、ポリペプチド変異体をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用するもの)を用いて配列決定される。多くのベクターが公的に入手可能である。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、次のものの一又は複数が含まれる：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列である。

【0073】

(i)シグナル配列成分

本発明のポリペプチド変異体は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。天然ポリペプチド変異体シグナル配列を認識せずプロセッシングしない原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母の分泌に関しては、天然シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含む)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー、又は国際特許出願第W0 90/13646号に記載されているシグナルにより置換されうる。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。

このような前駆体領域のDNAは、好ましくは、ポリペプチド変異体をコードするDNAにリーディングフレームが結合される。

(ii)複製開始点成分

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクタ

10

20

30

40

50

一の複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、この配列はクローニングベクターにおいて、宿主染色体DNAとは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド pBR322 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である(SV40開始点が典型的には初期プロモーターを有しているため用いられる)。

【0074】

(iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

選択技術の一例においては、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、抗薬物性を付与し、選択工程を生存するタンパク質を生産する。このような優性選択の例としては、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸又はハイグロマイシンが使用される。

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、ポリペプチド変異体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することのできるもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、まず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞である。

【0075】

あるいは、ポリペプチド変異体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選べるマーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地における細胞増殖により選択することができる。米国特許第4,965,199号を参照。

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979))。trp1遺伝子は、例えば、ATCC第44076号あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。酵母宿主細胞ゲノムにtrp1破壊が存在することは、トリプトファンの不存在下における増殖による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2欠陥酵母株(ATCC 20,622あるいは38,626)は、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

さらに、1.6 μ mの円形プラスミドpKD1由来のベクターは、クルイヴェロマイシス(Kluyveromyces)酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え子ウシのキモシンの大量生産のための発現系がK.ラクティス(lactis)に対して報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株からの、組換えによる成熟したヒト血清アルブミンを分泌する安定した複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

【0076】

(i v) プロモーター成分

発現およびクローニング用ベクターは、宿主生物によって認識され、かつポリペプチド変異体をコードする核酸と動作可能な状態で結合されているプロモータを含んでいる。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは *p h o A* プロモーター、 β ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(*trp*)プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば *t a c* プロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するプロモータもまたポリペプチド変異体をコードする DNA と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子は、転写開始部位からおよそ 25 ないし 30 塩基上流に見出される AT リッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写開始位置から 70 ないし 80 塩基上流に見出される他の配列は、N が任意のヌクレオチドである C N C A A T 領域である。大部分の真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A 尾部の付加に対するシグナルである A A T A A A 配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

【0077】

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母の発現に好適に用いられるベクターとプロモータは EP 736 57 に更に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に好適に用いられる。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのポリペプチド変異体転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス 2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B 型肝炎ウィルス及び最も好ましくはサルウィルス 40 (SV40) のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40 ウィルスの初期及び後期プロモーターは、SV40 ウィルスの複製起点をさらに含む SV40 制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E 制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主で DNA を発現する系が、米国特許第 4,419,446 号に開示されている。この系の変更例は米国特許第 4,601,978 号に開示されている。また、単純ヘルペスウィルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞におけるヒト β インターフェロン c DNA の発現について、Reyes 等, *Nature*, 297: 598-601 (1982) を参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0078】

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明の R T D をコードしている DNA の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。哺乳動物の遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フ

10

20

30

40

50

ェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物のプロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、RTDコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0079】

(vi)転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、RTDをコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開WO 94/11026とここに開示した発現ベクターを参照されたい。

【0080】

(vii)宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキヤンス及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びバシリ・リチェフォルミス(licheniformis)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD 266,710に開示されたバシリ・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC 31446)であるが、他の大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC 31537)及び大腸菌W3110(ATCC 27325)のような株も好適である。これらの例は限定

【0081】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ポリペプチド変異体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシヤ、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でここで使用でき、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ；クルイペロマイセス宿主、例えばK.ラクティス、K.フラギリス(ATCC 12424)、K.ブルガリカス(ATCC 16045)、K.ウィッケラミイ(ATCC 24178)、K.ワルチイ(ATCC 56500)、K.ドロソフィラルム(ATCC 36906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアナス；ヤローウィア(EP 402226)；ピチアパストリス(EP 183070)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア(EP 244234)；アカパンカビ；シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス；及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリボクラジウム、及びコウジカビ属宿主、例えば偽巢性コウジ菌及びクロカビが使用できる。

【0082】

グリコシル化ポリペプチド変異体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。このような宿主細胞は、複雑なプロセッシング及びグリコシル化活動が可能である。原則的には、脊椎動物であろうと無脊椎動物培養であろうと、任意のより高等の真核生物細胞培養が使用できる。無脊椎動物細胞の例としては植物及び昆虫細胞が含まれる。多数の

10

20

30

40

50

バキュロウィルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドプテラ・フルギペルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンビクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウィルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニカNPVのL-1変異体とボンビクス・モリNPVのBm-5株が公に利用でき、そのようなウィルスは本発明においてここに記載したウィルスとして使用でき、特にスポドプテラ・フルギペルダ細胞の形質転換に使用できる。

綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することができる。

【0083】

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になった。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株[293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Grahamほか, J. Gen Viro l., 36:59 (1977)]; ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞[TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)]; サルの腎細胞(CVI ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞[Motherほか, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)]; MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝癌株(Hep G2)である。

宿主細胞は、ポリペプチド変異体生成のための発現又はクローニングベクターで形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適当に修飾された常套的栄養培地で培養する。

【0084】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明のポリペプチド変異体を生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、Ham(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地(「MEM」, シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地(「DMEM」, シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第5,767,704号; 同4,657,866号; 同4,927,762号; 4,560,655号; 又は同5,122,469号; 国際公開WO 90/03430; 国際公開WO 87/00195; 又は米国特許再発行第30,985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシンTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0085】

(ix) ポリペプチド変異体精製

組換え技術を用いる場合、ポリペプチド変異体は細胞内、細胞膜周辺腔に生成され、又は媒質内に直接分泌される。ポリペプチド変異体は細胞内に生成された場合、第1の工程として、粒子状の細片、宿主細胞又は溶解された断片のいずれかが、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。Carter等, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)は、大腸

10

20

30

40

50

菌の細胞膜周辺腔に分泌された抗体の単離方法を記載している。簡単には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム (pH3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) の存在下で約30分間解凍する。細胞細片は遠心分離で除去できる。ポリペプチド変異体が媒質に分泌された場合、そのような発現系からの上清は、一般的には第1に市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過ユニットを用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製したポリペプチド変異体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、ポリペプチド変異体に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト γ 1、 γ 2、又は γ 4重鎖に基づくポリペプチド変異体の精製に用いることができる (Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト γ 3に推奨されている (Guss等, EMBO J. 5: 16571575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。ポリペプチド変異体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商品名)樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換膜での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂 (ポリアスパラギン酸カラム) 上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿も、回収されるポリペプチド変異体に応じて利用可能である。

任意の予備精製工程に続いて、対象とするポリペプチド変異体と汚染物とを含む混合物に、約2.5-4.5のpHでの溶離バッファーを用いて、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度 (例えば、約0-0.25M塩) で実施される。

【0086】

E. 製薬製剤

ポリペプチド変異体の治療用製剤は、所定の純度を持つポリペプチド変異体と、場合によっては製薬的に許容される単体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより (Remington's Pharmaceutical sciences 16th edition, Osol, A. 編, (1980))、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製され彫像される。許容される単体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンズアルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール、メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール等)；低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体 (例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び/又はTWEEN(商品名)、PLURONICS(商品名)又はポリエチレングリコール (PEG) を含む。

ここでの製剤は、治療される特定の徴候のために必要ならば1以上の活性化化合物も含んでよく、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものである。そのような分子は、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

また活性成分は、各々例えばコアセルベーション技術又は界面重合により調製されたマ

イクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリペプチド-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル、コロイド状ドラッグデリバリー系（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、(Remington's Pharmaceutical sciences 16th edition, Osol, A. 編, (1980)に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、ポリペプチド変異体を含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリペプチド(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号))、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT(商品名)（分解性乳酸注グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる射可能な微小球）、及びポリ-D-(−)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間止まると、37℃の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物学的活性及び免疫原性における可能な変化を喪失させる。合理的な戦略は、含まれるメカニズムに応じて安定化のために考案できる。例えば、凝集メカニズムがチオージスルフィド交換を通した分子間S-S結合であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適当な添加剤の使用、及び特定のポリマーマトリクス組成物の開発によって達成される。

【0087】

F. ポリペプチド変異体の非治療的用途

本発明のポリペプチド変異体は、アフィニティ精製剤として使用することができる。このプロセスでは、ポリペプチド変異体は、この分野で良く知られた方法を用いてセファデックス樹脂又は濾紙などの固相上に固定化される。固定化されたポリペプチド変異体を精製すべき抗原を含有する試料と接触させ、その後支持体を適当な溶媒で洗浄し、その溶媒は、固定化ポリペプチド変異体に結合した精製すべき抗原を除く試料中の実質的に全ての物質を除去する。最後に、支持体をグリシンバッファー、pH5.0等の他の適当な溶媒で洗浄して、抗原をポリペプチド変異体から放出させる。

またポリペプチド変異体は、例えば、対象とする抗原の特定細胞、組織、又は血清における発現を検出するための診断アッセイにおいても有用である。

診断的応用においては、ポリペプチド変異体は典型的に検出可能な部分で標識される。多数の標識は利用可能であり、それらは一般的に以下の範疇にグループ分けされる：

(a) 放射性同位体、例えば、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及び ^{131}I 等。ポリペプチド変異体は、例えばCurrent Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan等, 編, Wiley-Interscience, New York, Pubs. (1991)に記載された技術を用いて放射性同位体で標識され、放射活性はシンチレーションカウンティングにより測定できる。

(b) 蛍光標識、例えば希土類キレート（ユーロピウムキレート）又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン(Lissamine)、フィコエリトリン及びテキサスレッド等が使用できる。蛍光標識は、例えば上掲のCurrent Protocols in Immunologyに開示された技術を用いてポリペプチド変異体に抱合させることができる。

(c) 種々の酵素-基質標識が利用でき、米国特許第4,275,249号は、それらの幾つかの概説を提供している。酵素は一般に、種々の技術を用いて測定可能な色素原基質の化学変換を触媒する。例えば、酵素は基質における色変化を触媒視、それは分光学的に測定可

能である。あるいは、酵素は基質の蛍光又は化学発光を変化させることもある。蛍光変化を定量化する技術は上述した。化学発光基質は化学反応によって電子的に励起され、次いで（例えば化学発光計を用いて）測定可能な光を放出する、または蛍光受容体にエネルギーを供与する。酵素標識の例は、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2, 3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸塩デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P O）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソザイム、糖類オキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、ヘテロ環オキシダーゼ（ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等を含む。酵素を抗体に抱合させる技術は、O'Sullivan等, Methods for Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (編J. Langone & H. Van Vunakis) Academic press, New York, 73: 147-166 (1981)に記載されている。

【0088】

酵素-基質の組み合わせは、例えば以下を含む：

(i)セイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P O）と基質としての過酸化水素、過酸化水素が染料前駆物質（例えば、オルトフェニレンジアミン（O P D）又は3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンヒドロクロリド（T M B））を酸化する；

(ii)アルカリホスファターゼ（A P）と色素原基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェート；

(iii) β -D-ガラクトシダーゼ（ β -D-G a l）と色素原基質（例えば、p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシダーゼ）又は蛍光原基質4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシダーゼ。

当業者には、多くの他の酵素-基質の組み合わせが利用可能である。これらの一般的な概説は、米国特許第4,275,149号及び第4,318,980号を参照。

標識はポリペプチド変異体に間接的に抱合されるときもある。当業者は、これを達成するための種々の技術を知っているであろう。例えば、ポリペプチド変異体にビオチンを抱合し、上記3つの範疇の標識の任意のものにアビジンを抱合する、又はその逆が可能である。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、よってこの間接的な方式でポリペプチド変異体に標識を抱合させることができる。あるいは、ポリペプチド変異体での標識の間接的抱合を達成するために、ポリペプチド変異体に小さなハプテン（例えばジゴキシン）を抱合させ、上記した異なる型の標識を抗-ハプテンポリペプチド変異体（例えば抗-ジゴキシン抗体）に抱合させる。よってポリペプチド変異体での標識の間接的抱合が達成できる。

本発明の他の実施態様では、ポリペプチド変異体を標識する必要はなく、その存在がポリペプチド変異体に結合する標識抗体を用いて検出させる。

本発明のポリペプチド変異体は任意の公知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ等で用いられうる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

またポリペプチド変異体は、インビボ診断アッセイでも使用できる。一般的に、ポリペプチド変異体は放射性核種（ ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 又は ^{35}S 等）で標識され、抗原又はそれを発現する細胞が免疫シンチオグラフィーによって局在化される。

【0089】

G. ポリペプチド変異体のインビボ用途

本発明のポリペプチド変異体は、哺乳動物、例えば疾患又は障害に罹患し、ポリペプチド変異体の投与の恩恵を受けることのできる患者の治療に使用できると考える。ポリペプチド変異体で処理できる状態は多く、癌（例えば、ポリペプチド変異体がH E R 2レセプター又はC D 2 0に結合する場合）；喘息等のアレルギー状態（抗-I g E抗体で）；及

びLFA媒介疾患（例えば、ポリペプチド変異体が抗-LFA-1又は抗-ICAM-1である場合）等を含む。

抗体がHER2受容体に結合する場合、好適には、疾患がHER2発現型の癌の場合である。例えば、HER2受容体の過発現によって良性か悪性かの性質を決めることができる。そのような癌には、乳癌、扁平細胞腫、小細胞型肺ガン、非小細胞型肺ガン、胃腸管癌、すい臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、肝細胞腫、大腸癌、結腸癌、子宮内膜癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌腫、および様々なタイプの頭部、頸部癌を含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0090】

ここでの教示に従って、改善もしくは減弱化されたADCC活性を有するFc領域の変異体を含むポリペプチドを調製する事ができる。そのような分子は、様々な疾患の治療に対して、適用することになる。

例えば、改善されたADCC活性を有するポリペプチド変異体は、組織又は外来性の微生物を破壊もしくは除去する事が望まれるような疾患又は疾病において用いられる可能性がある。例えば、そのポリペプチドは、癌；炎症性疾患；感染症（例えば、バクテリア、ウィルス、真菌もしくは酵母などの感染）；およびさお式の除去が望まれるようなその他の状態（甲状腺腫のような）等、の治療に用いられるであろう。

ポリペプチド変異体が減弱化したADCC活性を有する場合、そのような変異体は、長い半減期を持つポリペプチドで構成されるFc領域が適しているが、そのエフェクター機能は望ましいものではないような疾病もしくは疾患を治療するために用いられるであろう。例えば、そのようなポリペプチドで構成されるFc領域は、抗組織因子抗体；抗IgE抗体；および抗インテグリン（例えば、抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体）などが考えられる。そのようなポリペプチドで構成されるFc領域の活性において望まれる機構は、リガンド受容体結合対を阻害することである可能性がある。さらに、減弱化されるADCC活性を有するポリペプチドFc領域は、アゴニスト抗体の可能性もある。

ポリペプチド変異体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、および局所的な免疫的抑制治療が望まれる場合には、その病巣内への与薬などを含む、あらゆる適した方法により投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下投与を含む。さらに、ポリペプチド変異体は、特に減少させたポリペプチド変異体用量で、パルス注入によって適切に投与される。好ましくは、投与は注射によって、最も好ましくは、部分的には投与が簡潔か慢性的かに応じて、静脈内又は皮下注射によってなされる。

疾患の予防又は治療のために、ポリペプチド変異体の適切な用量は、治療すべき疾患の型、疾患の重篤さ及び経路、ポリペプチド変異体投与が予防的か治療目的か、従前の治療、患者の臨床履歴及びポリペプチド変異体に対する反応、及び担当医師の判断に依存する。ポリペプチド変異体は、一時に又は一連の治療を通じて適切に患者に投与される。

疾患の重篤さに応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{--}20\text{mg}/\text{kg}$ ）のポリペプチド変異体が、患者への候補となる初期投与であり、例えば一又は複数の別々の投与、あるいは連続注入のいずれかによる。典型的な1日の用量は、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であるが、上記の要因に依存する。数日間以上に渡る繰り返し投与については、状態応じて、望まれる疾患状態の抑制が起こるまで治療を続ける。しかしながら、他の用量計画も有用である場合もある。この療法の進行は、従来の技術及びアッセイで容易に監視できる。

ポリペプチド変異体組成物が処方され、用量決定(dose)され、良好な医学的実務に適合する方式で投与される。ここで考慮すべき因子は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的状态、疾患の原因、薬剤の輸送部位、投与方法、投与計画、及び医学実務者に知られた他の因子を含む。投与すべきポリペプチド変異体の「治療的有効量」は、それらを考慮して決定され、疾患又は障害を予防、改善、又は治療するのに必要な最小量である。ポリペプチド変異体は、問題とする疾患の予防又は治療に現在使用されている一又は複数の他の薬剤とともに製剤する必要はないが、場合によってはそのようにされる。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在するポリペプチド変異体

の量、疾患又は治療の型、及び上述した他の因子に依存する。これらは、一般的にはこれまでに使用されたのと同じ用量かつ投与経路で、あるいはこれまでに使用された用量の1から99%で用いられる。

【0091】

本発明は以下の実施例によってより十分に理解されるであろう。しかしながら。これらは本発明の範囲を限定すると解してはならない。ここに述べた全ての文献及び特許引用例は参考として全体を取り入れるものとする。

実施例1

低親和性レセプター結合アッセイ

このアッセイは、H i s 6-グルタチオンSトランスフェラーゼ (G S T) -タグ融合タンパク質として発現された組換えF c γ R I I A、F c γ R I I B及びF c γ R I I I A αサブユニットへのI g G F c領域の結合性を決定する。I g G 1のF c領域のF c γ R I I I Aに対する親和性はナノモル範囲であるので、I g G 1 F c変異体の結合性は単量体I g Gの滴定及び標準的なE L I S A方式(下記実施例2)でのポリクローナル抗-I g Gと結合したI g Gの測定によって測定できる。しかしながら、F c γ Rファミリーの他のメンバー、例えば、F c γ R I I A、F c γ R I I B及びF c γ R I I I AのI g Gに対する親和性はマイクロモル範囲であり、単量体I g Gのこれらレセプターへの結合性はE L I S A方式で信頼性良く測定することはできない。

以下のアッセイは、組換え抗-I g E E 2 7 (図4 A及び4 B)のF c変異体を用い、それはヒトI g Eと1:1モル比で混合すると3つの抗-I g E分子及び3つのI g E分子からなる安定な六量体を形成する。I g Eの組換えキメラ形態(キメラI g E)を加工し、ヒトI g E F c領域及び抗-V E G F抗体のF a bからなり(Presta等, Cancer Research 57: 4593-4599 (1997))、それは抗-V E G F分子当たり2つのV E G F分子と結合する。組換えヒトV E G FをキメラI g E:E 2 7六量体と2:1のモル比で添加すると、六量体は、I g E F a b:V E G F相互作用を介してより大きな分子量の複合体に結合する。この複合体のE 2 7成分は、より高い結合活性を持つF c γ R I I A、F c γ R I I B及びF c γ R I I I A αサブユニットと結合し、E L I S A方式での検出を可能にする。

【0092】

材料及び方法

レセプターコート: F c γ レセプターαサブユニットを、E C D-6 H i s-G S T融合タンパク質をもたらす293細胞のH i s 6タグ細胞外ドメイン(E C D) G S T融合物として発現させ(Graham等, J. Gen. Virol. 36: 59-72 (1977)及びGorman等, DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10 (1990))、N i-NTAカラムクロマトグラフィー(Qiagen, Australia)により精製し、リン酸緩衝塩水(P B S)にバッファー交換した。濃度は、アミノ酸組成分析から誘導した減衰係数を用いて280nmにおける吸収により決定した。レセプターをNunc F96 maxisorbプレート(カタログ番号439454)上に、P B S中1 μg/mlのレセプター-G S T融合物の100 μlを添加することによりウェル当たり100ngでコートし、4℃において48時間インキュベートした。アッセイの前に、プレートを3x250 μlの洗浄バッファー(0.5%のTWEEN20(登録商標)を含むP B S pH7.4)で洗浄し、250 μlのアッセイ用バッファー(50mMトリス緩衝塩水、0.05%TWEEN20(登録商標)、0.5% R I A等級ウシ血清(Sigma A7888)及び2mMのE D T A pH7.4)でブロックした。

免疫複合体形成: 等モル量(1:1)のE 2 7及びキメラI g E分子当たり2モルの組換えヒトV E G Fに結合する組換えキメラI g Eを、12x75mmポリプロピレン管にP B S中で添加し、25℃で30分間回転させて混合した。このインキュベーションの間にE 2 7(抗-I g E)／キメラI g E(I g E)六量体が形成される。組換えヒトV E G F(165形態、MW 44,000)をI g E濃縮物に2:1のモル比で添加し、25℃でさらに30分間回転させて混合した。V E G F-キメラI g E結合は、E 2 7:キメラI g E六量体をより大きな分子量の複合体に結合させ、それはE 2 7抗体のF c領域を介してF c γ R αサブユニットE C Dコートプレートに結合する。

E 2 7 : キメラ I g E : V E G F (1:1.2モル比) 複合体を、5 μ g の E 2 7 濃縮物及び4
パイのアッセイ用バッファー中の1 μ g の全 I g G において F c γ R α サブユニットコート
プレートに添加し、オービタル振盪機上で25°Cにおいて120分間インキュベートした。

複合体検出：プレートを5x 洗浄バッファーで洗浄して未結合の複合体を除去し、アッ
セイ用バッファー中1:10,000のセイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) 抱合ヤギ抗-
ヒト I g G (γ) 重鎖特異物 (Boehringer Mannheim 1814249) 100 μ l を添加してオービタ
ル振盪機上で25°Cにおいて90分間インキュベートすることにより I g G 結合を検出する。
プレートを5x 洗浄バッファーで洗浄して未結合の H R P ヤギ抗-ヒト I g G を除去し、基
質溶液 (0.4mg/ml の o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド、sigma P6912、6mM の H₂
O₂ P B S 中) の100 μ l を添加して25°Cにおいて8分間インキュベートすることにより抗-
I g G を検出する。酵素反応は、100 μ l の4.5N の H₂ S O₄ の添加により停止させ、96ウ
ェルプレート濃度計 (Molecular Devices) 上で比色生成物を490nmにおいて測定する。
E 2 7 変異複合体の結合性を、野生型 E 2 7 複合体の割合として表した。

【0093】

実施例 2

ヒト I g G 抗体における独特な C 1 q 結合部位の同定

この実験では、抗体の C 1 q への結合性を無くすが抗体の高次構造は変えず各 F c γ R
への結合性にも影響しないヒト I g G 1 抗体「C 2 B 8」(Reff等, Blood 83: 435 (199
4)) の C H 2 ドメインにおける変異体を同定した。アラニンスキャンニング変異により、
ヒト I g G 1 における5つの変異体、D 2 7 0 K、D 2 7 0 V、K 3 2 2 A、P 3 2 9 A
及び P 3 3 1 が同定され、それらは非溶解性で C 1 q に対する減少した結合性を有してい
た。データは、ヒト I g G 1 の中心の C 1 q 結合部位は、マウス I g G 2 b と相違するこ
を示唆した。さらに、K 3 2 2 A、P 3 2 9 A 及び P 3 3 1 A が通常 C D 2 0 抗原、及び
4つの F c レセプター、F c γ R I、F c γ R I I、F c γ R I I I 及び F c R n に結
合することが見出された。

【0094】

材料及び方法

C 2 B 8 変異体の作成：抗-C D 2 0 抗体 C 2 B 8 (Reff等, Blood 83: 435 (1994))
のキメラ軽鎖及び重鎖を、既に記載した P R K ベクター (Gorman等, DNA Protein Eng. T
ech.2: 3 (1990)) を用いて別々にサブクローニングした。重鎖における F c 領域の部位
指向性突然変異誘発 (Kunkel等, Proc. Natl. Acad. sci. USA 82: 488 (1985))、アラ
ニンスキャン変異体を作成した。重鎖及び軽鎖プラスミドを、既に記載したようにアデノ
ウイルス形質移入ヒト胚腎臓細胞系に同時形質移入した (Werther等, J. Immunol. 157:
4986 (1996))。形質移入の24時間後に媒質を無血清に換え、分泌された抗体を5日後に回
収した。抗体をプロテイン A-セファロース C L-4 B (登録商標) (Pharmacia) を用いて
精製し、バッファー交換し、Centricon-30 (Amicon) を用いて P B S で0.5mlまで濃縮し
、4°Cで保存した。抗体濃度は全 I g 結合 E L I S A を用いて決定した。

C 1 q 結合 E L I S A：コーティングバッファー (0.05M炭酸ナトリウムバッファー) p
H9中の表示した濃度の C 2 B 8 で、Costar 9 6 ウェルプレートを4°Cにおいて終夜コート
した。次いでプレートを3x P B S /0.05%のTWEEN20(登録商標)、pH7.4で洗浄し、200 μ l
のチメロサル(thimerosal)を含まない E L I S A 希釈剤 (0.1M N a P O₄ /0.1M N a C
l /0.1%ゼラチン/0.05%TWEEN20(登録商標)/0.05%ProClin300) で室温において1時間ブ
ロックした。プレートを3x 洗浄バッファーで洗浄し、2 μ g/ml C 1 q (Quidel, San Dieg
o, CA) のアリコート100 μ l を各ウェルに添加して室温で2時間インキュベートした。次い
でプレートを6x 洗浄バッファーで洗浄した。ヒツジ抗-補体 C 1 q ペルオキシダーゼ抱合
抗体 (Biodsign) の1:1000希釈物100 μ l を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベ
ートした。プレートを6x 洗浄バッファーで再度洗浄し、O P D (O-フェニレンジアミンジ
ヒドロクロリド(Sigma)) を含む基質バッファー (P B S /0.012% H₂ O₂) 100 μ l を各
ウェルに添加した。黄色の出現により観察される酸化反応を30分間進行させ、4.5N の H₂
S O₄ の100 μ l の添加で停止させた。次いでマイクロプレートリーダー (SPECTRA MAX 25

0(登録商標)、Molecular Devices Corp.)を用いて(492-405) nmでの吸収を読んだ。適当な対象を平行して走らせた(例えば、用いたC 2 B 8の各濃度についてC 1 q無しでE L I S Aを実行し、またC 2 B 8無しでもE L I S Aを実行した)。各変異体について、4-変数カーブフィッティングプログラム(KALEIDAGRAPH(登録商標))を用いて $\mu\text{g/ml}$ でのC 2 B 8濃度に対し吸収(492-405) nmをプロットし、E C ₅₀を比較することによりC 1 q結合性を測定した。

【0095】

補体依存性細胞毒性(C D C)アッセイ:このアッセイは、実質的に既に記載されているように実施した(Gazzano-Santoro等, J. Immunol. methods 202:163 (1997))。種々の濃度のC 2 B 8 (0.8-20 $\mu\text{g/ml}$)をR H Bバッファー(R P M I 1640/20mM H E P E S (pH7.2)/2mMグルタミン/0.1%B S A/100 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシン)で希釈した。ヒト補体(Quidel)をR H Bバッファーで1:3に希釈し、C D 2 0抗原を表現するW I L 2 - S細胞(ATCC, Manassas, VAから入手可能)をR H Bバッファーで 1×10^6 細胞/mlの密度まで希釈した。等容量のC 2 B 8、希釈ヒト補体及びW I L 2 - S細胞を含む混合物150 μl を平底組織培養96ウェルプレートに添加し、37°C及び5 % C O ₂で2時間インキュベートして補体媒介細胞溶解を促進させた。次いで50 μl のアラマブルー(Accumed International)を各ウェルに添加して37°Cで終夜インキュベートした。96-ウェル蛍光光度計を用いて530nmでの励起及び590nmでの放射で吸収を測定した。Gazzano-Santoro等によって記載されているように、結果を相対蛍光単位(R F U)で表す。C 2 B 8標準曲線から試料濃度を計算し、野生型C 2 B 8と比較した活性パーセントを各変異体について報告する。

C 2 B 8変異体のC D 2 0結合能力:C 2 B 8及び変異体のC D 2 0抗原への結合性を既に記載されている方法によって評価した(Reff等(1994), 上掲; Gazzano-Santoro等(1996), 上掲に概説されている)。W I L 2 - S細胞を 1×10^6 細胞/mlの細胞密度まで3-4日成長させた。細胞を洗浄し、F A C Sバッファー(P B S/0.1%B S A/0.02%N a N ₃)中で2回遠心し、 5×10^6 細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。200 μl の細胞(5×10^6 細胞/ml)及び20 μl の希釈したC 2 B 8試料を5ml管に添加し、室温で30分間強く攪拌しながらインキュベートした。次いで混合物を2mlの冷F A C Sバッファーで洗浄し、遠心沈殿させ、200 μl の冷F A C Sバッファー中に再懸濁させた。懸濁物に、10 μl のヤギ抗-ヒト-I g G-F I T C (American Qualex Labs.)を添加し、混合物を暗中室温で30分間強く攪拌しながらインキュベートした。インキュベーションの後、混合物を2mlのF A C Sバッファーで洗浄し、遠心沈殿させて1mlの冷固定バッファー(P B S中の1%ホルムアルデヒド)中に再懸濁させた。試料をフローサイトメトリーで分析し、相対蛍光単位(R F U)で表した結果を、4-変数カーブフィッティングプログラム(KALEIDAGRAPH(登録商標))を用いて抗体濃度に対してプロットした。E C ₅₀は、C 2 B 8対照材料のパーセントとして報告する。

【0096】

F c γ R結合E L I S A:F c γ R I α サブユニット-G S T融合物を、P B S中1 $\mu\text{g/ml}$ のレセプター-G S T融合物100 μl を添加し、4°Cで48時間インキュベートすることによりNunc F96 maxisorbプレート(カタログ番号439454)にコートした。アッセイの前に、プレートを3x250 μl の洗浄バッファー(0.5%のTWEEN20(登録商標)を含むP B S pH7.4)で洗浄し、250 μl のアッセイ用バッファー(50mMトリス緩衝塩水、0.05%TWEEN20(登録商標)、0.5%R I A等級ウシ血清(Sigma A7888)及び2mMのE D T A pH7.4)でブロックした。1mlのアッセイ用バッファー中に10m $\mu\text{g/ml}$ まで希釈した試料をF c γ R Iサブユニットコートプレートに添加して、オービタル振盪機上で25°Cにおいて120分間インキュベートした。プレートを5x洗浄バッファーで洗浄して未結合の複合体を除去し、アッセイ用バッファー中1:10,000のセイヨウワサビペルオキシダーゼ(H R P) 抱合ヤギ抗-ヒトI g G(γ)重鎖特異物(Boehringer Mannheim 1814249) 100 μl を添加してオービタル振盪機上で25°Cにおいて90分間インキュベートすることによりI g G結合を検出する。プレートを5x洗浄バッファーで洗浄して未結合のH R Pヤギ抗-ヒトI g Gを除去し、基質溶液(0.4mg/mlのo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド、sigma P6912、6mMのH ₂ O ₂ P B S

中)を添加して25℃において8分間インキュベートすることにより結合した抗-IgGを検出する。酵素反応は、100μlの4.5NのH₂SO₄の添加により停止させ、96ウェルプレート濃度計(Molecular Devices)上で比色生成物を490nmにおいて測定する。変異体の結合性を、野生型の割合として表した。

FcγRII及びIII結合ELISAは上記実施例1に記載したように実施した。

IgG変異体のFcRn結合活性を測定するために、ELISAプレートを、50mMの炭酸バッファー、pH9.6中の2μg/mlのストレプトアビジン(Zymed, South San Francisco)で4℃において終夜コートし、PBS-0.5%BSA、pH7.2で室温において1時間ブロックした。PBS-0.5%BSA、0.05%ポリソルベート20、pH7.2中のビオチニル化FcRn(Research Organics, Cleveland, OHからのビオチン-X-NHSを用いて調製し、1-2μg/mlで使用)をプレートに添加し、1時間インキュベートした。PBS-0.5%BSA、0.05%ポリソルベート20、pH6.0中のIgG標準品(1.6-100ng/ml)又は変異体の2倍連続希釈物をプレートに添加し、2時間インキュベートした。上記pH6.0バッファー(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)中のペルオキシダーゼ標識したヤギF(ab')₂抗-ヒトIgGF(ab')₂、続いて基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Kirgaard & Perry Laboratories)を用いて結合したIgGを検出した。プレートは、pH7.2又は6.0のいずれかのPBS-0.05%ポリソルベート20での工程の間に洗浄した。吸収は、Vmaxプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)上で450nmにおいて読んだ。滴定曲線は、4-変数非線形回帰カーブフィッティングプログラム(KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA)でフィッティングさせた。標準品の滴定曲線の中点吸収に対応するIgG変異体の濃度を計算し、次いで標準品滴定曲線の中点吸収に対応する標準品の濃度で除した。

【0097】

結果と議論

アラニンスキャンニング変異により、E318A、K320A及びK322Aで始まるC2B8のCH2ドメインにおける幾つかの単点変異体を作成した。作成した全ての変異体は通常はCD20抗原に結合した

表 3

	野生型	E318A	K320A	K322A	P329A	P331A
FcRn	+	+	+	+		
CD20	+	+	+	+	+	+
FcγRI	+	+	+	+	+	+
FcγRII	+	+	+	+	+	+
FcγRIII	+	+	+	+	+	+
*C1q	+++	++	+++	-	-	-
CDC	+	+	+	-	-	-

(+)は、結合を示し(-)は結合が無いことを示す。

*C1q結合について、各+印は約33%結合性と等価である。

【0098】

ヒト補体のヒトFcを持つ抗体への結合性を分析した場合、E318A及びK320Aの補体を活性化する能力は、野生型C2B8と実質的に同等であった(表3)。野生型C2B8と比較した場合、E318A及びK320AのC1qに対する結合性には殆ど相違が無いことがわかった。K320Aで約10%の結合性の低下、E318Aで約30%の結合性の低下があっただけである(図2)。これらの結果は、E318及びK320A置換の補

体活性化及びC 1 q 結合性への効果が最小であることを示している。また、C 2 B 8 のヒト I g G 1 がヒト I g G 2 に置換され、C 1 q 結合実験におけるネガティブ対照として用いられた。I g G 2 変異体は、C 1 q に対してE 3 1 8 A 及びK 3 2 0 A 変異体より更に低い親和性を持つことがわかった（図2）。即ち、これら御結果は、E 3 1 8 A 及びK 3 2 0 A が、ヒト I g G 1 の中心C 1 q 結合部位を構成していないことを示している。逆に、K 3 2 2 A 置換は、補体活性及びC 1 q 結合性の両方に有意な影響を与えた。K 3 2 2 A 変異体は上記C D C アッセイで試験した場合にC D C 活性を持たず、C 1 q 結合性において野生型C 2 B 8 より100倍以上低かった（図2）。ヒト系では、K 3 2 2 は中心C 1 q 結合部位として提唱された唯一の残基であり、補体活性化及びC 1 q 結合性に有意な影響を有している。

10

Duncan及びWinterの研究がマウス I g G 2 b を用いて実施され、上記の結果がヒト I g G 1 におけるK 3 2 0 及びE 3 1 8 がC 1 q 結合に含まれないことを明らかにしたので、如何なる理論と結びつけるものではないが、上記のデータはマウス I g G におけるC 1 q 結合領域がヒトとは異なることを示唆している。このことを更に実験し、C 1 q に結合せず、従って補体を活性化しない更なる変異体を同定するために、C 2 B 8 F c の三次元構造から評価したときのK 3 2 2 の近傍における更に幾つかの点変異体を作成した。K 2 7 4 A、N 2 7 6 A、Y 2 7 8 A、S 3 2 4 A、P 3 2 9 A、P 3 3 1 A、K 3 3 4 A 及びT 3 3 5 A を、それらのC 1 q 結合能力、及び補体活性化についても評価した。これら置換体の多くはC 1 q 結合性又は補体活性化効果を殆ど又は全く持たなかった。上記のアッセイに置いて、P 3 2 9 A 及びP 3 3 1 A 変異体は補体を活性化せず、C 1 q に対して低下した結合性を有していた。P 3 3 1 A 変異体は、補体を活性化せず、野生型C 2 B 8 （図2）に比較して60倍低下したC 1 q 結合性であった（図3）。図3で使用した抗体変異体の濃度範囲は、P 3 3 1 A 変異体に対するC 1 q 結合性の飽和を観察するために100 µg/mlまで拡張した。変異体P 3 2 9 A は、補体を活性化せず、野生型C 2 B 8 （図2）に比較して100倍以上低下したC 1 q 結合性の抗体となった（図3）。

20

【0099】

C 1 q に結合しない、よって補体を活性化しない変異体を、それらのF c レセプター：F c γ R I、F c γ R I I A、F c γ R I I B、F c γ R I I I A 及びF c R n に結合する能力について試験した。この特別な実験は、ヒト化抗-I g E 抗体、これらの変異体を持つI g G 1 抗体（上記実施例1参照）を用いて実施した。結果は、変異体、K 3 2 2 A 及びP 3 2 9 A が、全てのF c レセプターに対して野生型タンパク質と同程度に結合することを明らかにした（表2）。しかしながら、P 3 3 1 A のF c γ R I I B への結合性に若干の低下があった。

30

結論として、ヒト I g G 1 のC H 2 ドメインのC O O H 末端領域における2つのアミノ酸置換、K 3 2 2 A 及びP 3 2 9 A は、C 1 q 結合性において100倍以上の低下をもたらし、C D C 経路を活性化しないことが確認された。これら2つの変異体K 3 2 2 A 及びP 3 2 9 A は、全てのF c レセプターに、野生型抗体と同様の親和性で結合する。表2にまとめたこれらの結果に基づいて、何ら理論に結びつけないが、ヒト I g G 1 のC 1 q 結合中心点は、K 3 2 2、P 3 2 9 及びP 3 3 1 の周辺に集中しており、E 3 1 8、K 3 2 0 及びK 3 2 2 からなるマウス I g G 2 b 中心点とは相違すると提唱する。

40

【0100】

表 4

	野生型	E318A	K320A	K322A	P329A	P331A
CD20	100	89	102	86	112	103
^a FcγRI	100	93	102	90	104	74
^a FcγRIIA	100	113	94	109	111	86
^a FcγRIIB	100	106	83	101	96	58
^a FcγRIII	100	104	72	90	85	73
CDC	100	108	108	無し	無し	無し

a F c γ R への結合のために、変異体は E 2 7 バックグラウンド（抗-I g E）で作成した。

結果は野生型に対するパーセントで表示した。

ヒト C 1 q 結合に含まれる更なる残基は、この実施例に記載した方法を用いて同定した。残基 D 2 7 0 をリシン及びバリンに置換して、各々変異体 D 2 7 0 K 及び D 2 7 0 V を生成させた。これらの変異体は、ともにヒト C 1 q への低下した結合性（図 6）及び非溶解性（図 7）を示した。2 つの変異体は C D 2 0 抗原に結合して A D C C を補充した。

【 0 1 0 1 】

実施例 3

向上した C 1 q 結合性を持つ変異体

以下の実験は、位置 K 3 2 6、A 3 2 7、E 3 3 3 及び K 3 3 4 における残基の置換が、野生型抗体と比較した場合に少なくとも 30% の C 1 q 結合性が向上した変異体をもたらすことを示す。表示した K 3 2 6、A 3 2 7、E 3 3 3 及び K 3 3 4 は、C D C 経路による抗体の効果を向上させる潜在的な部位である。この実験の目的は、C 1 q に対する結合性を向上させることにより抗体の C D C 活性を向上させることである。K 3 2 6 及び E 3 3 3 における部位指向性突然変異誘発により、C 1 q に対する向上した結合性を持つ幾つかの変異体を作成した。K 3 2 6 における向上した結合性のための残基は K < V < E < A < G < D < M < W であり、E 3 3 3 における向上した結合性のための残基は E < Q < D < V < G < A < S である。野生型と比較したときに C 1 q 結合性において少なくとも 2 倍の向上を示す 4 つの変異体、K 3 2 6 M、K 3 2 6 D、K 3 2 6 E 及び E 3 3 3 S を作成した。変異体 K 3 2 6 W は、C 1 q 結合性において約 5 倍の向上を示した。

野生型 C 2 B 8 抗体の変異体は、上記実施例 2 に記載したように調製した。さらなる対照抗体、米国特許第 5,736,137 に実質的に記載されたチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞で産生された野生型 C 2 B 8 を C 1 q 結合 E L I S A に含ませ、2 9 3 腎臓細胞系で産生された野生型 (wt) C 2 B 8 が C H O 細胞産生抗体と同様の C 1 q 結合活性を持つことを確認した（図 8 の「C H O -wt - C 2 B 8」参照）。この実施例における C 1 q 結合 E L I S A、C D C アッセイ、及び C D 2 0 結合アッセイは、上記実施例 2 に記載したように実施した。

図 8 に示すように、C 2 B 8 の K 3 2 6 及び E 3 3 3 におけるアラニン置換は、C 1 q に対する結合性において約 30% 向上した変異体をもたらした。

幾つかの他の K 3 2 6 及び E 3 3 3 における単点変異体を作成し、それらの C 1 q 結合性及び補体活性化について評価した。作成した全ての変異体が通常 C D 2 0 抗原に結合した。

K 3 2 6 について、作成した他の単点変異体は K 3 2 6 A、K 3 2 6 D、K 3 2 6 E、K 3 2 6 G、K 3 2 6 V、K 3 2 6 M 及び K 3 2 6 W であった。図 9 に示すように、これらの変異体は全て野生型抗体より良い親和性で C 1 q に結合した。K 3 2 6 W、K 3 2 6 M、K 3 2 6 D 及び K 3 2 6 E は、C 1 q への結合性において少なくとも 2 倍の向上を示した（表 5）。K 3 2 6 変異体の中で、K 3 2 6 W が C 1 q に対して最も良い親和性を有していた。

表 5

変異体	EC ₅₀ 値
野生型	1.53
K326V	1.30
K326A	1.03
K326E	1.08
K326G	0.95
K326D	0.76
K326M	0.67
K326W	0.47
E333S	0.81
E333A	0.98
E333G	1.14
E333V	1.18
E333D	1.22
E333Q	1.52
K334A	1.07

【0102】

疎水性並びに荷電した残基での置換は、C1q結合性が向上した変異体をもたらした。鎖にフレキシビリティを付与し天然で良く保存されるグリシンでの置換でさえも、野生型に比較して高いC1qに対する親和性を持つ変異体をもたらした。この部位での任意のアミノ酸置換がより高いC1qに対する親和性を持つ変異体をもたらすことは明らかである。三次元構造の評価によると、K326及びE333は中心C1q結合部位の近傍にある(図10)。

アラニンに加えて、E333は他のアミノ酸残基でも置換した。これらの変異体、E333S、E333G、E333V、E333D及びE333Qは、全てが野生型に比較して向上したC1qに対する結合性を有していた(図11)。表3に示したように、C1qに対する結合性の順序は次の通りであった：E333S>E333A>E333G>E333V>E333D>E333Q。小さな側鎖容積を持つアミノ酸残基、即ち、セリン、アラニン、グリシンでの置換は、大きな側鎖容積を持つ他の変異体、E333V、E333D及びE333Qに比較して高いC1qに対する親和性をもたらした。変異体E333Sが、C1qに対して最も高い親和性を有し、野生型と比較して2倍向上した結合性を示した。如何なる理論とも結びつけないが、このことは、333におけるC1q結合性への効果が部分的に残基の極性によることを示している。

二重変異体も作成した。図12及び13に示すように、K326M-E333S及びK326A-E333Aは、ヒトC1q結合性において野生型C2B8より少なくとも3倍良好であり(図12)、CDC媒介において野生型C2B8より少なくとも2倍良好であった(図13)。付加性は、これらが独立して作用する残基であることを示している。

さらなる二重変異体K326W-E333Sを作成したところ、それは野生型C2B8に比較した場合、ヒトC1q結合性において6倍良好であり、CDC媒介において3倍良好であった。この二重変異体は細胞ベースのアッセイではADCC活性を欠いていた。

さらに、図14に示すように、ヒトIgG1定常領域におけるA327をグリシンに変えることにより、C1q結合性の向上した(50%向上)を作成した。逆に、ヒトIgG2定常領域においてG327をアラニンに変えると、IgG2抗体のC1q結合性を低下させた。

【0103】

実施例 4

ヒト IgA 抗体における FcR 結合部位の同定

この実験では、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA 及び FcRn との結合に関係している IgG1 抗体の、Fc 領域における様々なアミノ酸残基の変異の影響が、調べられている。FcR との結合力が減弱化されているものだけでなく、改善されている抗体の変異体が同定されている。

【0104】

材料及び方法

IgG1 変異体の作成：図 4A および 4B にそれぞれ示されるような重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗 IgE E27 の組換え体は、以下の実験において親抗体として使用された。この抗体は抗原である IgE に結合し、非 A アロタイプの IgG1 Fc 領域を有する。部位特異的突然変異 (Kunkel et al, Proc. Natl. Acad. sci. USA 82: 488 (1987)) により、上記親抗体の重鎖において、Fc 領域の変異体が構築された。重鎖及び軽鎖プラスミドを、既に記載したようにアデノウイルス形質移入ヒト胚腎臓細胞系に同時形質移入した (Werther 等, J. Immunol. 157: 4986 (1996))。形質移入の 24 時間後に媒質を無血清に換え、分泌された抗体を 5 日後に回収した。抗体をプロテイン G-セファロース CL-4B (商標登録出願) (Pharmacia) を用いて精製し、バッファー交換し、Centricon-30 (Amicon) を用いて PBS で 0.5ml まで濃縮し、4℃で保存した。抗体濃度は全 Ig 結合 ELISA を用いて決定した。

【0105】

高親和性 FcγRIIA 結合 ELISA：FcγRIIA は、細胞外領域に His タグ GST を結合された GST 融合物として 293 細胞中に発現され、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより精製された。

FcγRIIA を精製するために、形質転換した 293 細胞の培養上清は 3 日後に除去された。プロテアーゼ阻害剤 (50 μL アプロチニン (Sigma) / 50mL 培養上清、および PMSF (1mM)) を添加した。培養上清は Stirred cell (Amicon) により 10mL に濃縮し、1L のカラム緩衝液 (50mM Tris (pH8.0), 20mM Imideazole, 300mM NaCl) に対し、一晚 4℃にて透析した。さらに、翌朝、引き続き新しいカラム緩衝液に対して、4 時間 4℃にて透析を行った。透析後の培養上清を、あらかじめ 10mL のカラム緩衝液で平衡化した Ni⁺⁺ カラム (NTA super flow resin, Qiagen) 1mL にかけた。カラムは 10mL のカラム緩衝液で洗浄し 2.5mL の溶出緩衝液 (50mM Tris (pH8.0), 250mM Imidazole, 300mM NaCl) で溶出した。タンパク質を 0.05mL に濃縮し、緩衝液を PBS に変えた。濃度は、アミノ酸組成分析から誘導した減衰係数を用いて 280nm における吸収により決定した。

収集したレセプターを Nunc F96 maxisorb プレート (カタログ番号 439454) 上に、PBS 中 1 μg/ml のレセプターの 100 μl を添加することによりウェル当たり 150ng でコートし、4℃において 24 時間インキュベートした。アッセイの前に、プレートを 3x 250 μl の洗浄バッファー (0.5% の TWEEN20 (登録商標) を含む PBS pH7.4) で洗浄し、250 μl のアッセイ用バッファー (50mM トリス緩衝塩水、0.05% TWEEN20 (登録商標)、0.5% RIA 等級ウシ血清 (Sigma A7888) 及び 2mM の EDTA pH7.4) でブロックした。

10 μg/mL の濃度にて FcγRIIA サブユニットをコートした最初の 4 ウェルに、E27 の 100 μl を添加した。80 μL のアッセイ緩衝液を次の 4 つのウェルに添加したのち、最終濃度 2 μg/mL になるように 10 μg/mL の E27 IgG の 20 μL を添加した。プレートは 25℃にて 2 時間オービタル振盪機上でインキュベートした。

検出するにあたって、プレートを 5x 洗浄バッファーで洗浄して未結合の複合体を除去し、アッセイ用バッファー中 1:5,000 のセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合プロテイン G (BIORAD) 100 μl を添加しすることにより、GST-FcγRIIA 結合を検出する。HRP 結合体は 25℃にて 1.5 時間オービタル振盪機上でインキュベートした。プレートを 5x 洗浄バッファーで洗浄して未結合の HRP 結合体を除去した。基質溶液 (0.4

10

20

30

40

50

mg/mlのo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド、sigma P6912、6mMの H_2O_2 PBS中)の100 μ lを添加して25°Cにおいて10分間インキュベートすることにより結合を検出する。酵素反応は、100 μ lの4.5Nの H_2SO_4 の添加により停止させ、96ウェルプレート濃度計 (Molecular Devices) 上で比色生成物を490nmにおいて測定する。

E 2 7 変異複合体の2 μ g/mLの I g G 濃度での結合性を、野生型 E 2 7 複合体の割合として表した。

F c γ R I A T H P - 1 アッセイ : 100 μ l の E 2 7 を、アッセイ緩衝液(1xPBS, 0.1 % BSA, 0.01% NaN_3)中、20 μ g / m L 濃度になるように、seroclusterプレート(Coster)の最初の3ウェルに添加した。92.5 μ L のアッセイ緩衝液を次の3つのウェルに添加したのち、最終濃度1.5 μ g / m L になるように20 μ g / m L の E 2 7 I g G の7.5 μ L を添加した。それぞれのウェルに対して、100 μ L の T H P - 1 細胞を、F A C S アッセイ緩衝液中、 5.0×10^6 細胞 / m l になるように加える。プレートは氷上にて30分間インキュベートした。

検出するにあたって、細胞を2x 洗浄バッファーで洗浄して未結合の抗体を除去した。

F c γ R I A に対する I g G の結合能は、1:200に希釈したH R P を結合させたヤギ抗ヒト I g G 重鎖特異的なF(ab')₂フラグメントを添加することにより検出した。H R P 結合体は氷上にて30分間インキュベートした。細胞を3x 洗浄バッファーで洗浄して未結合のH R P 結合体を除去した。細胞は2.5 μ g / m L の P . I (Sigma)で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

1.5 μ g / m L の I g G 濃度での E 2 7 変異複合体の結合性を、野生型 E 2 7 複合体の割合として表した

プレートアッセイ (F c γ R I A E L A S A) および細胞を基礎としたアッセイ (F c γ R I A T H P - 1 アッセイ) によるデータは、F c γ R I A 結合活性に帰着させるように平均化した。

低親和性 F c γ R 結合 E L I S A s : F c γ R I I A 、 F c γ R I I B 及び F c γ R I I A 結合 E L I S A s は、上記実施例1において記述したように行い、安定した6量体(3つの抗 I g E 分子と3つの I g E 分子)として検出された。

F c R n 結合 E L I S A : I g G 変異体の F c R n 結合活性を測定するために、E L I S A プレートを、50mMの炭酸バッファー、pH9.6中の2 μ g/mlのストレプトアビジン (Zymed, South San Francisco) で4°Cにおいて一晩コートし、P B S - 0.5% B S A 、 pH7.2で室温において1時間ブロックした。P B S - 0.5% B S A 、 0.05%ポリソルベート 2 0 、 pH7.2中、ビオチン化 F c R n (Research Organics, Cleveland, OHのビオチン-X-NH S を用いて調製し、1-2 μ g/mlで使用)をプレートに添加し、1時間インキュベートした。P B S - 0.5% B S A 、 0.05%ポリソルベート 2 0 、 pH6.0中の I g G 標準品 (1.6-100ng/ml) 又は変異体の2倍連続希釈物をプレートに添加し、2時間インキュベートした。上記pH6.0バッファー (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 中のペルオキシダーゼ標識したヤギ F (a b ') ₂ 抗 - ヒト I g G F (a b ') ₂ 、 続いて基質として 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (Kirgaard & Perry Laboratories) を用いて結合した I g G を検出した。プレートは、pH7.2又は6.0のいずれかの P B S - 0.05%TWEEN20(登録商標)の工程において洗浄した。吸収は、Vmaxプレートリーダー (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 上で450 nmにおいて読んだ。滴定曲線は、4-変数非線形回帰カーブフィッティングプログラム (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA) でフィッティングさせた。標準品の滴定曲線の中点吸収に対応する I g G 変異体の濃度を計算し、次いで標準品滴定曲線の中点吸収に対応する標準品の濃度で除した。

【 0 1 0 6 】

インヴィトロ A D C C アッセイ : C r ⁵¹ で標識した細胞を準備するために、ガン細胞系列を組織培養プレート上で生育させ、滅菌した10 mM EDTAをPBS中に回収した。SK-BR-3細胞 (3+HER2を過発現させたヒト乳癌細胞系列) は、全てのアッセイにおける標的として使用した。プレートより剥がれた細胞は、細胞培養液で2度洗浄した。細胞 (5×10^6) は、37 °Cにおいて時々振盪しながら1時間、200 μ C i の C r ⁵¹ (New England Nuclear /Dupont

）で標識した。標識された細胞は細胞培養液で3回洗浄し、その後、 5×10^5 濃度になるように再懸濁した。細胞はオプソニル化されることなしに使用されるか、あるいはアッセイに先立ち rhuMab HER2 の野生型 (HERCEPTION (登録商標)) 又は7つの Fc 変異体 (G14、G18、G17、G36、G30、G31 および G34) を P B M C を用いたアッセイにおいて 100 ng/mL および 1.25 ng/mL の濃度で、NK を用いたアッセイでは 20 ng/mL および 1 ng/mL の濃度で使用し、オプソニル化した。

抹消血単核細胞は、ヘパリン上で通常の健康な提供者からの血液集め、等量のリン酸緩衝液 (P B S) で希釈することにより調製した。その後、血液は LYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM (登録商標) (LSM: Organon Teknika) 上に重層し、メーカーの指示に従って遠心した。単核細胞は L S M と血漿との中間層に回収され、それらを P B S で3回洗浄した。エ
10
フェクター細胞は細胞培養液に最終濃度 1×10^7 細胞/mL になるように懸濁した。

ナチュラルキラー細胞 (NK) は、L S M を通して精製した P B M C から、NK 細胞単離キットおよび磁気カラム (Miltenyi Biotech) を用い、メーカーの指示に従ってネガティブ選択により単離した。単離された NK 細胞は回収し、洗浄後、細胞培養液に 2×10^6 細胞/mL 濃度になるように再懸濁した。NK 細胞との同一性はフローサイトメトリー解析で確認した。

様々なエフェクターと標的との比率は、マイクロタイタープレート (最終的には $100 \mu\text{l}$) の列に沿って、細胞培養液で2倍に希釈して調製した。エフェクター細胞の濃度は、P B M C の場合は $1 \times 10^7/\text{m l}$ から $2.0 \times 10^4/\text{m l}$ の範囲に、N k の場合は $2.0 \times 10^6/\text{m l}$ から $3.9 \times 10^3/\text{m l}$ の範囲になるようにする。エフェクター細胞を希釈したのち、 1×10^5 細胞/
20
m l の $100 \mu\text{l}$ の Cr^{51} 標識標的細胞 (オプソニル化もしくは非オプソニル化) をプレートのそれぞれのウェルに加えた。その結果、最初のエフェクターと標的細胞との比率は、P B M C では、100:1 に、NK 細胞では 20:1 になった。全てのアッセイは、二組ずつ行い、それぞれのプレートには自発的な溶解 (エフェクター細胞が存在しない) および全溶解 (標的細胞に $100 \mu\text{L}$ の 1% ソディウムドデシル硫酸塩および 1N 水酸化ナトリウムを添加する) に対するコントロールが含まれている。プレートは、 37°C で 18 時間インキュベートし、その後、上清回収システム (Skatron Instrument, Inc.) を用いて細胞培養液を回収し、M i n a x i auto-gamma 5000 シリーズカンマカウンター (Packard) で 1 分間測定した。その後、結果は以下に示す方式を用いて細胞毒性の割合として表した：

$\% \text{細胞毒性} = (\text{サンプル (c p m)} - \text{自発的溶解 (c p m)}) / (\text{全溶解 (c p m)} - \text{自
30
発溶解 (c p m)}) \times 100$

その後、4変数適正曲線は、データを評価するのに用いた (KaleidaGraph3.0.5)

【0107】

結果

様々は抗体変異体が作製され、それらは親抗体と異なる F c R 結合活性を有する。変異体の F c R 結合力に関するデータは、以下の表6および7に示す。さらなる変異体、T 3 0 7 Q、も E 2 7 親抗体に比べて改善された F c R n を示した。

【0108】

表 6

CH2ドメイン変異体

IG2	Res#EU (Kabat)	FcRn 平均	sd	n	FcγRI 平均	sd	n	FcγRIIA 平均	sd	FcγRIIB 平均	sd	FcγRIIbA 平均	sd
全てのFcγRIに対して低下した結合性													
1	233-236	0.54	(0.20)	3	0.12	(0.06)	6	0.08	(0.01)	0.12	(0.01)	0.04	(0.02)
ELLG > PVA-													
2	P238A(251)	1.49	(0.17)	3	0.60	(0.05)	5	0.38	(0.14)	0.36	(0.15)	0.07	(0.05)
14	D265A(278)	1.23	(0.14)	4	0.14	(0.04)	6	0.07	(0.01)	0.13	(0.05)	0.09	(0.06)
17	E269A(282)	1.05			0.52	(0.03)	6	0.65	(0.18)	0.75	(0.29)	0.45	(0.13)
18	D270A(283)	1.05			0.76	(0.12)	6	0.06	(0.01)	0.11	(0.05)	0.14	(0.04)
58	N297A(314)	0.80	(0.18)	8	0.15	(0.06)	7	0.05	(0.00)	0.10	(0.02)	0.03	(0.01)
52	A327Q(346)	0.97			0.63	(0.15)	7	0.13	(0.03)	0.14	(0.03)	0.06	(0.01)
64	P329A(348)	0.80			0.48	(0.10)	6	0.08	(0.02)	0.12	(0.08)	0.21	(0.03)
FcγRII及びFcγRIIIに対して低下した結合性													
3	S239A(252)	1.06			0.81	(0.09)	7	0.73	(0.25)	0.76	(0.36)	0.26	(0.08)
33	E294A(311)	0.75			0.90	(0.08)	4	0.87	(0.19)	0.63	(0.17)	0.66	(0.14)
34	Q295A(312)	0.79			1.00	(0.11)	4	0.62	(0.20)	0.50	(0.24)	0.25	(0.09)
39	V303A(322)	1.26	(0.21)	3	0.91	(0.11)	5	0.86	(0.10)	0.65	(0.17)	0.33	(0.09)
FcγRII及びFcγRIIIに対して向上した結合性													
11	T256A(269)	1.91	(0.43)	6	1.14	(0.14)	4	1.41	(0.27)	2.06	(0.66)	1.32	(0.18)
30	K290A(307)	0.79	(0.14)	3	1.01	(0.08)	4	1.29	(0.21)	1.40	(0.18)	1.28	(0.21)

【0109】

【0 1 1 0】

44	D312A(331)	1.50 (0.06)	4	1.01 (0.12)	5	1.20 (0.24)	1.19 (0.07)	1.23 (0.14)	n=3
51	K326A(345)	1.03		1.04 (0.05)	4	1.26 (0.21)	1.49 (0.27)	1.22 (0.28)	n=5
197	A330(349)K			1.28			1.25	1.28	n=1
273	A339(359)T			1.23		1.11	1.23	1.42	n=1
Fcγ R IIに影響									
10	R255A(268)	0.59 (0.19)	4	1.26 (0.26)	8	1.30 (0.20)	1.59 (0.42)	0.98 (0.18)	n=5
12	E258A(271)	1.18		1.18 (0.13)	4	1.33 (0.22)	1.65 (0.38)	1.12 (0.12)	n=5
15	S267A(280)	1.08		1.20 (0.14)	4	1.64 (0.18)	2.06 (0.35)	1.14 (0.25)	n=7
16	H268A(281)	1.02 (0.22)	3	1.05 (0.11)	4	1.22 (0.14)	1.45 (0.23)	0.52 (0.09)	n=12
19	E272A(285)	1.34 (0.24)	4	1.04 (0.06)	4	1.24 (0.11)	1.58 (0.19)	0.74 (0.12)	n=4
21	N276A(289)	1.15 (0.21)	3	1.05 (0.14)	4	1.29 (0.20)	1.34 (0.40)	0.95 (0.04)	n=4
23	D280A(295)	0.82		0.97 (0.06)	4	1.34 (0.14)	1.60 (0.31)	1.09 (0.20)	n=10
25	E283A(300)	0.71		0.97 (0.03)	4	1.24 (0.23)	1.20 (0.17)	1.01 (0.14)	n=5
26	H285A(302)	0.85		0.96 (0.07)	4	1.26 (0.12)	1.23 (0.15)	0.87 (0.04)	n=4
27	N286A(303)	1.24 (0.04)	2	0.94 (0.20)	13	1.28 (0.23)	1.39 (0.14)	1.03 (0.08)	n=5
31	R292A(309)	0.81 (0.18)	4	0.93 (0.02)	4	0.27 (0.14)	0.18 (0.07)	0.90 (0.18)	n=9
36	S298A(317)	0.80		1.10 (0.04)	3	0.40 (0.08)	0.21 (0.11)	1.30 (0.18)	n=12
38	R301A(320)	0.86		1.06 (0.10)	4	1.12 (0.12)	1.26 (0.14)	0.21 (0.08)	n=6
38B	R301M(320)	0.88		1.06 (0.12)	4	1.29 (0.17)	1.56 (0.12)	0.48 (0.21)	n=4
40	V305A(324)	1.46 (0.48)	6	1.04 (0.19)	10	1.12 (0.12)	1.23 (0.22)	0.84 (0.15)	n=4
41	T307A(326)	1.81 (0.32)	6	0.99 (0.14)	4	1.19 (0.37)	1.35 (0.33)	1.12 (0.18)	n=12

10

20

30

【0111】

42	L309A(328)	0.63 (0.18)	4	0.93 (0.18)	6	1.13 (0.08)	1.26 (0.12)	1.07 (0.20)	n=3
45	N315A(334)	0.76 (0.14)	3	1.27 (0.36)	6	1.15 (0.06)	1.30 (0.17)	1.07 (0.21)	n=5
48	K320A(339)	1.10		0.98 (0.09)	5	1.12 (0.11)	1.22 (0.05)	0.87 (0.17)	n=4
49	K322A(341)	0.98		0.94 (0.05)	6	1.15 (0.11)	1.27 (0.24)	0.61 (0.14)	n=5
50	S324A(343)	1.08		0.95 (0.05)	4	0.82 (0.22)	0.70 (0.12)	1.12 (0.17)	n=4
65	P331A(350)	0.85		1.30 (0.34)	8	1.29 (0.14)	1.47 (0.28)	1.03 (0.19)	n=3
54	E333A(352)	1.03 (0.01)	2	0.98 (0.15)	5	0.92 (0.12)	0.76 (0.11)	1.27 (0.17)	n=10
56	T335A(354)	0.98		1.00 (0.05)	4	0.79 (0.22)	0.65 (0.26)	0.92 (0.54)	n=3
57	S337A(356)	1.03		1.17 (0.23)	3	1.22 (0.30)	1.26 (0.06)	0.94 (0.18)	n=4
FcγRIIIに影響									
5	K248A(261)	0.87		0.95 (0.05)	5	1.06 (0.12)	1.01 (0.12)	0.71 (0.05)	n=4
6	D249A(262)	0.93		1.04 (0.10)	4	1.02 (0.12)	0.94 (0.02)	0.66 (0.07)	n=5
7	M252A(265)	0.64 (0.13)	4	0.99 (0.10)	5	1.01 (0.18)	1.15 (0.22)	0.65 (0.17)	n=6
9	S254A(267)	< 0.10		0.96 (0.08)	4	0.97 (0.24)	1.15 (0.38)	0.73 (0.14)	n=3
16	H268A(281)	1.02 (0.22)	3	1.05 (0.11)	4	1.22 (0.14)	1.45 (0.23)	0.52 (0.09)	n=12
19	E272A(285)	1.34 (0.24)	4	1.04 (0.06)	4	1.24 (0.11)	1.58 (0.19)	0.74 (0.12)	n=4
22	Y278A(291)	0.90		0.96 (0.02)	4	1.11 (0.08)	1.10 (0.16)	0.67 (0.11)	n=4
29	T289A(306)	0.86		0.93 (0.03)	4	0.96 (0.33)	0.83 (0.22)	0.62 (0.19)	n=7
32	E293A(310)	0.85		1.11 (0.07)	4	1.08 (0.19)	1.07 (0.20)	0.31 (0.13)	n=6
35	Y296F(313)	0.79		1.07 (0.12)	4	0.97 (0.26)	0.84 (0.18)	0.52 (0.09)	n=5
36	S298A(317)	0.80		1.10 (0.04)	3	0.40 (0.08)	0.21 (0.11)	1.30 (0.18)	n=12

10

20

30

【 0 1 1 2 】

38	R301A(320)	0.86		1.06 (0.10)	4	1.12 (0.12)	1.26 (0.14)	0.21 (0.08)	n=6
38B	R301M(320)	0.88		1.06 (0.12)	4	1.29 (0.17)	1.56 (0.12)	0.48 (0.21)	n=4
49	K322A(341)	0.98		0.94 (0.05)	6	1.15 (0.11)	1.27 (0.24)	0.61 (0.14)	n=5
54	E333A(352)	1.03 (0.01)	2	0.98 (0.15)	5	0.92 (0.12)	0.76 (0.11)	1.27 (0.17)	n=10
55	K334A(353)	1.05 (0.03)	2	1.10 (0.06)	4	1.01 (0.15)	0.90 (0.12)	1.39 (0.19)	n=17

F_Cγ Rに影響なし

4	K246A(259)	1.03		0.94 (0.06)	4	1.02 (0.10)	0.92 (0.15)	1.14 (0.38)	n=4
4B	K246M(259)	0.69		0.83 (0.05)	5	0.83 (0.06)	0.76 (0.05)	0.95 (0.09)	n=3
5B	K248M(261)	0.79		0.95 (0.06)	4	0.89 (0.09)	0.83 (0.04)	1.01 (0.23)	n=3
8	I253A(266)	< 0.10		0.96 (0.05)	4	1.14 (0.02)	1.18 (0.06)	1.08 (0.14)	n=3
13	T260A(273)	1.09		0.93 (0.09)	4	0.89 (0.14)	0.87 (0.10)	0.89 (0.08)	n=4
20	K274A(287)	1.18		1.02 (0.04)	4	0.86 (0.09)	0.96 (0.10)	1.11 (0.08)	n=3
24	V282A(299)	1.13 (0.07)	2	0.96 (0.02)	4	1.15 (0.13)	1.15 (0.20)	1.00 (0.18)	n=4
28	K288A(305)	0.38 (0.12)	5	0.88 (0.15)	15	1.15 (0.26)	1.14 (0.20)	1.06 (0.04)	n=4
37	Y300F(319)	0.74 (0.10)	2	1.07 (0.15)	4	1.11 (0.04)	1.09 (0.09)	1.01 (0.10)	n=3
43	Q311A(330)	1.62 (0.25)	4	0.93 (0.05)	4	1.11 (0.06)	1.19 (0.13)	0.93 (0.17)	n=3
46	K317A(336)	1.44 (0.18)	4	0.92 (0.17)	6	1.13 (0.05)	1.18 (0.27)	1.10 (0.23)	n=4
47	E318A(337)	0.85		0.92 (0.07)	4	1.04 (0.10)	1.17 (0.23)	1.01 (0.05)	n=3
53	A330Q(349)	0.76		0.96 (0.10)	4	1.01 (0.12)	1.02 (0.02)	0.75 (0.18)	n=3

10

20

30

40

表 7
CH3ドメイン変異体

IG2	Res#EU (Kabat)	FcRn 平均 sd	n	FcyRI 平均 sd	n	FcyRIIA 平均 sd	FcyRIIB 平均 sd	FcyRIIIA 平均 sd	n
B1	K338(358)A	1.14		0.90 (0.05)	3	0.78 (0.09)	0.63 (0.08)	0.15 (0.01)	n=2
B1A	K338(358)M	0.78		0.99 (0.08)	3	0.99 (0.13)	0.93 (0.15)	0.49 (0.04)	n=2
B2	K340(360)A	1.02		1.04 (0.07)	3	1.05 (0.18)	0.96 (0.20)	0.84 (0.11)	n=2
B2A	K340(360)M	1.20		1.17 (0.11)	3	1.10 (0.12)	1.20 (0.19)	0.75 (0.12)	n=2
B3	Q342(363)A	1.09		1.13 (0.11)	3	1.01 (0.10)	1.09 (0.23)	0.98 (0.10)	n=2
B4	R344(365)A	0.77		1.04 (0.08)	3	0.89 (0.14)	0.91 (0.04)	0.97 (0.07)	n=4
B5	E345(366)A	1.18		1.06 (0.05)	3	1.03 (0.10)	0.98 (0.10)	0.97 (0.13)	n=4
B6	Q347(368)A	0.95		1.04 (0.06)	3	1.00 (0.03)	0.92 (0.02)	1.04 (0.12)	n=4
B7	R355(376)A	1.06		1.09 (0.07)	3	0.84 (0.09)	0.87 (0.11)	0.98 (0.09)	n=4
B8	E356(377)A	1.21 (0.11)	2	1.05 (0.04)	3	0.90 (0.02)	0.99 (0.13)	0.92 (0.03)	n=3
B9	M358(381)A	0.96		1.06 (0.07)	3	1.11 (0.06)	1.16 (0.25)	0.91 (0.09)	n=3
B10	T359(382)	1.04		1.04 (0.05)	3	1.13 (0.10)	1.15 (0.04)	1.23 (0.26)	n=3
B11	K360(383)A	1.30 (0.08)	4	1.02 (0.04)	3	1.12 (0.10)	1.12 (0.08)	1.23 (0.16)	n=6
B12	N361(384)A	1.16		1.00 (0.03)	3	0.82 (0.07)	0.82 (0.12)	1.08 (0.06)	n=3
B13	Q362(385)A	1.25 (0.24)	3	1.00 (0.04)	3	1.03 (0.10)	1.02 (0.03)	1.03 (0.16)	n=4
B14	Y373(396)A	0.86		0.98 (0.07)	3	0.84 (0.11)	0.75 (0.08)	0.67 (0.04)	n=5
B15	S375(398)A	1.17 (0.19)	5	0.95 (0.02)	3	1.08 (0.06)	1.14 (0.11)	1.04 (0.05)	n=6
B16	D376(399)A	1.45 (0.36)	4	1.00 (0.05)	3	0.80 (0.16)	0.68 (0.14)	0.55 (0.10)	n=5

【0113】

10

20

30

【0 1 1 4】

B17	A378(401)Q	1.32	(0.13)	3	1.06	(0.05)	3	1.40	(0.17)	1.45	(0.17)	1.19	(0.17)	n=5
B18	E380(405)A	2.19	(0.29)	6	1.04	(0.06)	3	1.18	(0.01)	1.07	(0.05)	0.92	(0.12)	n=2
B19	E382(407)A	1.51	(0.18)	4	1.06	(0.03)	3	0.95	(0.11)	0.84	(0.04)	0.76	(0.17)	n=3
B20	S383(408)A	0.74			1.03	(0.03)	3	0.92	(0.04)	0.94	(0.05)	0.88	(0.07)	n=3
B21	N384(410)A	0.88			1.00	(0.01)	3	1.05	(0.19)	1.10	(0.18)	0.96	(0.18)	n=8
B22	Q386(414)A	0.70	(0.10)	2	1.14	(0.08)	3	1.08	(0.13)	1.19	(0.25)	0.98	(0.14)	n=9
B23	E388(416)A	0.64	(0.12)	2	1.15	(0.09)	3	0.87	(0.03)	0.94	(0.09)	0.62	(0.04)	n=3
B24	N389(417)A	0.73			1.00	(0.02)	3	0.98	(0.15)	0.81	(0.04)	0.75	(0.02)	n=3
B25	N390(418)A	0.87			1.06	(0.04)	3	0.99	(0.10)	0.94	(0.02)	0.87	(0.09)	n=3
B26A	Y391(419)A	1.14			1.00	(0.08)	3	0.97	(0.10)	0.94	(0.02)	0.86	(0.05)	n=3
B26B	Y391(419)F	0.81	(0.10)	2	1.00	(0.01)	3	1.05	(0.12)	1.11	(0.08)	1.01	(0.15)	n=5
B27	K392(420)A	0.97			1.01	(0.08)	3	0.92	(0.20)	0.94	(0.01)	0.79	(0.22)	n=3
B28	L398(426)A	0.94	(0.04)	2	1.13	(0.15)	6	1.17	(0.11)	1.20	(0.08)	0.94	(0.04)	n=3
B29	S400(428)A	0.64	(0.07)	3	1.10	(0.09)	3	0.95	(0.04)	0.99	(0.08)	0.83	(0.07)	n=2
B30	D401(430)A	1.10	(0.09)	3	1.13	(0.16)	6	1.11	(0.12)	1.19	(0.11)	0.97	(0.10)	n=5
B31	D413(444)A	1.21	(0.07)	2	1.00	(0.01)	3	0.83	(0.08)	0.84	(0.06)	0.90	(0.16)	n=2
B32	K414(445)A	1.02			1.00	(0.04)	3	0.64	(0.15)	0.58	(0.18)	0.82	(0.27)	n=3
B33	S415(446)A	0.44			1.04	(0.03)	3	0.90	(0.11)	0.88	(0.05)	0.86	(0.18)	n=2
B34	R416(447)A	1.08			0.96	(0.04)	3	0.68	(0.05)	0.80	(0.05)	0.71	(0.08)	n=2
B35	Q418(449)A	0.77	(0.03)	2	0.98	(0.01)	3	1.00	(0.01)	0.96	(0.02)	0.96	(0.05)	n=2
B36	Q419(450)A	0.76	(0.01)	2	0.97	(0.02)	3	0.68	(0.09)	0.63	(0.07)	0.86	(0.08)	n=3

10

20

30

【 0 1 1 5 】

B37	N421(452)A	0.98	0.99 (0.01)	3	0.90 (0.03)	0.81 (0.0)	0.87 (0.12)	n=2
B38	V422(453)A	1.01	0.98 (0.02)	3	0.89 (0.0)	0.83 (0.05)	0.83 (0.12)	n=2
B39	S424(455)A	1.41 (0.14)	3 0.98 (0.03)	3	1.04 (0.06)	1.02 (0.02)	0.88 (0.09)	n=2
B40	E430(461)A	0.93 (0.03)	2 1.05 (0.02)	3	1.24 (0.11)	1.28 (0.10)	1.20 (0.18)	n=5
B41	H433(464)A	0.41 (0.14)	2 0.98 (0.03)	3	0.92 (0.18)	0.79 (0.18)	1.02 (0.15)	n=3
B42	N434(465)A	3.46 (0.37)	7 1.00 (0.04)	3	0.97 (0.07)	0.98 (0.13)	0.74 (0.12)	n=5
B43	H435(466)A	< 0.10	4 1.25 (0.09)	3	0.77 (0.05)	0.72 (0.05)	0.78 (0.03)	n=3
B44	Y436(467)A	< 0.10	2 0.99 (0.02)	2	0.93 (0.05)	0.91 (0.06)	0.91 (0.15)	n=3
B45	T437(468)A	0.99 (0.07)	1.00 (0.02)	3	1.12 (0.18)	1.00 (0.22)	0.77 (0.19)	n=5
B46	Q438(469)A	0.79 (0.05)	2 1.02 (0.05)	3	0.80 (0.10)	0.72 (0.16)	1.01 (0.17)	n=5
B47	K439(470)A	0.70 (0.04)	2 0.98 (0.04)	3	0.78 (0.16)	0.68 (0.22)	0.86 (0.19)	n=4
B48	S440(471)A	0.99	1.01 (0.02)	3	1.10 (0.15)	1.11 (0.26)	0.93 (0.01)	n=3
B49	S442(473)A	0.86	1.02 (0.02)	3	0.98 (0.08)	0.91 (0.11)	0.95 (0.10)	n=5
B50	S444(475)A	0.80	1.01 (0.02)	3	1.07 (0.03)	1.03 (0.03)	0.88 (0.12)	n=2
B51	K447(478)A	0.62 (0.12)	3 1.02 (0.03)	3	0.95 (0.05)	0.91 (0.05)	0.84 (0.09)	n=2

Fcγ Rに対して向上した結合性を持つ変異体は一般に、この実施例で測定したときに ≥ 1.20 の結合値を持ち、Fcγ Rに対して低下した結合性を持つ変異体は一般に、この実施例で測定したときに ≤ 0.80 の結合値を持つ。FcRnに対して向上した結合性を持つ変異体は一般に、この実施例で測定したときに ≥ 1.30 の結合値を持ち、FcRnに対して低下した結合性を持つ変異体は一般に、この実施例で測定したときに ≤ 0.70 の結合値を持つ。

アラニン変異体以外に、種々の非-アラニン変異体を作製し、これらの変異体のFcR結合活性を、次の表にまとめた。

表 8
非-アラニン変異体

IG2	Res#EU (Kabat)	FcRn 平均 sd n	FcγRI 平均 sd n	FcγRIIA 平均 sd n	FcγRIIB 平均 sd n	FcγRIIIA 平均 sd n
222	D249(262)E			0.97	0.99	0.84 n=1
176	T256(269)G			1.10 (0.03)	1.06 (0.07)	0.96 (0.27) n=2
254	T256(269)N			1.03	0.89	1.13 n=1
157	D265(278)N			0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01) n=3
158	D265(278)E			0.11 (0.04)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01) n=3
189	S267(280)G		R131 1.21 (0.05) H131 0.59 (0.09)		0.97 (0.16)	0.09 (0.02) n=3
84	H268(281)N			1.33	1.41	0.56 n=1
85	H268(281)S			1.35	1.38	0.81 n=1
87	H268(281)Y			1.19	1.29	0.76 n=1
168	E269(282)D			0.89 (0.10)	0.73 (0.07)	1.13 (0.21) n=2
169	E269(282)Q			0.08 (0.01)	0.16 (0.00)	0.28 (0.03) n=2
92	D270(283)N			0.06 (0.01)	0.10 (0.02)	0.04 (0.00) n=2
93	D270(283)E			0.55 (0.05)	0.38 (0.05)	1.17 (0.01) n=2
223	E272(285)Q			1.93	1.81	0.82 n=1
224	E272(285)N			0.43	0.23	0.50 n=1
167	K274(287)Q			0.86	0.94	0.62 n=1
165	N276(289)K			0.81	0.77	0.61 n=1

【0116】

10

20

30

【 0 1 1 7 】

233	N276(289)Q	1.09	0.79	0.91	n=1
79	D280(295)N	1.26 (0.07)	1.38 (0.04)	1.13 (0.13)	n=2
149	D280(295)S	1.07 (0.06)	1.04 (0.08)	1.09 (0.06)	n=2
226	E283(300)Q	1.12	1.24	1.19	n=1
227	E283(300)S	1.03	1.07	0.85	n=1
228	E283(300)N	1.18	1.28	0.94	n=1
229	E283(300)D	1.14	1.23	0.95	n=1
23	N286(303)Q	1.52	1.13	0.96	n=1
237	N286(303)S	1.72	1.38	1.32	n=1
238	N286(303)D	1.41	1.23	0.98	n=1
73	K290(307)Q	1.17	1.26	1.40	n=1
75	K290(307)S	1.27	1.34	1.26	n=1
77	K290(307)E	1.10	1.20	1.30	n=1
78	K290(307)R	1.05	1.15	1.08	n=1
177	K290(307)G	1.07	1.21	1.23	n=1
80	R292(309)K	0.71 (0.17)	0.75 (0.10)	1.15 (0.18)	n=3
81	R292(309)H	0.21 (0.09)	0.12 (0.01)	0.92 (0.08)	n=2
82	R292(309)Q	0.47 (0.12)	0.25 (0.06)	0.45 (0.09)	n=3
83	R292(309)N	0.54 (0.16)	0.29 (0.07)	0.88 (0.02)	n=3
144	E293(310)Q	0.85 (0.03)	0.77 (0.13)	0.99 (0.04)	n=2
145	E293(310)D	0.90 (0.02)	0.88 (0.07)	0.37 (0.07)	n=2
147	E293(310)K	1.13 (0.04)	1.31 (0.17)	0.72 (0.08)	n=4

10

20

30

173	E294(311)Q	1.01	0.95	0.84	n=1
174	E294(311)D	0.37	0.26	0.14	n=1
185	Y296(313)H	0.90	0.81	0.92	n=1
186	Y296(313)W	0.96	0.93	1.38	n=1
70	S298(317)G	0.87 (0.17)	0.63 (0.33)	0.46 (0.09)	n=4
71	S298(317)T	0.41 (0.21)	0.40 (0.19)	0.89 (0.20)	n=3
72	S298(317)N	0.08 (0.01)	0.16 (0.03)	0.06 (0.01)	n=2
218	S298(317)V	0.11 (0.06)	0.17 (0.01)	0.33 (0.19)	n=3
219	S298(317)L	1.14 (0.12)	1.42 (0.31)	0.34 (0.04)	n=3
150	V303(322)L	0.89 (0.05)	0.73 (0.10)	0.76 (0.09)	n=4
151	V303(322)T	0.64 (0.11)	0.34 (0.05)	0.20 (0.05)	n=4
217	E318(337)K	1.03	1.08	0.72	n=1
172	K320(339)R	0.71	0.66	0.68	n=1
202	K320(339)M	1.34	1.40	1.27	n=1
204	K320(339)Q	1.23	1.12	1.17	n=1
205	K320(339)E	1.29	1.34	1.12	n=1
235	K320(339)R	1.24	0.95	0.86	n=1
155	K322(341)R	0.87 (0.07)	0.87 (0.21)	0.92 (0.15)	n=3
156	K322(341)Q	0.87 (0.02)	0.92 (0.23)	0.78 (0.18)	n=3
206	K322(341)E	1.38	1.34	0.81	n=1
207	K322(341)N	0.57	0.36	0.04	n=1

【 0 1 1 8 】

10

20

30

【 0 1 1 9 】

213	S324 (343)N	1.15	1.09	0.97	n=1
214	S324 (343)Q	0.82	0.83	0.78	n=1
215	S324 (343)K	0.66	0.37	0.77	n=1
216	S324 (343)E	0.82	0.73	0.81	n=1
208	K326(345)S	1.44	1.62	1.37	n=1
209	K326(345)N	1.04	1.00	1.27	n=1
210	K326(345)Q	1.36	1.41	1.15	n=1
211	K326(345)D	1.68	2.01	1.36	n=1
212	K326(345)E	1.34 (0.27)	1.47 (0.33)	1.26 (0.04)	n=2
131	A327(346)S	0.23 (0.06)	0.22 (0.05)	0.06 (0.01)	n=4
159	A327(346)G	0.92 (0.09)	0.83 (0.10)	0.36 (0.05)	n=3
196	A330(349)D	0.18	0.08	0.07	n=1
197	A330(349)K	1.28	1.25	1.28	n=1
198	P331(350)S	1.00	0.86	0.86	n=1
199	P331(350)N	0.86	0.65	0.23	n=1
200	P331(350)E	1.06	0.91	0.42	n=1
203	P331(350)K	0.94	0.71	0.33	n=1
141	E333(352)Q	0.70 (0.05)	0.64 (0.09)	1.10 (0.03)	n=2
142	E333(352)N	0.59 (0.04)	0.52 (0.07)	0.56 (0.10)	n=2
143	E333(352)S			0.94	n=1
152	E333(352)K			0.85 (0.14)	n=3
153	E333(352)R	0.75 (0.04)	0.66 (0.03)	0.84 (0.05)	n=2

10

20

30

154	E333(352)D			1.26 (0.04)	n=3	
178	E333(352)G	0.87	0.76	1.05	n=1	
179	K334(353)G	0.76 (0.08)	0.60 (0.13)	0.88 (0.22)	n=5	
135	K334(353)R	1.15 (0.09)	1.33 (0.18)	0.68 (0.07)	n=5	
136	K334(353)Q	1.08 (0.11)	1.10 (0.21)	1.31 (0.26)	n=7	
137	K334(353)N	1.16 (0.11)	1.29 (0.30)	1.15 (0.16)	n=7	
138	K334(353)S	1.01 (0.11)	1.03 (0.05)	1.19 (0.08)	n=3	
139	K334(353)E	0.74 (0.15)	0.72 (0.12)	1.30 (0.09)	n=4	
140	K334(353)D	0.51 (0.09)	0.40 (0.03)	1.13 (0.09)	n=4	
190	K334(353)M	1.18	1.01	1.35	n=1	
191	K334(353)Y	1.15	1.05	1.31	n=1	
192	K334(353)W	1.16	0.91	1.07	n=1	
193	K334(353)H	1.11	1.07	1.26	n=1	
220	K334(353)V		1.13 (0.11)	1.09 (0.15)	1.34 (0.18)	n=3
221	K334(353)L		1.05	1.09	1.38	n=1
171	T335(354)Q		0.86	0.79	0.84	n=1
194	T335(354)E		1.24	1.30	1.19	n=1
195	T335(354)K		1.19	1.14	1.30	n=1
273	A339(359)T	1.23	1.11	1.23	1.42	n=1

次の表は、種々の組み合わせ変異体のF_cR結合活性をまとめたものである。

10

20

30

表 9
組み合わせ変異体

IG2	Res#EU (Kabat)	FcRn 平均 sd n	FcγRI 平均 sd n	FcγRIIA 平均 sd n	FcγRIIB 平均 sd n	FcγRIIA 平均 sd n
96	S267(280)A H268(281)A			1.41	1.72	0.84 n=1
134	E333(352)A K334(353)A			0.72 (0.08)	0.63 (0.13)	1.30 (0.12) n=5
1059	T256(269)A S298(317)A			0.44 (0.03)	0.22 (0.04)	1.41 (0.06) n=2
1051	T256(269)A D280(295)A S298(317)A T307(326)A			0.47 (0.01)	0.30 (0.03)	1.21 (0.26) n=2
106	T256(269)A D280(295)A R292(309)A S298(317)A T307(326)A			0.11	0.08	0.90 n=1
107	S298(317)A E333(352)A			0.34 (0.05)	0.16 (0.08)	1.53 (0.24) n=5
109	S298(317)A K334(353)A			0.41 (0.07)	0.19 (0.08)	1.62 (0.34) n=6
110	S298(317)A E333(352)A K334(353)A			0.35 (0.13)	0.18 (0.08)	1.66 (0.42) n=11
246	S267(280)A E258(271)A			1.62 (0.15)	2.01 (0.45)	1.04 (0.12) n=2
247	S267(280)A R255(268)A			1.60 (0.18)	1.72 (0.13)	0.88 (0.07) n=3

【0121】

10

20

30

248	S267(280)A D280(295)A	1.54 (0.08)	1.96 (0.37)	1.13 (0.07)	n=2
250	S267(280)A E272(285)A	1.51 (0.13)	1.82 (0.32)	0.95 (0.05)	n=3
251	S267(280)A E293(310)A	1.67 (0.11)	1.85 (0.10)	0.92 (0.09)	n=3
264	S267(280)A E258(271)A D280(295)A R255(268)A	1.48 (0.12)	2.03 (0.30)	0.89 (0.04)	n=2
269	E380(405)A N434(465)A	1.02 (0.07)	1.05 (0.11)	1.02	n=2
270	E380(405)A N434(465)A T307(326)A	0.99 (0.06)	0.99 (0.11)	0.96	n=2
271	E380(405)A L309(328)A	0.98	1.04	0.92	n=1
272	N434(465)A K288(305)A	0.94 (0.11)	0.96 (0.17)	0.88	n=2

【0122】

考察

本研究は、ヒトFcγRI、FcγRII、FcγRIII及びFcRnに対するヒトIgG1の完全なマッピングを含んでいる。ヒトのFc (Deusebhofer, Biochemistry 20:2361-2370 (1981)) の結晶構造を基礎とし、溶媒に暴露されたヒトIgG1のFc領域(CH2およびCH3)中アミノ酸のアラニンスキャンが行われた。CH2およびCH3における、それぞれ暴露されたアミノ酸は各々アラニンに変更され、変異体IgGは、5つ全てのヒト受容体に対してアッセイを行った；全ての変異体は、親ポリペプチドとしてヒト化抗IgE E27 IgG1を用いて調べられた。FcγRI及びFcRnは高親和性の受容体である、単量体のIgGは、これら二種の受容体に対するアッセイにおいて評価し

10

20

30

40

50

た。FcγRIIA、FcγRIIB及びFcγRIIIは低親和性受容体であって、免疫複合体を利用することが必要である。そのため、ELISA方式のアッセイが、FcγRIIA、FcγRIIB及びFcγRIIIに対して用いられ、そのアッセイにおいて、3つの抗IgE E27IgGと3つのIgEであらかじめ形成した6量体が、FcγRおよび検出試薬としての抗ヒトIgG Fc-HRPもしくはプロテインG-HRPと結合し得た。結合能を上昇させるために、これらの6量体はヒトVEGF（抗VEGF IgEを用いて）により、多量体として互いに結合させることができる。6量体は低親和性FcγRに対してIgG単量体に比べ非常によく結合し；多量体は6量体よりも受容体に対して強く結合した（図15Aおよび15B）。6量体は十分な結合力を提供し、より少量のIgGしか必要としないため、6量体をアッセイに用いた。抗原が、抗体に対して同一の結合サイトを、少なくとも2つ有する限り、他の抗体：抗原の組み合わせを用いて形成された複合体も利用可能な試薬となり得る。例えば、VEGFは、抗VEGF抗体A. 4. 6. 1に対し、VEGF 2量体あたり2つの結合サイトを含んでいる（Kim et al., Growth Factors 7:53 (1992)およびkim et al. Nature 362:841 (1993)）。VEGF：抗VEGF多量体も低親和性のFcγRIIA、FcγRIIB及びFcγRIIIAに対して結合した（図16Aおよび16B）。

【0123】

一度完全なアラニンスキャンが行われると、いくつかのクラスのアラニン変異体が見出された。ある変異体は全てのFcγRに対して減少した結合能を示し（G14、図17）、一方他の変異体はただ一つのFcγRに対して減少した結合能を示しが（G36、図17）、その他の変異体はただ一つのFcγRに対して改善した結合能を示す（G15、G54、G55、図17。、また、同時にある種のFcγRには減少した結合能を示すが、他の種のFcγRに対しては改善した結合能を示すものもある（G16、図17）。

個々のアラニン変異体は単一のFc領域の変異体と組み合わせることも可能である。例えば、S298(317)AとK334(353)Aを組み合わせると、S298(317)AもしくはK334(353)A単独の場合よりも、FcγRIIIAに対して結合力が向上した（図18A、B；および表6と9における変異体、36、55、および109と比較されたい）（括弧の中の残基番号はKabatのE Uインデックスによる）。

選択したIgG変異体については、哺乳類細胞に形質転換されたFcγRに対する結合力も調べられた。GPI-linkを用い、ヒトFcγRIIIAのα鎖細胞外部分により、CHO細胞を形質転換し、一方、ヒトFcγRIIBにおいては受容体の全長を用いて、CHO細胞を形質転換した。調べた変異体に関して、細胞に対する結合様式は、タンパク質対タンパク質のアッセイ（ELISA）における結合の様式と同様であった（図18A-Bおよび19A-B）。

【0124】

これらの変異体の用途の一つは、抗体のADCCエフェクター機能を改善することである。そのような事は、FcγRIIIAとの結合を改善せしめるであろう、Fc領域における一又はそれ以上のアミノ酸残基を修飾することにより達成できる。FcγRIIIAとの結合が改善されることにより、FcγRIIIAのみを保持しADCCを媒介する事ができるNK細胞との結合が向上するであろう。FcγRIIIAとの結合が減少（変異体17,18,34；表6）、もしくはFcγRIIIAとの結合に影響がないか（変異体31；表6）、もしくはFcγRIIIAとの結合が向上した（範囲体30、36、表6）、選択されたアラニン変異体は、エフェクター細胞としてヒトPBMCを用いたインビトロにおけるADCCアッセイにより調べられた。標的細胞は、HER2過発現SKBR3細胞であるので、このアッセイに用いたIgG Fc領域の変異体は、抗IgE E27のV_H/V_L領域を抗HER2抗体のV_H/V_L領域と置き換えることで作製した；HERCEPTIN（登録商標）（Carter et al. PNAS(USA) 89:4285-4289における表1、humAb4D5-8）。変異体により示されたADCCのパターンは、FcγRIIIAとの結合パターンとよく相関している（図20および21）。特に、タンパク質対タンパク質のアッセイにおいて、FcγRIIIAとの結合が最もよく向上した変異体、変異体36S298(317)Aは、野生型のHER

C E P T I N（登録商標）と1.25 n g / m l 濃度で比較した場合、A D C Cにおける活性の向上をも示した（図21）。

【0125】

実施例5

多形性F c レセプターに対するF c 領域変異体の結合

いくつかのヒトF c γ Rの対立遺伝子変異体は、ヒトの集団において見出されたきた。これらの対立遺伝子変異体は、ヒトおよびマウスI g Gとの結合において相違を示すことが明らかにされ、多くの関連研究により、特異的な対立遺伝子型と臨床結果との相関が示されたきた（Lehrnbecher et al. Blood 94 (12):4220-4232 (1999)を参照されたし）

。F c γ R I I Aの2つの型、R131およびH131と臨床結果との相関について、多くの研究が行われたきた（Hatta et al. Genes and Immunity 1:53-60 (1999); Yap et al. Lupus 8:305-310 (1999);およびLorenz et al. European J. Immunogenetics 22:397-401 (1995))。二つのF c γ R I I Aの対立遺伝子型、F158およびV158が、唯一現在研究が行われている（Lehrnbecher et al., supra;およびWu et al. J. Clin. Invest. 100(5):1059-1070 (1997))。本実施例において、選択されたI g G変異体は、F c γ R I I AもしくはF c γ R I I I Aの対立遺伝子型に対して検討されている。基本的には、上記実施例に示したようなF c レセプター結合アッセイを行った。しかしながら、F c γ R I I I A-V158に対しては、(a) 実施例1（I g G複合体のF c γ R I I I A-V158に対する結合能を解析している）における低親和性受容体結合アッセイ；および(b) 実施例4（I g G単体のF c γ R I I I A-V158に対する結合能を解析している）に示す高親和性F c γ R結合アッセイが行われている。これらの研究の結果は、以下の表10に要約されている。

【0126】

10

20

表 10
FcγRIIA及びFcγRIIIA多形性レセプターへの変異体の結合性

IG2	Res#EU (Kabat)	IgG 複合体			IgG 複合体			IgG 複合体			IgG 複合体			IgG 単量体		
		FcγRIIA-R131 平均	sd	n	FcγRIIA-H131 平均	sd	n	FcγRIIA-F158 平均	sd	n	FcγRIIA-V158 平均	sd	n	FcγRIIA-V158 平均	sd	n
11	T256(269)A	1.41	(0.27)	9				1.32	(0.18)	9	0.97	(0.03)	2	1.20		1
254	T256(269)N	1.03		1				1.13		1	0.95		1	0.88		1
14	D265(278)A	0.07	(0.01)	4				0.09	(0.06)	4	0.01		1			
15	S267(280)A	1.64	(0.18)	7	1.05	(0.03)	2	1.14	(0.25)	7						
189	S267(280)G	1.21	(0.05)	3	0.59	(0.09)	3	0.09	(0.02)	3						
16	H268(281)A	1.22	(0.14)	12	1.09	(0.01)	2	0.52	(0.09)	12						
25	E283(300)A	1.24	(0.23)	5				1.01	(0.14)	5				0.78		1
226	E283(300)Q	1.12		1				1.19		1				0.89		1
227	E283(300)S	1.03		1				0.85		1				0.83		1
228	E283(300)N	1.18		1				0.94		1				0.63		1
229	E283(300)D	1.14		1				0.95		1				0.67		1
30	K290(307)A	1.29	(0.21)	7				1.28	(0.21)	7	1.12	(0.05)	2	1.13		1
73	K290(307)Q	1.17		1				1.40		1	1.02		1	1.30		1
75	K290(307)S	1.27		1				1.26		1	1.05		1	1.62		1
77	K290(307)E	1.10		1				1.30		1	0.98		1	1.50		1
78	K290(307)R	1.05		1				1.08		1	1.07		1	1.24		1
177	K290(307)G	1.07		1				1.23		1	1.11		1	2.29		1

【0127】

10

20

30

【0 1 2 8】

31	R292(309)A	0.27 (0.14)	9	0.90 (0.18)	9	0.94	1
80	R292(309)K	0.71 (0.17)	3	1.15 (0.18)	3	1.64	1
81	R292(309)H	0.21 (0.09)	2	0.92 (0.08)	2	1.21	1
82	R292(309)Q	0.47 (0.12)	3	0.45 (0.09)	3	0.56	1
83	R292(309)N	0.54 (0.16)	3	0.88 (0.02)	3	0.91	1
144	E293(310)Q	0.85 (0.03)	2	0.99 (0.04)	2	1.00	1
33	E294(311)A	0.87 (0.19)	5	0.66 (0.14)	5	0.68	1
173	E294(311)Q	1.01	1	0.84	1	0.79	1
174	E294(311)D	0.37	1	0.14	1	0.26	1
36	S298(317)A	0.40 (0.08)	12	1.30 (0.18)	12	1.02 (0.04)	2
70	S298(317)G	0.87 (0.17)	4	0.46 (0.09)	4	0.88	1
71	S298(317)T	0.41 (0.21)	3	0.89 (0.20)	3	0.96	1
72	S298(317)N	0.08 (0.01)	2	0.06 (0.01)	2	0.66	1
218	S298(317)V	0.11 (0.06)	3	0.33 (0.19)	3	0.88	1
219	S298(317)L	1.14 (0.12)	3	0.34 (0.04)	3	0.83	1
40	V305(324)A	1.12 (0.12)	4	1.04	1	0.84 (0.15)	4
41	T307(326)A	1.19 (0.37)	12	1.37 (0.13)	2	1.12 (0.18)	12
45	N315(334)A	1.15 (0.06)	5	1.11 (0.06)	2	1.07 (0.21)	5
46	K317(336)A	1.13 (0.05)	4	1.04	1	1.10 (0.23)	4
48	K320(339)A	1.12 (0.11)	4	1.16	1	0.87 (0.17)	4
54	E333(352)A	0.92 (0.12)	10	1.27 (0.17)	10	1.10 (0.10)	2
						1.29	1

10

20

30

【0 1 2 9】

141	E333(352)Q	0.70 (0.05) 2	1.10 (0.03) 2	1.05	1	1.00	1
142	E333(352)N	0.59 (0.04) 2	0.56 (0.10) 2	0.64	1	0.56	1
143	E333(352)S		0.94	1 0.99	1	1.07	1
152	E333(352)K		0.85 (0.14) 3	0.88	1	0.81	1
153	E333(352)R	0.75 (0.04) 2	0.84 (0.05) 2	0.93	1	0.83	1
154	E333(352)D		1.26 (0.04) 3	1.00	1	1.70	1
178	E333(352)G	0.87	1.05	1		1.23	1
55	K334(353)A	1.01 (0.15) 17	1.39 (0.19) 17	1.07 (0.09) 3	1.60 (0.01) 2		
135	K334(353)R	1.15 (0.09) 5	0.68 (0.07) 5		0.88	1	
136	K334(353)Q	1.08 (0.11) 7	1.31 (0.26) 7	1.27 (0.01) 2	1.92	1	
137	K334(353)N	1.16 (0.11) 7	1.15 (0.16) 7	1.19 (0.06) 2	1.70	1	
138	K334(353)S	1.01 (0.11) 3	1.19 (0.08) 3	1.25	1	1.82	1
139	K334(353)E	0.74 (0.15) 4	1.30 (0.09) 4	1.17	1	2.75	1
140	K334(353)D	0.51 (0.09) 4	1.13 (0.09) 4	1.07	1		
179	K334(353)G	0.76 (0.08) 5	0.88 (0.22) 5	0.94	1	1.28	1
190	K334(353)M	1.06	1.35	1 0.99	1	2.08	1
191	K334(353)Y	1.08	1.31	1 0.98	1	1.72	1
192	K334(353)W	0.94	1.07	1 0.96	1	1.53	1
193	K334(353)H	1.09	1.26	1 0.97	1	2.06	1
220	K334(353)V	1.13 (0.11) 3	1.34 (0.18) 3	1.00	1	2.89	1
221	K334(353)L	1.05	1.38	1 0.96	1	3.59	1

10

20

30

65	P331(350)A	1.29 (0.14)	3	1.03 (0.19)	3	0.96	1	0.78	1
198	P331(350)S	1.00	1	0.86	1			0.54	1
199	P331(350)N	0.86	1	0.23	1			0.24	1
200	P331(350)E	1.06	1	0.42	1			0.36	1
203	P331(350)K	0.94	1	0.33	1			0.26	1
96	S267(280)A H268(281)A	1.54 (0.12)	3	1.07 (0.06)	2	0.84	1		
110	S298(317)A E333(352)A K334(353)A	0.35 (0.13)	11	1.66 (0.42)	11	1.19 (0.18)	3		
271	E380(405)A L309(328)A	0.98	1	0.92	1			1.10	1

【0130】

FcγRIIIAにおいては、選択されたIgG1変異体と相対的に高い親和性を示すFcγRIIIA-V158の結合パターンは、相対的に低い親和性を示すFcγRIIIA-F158（F158型は全ての変異体アッセイで用いた）。それ程明白な改善ではないが、FcγRIIIA-F158型に対する改善した結合能を示すIgG1変異体は、FcγRIIIA-V158型に対しても改善した結合能を示した。FcγRIIIA-R131（全ての変異体アッセイにおいて使用）およびFcγRIIIA-H131に対して、選択されたIgG1変異体の結合パターンは、なんらかの明白な相違を示さなかった。S267(280)A、H268(281)A、お

10

20

30

40

50

よび S267(280)A/H268(281)Aは、天然存在の I g G 1 に比して、F c γ R I I A -R131には改善された結合能を示したが、F c γ R I I A -H131に対しては示さなかった。これに対して、S267(280)Gは、F c γ R I I A -R131に対しては、改善された結合能を示したが、F c γ R I I A -H131に対しては結合能の低下を示した（表10）。その他の変異体は、両方の F c γ R I I A 対立遺伝子型と同程度に結合した；それらの変異体は、V305(324)A、T307(326)A、N315(324)A、K317(336)A、およびK320(339)Aである。

【図面の簡単な説明】

【0131】

【図1】天然 I g G の模式図である。ジスルフィド結合は C H 1 及び C L ドメイン及び 2 つの C H 2 ドメインの間の太線で示した。V は可変ドメインであり；C は定常ドメインであり；L は軽鎖を表し H は重鎖を表す。

10

【図2】野生型(wt) C 2 B 8 抗体；ヒト I g G 2 定常領域 (I g G 2) を持つ C 2 B 8 抗体；及び変異体 K 3 2 2 A、K 3 2 0 A 及び E 3 1 8 A の C 1 q 結合性を示す図である。

【図3】変異体の P 3 3 1 A、P 3 2 9 A 及び K 3 2 2 A の C 1 q 結合性を示す図である。

【図4A】E 2 7 抗-I g E 抗体の軽鎖 (Fig.4A；配列番号：1) 及び重鎖 (Fig.4B；配列番号2) のアミノ酸配列を示す図である。

【図4B】E 2 7 抗-I g E 抗体の軽鎖 (Fig.4A；配列番号：1) 及び重鎖 (Fig.4B；配列番号2) のアミノ酸配列を示す図である。

【図5】実施例1に記載した F c R アッセイで用いるために調製した「免疫複合体」の模式図である。3つの抗-I g E 抗体分子（「F c 領域含有ポリペプチド」）及び3つの I g E 分子（「第1の標的分子」）を含む六量体を示した。I g E は、その F c 領域に抗-I g E 抗体 (E 2 7) に対する2つの「結合部位」を有する。複合体中の各 I g E 分子は、さらに2つの V E G F 分子（「第2の標的ポリペプチド」）に結合できる。V E G F は I g E に対する2つの「結合部位」を有する。

20

【図6】野生型 C 2 B 8 と比較した変異体 D 2 7 0 K 及び D 2 7 0 V について得られた C 1 q 結合性結果を示す図である。

【図7】野生型 C 2 B 8 と比較した際の変異体 D 2 7 0 K 及び D 2 7 0 V の補体依存性細胞毒性 (C D C) を示す図である。

【図8】293細胞-産生野生型 C 2 B 8 抗体 (293-wt-C 2 B 8)、C H O-産生野生型 C 2 B 8 抗体 (C H O-wt-C 2 B 8) 及び種々の変異抗体についての C 1 q 結合 E L I S A の結果を示す図である。

30

【図9】実施例3で測定したような野生型(wt) C 2 B 8 及び種々の変異抗体についての C 1 q 結合 E L I S A の結果を示す図である。

【図10】ヒト I g G F c 領域の三次元構造を示す図であり、強調した残基は、A s p 2 7 0、L y s 3 2 6、P r o 3 2 9、P r o 3 3 1、L y s 3 2 2 及び G l u 3 3 3 である。

【図11】実施例3で測定したような野生型 C 2 B 8 及び種々の変異抗体についての C 1 q 結合 E L I S A の結果を示す図である。

【図12】野生型 C 2 B 8 及び二重変異抗体、K 3 2 6 M-E 3 3 3 S 及び K 3 2 6 A-E 3 3 3 A についての C 1 q 結合 E L I S A の結果を示す図である。

40

【図13】野生型 C 2 B 8 及び二重変異抗体、K 3 2 6 M-E 3 3 3 S 及び K 3 2 6 A-E 3 3 3 A についての C D C を示す図である。

【図14】ヒト I g G 4 重鎖定常領域 (I g G 4) を持つ C 2 B 8、野生型 C 2 B 8 (Wt-C 2 B 8)、ヒト I g G 2 重鎖定常領域 (I g G 2) を持つ C 2 B 8、及び実施例3に記載したような種々の変異体について得られた C 1 q 結合 E L I S A の結果を示す図である。

【図15A】親抗体 (E27) と F c γ R I I B および F c γ R I I I A との結合パターンを示す図である。図15Aは、単量体 (白丸)、6量体 (黒四角)、および多種6量体により構成される免疫複合体 (黒三角) としての、ヒト化抗 I g E E 2 7 I g G 1 の、組換

50

体ヒトFcγRIIB (CD32) 受容体のαサブユニットのGST融合タンパク質に対する結合パターンを示す。6量体 (黒四角) は等モル濃度のE27 (ヒトIgEのFc領域と結合する) とヒトミエローマIgEとの混合物により形成された。6量体は、安定な1.1kDaの複合体で3つのIgG分子 (各々150kDa) と3つのIgE分子 (各々200kDa) によって構成される。免疫複合体は、初めに、6量体を形成するため等モル濃度のE27と抗VEGF IgE (ヒトVEGFに結合するFab領域を有するヒトIgE) を混合することにより、連続的に形成される。6量体はその後、免疫複合体を形成するために、2倍のモル濃度のヒトVEGF (VEGF分子あたり、抗VEGF IgEに対し、2つの結合部位を持つ44kDaのホモ2量体) を加えることにより、互いに連結される。

【図15B】図15Bは、ヒトFcγRIIA (CD16) のαサブユニットとGSTとの融合組換えタンパク質との結合パターンを示す。

10

【図16A】FcγRIIA受容体のαサブユニットのGST融合組換えタンパク質と、異なる抗原抗体対を用いて形成させた免疫複合体との結合を示す図である。

【図16B】FcγRIIA受容体のαサブユニットのGST融合組換えタンパク質と、Aと同じ抗原抗体対を用いて形成させた免疫複合体との結合を示す図である。黒丸は、ヒトIgEと抗IgE E27 IgG1から成る免疫複合体との結合を示す。白丸は、ヒトVEGFとヒト化抗VEGF IgG1から成る免疫複合体との結合を示す。

【図17】いくつかのアラニン変異体と異なるFcγRsとの結合選択性の相違をまとめた図である。抗IgE E27 IgG1のCH2領域のアミノ酸残基におけるアラニン変異体とFcγRIIA、FcγRIIB及びFcγRIIAとの結合が示されている。タイプ1は、全3つのレセプターとの結合を抑制する；D273A (EU番号付けでは265)。タイプ2は、FcγRIIA、FcγRIIBとの結合は向上させるが、FcγRIIAとの結合には影響を与えない；S280A (EU番号付けでは267)。タイプ3は、FcγRIIA、FcγRIIBとの結合は向上させるが、FcγRIIAとの結合は低下させる；H281A (EU番号付けでは268)。タイプ4は、FcγRIIA、FcγRIIBとの結合は低下させるが、FcγRIIAとの結合は向上させる；S317A (EU番号付けでは298)。タイプ5は、FcγRIIAとの結合は向上させるが、FcγRIIA、FcγRIIBとの結合には影響を与えない；E352A、K353A (EU番号付けでは333および334)。

20

【図18A】FcγRIIAのタンパク質/タンパク質のアッセイ、GPI-FcγRIIA CHO細胞におけるアッセイの結果を各々示す図である。図18Aは、選択されたアラニン変異体のFcγRIIA-GST融合タンパク質に対する結合性を示している。S317A (EU番号付けでは298) およびS317A/K353A (EU番号付けでは298および334) は、E27野生型よりも強く結合し、一方、S278A (EU番号付けでは265) では、ほぼ完全に結合力が消失している。

30

【図18B】図18Bは、GPI連結型組換え体FcγRIIAを発現しているCHO細胞において、同様の結合様式が見られることを示している。

【図19A】FcγRIIBのタンパク質/タンパク質のアッセイおよびGPI-FcγRIIB CHO細胞におけるアッセイの結果を各々比較したものである。図19Aは、選択されたアラニン変異体のFcγRIIB-GST融合タンパク質に対する結合性を示している。H281A (EU番号付けでは268) は、E27野生型よりも強く結合し、一方、S317A (EU番号付けでは298) では、結合性の低下が見られる。

40

【図19B】図19Bは、組換え体膜結合性FcγRIIBを発現しているCHO細胞において、同様の結合様式が見られることを示している。

【図20】タンパク質/タンパク質および細胞を基礎としたアッセイにおいてFcγRIIAとの結合性に影響を与える抗HER2 IgG1のCH2領域 (HERCEPTIN (登録商標)) 中のアラニン残基置換は、抹消血単核細胞 (PBMC) エファクター細胞表面のFcγRIIAとの結合性を変化させることを示している。組換え体ヒト化抗HER2 (HERCEPTIN (登録商標)) は、HER2を発現しているSK-BR-3乳癌細胞に結合するが、この組換え体抗体100ng/ml (黒丸) および1.25ng/ml (黒四

50

角)と、C r⁵¹で標識したS K-B R-3細胞とを30分間プレインキュベートした(オプソニル化)。S K-B R-3癌標的細胞の濃度を一定に保ち、エフェクター細胞の比率を0から100まで増加させた。抗体非存在下における自発的細胞毒性(斜掛け四角)は、エフェクター細胞(E)と標的細胞(T)との比率が100:1の時に、20%であった。F c γ R I I I Aとの結合に影響を与えないアラニンの一残基置換(G31=R309A(E U番号付けでは292))は、A D C Cに影響を与えない(黒三角)。F c γ R I I I Aとの結合を僅かにのみ上昇させるアラニンの一残基置換(G30=K307A(E U番号付けでは290))(1.25 n g / m l 黒菱形)は、野生型の抗体(1.25 n g / m l 黒四角)と比較してE:T全ての比率において、A D C C活性をも僅かに上昇させた。F c γ R I I I Aとの結合を減少させるアラニンの一残基置換(G34=Q312A(E U番号付けでは295))は、A D C C活性をも減少させた(黒逆三角)。

10

【図21】タンパク質/タンパク質および細胞を基礎としたアッセイにおいてF c γ R I I I Aとの結合を最もよく向上させるアラニンの一残基置換(G36=S317A(E U番号付けでは298))は、野生型(1.25 n g / m l)と比較した変異体中で最高のA D C C活性上昇を示した(黒三角)。G36は、1.7倍のA D C C活性の上昇を示した(曲線下の面積として計算した)。G17=E282A(E U番号付けでは269)変異体およびG18=D283A(E U番号付けでは270)変異体は、F c γ R I I I Aとの結合性の低下を示す他、A D C Cに対する有効性も減少した。エフェクター細胞はP B M C sを用いた。

【図22A】図22Aはネイティブ(天然)なI g G F c領域のアライメントを示す。ヒトI g G F c領域配列のネイティブアミノ酸配列、ヒトI g G 1(非AおよびAアロタイプ)(配列I D番号:各々3および4)、ヒトI g G 2(配列I D番号:5)、ヒトI g G 3(配列I D番号:6)およびヒトI g G 4(配列I D番号:7)を示す。ヒトI g G 1配列は非Aアロタイプで、この配列とAアロタイプ間の相違は(E U番号付けで356番と358番目)、ヒトI g G 1配列の下に示してある。マウスI g G 1 F c領域のネイティブアミノ酸配列、マウスI g G 1(配列I D番号:8)、マウスI g G 2A(配列I D番号:9)、マウスI g G 2B(配列I D番号:10)およびマウスI g G 3(配列I D番号:11)、も示してある。

20

【図22B】図22Bは、図22A中のF c領域配列同士における同一性の比率を示す。

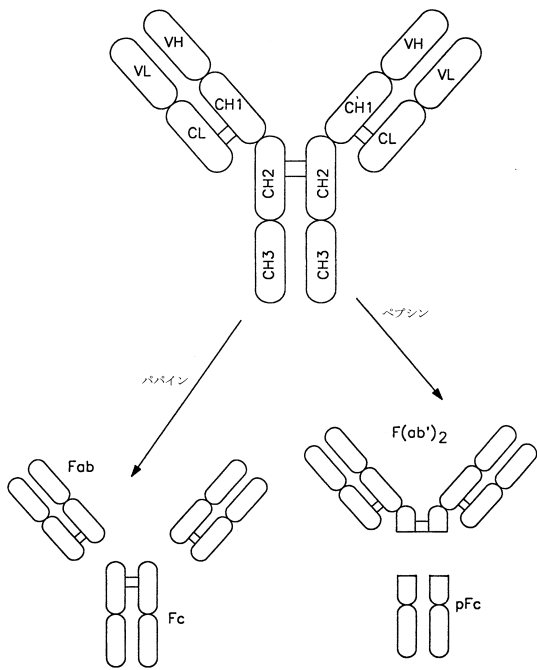
【図23】ヒトI g G F c領域のネイティブ配列のアライメント、ヒトI g G 1(非AおよびAアロタイプ)(配列I D番号:各々3および4)、ヒトI g G 2(配列I D番号:5)、ヒトI g G 3(配列I D番号:6)およびヒトI g G 4(配列I D番号:7)を示し、配列相互間の相違はアスタリスクで示す。

30

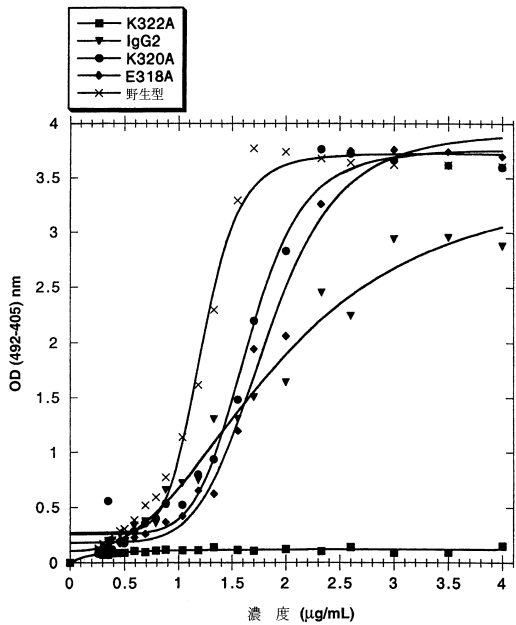
【図24】4時間のA D C Cアッセイににおける抗H E R 2 I g G 1(H E R C E P T I N(登録商標))に対する選択された変異体の曲線下面性(A U C)を示す。エフェクター細胞はP B M C s(N=5)である。F c γ R I I I Aと上昇した結合性を示す変異体G36(S317A; E U番号付けでは298)は、向上したA D C C活性を示した; F c γ R I I I Aとの結合性において変化を示さなかった変異体G31(R309A; E U番号付けでは292)はA D C C活性も変化させなかった。;さらに、F c γ R I I I Aとの結合性を減少させた変異体G14(D265A; E U番号付けでは278)は、A D C C活性をも減少させた。

40

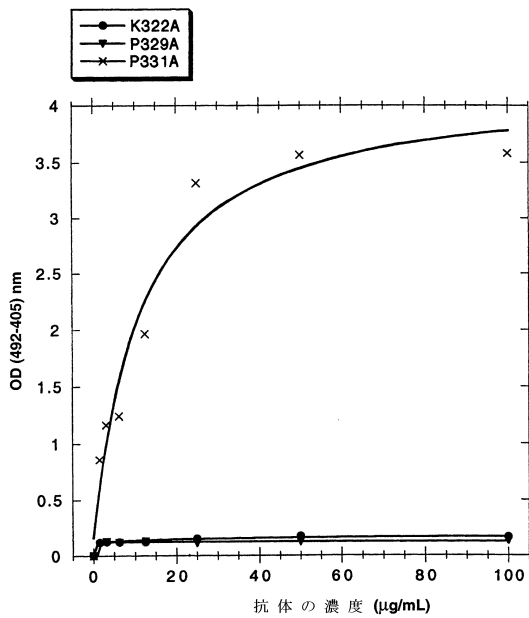
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4 A】

(E27) - 軽鎖

DIQLTQSPSS LSASVGRVT ITCRASKPVD GEGDSYMNWY QOKPGKAPKL LIYAASYLES GVPGRFSGSG
SGTDFLTITIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL STLTLSKADY EKHVYACEV THQGLSSFT
KSFNRGEC

【図 4 B】

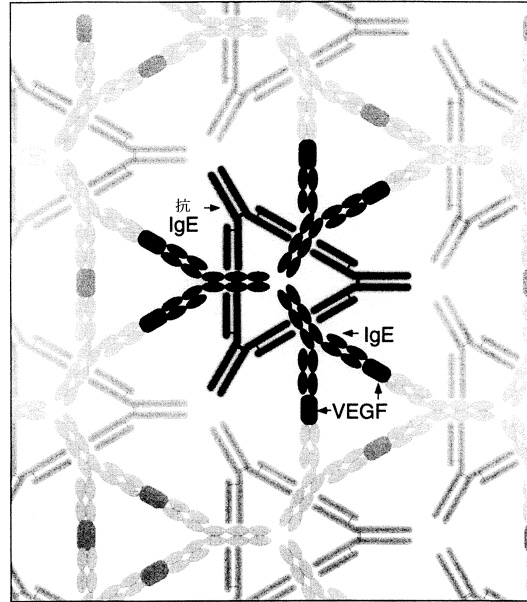
(E27) - 重鎖

```

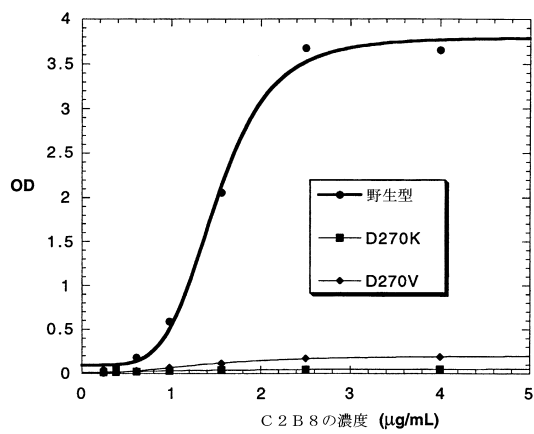
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVGSYIT SGYSWNIRQ APKGLEWVA SIKYGETKY NPSVGRITL
SRDDSKNTFY LOMNSLAED TAVYICARGS HYFGHWFAV WQGTIVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYPPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYLSLVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHIC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTYPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPSPD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGSGSFFL YSKLTVDKSR
WQGGNVFSCS VMHEALHNYH TQKSLSLSPG K

```

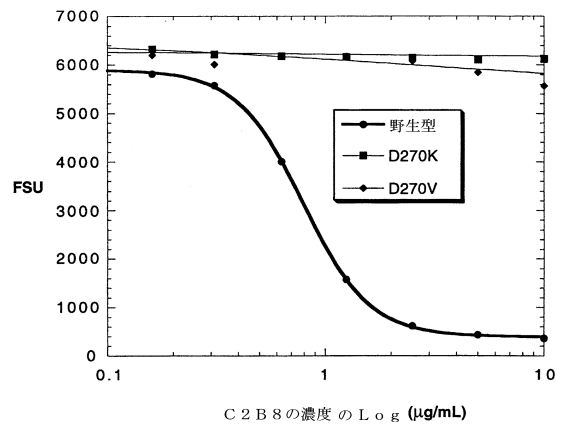
【図 5】



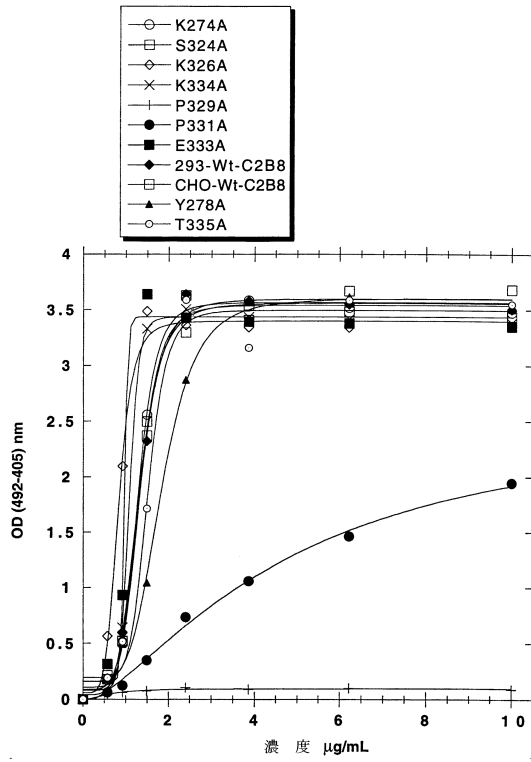
【図 6】



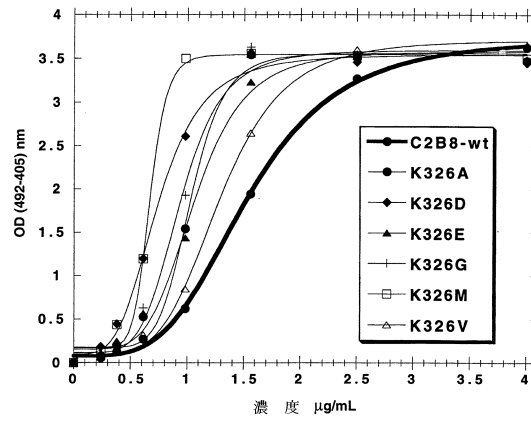
【図 7】



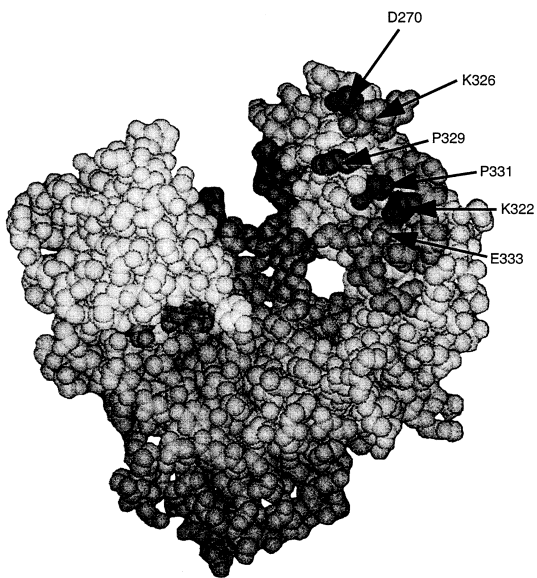
【図 8】



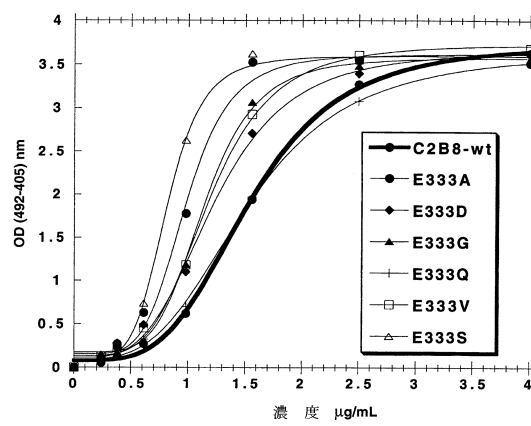
【図 9】



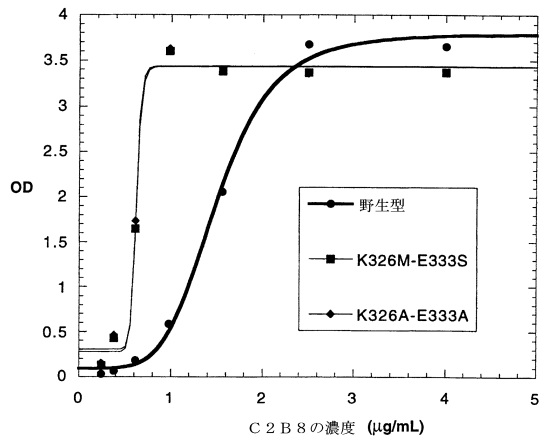
【図 10】



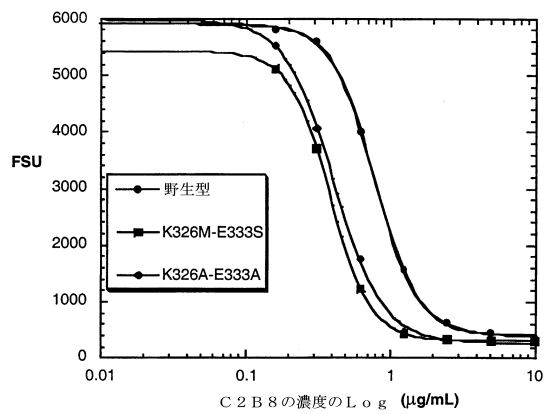
【図 11】



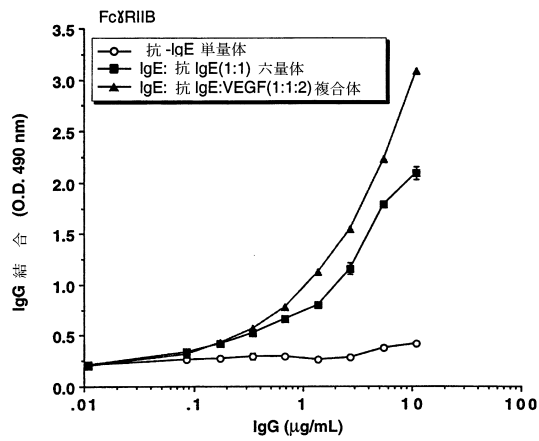
【図 1 2】



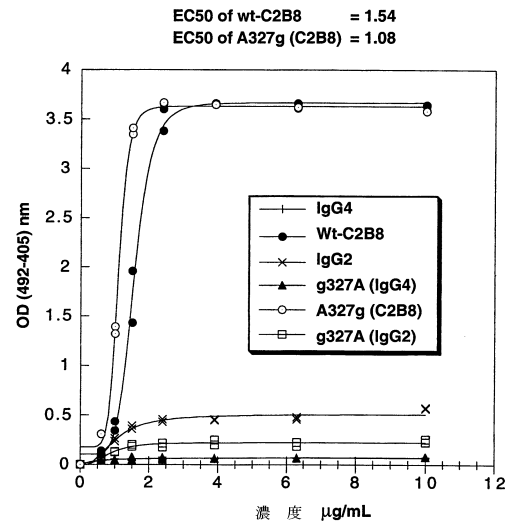
【図 1 3】



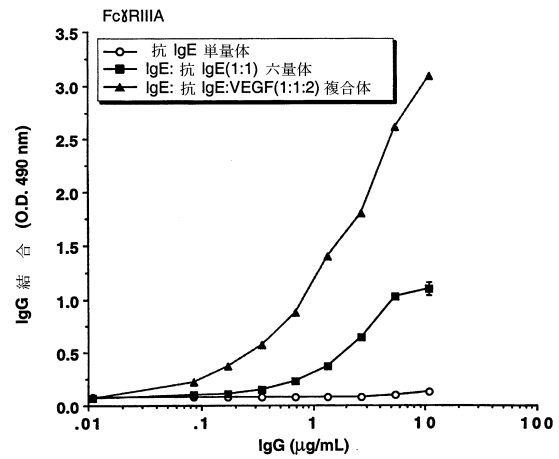
【図 1 5 A】



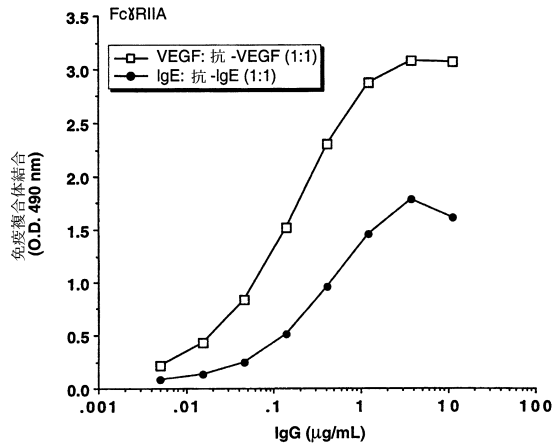
【図 1 4】



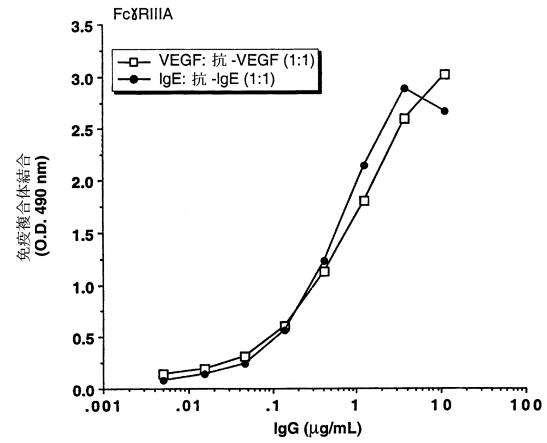
【図 1 5 B】



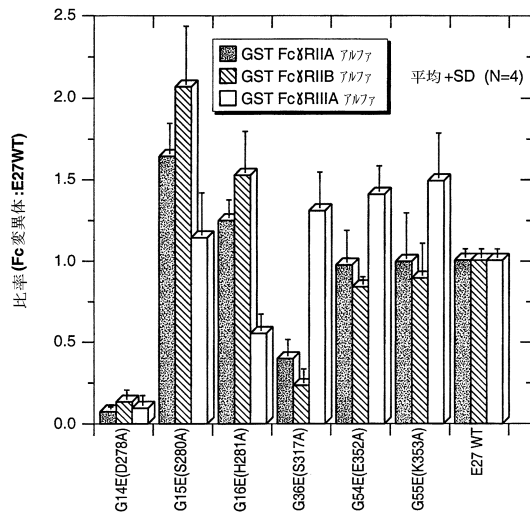
【図 16 A】



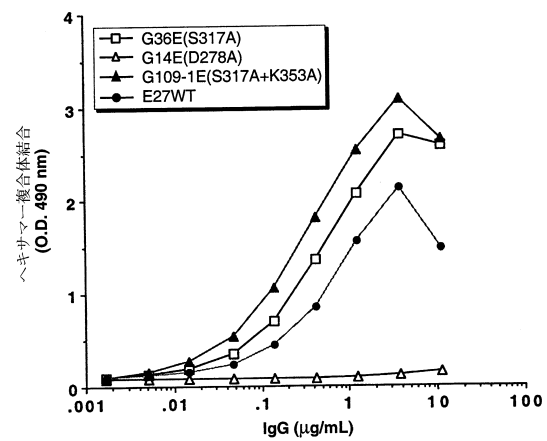
【図 16 B】



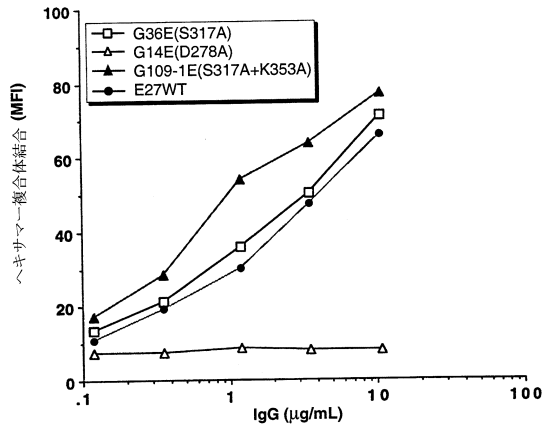
【図 17】



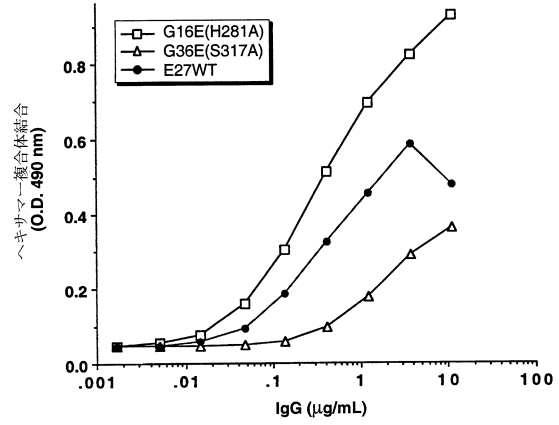
【図 18 A】



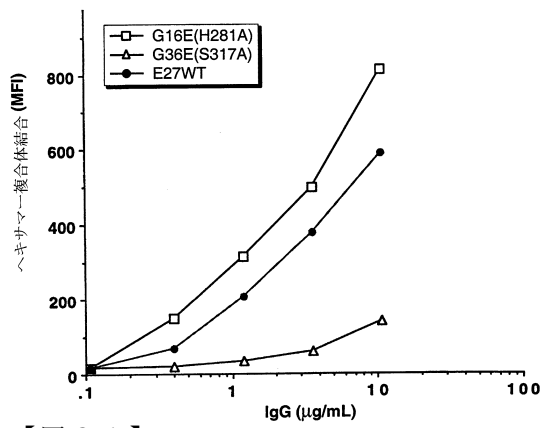
【図 18 B】



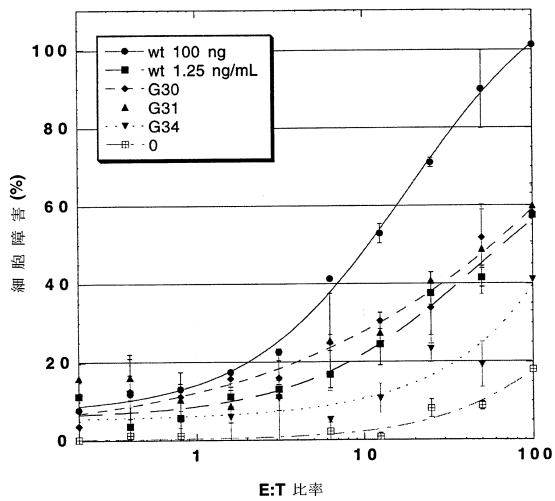
【図 19 A】



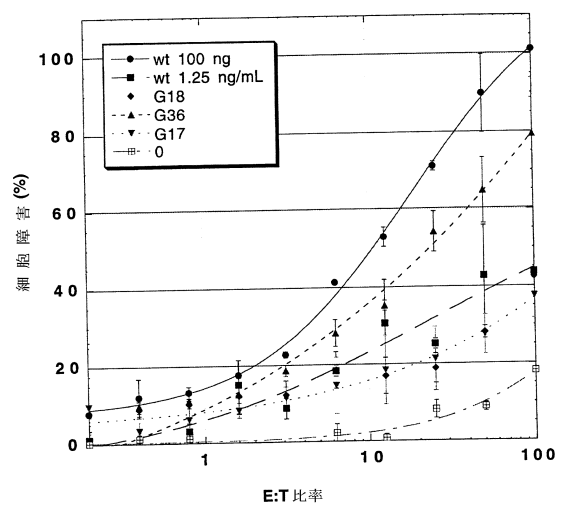
【図 19 B】



【図 20】



【図 21】



【図 2 2 A】

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP - PVAGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
murIgG1	---TVPEVSSVFIPPPKKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFNSWFV				
murIgG2A	PAPNLLGGPSVFIIPPNIKDVLIMISLSPVTCVVVDVSEDDPDVQISWVF				
murIgG2B	PAPNLLGGPSVFIIPPNIKDVLIMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWVF				
murIgG3	PPGNILGGPSVFIIPPKKDALMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVHVSWFV				
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
murIgG1	DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSESLPIHQDCLNGKEFKCKVNSAAPP				
murIgG2A	NNVEVHTAQTQTHREYDNTSLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL				
murIgG2B	NNVEVHTAQTQTHREYDNTSLRVVSHLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL				
murIgG3	DNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKALP				
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
murIgG1	APIEKTISKTKGRKAPQVYTIIPPKQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV				
murIgG2A	APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMTDFMEEDIV				
murIgG2B	SPIERTISKPKGLVRAPQVYVLPPEEQLSRKQVSLTCLVVGPNQDVS				
murIgG3	APIERTISKPKGRAPQVYTIIPPRQMSKKVSLTCLVTNFFSEAI				
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
humIgG3	EWESNGQPENNYNTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
murIgG1	EWQWNGQPAENYKNTOPIMTDGSGFYFYSKLNVKSNWEAGNFFCSV				
murIgG2A	EWTNNGKTELNVKNTPEVLDSDGSFYFYSKLNVKSNWEAGNFFCSV				
murIgG2B	EWTNNGKTELNVKNTPEVLDSDGSFYFYSKLNVKSNWEAGNFFCSV				
murIgG3	EWTNNGKTELNVKNTPEVLDSDGSFYFYSKLNVKSNWEAGNFFCSV				
	430	440			
humIgG1	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
murIgG1	EGLHNHNTKSLSHSPGK				
murIgG2A	EGLHNHNTKSLFSRTPGK				
murIgG2B	EGLKNYLYKKTLSRSPGK				
murIgG3	EALHNHNTQKSLSLSPGK				

【図 2 2 B】

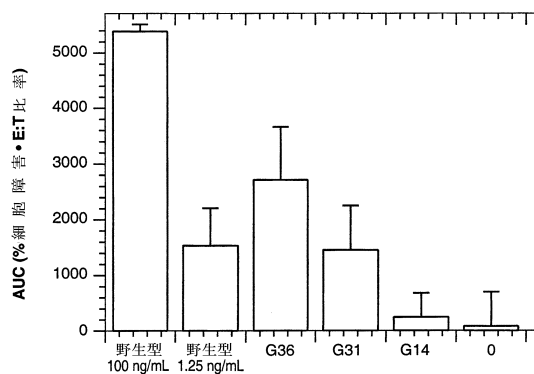
Fc配列間のパーセント同一性

		1	2	3	4	5	6	7	8
1.	humIgG1	-	94	94	94	64	66	63	68
2.	humIgG2		-	93	92	65	63	60	67
3.	humIgG3			-	91	64	64	61	67
4.	humIgG4				-	62	64	61	64
5.	murIgG1					-	65	61	67
6.	murIgG2A						-	77	70
7.	murIgG2B							-	68
8.	murIgG3								-

【図 2 3】

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP - PVAGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
	****			*	**
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
		*	*	*	*
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
		D L			
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	**	*		*	
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
humIgG3	EWESNGQPENNYNTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS				
	*	*	*	*	*
	430	440			
humIgG1	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHNTQKSLSLSPGK				
	**	*			

【図 2 4】



【配列表】

0006230257000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 C
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

合議体

審判長 田村 明照

審判官 福井 悟

審判官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第98/058964 (WO, A1)
 国際公開第98/023289 (WO, A1)
 国際公開第97/034631 (WO, A1)
 特表平1-502875 (JP, A)
 The Journal of Immunology, 1998年, Vol. 161, No. 8, p. 3862-3869
 Proc Natl Acad Sci USA, 1991年, Vol. 88, No. 20, p. 9036-9040
 European Journal of Immunology, 1998年7月1日, Vol. 28, No. 7, p. 2092-2100
 Immunology, 1995年, Vol. 86, p. 319-324
 Nature Biotechnology, 1997年, Vol. 15, No. 7, 637-640

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

C07K1/00-19/00

A61K39/00-39/44

JSTPlus/JST7580/JMEDPlus (JDreamIII)、
 CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/AGRIC
 ORA/SCISEARCH (STN)