

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5242502号
(P5242502)

(45) 発行日 平成25年7月24日(2013.7.24)

(24) 登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 6 外国語出願 (全 135 頁)

(21) 出願番号	特願2009-141637 (P2009-141637)	(73) 特許権者	501154035
(22) 出願日	平成21年5月25日 (2009.5.25)		ゼンコー・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2005-501987 (P2005-501987) の分割		X E N C O R、 I N C.
原出願日	平成15年9月26日 (2003.9.26)		アメリカ合衆国91016カリフォルニア
(65) 公開番号	特開2009-203237 (P2009-203237A)		州モンロビア、ウエスト・レモン・アベニ
(43) 公開日	平成21年9月10日 (2009.9.10)	(74) 代理人	100082005
審査請求日	平成21年6月24日 (2009.6.24)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	60/414, 433	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成14年9月27日 (2002.9.27)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084663
(31) 優先権主張番号	60/442, 301		弁理士 箱田 篤
(32) 優先日	平成15年1月23日 (2003.1.23)	(74) 代理人	100093300
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】最適化Fc変異体およびそれらの生成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトの親IgG1ポリペプチドのFc変異体を含むポリペプチドであって、当該Fc変異体が、当該親ポリペプチドのFc領域において位置328で328M、328E、328Fおよび328Aからなる群から選択されるアミノ酸置換を含み、かつ、親ポリペプチドと比較して減少したFcγRIIIaへの結合性を示し、ここで番号付けはEUインデックスに従う、ポリペプチド。

【請求項2】

当該FcγRIIIaが、FcγRIIIaのV158またはF158アロタイプである、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

当該ポリペプチドが抗体または融合体である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

当該抗体が工学処理された糖形態をさらに含む、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項5】

当該ポリペプチドが、CD19、CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA125、HLA-DR、TNFαおよびVEGFからなる群から選択される標的抗原に特異性を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項6】

10

20

当該Fc変異体が328Fの置換を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2003年6月12日に出願されたUS 60/477,839; 2003年5月2日に出願された60/467,606; 2002年9月27日に出願された60/414,433; および2003年1月23日に出願された60/442,301に対し、35 U.S.C. § 199 (e) の利益を主張する出願であり、これらの出願の全体を出典明示により本明細書の一部とする。

【0002】

10

発明の分野

本発明は、新規最適化Fc変異体、それらの生成のための工学処理方法、および特に治療目的へのそれらの適用に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

抗体は、特定の抗原に結合する免疫タンパク質である。ヒトやマウスを含む殆どの哺乳動物において、抗体は、対になった重鎖と軽鎖のポリペプチド鎖から構築される。各々の鎖は、個々の免疫グロブリン(Ig)ドメインからできており、従って一般用語の免疫グロブリンは、このようなタンパク質に対して使用される。各鎖は、2個の別個の領域からなり、これらは可変および定常領域と呼ばれる。軽鎖と重鎖の可変領域は、抗体間でかなりの配列多様性を示し、標的抗原の結合を担う。定常領域は、乏しい配列多様性を示し、重要な生化学的事象を誘起する数々の天然タンパク質の結合を担う。ヒトでは、5種の異なるクラスの抗体があり、IgA(サブクラスIgA1およびIgA2を含む)、IgD、IgE、IgG(サブクラスIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む)、およびIgMが含まれる。これらの抗体クラス間を区別する顕著な特徴は、それらの定常領域であり、一方V領域には微妙な違いが存在することがある。図1は、本明細書で免疫グロブリンの一般的構造特徴を説明する例として用いられるIgG1抗体を示す。IgG抗体は、2本の重鎖および2本の軽鎖から構成される四量体タンパク質である。IgG重鎖は、N末端からC末端へV_H-C_γ1-C_γ2-C_γ3(各々、重鎖可変ドメイン、定常ガンマ1ドメイン、定常ガンマ2ドメインおよび定常ガンマ3ドメインを表す)の順に連結された4個の免疫グロブリンドメインから構成される。IgG軽鎖は、N末端からC末端へV_L-C_L(各々、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常ドメインを表す)の順に連結された2個の免疫グロブリンドメインから構成される。

20

30

【0004】

抗体の可変領域は、この分子の抗原結合決定基を含有し、従って、その標的抗原に対する抗体の特異性を決定する。可変領域は、同じクラス内の他の抗体から配列が最も異なっているために、このように名付けられている。配列可変性の大部分は、相補性決定領域(CDR)において生じる。重鎖と軽鎖に3個ずつ、全部で6個のCDRがあり、V_HCDR1、V_HCDR2、V_HCDR3、V_LCDR1、V_LCDR2およびV_LCDR3と呼ばれるCDRの外側の可変領域は、フレームワーク(FR)領域と呼ばれる。CDRほど多様ではないが、配列可変性は、異なる抗体間で、FR領域において生じる。全体的に、抗体のこの特徴的構造様式が、安定な骨格(FR領域)をもたらし、その上で実質的な抗原結合多様性(CDR)が免疫系により探索され、幅広い抗原群に対する特異性が獲得される。様々な生物由来の多様な可変領域フラグメントについて、数々の高解像度構造が入手可能である。未結合のものもあり、抗原と複合体化したものもある。抗体の可変領域の配列および構造的な特徴は、十分に特徴解析されており(Morea et al., 1997, Biophys Chem 68:9-16; Morea et al., 2000, Methods 20:267-279)、抗体の保存された特徴は、豊かな抗体工学処理技法の発展を可能にしてきた(Maynard et al., 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-376)。例えば、ある抗体、例えばマウスの抗体からのCDRを、別の抗体

40

50

、例えばヒトの抗体のフレームワーク領域に移植することが可能である。当分野で「ヒト化」と呼ばれるこのプロセスは、非ヒト抗体からの免疫原性の低い抗体治療剤の生成を可能にする。可変領域を含むフラグメントは、抗体の他の領域の非存在下で存在でき、例えば、 $V_H-C\gamma 1$ および V_H-C_L を含む抗原結合フラグメント (Fab)、 V_H および V_L を含む可変フラグメント (Fv)、同じ鎖中で一緒に連結された V_H および V_L を含む一本鎖可変フラグメント (scFv)、並びに多様な他の可変領域フラグメントが包含される (Little et al., 2000, Immunol Today 21:364-370)。

【0005】

抗体のFc領域は、数々のFc受容体およびリガンドと相互作用し、エフェクター機能と呼ばれる一群の重要な機能的能力を伝える。IgGについて、Fc領域は、図1に示す通り、Igドメイン $C\gamma 2$ および $C\gamma 3$ 並びに $C\gamma 2$ に導くN末端ヒンジを含む。IgGクラスに対する重要なFc受容体ファミリーは、Fcガンマ受容体 (Fc γ R) である。これらの受容体は、抗体と免疫系の細胞の武器との間のコミュニケーションを媒介する (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。ヒトでは、このタンパク質ファミリーには、アイソフォームFc γ RIa、Fc γ RIbおよびFc γ RIcを含むFc γ RI (CD64) ; アイソフォームFc γ RIIa (アロタイプH131およびR131を含む)、Fc γ RIIb (Fc γ RIIb-1およびFc γ RIIb-2を含む) およびFc γ RIIcを含むFc γ RII (CD32) ; そして、アイソフォームFc γ RIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFc γ RIIIb (アロタイプFc γ RIIIb-NA1およびFc γ RIIIb-NA2を含む) を含むFc γ RIII (CD16) が含まれる (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。これらの受容体は、典型的に、Fcへの結合を媒介する細胞外ドメイン、膜貫通領域、および細胞内でのシグナル伝達事象を媒介し得る細胞内ドメインを有する。これらの受容体は、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、B細胞、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、および $\gamma\gamma$ T細胞を含む様々な免疫細胞において発現される。Fc/Fc γ R複合体の形成は、これらのエフェクター細胞を結合した抗原の部位に募らせ、典型的に細胞内のシグナル伝達事象およびそれに続く重要な免疫反応、例えば、炎症介在物質の放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、ファゴサイトーシスおよび細胞傷害性攻撃など、をもたらす。細胞傷害およびファゴサイトーシスのエフェクター機能を媒介する能力は、それにより抗体が標的細胞を破壊する潜在能力のあるメカニズムである。Fc γ Rを発現する非特異的細胞傷害細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、それに続いて標的細胞の溶解を引き起こす細胞介在反応は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 (ADCC) と呼ばれる (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。Fc γ Rを発現する非特異的細胞傷害細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、それに続いて標的細胞のファゴサイトーシスを引き起こす細胞介在反応は、抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシス (ADCP) と呼ばれる。数々のヒトFc γ Rの細胞外ドメインの構造が解明されてきた。これには、Fc γ RIIa (pdb受託コード1H9V) (Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737-749) (pdb受託コード1FCG) (Maxwell et al., 1999, Nat Struct Biol 6:437-442)、Fc γ RIIb (pdb受託コード2FCB) (Sondermann et al., 1999, Embo J 18:1095-1103) ; およびFc γ RIIIb (pdb受託コード1E4J) (Sondermann et al., 2000, Nature 406:267-273) が含まれる。全Fc γ R類は、Fc上の同じ領域に、 $C\gamma 2$ ドメインのN末端および先行するヒンジで結合する (図2に示す)。この相互作用は、十分に構造解析されており (Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737-749)、ヒトFc γ RIIIbの細胞外ドメインに結合したヒトFcのいくつかの構造 (pdb受託コード1E4K) (Sondermann et al., 2000, Nature 406:267-273) (pdb受託コードs1IISおよび1IIX) (Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477)、並びにヒトIgE/Fc ϵ RI α 複合体の構造 (pdb受託コード

10

20

30

40

50

1 F 6 A) (Garman et al., 2000, Nature 406:259-266) が解明されてきた。

【0006】

異なる I g G サブクラスは、F c γ R 類に対して異なる親和性を有し、I g G 1 および I g G 3 が、典型的に I g G 2 および I g G 4 よりも実質的に良好に受容体に結合する (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。全 F c γ R 類は、I g G F c の同じ領域に、但し異なる親和性で結合する：高い親和性で結合する F c γ R I は、I g G 1 への $Kd\ 10^{-8}M^{-1}$ を有し、一方、低親和性受容体の F c γ R I I および F c γ R I I I は、一般的に各々 10^{-6} および 10^{-5} で結合する。F c γ R I I I a および F c γ R I I I b の細胞外ドメインは、96% 同一であるが、F c γ R I I I b は細胞内シグナル伝達ドメインを持たない。さらに、F c γ R I、F c γ R I I a / c および F c γ R I I I a は免疫複合体が引き起こす活性化の正の調節因子であり、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を有する細胞内ドメインを有することを特徴とし、一方、F c γ R I I b は、免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ (ITIM) を有し、従って阻害性である。故に、前者は活性化受容体と呼ばれ、F c γ R I I b は、阻害性受容体と呼ばれる。これらの受容体は、様々な免疫細胞における発現パターンおよびレベルにおいても異なる。さらに、別のレベルの複雑さは、ヒトのプロテオームにおける数々の F c γ R 多型の存在である。特に臨床的に意味のある関連多型は、V 1 5 8 / F 1 5 8 F c γ R I I I a である。ヒト I g G 1 は、F 1 5 8 アロタイプよりも V 1 5 8 アロタイプに高い親和性で結合する。この親和性の差異、および恐らくその A D C C および / または A D C P に対する効果は、抗 C D 2 0 抗体リツキシマブ (Rituxan^(登録商標)、IDEC Pharmaceuticals Corporation の登録商標) の効力の重大な決定因子であることが示された。V 1 5 8 アロタイプの患者は、リツキシマブ処置に好都合に応答する；しかしながら、低親和性の F 1 5 8 アロタイプの患者は、不十分に応答する (Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758)。ヒトの約 10 - 20 % は V 1 5 8 / V 1 5 8 ホモ接合型であり、45 % は V 1 5 8 / F 1 5 8 ヘテロ接合型であり、ヒトの 35 - 45 % は F 1 5 8 / F 1 5 8 ホモ接合型である (Lehrnbecher et al., 1999, Blood 94:4220-4232; Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758)。従って、ヒトの 80 - 90 % は不十分な応答者である、即ち、彼らは少なくとも 1 つの F 1 5 8 F c γ R I I I a 対立遺伝子を有する。

【0007】

図 1 に示す、F c 上の重なり合うが別個の部位は、補体タンパク質 C 1 q への接点 (interface) として働く。F c / F c γ R 結合が A D C C を媒介するのと同じやり方で、F c / C 1 q 結合は、補体依存性細胞傷害作用 (CDC) を媒介する。C 1 q は、セリンプロテアーゼ C 1 r および C 1 s と複合体を形成し、C 1 複合体を形成する。C 1 q は、6 個の抗体を結合する能力があるが、補体カスケードを活性化するには 2 個の I g G への結合で十分である。F c の F c γ R 類との相互作用と同様に、異なる I g G サブクラスは、C 1 q に対して異なる親和性を有し、I g G 1 および I g G 3 は、典型的に、I g G 2 および I g G 4 よりも実質的に良好に F c γ R 類に結合する (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。F c / C 1 q 複合体の現在入手可能な構造はない；しかしながら、変異誘発研究により、ヒト I g G 上の C 1 q の結合部位が、残基 D 2 7 0、K 3 2 2、K 3 2 6、P 3 2 9 および P 3 3 1 および E 3 3 3 を含む領域にマッピングされた (Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575)。

【0008】

図 1 に示す、F c 上の C γ 2 および C γ 3 ドメインの間の部位は、新生児の受容体 F c R n との相互作用を媒介し、その結合により、エンドサイトーシスされた抗体がエンドソームから血流へ再利用される (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766)。この過程は、完全長分子のサイズが大きいことによる腎臓濾過の除外と対になって、1 ないし 3 週間の範囲に渡る好都合な抗体血清半減期をもたらす。F c の F c R n への結合は、また、抗体輸送において鍵となる役割を果たす。F c 上の F c R n 結合部位はまた、細菌のプロテイン A および

Gが結合する部位でもある。これらのタンパク質による密接な結合は、典型的に、タンパク質精製中にプロテインAまたはプロテインG親和性クロマトグラフィーを用いることにより、抗体精製の手段として活用される。従って、Fc上のこの領域の忠実度は、抗体の臨床的特性およびそれらの精製の両方にとって重要である。ラットFc/FcRn複合体 (Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877) およびFcのプロテインAおよびGとの複合体 (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20:2361-2370; Sauer-Eriksson et al., 1995, Structure 3:265-278; Tashiro et al., 1995, Curr Opin Struct Biol 5:471-481) の入手可能な構造は、Fcのこれらのタンパク質との相互作用への洞察を与える。

【0009】

Fc領域の鍵となる特徴は、図1に示す、N297で生じる保存されたN連結グリコシレーションである。この炭水化物またはオリゴ糖類（このように呼ばれるときもある）は、抗体にとって決定的な構造的および機能的役割を果たし、哺乳動物発現系を使用して抗体を産生しなければならない根拠的理由の1つである。一理論に限定されることを望まないが、この炭水化物の構造的目的は、Fcの安定化または可溶化、Cγ3およびCγ2ドメイン間の特定の角度または可撓性のレベルの決定、2個のCγ2ドメインを、中心軸を超えて相互に凝集させずにおくこと、またはこれらの組合せであり得ると考えられる。効率的なFcγRおよびC1qへのFcの結合は、この修飾を必要とし、N297の炭水化物の組成の変更またはその除去は、これらのタンパク質への結合に影響を与える (Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539-45547.; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263:133-147)。この炭水化物は、FcγR類との特異的接触をあるとしてもごくわずかにしか成さないが (Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477)、このことは、Fc/FcγR結合の媒介におけるN297炭水化物の機能的役割は、それがFcの高次構造の決定において果たす構造的役割を介するものであり得ることを示している。このことは、オリゴ糖組成がCγ2の高次構造に、そして結果的にFc/FcγRの接点に衝撃を与えることを示す、4種の異なるFc糖形態の結晶構造を集めることにより支持される (Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325:979-989)。

【0010】

上記で論じた抗体の特徴一標的への特異性、免疫エフェクターメカニズムを媒介する能力、および血清中での長い半減期は、抗体を強力な治療剤にする。モノクローナル抗体は、癌、炎症および心血管疾患を含む様々な症状の処置のために治療的に使用されている。現在市場に10種を超える抗体製品があり、数百が開発中である。抗体に加え、研究および治療において拡大中の役割を見出している抗体様タンパク質は、Fc融合体である (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200)。Fc融合体は、1個またはそれ以上のポリペプチドが、Fcに機能し得るように連結されたタンパク質である。Fc融合体は、抗体のFc領域を、従ってその好都合なエフェクター機能および薬物動態を、受容体、リガンドまたはその他のタンパク質またはタンパク質ドメインの標的結合領域と組み合わせる。後者の役割は、標的認識を媒介することであり、従って、それは抗体可変領域と機能的に類似する。Fc融合体は抗体と構造および機能的に重複するので、本発明における抗体に関する議論は、直接Fc融合体に及ぶ。

【0011】

このような広範な用途にも関わらず、抗体は、臨床使用のために最適化されていない。抗体の2つの重大な欠点は、最適には及ばない抗癌能力と、厳しい製造要件である。本発明は、これらの欠点に取り組む。

【0012】

抗体が腫瘍細胞を破壊する数々の可能なメカニズムがあり、必要な増殖経路の遮断を介する抗増殖、アポトーシスへ導く細胞内シグナリング、受容体の下方調節および／または

10

20

30

40

50

代謝回転の増強、C D C、A D C C、A D C Pおよび適応免疫反応の促進が含まれる (Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410)。抗腫瘍効力は、これらのメカニズムの組合せによるものであり得、それらの臨床治療における相対的重要性は、癌依存性であると思われる。このように抗腫瘍兵器の兵器庫であるにも関わらず、抗癌剤としての抗体の能力は、特にそれらの高いコストを考えると不満足なものである。患者の腫瘍応答データは、モノクローナル抗体が、通常の単剤の細胞毒性化学療法剤に対して、治療の成功に小さな改善をもたらすにすぎないことを示している。例えば、低悪性度非ホジキンリンパ腫の全再発患者のちょうど半分が、抗C D 2 0抗体のリツキシマブに応答する (McLaughlin et al., 1998, J Clin Oncol 16:2825-2833)。臨床患者1 6 6人の6 %が完全な応答を示し、4 2 %が部分的応答を示し、応答期間の中央値は約1 2月であった。転移乳癌処置用の抗H E R 2 / n e u抗体であるトラスツズマブ (Herceptin^(登録商標)、Genentechの登録商標) は、もっと低い効力である。総括的応答率は、トラスツズマブを被験患者2 2 2人に使用して、わずか1 5 %であり、8人が完全に、2 6人が部分的に応答し、応答期間および生存の中央値は9ないし1 3月であった (Cobleigh et al., 1999, J Clin Oncol 17:2639-2648)。現在、抗癌療法については、死亡率のいかなる小さな改善であっても、成功と定義される。従って、標的癌細胞を破壊する抗体の能力の増強に対して、重大な要望がある。

【0 0 1 3】

抗体の抗腫瘍能力を増強するための有望な手段は、A D C C、A D C PおよびC D Cなどの細胞傷害性エフェクター機能を媒介する能力の増強を介するものである。抗体の抗癌活性のためのF c γ R媒介性エフェクター機能の重要性は、マウスで立証されており (Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:652-656; Clynes et al., 2000, Nat Med 6:443-446)、F cとある種のF c γ R類との間の相互作用の親和性は、細胞をベースとするアッセイにおいて標的細胞傷害と相関する (Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740)。さらに、ヒトにおける臨床効力と、彼らのF c γ R I I I aの高 (V 1 5 8) または低 (F 1 5 8) 親和性多型アロタイプとの間に相関が観察された (Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758)。これらのデータを合わせると、ある種のF c γ R類への結合について最適化されたF c領域を有する抗体は、より良好にエフェクター機能を媒介し、それにより患者において癌細胞をより効果的に破壊することが示唆される。活性化受容体と阻害性受容体との間の均衡は、重要な検討事項であり、最適なエフェクター機能は、活性化受容体 (例えばF c γ R I、F c γ R I I a / cおよびF c γ R I I I a) に対して増強された親和性を有し、一方阻害性受容体F c γ R I I bには低減された親和性を有するF cから生じ得る。さらに、F c γ R類は、抗原提示細胞による抗原取込およびプロセッシングを媒介できるので、F c / F c γ R親和性の増大は、抗体治療剤の適応免疫反応を誘起する能力も改善し得る。

【0 0 1 4】

様々な目標に向けて、F cの変異誘発研究が実行されてきた。置換は典型的にアラニンにされた (アラニンスキャンと呼ばれる) か、または、配列相同性置換により導かれた (Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65) (U S 5, 6 2 4, 8 2 1; U S 5, 8 8 5, 5 7 3; P C T W O 0 0 / 4 2 0 7 2; P C T W O 9 9 / 5 8 5 7 2)。置換の大多数は、F c γ R類との結合を低減させるか、または失わせる。しかしながら、より高いF c γ R親和性を有するF c変異体の獲得において、いくつかの成果が成された (例えば、U S 5, 6 2 4, 8 2 1およびP C T W O 0 0 / 4 2 0 7 2参照)。例えば、Winter と共同研究者たちは、ヒトの位置2 3 5のアミノ酸をマウスI g G 2 b抗体のものと置

10

20

30

40

50

換し（グルタミン酸からロイシンへの変異）、それはマウス抗体のヒト F c γ R I への結合を 100 倍まで増加させた（Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564）（U S 5, 6 2 4, 8 2 1）。Shields らは、アラニンスキャン変異誘発を使用し、F c γ R 結合に必要な F c 残基をマッピングし、続いて選択残基を非アラニン変異で置換した（Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490）（P C T W O 0 0 / 4 2 0 7 2）。S 2 9 8 A、E 3 3 3 A および K 3 3 4 A を含む、この研究で開示された数個の変異は、活性化受容体 F c γ R I I I a への結合の増強と、阻害性受容体 F c γ R I I b への結合の低減を示す。これらの変異は、組み合わせられて、結合の相加的改善を示す二重および三重変異の変異体をもたらした。この研究で開示された最良の変異体は、S 2 9 8 A / E 3 3 3 A / K 3 3 4 A 三重変異であり、F 1 5 8 F c γ R I I I a への結合において約 1.7 倍の増加、F c γ R I I b への結合において 5 倍の減少、そして A D C C において 2.1 倍の増強を伴った。

【0015】

F c の F c γ R への親和性の増強は、工学処理細胞株または変異体細胞株において抗体を発現させることにより生成させた、工学処理された糖形態を使用しても達成された（Uma et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473）。このアプローチは、抗体の F c γ R I I I a への結合能力および A D C C の媒介能力の実質的な増強を生じさせた。大スケールの産生条件下での発現系統の増殖効率などの実用上の制限はあるものの、F c / F c γ R 親和性とエフェクター機能の増強のためのこのアプローチは有望である。実際に、この代替糖形態の技法を本発明の F c 変異体と組み合わせることは、最適なエフェクター機能に相加的または共同的な効果をもたらす得る。

【0016】

より大きいエフェクター機能への要望があるが、いくつかの抗体治療剤のためには、低減された、または除去されたエフェクター機能が求められることがある。これは、その作用メカニズムが遮断または拮抗作用を含むが標的抗原を有する細胞の殺傷を含まない治療用抗体の場合に、よくあることである。これらの場合、標的細胞の枯渇は望ましくなく、副作用と考えることができる。例えば、T 細胞上の C D 4 受容体を遮断する抗 C D 4 抗体の能力は、これらを効果的な抗炎症剤にしているが、それらの F c γ R 受容体を募らせる能力は、標的細胞に対する免疫攻撃も導き、T 細胞の枯渇をもたらす（Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933）。エフェクター機能は、放射性コンジュゲート（radioc conjugate）と呼ばれる放射性標識抗体、および免疫毒と呼ばれる毒素に結合させた抗体についても問題であり得る。これらの薬物は、癌細胞の破壊に使用できるが、F c の F c γ R 類との相互作用を介して免疫細胞を募らせることは、致命的荷重（放射能または毒素）の近傍に健康な免疫細胞を運び込み、標的癌細胞と共に正常リンパ組織の枯渇をもたらす（Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; White et al., 2001, Annu Rev Med 52:125-145）。この問題は、補体またはエフェクター細胞を弱く募らせる I g G アイソタイプ、例えば I g G 2 および I g G 4、の使用により、回避できる可能性がある。代替的解決法は、結合を低減させるか、または失わせる F c 変異体の開発である（Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604）（U S 6, 1 9 4, 5 5 1 ; U S 5, 8 8 5, 5 7 3 ; P C T W O 9 9 / 5 8 5 7 2）。エフェクター機能の低減または除去のために重要な検討事項は、他の重要な抗体の特性が乱されないことである。F c 変異体は、F c γ R 類および / または C 1 q への結合を失うだけでなく、抗体の安定性、溶解性および構造的完全性（integrity）、並びに F c R n およびプロテイン A および G などの他の重要な F c リガンドとの相互作用能を維持するように工学処理されるべきである。

10

20

30

40

50

【0017】

本発明は、抗体のもう1つの主要な短所、即ち、それらの厳しい製造要件を取り扱う（Garber, 2001, Nat Biotechnol 19:184-185; Dove, 2002, Nat Biotechnol 20:777-779）。抗体は哺乳動物細胞で発現させなければならず、現在市販されている抗体は、他の要件が厳しいバイオ治療剤（biotherapeutic）と共に、実質的に全ての利用可能な製造許容量を使い尽くしている。数百の生物剤（biologic）が開発中であり、その大部分が抗体であるので、より効率的かつ安価な製造方法に対する緊急の要望がある。不十分な抗体製造許容量の下流での影響は3倍である。第1に、それは商品のコストを製造者に対して劇的に高め、コストは患者に渡される。第2に、それは承認された抗体製品の産業的製造を妨げ、需要の高い治療剤の患者への入手可能性を制限する。最後に、臨床試験はまだ収益のない大量のタンパク質を必要とするので、不十分な供給は、成長している抗体パイプラインの市場への前進を妨げる。

10

【0018】

代替的製造方法が、この問題の解消を試みて探究されてきた。遺伝子組換え植物および動物は、潜在的に安価かつ高許容量の製造システムとして追求されている（Chadd et al., 2001, Curr Opin Biotechnol 12:188-194）。しかしながら、そのような発現系は、ヒトの糖タンパク質と有意に異なるグリコシレーションパターンを生じさせ得る。これは、エフェクター機能の低減、あるいは喪失さえもたらし得る。なぜなら、上記で論じたように、炭水化物構造は、FcγRおよび補体の結合に有意に衝撃を与え得るからである。非ヒト糖形態に伴う可能性のあるより大きい問題は、免疫原性であり得る；炭水化物は、免疫系にとって抗原性の鍵となる供給源であり、非ヒト糖形態の存在は、その治療剤を中和する抗体を誘起する重大な機会を有し、悪くすると有害な免疫反応を引き起こす。従って、遺伝子組換え植物および動物により産生される抗体の効力と安全性は、不確かなままである。細菌発現は、抗体製造問題に対するもう一つの魅力的な解決法である。細菌、例えば大腸菌（E. coli）での発現は、コスト上有効かつ高許容量のタンパク質製造方法を提供する。抗体などの複雑なタンパク質には、細菌発現に対する数々の障害があり、これには、折り畳み、これらの複雑な分子の会合、適正なジスルフィド形成、並びに、細菌で発現されたタンパク質はグリコシレーションされないので、グリコシレーションの非存在下での溶解性、安定性および機能性が含まれる。抗原に結合する完全長非グリコシル化抗体は、大腸菌で成功裏に発現され（Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263:133-147）、従って、真核生物のシャペロン機構がなくても、細菌で発現された抗体の折り畳み、会合および適切なジスルフィド形成は可能である。しかしながら、細菌発現抗体の治療剤としての最終的な利用性は、エフェクター機能の欠如をもたらし、乏しい安定性と溶解性をもたらし得るグリコシレーションの欠如により、妨げられたままである。このことは、臨床使用に求められる長期間用の高濃度の製剤に関して、さらに問題になると思われる。

20

30

【0019】

好都合な溶解特性およびエフェクター機能媒介能力を有する非グリコシル化Fcは、上記の代替的製造方法を大いに可能にするであろう。非グリコシル化Fcの構造的および機能的短所を克服することにより、細菌並びに遺伝子組換え植物および動物において、免疫原性のリスクを低減させて、そして癌などの細胞傷害作用が望まれる臨床適用のためのエフェクター機能をもたせて、抗体を製造することができる。本発明は、エフェクター機能を有する安定な可溶性Fc変異体を開発するためのタンパク質工学処理方法の利用に関する。現在、そのようなFc変異体は、当分野に存在しない。

40

【0020】

まとめると、治療特性が増強された抗体への要望がある。最適化または増強されたFc変異体の工学処理は、この要望をかなえる有望なアプローチである。所望の特性を有するFc変異体の工学処理に対する実質的な障害は、抗体の不十分な産生とスクリーニング方法と共に、膨大な数の可能性からどのアミノ酸修飾が所望の目標を達成するかを予測することの困難さである。先行技術の不完全な成功の根源的理由の1つは、これまでのFc工

50

学処理へのアプローチが、アラニンスキャンや異なる発現システムを使用する糖形成の産生などのいちかばちかの方法を含むことであった。これらの研究では、成されたFc修飾は、好都合な特性を有する変異体を得ることを期待して、完全または部分的にランダムであった。本発明は、様々な工学処理方法を提供する。その多くは、より洗練された効率的な技法であり、所望の特性について最適化されたFc変異体を開発するために、これらの障害を克服するのに使用し得る。記載する工学処理方法は、Fc修飾を先導する設計戦略、王都合なFc変異体を設計するためのコンピューター処理スクリーニング方法、実験的調査用に有望な変異体を決定するためのライブラリー生成アプローチ、および好都合な特性を有するFc変異体を決定するための一群の実験的産生およびスクリーニング方法を提供する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明は、数々の治療関連特性について最適化されたFc変異体を提供する。

【0022】

本発明の目的は、そこで最適化Fc変異体の生成のためにアミノ酸修飾をなし得る、新規Fc位置を提供することである。当該Fc位置には、240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328および332が含まれる。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。本発明は、最適化Fc変異体を生成させるための、当該新規Fc位置のいずれかにおける任意のアミノ酸修飾に関する。

20

【0023】

本発明のさらなる目的は、コンピューター処理によりスクリーニングされたFc変異体を提供することである。コンピューター処理によりスクリーニングされたFc変異体は、本明細書に記載のコンピューター処理スクリーニング計算により、所望の特性について最適化されている可能性がランダムよりも有意に高いと予想されたものである。このようにして、コンピューター処理スクリーニングは、実験的スクリーニングの前座または代理として役立ち、従って当該コンピューター処理によりスクリーニングされたFc変異体は、新規であると考えられる。

【0024】

30

本発明のさらなる目的は、1またはそれ以上の本明細書に記載の実験方法を使用して特徴解析されたFc変異体を提供することである。ある実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330および332。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む；L234D、L234E、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234Y、L234I、L234V、L234F、L235D、L235S、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235Y、L235I、L235V、L235F、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239F、S239T、S239H、S239Y、V240I、V240A、V240T、V240M、F241W、F241L、F241Y、F241E、F241R、F243W、F243L、F243Y、F243R、F243Q、P244H、P245A、P247V、P247G、V262I、V262A、V262T、V262E、V263I、V263A、V263T、V263M、V264L、V264I、V264W、V264T、V264R、V264F、V264M、V264Y、V264E、D265G、D265N、D265Q、D265Y、D265F、D265V、D265I、D265L、D265H、D265T、V266I、V266A、V266T、V266M、S267Q、S267L、E269H、E

40

50

2 6 9 Y、E 2 6 9 F、E 2 6 9 R、Y 2 9 6 E、Y 2 9 6 Q、Y 2 9 6 D、Y 2 9 6 N
 、Y 2 9 6 S、Y 2 9 6 T、Y 2 9 6 L、Y 2 9 6 I、Y 2 9 6 H、N 2 9 7 S、N 2 9
 7 D、N 2 9 7 E、A 2 9 8 H、T 2 9 9 I、T 2 9 9 L、T 2 9 9 A、T 2 9 9 S、T
 2 9 9 V、T 2 9 9 H、T 2 9 9 F、T 2 9 9 E、W 3 1 3 F、N 3 2 5 Q、N 3 2 5 L
 、N 3 2 5 I、N 3 2 5 D、N 3 2 5 E、N 3 2 5 A、N 3 2 5 T、N 3 2 5 V、N 3 2
 5 H、A 3 2 7 N、A 3 2 7 L、L 3 2 8 M、L 3 2 8 D、L 3 2 8 E、L 3 2 8 N、L
 3 2 8 Q、L 3 2 8 F、L 3 2 8 I、L 3 2 8 V、L 3 2 8 T、L 3 2 8 H、L 3 2 8 A
 、P 3 2 9 F、A 3 3 0 L、A 3 3 0 Y、A 3 3 0 V、A 3 3 0 I、A 3 3 0 F、A 3 3
 0 R、A 3 3 0 H、I 3 3 2 D、I 3 3 2 E、I 3 3 2 N、I 3 3 2 Q、I 3 3 2 T、I
 3 3 2 H、I 3 3 2 Y および I 3 3 2 A。ここで、Fc 領域における残基の番号付けは、
 Kabat にある通りの EU インデックスのものである。最も好ましい実施態様では、当該 F
 c 変異体は、以下からなる群から選択される；V 2 6 4 L、V 2 6 4 I、F 2 4 1 W、F
 2 4 1 L、F 2 4 3 W、F 2 4 3 L、F 2 4 1 L/F 2 4 3 L/V 2 6 2 I/V 2 6 4 I
 、F 2 4 1 W/F 2 4 3 W、F 2 4 1 W/F 2 4 3 W/V 2 6 2 A/V 2 6 4 A、F 2 4
 1 L/V 2 6 2 I、F 2 4 3 L/V 2 6 4 I、F 2 4 3 L/V 2 6 2 I/V 2 6 4 W、F
 2 4 1 Y/F 2 4 3 Y/V 2 6 2 T/V 2 6 4 T、F 2 4 1 E/F 2 4 3 R/V 2 6 2 E
 /V 2 6 4 R、F 2 4 1 E/F 2 4 3 Q/V 2 6 2 T/V 2 6 4 E、F 2 4 1 R/F 2 4
 3 Q/V 2 6 2 T/V 2 6 4 R、F 2 4 1 E/F 2 4 3 Y/V 2 6 2 T/V 2 6 4 R、L
 3 2 8 M、L 3 2 8 E、L 3 2 8 F、I 3 3 2 E、L 3 2 8 M/I 3 3 2 E、P 2 4 4 H
 、P 2 4 5 A、P 2 4 7 V、W 3 1 3 F、P 2 4 4 H/P 2 4 5 A/P 2 4 7 V、P 2 4
 7 G、V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、F 2 4 1 E/F 2 4 3 R/V 2 6 2 E/V 2 6 4 R/I
 3 3 2 E、F 2 4 1 E/F 2 4 3 Q/V 2 6 2 T/V 2 6 4 E/I 3 3 2 E、F 2 4 1 R
 /F 2 4 3 Q/V 2 6 2 T/V 2 6 4 R/I 3 3 2 E、F 2 4 1 E/F 2 4 3 Y/V 2 6
 2 T/V 2 6 4 R/I 3 3 2 E、S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/I 3 3 2 E、S
 2 3 9 Q/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E、D 2 6 5 G、D 2 6 5 N、S 2 3 9 E/D 2 6 5 G
 、S 2 3 9 E/D 2 6 5 N、S 2 3 9 E/D 2 6 5 Q、Y 2 9 6 E、Y 2 9 6 Q、T 2 9
 9 I、A 3 2 7 N、S 2 6 7 Q/A 3 2 7 S、S 2 6 7 L/A 3 2 7 S、A 3 2 7 L、P
 3 2 9 F、A 3 3 0 L、A 3 3 0 Y、I 3 3 2 D、N 2 9 7 S、N 2 9 7 D、N 2 9 7 S
 /I 3 3 2 E、N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、N 2 9 7 E/I 3 3 2 E、D 2 6 5 Y/N 2 9
 7 D/I 3 3 2 E、D 2 6 5 Y/N 2 9 7 D/T 2 9 9 L/I 3 3 2 E、D 2 6 5 F/N
 2 9 7 E/I 3 3 2 E、L 3 2 8 I/I 3 3 2 E、L 3 2 8 Q/I 3 3 2 E、I 3 3 2 N
 、I 3 3 2 Q、V 2 6 4 T、V 2 6 4 F、V 2 4 0 I、V 2 6 3 I、V 2 6 6 I、T 2 9
 9 A、T 2 9 9 S、T 2 9 9 V、N 3 2 5 Q、N 3 2 5 L、N 3 2 5 I、S 2 3 9 D、S
 2 3 9 N、S 2 3 9 F、S 2 3 9 D/I 3 3 2 D、S 2 3 9 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D
 /I 3 3 2 N、S 2 3 9 D/I 3 3 2 Q、S 2 3 9 E/I 3 3 2 D、S 2 3 9 E/I 3 3
 2 N、S 2 3 9 E/I 3 3 2 Q、S 2 3 9 N/I 3 3 2 D、S 2 3 9 N/I 3 3 2 E、S
 2 3 9 N/I 3 3 2 N、S 2 3 9 N/I 3 3 2 Q、S 2 3 9 Q/I 3 3 2 D、S 2 3 9 Q
 /I 3 3 2 N、S 2 3 9 Q/I 3 3 2 Q、Y 2 9 6 D、Y 2 9 6 N、F 2 4 1 Y/F 2 4
 3 Y/V 2 6 2 T/V 2 6 4 T/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、V
 2 6 4 I/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/A 3 3 0 L
 /I 3 3 2 E、L 2 3 4 D、L 2 3 4 E、L 2 3 4 N、L 2 3 4 Q、L 2 3 4 T、L 2 3
 4 H、L 2 3 4 Y、L 2 3 4 I、L 2 3 4 V、L 2 3 4 F、L 2 3 5 D、L 2 3 5 S、L
 2 3 5 N、L 2 3 5 Q、L 2 3 5 T、L 2 3 5 H、L 2 3 5 Y、L 2 3 5 I、L 2 3 5 V
 、L 2 3 5 F、S 2 3 9 T、S 2 3 9 H、S 2 3 9 Y、V 2 4 0 A、V 2 4 0 T、V 2 4
 0 M、V 2 6 3 A、V 2 6 3 T、V 2 6 3 M、V 2 6 4 M、V 2 6 4 Y、V 2 6 6 A、V
 2 6 6 T、V 2 6 6 M、E 2 6 9 H、E 2 6 9 Y、E 2 6 9 F、E 2 6 9 R、Y 2 9 6 S
 、Y 2 9 6 T、Y 2 9 6 L、Y 2 9 6 I、A 2 9 8 H、T 2 9 9 H、A 3 3 0 V、A 3 3
 0 I、A 3 3 0 F、A 3 3 0 R、A 3 3 0 H、N 3 2 5 D、N 3 2 5 E、N 3 2 5 A、N
 3 2 5 T、N 3 2 5 V、N 3 2 5 H、L 3 2 8 D/I 3 3 2 E、L 3 2 8 E/I 3 3 2 E
 、L 3 2 8 N/I 3 3 2 E、L 3 2 8 Q/I 3 3 2 E、L 3 2 8 V/I 3 3 2 E、L 3 2

10

20

30

40

50

8 T/I 3 3 2 E、L 3 2 8 H/I 3 3 2 E、L 3 2 8 I/I 3 3 2 E、L 3 2 8 A、I
 3 3 2 T、I 3 3 2 H、I 3 3 2 Y、I 3 3 2 A、S 2 3 9 E/V 2 6 4 I/I 3 3 2 E
 、S 2 3 9 Q/V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/V 2 6 4 I/A 3 3 0 Y/I 3 3
 2 E、S 2 3 9 E/V 2 6 4 I/S 2 9 8 A/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/N
 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/D 2 6 5 V
 /N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/D 2 6 5 I/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3
 9 D/D 2 6 5 L/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/D 2 6 5 F/N 2 9 7 D/I
 3 3 2 E、S 2 3 9 D/D 2 6 5 Y/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/D 2 6 5 H
 /N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/D 2 6 5 T/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、V 2 6
 4 E/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、Y 2 9 6 D/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、Y 2 9 6 E/N
 2 9 7 D/I 3 3 2 E、Y 2 9 6 N/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、Y 2 9 6 Q/N 2 9 7 D
 /I 3 3 2 E、Y 2 9 6 H/N 2 9 7 D/I 3 3 2 E、Y 2 9 6 T/N 2 9 7 D/I 3 3
 2 E、N 2 9 7 D/T 2 9 9 V/I 3 3 2 E、N 2 9 7 D/T 2 9 9 I/I 3 3 2 E、N
 2 9 7 D/T 2 9 9 L/I 3 3 2 E、N 2 9 7 D/T 2 9 9 F/I 3 3 2 E、N 2 9 7 D
 /T 2 9 9 H/I 3 3 2 E、N 2 9 7 D/T 2 9 9 E/I 3 3 2 E、N 2 9 7 D/A 3 3
 0 Y/I 3 3 2 E、N 2 9 7 D/S 2 9 8 A/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/A
 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 N/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/A 3 3 0 L
 /I 3 3 2 E、S 2 3 9 N/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/S 2 9 8 A/I 3 3
 2 E、S 2 3 9 D/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 N/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S
 2 3 9 D/V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/V 2 6 4 I/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E
 および S 2 3 9 D/V 2 6 4 I/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E。ここで、F c 領域における残
 基の番号付けは、Kabat にある通りの E U インデックスのものである。

10

20

【0025】

本発明のさらなる目的は、1 またはそれ以上の F c γ R 類により高い親和性で結合する
 F c 変異体を提供することである。ある実施態様では、当該 F c 変異体は、親 F c ポリペ
 プチドの 1 倍より高い F c γ R への親和性を有する。別の実施態様では、当該 F c 変異体
 は、親 F c ポリペプチドの 5 倍より高い F c γ R への親和性を有する。好ましい実施態様
 では、当該 F c 変異体は、親 F c ポリペプチドの 5 倍ないし 300 倍高い F c γ R への親
 和性を有する。ある実施態様では、当該 F c 変異体は、以下からなる群から選択される位
 置で、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む：2 3 4、2 3 5、2 3 9、2 4 0、2 4 3
 、2 6 4、2 6 6、3 2 8、3 3 0、3 3 2 および 3 2 5。ここで、F c 領域における残
 基の番号付けは、Kabat にある通りの E U インデックスのものである。好ましい実施態様
 では、当該 F c 変異体は、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換
 を含む：L 2 3 4 E、L 2 3 4 Y、L 2 3 4 I、L 2 3 5 D、L 2 3 5 S、L 2 3 5 Y、
 L 2 3 5 I、S 2 3 9 D、S 2 3 9 E、S 2 3 9 N、S 2 3 9 Q、S 2 3 9 T、V 2 4 0
 I、V 2 4 0 M、F 2 4 3 L、V 2 6 4 I、V 2 6 4 T、V 2 6 4 Y、V 2 6 6 I、L 3
 2 8 M、L 3 2 8 I、L 3 2 8 Q、L 3 2 8 D、L 3 2 8 V、L 3 2 8 T、A 3 3 0 Y、
 A 3 3 0 L、A 3 3 0 I、I 3 3 2 D、I 3 3 2 E、I 3 3 2 N、I 3 3 2 Q および N 3
 2 5 T、ここで、F c 領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りの E U インデッ
 クスのものである。最も好ましい実施態様では、当該 F c 変異体は、以下からなる群から
 選択される；V 2 6 4 I、F 2 4 3 L/V 2 6 4 I、L 3 2 8 M、I 3 3 2 E、L 3 2 8
 M/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/I 3
 3 2 E、S 2 3 9 Q/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E、A 3 3 0 Y、I 3 3 2 D、L 3 2 8 I/
 I 3 3 2 E、L 3 2 8 Q/I 3 3 2 E、V 2 6 4 T、V 2 4 0 I、V 2 6 6 I、S 2 3 9
 D、S 2 3 9 D/I 3 3 2 D、S 2 3 9 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/I 3 3 2 N、S 2
 3 9 D/I 3 3 2 Q、S 2 3 9 E/I 3 3 2 D、S 2 3 9 E/I 3 3 2 N、S 2 3 9 E/
 I 3 3 2 Q、S 2 3 9 N/I 3 3 2 D、S 2 3 9 N/I 3 3 2 E、S 2 3 9 Q/I 3 3 2
 D、A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、A 3 3 0 L/I 3
 3 2 E、V 2 6 4 I/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、L 2 3 4 E、L 2 3 4 Y、L 2 3 4 I、
 L 2 3 5 D、L 2 3 5 S、L 2 3 5 Y、L 2 3 5 I、S 2 3 9 T、V 2 4 0 M、V 2 6 4

30

40

50

Y、A330I、N325T、L328D/I332E、L328V/I332E、L328T/I332E、L328I/I332E、S239E/V264I/I332E、S239Q/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332EおよびS239D/V264I/A330L/I332E。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。

10

【0026】

本発明のさらなる目的は、1:1より大きいFcγRIIIa倍率:FcγRIIIb倍率の比を有するFc変異体を提供することである。ある実施態様では、当該Fc変異体は、11:1より大きいFcγRIIIa倍率:FcγRIIIb倍率の比を有する。好ましい実施態様では、11:1ないし86:1のFcγRIIIa倍率:FcγRIIIb倍率の比を有する。ある実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む:234、235、239、240、264、296、330およびI332。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む: L234Y、L234I、L235I、S239D、S239E、S239N、S239Q、V240A、V240M、V264I、V264Y、Y296Q、A330L、A330Y、A330I、I332DおよびI332E。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。最も好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される: I332E、V264I/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、Y296Q、A330L、A330Y、I332D、S239D、S239D/I332E、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234Y、L234I、L235I、V240A、V240M、V264Y、A330I、S239D/A330L/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332EおよびS239D/V264I/A330L/I332E。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。

20

30

【0027】

本発明のさらなる目的は、エフェクター細胞の存在下で、より効果的にエフェクター機能を媒介するFc変異体を提供することである。ある実施態様では、当該Fc変異体は、親Fcポリペプチドにより媒介されるものよりも大きいADCCを媒介する。好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、親Fcポリペプチドにより媒介されるものの5倍よりも大きいADCCを媒介する。最も好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、親Fcポリペプチドにより媒介されるものよりも5倍ないし50倍大きいADCCを媒介する。ある実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む:234、235、239、240、243、264、266、328、330、332および325、ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む: L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239T、V240I、V240M、F243L、V264I、V264T、V264Y、V266I、L328M、L328I、L328Q、L328D、L328V、L328T、A330Y、A330L、A33

40

50

0 I、I 3 3 2 D、I 3 3 2 E、I 3 3 2 N、I 3 3 2 QおよびN 3 2 5 T。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りのEUインデックスのものである。最も好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される：V 2 6 4 I、F 2 4 3 L/V 2 6 4 I、L 3 2 8 M、I 3 3 2 E、L 3 2 8 M/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/I 3 3 2 E、S 2 3 9 Q/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E、A 3 3 0 Y、I 3 3 2 D、L 3 2 8 I/I 3 3 2 E、L 3 2 8 Q/I 3 3 2 E、V 2 6 4 T、V 2 4 0 I、V 2 6 6 I、S 2 3 9 D、S 2 3 9 D/I 3 3 2 D、S 2 3 9 D/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/I 3 3 2 N、S 2 3 9 D/I 3 3 2 Q、S 2 3 9 E/I 3 3 2 D、S 2 3 9 E/I 3 3 2 N、S 2 3 9 E/I 3 3 2 Q、S 2 3 9 N/I 3 3 2 D、S 2 3 9 N/I 3 3 2 E、S 2 3 9 Q/I 3 3 2 D、A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、L 2 3 4 E、L 2 3 4 Y、L 2 3 4 I、L 2 3 5 D、L 2 3 5 S、L 2 3 5 Y、L 2 3 5 I、S 2 3 9 T、V 2 4 0 M、V 2 6 4 Y、A 3 3 0 I、N 3 2 5 T、L 3 2 8 D/I 3 3 2 E、L 3 2 8 V/I 3 3 2 E、L 3 2 8 T/I 3 3 2 E、L 3 2 8 I/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 3 9 Q/V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 3 9 E/V 2 6 4 I/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 N/A 3 3 0 Y/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、S 2 3 9 N/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E、V 2 6 4 I/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 N/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/V 2 6 4 I/I 3 3 2 E、S 2 3 9 D/V 2 6 4 I/S 2 9 8 A/I 3 3 2 E およびS 2 3 9 D/V 2 6 4 I/A 3 3 0 L/I 3 3 2 E。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りのEUインデックスのものである。

【0028】

本発明のさらなる目的は、1またはそれ以上のFcγR類と、より弱い親和性で結合するFc変異体を提供することである。ある実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：2 3 4、2 3 5、2 3 9、2 4 0、2 4 1、2 4 3、2 4 4、2 4 5、2 4 7、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6 5、2 6 6、2 6 7、2 6 9、2 9 6、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3 1 3、3 2 5、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0および3 3 2。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りのEUインデックスのものである。好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置でアミノ酸置換を含む：L 2 3 4 D、L 2 3 4 N、L 2 3 4 Q、L 2 3 4 T、L 2 3 4 H、L 2 3 4 V、L 2 3 4 F、L 2 3 5 N、L 2 3 5 Q、L 2 3 5 T、L 2 3 5 H、L 2 3 5 V、L 2 3 5 F、S 2 3 9 E、S 2 3 9 N、S 2 3 9 Q、S 2 3 9 F、S 2 3 9 H、S 2 3 9 Y、V 2 4 0 A、V 2 4 0 T、F 2 4 1 W、F 2 4 1 L、F 2 4 1 Y、F 2 4 1 E、F 2 4 1 R、F 2 4 3 W、F 2 4 3 L、F 2 4 3 Y、F 2 4 3 R、F 2 4 3 Q、P 2 4 4 H、P 2 4 5 A、P 2 4 7 V、P 2 4 7 G、V 2 6 2 I、V 2 6 2 A、V 2 6 2 T、V 2 6 2 E、V 2 6 3 I、V 2 6 3 A、V 2 6 3 T、V 2 6 3 M、V 2 6 4 L、V 2 6 4 I、V 2 6 4 W、V 2 6 4 T、V 2 6 4 R、V 2 6 4 F、V 2 6 4 M、V 2 6 4 E、D 2 6 5 G、D 2 6 5 N、D 2 6 5 Q、D 2 6 5 Y、D 2 6 5 F、D 2 6 5 V、D 2 6 5 I、D 2 6 5 L、D 2 6 5 H、D 2 6 5 T、V 2 6 6 A、V 2 6 6 T、V 2 6 6 M、S 2 6 7 Q、S 2 6 7 L、E 2 6 9 H、E 2 6 9 Y、E 2 6 9 F、E 2 6 9 R、Y 2 9 6 E、Y 2 9 6 Q、Y 2 9 6 D、Y 2 9 6 N、Y 2 9 6 S、Y 2 9 6 T、Y 2 9 6 L、Y 2 9 6 I、Y 2 9 6 H、N 2 9 7 S、N 2 9 7 D、N 2 9 7 E、A 2 9 8 H、T 2 9 9 I、T 2 9 9 L、T 2 9 9 A、T 2 9 9 S、T 2 9 9 V、T 2 9 9 H、T 2 9 9 F、T 2 9 9 E、W 3 1 3 F、N 3 2 5 Q、N 3 2 5 L、N 3 2 5 I、N 3 2 5 D、N 3 2 5 E、N 3 2 5 A、N 3 2 5 V、N 3 2 5 H、A 3 2 7 N、A 3 2 7 L、L 3 2 8 M、3 2 8 E、L 3 2 8 N、L 3 2 8 Q、L 3 2 8 F、L 3 2 8 H、L 3 2 8 A、P 3 2 9 F、A 3 3 0 L、A 3 3 0 V、A 3 3 0 F、A 3 3 0 R、A 3 3 0 H、I 3 3 2 N、I 3 3 2 Q、I 3 3 2 T、I 3 3 2 H、I 3 3 2 YおよびI 3 3 2 A。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りのEUインデックスのもの

である。最も好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される：V264L、F241W、F241L、F243W、F243L、F241L/F243L/V262I/V264I、F241W/F243W、F241W/F243W/V262A/V264A、F241L/V262I、F243L/V262I/V264W、F241Y/F243Y/V262T/V264T、F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264R、L328M、L328E、L328F、P244H、P245A、P247V、W313F、P244H/P245A/P247V、P247G、F241E/F243R/V262E/V264R/I332E、F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E、D265G、D265N、S239E/D265G、S239E/D265N、S239E/D265Q、Y296E、Y296Q、T299I、A327N、S267Q/A327S、S267L/A327S、A327L、P329F、A330L、N297S、N297D、N297S/I332E、I332N、I332Q、V264F、V263I、T299A、T299S、T299V、N325Q、N325L、N325I、S239N、S239F、S239N/I332N、S239N/I332Q、S239Q/I332N、S239Q/I332Q、Y296D、Y296N、L234D、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234V、L234F、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235V、L235F、S239H、S239Y、V240A、V263T、V263M、V264M、V266A、V266T、V266M、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、A298H、T299H、A330V、A330F、A330R、A330H、N325D、N325E、N325A、N325V、N325H、L328E/I332E、L328N/I332E、L328Q/I332E、L328H/I332E、L328A、I332T、I332H、I332YおよびI332A。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。

【0029】

本発明のさらなる目的は、エフェクター細胞の存在下で、より低い効力でADCCを媒介するFc変異体を提供することである。ある実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330および332。ここで、Fc領域における残基の番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスのものである。好ましい実施態様では、当該Fc変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：L234D、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234V、L234F、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235V、L235F、S239E、S239N、S239Q、S239F、S239H、S239Y、V240A、V240T、F241W、F241L、F241Y、F241E、F241R、F243W、F243L、F243Y、F243R、F243Q、P244H、P245A、P247V、P247G、V262I、V262A、V262T、V262E、V263I、V263A、V263T、V263M、V264L、V264I、V264W、V264T、V264R、V264F、V264M、V264E、D265G、D265N、D265Q、D265Y、D265F、D265V、D265I、D265L、D265H、D265T、V266A、V266T、V266M、S267Q、S267L、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296E、Y296Q、Y296D、Y296N、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、Y296H、N297S、N297D、N297E、A298H、T299I、T299L、T299A、T299S、T299V、T299H、T299F、T299E、W313F、N325

Q、N 3 2 5 L、N 3 2 5 I、N 3 2 5 D、N 3 2 5 E、N 3 2 5 A、N 3 2 5 V、N 3 2 5 H、A 3 2 7 N、A 3 2 7 L、L 3 2 8 M、3 2 8 E、L 3 2 8 N、L 3 2 8 Q、L 3 2 8 F、L 3 2 8 H、L 3 2 8 A、P 3 2 9 F、A 3 3 0 L、A 3 3 0 V、A 3 3 0 F、A 3 3 0 R、A 3 3 0 H、I 3 3 2 N、I 3 3 2 Q、I 3 3 2 T、I 3 3 2 H、I 3 3 2 Y および I 3 3 2 A。ここで、Fc 領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りの EU インデックスのものである。最も好ましい実施態様では、当該 Fc 変異体は、以下からなる群から選択される：V 2 6 4 L、F 2 4 1 W、F 2 4 1 L、F 2 4 3 W、F 2 4 3 L、F 2 4 1 L / F 2 4 3 L / V 2 6 2 I / V 2 6 4 I、F 2 4 1 W / F 2 4 3 W、F 2 4 1 W / F 2 4 3 W / V 2 6 2 A / V 2 6 4 A、F 2 4 1 L / V 2 6 2 I、F 2 4 3 L / V 2 6 2 I / V 2 6 4 W、F 2 4 1 Y / F 2 4 3 Y / V 2 6 2 T / V 2 6 4 T、F 2 4 1 E / F 2 4 3 R / V 2 6 2 E / V 2 6 4 R、F 2 4 1 E / F 2 4 3 Q / V 2 6 2 T / V 2 6 4 E、F 2 4 1 R / F 2 4 3 Q / V 2 6 2 T / V 2 6 4 R、F 2 4 1 E / F 2 4 3 Y / V 2 6 2 T / V 2 6 4 R、L 3 2 8 M、L 3 2 8 E、L 3 2 8 F、P 2 4 4 H、P 2 4 5 A、P 2 4 7 V、W 3 1 3 F、P 2 4 4 H / P 2 4 5 A / P 2 4 7 V、P 2 4 7 G、F 2 4 1 E / F 2 4 3 R / V 2 6 2 E / V 2 6 4 R / I 3 3 2 E、F 2 4 1 E / F 2 4 3 Y / V 2 6 2 T / V 2 6 4 R / I 3 3 2 E、D 2 6 5 G、D 2 6 5 N、S 2 3 9 E / D 2 6 5 G、S 2 3 9 E / D 2 6 5 N、S 2 3 9 E / D 2 6 5 Q、Y 2 9 6 E、Y 2 9 6 Q、T 2 9 9 I、A 3 2 7 N、S 2 6 7 Q / A 3 2 7 S、S 2 6 7 L / A 3 2 7 S、A 3 2 7 L、P 3 2 9 F、A 3 3 0 L、N 2 9 7 S、N 2 9 7 D、N 2 9 7 S / I 3 3 2 E、I 3 3 2 N、I 3 3 2 Q、V 2 6 4 F、V 2 6 3 I、T 2 9 9 A、T 2 9 9 S、T 2 9 9 V、N 3 2 5 Q、N 3 2 5 L、N 3 2 5 I、S 2 3 9 N、S 2 3 9 F、S 2 3 9 N / I 3 3 2 N、S 2 3 9 N / I 3 3 2 Q、S 2 3 9 Q / I 3 3 2 N、S 2 3 9 Q / I 3 3 2 Q、Y 2 9 6 D、Y 2 9 6 N、L 2 3 4 D、L 2 3 4 N、L 2 3 4 Q、L 2 3 4 T、L 2 3 4 H、L 2 3 4 V、L 2 3 4 F、L 2 3 5 N、L 2 3 5 Q、L 2 3 5 T、L 2 3 5 H、L 2 3 5 V、L 2 3 5 F、S 2 3 9 H、S 2 3 9 Y、V 2 4 0 A、V 2 6 3 T、V 2 6 3 M、V 2 6 4 M、V 2 6 6 A、V 2 6 6 T、V 2 6 6 M、E 2 6 9 H、E 2 6 9 Y、E 2 6 9 F、E 2 6 9 R、Y 2 9 6 S、Y 2 9 6 T、Y 2 9 6 L、Y 2 9 6 I、A 2 9 8 H、T 2 9 9 H、A 3 3 0 V、A 3 3 0 F、A 3 3 0 R、A 3 3 0 H、N 3 2 5 D、N 3 2 5 E、N 3 2 5 A、N 3 2 5 V、N 3 2 5 H、L 3 2 8 E / I 3 3 2 E、L 3 2 8 N / I 3 3 2 E、L 3 2 8 Q / I 3 3 2 E、L 3 2 8 H / I 3 3 2 E、L 3 2 8 A、I 3 3 2 T、I 3 3 2 H、I 3 3 2 Y および I 3 3 2 A、ここで、Fc 領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りの EU インデックスのものである。

【0030】

本発明のさらなる目的は、親 Fc ポリペプチドの非グリコシル化形態と比較して改善された機能および／または溶解特性を有する Fc 変異体を提供することである。ここで、改善された機能性には Fc リガンドへの結合親和性が含まれるが、これに限定されるものではない。ここで、改善された溶解特性には、安定性および溶解性が含まれるが、これらに限定されるものではない。ある実施態様では、当該非グリコシル化 Fc 変異体は、グリコシル化親 Fc ポリペプチドに匹敵するか、またはそれより良好な親和性で、Fc γ R に結合する。別の実施態様では、当該 Fc 変異体は、親 Fc ポリペプチドのグリコシル化形態の 0.4 倍以内の親和性で Fc γ R に結合する。ある実施態様では、当該 Fc 変異体は、以下からなる群から選択される位置で、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む：2 3 9、2 4 1、2 4 3、2 6 2、2 6 4、2 6 5、2 9 6、2 9 7、3 3 0 および 3 3 2。ここで、Fc 領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りの EU インデックスのものである。好ましい実施態様では、当該 Fc 変異体は、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む：S 2 3 9 D、S 2 3 9 E、F 2 4 1 Y、F 2 4 3 Y、V 2 6 2 T、V 2 6 4 T、V 2 6 4 E、D 2 6 5 Y、D 2 6 5 H、Y 2 9 6 N、N 2 9 7 D、A 3 3 0 Y および I 3 3 2 E。ここで、Fc 領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りの EU インデックスのものである。最も好ましい実施態様では、当該 Fc 変異体は、以下からなる群から選択される：N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、F 2 4 1 Y / F 2 4 3 Y / V 2 6 2 T / V

2 6 4 T / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、S 2 3 9 D / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、S 2 3 9 E / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、S 2 3 9 D / D 2 6 5 Y / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、S 2 3 9 D / D 2 6 5 H / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、V 2 6 4 E / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E、Y 2 9 6 N / N 2 9 7 D / I 3 3 2 E および N 2 9 7 D / A 3 3 0 Y / I 3 3 2 E。ここで、F c 領域における残基の番号付けは、Kabat にある通りの E U インデックスのものである。

【0031】

本発明はまた、最適化 F c 変異体の工学処理方法を提供する。本発明の1つの目的は、F c 最適化を先導するために使用し得る設計戦略を提供することである。本発明のさらなる目的は、F c 変異体の設計に使用し得るコンピューター処理スクリーニング方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、実験的試験用のライブラリーの生成方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、最適化 F c 変異体を得るための実験的製造およびスクリーニング方法を提供することである。

10

【0032】

本発明は、本明細書に記載の F c 変異体をコードする単離された核酸を提供する。本発明は、場合により制御配列に機能し得るように連結された当該核酸を含むベクターを提供する。本発明は、このベクターを含有する宿主細胞、および F c 変異体を製造し、場合により回収する方法を提供する。

【0033】

本発明は、本明細書に開示の F c 変異体を含む新規抗体および F c 融合体を提供する。当該新規抗体および F c 融合体は、治療用製品に用途を見出し得る。

20

【0034】

本発明は、本明細書に記載の F c 変異体を含む抗体および F c 融合体、並びに生理的または医薬的に許容し得る担体または希釈剤を含む組成物を提供する。

【0035】

本発明は、本明細書に開示の F c 変異体を含む抗体および F c 融合体の、治療および診断的使用を企図している。

【0036】

図面の簡単な説明

図1。抗体の構造および機能。示されているのは、p d b 受託コード 1 C E 1 (James et al., 1999, J Mol Biol 289:293-301) 由来のヒト化 F a b 構造、および p d b 受託コード 1 D N 2 (DeLano et al., 2000, Science 287:1279-1283) 由来のヒト I g G 1 F c 構造を使用してモデル化された、完全長ヒト I g G 1 抗体のモデルである。F a b と F c 領域を連結する可撓性ヒンジは示していない。I g G 1 は、ヘテロ二量体のホモ二量体であり、2本の軽鎖および2本の重鎖からなる。抗体を構成する I g ドメインを表示しており、それには軽鎖の V_L および C_L、重鎖の V_H、Cガンマ1 (C_γ1)、Cガンマ2 (C_γ2) および Cガンマ3 (C_γ3) が含まれる。F c 領域を表示している。関連タンパク質の結合部位を表示しており、それには可変領域の抗原結合部位、並びに F c 領域の F c_γR 類、F c R n、C 1 q およびプロテイン A および G の結合部位が含まれる。

30

【0037】

図2。F c / F c_γR I I I b 複合体構造 1 I I S。F c を灰色のリボン図として示し、F c_γR I I I b を黒色のリボンとして示す。N 2 9 7 炭水化物を黒色の棒として示す。

40

【0038】

図3。抗体アレムツズマブ (alemtuzumab) (Campath^(登録商標)、Ilex Pharmaceuticals LPの登録商標) 重鎖のアミノ酸配列。連続番号を付けた位置 (アミノ酸配列の2行上) および Kabat にある通りの E U インデックスに従って番号を付けた位置 (アミノ酸配列の2行下) を図解している。I g ドメインの V H 1、C_γ1、ヒンジ、C_γ2 および C_γ3 のおよその始点も、連続番号の上に表示してある。Kabat 270、272、312、315、356 および 358 を含むがこれらに限定されない数々の F c 位置で多型が観察され

50

てきたので、提示した配列と先行技術の配列との間にわずかな差異が存在し得る。

【0039】

図4。Fc/FcγRIIIb複合体構造LIIS上にマッピングした実験用ライブラリーの残基。Fcを灰色のリボン図として示し、FcγRIIIbを黒色のリボンとして示す。実験用ライブラリーの残基を黒色の球形および棒として示す。N297炭水化物を黒色の棒として示す。

【0040】

図5。Fc変異体実験用ライブラリーの設計に関連する位置を示すヒトIgG1のFc配列。配列には、ヒンジ領域、ドメインCγ2およびドメインCγ3が含まれる。残基の番号は、Kabatにある通りのEUインデックスに従う。実験用ライブラリーに関連する位置に下線を付す。数々のFc位置で多型変異が観察されてきたので、提示した配列と文献中の配列との間にわずかな差異が存在し得る。

10

【0041】

図6。293T細胞におけるアレムツズマブのFc変異体および野生型(WT)タンパク質の発現。アレムツズマブ重鎖遺伝子(WTまたは変異体)を含有するプラスミドを、アレムツズマブ軽鎖遺伝子を含有するプラスミドと共に形質移入した。形質移入5日後に培地を回収した。各形質移入サンプルについて、培地10ulをウエスタン分析用のSDS-PAGEゲルにのせた。ウエスタン用のプローブは、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG(Jackson Immuno-Research, catalog # 109-035-088)であった。WT:野生型アレムツズマブ; 1-10:アレムツズマブ変異体。HおよびLは、各々抗体の重鎖および軽鎖を示す。

20

【0042】

図7。プロテインAクロマトグラフィーを使用するアレムツズマブの精製。WTアレムツズマブタンパク質を、293T細胞で発現させ、形質移入5日後に培地を回収した。培地をPBSで1:1に希釈し、プロテインA(Pierce, Catalog # 20334)で精製した。O:精製前の最初のサンプル; FT:流出物(flow through); E:抽出物; C:濃縮された最終サンプル。左の写真は、単純青色染色(Simple Blue-stained)したSDS-PAGEゲルを示し、右は、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgGを使用して標識したウエスタンブロットを示す。

【0043】

30

図8。脱グリコシル化抗体の精製。アレムツズマブの野生型および変異体を293T細胞で発現させ、プロテインAクロマトグラフィーで精製した。抗体をペプチド-N-グリコシダーゼ(PNGase F)と共に37℃で24時間インキュベートした。各抗体について、偽処理サンプル(-PNGase F)を平衡して行った。WT:野生型アレムツズマブ; #15、#16、#17、#18、#22:各々、アレムツズマブ変異体F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264RおよびI332E。偽処理サンプルよりも早く泳動するPNGase F処理サンプルは、脱グリコシル化重鎖を表す。

【0044】

40

図9。293T細胞から発現されたアレムツズマブは、その抗原に結合する。GSTに融合させた抗原のCD52ペプチドを、IPTG誘導下で大腸菌BL21(DE3)に発現させた。非誘導および誘導サンプルの両方をSDS-PAGEゲルで流し、PVD膜に移した。ウエスタン分析のために、Sotec(α-CD52, Sotec)のアレムツズマブ(最終濃度2.5ng/ul)または形質移入293T細胞の培地(Campath, Xencor)(最終アレムツズマブ濃度約0.1-0.2ng/ul)のいずれかを一次抗体として使用し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgGを二次抗体として使用した。M:予め染色されたマーカー; U:GST-CD52の非誘導サンプル; I:GST-CD52の誘導サンプル。

【0045】

図10。ヒトV158 FcγRIIIaの細胞外領域の発現と精製。タグを付けたF

50

c γ R I I I aを、293T細胞に形質移入し、分泌されたFc γ R I I I aを含有する培地を3日後に回収し、親和性クロマトグラフィーを使用して精製した。1：培地；2：流出物；3：洗浄液；4－8：連続抽出物。単純青色染色したSDS-PAGEゲルおよびウェスタンの結果を示す。ウェスタンブロットには、膜を抗GST抗体でプローブした。

【0046】

図11。実施例2に記載のAlphaScreen^(商標)アッセイにより測定した、実験用ライブラリーから選択されたアレムツズマブFc変異体によるヒトV158 Fc γ R I I I aへの結合。競合抗体（Fc変異体またはWTアレムツズマブ）の存在下で、発光シグナルの減少として、特徴的な阻害曲線が観察された。リン酸緩衝塩水（PBS）単独を負の対照として使用した。これらのデータは、競合抗体の低濃度および高濃度で各々もたらされる最大および最小発光シグナルに対して標準化した。曲線は、非線形回帰を使用して、一部位競合モデルへのデータのフィット（fit）を表す。これらのフィットは、各抗体のIC50を提供する。これをWTおよびS239Dについて破線で例示説明する。

10

【0047】

図12。選択されたアレムツズマブFc変異体のヒトFc γ R I I bへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

【0048】

図13。選択されたアレムツズマブFc変異体のヒトVal158 Fc γ R I I I aへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

20

【0049】

図14。リツキシマブに関して、選択されたFc変異体によるヒトV158 Fc γ R I I I aへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

【0050】

図15。トラスツズマブに関して、選択されたFc変異体によるヒトV158 Fc γ R I I I aへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

30

【0051】

図16a－16b。選択されたアレムツズマブFc変異体のヒトV158 Fc γ R I I I a（図16a）およびヒトFc γ R I I b（図16b）への結合を比較するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

【0052】

図17。トラスツズマブに関して、選択されたFc変異体によるヒトV158 Fc γ R I I I aへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。

【0053】

図18。選択されたアレムツズマブFc変異体のヒトR131 Fc γ R I I aへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。

40

【0054】

図19aおよび19b。選択されたアレムツズマブFc変異体のヒトV158 Fc γ R I I I aへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

【0055】

図20。非グリコシル化アレムツズマブFc変異体のヒトV158 Fc γ R I I I aへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合

50

モデルへのデータのフィットを表す。P B Sを負の対照として使用した。

【0056】

図21。グリコシル化（黒色の記号、実線）および脱グリコシル化（白色の記号、破線）状態の選択されたアレムツズマブFc変異体によるヒトV158 FcγRIIIaの結合を比較する AlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。

【0057】

図22a-22b。選択されたアレムツズマブFc変異体の、ヒトFcγRIIIaのV158（図22a）およびF158（図22b）アロタイプへの結合を示す AlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。P B Sを負の対照として使用した。

10

【0058】

図23a-23d。図23aおよび23bは、選択されたアレムツズマブFc変異体のV158 FcγRIIIa（図23a）およびF158 FcγRIIIa（図23b）への結合から、S P RのKdとAlphaScreen^(商標)のIC50との間の相関を示す。図23cおよび23dは、選択されたアレムツズマブFc変異体のV158 FcγRIIIa（図23c）およびF158 FcγRIIIa（図23d）への結合について、WTに対するS P RおよびAlphaScreen^(商標)の改善倍率間の相関を示す。結合のデータを表62に提示する。データの間の線は、データの線形フィットを表し、 r^2 値は、これらのフィットの有意さを示す。

20

【0059】

図24a-24b。アレムツズマブに関する、選択されたFc変異体の細胞ベースのADCCアッセイ。DELFI^(登録商標)A EuTDA ベースの細胞傷害作用アッセイ（Perkin Elmer, MA）を使用して、実施例7に記載の通り、D o H H-2リンパ腫標的細胞および50倍過剰のヒトP B M Cを使用して、ADCCを測定した。図24aは、10ng/mlの明記したアレムツズマブ抗体について未加工の蛍光データを示す棒グラフである。P B M Cの棒は、抗体の非存在下における細胞傷害作用の基底レベルを示す。図24bは、明記したアレムツズマブ抗体について、抗体濃度に対するADCCの用量依存を示し、各々抗体の低濃度および高濃度でのベースラインによりもたらされる最小および最大蛍光シグナルに対して標準化したものである。曲線は、非線形回帰を使用して、S字用量反応モデルへのデータのフィットを表す。

30

【0060】

図25a-25b。リツキシマブに関する、選択されたFc変異体の細胞ベースのADCCアッセイ。DELFI^(登録商標)A EuTDA ベースの細胞傷害作用アッセイを使用して、実施例7に記載の通り、W I L 2-Sリンパ腫標的細胞および50倍過剰のヒトP B M Cを使用して、ADCCを測定した。図25aは、1ng/mlの明記したリツキシマブ抗体について未加工の蛍光データを示す棒グラフである。P B M Cの棒は、抗体の非存在下における細胞傷害作用の基底レベルを示す。図25bは、明記したリツキシマブ抗体について、抗体濃度に対するADCCの用量依存を示し、各々抗体の低濃度および高濃度でのベースラインによりもたらされる最小および最大蛍光シグナルに対して標準化したものである。曲線は、非線形回帰を使用して、S字用量応答モデルへのデータのフィットを表す。

40

【0061】

図26a-26c。トラスツズマブに関する、選択されたFc変異体の細胞ベースのADCCアッセイ。DELFI^(登録商標)A EuTDA ベースの細胞傷害作用アッセイを使用して、実施例7に記載の通り、B T 4 7 4およびS k-B r-3乳癌腫標的細胞および50倍過剰のヒトP B M Cを使用して、ADCCを測定した。図26aは、1ng/mlの明記したトラスツズマブ抗体について未加工の蛍光データを示す棒グラフである。P B M Cの棒は、抗体の非存在下における細胞傷害作用の基底レベルを示す。図26bおよび26cは、明記したトラスツズマブ抗体について、抗体濃度に対するADCCの用量依存を示し、各々抗体の低濃度および高濃度でのベースラインによりもたらされる最小および最大蛍光

50

シグナルに対して標準化したものである。曲線は、非線形回帰を使用して、S字用量応答モデルへのデータのフィットを表す。

【0062】

図27a-27b。選択されたFc変異体が補体の結合および活性化を媒介する能力。図27aは、選択されたアレムツズマブFc変異体のC1qへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。データは、競合抗体の低濃度および高濃度でのベースラインにより各々もたらされる最大および最小発光シグナルに対して標準化した。曲線は、非線形回帰を使用して、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。図27bは、選択されたリツキシマブFc変異体がCDCを媒介する能力を測定する細胞をベースとするアッセイを示す。CDCアッセイは、Fc変異体およびWTリツキシマブによりオプソニン化されたWIL2-Sリンパ腫細胞のヒト血清補体による溶解をモニターするのに、Amar Blueを使用して実施した(Quidel, San Diego, CA)。明記したリツキシマブ抗体について、抗体濃度に対する補体媒介溶解の用量依存が示され、これは抗体の低濃度および高濃度でのベースラインにより各々もたらされる最小および最大蛍光シグナルに対して標準化したものである。曲線は、非線形回帰を使用して、S字用量反応モデルへのデータのフィットを表す。

10

【0063】

図28。実施例9に記載の通りの、選択されたアレムツズマブFc変異体の細菌のプロテインAへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

20

【0064】

図29。実施例10に記載の通りの、選択されたアレムツズマブFc変異体のマウスFcγRIIIへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化した。曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

【0065】

図30。実施例11に記載の通りの、293TおよびCHO細胞で発現させた選択されたトラスツズマブFc変異体による、ヒトV158FcγRIIIaへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイ。データを標準化し、曲線は、一部位競合モデルへのデータのフィットを表す。PBSを負の対照として使用した。

30

【0066】

図31a-31c。改善された抗CD20抗体を示す配列。リツキシマブの軽鎖および重鎖の配列を、図31aおよび図31bに各々提示する。これらは、US5,736,137の翻訳された配列3から採用した。図31b中のS239、V240、V264I、N297、S298、A330およびI332を含む関連位置を太字にしてある。図31cは、改善された抗CD20抗体重鎖の配列を示し、可変位置を、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆およびZ₁として太字で示してある。配列の下表は、これらの位置について可能な置換を提供する。改善された抗CD20抗体の配列は、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅およびX₆について可能な置換の群から選択される少なくとも1つの非WTアミノ酸を含む。これらの改善された抗CD20抗体の配列はまた、置換Z₁を含んでもよい。これらの位置は、Kabatにある通りのEUインデックスに従って番号付けしてあり、従て配列の連続的順序に対応しない。

40

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】図1は、抗体の構造および機能を示す。

【図2】図2は、Fc/FcγRIIIb複合体構造111Sを示す。

【図3】図3は、抗体アレムツズマブ重鎖のアミノ酸配列を示す。

【図4】図4は、Fc/FcγRIIIb複合体構造111S上にマッピングした実験用ライブラリーの残基を示す。

【図5】図5は、Fc変異体実験用ライブラリーの設計に関連する位置を示すヒトIgG

50

1 F c 配列を示す。

【図6】図6は、293T細胞におけるアレムツズマブのF c 変異体および野生型 (WT) タンパク質の発現を示す。

【図7】図7は、プロテインAクロマトグラフィーを使用するアレムツズマブの精製を示す。

【図8】図8は、脱グリコシル化抗体の精製を示す。

【図9】図9は、293T細胞から発現されたアレムツズマブがその抗原に結合することを示す。

【図10】図10は、ヒトV158 F c γ R I I I a の細胞外領域の発現と精製を示す。

10

【図11】図11は、実施例2に記載のAlphaScreen^(商標)アッセイにより測定した、実験用ライブラリーから選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトV158 F c γ R I I I a への結合を示す。

【図12】図12は、選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトF c γ R I I I b への結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図13】図13は、選択されたアレムツズマブF c 変異体のV a l 158 F c γ R I I I a への結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図14】図14は、リツキシマブに関して、選択されたF c 変異体によるヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図15】図15は、トラスツズマブに関して、選択されたF c 変異体によるヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

20

【図16a】図16aは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を比較するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図16b】図16bは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトF c γ R I I I b への結合を比較するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図17】図17は、トラスツズマブに関して、選択されたF c 変異体によるヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図18】図18は、選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトR131 F c γ R I I I a への結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図19a】図19aは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

30

【図19b】図19bは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図20】図20は、非グリコシル化アレムツズマブF c 変異体のヒトV158 F c γ R I I I I a への結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図21】図21は、グリコシル化 (黒色の記号、実線) および脱グリコシル化 (白色の記号、破線) 状態の選択されたアレムツズマブF c 変異体によるヒトV158 F c γ R I I I I a の結合を比較するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図22a】図22aは、選択されたアレムツズマブF c 変異体の、ヒトF c γ R I I I a のV158アロタイプへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

40

【図22b】図22bは、選択されたアレムツズマブF c 変異体の、ヒトF c γ R I I I a のF158アロタイプへの結合を示すAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図23a】図23aは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のV158 F c γ R I I I a への結合から、S P R のK d とAlphaScreen^(商標)のI C 50 との相関を示す。

【図23b】図23bは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のF158 F c γ R I I I a への結合から、S P R のK d とAlphaScreen^(商標)のI C 50 との相関を示す。

【図23c】図23cは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のV158 F c γ R I I I a への結合について、S P R およびAlphaScreen^(商標)のWTに対する改善倍率間の相関を示す。

【図23d】図23dは、選択されたアレムツズマブF c 変異体のF158 F c γ R I

50

I I aへの結合について、S P RおよびAlphaScreen^(商標)のW Tに対する改善倍率間の相関を示す。

【図24a】図24aは、アレムツズマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。10 ng/mlの明記したアレムツズマブ抗体についての未加工の蛍光データを示す棒グラフである。

【図24b】図24bは、アレムツズマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。明記したアレムツズマブ抗体について、抗体濃度に対するA D C Cの用量依存を示す。

【図25a】図25aは、リツキシマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。1 ng/mlの明記したリツキシマブ抗体についての未加工の蛍光データを示す棒グラフである。

10

【図25b】図25bは、リツキシマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。明記したリツキシマブ抗体について、抗体濃度に対するA D C Cの用量依存を示す。

【図26a】図26aは、トラスツズマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。1 ng/mlの明記したトラスツズマブ抗体についての未加工の蛍光データを示す棒グラフである。

【図26b】図26bは、トラスツズマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。明記したトラスツズマブ抗体について、抗体濃度に対するA D C Cの用量依存を示す。

20

【図26c】図26cは、トラスツズマブに関する、選択されたF c変異体の細胞ベースのA D C Cアッセイを示す。明記したトラスツズマブ抗体について、抗体濃度に対するA D C Cの用量依存を示す。

【図27a】図27aは、選択されたアレムツズマブF c変異体のC 1 qへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図27b】図27bは、選択されたリツキシマブF c変異体がC D Cを媒介する能力を測定する細胞をベースとするアッセイを示す。

【図28】図28は、実施例9に記載の通りの、選択されたアレムツズマブF c変異体の細菌のプロテインAへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図29】図29は、実施例10に記載の通りの、選択されたアレムツズマブF c変異体のマウスF c γ R I I Iへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

30

【図30】図30は、実施例11に記載の通りの、293 TおよびCHO細胞で発現させた選択されたトラスツズマブF c変異体による、ヒトV 1 5 8 F c γ R I I I aへの結合を測定するAlphaScreen^(商標)アッセイを示す。

【図31a】図31aは、改善された抗C D 2 0抗体を示す配列を示す。

【図31b】図31bは、改善された抗C D 2 0抗体を示す配列を示す。

【図31c】図31cは、改善された抗C D 2 0抗体を示す配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0068】

発明の詳細な説明

40

本発明がより詳細に理解されるように、数個の定義を以下に記載する。かかる定義は、文法的に均等なものを包含することを意図している。

【0069】

「A D C C」または「抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用」は、本明細書で使用されるとき、F c γ R類を発現する非特異的細胞傷害性細胞が標的細胞上に結合した抗体を認識し、続いてその標的細胞の溶解を引き起こす、細胞介在性反応を意味する。

【0070】

「A D C P」または抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシスは、本明細書で使用されるとき、F c γ R類を発現する非特異的細胞傷害性細胞が標的細胞上に結合した抗体を認識し、続いてその標的細胞のファゴサイトーシスを引き起こす、細胞介在性反応を意味す

50

る。

【0071】

「アミノ酸修飾」は、本明細書で、ポリペプチド配列中のアミノ酸の置換、挿入および／または欠失を意味する。本発明で好ましいアミノ酸修飾は、置換である。 ** T T

【0072】

「抗体」は、本明細書で、認められている免疫グロブリン遺伝子の全部または一部により実質的にコードされる1個またはそれ以上のポリペプチドからなるタンパク質を意味する。認められている免疫グロブリン遺伝子には、例えば、ヒトでは、カッパ（ κ ）、ラムダ（ λ ）および重鎖の遺伝子座が含まれ、それは、無数の可変領域の遺伝子、並びに各々 I g M、I g D、I g G、I g E および I g A のアイソタイプをコードする定常領域の遺伝子ミュー（ μ ）、デルタ（ δ ）、ガンマ（ γ ）、シグマ（ σ ）およびアルファ（ α ）を一緒に含む。本明細書における抗体は、完全長抗体および抗体フラグメントを含むことを意図しており、任意の生物に由来する天然抗体、工学処理された抗体、または、実験、治療もしくは下記でさらに定義されるような他の目的のために組換え的に生成された抗体に言及し得る。従って、「抗体」には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体（m A b）の両方が含まれる。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の調製および精製方法は、当分野で知られており、例えば Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) に記載されている。本明細書で概説する通り、「抗体」は、明確に、本明細書に記載の F c 変異体、本明細書に記載の F c 変異体フラグメントを含む「完全長」抗体、および本明細書に記載の通り他のタンパク質への F c 変異体融合体を含む。

【0073】

いくつかの実施態様では、抗体は、中和性もしくは阻害性、または刺激性であり得、好ましい実施態様では、本明細書に記載の通り、刺激活性は、親抗体（例えば、非天然産生変異体を本発明のコンピューター処理分析の出発点として使用する場合）または元の野生型抗体のいずれかと比較した、変異体抗体の受容体への親和性の増加により測定される。従って、「中和」「中和する」「中和性」および文法的に均等なものは、本明細書において、ある場合には抗原への結合（例えば、競合的に）および結合の生物学的効果の回避または減少により、または結合の生物学的効果の減少に至る結合により、抗体の生物学的効果を阻害または縮小することを意味する。

【0074】

用語「抗体」には、当分野で知られているような、F a b、F a b'、F（a b'）₂、F c s などの抗体フラグメント、または一本鎖抗体（例えば F v）、キメラ抗体などの抗体の他の抗原結合下位配列が含まれ、これらは、完全な抗体の修飾により産生されるか、または組換え D N A 技法を使用して新しく合成されるものである。特に好ましいのは、本明細書に記載の F c 変異体である。用語「抗体」はさらに、アゴニストまたはアンタゴニスト抗体であり得るポリクローナル抗体および m A b を含む。

【0075】

本発明の抗体は、本明細書で概説する通り、F c 受容体に特異的に結合する。「特異的に結合する」は、本明細書では、L C 抗体が少なくとも $10^{-4} - 10^{-6} \text{M}^{-1}$ の範囲、好ましくは $10^{-7} - 10^{-9} \text{M}^{-1}$ の範囲の結合定数を有することを意味する。

好ましい実施態様では、本発明の抗体は、ヒト化されている。現在のモノクローナル抗体技法を使用して、事実上同定可能ないかなる標的抗原に対しても、ヒト化抗体を産生することができる [Stein, Trends Biotechnol. 15:88-90 (1997)]。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（F v、F c、F a b、F a b'、F（a b'）₂ または他の抗体の抗原結合下位配列など）のキメラ分子である。ヒト化抗体には、レシピエント（recipient）の相補性決定領域（C D R）を形成する残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）の C D R 由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン（

レシピエント抗体)が含まれる。ある例では、ヒト免疫グロブリンのF_vフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基により置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも移入されたC D Rまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、C D R領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全部または実質的に全部のF R領域がヒト免疫グロブリン共通配列のものである、少なくとも1個、そして典型的に2個の可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体はまた、最適には、典型的にヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部も含む [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986) ; Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) ; and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]。非ヒト抗体をヒト化する方法は当分野で周知である。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入された1個またはそれ以上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(import residue)と呼ばれ、それは典型的に移入可変ドメインから取られたものである。ヒト化は、本質的に、Winter および共同研究者の方法 [Jones et al., supra; Riechmann et al., supra; and Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)] に従って、齧歯類C D RまたはC D R配列を対応するヒト抗体の配列の代わりに置換することにより実施できる。例えば、ヒトタンパク質C [O'Connor et al., Protein Eng. 11:321-8 (1998)]、インターロイキン2受容体 [Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 86:10029-33 (1989)]、およびヒト上皮成長因子受容体2 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285-9 (1992)] に結合する抗体など、さらなるヒト化マウスモノクローナル抗体の例も当分野で知られている。従って、かかるヒト化抗体はキメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号)、そこでは無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ないものが、対応する非ヒト種由来配列により置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかのC D R残基およびおそらくいくつかのF R残基が齧歯類抗体の類似部位由来残基により置換されているヒト抗体である。

【0076】

好ましい実施態様では、本発明の抗体は、ヒト配列に基づき、故にヒト配列は、ラット、マウスおよびサルなどの他の配列に対する「基礎」配列として使用される。一次配列または構造に対する相同性を確立するために、前駆体または親Fcのアミノ酸配列を、本明細書で概説するヒトFc配列と直接比較する。本明細書に記載の1またはそれ以上の相同性アラインメントプログラムを使用して(例えば、種間の保存残基を使用して)配列を整列させた後、アラインメントを維持するために必要な挿入または欠失を可能にし(即ち、任意の欠失および挿入による保存残基の除去を回避する)、ヒトFcの一次配列中の特定のアミノ酸と等価な残基を定義する。保存残基のアラインメントは、好ましくは、そのような残基の100%を保存する。しかしながら、75%より高いか、またはわずか50%の保存残基のアラインメントも、等価残基を定義するのに適している(本明細書で「対応する残基」と呼ばれることもある)。

【0077】

等価な残基は、三次構造がX線結晶構造解析により決定されているFcフラグメントについて、三次構造のレベルでの相同性を決定することによっても定義し得る。等価な残基は、親または前駆体の特定のアミノ酸残基の2個またはそれ以上の主鎖原子の原子座標(N対N、CA対CA、C対CおよびO対O)が、アラインメント後に0.13nm以内、好ましくは0.1nm以内であるものとして定義される。アラインメントは、最良のモデルが方向付けられ、位置付けられて、Fc変異体フラグメントの水素ではないタンパク質の原子の原子座標の最大の重複が得られた後に達成される。

【0078】

「抗体」の定義内に特に含まれるものは、非グリコシル化(aglycosylated)抗体である。「非グリコシル化抗体」は、本明細書で使用されるとき、Fc領域の位置297で結合する炭水化物を欠く抗体を意味する(番号付けは、Kabatにある通りのEUシステムによる)。非グリコシル化抗体は、Fcの炭水化物が例えばキメラ的または酵素的に除去さ

れた抗体である脱グリコシル化 (deglycosylated) 抗体であり得る。あるいは、非グリコシル化抗体は、例えば、グリコシレーションパターンをコードする1個または複数の残基の変異により、または、例えば細菌などのタンパク質に炭水化物を結合させない生物での発現により、Fcの炭水化物なしで発現された抗体である、無グリコシル化 (nonglycosylated) または未グリコシル化 (unglycosylated) 抗体であり得る。

【0079】

「抗体」の定義内に特に含まれるものは、Fc変異体部分を含有する完全長抗体である。「完全長抗体」は、本明細書では、可変および定常領域を含む抗体の天然の生物学的な形態を構築する構造を意味する。例えば、ヒトやマウスを含む殆どの哺乳動物では、IgGクラスの完全長抗体は四量体であり、2本の免疫グロブリン鎖の2個の同一の対からなり、各対は、1本の軽鎖および1本の重鎖を有し、各軽鎖は、免疫グロブリンドメインV_LおよびC_Lを含み、各重鎖は、免疫グロブリンドメインV_H、C_γ1、C_γ2およびC_γ3を含む。いくつかの哺乳動物では、例えばラクダやラマなどでは、IgG抗体は、2本の重鎖のみからなることもあり、各重鎖は、Fc領域に結合した可変ドメインを含む。「IgG」は、本明細書で使用されるとき、認められている免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。ヒトでは、このクラスには、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4が含まれる。マウスでは、このクラスにはIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3が含まれる。

【0080】

「アミノ酸」および「アミノ酸本体」は、本明細書で使用されるとき、20個の天然産生アミノ酸または特定の定義された位置に存在し得る任意の非天然類似体の1つを意味する。「タンパク質」は、本明細書では、少なくとも2個の共有結合したアミノ酸を意味し、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびペプチドが含まれる。タンパク質は、天然産生アミノ酸およびペプチド結合、または合成偽ペプチド (peptidomimetic) 構造、即ちペプトイドなどの「類似体」 (Simon et al., PNAS USA 89(20):9367 (1992) 参照) からなり得る (特にLCペプチドを患者に投与しようとする場合)。従って、「アミノ酸」または「ペプチド残基」は、本明細書で使用されるとき、天然産生および合成アミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリンおよびノルロイシンは、本発明のためにアミノ酸とみなされる。「アミノ酸」にはまた、プロリンやヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基も含まれる。側鎖は、(R) または (S) 配置のどちらでもよい。好ましい実施態様では、アミノ酸は、(S) またはL-配置である。非天然産生側鎖を使用する場合、例えば、インビボでの分解を防止するかまたは遅延させるために、アミノ酸ではない置換基を使用してもよい。

【0081】

「コンピューター処理スクリーニング方法」は、本明細書では、タンパク質に1またはそれ以上の変異を設計するための、コンピューターを利用して、起こり得るアミノ酸側鎖置換同士の、および/またはタンパク質の残りの部分との相互作用のエネルギーを評価する、いかなる方法をも意味する。当業者には分かるように、エネルギーの評価 (エネルギー計算と呼ばれる) は、1またはそれ以上のアミノ酸修飾をスコアリングするいくつかの方法を参照する。当該方法は、物理または化学エネルギーの項を含んでもよく、あるいは、知識、統計、配列をベースとするエネルギーの項などを含んでもよい。コンピューター処理スクリーニング方法を構成する計算は、本明細書で「コンピューター処理スクリーニング計算」と呼ばれる。

【0082】

「エフェクター機能」は、本明細書で使用されるとき、抗体のFc領域とFc受容体またはリガンドとの相互作用に起因する生化学的事象を意味する。エフェクター機能には、ADCC、ADCPおよびCDCが含まれるがこれらに限定されるわけではない。「エフェクター細胞」は、本明細書で使用されるとき、1またはそれ以上のFc受容体を発現し、1またはそれ以上のエフェクター機能を媒介する免疫系の細胞を意味する。エフェクター細胞には、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、

B細胞、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびγγT細胞が含まれるがこれらに限定されるわけではなく、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルが含まれるがこれらに限定されるわけではない、いかなる生物に由来してもよい。「ライブラリー」は、本明細書では、核酸またはアミノ酸配列のリスト、可変位置での核酸またはアミノ酸置換のリスト、ライブラリー配列をコードする核酸を含む物理的ライブラリー、または精製もしくは非精製形態のFc変異体タンパク質を含む物理的ライブラリーを含むが、これらに限定されるわけではない、任意の形態のFc変異体のセットを意味する。

【0083】

「Fc」、「Fc領域」、「FCポリペプチド」などは、本明細書で使用されるとき、最初の定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を含むポリペプチドを含む、本明細書で定義される通りの抗体を意味する。従って、Fcは、IgA、IgDおよびIgGの最後の2個の定常領域免疫グロブリンドメイン、並びにIgEおよびIgMの最後の3個の定常領域免疫グロブリンドメイン、並びにこれらのドメインのN末端の可撓性ヒンジを表す。IgAおよびIgMについて、Fcは、J鎖を含み得る。IgGについて、図1に例示説明する通り、Fcは、免疫グロブリンドメインCガンマ2およびCガンマ3（Cγ2およびCγ3）、並びにCガンマ1（Cγ1）とCガンマ2（Cγ2）との間のヒンジを含む。Fc領域の境界は変化し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、残基C226またはP230からカルボキシル末端までを含むと定義される（番号付けは、Kabatにある通りのEUインデックスに従う）。Fcは、単離されたこの領域、または、抗体、抗体フラグメントもしくはFc融合体の文脈におけるこの領域を表し得る。Fcは、抗体、Fc融合体またはFcを含むタンパク質もしくはタンパク質ドメインであり得る。特に好ましいのは、Fcの非天然産生変異体であるFc変異体である。

【0084】

「Fc融合体」は、本明細書で使用されるとき、1またはそれ以上のポリペプチドがFcに機能し得るように連結されているタンパク質を意味する。Fc融合体は、本明細書では、先行技術において使用される通り（Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200）、用語「イムノアドヘシン（immunoadhesin）」、「Ig融合体」、「Igキメラ」および「受容体グロブリン」（ダッシュを伴う場合もある）と同義を意味する。Fc融合体は、免疫グロブリンのFc領域を、融合体パートナーと組み合わせる。融合体パートナーは、一般に、受容体の標的結合領域、接着分子、リガンド、酵素、またはいくつかの他のタンパク質またはタンパク質ドメインを含むがこれらに限定されるわけではなく、いかなるタンパク質でもあり得る。Fc融合体の非Fc部分の役割は、標的結合を調整することであり、従って、それは抗体の可変領域に機能的に類似している。

【0085】

「Fcガンマ受容体」または「FcγR」は、本明細書で使用されるとき、IgG抗体のFc領域に結合し、実質的にFcγR遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）（Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65）、並びにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むが、これらに限定されるものではない、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2

(C D 1 6 - 2)、並びにいかなる未発見のマウス F c γ R 類または F c γ R アイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0086】

「F c リガンド」は、本明細書で使用されるとき、抗体の F c 領域に結合して F c - リガンド複合体を形成する、任意の生物に由来する分子、好ましくはポリペプチドを意味する。F c リガンドには、F c γ R 類、F c γ R 類、F c γ R 類、F c R n、C 1 q、C 3、マンナン結合レクチン、マンノース受容体、スタフィロコッカスのプロテイン A、スタフィロコッカスのタンパク質 G およびウイルスの F c γ R が含まれるが、これらに限定されるわけではない。F c リガンドには、F c に結合する未発見の分子も含まれ得る。

【0087】

「I g G」は、本明細書で使用されるとき、認められている免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。ヒトでは、このクラスは、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 を含む。マウスでは、このクラスは、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3 を含む。「免疫グロブリン (I g)」は、本明細書では、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる 1 またはそれ以上のポリペプチドからなるタンパク質を意味する。免疫グロブリンには、抗体が含まれるがこれに限定されるわけではない。免疫グロブリンは、完全長抗体、抗体フラグメントおよび個々の免疫グロブリンドメインを含むがこれらに限定されるものではない、数々の構造的形態を有し得る。「免疫グロブリン (I g) ドメイン」は、本明細書では、タンパク質構造の当業者に確認されるように、別個の構造体として存在する免疫グロブリンの領域を意味する。I g ドメインは、典型的に、特徴的な β - サンドイッチ折り畳みトポロジーを有する。抗体の I g G クラスにおける既知の I g ドメインは、V_H、C γ 1、C γ 2、C γ 3、V_L および C_L である。

【0088】

「親ポリペプチド」または「前駆体ポリペプチド」(F c の親または前駆体を含む)は、本明細書で使用されるとき、後に修飾されて変異体を生成するポリペプチドを意味する。当該親ポリペプチドは、天然産生ポリペプチド、または天然産生ポリペプチドの変異体もしくは工学処理変形であり得る。親ポリペプチドは、ポリペプチド自体、親ポリペプチドを含む組成物、またはそれをコードするアミノ酸配列を表し得る。従って、「親 F c ポリペプチド」は、本明細書で使用されるとき、修飾されて変異体を生成する非修飾 F c ポリペプチドを意味し、「親抗体」は、本明細書で使用されるとき、修飾されて変異体抗体を生成する非修飾抗体を意味する。

【0089】

上記概説の通り、F c 分子のある種の位置を変更できる。「位置」は、本明細書で使用されるとき、タンパク質配列中の場所を意味する。位置は、連続的に、または、例えば Kabat にある通りの EU インデックスなどの確立された様式に従って、番号付けし得る。例えば、位置 297 は、ヒト抗体 I g G 1 中のある位置である。対応する位置は、上記概説の通りに、一般に他の親配列とのアラインメントを通して決定される。

【0090】

「残基」は、本明細書で使用されるとき、タンパク質中の位置およびその関連するアミノ酸本体を意味する。例えば、ダラギン (Daragine) 297 (N 297 と呼ばれる、N 297 と呼ばれる) は、ヒト抗体 I g G 1 中の残基である。

【0091】

「標的抗原」は、本明細書で使用されるとき、所定の抗体の可変領域により特異的に結合される分子を意味する。標的抗原は、タンパク質、炭水化物、脂質または他の化学的化合物であり得る。

【0092】

「標的細胞」は、本明細書で使用されるとき、標的抗原を発現する細胞を意味する。

【0093】

「可変領域」は、本明細書で使用されるとき、各々カッパ、ラムダおよび重鎖免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリン遺伝子座をなす V_{κ} 、 V_{λ} および／または V_H 遺伝子により実質的にコードされる1またはそれ以上のIgドメインを含む免疫グロブリンの領域を意味する。

【0094】

「変異体ポリペプチド」は、本明細書で使用されるとき、少なくとも1つのアミノ酸修飾のために親ポリペプチド配列と異なるポリペプチド配列を意味する。変異体ポリペプチドは、ポリペプチド自体、ポリペプチドを含む組成物、またはそれをコードするアミノ酸配列を表し得る。好ましくは、変異体ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を、例えば、親ポリペプチドと比較して約1ないし約10個のアミノ酸修飾を、好ましくは約1個ないし約5個のアミノ酸修飾を有する。変異体ポリペプチド配列は、本明細書では、親ポリペプチド配列と、好ましくは少なくとも約80%の相10同性を、最も好ましくは少なくとも約90%の相同性を、より好ましくは少なくとも約95%の相同性を有する。従って、「Fc変異体」は、本明細書で使用されるとき、少なくとも1つのアミノ酸修飾のために親Fc配列と異なるFc配列を意味する。Fc変異体は、1個のFc領域を包含するだけでもよく、または抗体、Fc融合体または実質的にFcにコードされる他のポリペプチドに関して存在してもよい。Fc変異体は、Fcポリペプチド自体、Fc変異体ポリペプチドを含む組成物、またはそれをコードするアミノ酸配列を表し得る。

【0095】

本発明において論じられるすべての位置について、免疫グロブリン重鎖の番号付けは、EUインデックス (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) に従う。「Kabat にある通りのEUインデックス」は、このヒトIgG1 EU抗体の残基の番号付けを表す。20

【0096】

本発明のFc変異体は、様々な特性について最適化され得る。最適化され得る特性には、増強または低減されたFc γ Rへの親和性が含まれるがこれに限定されるわけではない。好ましい実施態様では、本発明のFc変異体は、ヒト活性化Fc γ R、好ましくはFc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIaおよびFc γ RIIIb、最も好ましくはFc γ RIIIaへの増強された親和性を有するように最適化される。別の好ましい実施態様では、Fc変異体は、ヒト阻害性受容体Fc γ RIIbへの低減された30親和性を有するように最適化される。これらの好ましい実施態様は、増強されたヒトにおける治療特性、例えば、増強されたエフェクター機能およびより高い抗癌能力を有する抗体およびFc融合体をもたらすと期待される。別の実施態様では、本発明のFc変異体は、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIaおよびFc γ RIIIbを含むがこれらに限定されるものではないヒトFc γ Rへの、低減または除去された親和性を有するように最適化される。これらの実施態様は、増強されたヒトにおける治療特性、例えば、低減されたエフェクター機能および低減された毒性を有する抗体およびFc融合体をもたらすと期待される。好ましい実施態様は、ヒトFc γ Rに対するFc結合の最適化を含むが、しかしながら、別の実施態様では、本発明のFc40変異体は、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むがこれらに限定されるものではない非ヒト生物由来のFc γ R類に対して、増強または低減された親和性を有する。非ヒトFc γ Rへの結合について最適化されたFc変異体は、実験に用途を見出し得る。例えば、マウスモデルは様々な疾患について入手可能であり、所定の薬物候補の効力、毒性および薬物動態の試験を可能にする。当分野で知られているように、癌細胞をマウスに移植または注射して、ヒトの癌を模倣することができる（異種移植と呼ばれる方法）。1またはそれ以上のマウスFc γ R類について最適化されたFc変異体を含む抗体またはFc融合体の試験は、抗体またはFc融合体の効力、その作用メカニズムなどに関して、価値ある情報を提供し得る。本発明のFc変異体は、非グリコシル化形態での増強された機能性および／または溶解特性のためにも最適化し得る。好ましい実施態様では、本発明の非グリコシル化Fc変異体は、親Fcポリペプチドの非グリコシル化形態よりも高い親和性でFc50

リガンドに結合する。当該 F c リガンドには、F c γ R 類、C 1 q、F c R n およびプロテイン A および G が含まれるがこれらに限定されるわけではなく、ヒト、マウス、ラット、ウサギまたはサル、好ましくはヒトを含むがこれらに限定されるものではない、いかなる供給源由来であってもよい。別の好ましい実施態様では、F c 変異体は、親 F c ポリペプチドの非グリコシル化形態よりも安定および／または可溶性であるように最適化される。上述の最適化特性のいずれかを発揮するように工学処理された、または予想された F c 変異体は、本明細書で「最適化 F c 変異体」と呼ばれる。

【0097】

本発明の F c 変異体は、それ自体広範囲の供給源に由来する親 F c ポリペプチドに由来し得る。親 F c ポリペプチドは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、サル、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトおよびマウスを含むがこれらに限定されるものではない、任意の生物由来の 1 またはそれ以上の F c 遺伝子により実質的にコードされ得る。好ましい実施態様では、親 F c ポリペプチドは、抗体を構成し、これは親抗体と呼ばれる。親抗体は、完全にヒトのものであってもよく、これは、例えば遺伝子組換えマウス (Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458)、または選択方法と組み合わせてヒト抗体ライブラリー (Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108) を使用して得られる。親抗体は、天然産生である必要はない。例えば、親抗体は、キメラ抗体およびヒト化抗体 (Clark, 2000, Immunol Today 21:397-402) を含むがこれらに限定されるものではない、工学処理された抗体であってもよい。親抗体は、1 またはそれ以上の天然抗体遺伝子により実質的にコードされる、工学処理された抗体変異体であり得る。ある実施態様では、親抗体は、当分野で知られているように、親和性成熟化したものである。あるいは、抗体は、例えば 2003 年 3 月 3 日に出版された U S S N 10 / 339788 に記載されているように、いくつかの他のやり方で修飾されたものである。

【0098】

本発明の F c 変異体は、抗体クラスのいずれかに属する免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされ得る。好ましい実施態様では、本発明の F c 変異体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 を含む抗体の I g G クラスに属する配列を含む抗体または F c 融合体において用途を見出す。別の実施態様では、本発明の F c 変異体は、抗体の I g A (サブクラス I g A 1 および I g A 2 を含む)、I g D、I g E、I g G または I g M クラスに属する配列を含む抗体または F c 融合体において用途を見出す。本発明の F c 変異体は、1 より多いタンパク質鎖を含み得る。つまり、本発明は、モノマーまたはホモもしくはヘテロオリゴマーを含むオリゴマーである抗体または F c 融合体において用途を見出す。

【0099】

本発明の F c 変異体は、エフェクター機能を変更する修飾を含むがこれに限定されるものではない、他の F c 修飾と組み合わせてもよい。そのような組合せは、抗体または F c 融合体に、相加的、共同的または新規の特性をもたらし得る。ある実施態様では、本発明の F c 変異体は、他の既知の F c 変異体と組み合わせられ得る (Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490) (U S 5,624,821; U S 5,885,573; U S 6,194,551; P C T W O 00 / 42072; P C T W

10

20

30

40

50

099/58572)。別の実施態様では、本発明のFc変異体は、1またはそれ以上の工学処理された糖形態を含む抗体またはFc融合体に導入される。「工学処理された糖形態」は、本明細書で使用されるとき、Fcポリペプチドに共有結合している炭水化物組成であって、当該炭水化物組成が親Fcポリペプチドのものと化学的に異なるものを意味する。工学処理された糖形態は、エフェクター機能の増強または低減を含むがこれらに限定されるものではない、様々な目的に有用であり得る。工学処理された糖形態は、任意の方法で、例えば、工学処理または変異体発現系統の使用により、1またはそれ以上の酵素、例えばβ1-4-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII(GnTIII)との共発現により、Fcポリペプチドを様々な生物または様々な生物由来の細胞株で発現させることにより、またはFcポリペプチドが発現された後に炭水化物(複数も可)を修飾することにより、生成させ得る。工学処理された糖形態の生成方法は当分野で知られており、(Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shin kawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US 6,602,684; US SN 10/277,370; US SN 10/113,929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/29246 A1; PCT WO 02/31140 A1; PCT WO 02/30954 A1; Potelligent^(商標) 技法 (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); Glyco MAb^(商標) グリコシレーション工学処理技法 (GLYCART biotechnology AG, Zuerich, Switzerland)) が含まれるがこれらに限定されるわけではない。工学処理された糖形態は、典型的に、この異なる炭水化物またはオリゴ糖を表す; 従って、Fcポリペプチド、例えば抗体またはFc融合体は、工学処理された糖形態を含み得る。あるいは、工学処理された糖形態は、この異なる炭水化物またはオリゴ糖を含むFcポリペプチドを表し得る。従って、本発明のFc変異体の他のFc修飾並びに未発見のFc修飾との組合せは、最適化された特性を有する新規抗体またはFc融合体を生成するという目標と共に企図されている。

【0100】

本発明のFc変異体は、抗体に用途を見出し得る。「本発明の抗体」は、本明細書で使用されるとき、本発明のFc変異体を含む抗体を意味する。本発明は、実際に、Fcを含むいかなるタンパク質にも用途を見出し、従って本発明のFc変異体の適用は抗体に限定されない。本発明のFc変異体は、Fc融合体に用途を見出し得る。「本発明のFc融合体」は、本明細書で使用されるとき、本発明のFc変異体を含むFc融合体を表す。Fc融合体は、サイトカイン、可溶性受容体ドメイン、接着分子、リガンド、酵素、ペプチドまたは他のタンパク質もしくはタンパク質ドメインに機能し得るように連結された本発明のFc変異体を含み得、US 5,843,725; US 6,018,026; US 6,291,212; US 6,291,646; US 6,300,099; US 6,323,323; PCT WO 00/24782; および (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200) に記載のFc融合体を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0101】

事実上いかなる抗原も、本発明の抗体および融合体により標的とされ得る。これには、以下のリストのタンパク質、以下のリストのタンパク質に属するサブユニット、ドメイン、モチーフおよびエピトープが含まれるが、これらに限定されるものではない: CD2; CD3、CD3E、CD4、CD11、CD11a、CD14、CD16、CD18、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD28、CD29、CD30、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD38、CD40、CD40L、CD52、CD54、CD56、CD80、CD147、GD3、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-12、IL-15、IL-18、IL-23、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ; TNF-アルファ、TNFベータ2、TNFc、TNFアルファベータ、TNF-R I、TNF-R II、FasL、CD27L、CD30L、4

- 1 B B L、T R A I L、R A N K L、T W E A K、A P R I L、B A F F、L I G H T、V E G I、O X 4 0 L、T R A I L 受容体-1、A 1 アデノシン受容体、リンホトキシンベータ受容体、T A C I、B A F F-R、E P O；L F A-3、I C A M-1、I C A M-3、E p C A M、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インテグリンアルファ4／ベータ7、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ5、インテグリンアルファ6、インテグリンアルファv、アルファVベータ3インテグリン、F G F R-3、ケラチノサイト成長因子、V L A-1、V L A-4、L-セレクチン、抗 I d、E-セレクチン、H L A、H L A-D R、C T L A-4、T細胞受容体、B 7-1、B 7-2、V N Rインテグリン、T G Fベータ1、T G Fベータ2、エオタキシン (eotaxin) 1、B L y S (B-リンパ球刺激因子)、補体C 5、I g E、ファクターV I I、C D 6 4、C B L、N C A 9 0、E G F R (E r b B-1)、H e r 2 / n e u (E r b B-2)、H e r 3 (E r b B-3)、H e r 4 (E r b B-4)、組織因子、V E G F、V E G F R、エンドセリン受容体、V L A-4、ハプテンN P-キャップ (cap) またはN I P-キャップ、T細胞受容体アルファ／ベータ、E-セレクチン、ジゴキシン、胎盤アルカリホスファターゼ (P L A P) および精巢P L A P様アルカリホスファターゼ、トランスフェリン受容体、癌胎児抗原 (C E A)、C E A C A M 5、H M F G P E M、ムチンM U C 1、M U C 1 8、ヘパラーゼ (H e p a r a n a s e) I、ヒト心臓ミオシン、腫瘍関連糖タンパク質-7 2 (T A G-7 2)、腫瘍関連抗原C A 1 2 5、前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、高分子量黒色腫関連抗原 (H M W-M A A)、癌腫関連抗原、グコプロテイン (G c o p r o t e i n) I I b / I I I a (G P I I b / I I I a)、ルイスY関連炭水化物を発現する腫瘍関連抗原、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) g Hエンベロープ糖タンパク質、H I V g p 1 2 0、H C M V、呼吸器合胞体ウイルスR S V F、R S V F F g p、V N Rインテグリン、I L-8、サイトケラチン腫瘍関連抗原、H e p B g p 1 2 0、C M V、g p I I b I I I a、H I V I I I B g p 1 2 0 V 3ループ、呼吸器合胞体ウイルス (R S V) F g p、単純ヘルペスウイルス (H S V) g D糖タンパク質、H S V g B糖タンパク質、H C M V g Bエンベロープ糖タンパク質およびウェルシュ菌毒素。

【0102】

当業者は、上述の標的リストが特定のタンパク質や生体分子だけでなく、それらを含む生化学経路または経路群を表すことがわかる。例えば、標的抗原としてC T L A-4に言及することは、C T L A-4、B 7-1、B 7-2、C D 2 8およびこれらのタンパク質に結合する任意の他の未発見のリガンドまたは受容体を含む、T細胞共刺激経路を形成するリガンドおよび受容体もまた標的であることを含意する。従って、標的は、本明細書で使用されるとき、特定の生体分子だけでなく、当該標的と相互作用するタンパク質のセットおよび当該標的が属する生化学的経路のメンバーを表す。当業者はさらに、上述の標的抗原、それらに結合するリガンドまたは受容体、またはそれらの対応する生化学経路の他のメンバーはいずれも、F c融合体を生成させるために、本発明のF c変異体に機能し得るように連結され得ることがわかる。従って、例えば、E G F Rを標的とするF c融合体は、F c変異体を、E G F、T G F α、またはE G F Rに結合する既発見もしくは未発見の任意の他のリガンドに機能し得るように連結させることにより構築できる。従って、E G F、T G F α、またはE G F Rに結合する既発見もしくは未発見の任意の他のリガンドに結合するF c融合体を生成させるために、本発明のF c変異体をE G F Rに機能し得るように連結させ得る。従って、事実上いかなるポリペプチドも、上述の標的およびそれらの対応する生化学経路を構成するタンパク質を含むがこれらに限定されるものではない、リガンド、受容体または他のタンパク質またはタンパク質ドメインのいずれであっても、F c融合体を開発するために本発明のF c変異体に機能し得るように連結させ得る。

【0103】

治験において使用を承認された、または開発中の数々の抗体およびF c融合体は、本発明のF c変異体から利益を得うる。当該抗体およびF c融合体は、本明細書において、「臨床用製品および候補」と呼ばれる。従って、好ましい実施態様では、本発明のF c変異

10

20

30

40

50

体は、広範囲の臨床用製品および候補において用途を見出し得る。例えば、数々のCD20を標的とする抗体は、本発明のFc変異体から利益を得うる。例えば、本発明のFc変異体は、非ホジキンリンパ腫の処置に承認されたキメラ抗CD20抗体であるリツキシマブ(Rituxan^(登録商標)、IDEC/Genentech/Roche)(例えば、US5,736,137参照)；Genmabにより現在開発されている抗CD20であるHuMax-CD20、US5,500,362に記載の抗CD20抗体、AME-133(Applied Molecular Evolution)、hA20(Immuno medics, Inc.)およびHumaLYM(Intracel)に実質的に類似する抗体において、用途を見出し得る。EGFR(ErbB-1)、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)を含む上皮成長因子受容体ファミリーのメンバーを標的とする数々の抗体は、本発明のFc変異体から利益を得うる。例えば、本発明のFc変異体は、トラスツズマブ(Herceptin^(登録商標)、Genentech)(例えば、US5,677,171参照)、乳癌の処置に承認されたヒト化抗Her2/neu抗体；Genentechにより現在開発されているペルツズマブ(pertuzumab)(rhuMab-2C4, Omnitarg^(商標))；US4,753,894に記載の抗Her2抗体；セツキシマブ(cetuximab)(Erbbitux^(登録商標)、Imclone)(US4,943,533；PCT WO 96/40210)、様々な癌のために治験中のキメラ抗EGFR抗体；Abgenix/Immunex/Amgenにより現在開発されているABX-EGF(US6,235,883)；Genmabにより現在開発されているHuMax-EGFr(US SN 10/172,317)；425、EMD55900、EMD62000およびEMD72000(Merck KGaA)(US5558864；Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60；Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20；Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83)；ICR62(Institute of Cancer Research)(PCT WO 95/20045；Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46；Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53；Modjtahedi et al, 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35；Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80)；TheraCIMhR3(YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba)(US5,891,996；US6,506,883；Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81)；mAb-806(Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2):639-44)；KSB-102(KS Biomedix)；MR1-1(IVAX, National Cancer Institute)(PCT WO 01/62931A2)；およびSC100(Scancell)(PCT WO 01/88138)に実質的に類似する抗体において、用途を見出し得る。他の好ましい実施態様では、本発明のFc変異体は、B細胞慢性リンパ性白血病の処置に現在承認されているヒト化モノクローナル抗体であるアレムツズマブ(CamPATH^(登録商標)、Millenium)において用途を見出し得る。本発明のFc変異体は、Ortho Biotech/Johnson & Johnsonにより開発された抗CD3抗体であるムロモナブ(muromonab)－CD3(Ortho clone OKT3^(登録商標))、IDEC/Schering AGにより開発された抗CD20抗体であるイブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan)(Zevalin^(登録商標))、Celltech/Wyethにより開発された抗CD33(p67タンパク質)抗体であるゲンツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg^(登録商標))、Biogenにより開発された抗LFA-3Fc融合体であるアレファセプト(alefacept)(Amevive^(登録商標))、Centocor/Lillyにより開発されたアブシキシマブ(ReoPro^(登録商標))、Novartisにより開発されたバシリキシマブ(Simulect^(登録商標))、MedImmuneにより開発されたパリビズマブ(palivizumab)(Synagis^(登録商標))、Centocorにより開発された抗TNFアルファ抗体であるインフリキシマブ(Remicade^(登録商標))、Abbottにより開発された抗TNFアルファ抗体であるアダリムマブ(adalimumab)(Humira^(登録商標))、Celltechにより開発された抗TNFアルファ抗体であるHumicade^(商標)、Immunex/Amgenにより開発された抗TNFアルファFc融合体であるエタネルセプト(Enbrel^(登録商標))、Abgenixにより開発されている抗CD147抗体であるABX-CBL、Abgenixにより開発されている抗IL8抗体であるABX-IL8、Abgenixにより開発されている抗MUC18抗体であるABX-MA1、Antisomaにより開発されている抗MUC1であるペンツモマブ(Pemtumomab

10

20

30

40

50

) (R1549、 ^{90}Y -muHMFGL)、Antisoma により開発されている抗MUC1抗体であるThere
 x (R1550)、Antisoma により開発されている AngioMab (AS1405)、Antisoma により開
 発されている HuBC-1、Antisoma により開発されているチオプラチン (Thioplatin) (AS
 1407)、Biogen により開発されている抗アルファ-4-ベータ-1 (VLA-4) およ
 びアルファ-4-ベータ-7抗体であるAntegren^(登録商標) (ナタリズマブ (natalizuma
 b))、Biogen により開発されている抗VLA-1インテグリン抗体であるVLA-1 mAb、B
 iogen により開発されている抗リンホトキシンベータ受容体 (LTBR) 抗体である LTB
 R mAb、Cambridge Antibody technologyにより開発されている抗TGF β 2抗体であるCA
 T-152、Cambridge Antibody technology および Abbott により開発されている抗IL-
 12抗体であるJ695、Cambridge Antibody technology および Genzymeにより開発されて
 いる抗TGF β 1抗体である CAT-192、Cambridge Antibody technology により開発され
 ている抗エオタキシン (Eotaxin) 1抗体である CAT-213、Cambridge Antibody technolo
 gy and Human Genome Sciences Inc. により開発されている抗Bly s抗体であるLympho
 Stat-B^(商標)、Cambridge Antibody technology and Human Genome Sciences, Inc. によ
 り開発されている抗TRAIL-R1抗体であるTRAIL-R1mAb、Genentechにより開発され
 ている抗VEGF抗体であるAvastin^(商標) (ベバシズマブ (bevacizumab)、rhuMAb-VEG
 F)、Genentechにより開発されている抗HER受容体ファミリー抗体、Genentech により
 開発されている抗組織因子抗体である抗組織因子 (ATF)、Genentech により開発されて
 いる抗IgE抗体である Xolair^(商標) (オマリズマブ (Omalizumab))、Genentech お
 よび Xoma により開発されている抗CD11a抗体であるRaptiva^(商標) (エファリズマ
 ブ (Efalizumab))、Genentech および Millenium Pharmaceuticals により開発されて
 いるMLN-02抗体 (以前はLDP-02)、Genmab により開発されている抗CD4
 抗体である HuMax CD4、Genmab および Amgen により開発されている抗IL15抗体であ
 る HuMax-IL15、Genmab および Medarex により開発されている HuMax-Inflam、Genmab
 および Medarex および Oxford GcoSciences により開発されている抗ヘパラーゼI抗
 体である HuMax-Cancer、Genmab および Amgenにより開発されている HuMax-Lymphoma、G
 enmab により開発されている HuMax-TAC、IDEC Pharmaceuticals により開発されている
 抗CD40L抗体であるIDEC-131、IDEC Pharmaceuticals により開発されている抗CD
 4抗体であるIDEC-151 (クレノリキシマブ (Clenoliximab))、IDEC Pharmaceuticals
 により開発されている抗CD80抗体であるIDEC-114、IDEC Pharmaceuticals により開
 発されている抗CD23であるIDEC-152、IDEC Pharmaceuticals により開発されている
 抗マクロファージ遊走因子 (MIF) 抗体、Imclone により開発されている抗イディオタイ
 プ抗体であるBEC2、Imclone により開発されている抗KDR抗体である IMC-1C11、Imc
 lone により開発されている抗flk-1抗体であるDC101、Imclone により開発されている抗
 VEカドヘリン抗体、Immunomedicsにより開発されている抗癌胎児抗原 (CEA) 抗体で
 あるCEA-Cide^(商標) (ラベツズマブ (labetuzumab))、Immunomedics により開発されて
 いる抗CD22抗体である LymphoCide^(商標) (エプラツズマブ (Epratuzumab))、Immu
 nomedics により開発されているAFP-Cide、Immunomedics により開発されている Myeloma
 Cide、Immunomedics により開発されている LkoCide、Immunomedics により開発されて
 いる ProstaCide、Medarex により開発されている抗CTLA4抗体であるMDX-010、Medare
 x により開発されている抗CD30抗体であるMDX-060、Medarex により開発されているM
 DX-070、Medarex により開発されているMDX-018、Medarex および Immuno-Designed Mole
 cules により開発されている抗Her2抗体である Osidem^(商標) (IDM-1)、Medarex お
 よび Genmab により開発されている抗CD4抗体である HuMax^(商標)-CD4、Medarex およ
 び Genmab により開発されている抗IL15抗体であるHuMax-IL15、Medarex および Cen
 tocor/J&J により開発されている抗TNF α 抗体であるCNT0 148、Centocor/J&J により
 開発されている抗サイトカイン抗体であるCNT0 1275、MorphoSys により開発されている
 抗細胞間接着分子-1 (ICAM-1) (CD54) 抗体である MOR101 および MOR102
 、MorphoSys により開発されている抗線維芽細胞成長因子受容体3 (FGFR-3) 抗体
 である MOR201、Protein Design Labs により開発されている抗CD3抗体である Nuvion

10

20

30

40

50

(登録商標) (ビシリズマブ (visilizumab))、Protein Design Labs により開発されている抗ガンマイインターフェロン抗体である HuZAF^(商標)、Protein Design Labs により開発されている抗 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン、Protein Design Labs により開発されている抗 I L-12、Xoma により開発されている抗 E p-C A M 抗体である ING-1、並びに Xoma により開発されている抗ベータ 2 インテグリン抗体である MLN01 を含むがこれらに限定されるものではない、他の臨床用製品および候補に実質的に類似する様々な抗体または F c 融合体において用途を見出し得る。

【0104】

上述の抗体および F c 融合体の臨床用製品および候補への F c 変異体の適用は、それらの組成そのものに制限されることを意味しない。本発明の F c 変異体は、上述の臨床用候補および製品に、またはそれらに実質的に類似する抗体および F c 融合体に組み込まれ得る。本発明の F c 変異体は、ヒト化、親和性成熟化、工学処理または他のやり方で修飾された、上述の臨床用候補および製品の変形に組み込まれ得る。さらに、本発明の F c 変異体を組み込む新しい抗体または F c 融合体を構築するのに、上述の臨床用製品および候補のポリペプチド全体を使用する必要はない；例えば、臨床用製品または候補抗体の可変領域、実質的に類似する可変領域、またはヒト化、親和性成熟化、工学処理または修飾された変形の可変領域のみを使用し得る。他の実施態様では、本発明の F c 変異体は、上述の臨床用製品および候補の 1 つとして、同じエピトープ、抗原、リガンドまたは受容体に結合する抗体または F c 融合体において用途を見出し得る。

【0105】

本発明の F c 変異体は、広範囲の抗体および F c 融合体製品において用途を見出し得る。ある実施態様では、本発明の抗体または F c 融合体は、治療的、診断的、または研究用試薬であり、好ましくは治療的である。あるいは、本発明の抗体および F c 融合体は、農業または産業的用途に使用し得る。別の実施態様では、本発明の F c 変異体は、実験的にスクリーニングし得るライブラリーを含む。このライブラリーは、核酸またはアミノ酸配列のリストであり得、または、ライブラリー配列をコードする核酸またはポリペプチドの物理的組成物であり得る。F c 変異体は、モノクローナルまたはポリクローナルである抗体組成物において用途を見出し得る。好ましい実施態様では、本発明の抗体および F c 融合体は、標的抗原を有する標的細胞、例えば癌細胞、を殺傷するのに使用される。別の実施態様では、本発明の抗体および F c 融合体は、標的抗原を阻害、アンタゴナイズ (antagonize)、またはアゴナイズ (agonize) するのに、例えば、サイトカインまたはサイトカイン受容体をアンタゴナイズするのに使用される。別の好ましい実施態様では、本発明の抗体および F c 融合体は、標的抗原をブロック、アンタゴナイズ、またはアゴナイズし、そして標的抗原を有する標的細胞を殺傷するのに使用される。

【0106】

本発明の F c 変異体は、様々な治療目的に使用し得る。好ましい実施態様では、F c 変異体タンパク質は、抗体関連障害を処置するために患者に投与される。本発明のための「患者」には、ヒトおよび他の動物の両方が含まれ、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトである。従って、本発明の抗体および F c 融合体には、ヒトの治療および獣医学の両方の適用がある。好ましい実施態様では、患者は哺乳動物であり、最も好ましい実施態様では、患者はヒトである。本発明における用語「処置」は、治療的処置、並びに疾患または障害の予防的または抑制的措置を含む意味である。従って、例えば、疾患の発病に先立ち抗体または F c 融合体を成功裏に投与することは、疾患の処置をもたらす。他の例として、疾患の臨床的顕在化の後に最適化抗体または F c 融合体を成功裏に投与して疾患の症状と闘うことは、疾患の処置を含む。「処置」は、疾患を根絶するために、最適化抗体または F c 融合体タンパク質を疾患の出現後に投与することも包含する。発病後および臨床的症狀の進行後に、可能性のある臨床的症狀の減退と恐らくは疾患の改善を伴って物質を成功裏に投与することは、疾患の処置を含む。「処置を必要とする」ものには、疾患または障害を既に有する哺乳動物、並びに疾患または障害を有する傾向のあるものが含まれ、疾患または障害を予防すべきものが含まれる。本明細書における「抗体関連障害」

または「抗体応答性障害」または「症状」または「疾患」は、本発明の抗体またはFc融合体を含む医薬組成物の投与により改善され得る障害を意味する。抗体関連障害には、自己免疫疾患、免疫性疾患、感染性疾患、炎症性疾患、神経性疾患、並びに癌を含む腫瘍性および新生物性疾患が含まれるがこれらに限定されるわけではない。本明細書において「癌」および「癌性」は、典型的に調節されていない細胞増殖を特徴とする、哺乳動物の生理的症状を表すか、または記載する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫（脂肪肉腫を含む）、神経内分泌系腫瘍、中皮腫、シュワン腫、髄膜腫、腺癌、黒色腫および白血病またはリンパ性悪性疾患が含まれるがこれらに限定されるわけではない。かかる癌のより詳細な例には、扁平上皮細胞癌（例えば、上皮の扁平上皮細胞癌を含む）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌腫を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸の癌を含む胃または腹部の癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓または腎癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、精巣癌、食道癌、胆道の腫瘍、並びに頭部および頸部の癌が含まれる。さらに、本発明のFc変異体は、鬱血性心不全（CHF）、血管炎、酒さ（rosecea）、アクネ、湿疹、心筋炎および心筋の他の症状、全身性エリテマトーデス、糖尿病、脊椎症、滑膜線維芽細胞（synovial fibroblasts）および骨髄ストロマ；骨減少；パジェット病、骨巨細胞腫；多発性骨髄腫；乳癌；廃用性骨減少症（disuse osteopenia）；栄養失調症、歯周病、ゴーシェ病、ランゲルハンス細胞組織球症、脊髄損傷、急性敗血症性関節炎、骨軟化症、クッシング症候群、単骨性（monoostotic）線維性骨異形成、多骨性（polyostotic）線維性骨異形成、歯周再構成（periodontal reconstruction）および骨折；サルコイドーシス；多発性骨髄腫；溶骨性骨肉腫、乳癌、肺癌、腎臓癌および直腸癌；骨転移、骨痛の管理、および体液性悪性高カルシウム血症、強直性脊椎炎および他の脊椎関節症；移植拒絶、ウイルス感染、血液新形成および新生様症状、例えば、ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫（パーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫／慢性リンパ球性白血病、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型Bリンパ腫、辺縁帯リンパ腫、毛様細胞白血病およびリンパ形質細胞性白血病）、リンパ球前駆細胞の腫瘍（B細胞急性リンパ芽球白血病／リンパ腫およびT細胞急性リンパ芽球白血病／リンパ腫を含む）、胸腺腫、成熟TおよびNK細胞の腫瘍（末梢T細胞白血病、成人T細胞白血病／T細胞リンパ腫および大顆粒リンパ球性白血病を含む）、ランゲルハンス細胞組織球症、骨髄新形成（急性骨髄性白血病（成熟を認めるAML、分化していないAML、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病および急性単球性白血病を含む）、骨髄異形成症候群、および慢性骨髄増殖性障害（慢性骨髄性白血病を含む）など）、中枢神経系の腫瘍、例えば脳腫瘍（神経膠腫、神経芽細胞腫、星細胞腫、骨髄腫、上衣細胞腫および網膜芽細胞腫）、固形腫瘍（鼻咽頭癌、基底細胞腫、膵癌、胆管の癌、カポジ肉腫、精巣癌、子宮、腔部または子宮頸の癌、卵巣癌、原発性肝癌または子宮体癌）、および血管系の腫瘍（血管肉腫および血管外皮細胞腫）、骨粗鬆症、肝炎、HIV、AIDS、脊椎関節炎、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患（IBD）、敗血症および敗血症ショック、クローン病、乾癬、強皮症、移植片対宿主病（GVHD）、膵島同種移植拒絶、血液悪性腫瘍（多発性骨髄腫（MM）、骨髄異形性症候群（MDS）および急性骨髄性白血病（AML）など）、癌に伴う炎症、末梢神経損傷または脱髄性疾患を含むがこれらに限定されるものではない症状の処置に使用し得る。

【0107】

ある実施態様では、本発明の抗体またはFc融合体は、タンパク質の不適切な発現に関与する疾患を有する患者に投与される。本発明の範囲内では、これは、例えばタンパク質存在量の変化、変異型タンパク質の存在、または両者に起因する、異常なタンパク質を特徴とする疾患および障害を含む意味である。過剰は、分子レベルでの過剰発現、作用部位での延長された、または蓄積された出現、または正常と比べて増加したタンパク質の活性を含むがこれらに限定されるものではない、いかなる原因によるものでもあり得る。タンパク質の低減を特徴とする疾患および障害は、この定義に含まれる。この低減は、分子レ

10

20

30

40

50

ベルでの限定された、または低減された発現、作用部位での短縮された、または低減された出現、タンパク質の変異形、または正常と比べて減少したタンパク質の活性を含むがこれらに限定されるものではない、いかなる原因によるものでもあり得る。このようなタンパク質の過剰または低減は、タンパク質の正常な発現、出現、または活性と比べて測定でき、当該測定は、本発明の抗体およびFc融合体の開発および／または治験において重要な役割を果たし得る。

【0108】

ある実施態様では、本発明の抗体またはFc融合体は、患者に投与される唯一の治療的活性物質である。あるいは、本発明の抗体またはFc融合体は、細胞傷害性物質、化学療法剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤、キナーゼ阻害剤、抗血管形成剤、心臓保護剤、または他の治療物質を含むがこれらに限定されるものではない、1またはそれ以上の治療物質と組合せて投与される。このような分子は、企図する目的に有効な量で組合せ中に適切に存在する。熟練した医師は、ここで有用な他の治療物質の適切な用量または複数の用量を経験的に決定できる。本発明の抗体およびFc融合体は、1またはそれ以上の他の治療法と同時に投与し得る。例えば、本発明の抗体またはFc融合体は、化学療法、放射線療法、または化学療法と放射線療法の両方と共に患者に投与し得る。ある実施態様では、本発明の抗体またはFc融合体は、本発明のFc変異体を含んでも含まなくてもよい1またはそれ以上の抗体またはFc融合体と一緒に投与し得る。

【0109】

ある実施態様では、本発明の抗体およびFc融合体は、化学療法剤と共に投与される。「化学療法剤」は、本明細書で使用されるとき、癌の処置に有用な化学的化合物を意味する。化学療法剤の例には、チオテパおよびシクロスホスファミド (cyclophosphamido) (CYTOXAN^(商標)) などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン (piposulfan) などのアルキルスルホネート類；ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa) およびウレドーパ (uredopa) などのアジリジン類；アルトレトアミン (altretamine)、トリエチレンメルアミン (triethylenemelamine)、トリエチレンホスホルアミド (triethylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスホルアミド (triethylenethiophosphoramidate) およびトリメチロールオメラアミン (trimethylolomelamine) を含むエチレンイミン類およびメチルアメルアミン (methylamelamine) 類；クロランブシル、クロルナファジン (chlornaphazine)、クロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニマスチン (prednimustine)、トロフォスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード；カルムスチン (carmustine)、クロロゾトシン (chlorozotocin)、フォテムスチン (fotemustine)、ロムスチン (lomustine)、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素類；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン (cactinomycin)、カリケアマイシン (calicheamicin)、カラビシン (carabycin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン (detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、エソルピシン (esorubicin)、イダルピシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン (nogalamycin)、オリボマイシン (olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロボルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン (zinostatin)、ゾルピシン (zorubicin) などの抗生物質；メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) などの抗代謝剤；デノプテリン (denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトトレキセートなどの葉酸類似体；フルダラビン (fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprine)、チオグア

ニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フルオキシウリジン（floxuridine）、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン（calusterone）、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤（anti-adrenal）；フロリン酸（frolinic acid）などの葉酸補充剤（replenisher）；アセグラトン；アルドホルホラミド（aldophosphamide）グリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル（bestrabucil）；ビスアントレン（bisantrene）；エダトラキセート（edatraxate）；デホファミン（defofamine）；デメコルシン（demecolcine）；ジアジクオン（diaziquone）；エルホルミチン（elformithine）；エリプチニウムアセテート（elliptinium acetate）；エトグルシド（etoglucid）；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン（lonidamine）；ミトグアゾン（mitoguazone）；ミトキサントロン；モピダモール（mopidamol）；ニトラシン（nitracrine）；ペントスタチン；フェナメット（phenamet）；ピラルビシン；ポドフィリン酸（podophyllinic acid）；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK^{（登録商標）}；ラゾキサン（razoxane）；シゾフラン（sizofuran）；スピロゲルマニウム（spirogermanium）；テヌアゾン酸（tenuazonic acid）；トリアジコン（triaziquone）；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ペンデシン；ダカルバジン；マンノマスチン（mannomustine）；ミトブロニトール；ミトラクトール（mitolactol）；ピポブロマン（pipobroman）；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン類、例えばパクリタキセル（TAXOL^{（登録商標）}，Bristol-Myers Squibb Oncology，Princeton，N.J.）およびドセタキセル（TAXOTERE^{（登録商標）}，Rhne-Poulenc Rorer，Antony，France）；クロランブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン（vinorelbine）；ナベルビン（navelbine）；ノバントロン（novantrone）；テニポシド（teniposide）；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセロダ（xeloda）；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン（esperamicins）；カペシタビン（capecitabine）；チミジル酸合成阻害剤（Tomudexなど）；セリコキシブ（celicoxib）（CELEBREX^{（登録商標）}）またはMK-0966（VIOXX^{（登録商標）}）などのcox-2阻害剤；および上記のいずれかの医薬的に許容し得る塩、酸または誘導体が含まれるが、これらに限定されるわけではない。この定義には、また、腫瘍に対するホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれ、これには、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4（5）-イミダゾール類、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン（trioxifene）、ケオキシフェン（keoxifene）、LY 117018、オナプリストン（onapristone）およびトレミフェン（Fareston）などのエストロゲン類；およびフルタミド、ニルタミド（nilutamide）、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンなどの抗アンドロゲン類；および上記のいずれかの医薬的に許容され得る塩、酸または誘導体が含まれる。

【0110】

化学療法剤または他の細胞傷害性物質は、プロドラッグとして投与し得る。「プロドラッグ」は、本明細書で使用されるとき、腫瘍細胞に対する細胞傷害性が親の薬物と比較して低く、酵素的に活性化されるか、より活性の高い親の形態に変換される能力のある、医薬的に活性な物質の前駆体または誘導体形を意味する。例えば、Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14:375-382; and Stella et al., Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.): 247-267, Humana Press, 1985 参照。本発明で用途を見出し得るプロドラッグには、より活性の高い細胞傷害性の遊離薬物に変換され得る、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロド

10

20

30

40

50

ラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ペターラクタム含有プロドラッグ、置換されていることもあるフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは置換されていることもあるフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグ類が含まれるが、これらに限定されるわけではない。本発明の抗体およびFc融合体と共に使用するためにプロドラッグ形態に誘導体化できる細胞傷害性の薬物の例には、上述の化学療法剤のいずれもが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0111】

本発明の抗体およびFc融合体は、他の治療法と組合せてもよい。例えば、ある実施態様では、抗体またはFc融合体で処置されるべき患者は、放射線療法も受け得る。放射線療法は、当分野で一般的に用いられ、当業者に知られているプロトコルに従って施すことができる。かかる治療には、セシウム、イリジウム、ヨウ素またはコバルト放射が含まれるが、これらに限定されるものではない。放射線療法は、全身放射であってもよく、肺、膀胱または前立腺などの体内または体表の特定の部位または組織に局所的に向けてもよい。典型的に、放射線療法は、約1ないし2週間の期間にわたり、パルスで施す。しかしながら、放射線療法は、もっと長い期間施してもよい。例えば、放射線療法は、頭部および頸部の癌を有する患者に、約6ないし約7週間施してもよい。場合により、放射線療法は、単回用量または複数回、連続的用量として施し得る。熟練した医師は、ここで有用な放射線療法の適切な用量または複数の用量を、経験的に決定できる。本発明の他の実施態様によると、本発明の抗体またはFc融合体および1またはそれ以上の他の抗癌療法を、癌細胞をエクスピボで処置するのに用いる。かかるエクスピボ処置は、骨髄移植および特に自家骨髄移植において有用であり得ると企図されている。例えば、抗体またはFc融合体および上記のような1またはそれ以上の他の抗癌治療による細胞または癌細胞を含有する組織（複数可）の処置は、レシピエントの患者への移植に先立ち、癌細胞を枯渇させるか、または実質的に枯渇させるのに用いることができる。当然、本発明の抗体およびFc融合体は、手術などのもっと他の治療技法と組み合わせて用いることができると企図されている。

【0112】

別の実施態様では、本発明の抗体およびFc融合体は、サイトカインと共に投与される。「サイトカイン」は、本明細書で使用されるとき、一細胞群から放出され、細胞間媒介物質として他の細胞に作用するタンパク質を表す一般用語を意味する。かかるサイトカインの例は、リンホカイン、モノカインおよび伝統的なポリペプチドホルモンである。ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；リラキシン；プロリラキシン；濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；肝細胞成長因子；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ；ミューラー管阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF-ベータなどの神経成長因子；血小板成長因子；TGF-アルファおよびTGF-ベータなどの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および-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導（osteoinductive）因子；インターフェロン-アルファ、ベータおよびガンマなどのインターフェロン；マクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）などのコロニー刺激因子（CSF）；IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15などのインターロイキン（IL）；TNF-アルファまたはTNF-ベータなどの腫瘍壊死因子；およびLIFおよびキット（kit）リガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子は、サイトカインに含まれる。本明細書で使用されるとき、用語サイトカインには、天然の供給源由来または組換え細胞培養由来のタンパク質、および

10

20

30

40

50

天然配列のサイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

【0113】

様々な他の治療物質が、本発明の抗体およびFc融合体との投与に用途を見出し得る。ある実施態様では、抗体またはFc融合体は、抗血管形成剤と共に投与される。「抗血管形成剤」は、本明細書で使用されるとき、血管の発達を阻害するか、ある程度妨害する化合物を意味する。抗血管形成因子は、例えば、血管形成の促進に関与する成長因子または成長因子受容体に結合する抗体、Fc融合体またはサイトカインなどの低分子またはタンパク質であり得る。本発明において好ましい抗血管形成因子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に結合する抗体である。別の実施態様では、抗体またはFc融合体は、適応免疫反応を誘導または増強する治療剤、例えば、CTLA-4を標的とする抗体、と共に投与される。別の実施態様では、抗体またはFc融合体は、チロシンキナーゼ阻害剤と共に投与される。「チロシンキナーゼ阻害剤」は、本明細書で使用されるとき、チロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子を意味する。そのような阻害剤の例には、PD153035、4-（3-クロロアニリノ）キナゾリンなどのキナゾリン類；ピリドピリミジン類；ピリミドピリミジン類；CGP59326、CGP60261およびCGP62706などのピロロピリミジン類；ピラゾロピリミジン類、4-（フェニルアミノ）-7H-ピロロ（2,3-d）ピリミジン類；クルクミン（ジフェルロイルメタン、4,5-ビス（4-フルオロアニリノ）フタルイミド）；ニトロチオフェン部分を含むチルホスチン（tyrphostine）類；PD-0183805（Warner-Lambert）；アンチセンス分子（例えば、ErbBをコードする核酸に結合するもの）；キノキサリン類（US 5,804,396）；トリホスチン（tryphostin）類（US 5,804,396）；ZD6474（AstraZeneca）；PTK-787（Novartis/Schering AG）；C1-1033（Pfizer）などのpan-ErbB阻害剤；Affinitac（ISIS 3521；Isis/Lilly）；イマチニブメシレート（STI571, Gleevec^{（登録商標）}；Novartis）；PKI 166（Novartis）；GW2016（Glaxo SmithKline）；C1-1033（Pfizer）；EKB-569（Wyeth）；Semaxinib（Sugen）；ZD6474（AstraZeneca）；PTK-787（Novartis/Schering AG）；INC-1C11（Imclone）；または以下の特許公開のいずれかに記載されている通り：US 5,804,396；PCT WO 99/09016（American Cyanamid）；PCT WO 98/43960（American Cyanamid）；PCT WO 97/38983（Warner-Lambert）；PCT WO 99/06378（Warner-Lambert）；PCT WO 99/06396（Warner-Lambert）；PCT WO 96/30347（Pfizer, Inc）；PCT WO 96/33978（AstraZeneca）；PCT WO96/3397（AstraZeneca）；PCT WO 96/33980（AstraZeneca）、ゲフィチニブ（IRESSA^{（商標）}、ZD1839, AstraZeneca）および OSI-774（Tarceva^{（商標）}、OSI Pharmaceuticals/Genentech）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0114】

別の実施態様では、本発明の抗体またはFc融合体は、他の治療化合物に結合または機能し得るように連結している。治療化合物は、細胞傷害性物質、化学療法剤、毒素、放射性同位元素、サイトカイン、または他の治療的に活性な物質であり得る。抗体またはFc融合体と細胞傷害性物質の結合物は、N-スクシニミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオネート（SPDP）、スクシニミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン（IT）、イミドエステル類の二官能性誘導体（ジメチルアジブイミデートHCLなど）、活性エステル類（ジスクシニミジルスベレートなど）、アルデヒド類（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート類（トリエン（tolylene）2,6-ジイソシアネートなど）、およびビス-活性フッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど）などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作成し得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., 1971, Science 238:1098 に記載の通りに製造できる。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、抗体に放射線ヌクレオチドを結合させるための例示的キレート剤である。PCT WO 94/11

10

20

30

40

50

026 参照。リンカーは、細胞中で細胞傷害性の薬物の放出を助長する切断可能リンカーであり得る。例えば、酸で変化しやすい (acid-labile) リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Chari et al., 1992, Cancer Research 52: 127-131) を使用し得る。あるいは、抗体または Fc 融合体は、例えば組換え技法またはペプチド合成により、治療物質に機能し得るように連結される。

【0115】

本発明の抗体および Fc 融合体への結合に有用であり得る化学療法剤は、上記で説明した。別の実施態様では、抗体または Fc 融合体は、低分子毒素および細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素 (それらのフラグメントおよび/または変異体を含む) を含むがこれらに限定されるものではない毒素に、結合または機能し得るように連結する。低分子毒素には、カリチェアミシン (calicheamicin)、メイタンシン (maytansine) (US 5,208,020)、トリコセン (trichothene) および CC1065 が含まれるが、これらに限定されるわけではない。本発明のある実施態様では、抗体または Fc 融合体を、1 またはそれ以上のメイタンシン分子に結合させる (例えば、抗体分子 1 個につき約 1 ないし約 10 メイタンシン分子)。メイタンシンを、例えば、May-SS-Me に変換し得、それを May-SH3 に還元し、修飾抗体または Fc 融合体と反応させ (Chari et al., 1992, Cancer Research 52: 127-131)、メイタンシノイドー抗体またはメイタンシノイドー Fc 融合体結合体を生成させ得る。興味深い他の結合体には、1 またはそれ以上のカリチェアミシン分子に結合した抗体または Fc 融合体が含まれる。抗生物質のカリチェアミシンファミリーは、ピコモル濃度以下の濃度で二本鎖 DNA の破壊をもたらす能力を有する。使用し得るカリチェアミシン構造類似体には、 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3 、N-アセチル- γ_1^1 、PSAG、および θ_1^1 (Hinman et al., 1993, Cancer Research 53: 3336-3342; Lode et al., 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (US 5,714,586; US 5,712,374; US 5,264,586; US 5,773,001) が含まれるが、これらに限定されるわけではない。アウリスタチン (auristatin) E (AE) およびモノメチルアウリスタチン E (MMAE) などのドラスタチン (Dolastatin) 10 類似体は、本発明の Fc 変異体のための結合体として用途を見出し得る (Doronina et al., 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco et al., 2003 Blood 102(4):1458-65)。有用な酵素的に活性な毒素には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、菌体外毒素 A 鎖 (緑濃菌由来)、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデクシン (modeccin) A 鎖、アルファールサルシン (sarcin)、オオアブラギリ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII および PAP-S)、ニガウリ (momordica charantia) 阻害剤、クルシン (curcin)、クロチン (crotonin)、サポナリア (saponaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン (gelonin)、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) およびトリコセセン (tricothecene) が含まれるが、これらに限定されるわけではない。例えば、PCT WO 93/21232 参照。本発明はさらに、本発明の抗体または Fc 融合体と核酸分解活性を有する化合物 (例えば、リボヌクレアーゼ、またはデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) などの DNA エンドヌクレアーゼ) との間で形成される結合体または融合体を企図している。

【0116】

別の実施態様では、本発明の抗体または Fc 融合体は、放射性同位元素に結合または機能し得るように連結し、放射性結合体を形成し得る。放射性結合体の抗体および Fc 融合体を産生するために、様々な放射活性同位元素が利用可能である。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} および Lu の放射性同位元素が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0117】

さらに他の実施態様では、本発明の抗体または Fc 融合体を、腫瘍の予標的化に利用するために、「受容体」(ストレプトアビジンなど) に結合させ得る。その場合、抗体-受容体または Fc 融合体-受容体結合体を患者に投与し、続いて除去剤 (clearing agent)

を使用して未結合の結合体を循環から除去し、その後、細胞傷害性物質（例えば、放射性ヌクレオチド）に結合した「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。別の実施態様では、抗体依存性酵素媒介プロドラッグ療法（ADEPT）を用いるために、抗体またはFc融合体を酵素に結合または機能し得るように連結させる。ADEPTは、抗体またはFc融合体を、プロドラッグ（例えば、ペプチド化学療法剤、PCT WO 81/01145参照）を活性な抗癌薬に変換するプロドラッグ活性化酵素に、結合または機能し得るように連結させることにより使用し得る。例えば、PCT WO 88/07378およびUS 4,975,278参照。ADEPTに有用な免疫結合体の酵素成分には、プロドラッグに対して、それをより活性の高い細胞傷害性形態に変換するようなやり方で作用する能力のある、いかなる酵素も含まれる。本発明の方法に有用な酵素には、ホスフェート含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；サルフェート含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なアリアルサルファターゼ；非毒性の5-フルオロシトシンを抗癌薬の5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用な、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシンなどのプロテアーゼ類、カルボキシペプチダーゼ類およびカテプシン類（カテプシンBおよびLなど）；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ類；グリコシル化プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用な、ベーターガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ（neuramimidase）などの炭水化物切断酵素；アルファラクタム類で誘導された薬物を遊離の薬物に変換するのに有用なベーターラクタマーゼ；および、アミン窒素でフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基により各々誘導体化された薬物を遊離の薬物に変換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼ類が含まれるが、これらに限定されるわけではない。あるいは、酵素活性を有する抗体（当分野で「抗体酵素」としても知られる）を、本発明のプロドラッグを遊離の活性な薬物に変換するのに使用できる（例えば、Massey, 1987, Nature 328: 457-458参照）。抗体-抗体酵素およびFc融合体-抗体酵素結合体は、腫瘍細胞群に抗体酵素を送達するために調製できる。本発明の抗体およびFc融合体の他の修飾が、本発明において企図されている。例えば、抗体またはFc融合体を、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーなどの、様々な非タンパク質性ポリマーの1つに連結させてもよい。

【0118】

本発明の抗体またはFc融合体および1またはそれ以上の治療的活性物質を製剤化した医薬組成物が企図されている。本発明の抗体およびFc融合体の製剤は、所望の純度を有する当該抗体またはFc融合体を、任意の医薬的に許容し得る担体、賦形剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980）と混合することにより、凍結乾燥製剤または水性溶液の形態で、保存用に調製する。許容し得る担体、賦形剤または安定化剤は、用いる用量および濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、アセテートおよび他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム（methonium）；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン類；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；およびm-クレゾールなど）；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などのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類および他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；甘味料および他の香味料；微結晶セルロース、ラクトース、トウモロコシおよび他のデンプンなどの増量剤；結合剤；添加物；着

色料；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／またはTWEEN^(商標)、PLURONICS^(商標)またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。好ましい実施態様では、本発明の抗体またはFc融合体を含む医薬組成物は、医薬的に許容し得る塩（これは、酸および塩基付加塩の両方を含む意味である）として存在するなど、水溶性形態である。「医薬的に許容し得る酸付加塩」は、遊離塩基の生物学的効力を保持する、生物学的または他の点で不都合ではない塩を表し、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸、および酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、蔞酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などの有機酸により形成されたものである。「医薬的に許容し得る塩基付加塩」には、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩などの、無機塩基から誘導されたものが含まれる。特に好ましいのは、アンモニウム、カリウム、ナトリウム、カルシウムおよびマグネシウム塩である。医薬的に許容し得る有機非毒性塩基から誘導される塩には、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミンおよびエタノールアミンなどの、第一級、第二級および第三級アミン類、天然産生置換アミン類を含む置換アミン類、環状アミン類および塩基性イオン交換樹脂が含まれる。インビボ投与に使用される製剤は、好ましくは無菌である。これは、滅菌濾過膜を通す濾過または他の方法により、容易に達成される。

【0119】

本明細書で開示される抗体およびFc融合体は、免疫リポソームとしても製剤し得る。リポソームは、哺乳動物に治療物質を送達するのに有用な、様々なタイプの脂質、リン脂質および／または界面活性剤を含む小胞である。抗体またはFc融合体を含むリポソームは、Epstein et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030; US 4,485,045; US 4,544,545; および PCT WO 97/38731に記載されているような、当分野で知られている方法により製造する。循環時間が延長されたリポソームは、US 5,013,556に開示されている。リポソームの成分は、生体膜の脂質配置と同様に、一般に二層形態で配置される。特に有用なリポソームは、逆相蒸発法により、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成を用いて生成させることができる。所望の直径を有するリポソームを得るために、リポソームを所定の孔サイズのフィルターを通して押し出す。化学療法剤または他の治療的に活性な物質を、場合によりリポソームに含有させる（Gabizon et al., 1989, J National Cancer Inst 81:1484）。

【0120】

抗体、Fc融合体および他の治療的に活性な物質は、コアセルベーション技法、界面重合（例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル、またはポリ（メチルメトアシレート（methylethylmethacrylate））マイクロカプセルを使用する）、コロイド性薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）およびマクロエマルジョンを含むがこれらに限定されない方法により調製されるマイクロカプセルに封入してもよい。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980に開示されている。持続放出製剤を調製してもよい。適する持続放出製剤の例には、固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、そのマトリックスは、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態である。持続放出マトリックスの例には、ポリエステル類、ヒドロゲル類（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（US 3,773,919）、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタミン酸塩のコポリマー、分解不能なエチレン-ビニルアセテート、LUPRON DEPOT^(商標)（これは、乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートで構成される注射可能ミクロスフェアである）などの分解可能な乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸およびProLease^(登録商標)（Alkerm

esから販売されている) (これは、ポリ-D L-ラクチド-コ-グリコリド (PLG) のマトリックスに組み込まれた所望の生体活性分子で構成されるミクロスフェアベースの送達系である) が含まれる。

【0121】

製剤中の治療的に活性な本発明の抗体またはFc融合体の濃度は、約0.1ないし100重量%で変動し得る。好ましい実施態様では、抗体またはFc融合体の濃度は、0.003ないし1.0モル濃度の範囲にある。患者を処置するために、治療的有効量の本発明の抗体またはFc融合体を投与し得る。「治療的有効量」は、本明細書では、それが投与される目的である効果を奏する用量を意味する。正確な用量は処置目的に依存し、既知の技法を使用して当業者により確認可能である。投薬量は、0.01ないし100mg/kg体重またはそれ以上の範囲で変動し得、例えば、0.1、1、10または50mg/kg体重であり、1ないし10mg/kgが好ましい。当分野で知られているように、抗体またはFc融合体の分解、全身対局所の送達、および新規プロテアーゼ合成の速度、並びに年齢、体重、全般的健康、性別、食事、投与時間、薬物の相互作用および症状の重篤さのために補正が必要なが

10

【0122】

好ましくは滅菌水性溶液の形態で本発明の抗体またはFc融合体を含む医薬組成物の投与は、経口、皮下、静脈内、鼻腔内、耳内 (intraotically)、経皮、局所 (例えば、ゲル、膏薬、ローション、クリームなど)、腹腔内、筋肉内、肺内 (例えば、Aradigmから販売されているAERx^(登録商標) 吸入技法、またはInhale Therapeuticsから販売されているInhance^(商標) 肺送達系)、腔内、非経腸、直腸または眼内を含むがこれらに限定されるわけではない、様々な方法で行い得る。いくつかの例では、例えば、創傷、炎症などの処置のために、抗体またはFc融合体を、液剤またはスプレーとして直接適用し得る。当分野で知られているように、医薬組成物は、導入様式に応じてしかるべく製剤し得る。

20

【0123】

工学処理方法

本発明は、Fc変異体を生成させるのに使用し得る工学処理方法を提供する。過去のFc工学処理の試みを妨げてきた主な障害は、部分的には、不十分な工学処理戦略および方法のために、そして抗体産生およびスクリーニングが低処理量である性質のために、修飾におけるランダムな試みしか可能ではなかったことである。本発明は、これらの短所を克服する工学処理方法に関する。様々な設計戦略、コンピューター処理スクリーニング方法、ライブラリー生成方法並びに実験的産生およびスクリーニング方法が企図されている。これらの戦略、アプローチ、技法および方法は、個別に、または様々な組合せで、最適化Fc変異体を工学処理するのに適用し得る。

30

【0124】

設計戦略

所望の特性について最適化されたFc変異体を生成させるための最も効率的なアプローチは、その目標に対して工学処理の努力を向けることである。従って、本発明は、最適化Fc変異体を工学処理するのに使用し得る設計戦略を教示する。設計戦略の使用は、Fc工学処理を先導することを意味するが、Fc変異体を工学処理に使用した設計戦略に基づく特定の最適化特性に制限することを意味しない。一見するとこれは直感に反すると思われるかもしれない；しかしながら、その妥当性は、タンパク質およびタンパク質-タンパク質複合体の構造、安定性、溶解性および機能を決定する微妙な相互作用の膨大な複雑さから演繹される。どのタンパク質の位置、残基、相互作用などが設計目標のために重要であるかを予想する努力をすることはできるが、しばしば決定的なものは予想できない。タンパク質の構造、安定性、溶解性および機能に対する効果は、好都合であろうと不都合であろうと、しばしば予見できない。そのうえ、タンパク質に不利益または有害な無数のアミノ酸修飾がある。従って、しばしば、工学処理への最良のアプローチは、概して設計目標に対して焦点を向けているが不利益な結果を引き起こさないタンパク質の生成によりもたらされる。このように、設計戦略の主な目的は、品質の多様性の生成であり得る。極度

40

50

に単純化されたレベルでは、これは勝ち目の積み重ねとみなすことができる。例として、下記のようなFcの炭水化物または特定のドメインドメイン角の動揺は、どのように炭水化物およびドメインドメイン角がFcの特性を決定しているかは、よくわかっていないにも関わらず、最適化Fc変異体を生成させるための妥当な設計戦略である。スクリーニングされる不利益なアミノ酸修飾の数を減らすことにより、即ち、品質多様性をスクリーニングすることにより、これらの設計戦略は実用的になる。従って、本発明で考えられている設計戦略の真の価値は、工学処理の努力を価値あるFc変異体の生成に向かわせる能力である。任意の得られる変異体の特異的価値は、実験後に決定される。

【0125】

Fc変異体の工学処理のためのある設計戦略を提供する。そこでは、FcといくつかのFcリガンドとの相互作用が、Fcと当該Fcリガンドとの接点でアミノ酸修飾を工学処理することにより、変更される。ここで、Fcリガンドには、FcγR類、C1q、FcRn、プロテインAまたはGなどが含まれるが、これらに限定されるわけではない。結合点に衝撃を与えるFc位置でエネルギー的に好都合な置換を探索することにより、新しい接点の高次構造を標本抽出する変異体を工学処理できる。そのいくつかはFcリガンドへの結合を改善し得、いくつかはFcリガンド結合を低減させ得、そしていくつかは他の好都合な特性を有し得る。このような新しい接点の高次構造は、例えば、接点を形成するFcリガンド残基との直接的相互作用、または側鎖もしくは骨格高次構造の動揺などのアミノ酸修飾に起因する間接的効果の結果であり得る。可変位置は、接点の高次構造の決定に重要な役割を果たすと考えられる任意の位置として選択し得る。例えば、可変位置は、Fcリガンドと直接接触する任意の残基から、ある距離内、例えば5オングストローム(Å)、好ましくは1ないし10Å、にある残基のセットとして選択し得る。

【0126】

Fc変異体の生成のためのさらなる設計戦略を提供する。そこでは、N297のFcの炭水化物の高次構造を最適化する。最適化は、この文脈で使用されるとき、所望の特性、例えば増大または低減されたFcγR親和性をもたらす、N297炭水化物における高次構造的変化および組成的変化を含む意味である。そのような戦略は、炭水化物の構造および高次構造が劇的にFc/FcγRおよびFc/C1q結合に影響するという観察により支持される(Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539-45547; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473)。しかしながら、炭水化物は、FcγR類と全く特異的に接触しない。炭水化物と相互作用する位置でエネルギー的に好都合な置換を探索することにより、新しい炭水化物高次構造を標本抽出する変異体の品質多様性を工学処理できる。そのいくつかは1またはそれ以上のFcリガンド類への結合を改善し得、いくつかは低減させ得る。Fc/炭水化物接点に近い変異の大部分が炭水化物高次構造を変化させるように見えるが、いくつかの変異は、グリコシレーションの組成を変化させると示された(Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。

【0127】

Fc変異体の生成のための他の設計戦略を提供する。そこでは、Cγ2とCγ3のドメイン間の角を最適化する。最適化は、この文脈で使用されるとき、所望の特性、例えば増大または低減されたFcγR親和性をもたらす、Cγ2-Cγ3ドメイン角における高次構造的変化を記述する意味である。この角は、Fc/FcγR親和性の重要な決定要因であり(Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483)、Fc/FcγR接点から遠位の数々の変異が、恐らくそれを調整することにより結合に影響を与える(Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604)。Cγ2-Cγ3角および相互に対するドメインの可撓性の決定に重要な役割を果たすと思われる位置でエネルギー的に好都合な置換を探索することにより、新しい角および可撓性レベルを標本抽出する変異体の品質多様性を設計できる。そのいくつかは、所望のFc特性について最適化されている。

【0128】

Fc変異体の生成のための他の設計戦略を提供する。そこでは、Fcを再工学処理して、グリコシレーションへの構造および機能的依存を排除する。この設計戦略は、N297炭水化物の非存在下での、Fcの構造、安定性、溶解性および／またはFcの機能（例えば、1またはそれ以上のFcリガンド類に対するFcの親和性）の最適化に参与する。あるアプローチでは、グリコシレーションの非存在下で溶媒に露出する位置を、それらが安定し、構造的にFc構造と一致し、凝集する傾向のないように工学処理する。Cy2は、抗体中で唯一の対にならないIgドメインである（図1参照）。従って、N297炭水化物は、通常なら他のIgドメインとのタンパク質-タンパク質相互作用の接点であったであろう露出した疎水性区画を覆い、Fcの安定性および構造的完全性を維持し、Cy2ドメインが中心軸を超えて凝集しないようにしている。非グリコシル化Fcを最適化するためのアプローチは、Cy2-Cy2二量体軸の内側を向く極性および／または荷電残基を取り込むことにより、および非グリコシル化Fc/FcyR接点または非グリコシル化Fcといくつかの他のFcリガンドとの接点を直接増強するアミノ酸修飾を設計することにより、非グリコシル化Fcの安定性および／または溶解性を増強するアミノ酸修飾を設計することに関与し得るが、これらに限定されるものではない。

10

【0129】

Fc変異体を工学処理するためのさらなる設計戦略を提供する。そこでは、Cy2ドメインの高次構造を最適化する。最適化は、この文脈で使用されるとき、所望の特性、例えば増大または低減されたFcγR親和性をもたらし、Cy2ドメイン角の高次構造の変化を記述する意味である。Cy2高次構造に衝撃を与えるCy2位置でエネルギー的に好都合な置換を探索することにより、新しいCy2高次構造を標本抽出する変異体の品質多様性を工学処理できる。そのいくつかは、設計目標を達成し得る。そのような新しいCy2高次構造は、例えば、変異体により標本抽出される代替的主鎖高次構造の結果であり得る。可変位置は、Cy2の構造、安定性、溶解性、可撓性、機能などに重要な役割を果たすと考えられる任意の位置として選択され得る。例えば、溶媒から部分的または完全に隔離されているCy2残基であるCy2の疎水性コア残基を、再工学処理し得る。あるいは、非コア残基、または主鎖の構造、安定性または可撓性に重要と思われる残基を考慮し得る。

20

【0130】

Fc最適化のためのさらなる設計戦略を提供する。そこでは、FcγR、補体、またはいくつかの他のFcリガンドへの結合を、Fcと当該Fcリガンドとの間の静電的相互作用を調整する修飾により変化させる。そのような修飾は、Fcの大域的静電的特徴の最適化と見なしてもよく、荷電アミノ酸による中性アミノ酸の置換、中性アミノ酸による荷電アミノ酸の置換、または反対の荷電のアミノ酸による荷電アミノ酸の置換（即ち、荷電の逆転）を含む。そのような修飾は、Fcと1またはそれ以上のFcリガンド類、例えばFcγR類との結合親和性の変化を実行するために使用し得る。好ましい実施態様では、静電的電位を計算するための様々な周知方法の1つを使用して、静電的置換が結合に影響し得る位置を選択する。最も簡潔な実施態様では、クーロンの法則を使用して、タンパク質中の位置の関数として静電的電位を生成させる。さらなる実施態様は、イオン強度の効果を計上するためにDebye-Huckelのスクーリングの使用を含み、より洗練された実施態様は、Poisson-Boltzmann計算などを含む。そのような静電的計算は、位置を強調し、設計目標を達成するための特異的アミノ酸修飾を示唆し得る。いくつかの場合では、これらの置換は、例えば、活性化FcγR類への結合を増強し、一方で阻害性FcγR類への結合親和性を減少させるというように、異なるFcリガンド類への結合に変化して影響し得ると予想され得る。

30

40

【0131】

コンピューター処理スクリーニング

価値あるFc変異体を得るための主な障害は、膨大な数の可能性から、どのアミノ酸修飾が所望の目標を達成するかを予測することの難しさである。実際に、過去のFc工学処

50

理の試みが有意な臨床的価値のあるFc変異体を産生するのに失敗してきた主な理由の一つは、Fc工学処理へのアプローチが今までは行き当たりばったりのアプローチを含んだことである。本発明は、定量的かつ系統的なFc変異体の工学処理を可能にするコンピューター処理スクリーニング方法を提供する。これらの方法は、典型的に、原子レベルのスコアリング (scoring) 関数、側鎖回転異性体サンプリング (sampling)、およびタンパク質の配列、構造および機能の間の関係を正確に捉える進歩した最適化方法を使用する。コンピューター処理スクリーニングは、生じる膨大な多様性のフィルタリング (filtering) により、標的位置での可能性のある配列空間全体の探索を可能にする。コンピューター処理によりスクリーニングされる変異体ライブラリーは、安定な、正しく折り畳まれた、機能的な配列を効果的に増やされており、所望の目標のための有効なFcの最適化を可能にする。タンパク質の構造、安定性、溶解性および機能に対する重複配列の制限のために、ライブラリー中の多数の候補は、「無駄な」配列空間を占める。例えば、配列空間の大部分が、折り畳まれない、誤って折り畳まれた、不完全に折り畳まれた、部分的に折り畳まれた、または凝集したタンパク質をコードする。これは、Fc工学処理に特に該当する。なぜなら、Igドメインは小さいベータシート構造であり、その工学処理は、極度に要求が厳しいと証明されたからである (Quinn et al., 1994, Proc Natl Acad Sci U S A 91:8747-8751; Richardson et al., 2002, Proc Natl Acad Sci U S A 99:2754-2759)。

ベータシートの表面上の無害に見える置換でさえ、激しいパッキング (packing) の矛盾をもたらすことができ、折り畳みの平衡を劇的に動揺させる (Smith et al., 1995, Science 270:980-982) ; ちなみに、アラニンは最悪のベータシート形成物の一つである (Minor et al., 1994, Nature 371:264-267) 。ベータシートの安定性および特異性の決定要因は、極度に多数の微妙な相互作用間の繊細なバランスである。コンピューター処理スクリーニングは、主として生産的な配列空間からなるライブラリーの生成を可能にし、結果的に所望の目標のために最適化されたタンパク質を同定する機会を増加させる。事実上、コンピューター処理スクリーニングは、当たりの割合を高め、それにより実験的にスクリーニングしなければならない変異体の数を減らす。Fc工学処理へのさらなる障害は、相関または共役する変異を有効に設計する必要性である。例えば、今までに観察された最大のFc/FcγR親和性増強は、アラニンスキャンで別々に得られた3つの良好な結合物を組合せて得られたS298A/E333A/K334Aである (Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604) 。コンピューター処理スクリーニングは、このような3倍の変異体を、3回の別々の実験ではなく1回の実験で生成させる能力があり、さらにそれらの位置で、アラニンだけではなく20個全部のアミノ酸の官能基を試験することができる。コンピューター処理スクリーニングは、組合せの問題を実験的に扱いやすいサイズに縮小することにより、このような複雑さに対処する。

【0132】

コンピューター処理スクリーニングには、概観すると、4つの段階がある：1) タンパク質鑄型構造または複数の構造の選択と調製、2) 可変位置、これらの位置で考慮されるべきアミノ酸の選択、および/または考慮されるアミノ酸をモデル化する回転異性体の選択、3) エネルギー計算、および4) 組合せの最適化。より詳しくは、コンピューター処理スクリーニングのプロセスは、以下の通りに記述できる。タンパク質の三次元構造を出発点として使用する。最適化すべき位置を同定する。それは、タンパク質配列であっても、そのサブセット (複数も可) であってもよい。各位置で考慮されるであろうアミノ酸を選択する。好ましい実施態様では、各々の考慮されるアミノ酸は、回転異性体と呼ばれる許される高次構造の独立したセットにより表され得る。各々の考慮されるアミノ酸および各々の他の考慮されるアミノ酸、およびタンパク質主鎖と不変残基を含むタンパク質の残りの部分の間で、相互作用エネルギーを計算する。好ましい実施態様では、各々の考慮されるアミノ酸側鎖回転異性体および各々の他の考慮されるアミノ酸側鎖回転異性体、およびタンパク質主鎖と不変残基を含むタンパク質の残りの部分の間で相互作用エネルギーを計算する。次いで、1またはそれ以上の組合せ検索アルゴリズムを使用して、最低エネルギー配列および/または低エネルギー配列を同定する。

【0133】

好ましい実施態様では、使用するコンピューター処理スクリーニング方法は、実質的に Protein Design Automation^(登録商標) (PDA^(登録商標)) 技法に類似する。それは、US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; US SN 09/782,004; US SN 09/927,790; US SN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 に記載の通りである。他の好ましい実施態様では、実質的に Sequence Prediction Algorithm^(商標) (SPA^(商標)) 技法に類似するコンピューター処理スクリーニング方法を使用する。それは、(Raha et al., 2000, Protein Sci 9:1106-1119)、US SN 09/877,695 および US SN 10/071,859 に記載の通りである。他の好ましい実施態様では、2003年3月3日に出願された、「抗体最適化」と題する US SN 10/339788 に記載のコンピューター処理スクリーニング方法を使用する。いくつかの実施態様では、PDA^(登録商標) 技法と SPA^(商標) 技法の組合せ、並びに他の設計手段と組み合わせたこれらのコンピューター処理方法の組合せを含む、異なるコンピューター処理スクリーニング方法の組合せを使用する。同様に、これらのコンピューター処理方法は、同時または連続的に、いかなる順序でも使用できる。

【0134】

コンピューター処理スクリーニング計算へのインプット (input) として、鑄型構造を使用する。「鑄型構造」は、本明細書において、最適化すべきタンパク質の一部または全部の構造座標を意味する。鑄型構造は、三次元構造 (つまり、タンパク質の原子のセットの三次元座標) が知られているか、または計算、評価、モデル化、生成もしくは決定し得るいかなるタンパク質でもあり得る。タンパク質の三次元構造は、X線結晶構造解析技法、核磁気共鳴 (NMR) 技法、新規モデリングおよび相同性モデリングを含むがこれらに限定されるものではない方法を使用して決定し得る。構造が実験的に解明されていないタンパク質について最適化が望まれる場合、コンピューター処理スクリーニング計算の鑄型として役立ち得る適当な構造モデルを生成させてもよい。タンパク質の相同性モデルの生成方法は、当分野で知られており、これらの方法は、本発明において用途を見出す。例えば、Luo, et al. 2002, Protein Sci 11: 1218-1226, Lehmann & Wyss, 2001, Curr Opin Biotechnol 12(4) :371-5.; Lehmann et al., 2000, Biochim Biophys Acta 1543(2) :408-415; Rath & Davidson, 2000, Protein Sci, 9(12) :2457-69; Lehmann et al., 2000, Protein Eng 13(1) :49-57; Desjarlais & Berg, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90(6) :2256-60; Desjarlais & Berg, 1992, Proteins 12(2) :101-4; Henikoff & Henikoff, 2000, Adv Protein Chem 54:73-97; Henikoff & Henikoff, 1994, J Mol Biol 243(4) :574-8; Morea et al., 2000, Methods 20:267-269 参照。タンパク質/タンパク質複合体は、ドッキング (docking) 方法を使用しても得られる。鑄型構造として役立ち得るタンパク質構造には、the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, 以前は the Brookhaven National Lab) により編集および提供される the Protein Data Base に見出されるもの全てが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0135】

鑄型構造は、天然にあるか、または工学処理されたタンパク質のものであり得る。鑄型構造は、任意の生物に由来するタンパク質により実質的にコードされるタンパク質のものであり得、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルが好ましい。鑄型構造は、何個のタンパク質構造形態を含んでもよい。好ましい実施態様では、鑄型構造は、Fc 領域または Fc のドメインもしくはフラグメントを含む。別の好ましい実施態様では、鑄型構造は、1 またはそれ以上の Fc リガンドに結合した Fc または Fc のドメインもしくはフラグメントを含み、Fc/FcγR 複合体が好ましい。鑄型構造中の Fc は、グリコシル化されていてもグリコシル化されていなくてもよい。鑄型構造は、1 本以上のタンパク質鎖を含み得る。鑄型構造は、低分子、基質、補因子、金属、水分子、補欠分子族、ポリマーおよび炭水化物を含むがこれらに限定されるものではない、非タンパク質成分をさらに含んでもよい。好ましい実施態様では、鑄型構造は、複数またはセットの鑄型タンパク質、例え

ば、NMRから得られたものなどの構造の集合である。あるいは、関連タンパク質または構造のセット、または人工的に創生された集合から、鑄型構造のセットを生成させる。鑄型構造の組成および供給源は、工学処理の目標に依存する。例えば、ヒトFc/FcγR親和性の増強のために、ヒトFc/FcγR複合体構造またはその派生物を鑄型構造として使用し得る。あるいは、複合体化していないFc構造を鑄型構造として使用し得る。目標がヒトFcのマウスFcγRへの親和性を増強することであれば、鑄型構造は、マウスFcγRに結合したヒトFcの構造またはモデルであり得る。

【0136】

鑄型構造は、設計計算に先立ち修飾または変更し得る。様々な鑄型構造調製方法が、US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 09/877,695; USSN 10/071,859; USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588に記載されている。例えば、好ましい実施態様では、明らかな水素が構造内に含まれていなければ、加えてもよい。別の実施態様では、構造のエネルギー最小化を行って、ファンデルワールスの不調和、不都合な結合角、および不都合な結合の長さ起因するひずみを含むひずみを緩和する。あるいは、方向付けられた、またはランダムな動揺を含む他の方法を使用して、例えば手動で、鑄型構造を変更する。エネルギー計算および組合せの最適化を含むコンピューター処理スクリーニングの後の段階の間に、鑄型構造を修飾することも可能である。別の実施態様では、コンピューター処理スクリーニング計算の前または間に鑄型構造を修飾しない。

【0137】

一度鑄型構造を得たら、可変位置を選択する。「可変位置」は、本明細書では、アミノ酸本体がコンピューター処理スクリーニング計算において変更を許される位置を意味する。当分野で知られているように、ある可変位置でのみ考慮されるべきアミノ酸修飾を許可することは、計算の複雑さを低下させ、コンピューター処理スクリーニングをより直接的に設計目標に合わせることを可能にする。1またはそれ以上の残基が、コンピューター処理スクリーニング計算において可変位置であり得る。可変位置として選択される位置は、最適化しようとするタンパク質の特性、例えば、FcのFcγRへの親和性、Fcの安定性、Fcの溶解性など、に寄与するか、寄与すると仮定されるものであり得る。可変位置の残基は、特定のタンパク質特性に好都合または不都合に寄与し得る。例えば、Fc/FcγR接点の残基は結合の媒介に関与し得、従って、この位置は、Fc/FcγR親和性の改善を目的とする設計計算において変動させ得る。他の例として、露出した疎水性側鎖を有する残基は、不都合な凝集を引き起こす原因となり得るので、この位置は、溶解性の改善を目的とする設計計算において変動させ得る。可変位置は、特定のタンパク質特性の決定要因である相互作用に直接関与する位置であり得る。例えば、FcのFcγR結合部位は、その特定のFcγRに接触する全残基を含むと定義し得る。「接触」は、本明細書では、少なくともFc残基の1原子と、少なくとも結合したFcγRの1原子との間の、いくつかの化学的相互作用を意味し、化学的相互作用には、ファンデルワールス相互作用、水素結合相互作用、静電的相互作用および疎水性相互作用が含まれるがこれらに限定されるわけではない。別の実施態様では、可変位置は、タンパク質の特性に間接的に関与する位置を含み得る。即ち、そのような位置は、Fcの特性に寄与すると知られているかまたは仮定される残基の近傍にあり得る。例えば、FcのFcγR結合部位は、FcγRとファンデルワールス接触にある任意のFc残基から一定の距離、例えば4-10 Åにある、全Fc残基を含むと定義し得る。従って、この場合の可変位置は、FcγRと直接接触する残基としてだけでなく、FcγRと接触する残基に接触し、故に間接的に結合に影響を及ぼすものとしても選択し得る。選択される特定の位置は、採用されている設計戦略に依存する。

【0138】

可変ではない鑄型構造中の1またはそれ以上の位置を、浮動させ得る。「浮動位置」は

、本明細書では、コンピューター処理スクリーニング計算において、アミノ酸高次構造の変動を許されるが、アミノ酸本体の変動を許されない位置を意味する。ある実施態様では、浮動位置は、親のアミノ酸本体を有する。例えば、浮動位置は、可変位置残基の近距離、例えば5 Åの内にいる位置であり得る。別の実施態様では、浮動位置は、親のアミノ酸本体ではないものを有し得る。そのような実施態様は、本発明において、例えば、目標が特定の変異のエネルギーまたは構造的成果を評価することであるときに、用途を見出し得る。

【0139】

可変でも浮動でもない位置は、固定される。「固定位置」は、本明細書では、アミノ酸本体および高次構造がコンピューター処理スクリーニング計算において一定に保持される位置を意味する。固定し得る位置には、最適化しようとする特性に関与しないと知られているか、または仮定されている残基が含まれる。この場合、これらの位置を変動させることにより、殆どまたは全く得るものがないと仮定している。固定される位置には、その残基が正しい折り畳み、構造、安定性、溶解性および／または生物学的機能の維持に重要であると知られているか、または仮定されている位置も含まれる。例えば、Fcリガンドへの結合および正しいグリコシレーションが確実に乱されないようにするために、各々、特定のFcリガンドと相互作用する残基、またはグリコシレーション部位をコードする残基について、位置を固定し得る。同様に、安定性が最適化されているならば、結合が乱されないように、Fcリガンド、例えばFcγR、と直接または間接的に相互作用する位置を固定するのが有利であり得る。固定位置には、ジスルフィド架橋に関与するシステインなどの構造的に重要な残基、プロリンまたはグリシンなどの主鎖高次構造の決定に不可欠な残基、不可欠な水素結合残基および好都合なパッキング相互作用を形成する残基も含まれ得る。

【0140】

コンピューター処理スクリーニングの次の段階は、各々の特定の可変位置で考慮される可能なアミノ酸本体のセットを選択することである。この可能なアミノ酸のセットを、本明細書では、可変位置で「考慮されるアミノ酸」と呼ぶ。「アミノ酸」は、ここで使用されるとき、天然の20個のアミノ酸および任意の非天然または合成類似体のセットを表す。ある実施態様では、20個の天然アミノ酸全部が考慮される。あるいは、アミノ酸のサブセット、または1つだけのアミノ酸を所定の可変位置で考慮する。当業者にわかるように、検索の組合せの複雑さを減ずるので、ある一定のアミノ酸本体のみを可変位置で考慮することにコンピューター処理上の利益がある。さらに、ある一定のアミノ酸本体のみを可変位置で考慮することは、計算を特定の設計戦略の目標に合わせるために使用し得る。例えば、非グリコシル化Fcの溶解性の最適化のために、炭水化物の非存在下で溶媒に露出する非極性Fc残基で極性アミノ酸のみを考慮するようにすることは、有利であろう。合成アミノ酸および天然アミノ酸の類似体を含む非天然アミノ酸も、考慮されるアミノ酸であり得る。例えば、Chin et al., 2003, Science, 301(5635):964-7; and Chin et al., 2003, Chem Biol.10(6):511-9 参照。

【0141】

どのアミノ酸が各位置で考慮されるかを選択するのに、広く様々な方法を単独でまたは組み合わせて使用し得る。例えば、所定の可変位置で考慮されるアミノ酸のセットを、溶媒への露出度に基づいて選択し得る。疎水性または非極性アミノ酸は、典型的に、溶媒に接近不可能であるかまたは殆ど接近不可能であるタンパク質の内側またはコアに存在する。従って、可変コア位置では、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびメチオニンなどの非極性アミノ酸のみを、またはこれらを主として考慮するのが有利であり得る。親水性または極性アミノ酸は、典型的に、かなりの度合いの溶媒接近可能性を有するタンパク質の外側または表面に存在する。従って、可変表面位置では、アラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、リジンおよびヒスチジンなどの極性アミノ酸のみを、またはこれらを主として考慮するのが有利であり得る。いくつかの位置は、

部分的に露出しかつ部分的に埋まっており、明確にタンパク質コアまたは表面の位置ではなく、ある意味ではコアと表面の残基間の境界残基としてはたらく。従って、そのような可変境界位置では、アラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびメチオニンなどの、非極性および極性のアミノ酸の両方を考慮するのが有利であり得る。可変位置での溶媒露出度の判定は、タンパク質構造生物学の当業者による鑄型構造の主観的評価または視覚的検査によってもよく、または当分野で知られる様々なアルゴリズムの使用によってもよい。可変位置で考慮されるべきアミノ酸タイプの選択は、US 6,188,965; 6,269,312; US 6,403,312; US SN 09/782,004; US SN 09/927,790; US SN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 に概説されているように、溶媒接近可能領域の計算などのコンピューター処理方法により、または溶媒接近可能表面に対する α -C β ベクトルの向きを評定するアルゴリズムを使用して、補助するか、または全面的に決定し得る。ある実施態様では、コア、表面または境界位置、またはコア、表面または境界と実質的に類似する分類として、各可変位置を明確に分類し得る。

【0142】

別の実施態様では、可変位置で許されるアミノ酸のセットの選択は、仮説由来であり得る。どのアミノ酸タイプを可変位置で考慮すべきかについての仮説は、タンパク質構造生物学の当業者による鑄型構造の主観的評価または視覚的検査により導かれ得る。例えば、水素結合相互作用がある可変位置で好都合であると推測されたら、たとえその位置がコアにあっても、水素結合を形成する能力のある極性残基を考慮し得る。同様に、疎水性パッキング相互作用がある可変位置で好都合であると推測されたら、たとえその位置が表面にあっても、好都合なパッキング相互作用を形成する能力のある非極性残基を考慮し得る。仮説由来アプローチの他の例は、主鎖の可撓性またはタンパク質の折り畳みの問題に関与し得る。当分野で知られているように、ある種の残基、例えば、プロリン、グリシンおよびシステインは、タンパク質の構造と安定性に重要な役割を果たす。グリシンは、他の全アミノ酸よりも高い主鎖可撓性を可能にし、プロリンは他の全アミノ酸よりも主鎖を制限し、システインは、ジスルフィド結合を形成し得る。従って、所望の設計目標を達成するために、1 またはそれ以上のこれらのアミノ酸タイプを含めることは有利であり得る。あるいは、1 またはそれ以上のこれらのアミノ酸タイプを考慮されるアミノ酸のリストから排除するのが有利であり得る。

【0143】

別の実施態様では、保護範囲 (coverage) を最大にするためにアミノ酸のサブセットを選択し得る。この場合、鑄型構造のものと類似の特性を有するさらなるアミノ酸を可変位置で考慮し得る。例えば、鑄型構造中の可変位置の残基が大型疎水性残基であるならば、さらなる大型疎水性アミノ酸をその位置で考慮し得る。あるいは、多様性を最大にするためにアミノ酸のサブセットを選択し得る。この場合、鑄型構造のものと類似しない特性を有するさらなるアミノ酸を可変位置で考慮し得る。例えば、鑄型中の可変位置の残基が大型疎水性残基であるならば、小型、極性などのアミノ酸を考慮し得る。

【0144】

当分野で知られているように、いくつかのコンピューター処理スクリーニング方法は、考慮されるアミノ酸本体のみが設計計算中に決定されることを必要とする。つまり、アミノ酸側鎖の高次構造または可能な高次構造に関する情報は必要とされない。他の好ましい方法は、回転異性体と呼ばれる、独立した側鎖高次構造のセットを利用し、それは各アミノ酸について考慮される。従って、回転異性体のセットを各可変または浮動位置で考慮し得る。回転異性体は、発表されている回転異性体ライブラリーから得られる (例えば, Lovel et al., 2000, Proteins: Structure Function and Genetics 40:389-408; Dunbrack & Cohen, 1997, Protein Science 6:1661-1681; DeMaeyer et al., 1997, Folding and Design 2:53-66; Tuffery et al., 1991, J Biomol Struct Dyn 8:1267-1289, Ponder &

Richards, 1987, J Mol Biol 193:775-791 参照)。当分野で知られているように、回転異性体ライブラリーは、主鎖非依存性または主鎖依存性であり得る。回転異性体は、分子メカニズムから、または非経験的 (ab initio) 計算から、そして他の方法を使用して、入手してもよい。好ましい実施態様では、可撓性回転異性体モデルを使用する (Mendes et al., 1999, Proteins: Structure, Function, and Genetics 37:530-543参照)。同様に、人工的に生成させた回転異性体を使用し得るか、またはそれにより各アミノ酸および／または可変位置について選択されたセットを拡大し得る。ある実施態様では、現在低エネルギーである少なくとも1つの高次構造を、回転異性体のリストに含める。別の実施態様では、鋳型構造中の可変位置残基の回転異性体を、その可変位置に許される回転異性体のリストに含める。別の実施態様では、可変位置で考慮される各アミノ酸本体のみを与え、各アミノ酸の特定の高次構造状態を設計計算中に使用しない。つまり、回転異性体の使用は、コンピューター処理スクリーニングに必須ではない。

10

【0145】

可変位置の選択および／または可変位置で考慮されるアミノ酸の選択を先導するために、実験的情報を使用し得る。当分野で知られているように、タンパク質の構造および機能におけるある一定の残基の役割、例えば、どのタンパク質残基が安定性の決定に役割を果たすか、またはどの残基がタンパク質-タンパク質相互作用の接点を形成するか、を決定するために、変異誘発実験がしばしば実行される。このような実験から得られるデータは、本発明で有用である。例えば、Fc/FcγR親和性増強のための可変位置は、変異により結合に影響することが示された全ての位置の変動に関与し得る。同様に、そのような実験の結果を、可変位置で許されるアミノ酸タイプの選択を先導するのに使用し得る。例えば、ある種のタイプのアミノ酸置換が好都合であると判明したら、これらのアミノ酸と同様のタイプを考慮し得る。ある実施態様では、好都合であると実験的に判明したものと類似の特性を有するさらなるアミノ酸を可変位置で考慮し得る。例えば、Fc/FcγR接点における可変位置での大型疎水性残基への実験的変異が好都合であると判明したなら、使用者はコンピューター処理スクリーニングにおいてその位置でさらなる大型疎水性アミノ酸を含めることを選択し得る。当分野で知られているように、ディスプレイおよび他の選択技法をランダムな変異誘発と組合せて、選択された特性に好都合なアミノ酸置換のリストまたは複数のリストを生成させ得る。このような実験作業から得られたかかるリストまたは複数のリストは、本発明に用途を見出す。例えば、そのような実験で可変ではないと判明した位置を、コンピューター処理スクリーニング計算における可変位置として除外し得、一方、より変異を許容しやすいか、または変異に好都合に応答すると判明した位置を、可変位置として選択し得る。同様に、そのような実験の結果を、可変位置で許されるアミノ酸タイプの選択を先導するのに使用し得る。例えば、ある種のタイプのアミノ酸が実験的選択においてより頻繁に現れるならば、それらのアミノ酸と同様のタイプを考慮し得る。ある実施態様では、好都合であると実験的に判明したものに類似する特性を有するさらなるアミノ酸を、可変位置で考慮し得る。例えば、Fc/FcγR接点に存在する可変位置で選択された変異が非荷電極性アミノ酸であると判明したら、使用者は、さらなる非荷電極性アミノ酸、または恐らく荷電極性アミノ酸を、その位置で含めることを選択し得る。

20

30

40

【0146】

可変位置の選択および／または可変位置で考慮されるアミノ酸の選択を先導するために、配列情報も使用し得る。当分野で知られているように、いくつかのタンパク質は、共通の構造骨格を共有し、配列において相同である。この情報は、タンパク質ファミリーにおける特定の位置への洞察を得るのに使用し得る。当分野で知られているように、どのタンパク質残基が保存され、どれが保存されていないかを決定するために、しばしば配列アライメントが実行される。言い換えれば、タンパク質配列のアラインメントを比較または対比することにより、ある位置での可変性の度合いを観察し得、各位置で天然に生じるアミノ酸のタイプを観察し得る。かかる分析から得られるデータは、本発明で有用である。可変位置および可変位置で考慮されるアミノ酸の選択に配列情報を使用する有利さは、数倍

50

である。可変位置の選択のために配列情報を使用する主たる利点は、どの位置が変異により寛容であり、どれがあまり寛容ではないかに対して洞察を獲得し得ることである。従って、配列情報は、品質多様性、即ち、タンパク質の構造、安定性などに有害ではない変異が、コンピューター処理的に確実に標本抽出されることを補助し得る。同じ利点が、可変位置で考慮されるアミノ酸タイプを選択するための配列情報の使用に適用される。つまり、タンパク質配列アラインメント中で生じるアミノ酸のセットは、進化により予めスクリーニングされて、タンパク質の構造、安定性、溶解性、機能などに合致する機会をランダムよりも多く有すると見なし得る。従って、より高い品質多様性がコンピューター処理的に標本抽出される。可変位置で考慮されるアミノ酸タイプの選択に配列情報を使用する第2の利益は、ある種のアラインメントがランダム配列よりも低免疫原性であり得る配列を表し得ることである。例えば、所定の可変位置で考慮されるアミノ酸が、ヒトタンパク質配列のアラインメントにおいてその位置で生じるアミノ酸のセットであるならば、それらのアミノ酸は、最適化タンパク質がヒトの治療剤として使用される場合、免疫反応を起こさないか、または低い免疫反応を起こすように、自然により予めスクリーニングされていると見なし得る。

【0147】

配列の供給源は、広範囲にわたってよく、1またはそれ以上の既知のデータベースを含み得る。それには、the Kabat データベース (Johnson & Wu, 2001, Nucleic Acids Res 29:205-206; Johnson & Wu, 2000, Nucleic Acids Res 28:214-218)、the IMGT データベース (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system^(登録商標); Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res 27:209-212; Ruiz et al., 2000 Nucleic Acids Res. 28:219-221; Lefranc et al., 2001, Nucleic Acids Res 29:207-209; Lefranc et al., 2003, Nucleic Acids Res 31:307-310)、および VBASE、SwissProt、GenBank および Entrez、および EMBL Nucleotide Sequence Database が含まれる。哺乳動物を含むがこれに限定されない任意の生物に由来する天然産生タンパク質の配列アラインメントから、タンパク質配列情報を入手、編集および／または生成できる。私的に編集されたデータベースからタンパク質配列情報を得ることができる。膨大な配列をベースとするアラインメントプログラムおよび方法が当分野で知られており、これらの全ては、Fc および Fcγ リガンド類を含むタンパク質の配列アラインメントの生成のために、本発明において用途を見出す。

【0148】

一度アラインメントを作成したら、可変位置の選択を先導するために配列情報を使用できる。そのような配列情報は、所定の位置の可変性（天然であろうとそれ以外であろうと）に関連付けることができる。ここで、可変性は、可変位置とは区別されるべきである。可変性は、配列アラインメント中の所定の位置が、そこで生じるアミノ酸のタイプの変動を示す度合いを表す。繰り返しになるが、可変位置は、コンピューター処理スクリーニング計算においてアミノ酸本体を変化させるように使用者により選択される位置である。可変性は、生物情報学の当業者により定性的に決定され得る。当分野で知られる可変性を定量的に決定する方法もあり、それは本発明で用途を見出し得る。最も好ましい実施態様は、情報エントロピー (Information Entropy) またはシャロンエントロピー (Shannon Entropy) を測定する。可変位置は、密接に関連するタンパク質配列またはあまり密接に関連しない配列から得られる配列情報に基づいて選択できる。

【0149】

可変位置を選択するための配列情報の使用は、本発明において広範な用途を見出す。例えば、鋳型構造中の Fc/Fcγ R 接点の位置がトリプトファンであり、トリプトファンがアラインメント中で配列の 90% より多くその位置で観察されるならば、その位置を固定しておくのが有利であり得る。対照的に、他の接点位置がより高いレベルの可変性を有すると判明したら、例えば、5 個の異なるアミノ酸が各々約 20% の頻度でその位置で観察されたら、その位置は可変位置として選択し得る。他の実施態様では、整列させたタンパク質配列の視覚的検査は、タンパク質構造の視覚的検査に代わり得るか、またはそれを

補助し得る。配列情報は、可変位置で考慮されるアミノ酸の選択を先導するのにも使用できる。そのような配列情報は、所定の位置でどれくらい頻繁にアミノ酸、複数のアミノ酸またはアミノ酸のタイプ（例えば、極性または非極性、荷電または非荷電）が、天然またはそれ以外に生じるかに関連付けることができる。ある実施態様では、可変位置で考慮されるアミノ酸のセットは、アラインメントにおいてその位置で観察されるアミノ酸のセットを含み得る。従って、位置特異的アラインメント情報を、コンピューター処理スクリーニング計算において可変位置で考慮されるアミノ酸のリストの生成に直接使用する。そのような戦略は当分野で周知である；例えば、Lehmann & Wyss, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12(4) :371-5 ; Lehmann et al., 2000, *Biochim Biophys Acta* 1543(2) :408-415 ; Rath & Davidson, 2000, *Protein Sci*, 9(12) :2457-69 ; Lehmann et al., 2000, *Protein Eng* 13(1) :49-57 ; Desjarlais & Berg, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6) :2256-60 ; Desjarlais & Berg, 1992, *Protein s* 12(2) :101-4 ; Henikoff & Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54:73-97 ; Henikoff & Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243(4) :574-8 参照。別の実施態様では、可変位置または複数の位置で考慮されるアミノ酸のセットは、アラインメント中で最も頻繁に観察されるアミノ酸のセットを含み得る。従って、そのアミノ酸またはアミノ酸タイプの頻度が、それを可変位置で考慮されるアミノ酸のセットに含めることを正当化するか否かを決定するのに、ある一定の基準が適用される。当分野で知られているように、アラインメント中の任意の位置の配列多様性およびある位置での各アミノ酸の存在頻度または確率を計算する統計的方法を使用して、配列アラインメントを分析し得る。次いで、そのようなデータを、どのアミノ酸タイプを考慮するかを決定するのに使用し得る。最も簡潔な実施態様では、これらの存在頻度は、あるアラインメント位置であるアミノ酸が観察される回数を計数し、次いでアラインメント中の配列の総数で割ることにより計算される。他の実施態様では、計数手法に対する各配列、位置またはアミノ酸の寄与に、様々な可能なメカニズムにより重みを付ける。好ましい実施態様では、頻度の統計への各整列配列の寄与に、アラインメント中の他の配列と比較した多様性の重みに従って重みを付ける。これを達成するための一般的な戦略は、Henikoff および Henikoff により推奨される配列重み付けシステムである (Henikoff & Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54:73-97 ; Henikoff & Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243:574-8)。好ましい実施態様では、統計への各配列の寄与は、その標的配列、即ち、使用される鋳型構造、への類似性の程度に依存し、標的配列に高い類似性を有する配列は、より高く重みを付けられるようにする。類似性測定の例には、配列同一性、B L O S U M類似性スコア、P A Mマトリックス類似性スコア、およびB L A S Tスコアが含まれるが、これらに限定されるものではない。別の実施態様では、統計への各配列の寄与は、その既知の物理的または機能的特性に依存する。これらの特性には、熱的および化学的安定性、活性への寄与および溶解性が含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、非グリコシル化Fcを溶解性について最適化するとき、最も安定であると知られているアラインメント中の配列（例えば、Ewert et al., 2003, *J Mol Biol* 325:531-553 参照）は、計算される頻度により重く寄与するであろう。

【0150】

可変位置で考慮されるべき配列アラインメント中のアミノ酸のセットの選択にどのような基準を適用するかに関わらず、考慮されるアミノ酸の選択に配列情報を使用することは、本発明において広範な用途を見出す。例えば、露出した非極性表面残基を置き換えることによりFc溶解性を最適化するために、考慮されるアミノ酸は、タンパク質配列のアラインメントにおいてその位置で観察されるアミノ酸のセット、またはいくつかの基準に合うそれらのアミノ酸のサブセットとして選択し得る。他の例として、保護範囲を最大にするために、配列アラインメントから導かれたアミノ酸のリストに、1またはそれ以上のアミノ酸を主観的に加えるか、または除外し得る。例えば、配列アラインメント中に見出されるものと類似の特性を有するさらなるアミノ酸を、可変位置で考慮し得る。例えば、FcγRに結合すると知られているか、または仮定されるFc位置が、配列アラインメント中で非荷電極性アミノ酸を有すると観察されたら、使用者は、コンピューター処理スクリ

ーニング計算において、その位置でさらなる非荷電極性アミノ酸、または恐らく荷電極性アミノ酸を含めることを選択し得る。

【0151】

ある実施態様では、配列アラインメント情報を、後で論ずるエネルギー計算と組み合わせる。例えば、偽のエネルギーを配列情報から導き、スコアリング関数を生成させる。配列をベースとするスコアリング関数の使用は、計算の複雑さをかなり低減させるのを助け得る。しかしながら、当業者にはわかるように、配列情報は、実際は構造的に矛盾していることがある変異間の相関への誤指示をしばしば示すので、配列をベースとするスコアリング関数単独の使用は、不適切なことがある。従って、好ましい実施態様では、構造をベースとするエネルギー計算方法を、単独でまたは配列をベースとするスコアリング関数と組み合わせて使用する。つまり、好ましい実施態様は、分析段階として配列アラインメント情報単独を当てにしない。

10

【0152】

エネルギー計算は、アミノ酸修飾をスコアリングするプロセスを表す。相互作用のエネルギーは、1またはそれ以上のスコアリング関数により測定される。様々なスコアリング関数が、エネルギー計算のために本発明において用途を見出す。スコアリング関数は、ファンデルワールスポテンシャル、水素結合ポテンシャル、原子溶媒和ポテンシャルまたは他の溶媒和モデル、二次構造的向ポテンシャル、静電的ポテンシャル、ねじれポテンシャルおよびエントロピーポテンシャルを含むがこれらに限定されるものではない何個のポテンシャル（スコアリング関数のエネルギー項として本明細書において言及される）を含んでもよい。少なくとも1つのエネルギー項を使用して各可変または浮動位置をスコアリングするが、エネルギー項は、位置、考慮されるアミノ酸および他の検討事項に応じて異なり得る。ある実施態様では、1つのエネルギー項を使用するスコアリング関数を使用する。最も好ましい実施態様では、1より多いエネルギー項を含むスコアリング関数を使用して、例えば、ファンデルワールス、溶媒和、静電気および水素結合相互作用、およびこれらの組合せを記述して、エネルギーを計算する。さらなる実施態様では、さらなるエネルギー項には、エントロピー項、ねじれエネルギーおよび知識をベースとするエネルギーが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

20

【0153】

様々なスコアリング関数が、US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; US SN 09/782,004; US SN 09/927,790; US SN 09/877,695; US SN 10/071,859; US SN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 に記載されている。当業者にはわかるように、スコアリング関数は、物理化学的エネルギーの項に限定される必要はない。例えば、知識をベースとするポテンシャルは、本発明のコンピューター処理スクリーニング方法論において用途を見出し得る。そのような知識をベースとするポテンシャルは、スレッディング (threading) ポテンシャル、参照エネルギー、偽エネルギー、相同性をベースとするエネルギーおよび配列アラインメントから導かれた配列の偏重を含むがこれらに限定されるものではない、タンパク質配列および/または構造の統計から導かれ得る。好ましい実施態様では、MHC (主要組織適合複合体) へのペプチドの結合に関するデータから導かれた関数などの、免疫原性のモデルを含むようにスコアリング関数を修飾し、それを免疫原性の可能性のある配列の同定に使用し得る (例えば、US SN 09/903,378; US SN 10/039,170; US SN 60/222,697; US SN 10/339788; PCT WO 01/21823; および PCT WO 02/00165 参照)。ある実施態様では、アミノ酸置換をスコアリングするのに、配列アラインメント情報を使用できる。例えば、タンパク質配列の比較は、当該タンパク質の供給源がヒト、サル、マウスまたは他のもののいずれであっても、本発明のコンピューター処理スクリーニング方法論においてアミノ酸変異を示唆またはスコアリングするのに使用し得る。ある実施態様では、当分野で知られているように、1またはそれ以上のスコアリング関数を、コンピューター処理分析中に最適化または「

30

40

50

錬成」し、その後最適化システムを使用して分析を再実行し得る。そのような変更されたスコアリング関数は、例えば、実験データを使用してスコアリング関数を錬成することにより得られる。当業者にはわかるように、1またはそれ以上のエネルギー項からなる数々の力場は、スコアリング関数として役立ち得る。力場には、非経験的または量子力学の力場、半経験的力場および分子力学の力場が含まれるが、これらに限定されるわけではない。知識をベースとするか、または統計的方法を使用するスコアリング関数は、本発明において用途を見出し得る。これらの方法は、配列と三次元タンパク質構造との適合を評定するのに使用し得、故にタンパク質構造への忠実度についてアミノ酸置換をスコアリングするのに使用し得る。ある実施態様では、変異配列スコアを個別に計算することによりコンピューター処理的に配列をスクリーニングするために、分子力学計算を使用し得る。

10

【0154】

効率的なエネルギー計算を可能にするためにアミノ酸を表すのに、様々なやり方がある。好ましい実施態様では、考慮されるアミノ酸を、前記したように回転異性体として表し、各可変および浮動位置で可能な各々の回転異性体と、他の可変および浮動回転異性体、固定位置残基、主鎖構造、および任意の非タンパク質原子との相互作用のエネルギー（またはスコア）を計算する。好ましい実施態様では、あらゆる可変および浮動位置で各側鎖回転異性体につき、2セットの相互作用エネルギーを計算する：回転異性体と固定原子との相互作用エネルギー（「シングル」エネルギー）、および可変および浮動位置の回転異性体と、あらゆる他の可変および浮動位置での他の可能な全回転異性体との相互作用エネルギー（「ダブル」エネルギー）。別の実施態様では、シングルおよびダブルエネルギーを、固定位置並びに可変および浮動位置について計算する。別の実施態様では、考慮されるアミノ酸は、回転異性体として表されない。

20

【0155】

コンピューター処理スクリーニングの重要な成分は、好都合なスコアを有する、即ち低エネルギーである、1またはそれ以上の配列の同定である。極度に多数の可能性から低エネルギー配列のセットを決定することは、些細なことではなく、この問題を解決するために組合せの最適化アルゴリズムを用いる。組合せの最適化アルゴリズムの必要性は、典型的なコンピューター処理スクリーニング計算において考慮される可能性の数を調べることににより例示説明される。回転異性体セットの独立性は、所定の設計問題についての可能な回転異性体配列数の単純計算を可能にする。 m 個の可能な回転異性体を位置毎に有する長さ n の主鎖は、 m^n 個の可能な回転異性体配列を有し、数は配列の長さに伴い指数関数的に増大する。非常に単純な計算のためには、最適配列および／または1またはそれ以上の好都合な配列を同定するために、各々の可能な配列を調べるのが可能である。しかしながら、典型的な設計の問題のためには、可能な配列の数（ 10^{80} またはそれ以上まで）は、大きすぎて各々の可能な配列を調べることは手に負えない。最適配列および／または1またはそれ以上の好都合な配列を同定するために、様々な組合せの最適化アルゴリズムを使用し得る。組合せの最適化アルゴリズムは、2つのクラスに分けられ得る：（1）それらが収束するならば、大域的最低エネルギー配置（global minimum energy configuration）を出すことを保証するもの、および（2）大域的最低エネルギー配置を出すことを保証しないが、常にある解答を出すもの。第1のクラスのアルゴリズムの例には、Dead-End Elimination (DEE) および Branch & Bound (B&B) (Branch and Terminate を含む) (Gordon & Mayo, 1999, Structure Fold Des 7:1089-98) が含まれるがこれらに限定されるわけではない。第2のクラスのアルゴリズムの例には、Monte Carlo (MC)、自己無撞着性平均力場 (SCMF)、Boltzmann サンプリング (Metropolis et al., 1953, J Chem Phys 21:1087)、模擬アニーリング (Kirkpatrick et al., 1983, Science, 220:671-680)、遺伝的アルゴリズム (GA) および Fast and Accurate Side-Chain Topology and Energy Refinement (FASTER) (Desmet, et al., 2002, Proteins, 48:31-43) が含まれるがこれらに限定されるわけではない。組合せの最適化アルゴリズムは、単独で、または他の組合せの最適化アルゴリズムと共に使用し得る。

30

40

【0156】

50

本発明のある実施態様では、組合せの最適化アルゴリズムを適用する戦略は、大域的最小エネルギー配置を見出すためのものである。別の実施態様では、その戦略は、1またはそれ以上の低エネルギーのまたは好都合な配列を見出すためのものである。別の実施態様では、その戦略は、大域的最小エネルギー配置を見出し、次いで1またはそれ以上の低エネルギーのまたは好都合な配列を見出すためのものである。例えば、US SN 6,269,312に概説されているように、好ましい実施態様は、Dead End Elimination (DEE) 段階および Monte Carlo 段階を利用する。他の実施態様では、他の検索方法の中でも、タブー検索アルゴリズムを使用するか、またはDEE および／または Monte Carlo と組み合わせる (Modern Heuristic Search Methods, edited by V.J. Rayward-Smith et al., 1996, John Wiley & Sons Ltd.; USSN 10/218,102; and PCT WO 02/25588 参照)。他の好ましい実施態様では、遺伝的アルゴリズムを使用し得る; 例えば、US SN 09/877,695 および US SN 10/071,859 参照。他の例として、US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; US SN 09/782,004; US SN 09/927,790; US SN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 により詳細に記載されているように、大域的最適に到達してもよく、次いでさらなる最適化配列を生成させるコンピューター処理プロセッシングをさらに行ってもよい。最も簡潔な実施態様では、設計計算は組合せのものではない。つまり、エネルギー計算を使用して、単一の可変位置でアミノ酸置換を個別に評価する。他の計算には、1より多い可変位置でアミノ酸置換を評価するのが好ましい。好ましい実施態様では、組合せの最適化に先立ち、可能な全相互作用エネルギーを計算する。別の好ましい実施態様では、組合せの最適化中に随時エネルギーを計算してもよい。

【0157】

ライブラリー生成

本発明は、最適化 Fc 変異体を選抜するために後に実験的にスクリーニングし得るライブラリーの生成方法を提供する。「ライブラリー」は、本明細書で使用されるとき、1またはそれ以上の Fc 変異体のセットを意味する。ライブラリーは、いかなる形態の変異体のセットを表してもよい。ある実施態様では、ライブラリーは、核酸またはアミノ酸配列のリスト、可変位置での核酸またはアミノ酸置換のリストである。例えば、下記で本発明を例示説明するために使用される実施例は、可変位置でのアミノ酸置換としてライブラリーを提供する。ある実施態様では、ライブラリーは、所望の特性について最適化された Fc 変異体である少なくとも1つの配列のリストである。例えば、Filikov et al., 2002, Protein Sci 11:1452-1461 および Luo et al., 2002, Protein Sci 11:1218-1226 参照。別の実施態様では、ライブラリーは、組合せのリストとして定義され得る。これは、各可変位置についてアミノ酸置換のリストを生成させることを意味し、各置換は他の全可変位置で他の全ての設計された置換と組み合わせられるものであることを暗示する。この場合、全可変位置での全可能性の組合せの拡大は、大きい明確に定義されたライブラリーをもたらす。ライブラリーは、Fc 領域または Fc 領域のいくつかのドメインまたはフラグメントを含むポリペプチドの物理的組成物を表してもよい。従って、ライブラリーは、精製または未精製形態のどちらでも、抗体または Fc 融合体の物理的組成物を表し得る。ライブラリーは、ライブラリー配列をコードする核酸の物理的組成物を表し得る。当該核酸は、ライブラリーのメンバーをコードする遺伝子、ライブラリーのメンバーを任意の機能し得るように連結された核酸と共にコードする遺伝子、またはライブラリーのメンバーを機能し得るように連結された調節配列、選択マーカー、融合体コンストラクトおよび／または他のエレメントと共にコードする発現ベクターであってもよい。例えば、ライブラリーは、Fc ライブラリーのメンバーをコードする哺乳動物発現ベクター、後に実験的に発現、精製およびスクリーニングされ得るそのタンパク質産物のセットであり得る。他の例として、ライブラリーは、ディスプレイライブラリーであり得る。そのようなライブラリーは、例えば、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、酵母ディスプレイ、細菌表面ディスプレイなどを可能にするいくつかの融合体パートナーに機能し得るように連結

されたライブラリーのメンバーをコードする発現ベクターのセットを含み得る。

【0158】

コンピューター処理スクリーニングのアウトプット配列または複数の配列を使用して、ライブラリーを生成させ得る。上記で論じたとおり、コンピューター処理的に生成されたライブラリーは、ランダムに生成されたライブラリーと比較して、安定性、正しい折り畳み、および機能的配列に有意に富む。結果的に、コンピューター処理スクリーニングは、設計目標について最適化されたタンパク質を同定する機会を増やす。ライブラリー中の配列のセットは、一般的に、しかし常にではなく、親配列と有意に異なるが、ライブラリーが好ましくは親配列を含有する場合もある。当分野で知られているように、コンピューター処理スクリーニング計算のアウトプットからライブラリーを導き得る様々なやり方がある。例えば、US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 に記載されたライブラリー生成方法は、本発明において用途を見出す。ある実施態様では、大域的最適配列のある一定の範囲内をスコアリングする配列は、ライブラリーに含まれ得る。例えば、最低エネルギー配列の 10 kcal/mol 以内にある全配列を、ライブラリーとして使用し得る。別の実施態様では、1 またはそれ以上の局所的な最小配列のある一定の範囲内をスコアリングする配列を使用し得る。好ましい実施態様では、フィルタリングされたセットからライブラリー配列を得る。そのようなリストまたはセットは、当分野で知られているように、様々な方法で、例えば、Monte Carlo、B&B または SCMF などのアルゴリズムを使用して、生成させ得る。例えば、フィルタリングされたセット中の上位の 10^3 または上位の 10^5 の配列が、ライブラリーを構成し得る。あるいは、全変異の組合せにより定義される配列総数を、ライブラリーのカットオフ基準として使用し得る。組換え配列の総数に好ましい値は、 10 ないし 10^{20} の範囲にあり、特に好ましい値は、 100 ないし 10^9 の範囲にある。あるいは、カットオフは、位置毎に予め定めた変異の数に到達したら強制され得る。いくつかの実施態様では、カットオフに合わない配列がライブラリーに含まれる。このことは、例えば、ライブラリー生成へのアプローチの評価、対照または比較対象の提供、または付加的配列空間の標本抽出などの、いくつかの状況で望ましい。例えば、親配列は、カットオフに合わなくても、ライブラリーに含まれ得る。

【0159】

集束化アルゴリズムは、コンピューター処理スクリーニング方法により導かれた配列を代表的なグループに分類するのに有用であり得る。例えば、USSN 10/218,102 および PCT WO 02/25588 に記載されている集束化方法およびそれらの応用は、本発明において用途を見出す。代表的なグループは、例えば類似性により、定義し得る。類似性の測定には、配列類似性およびエネルギーの類似性が含まれるが、これらに限定されるものではない。従って、コンピューター処理スクリーニングからのアウトプット配列を、局所的な最小の周囲に集束化し得、これは本明細書において配列の集束化セットと呼ばれる。例えば、配列空間中で近い配列のセットを、他のセットから区別し得る。ある実施態様では、1 またはそれ以上の配列の集束化セットを形成するいくつかの、殆どの、または全ての配列をライブラリーに含めることにより、集束化セットの 1 つまたはサブセット内の保護範囲を最大化し得る。例えば、これらのセット内の配列の大部分をライブラリーに含めることにより、1 つ、2 つまたは 3 つの最低エネルギー集束化セット内の保護範囲を最大化するのが有利であり得る。別の実施態様では、ライブラリー内に各集束化セット内の配列のサブセットのみを含めることにより、配列の集束化セット間の多様性を標本抽出し得る。例えば、ライブラリーに各集束化セットからの最低エネルギー配列を含めることにより、全てまたは殆どの集束化セットを広くサンプリングし得る。

【0160】

ライブラリー生成用のコンピューター処理スクリーニングの結果を先導またはフィルタリングするのに、配列情報を使用し得る。論じたように、タンパク質配列のアラインメントを比較または対比することにより、ある位置での可変性の度合いおよびその位置で天然

に生じるアミノ酸のタイプを観察し得る。かかる分析から得られるデータは、本発明で有用である。配列情報を使用する利益は論じたが、それらの利益は、ライブラリー生成を先導するための配列情報の使用に同等に適用される。タンパク質配列アラインメント中で生じるアミノ酸のセットは、進化により予めスクリーニングされて、タンパク質の構造、安定性、溶解性、機能および免疫原性に合致する機会をランダムよりも多く有すると見なし得る。様々な配列供給源、並びに配列アラインメントの生成方法を論じたが、これらはライブラリー生成の先導への配列情報の適用に用途を見出す。同様に、上記で論じたように、アラインメント中のある残基の重要性または重みの決定に様々な基準を適用し得る。これらの方法も、ライブラリー生成の先導への配列情報の適用に用途を見出す。コンピューター処理スクリーニングの結果からのライブラリー生成を先導するのに配列情報を使用することは、本発明において広範な用途を見出す。ある実施態様では、配列情報を使用して、コンピューター処理スクリーニングのアウトプットに由来する配列をフィルタリングする。言い換えると、コンピューター処理のアウトプットからいくつかの置換を差し引いてライブラリーを生成させる。例えば、生じるコンピューター処理スクリーニング計算または複数の計算のアウトプットを、ライブラリーが、いくつかの基準に合うアミノ酸またはアミノ酸のサブセット、例えば、その位置で配列のアラインメント中に観察されるもの、のみを含むようにフィルタリングし得る。別の実施態様では、配列情報を使用してコンピューター処理スクリーニングのアウトプットに配列を追加する。言い換えれば、コンピューター処理のアウトプットに追加するさらなるアミノ酸の選択の先導に配列情報を使用して、ライブラリーを生成させる。例えば、コンピューター処理スクリーニング計算からの所定の位置のアミノ酸のセットのアウトプットを、タンパク質配列のアラインメントにおいてその位置で観察される1またはそれ以上のアミノ酸を含めるように増やし得る。別の実施態様では、配列アラインメント情報に基づき、保護範囲または多様性を最大にするために、1またはそれ以上のアミノ酸をコンピューター処理スクリーニング配列のアウトプットに追加するか、またはそこから差し引く。例えば、配列アラインメントに見出されるものと類似の特性を有するさらなるアミノ酸を、ライブラリーに追加し得る。例えば、ある位置が配列アラインメント中で非荷電極性アミノ酸を有すると観察されたら、さらなる非荷電極性アミノ酸をその位置でライブラリー中に含めてもよい。

【0161】

後続ライブラリーの生成のために、ライブラリーをさらに加工し得る。このように、コンピューター処理スクリーニング計算または複数の計算のアウトプットを、一次ライブラリーと見なし得る。この一次ライブラリーは、後続ライブラリー、本明細書では二次ライブラリーと呼ぶ、の生成のために、他の計算または他のライブラリーに由来する他の一次ライブラリーと組み合わせたり、後続する計算、配列情報または他の分析を使用して加工したり、実験的に加工したりし得る。この記載からわかるように、上記で論じたようなライブラリーを先導またはフィルタリングするための配列情報の使用は、それ自体、一次ライブラリーから二次ライブラリーを生成するための1つの方法である。二次ライブラリーの生成は、使用者にライブラリー内のより多くのパラメーターの制御をもたらす。このことは、より効率的な実験的スクリーニングを可能にし、実験結果からのフィードバックをより容易に解釈することを可能にし、より効率的な設計／実験サイクルをもたらし得る。

【0162】

一次ライブラリーから二次ライブラリーを生成させる様々な方法がある。例えば、US SN 10/218,102 および PCT WO 02/25588 は、本発明に用途を見出す二次ライブラリーの生成方法を記載している。典型的に、一次ライブラリーが何らかのやり方で加工されるいくつかの選択段階が生じる。例えば、ある実施態様では、いくつかの一次配列のセットを選択し、二次ライブラリーを形成する選択段階が生じる。別の実施態様では、選択段階はコンピューター処理段階であり、再度、いくつかの一次ライブラリーのサブセットを選択し、次いでさらなるコンピューター処理的分析に付す選択段階を一般的に含む。これはさらなるコンピューター処理スクリーニング並びに「インシリコ (in silico)」シャフリング (shuffling) または組換えなどの技法の両方を含む (例えば、U

S 5, 8 3 0, 7 2 1 ; U S 5, 8 1 1, 2 3 8 ; U S 5, 6 0 5, 7 9 3 ; および U S 5, 8 3 7, 4 5 8、例えば修飾ヌクレオチドを使用する、誤りがちな P C R ; マルチカセットの使用を含む既知の変異誘発技法 ; および D N A シャフリング (Cramer et al., 1998, Nature 391:288-291 ; Coco et al., 2001, Nat Biotechnol 19:354-9 ; Coco et al., 2002, Nat Biotechnol, 20:1246-50)、異種 D N A サンプル (U S 5,939,250) ; ITCHY (Ostermeier et al., 1999, Nat Biotechnol 17:1205-1209) ; StEP (Zhao et al., 1998, Nat Biotechnol 16:258-261)、GSSM (U S 6,171,820 および U S 5,965,408) ; インビボ相同組換え、リガーゼ補助遺伝子集合、末端相補的 P C R、プロフュージョン (profusion) (Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302) ; 酵母／細菌表面ディスプレイ (Lu et al., 1995, Biotechnology 13:366-372) ; Seed & Aruffo, 1987, Proc Natl Acad Sci USA 84(10) :3365-3369 ; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557)。別の実施態様では、実験段階、例えば、下記のライブラリースクリーニング段階のいずれか、である選択段階が生じ、一次ライブラリーのいくつかのサブセットが選択され、例えば、以下で論ずる定方向進化方法の 1 つを使用して実験的に組換えられ、二次ライブラリーを形成する。好ましい実施態様では、U S 6, 4 0 3, 3 1 2 に概説のように一次ライブラリーを生成させ、加工する。

10

【0163】

二次および後続ライブラリーの生成は、本発明において広範な用途を見出す。ある実施態様では、異なる一次ライブラリーを組み合わせて二次または後続ライブラリーを生成させ得る。他の実施態様では、二次ライブラリーは、変異性が高いかまたは保存性が高い位置で配列多様性を標本抽出することにより生成させ得る。一次ライブラリーを分析して、鋳型タンパク質中のどのアミノ酸位置が高い変異頻度を有するか、そしてどの位置が低い変異頻度を有するかを判定し得る。例えば、コンピューター処理スクリーニングにおいてかなりの変異多様性を示すタンパク質中の位置を、設計計算の後続ラウンドにおいて固定し得る。最初のものと同じサイズのフィルタリングされたセットは、最初のライブラリー中で大概保存されていた位置で、多様性を示すであろう。あるいは、変異数の高い位置でアミノ酸を変化させ、ある一定の頻度を超える変異を有さない位置を一定に保つことにより、二次ライブラリーを生成させ得る。

20

【0164】

この議論は、ライブラリーの生成を、一次ライブラリー、二次ライブラリーと続くものに制限することを意味しない。理解されるように、一次および二次ライブラリーをさらに加工して、三次ライブラリー、4 次ライブラリーなどを生成させ得る。このように、ライブラリー生成は、反復的プロセスである。例えば、1 またはそれ以上の二次ライブラリーに適用される様々な付加的段階を使用して、三次ライブラリーを構築し得る ; 例えば、さらなるコンピューター処理的加工を行ってもよく、二次ライブラリーを再度組み合わせてもよく、異なる二次ライブラリーのサブセットを組み合わせてもよい。好ましい実施態様では、三次ライブラリーは、二次ライブラリーを組み合わせることにより生成させ得る。例えば、タンパク質の異なる部分を分析した一次および／または二次ライブラリーを組合せ、組み合わせたタンパク質の部分を扱う三次ライブラリーを生成させ得る。別の実施態様では、一次ライブラリー由来の変異体を別の一次ライブラリー由来の変異体と組合せ、非常に長いフィルタリングされたセットを創生するよりも低いコンピューター処理のコストで、組み合わせられた三次ライブラリーを提供し得る。これらの組合せを使用して、例えば、大型タンパク質、特に大型マルチドメインタンパク質 (Fc はその例である) を分析し得る。このように、上記の二次ライブラリー生成の記載は、一次ライブラリーに後続する任意のライブラリーの生成に適用され、最終結果は、設計目標について最適化されたタンパク質変異体を得るために実験的にスクリーニングされ得る最終ライブラリーである。これらの例は、二次ライブラリーの生成をいかなる特定の適用または本発明の操作理論に制限することも意味しない。むしろ、これらの例は、二次ライブラリーおよび三次ライブラリーなどの後続ライブラリーの生成が、ライブラリー生成のためのコンピューター処理スクリーニング方法論に幅広く有用であることを例示説明する意味である。

30

40

50

【0165】

実験的産生およびスクリーニング

本発明は、F c 変異体ライブラリーの産生およびスクリーニングの方法を提供する。記載した方法は、本発明をいかなる特定の適用または操作理論にも制限することを意味しない。むしろ、提供される方法は、1またはそれ以上のF c 変異体または1またはそれ以上のF c 変異体ライブラリーを実験的に産生およびスクリーニングし、最適化F c 変異体入手し得ることを一般的に例示説明する意味である。F c 変異体は、本明細書で厳密に定義した通りのF c 領域、そのドメインまたはフラグメント、または抗体またはF c 融合体などのF c を含む大きいポリペプチドとしてなど、いかなる文脈で産生およびスクリーニングしてもよい。抗体の分子生物学、発現、生成およびスクリーニングのための一般方法は、Antibody Engineering, edited by Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; および Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76 に記載されている。

10

【0166】

本発明のある実施態様では、ライブラリー配列を使用して、そのメンバーの配列をコードする核酸を創生する。それは、次いで、所望により宿主細胞にクローニングされ、発現され、アッセイされ得る。このように、各メンバーのタンパク質配列をコードする核酸、そして特にDNAを作成し得る。これらの実践は周知手法を使用して実行される。例えば、本発明で用途を見出し得る様々な方法が、Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001) および Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) に記載されている。当業者にはわかるように、多数の配列を含むライブラリーの配列そのものの生成は、潜在的に高価であり時間がかかる。従って、本発明のライブラリーを効率的に生成させるのに使用し得る様々な技法がある。本発明で用途を見出し得るそのような方法は、US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 に記載または参照されている。そのような方法には、遺伝子集合方法、PCRをベースとする方法およびPCRの変形を使用する方法、リガーゼ連鎖反応をベースとする方法、合成的混合、誤りがちな増幅方法およびランダムな変異を有するオリゴを使用する方法で用いられるもののような集積オリゴ (pooled oligo) 方法、古典的部位特異的変異誘発方法、カセット変異誘発、および他の増幅および遺伝子合成方法が含まれるが、これらに限定されるわけではない。当分野で知られているように、遺伝子集合、変異誘発、ベクターのサブクローニングなどのための様々な市販のキットおよび方法がある。そのような市販品は、ライブラリーのF c 変異体メンバーをコードする核酸を生成させるために、本発明に用途を見出す。

20

30

【0167】

本発明のF c 変異体は、F c 変異体をコードする核酸を含有する核酸、好ましくは発現ベクターを形質移入された宿主細胞を、タンパク質の発現を誘導するかまたは引き起こすのに適切な条件下で培養することにより産生させ得る。発現に適する条件は、発現ベクターおよび宿主細胞の選択によって変動し、日常的な実験を通して容易に当業者に確認されるであろう。幅広い様々な適する宿主細胞を使用し得、それには哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞および酵母が含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、本発明において用途を見出し得る様々な細胞株が、the American Type Culture Collection から入手可能な ATCC^(登録商標) 細胞株カタログに記載されている。

40

【0168】

好ましい実施態様では、F c 変異体は、哺乳動物発現系で発現される。これには、レトロウイルスまたはアデノウイルスなどのウイルスを使用して発現コンストラクトが哺乳動物細胞に導入されるシステムが含まれる。いかなる哺乳動物細胞を使用してもよく、ヒト、マウス、ラット、ハムスターおよび霊長類の細胞が特に好ましい。適する細胞には、Jurkat T 細胞、NIH 3T3、CHO、COS および 293 細胞を含むがこれらに限定さ

50

れるものではない、既知の研究用細胞も含まれる。別の好ましい実施態様では、ライブラリーのタンパク質は、細菌細胞で発現される。細菌発現系は当分野で周知であり、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*) およびストレプトコッカス・リビダンス (*Streptococcus lividans*) が含まれる。別の実施態様では、Fc 変異体は、昆虫細胞または酵母細胞で産生される。別の実施態様では、Fc 変異体は、無細胞翻訳系を使用してインビトロで発現される。原核生物 (例えば、*E. coli*) および真核生物 (例えば、麦芽、ウサギの網状赤血球) 細胞の両方に由来するインビトロ翻訳系が入手可能であり、関心のあるタンパク質の発現レベルおよび機能的特性に基づいて選択し得る。例えば、当業者にはわかるように、インビトロ翻訳は、例えばリボソームディスプレイなどのいくつかのディスプレイ技法に必要とされる。加えて、Fc 変異体は、化学合成方法により産生してもよい。

10

【0169】

本発明の Fc 変異体をコードする核酸は、タンパク質を発現するために発現ベクターに導入され得る。様々な発現ベクターをタンパク質発現のために利用し得る。発現ベクターは、宿主ゲノムに組み込む自己複製用染色体外ベクターまたは複数のベクターを含んでもよい。発現ベクターは、宿主の細胞タイプに適合するように構築される。従って、本発明において用途を見出す発現ベクターには、哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞、酵母およびインビトロ系でタンパク質発現を可能にするものが含まれるがこれらに限定されるわけではない。当分野で知られているように、Fc 変異体タンパク質の発現のために本発明において用途を見出し得る様々な発現ベクターが、商業的にまたは他の手段で入手可能である。

20

【0170】

発現ベクターは、典型的に、制御または調節配列、選択可能マーカー、任意の融合体パートナーおよび／または付加的エレメントに機能し得るように連結されたタンパク質を含む。「機能し得るように連結された」は、本明細書において、核酸が他の核酸配列と機能的関係に置かれていることを意味する。一般に、これらの発現ベクターは、Fc 変異体をコードする核酸に機能し得るように連結された転写および翻訳調節核酸を含み、典型的にタンパク質の発現に使用される宿主細胞に適するものである。一般に、転写および翻訳調節配列には、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および停止配列、翻訳開始および停止配列、およびエンハンサーまたは活性化配列が含まれ得る。当分野でまた知られている通り、発現ベクターは、発現ベクターを含有する形質移入された宿主細胞の選択を可能にする選択遺伝子またはマーカーを典型的に含有する。選択遺伝子は、当分野で周知であり、使用される宿主細胞とともに変動する。

30

【0171】

Fc 変異体は、発現されたタンパク質の標的化、精製、スクリーニング、ディスプレイなどを可能にする融合体パートナーに機能し得るように連結されていてもよい。融合体パートナーは、リンカー配列を介して Fc 変異体配列に連結していてもよい。リンカー配列は、一般的に、典型的に 10 個より少ない、少数のアミノ酸を含むが、もっと長いリンカーも使用し得る。典型的に、リンカー配列は、可撓性かつ分解耐性であるように選択される。当業者にはわかるように、幅広く様々な配列のいずれも、リンカーとして使用し得る。例えば、一般的なリンカー配列は、アミノ酸配列 GGGGS を含む。融合体パートナーは、Fc 変異体タンパク質および任意の付随する融合体パートナーを、所望の細胞内場所または細胞外培地に導く標的化またはシグナル配列であり得る。当分野で知られているように、ある一定のシグナル配列は、増殖培地に分泌されるか、細胞膜周辺腔に分泌されるか、細胞の内膜と外膜の間に局在するかのいずれかに、タンパク質を標的化し得る。融合体パートナーは、精製および／またはスクリーニングを可能にするペプチドまたはタンパク質をコードする配列であってもよい。そのような融合体パートナーには、ポリヒスチジンタグ (His タグ) (例えば H₆ および H₁₀ または固定化金属親和性クロマトグラフィー (IMAC) 系 (例えば、Ni⁺² 親和性カラム) と共に使用するための他のタグ)、GST 融合体、MBP 融合体、ストレプタグ、細菌酵素 BirA の BSP ビオチン化標的配列、および抗体により標的化されるエピトープタグ (例えば c-myc タグ、fla

40

50

イブラリーをファージディスプレイライブラリーにする場合、タンパク質精製を実施しなくてもよい。

【0174】

Fc変異体は、インビトロアッセイ、インビボおよび細胞をベースとするアッセイ、並びに選択技法を使用するものを含むが、これらに限定されるものではない様々な方法を使用して、スクリーニングし得る。スクリーニングの手順において、自動化および高処理量スクリーニング技法を利用し得る。スクリーニングは、融合体パートナーまたは標識を使用してもよい。融合体パートナーは、上記で論じた。「標識化」は、本明細書において、本発明のFc変異体が、スクリーニングにおける検出を可能にするために取り付けられた1またはそれ以上のエレメント、同位元素または化学的化合物を有することを意味する。10
一般に、標識は、3つのクラスに分類される：a) 免疫標識、これは、融合体パートナーとして組み込まれたエピトープであり得、抗体により認識される、b) 同位元素標識、これは、放射性または重同位元素であり得る、およびc) 低分子標識、これは、蛍光もしくは比色染料、または他の標識方法を可能にするビオチンなどの分子を含み得る。標識は、任意の位置で化合物に組み込み得、タンパク質発現の間にインビトロまたはインビボで組み込んでよい。

【0175】

好ましい実施態様では、Fc変異体の機能的および／または生物物理的特性を、インビトロアッセイにおいてスクリーニングする。インビトロアッセイは、幅広い動的な範囲の関心のある特性のスクリーニングを可能にし得る。スクリーニングされ得るFc変異体の特性には、安定性、溶解性およびFcリガンド、例えばFcγR、に対する親和性が含まれるが、これらに限定されるわけではない。多数の特性を同時または個別にスクリーニングし得る。タンパク質は、アッセイの要件に応じて、精製されてもされなくてもよい。ある実施態様では、スクリーニングは、Fc変異体に結合すると知られているか、または考えられているタンパク質または非タンパク質分子に対する、Fc変異体の定性的または定量的結合アッセイである。好ましい実施態様では、スクリーニングは、抗体またはFc融合体の標的抗原に対する結合を測定するための結合アッセイである。別の好ましい実施態様では、スクリーニングは、FcγR類のファミリー、新生児受容体FcRn、補体タンパク質C1qおよび細菌タンパク質AおよびGを含むがこれらに限定されるものではないFcリガンドに対するFc変異体の結合についてのアッセイである。当該Fcリガンドはいかなる生物に由来してもよく、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルが好ましい。30
結合アッセイは、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）およびBRET（生物発光共鳴エネルギー転移）をベースとするアッセイ、AlphaScreen^(商標)（発光増幅近接均質化アッセイ（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay））、シンチレーション近接アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、SPR（表面プラズモン共鳴、BIAcore^(登録商標)としても知られる）、等温滴定熱量測定、示差走査熱量測定、ゲル電気泳動およびゲル濾過を含むクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されるものではない、当分野で知られている様々な方法を使用して実行できる。これらおよびその他の方法は、いくつかのFc変異体の融合体パートナーまたは標識を利用し得る。アッセイは、色素生産性、蛍光、発光または同位元素標識を含むがこれらに限定されるものではない、様々な検出方法を用いてもよい。40

【0176】

Fc変異体タンパク質の生物物理的特性、例えば、安定性や溶解性、を当分野で知られている様々な方法を使用してスクリーニングし得る。タンパク質の安定性は、折り畳まれた状態と折り畳まれていない状態との間の熱力学的平衡を測定することにより決定し得る。例えば、本発明のFc変異体タンパク質は、化学変性剤、熱またはpHを使用して折り畳まれていなくすることができ、この転移を、円二色性分光法、蛍光分光法、吸光分光法、NMR分光法、熱量測定法およびタンパク質分解を含むがこれらに限定されるものではない方法を使用して、モニタリングし得る。当業者にはわかるように、折り畳まれたものおよび折り畳まれていないものへの転移の動力学的パラメーターも、これらおよび他の技50

法を使用してモニタリングし得る。Fc変異体タンパク質の溶解性および全体構造的完全性は、当分野で知られている広範囲の方法を使用して定量的または定性的に測定し得る。Fc変異体タンパク質の生物物理学的特性の特徴分析のために本発明において用途を見出し得る方法には、ゲル電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィーや逆相高速液体クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、質量分析、紫外吸光分光法、蛍光分光法、円二色分光法、等温滴定熱量測定、示差走査熱量測定、分析的超遠心分離、動的光散乱法、タンパク質分解およびクロスリンク、濁度測定、フィルター遅延アッセイ、免疫学的アッセイ、蛍光染料結合アッセイ、タンパク質染色アッセイ、顕微鏡およびELISAまたは他のアッセイによる凝集体の検出が含まれる。X線結晶構造解析技法およびNMR分光法を用いる構造分析も、用途を見出し得る。ある実施態様では、何らかの決められた期間後にタンパク質溶液の量を測定することにより、安定性および／または溶解性を測定し得る。このアッセイでは、タンパク質は、例えば高温、低pHまたは変性剤の存在などの極端な条件に曝されていてもいなくてもよい。典型的に、機能は、安定な、可溶の、および／または良好に折り畳まれた／構造化されたタンパク質を要するので、後述の機能および結合アッセイも、そのような測定の実施方法を提供する。例えば、Fc変異体を含む溶液を、その標的抗原に結合する能力についてアッセイし、次いで1またはそれ以上の決められた期間にわたって高温に曝し、次いで抗原結合について再度アッセイできる。折り畳まれていない凝集したタンパク質は、抗原を結合できないと予期されるので、残っている活性の量は、Fc変異体の安定性および溶解性の測定を提供する。

【0177】

好ましい実施態様では、1またはそれ以上の細胞をベースとする、即ちインビボのアッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングする。そのようなアッセイのために、典型的に、細胞がライブラリーに属する個々の変異体または変異体の集積物に曝されるように、精製または未精製のFc変異体タンパク質を外来的に添加する。これらのアッセイは、典型的に、しかし常にではないが、Fc変異体を含む抗体またはFc融合体の機能をベースとする；つまり、抗体またはFc融合体の、標的抗原に結合し、何らかの生物化学的事象、例えばエフェクター機能、リガンド／受容体結合阻害、アポトーシスなどを媒介する能力をベースとする。そのようなアッセイは、しばしば、例えば、細胞の生存、細胞の死、細胞形態の変化、細胞の天然遺伝子またはレポーター遺伝子の発現などの転写活性化などの、抗体またはFc融合体に対する細胞の反応をモニタリングすることを含む。例えば、そのようなアッセイは、ADCC、ADCPまたはCDCを誘起するFc変異体の能力を測定し得る。いくつかのアッセイには、標的細胞に加えて、付加的細胞または成分、例えば、血清の補体または末梢血単球(PBMC)、NK細胞、マクロファージなどのエフェクター細胞を添加する必要がある。かかる付加的細胞は、いかなる生物由来でもよく、好ましくは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル由来である。抗体およびFc融合体は、抗体の標的抗原を発現しているある一定の細胞株のアポトーシスを引き起こし得、または、それらは、アッセイに添加された免疫細胞による標的細胞への攻撃を媒介し得る。細胞の死亡または生存度をモニタリングする方法は当分野で知られており、染料、免疫化学、細胞化学および放射活性試薬の使用を含む。例えば、カスパーゼ染色アッセイは、アポトーシスの測定を可能にし得、放射活性基質またはアラマブルー(alar blue)などの蛍光染料の取込または放出は、細胞増殖または活性化のモニタリングを可能にし得る。好ましい実施態様では、DELTA(登録商標) EuTDAをベースとする細胞傷害アッセイ(Perkin Elmer, MA)を使用する。あるいは、死亡した、または損傷した標的細胞は、例えば乳酸デヒドロゲナーゼなどの1またはそれ以上の天然細胞内タンパク質の放出を測定することによりモニタリングし得る。転写活性化も、細胞をベースとするアッセイにおいて機能をアッセイする方法として役立ち得る。この場合、上方調節され得る天然遺伝子またはタンパク質をアッセイすることにより反応をモニタリングし得、例えば、ある種のインターロイキンの放出を測定し得、あるいは、読出しはレポーターコンストラクトによってもよい。細胞ベースのアッセイは、Fc変異体の存在に対する反応として、細胞の形態変化の測定も含み得る。このようなアッセイのための細胞タイプは、原核でも真核で

もよく、当分野で知られている様々な細胞株を用い得る。

【0178】

あるいは、Fc変異体をコードする核酸で形質転換または形質移入された細胞を使用して、細胞をベースとするスクリーニングを実施する。つまり、Fc変異体タンパク質は細胞に外来的に添加されない。例えば、ある実施態様では、細胞をベースとするスクリーニングは、細胞表面ディスプレイを利用する。細胞表面上でのFc変異体のディスプレイを可能にする融合体パートナーを用いることができる (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399)。本発明で用途を見出し得る細胞表面ディスプレイ法には、細菌 (Georgiou et al., 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou et al., 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee et al., 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun et al., 1998, Nat Biotechnol 16:576-80)、酵母 (Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557) および哺乳動物細胞 (Whitehorn et al., 1995, Bio/technology 13:1215-1219) 上でのディスプレイが含まれるが、これらに限定されるわけではない。別の実施態様では、Fc変異体タンパク質は、細胞表面上にディスプレイされず、むしろ細胞内または他の細胞区画内でスクリーニングされる。例えば、周辺質発現および細胞測定スクリーニング (Chen et al., 2001, Nat Biotechnol 19: 537-542)、タンパク質フラグメント相補性アッセイ (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344.; Pelletier et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146) および酵母二重ハイブリッドスクリーニング (Fields & Song, 1989, Nature 340:245-246) は、本発明で用途を見出し得る。あるいは、Fc変異体を含むポリペプチド、例えば抗体またはFc融合体が、細胞に何らかの選択可能な増殖上の利点を与えるならば、この特性を使用してFc変異体をスクリーニングまたは選択し得る。

【0179】

当分野で知られているように、スクリーニング方法のサブセットは、好都合なライブラリーのメンバーを選択するものである。当該方法は、本明細書において、「選択方法」と呼ばれ、これらの方法は、本発明においてFc変異体ライブラリーのスクリーニングのために用途を見出す。ライブラリーが選択方法を使用してスクリーニングされる場合、好都合である、つまり何らかの選択基準に合うライブラリーのメンバーのみが、増殖、単離および/または観察される。理解されるように、最も適合する変異体のみが観察されるので、そのような方法は、ライブラリーのメンバーの適合性を個別にアッセイする方法によりスクリーニングできるものより大きいライブラリーのスクリーニングを可能にする。選択は、Fc変異体の表現型をその遺伝子型に、つまり、Fc変異体の機能をそれをコードする核酸に共有結合的または非共有結合的に連結させる、いかなる方法、技法または融合体パートナーによっても可能である。例えば、選択方法としてのファージディスプレイの使用は、ライブラリーのメンバーの遺伝子IIITタンパク質への融合により可能になる。このように、例えばFcγRへの結合親和性などの何らかの基準に合う変異体タンパク質の選択または単離は、それをコードする核酸も選択または単離する。一度単離したら、Fc変異体をコードする遺伝子または複数の遺伝子を増幅させ得る。このパニング (panning) と呼ばれる単離と増幅のプロセスは、繰り返してもよく、好都合なFc変異体をライブラリー中で増やすことが可能になる。最終的に、結合した核酸の配列解読により、遺伝子の同定が可能になる。

【0180】

本発明でFc変異体ライブラリーのスクリーニングに用途を見出し得る様々な選択方法が当分野で知られている。これらには、ファージディスプレイ (Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Kay et al., 1996, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317) 並びに選択的ファージ感染 (Malmborg et al., 1997, J Mol Biol 273:544-551)、選択的感染性ファージ (Krebber et al., 1997, J Mol Biol 268:619-630) および遅延感染パニング (Benhar et al., 2000, J Mol Biol 301:893-904) など

の派生物、細菌 (Georgiou et al., 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou et al., 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee et al., 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun et al., 1998, Nat Biotechnol 16:576-80)、酵母 (Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557)、および哺乳動物細胞 (Whitehorn et al., 1995, Bio/technology 13:1215-1219) 上でのディスプレイなどの細胞表面ディスプレイ (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399)、並びにポリソームディスプレイ (Mattheakis et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:9022-9026)、リボソームディスプレイ (Hanes et al., 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942)、mRNAディスプレイ (Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302; Nemoto et al., 1997, FEBS Lett 414:405-408)、およびリボソーム不活性化ディスプレイ系 (Zhou et al., 2002, J Am Chem Soc 124, 538-543) などのインビトロディスプレイ技法 (Amstutz et al., 2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405) が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0181】

本発明において用途を見出し得る他の選択方法には、周辺質発現および細胞測定スクリーニング (Chen et al., 2001, Nat Biotechnol 19:537-542)、タンパク質フラグメント相補性アッセイ (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletier et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146)、および選択モード (Visintin et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728) で使用する酵母二重ハイブリッドスクリーニング (Fields & Song, 1989, Nature 340:245-246) を含むがこれらに限定されるものではないインビボの方法などの、ディスプレイに頼らない方法が含まれる。別の実施態様では、選択は、発現ベクターの特異的配列に結合し、従って融合体パートナーおよび付随するFc変異体ライブラリーのメンバーを、それらをコードする核酸と共有結合的または非共有結合的に連結させる融合体パートナーにより可能になる。例えば、US 5,942,574; US 5,803,763; US 5,926,300; US 5,823,208; US 5,926,266; US 5,826,711; US 5,953,351; US 5,997,100; US 6,036,658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; および PCT WO 02/07466 は、本発明で用途を見出し得るそのような融合体パートナーおよび技法を記載している。別の実施態様では、抗体またはFc融合体などのFc変異体を含むポリペプチドの発現が、何らかの増殖、複製、生存的利点を細胞に与えるならば、インビボ選択を行うことができる。

【0182】

「定方向進化」法と呼ばれる選択方法のサブセットは、時には新しい変異の組込みによる、選択における好都合な配列の接合または交配を含むものである。当業者にはわかるように、定方向進化法は、ライブラリー中の最も好都合な配列の同定を促進でき、スクリーニングされる配列の多様性を高めることができる。本発明においてFc変異体ライブラリーのスクリーニングのために用途を見出し得る様々な定方向進化法が当分野で知られており、DNAシャフリング (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3)、エクソンシャフリング (US 6,365,377; Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428)、ファミリーシャフリング (Cramer et al., 1998, Nature 391:288-291; US 6,376,246)、RACHITT^(商標) (Coco et al., 2001, Nat Biotechnol 19:354-359; PCT WO 02/06469)、STEP およびインビトロ組換えのランダムプライミング (priming) (Zhao et al., 1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao et al., 1998, Nucleic acids Res 26:681-683)、エキソヌクレゼ媒介遺伝子集合 (US 6,352,842; US 6,361,974)、Gene Site Saturation Mutagenesis^(商標) (US 6,358,709)、Gene Reassembly^(商標) (US 6,358,709)、SCRATCHY (Lutz et al., 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253)、DNAフラグメント化法 (Kikuchi et al., Gene 236:159-167)、一本鎖DNAシャフリング (Kikuchi

et al., 2000, Gene 243:133-137) および AMESystem^(商標) 定方向進化タンパク質工学処理技法 (Applied Molecular Evolution) (US 5,824,514; US 5,817,483; US 5,814,476; US 5,763,192; US 5,723,323) が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0183】

本発明のFc変異体を含む抗体およびFc融合体の生物学的特性は、細胞、組織および生物全体での実験で特徴分析し得る。当分野で知られているように、薬物は、しばしば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタおよびサルを含むがこれらに限定されない動物で、疾患または疾患モデルの処置に関する薬物の効力を測定するために、または薬物の薬物動力学、毒性および他の特性を測定するために試験される。当該動物は、疾患モデルと呼ばれることがある。治療薬は、しばしば、ヌードマウス、SCIDマウス、異種移植マウスおよび遺伝子組換えマウス（ノックインおよびノックアウトを含む）を含むがこれらに限定されるものではないマウスで試験される。例えば、抗癌治療薬として企図される本発明の抗体またはFc融合体は、例えば異種移植マウスなどのマウス癌モデルで試験し得る。この方法では、腫瘍または腫瘍細胞株をマウスに移植または注射し、その後マウスを治療薬で処置して、抗体またはFc融合体の癌増殖を低減または阻害する能力を測定する。そのような実験は、治療薬として使用しようとする当該抗体またはFc融合体の潜在能力の判定のために、意味のあるデータを提供し得る。任意の生物、好ましくは哺乳動物を、試験に使用し得る。例えばそのヒトとの遺伝的類似性のために、サルは、適する治療モデルであり得、従って本発明の抗体およびFc融合体の効力、毒性、薬物動態または他の特性の試験に使用し得る。薬物としての承認にはヒトにおける本発明の抗体およびFc融合体の試験が最終的に必要とされ、従って、当然これらの実験が企図される。従って、本発明の抗体およびFc融合体を、ヒトで試験して、それらの治療効力、毒性、薬物動態および／または他の臨床的特性について判定し得る。

【0184】

実施例

本発明を例示説明するために、下記の実施例を提供する。これらの実施例は、本発明をいかなる特定の適用または操作理論に制限することも意味しない。

【0185】

本発明で論じる全位置について、番号付けはKabatにある通りのEUインデックスに従う (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)。抗体の分野の当業者は、この慣習が免疫グロブリン配列の特定領域における非連続的番号付けからなり、免疫グロブリンファミリー中で保存された位置への標準化された参照を可能にすることがわかる。従って、EUインデックスにより定義される任意の所定の免疫グロブリンの位置は、必ずしもその連続的配列に対応しない。図3は、この原理をより明確に例示説明するために、抗体アレムツズマブの連続およびEUインデックスの番号付けスキームを示す。Kabat 270、272、312、315、356および358を含むがこれらに限定されるものではない数々のFc位置で多型が観察されており、提示した配列と科学文献中の配列との間に僅かな差異が存在し得ることに留意すべきである。

【0186】

実施例1. コンピューター処理スクリーニングおよびFcライブラリーの設計

最適化Fc変異体を設計するために、コンピューター処理スクリーニング計算を実行した。数回のコンピューター処理／実験のサイクルにわたり、Fc変異体をコンピューター処理的にスクリーニングし、構築し、そして実験的に調べた。各々の連続サイクルについて、実験データは次セットのコンピューター処理スクリーニング計算およびライブラリー設計にフィードバックを与えた。全コンピューター処理スクリーニング計算およびライブラリー設計を実施例1に提示する。各セットの計算につき、結果を提示し関連情報およびパラメーターを提供する表を提供する。

【0187】

FcγR類の細胞外ドメインに結合したFcのいくつかの異なる構造を、コンピューター

ー処理スクリーニング計算の鑄型構造として供した。公に入手可能なFc/FcγR複合体構造には、pdb受託コード1E4K (Sondermann et al., 2000, Nature 406:267-273.) およびpdb受託コード1IISおよび1IIX (Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477) が含まれる。FcγRIIIbおよびFcγRIIIaの細胞外領域は、96%同一であり、従ってFc/FcγRIIIb構造の使用は、FcγRIIIaの使用と本質的に均等である。それでもやはり、いくつかの計算には、1IISおよび1E4K構造中にD129G変異をモデル化することにより、より正確なFc/FcγRIIIa鑄型構造(D129G 1IISおよびD129G 1E4K鑄型構造と呼ぶ)を構築した。加えて、ヒトFcγRIIIb、ヒトF158 FcγRIIIaおよびマウスFcγRIIIの細胞外ドメインに結合したヒトFcの構造を、標準的方法、入手可能なFcγR配列情報、上述のFc/FcγR構造、並びに非結合複合体(pdb受託コード1H9V) (Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737-749) (pdb受託コード1FCG) (Maxwell et al., 1999, Nat Struct Biol 6:437-442)、FcγRIIIb (pdb受託コード2FCB) (Sondermann et al., 1999, Embo J 18:1095-1103) およびFcγRIIIb (pdb受託コード1E4J) (Sondermann et al., 2000, Nature 406:267-273.) の構造情報を使用してモデル化した。

【0188】

可変位置およびこれらの位置で考慮されるべきアミノ酸を、上述のFc/FcγRおよびFcγR構造の視覚的検査により、そして溶媒接近可能情報および配列情報を使用して選択した。Fc類およびFcγR類の配列情報は、置換が活性化と阻害性の受容体の間を区別する親和性を提供し得る可変位置の決定に特に有用であった。事実上全てのCγ2位置をコンピューター処理的にスクリーニングした。Fc構造は、各々ヒンジおよびCγ2-Cγ3ドメイン(図2に示す)を含む2本の重鎖(1IIS、1IIXおよび1E4K構造中の標識鎖AおよびB)のホモ二量体である。FcγR(1IIS、1IIXおよび1E4K構造中の標識鎖C)が非対称的にFcホモ二量体に結合するので、各鎖は、しばしば設計計算において別々に考慮した。いくつかの計算には、可変位置残基に近接するFcおよび/またはFcγRの残基を浮動させた。つまり、タンパク質設計計算においてアミノ酸高次構造を変動させたが、アミノ酸本体は変動させず、高次構造の調整を可能にした。これらは、関連する場合、各セットの計算について下記表に示す。断りの無い限り、考慮されるアミノ酸は、コア、コアXM、表面、境界、境界XM、または全20の分類のいずれかに属した。これらの分類は、以下の通りに定義される：コア=アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびメチオニン；コアXM=アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；表面=アラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、リジンおよびヒスチジン；境界=アラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびメチオニン；境界XM=境界=アラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；全20=全20個の天然産生アミノ酸。

【0189】

計算の大部分は、2つの一般的なタイプのコンピューター処理スクリーニング方法の一方に従った。1つの方法では、可変位置でのアミノ酸の高次構造を、Dunbrack & Cohenの回転異性体ライブラリー(Dunbrack et al., 1997, Protein Sci 6:1661-1681)から導かれる主鎖非依存性側鎖回転異性体のセットとして表した。選択された可変位置で考慮されるアミノ酸の全ての可能な組合せのエネルギーを、ファンデルワールス、溶媒和、静電気および水素結合相互作用の項を含む力場を使用して計算し、Dead End Elimination (DEE) アルゴリズムを使用して最適(基底状態)配列を決定した。当業者にはわかるように、予想された最低エネルギー配列は、主としてスコアリング関数の誤りのために、そして僅

かなタンパク質の高次構造の差異が安定性の劇的な差異に至り得るという事実と相まって、必ずしも真の最低エネルギー配列ではない。しかしながら、予想された基底状態配列は真の基底状態に近いように思われ、従って、配列空間中で近い配列のエネルギーおよび予想される基底状態周辺のエネルギーを評価することにより、さらなる好都合な多様性を探査できる。このことを達成するために、並びにライブラリー用の配列多様性を発生させるために、Monte Carlo (MC) アルゴリズムを使用して、予想される基底状態周辺の 1000 個の類似配列のエネルギーを評価した。1000 個の配列セット中、その可変位置でのそのアミノ酸を含む配列の数を、その置換の占有率と呼び、この値は、その置換がどれくらい好都合であるかを反映し得る。このコンピューター処理スクリーニング方法は、US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; および PCT WO 02/25588 に記載されている通りの Protein Design Automation^(登録商標) (PDA^(登録商標)) 技法 (記載を簡単にするために、実施例中で PDA^(登録商標) 技法と呼ぶ) に実質的に類似する。これらの計算の結果を提示する表は、明示した鎖上の各可変位置 (列 1) について、各可変位置で考慮されるアミノ酸 (列 2)、各可変位置での WT の Fc アミノ酸本体 (列 3)、各可変位置での DEE 基底状態配列のアミノ酸本体 (列 4) 並びに Monte Carlo アウトプットにおいて観察されるアミノ酸のセットおよび対応する占有率 (列 5) を提供する。

【0190】

他の計算は、低エネルギー配列をスクリーニングするのに遺伝的アルゴリズム (GA) を利用し、「進化」の各ラウンドの間に標本抽出されているそれらの配列のエネルギーを計算した。可変および浮動位置でのアミノ酸の高次構造を、可撓性回転異性体モデルを使用して主鎖非依存性回転異性体ライブラリーから導かれた側鎖回転異性体のセットとして表した (Mendes et al., 1999, Proteins 37:530-543)。ファンデルワールス、溶媒和、静電気および水素結合相互作用を記述する項を含む力場を使用してエネルギーを計算した。この計算により、低エネルギーであると予想される 300 個の配列のリストが生成された。結果の分析とライブラリー生成を促進するために、配列を類似性スコアに基づいて関連グループに割り当てる最短距離単連結 (nearest neighbor single linkage) 階層的集束化アルゴリズムを使用して、300 個のアウトプット配列をコンピューター処理的に 10 個の類似配列のグループに集束させた (Diamond, 1995, Acta Cryst D51:127-135)。つまり、グループ内の全配列は、同じグループ内の全ての他の配列に最も類似し、他グループの配列にはあまり似ていない。これら 10 個のクラスターの各々からの最低エネルギー配列を、各グループの代表として使用し、結果として提示する。このコンピューター処理スクリーニング方法は、(Raha et al., 2000, Protein Sci 9:1106-1119); USSN 09/877,695; および USSN 10/071,859 に記載されている Sequence Prediction Algorithm^(商標) (SPA^(商標)) 技法 (記載を簡単にするために、実施例中で SPA^(商標) 技法と呼ぶ) に実質的に類似している。

【0191】

FcγR との結合を媒介するかまたは媒介する可能性のある可変位置の基でコンピューター処理スクリーニングを適用して、Fc/FcγR 接点でのエネルギー的に好都合な相互作用を設計した。結合の接点は、2 本の異なる鎖上の多数の Fc 残基を含むので、そして FcγR 類は非対称的に Fc に結合するので、残基を異なる相互作用する可変位置のセットにグループ化し、別個の計算のセットにおいて設計した。多くの場合、これらのセットは、共役する、つまり、1 またはそれ以上の残基のエネルギーが 1 またはそれ以上の他の残基の本体に依存すると思われる残基のグループとして選択された。様々な鑄型構造を使用し、そして多くの場合、計算は両方の鎖上の置換を探索した。可変位置セットの多くに、記載した PDA^(登録商標) および SPA^(商標) の両技法のコンピューター処理スクリーニング方法を使用して計算を実行した。これらの計算の結果並びに関連パラメーターおよび情報を、下記表 1-30 に提示する。

【0192】

これらの計算の結果を提示する表は、明示した鎖上の各可変位置（列1）について、各可変位置で考慮されるアミノ酸（列2）、各可変位置でのWTのFcアミノ酸本体（列3）、および各クラスターグループからの最低エネルギー配列の可変位置のアミノ酸本体（列4-13）を提供する。表1-59は、下記に記す通り、PDA^(登録商標)およびSPA^(商標)技法の2セットに分解される。PDA^(登録商標)の表の列4は、そのPDA^(登録商標)ランの間に上位1000配列中に生じる各残基の頻度を示す。従って、表1の第1行では、位置328で境界アミノ酸をその位置の可変残基のセットとして使用するランの場合、上位1000配列中にLは330回、Mは302回生じる、などである。

【0193】

加えて、本発明の組成物には、列挙した位置で、列挙したアミノ酸残基のいずれかを、単独でまたは任意の組合せ中に有する抗体が含まれる（好ましい組合せは、特許請求の範囲、要約および図面に列挙されていることに留意されたい）。ある好ましい組合せは、基底状態（本明細書では、野生型と区別して、「大域的解答」と呼ぶことがある）中の列挙された位置における列挙されたアミノ酸残基である。同様に、残基位置およびそれらの残基位置の特定のアミノ酸を、表の間で組み合わせてもよい。

【0194】

表4などのSPA^(商標)技法の表について、列4は、6個の列挙した位置で6個の列挙したアミノ酸を有するタンパク質をもたらすSPA^(商標)ランである（例えば、列4は、239E、265G、267S、269Y、270Tおよび299S以外は野生型の配列を有する単一のタンパク質である）。従って、これらの個々のタンパク質の各々は、本発明に含まれる。加えて、表内および表間のSPA^(商標)タンパク質間の組合せも含まれる。

【0195】

加えて、各表は、炭水化物の有無を示すが、逆の配列も明確に含まれる；例えば、表1は非グリコシル化変異体について列挙するが、これらの同じアミノ酸変化を、グリコシル化変異体で行うことができる。

【0196】

さらに、各表は、使用した鋳型構造並びに「浮動」残基を列挙する；例えば、表2は、C120、C132およびC134を浮動させるPDA^(登録商標)ランを使用した。

【0197】

表1

【表1】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
328 A	境界	L	L	L:330 M:302 E:111 K:62 A:45 Q:39 D:36 S:30 T:28 N:10 R:7
332 A	表面	I	R	R:247 K:209 Q:130 H:95 E:92 T:59 D:51 N:51 S:42 A:24
328 B	境界	L	L	L:321 M:237 T:166 K:73 R:72 S:55 Q:20 D:17 E:13 A:12 V:10 N:4
332 B	表面	I	E	E:269 Q:180 R:145 K:111 D:97 T:78 N:65 S:28 A:14 H:13

PDA^(登録商標)技法、111S鋳型構造；一炭水化物

【0198】

表2

【表 2】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	表面	S	K	E:349 D:203 K:196 A:95 Q:83 S:63 N:10 R:1
265 A	境界 XM	D	D	D:616 N:113 L:110 E:104 S:25 A:23 Q:9
299 A	境界 XM	T	I	I:669 H:196 V:135
327 A	境界 XM	A	S	A:518 S:389 N:67 D:26
265 B	境界 XM	D	Q	Q:314 R:247 N:118 I:115 A:63 E:55 D:34 S:22 K:21 V:11

PDA (登録商標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 1 2 0 C、1 3 2 C、1 3 4 C を浮動

【0199】

表 3

【表 3】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	表面	S	E	E:872 Q:69 D:39 K:16 A:4
265 A	境界 XM	D	Y	Y:693 H:111 E:69 D:62 F:29 K:19 R:14 W:2 Q:1
267 A	境界 XM	S	S	S:991 A:9
269 A	コア XM	E	F	F:938 E:59 Y:3
270 A	表面	D	E	E:267 T:218 K:186 D:89 Q:88 R:46 S:34 N:29 H:23 A:20
299 A	境界 XM	T	H	H:486 T:245 K:130 E:40 S:39 D:27 Q:27 A:4 N:2

PDA (登録商標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 1 2 0 C、1 2 2 C、1 3 2 C、1 3 3 C、1 3 4 C を浮動

【0200】

表 4

【表 4】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	表面	S	E	Q	Q	Q	E	E	E	Q	E	E
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
267 A	全 20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
269 A	コア	E	Y	Y	A	A	V	Y	A	A	A	A
270 A	表面	D	T	S	A	S	T	T	T	A	A	A
299 A	全 20	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

SPA (商標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 1 2 0 C、1 2 2 C、1 3 2 C、1 3 3 C、1 3 4 C を浮動

【0201】

表 5

【表 5】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
235 A	境界 XM	L	T	T:195 V:131 L:112 W:107 K:85 F:66 Y:56 E:52 Q:38 S:37 I:34 R:29 H:26 N:23 D:9
296 A	表面	Y	N	N:322 D:181 R:172 K:76 Y:70 Q:59 E:48 S:40 H:20 T:11 A:1
298 A	表面	S	T	T:370 R:343 K:193 A:55 S:39
235 B	境界 XM	L	L	L:922 I:78

PDA (登録商標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 1 1 9 C、1 2 8 C、1 5 7 C

を浮動

【0202】

表6

【表6】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
235 A	全 20	L	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S
296 A	表 面	Y	Q	Q	Q	E	E	Q	E	Q	Q	N
298 A	表 面	S	S	K	K	K	K	S	S	S	K	S
235 B	全 20	L	K	K	K	L	L	L	L	L	L	K

10

S P A (商 標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 1 1 9 C、1 2 8 C、1 5 7 Cを浮動

【0203】

表7

【表7】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 B	表 面	S	E	K:402 E:282 H:116 T:67 R:47 Q:39 D:26 A:11 S:7 N:3
265 B	境 界 XM	D	W	Y:341 W:283 I:236 V:77 F:36 H:9 T:7 E:4 K:4 A:2 D:1
327 B	境 界 XM	A	R	R:838 K: 86 H:35 E:12 T:10 Q:7 A:6 D:3 N:3
328 B	コ ア XM	L	L	L:1000
329 B	コ ア XM	P	P	P:801 A:199
330 B	コ ア XM	A	Y	Y:918 F:42 L:22 A:18
332 B	表 面	I	I	I:792 E:202 Q:5 K:1

20

P D A (登 録 商 標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 8 8 C、9 0 C、1 1 3 C、1 1 4 C、1 1 6 C、1 6 0 C、1 6 1 Cを浮動

【0204】

表8

【表8】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	表 面	S	D	T	E	E	E	E	E	E	E	E
265 B	全 20	D	G	G	K	G	K	G	G	K	K	G
327 B	全 20	A	K	M	L	L	N	L	K	L	L	L
328 B	コ ア	L	M	M	M	L	A	M	L	M	L	L
329 B	コ ア	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
330 B	コ ア	A	L	A	A	A	A	A	A	A	A	A
332 B	表 面	I	I	Q	I	I	Q	Q	E	D	I	I

40

S P A (商 標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 8 8 C、9 0 C、1 1 3 C、1 1 4 C、1 1 6 C、1 6 0 C、1 6 1 Cを浮動

【0205】

表9

【表 9】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	表面	S	Q	Q	Q	E	Q	E	Q	E	Q	Q
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 A	全 20	T	S	S	A	S	S	S	S	S	S	S
327 A	全 20	A	A	S	S	S	S	S	S	S	A	S
265 B	全 20	D	N	G	G	G	G	G	G	G	G	G

S P A (商 標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 1 2 0 C、1 3 2 C、1 3 4 C を浮動

【0206】

表 10

【表 10】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
234 A	境界 XM	L	K	Y:401 L:260 F:151 I:82 K:63 H:17 Q:11 W:7 R:3 T:2 E:2 V:1
235 A	境界 XM	L	L	W:777 L:200 K:12 Y:5 I:3 F:2 V:1
234 B	境界 XM	L	W	W:427 Y:203 L:143 F:74 I:59 E:32 K:23 V:14 D:10 T:7 H:4 R:4
235 B	境界 XM	L	W	W:380 Y:380 F:135 K:38 L:26 E:15 Q:12 H:8 R:4 T:2

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 1 1 3 C、1 1 6 C、1 3 2 C、1 5 5 C、1 5 7 C を浮動

【0207】

表 11

【表 11】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
234 A	全 20	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 A	全 20	L	T	L	L	L	L	L	L	L	T	L
234 B	全 20	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 B	全 20	L	S	A	S	A	A	S	S	S	A	A

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 1 1 3 C、1 1 6 C、1 3 2 C、1 5 5 C、1 5 7 C を浮動

【0208】

表 12

【表 12】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	境界 XM	S	E	E:235 S:122 D:94 Q:93 A:74 K:70 L:67 T:63 N:57 R:51 I:29 V:18 W:15 H:12
328 A	境界 XM	L	L	L:688 E:121 K:43 Q:41 A:33 D:26 S:14 T:14 N:12 R:8
332 A	境界 XM	I	W	I:155 W:95 L:82 K:79 E:74 Q:69 H:67 V:63 R:57 T:57 D:45 S:43 N:42 A:35 F:19 Y:18

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 1 2 0 C を浮動

【0209】

表 13

10

20

30

40

【表 1 3】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	全 20	S	L	E	E	Q	E	E	K	K	K	K
328 A	全 20	L	L	Q	L	Q	K	L	L	Q	K	L
332 A	全 20	I	K	K	L	Q	A	K	L	Q	A	Q

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 1 2 0 C を浮動
【 0 2 1 0 】

表 1 4

10

【表 1 4】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 B	境 界 XM	S	I	R:195 I:169 L:126 V:91 K:89 E:61 H:52 T:50 Q:42 N:35 S:34 D:30 A:26
328 B	境 界 XM	L	L	L:671 T:165 K:40 S:38 E:28 R:17 Q:17 V:11 A:8 D:5
332 B	境 界 XM	I	I	I:387 E:157 L:151 V:78 Q:63 K:50 R:33 T:29 D:25 A:12 N:8 S:6 W:1

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 9 0 C、1 6 0 C
、1 6 1 C を浮動
【 0 2 1 1 】

20

表 1 5

【表 1 5】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	全 20	S	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L
328 B	全 20	L	M	R	M	D	T	M	L	Q	D	L
332 B	全 20	I	I	D	Q	Q	Q	L	L	T	Q	L

30

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 9 0 C、1 6 0 C、1
6 1 C を浮動
【 0 2 1 2 】

表 1 6

【表 1 6】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 B	境 界 XM	S	T	T:164 S:159 L:156 E:86 W:76 K:71 D:65 A:52 R:43 H:38 Q:38 N:31 I:14 V:7
328 B	境 界 XM	L	L	L:556 E:114 T:84 K:80 S:69 Q:36 A:31 D:15 R:11 N:4
332 B	境 界 XM	I	W	I:188 W:177 E:97 L:94 T:59 Q:57 V:54 K:52 F:51 D:34 H:33 S:27 R:26 N:18 A:17 Y:16

40

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 1 1 7 C を浮動
【 0 2 1 3 】

表 1 7

【表 17】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	全 20	S	P	S	P	E	L	L	L	L	L	L
328 B	全 20	L	K	K	K	K	K	L	K	K	K	L
332 B	全 20	I	S	S	E	L	L	L	E	L	L	L

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 1 1 7 C を浮動
【 0 2 1 4 】

表 1 8

10

【表 18】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	境 界 XM	S	L	K:196 L:171 I:146 E:88 V:76 R:75 T:50 H:45 D:43 Q:39 S:30 N:22 A:19
328 A	境 界 XM	L	W	L:517 F:230 W:164 H:40 K:29 E:11 R:5 T:4
332 A	境 界 XM	I	E	I:283 L:217 E:178 Q:81 V:64 D:47 T:35 K:27 W:18 R:12 A:10 Y:7 N:7 F:6 S:5 H:3

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 8 7 C、1 5 7 C
、1 5 8 C を浮動

20

【 0 2 1 5 】

表 1 9

【表 19】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	全 20	S	F	Q	E	T	P	P	T	P	P	P
328 A	全 20	L	K	R	R	K	K	M	R	K	M	R
332 A	全 20	I	L	L	I	I	E	I	E	E	I	I

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; +炭水化物原子 ; 8 7 C、1 5 7 C
、1 5 8 C を浮動

30

【 0 2 1 6 】

表 2 0

【表 20】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
240 A	コア + Thr	V	V	V:698 M:162 T:140
263 A	コア + Thr	V	V	V:966 T:34
266 A	コア + Thr	V	V	V:983 T:17
325 A	境 界	N	N	N:943 T:40 A:17
328 A	境 界	L	L	L:610 M:363 K:27
332 A	Glu	I	E	E:1000

40

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 2 7 3 A、2 7 5
A、3 0 2 A、3 2 3 A、1 3 4 C を浮動

【 0 2 1 7 】

表 2 1

【表 2 1】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	全 20	V	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V
263 A	全 20	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
266 A	全 20	V	I	V	I	I	T	V	V	V	V	I
325 A	全 20	N	A	N	N	N	Q	T	T	Q	N	T
328 A	全 20	L	K	K	L	K	L	K	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

10

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 2 7 3 A、2 7 5 A、
3 0 2 A、3 2 3 A、1 3 4 C を浮動

【0 2 1 8】

表 2 2

【表 2 2】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
240 B	コア + Thr	V	V	V:713 T:287
263 B	コア + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	コア + Thr	V	V	V:976 T:24
325 B	境 界	N	N	N:453 T:296 A:116 D:96 S:30 V:9
328 B	境 界	L	L	L:623 M:194 T:100 R:72 K:11
332 B	Glu	I	E	E:1000

20

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物 ; 2 7 3 B、2 7 5
B、3 0 2 B、3 2 3 B、1 6 1 C を浮動

【0 2 1 9】

表 2 3

【表 2 3】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	全 20	V	A	T	A	T	T	A	A	T	T	T
263 B	全 20	V	V	A	A	T	T	V	V	T	A	T
266 B	全 20	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V
325 B	全 20	N	N	K	K	N	K	K	N	N	N	N
328 B	全 20	L	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

30

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 2 7 3 B、2 7 5 B、
3 0 2 B、3 2 3 B、1 6 1 C を浮動

40

【0 2 2 0】

表 2 4

【表 2 4】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
240 B	コア + Thr	V	M	V:715 M:271 T:12 I:2
263 B	コア + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	コア + Thr	V	V	V:996 T:4
325 B	境 界	N	N	N:651 T:232 D:64 A:53
328 B	境 界	L	M	M:556 L:407 K:37
332 B	Glu	I	E	E:1000

PDA (登録商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 2 7 3 B、2 7 5 B、3 0 2 B、3 2 3 B、1 3 1 C を浮動

【0 2 2 1】

表 2 5

【表 2 5】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	全 20	V	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A
263 B	全 20	V	T	W	T	T	A	T	T	T	L	L
266 B	全 20	V	L	A	T	T	V	L	T	T	L	V
325 B	全 20	N	A	N	A	A	N	A	A	A	A	A
328 B	全 20	L	L	K	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

SPA (商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 2 7 3 B、2 7 5 B、3 0 2 B、3 2 3 B、1 3 1 C を浮動

【0 2 2 2】

表 2 6

【表 2 6】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
240 A	コア + Thr	V	V	V:876 T:109 M:15
263 A	コア + Thr	V	V	V:913 T:87
266 A	コア + Thr	V	V	V:969 T:31
325 A	境 界	N	V	V:491 N:236 T:187 A:35 D:32 S:19
328 A	境 界	L	L	L:321 W:290 M:271 F:49 K:46 R:23
332 A	Glu	I	E	E:1000

PDA (登録商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 2 7 3 A、2 7 5 A、3 0 2 A、3 2 3 A、1 5 8 C を浮動

【0 2 2 3】

表 2 7

10

20

30

40

【表 2 7】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	全 20	V	A	T	A	A	T	T	A	A	A	T
263 A	全 20	V	T	T	V	V	T	V	L	L	V	T
266 A	全 20	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
325 A	全 20	N	Q	N	Q	Q	Q	Q	Q	Q	N	N
328 A	全 20	L	K	M	K	K	K	K	K	K	K	K
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; +炭水化物 ; 2 7 3 A、2 7 5 A、3 0 2 A、3 2 3 A、1 5 8 C を浮動

10

【0 2 2 4】

コンピューター処理スクリーニング計算は、F c 変異体の設計において N 2 9 7 炭水化物および C γ 2 ドメインの立体構造を最適化することを目指した。炭水化物と相互作用する位置でエネルギー的に好都合な置換を探索することにより、新しい好都合な可能性のある炭水化物立体構造を標本抽出する変異体を工学処理できる。F c の残基 F 2 4 1、F 2 4 3、V 2 6 2 および V 2 6 4 は F c / 炭水化物相互作用を媒介するので、標的位置である。これらの設計計算の結果を表 2 8 に提示する。

【0 2 2 5】

表 2 8

20

【表 2 8】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
241 A	コ ア	F	Y	Y:172 M:162 L:144 F:140 W:110 I:97 A:91 V:84
243 A	コ ア	F	Y	Y:211 L:204 W:199 F:160 M:141 A:85
262 A	コ ア	V	M	M:302 I:253 V:243 A:202
264 A	コ ア	V	F	I:159 M:152 V:142 L:140 W:136 F:120 Y:104 A:47

P D A (登 録 商 標) 技法、1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物

【0 2 2 6】

30

コンピューター処理スクリーニング計算は、F c 変異体の設計において C γ 3 と C γ 2 のドメイン間の角を最適化することを目指した。C γ 2 / C γ 3 接点に存在する残基 P 2 4 4、P 2 4 5、P 2 4 7 および W 3 1 3 は、C γ 2 - C γ 3 角および相互に対する各ドメインの可撓性の決定の鍵となる役割を果たすと思われる。これらの位置でエネルギー的に好都合な置換を探索することにより、新しい好都合な可能性のある角および可撓性レベルを標本抽出する変異体を設計できる。これらの設計計算の結果を表 2 9 に提示する。

【0 2 2 7】

表 2 9

【表 2 9】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
244 A	境 界	P	H	K:164 H:152 R:110 M:100 S:92 N:57 A:54 D:50 Q:49 T:46 E:37 V:30 L:27 W:23 F:9
245 A	境 界	P	A	A:491 S:378 N:131
247 A	境 界	P	V	V:156 T:125 K:101 E:87 Q:79 R:78 S:76 A:72 D:72 H:60 M:47 N:47
313 A	境 界	W	W	W:359 F:255 Y:128 M:114 H:48 K:29 T:24 A:11 E:10 V:10 S:9 Q:3

40

P D A (登 録 商 標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; -炭水化物

【0 2 2 8】

50

PDA(登録商標)およびSPA(商標)コンピューター処理スクリーニング方法を使用する上記の計算に加えて、静電気ポテンシャルを単独で使用するさらなる計算を使用してFc変異体をコンピューター处理的にスクリーニングした。クーロンの法則およびDebye-Huckelのスクーリングを用いる計算は、1またはそれ以上のFcγR類への結合に好都合に影響するであろうアミノ酸置換のためのFc中の数々の位置を強調し、これには、中性アミノ酸の負荷電アミノ酸による置き換えがFcγRIIIaへの結合を増強し得る位置、および正荷電アミノ酸の中性または負荷電アミノ酸による置き換えがFcγRIIIaへの結合を増強し得る位置が含まれる。これらの結果を表30に提示する。

【0229】

表30

10

【表30】

+残基の一残基による置き換え	中性残基の一残基による置き換え
H268	S239
K326	Y296
K334	A327
	I332

クーロンの法則および Debye-Huckel のスクーリング；1IIIS 鑄型構造；+炭水化物

【0230】

非グリコシル化Fcを最適化するために、つまり、N297炭水化物の非存在下で、Fcの構造、安定性、溶解性およびFc/FcγR親和性を最適化するために、コンピューター処理スクリーニング計算を実行した。設計計算は、非グリコシル化Fc鑄型構造に関して、残基297、それに近接する残基、Fc/FcγR接点の残基、Fc/炭水化物接点の残基で好都合な置換を設計することを目指した。可変位置を別々の相互作用する可変位置のセットにグループ化し、別個の計算のセットで設計し、そして様々な鑄型構造を使用した。可変位置のセットの多くに、PDA(登録商標)およびSPA(商標)の両コンピューター処理スクリーニング方法を使用して計算を実行した。これらの計算の結果および関連情報を、下記表31-53に提示する。

20

【0231】

表31

30

【表31】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
265 A	境界 XM	D	Y	Y:531 F:226 W:105 H:92 K:21 D:16 E:6 T:3
297 A	境界 XM	N	D	A:235 S:229 D:166 E:114 N:92 Y:57 F:55 Q:25 H:10 T:7 K:6 L:3 R:1
299 A	境界 XM	T	L	L:482 Y:186 F:131 T:55 S:51 K:31 H:22 A:18 E:14 Q:10
297 B	境界 XM	N	I	I:299 K:147 V:85 R:82 W:71 N:65 D:35 E:35 Q:34 S:32 L:31 H:30 T:28 A:26

40

PDA(登録商標)技法；1IIIS 鑄型構造；-炭水化物；122C、129C、132C、155Cを浮動

【0232】

表32

【表 3 2】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	全 20	N	A	T	A	E	K	K	A	A	N	N
299 A	全 20	T	S	K	S	K	F	F	F	F	F	S
297 B	全 20	N	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

S P A (商 標) 技法 ; 1 I I S 鋳型構造 ; ー炭水化物 ; 1 2 2 C、1 2 9 C、1 3 2 C、1 5 5 Cを浮動

【0 2 3 3】

表 3 3

【表 3 3】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	表 面	S	E	E:928 Q:65 D:7
265 A	境 界 XM	D	W	W:709 Y:248 F:43
296 A	表 面	Y	H	H:449 Y:146 E:137 D:89 K:64 N:32 T:30 R:25 Q:23 S:5
297 A	表 面	N	E	E:471 H:189 D:102 T:97 K:96 R:22 Q:15 S:8
298 A	境 界 XM	S	R	R:353 T:275 K:269 A:56 S:38 E:5 Q:2 H:2
299 A	境 界 XM	T	F	Y:398 F:366 L:217 H:15 K:4

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; ー炭水化物 ; 1 2 0 C、1 2 2 C、1 2 8 C、1 3 2 C、1 5 5 Cを浮動

【0 2 3 4】

表 3 4

【表 3 4】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	全 20	S	E	Q	Q	E	Q	Q	Q	Q	Q	Q
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	全 20	Y	D	Q	N	N	Q	N	N	N	Q	N
297 A	全 20	N	A	A	N	A	D	D	E	N	N	E
298 A	全 20	S	K	K	K	S	K	K	K	K	S	K
299 A	全 20	T	S	Y	F	S	Y	F	K	F	S	K

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; ー炭水化物 ; 1 2 0 C、1 2 2 C、1 2 8 C、1 3 2 C、1 5 5 Cを浮動

【0 2 3 5】

表 3 5

10

20

30

40

【表 3 5】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 B	表面	S	E	E:417 T:122 D:117 Q:94 R:84 S:63 K:47 H:29 N:19 A:8
265 B	境界 XM	D	W	W:865 Y:79 F:55 K:1
296 B	表面	Y	Y	Y:549 H:97 D:80 S:75 N:48 E:45 K:32 R:30 Q:28 A:16
297 B	表面	N	R	R:265 H:224 E:157 K:154 Q:75 D:47 T:34 N:24 S:13 A:7
298 B	境界 XM	S	V	V:966 D:10 T:8 A:8 N:4 S:4
299 B	境界 XM	T	Y	Y:667 F:330 H:3

PDA (登録商標) 技法; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造; 一炭水化物; 1 1 7 C、1 1 9 C、1 2 5 C、1 2 9 C、1 5 2 Cを浮動

【0 2 3 6】

表 3 6

【表 3 6】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	全 20	S	S	R	E	K	S	S	E	E	E	K
265 B	全 20	D	A	D	K	Y	A	A	F	F	K	Y
296 B	全 20	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	全 20	N	T	S	T	T	E	E	E	S	E	E
298 B	全 20	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	全 20	T	L	F	E	E	Y	F	Y	F	Y	Y

SPA (商標) 技法; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造; 一炭水化物; 1 1 7 C、1 1 9 C、1 2 5 C、1 2 9 C、1 5 2 Cを浮動

【0 2 3 7】

表 3 7

【表 3 7】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	表面	S	E	E:868 Q:92 D:38 K:1 N:1
265 A	境界 XM	D	W	W:575 Y:343 F:66 H:15 K:1
296 A	表面	Y	H	H:489 Y:103 R:98 K:97 Q:64 D:63 T:41 N:38 E:7
297 A	Asp	N	D	D:1000
298 A	境界 XM	S	R	R:340 K:262 T:255 A:59 S:57 E:11 Q:10 H:6
299 A	境界 XM	T	F	Y:375 F:323 L:260 H:24 K:18

PDA (登録商標) 技法; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造; 一炭水化物; 1 2 0 C、1 2 2 C、1 2 8 C、1 3 2 C、1 5 5 Cを浮動

【0 2 3 8】

表 3 8

10

20

30

40

【表 3 8】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	全 20	S	E	Q	E	E	E	E	E	E	Q	E
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	全 20	Y	E	N	Q	E	N	Q	Q	Q	Q	N
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 A	全 20	S	K	S	K	S	K	K	K	S	K	K
299 A	全 20	T	S	K	Y	S	F	F	F	F	F	K

10

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 1 2 0 C、1 2 2 C、1 2 8 C、1 3 2 C、1 5 5 Cを浮動

【0 2 3 9】

表 3 9

【表 3 9】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 B	表 面	S	E	E:318 Q:123 T:109 D:108 R:93 S:89 K:69 N:40 H:38 A:13
265 B	境 界 XM	D	W	W:745 Y:158 F:85 K:9 E:1 R:1 H:1
296 B	表 面	Y	Y	Y:390 H:127 S:83 R:81 K:78 N:65 D:55 E:49 Q:44 A:26 T:2
297 B	Asp	N	D	D:1000
298 B	境 界 XM	S	V	V:890 T:35 A:29 D:19 S:16 N:10 E:1
299 B	境 界 XM	T	Y	Y:627 F:363 H:10

20

P D A (登 録 商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 1 1 7 C、1 1 9 C、1 2 5 C、1 2 9 C、1 5 2 Cを浮動

30

【0 2 4 0】

表 4 0

【表 4 0】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	全 20	S	K	E	E	Q	E	K	Q	E	K	Q
265 B	全 20	D	F	K	K	A	K	Y	W	K	L	F
296 B	全 20	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 B	全 20	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	全 20	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	Y	Y

40

S P A (商 標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 1 1 7 C、1 1 9 C、1 2 5 C、1 2 9 C、1 5 2 Cを浮動

【0 2 4 1】

表 4 1

【表 4 1】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 A	境界 XM	S	E	E:312 L:148 D:102 Q:98 K:64 I:61 S:57 A:44 T:39 N:29 R:23 V:18 W:5
265 A	境界 XM	D	W	W:363 Y:352 F:139 H:77 K:39 R:14 D:11 E:4 Q:1
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	境界 XM	T	Y	Y:309 F:224 L:212 H:96 K:92 E:28 Q:20 R:16 T:2 S:1

10

PDA (登録商標) 技法; D129G 111S 鋳型構造; 一炭水化物; 120C、122C、132C、155Cを浮動

【0242】

表 4 2

【表 4 2】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	全 20	S	E	L	L	L	E	E	E	Q	L	E
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	全 20	T	S	K	K	F	F	F	K	F	K	F

20

SPA (商標) 技法; D129G 111S 鋳型構造; 一炭水化物; 120C、122C、132C、155Cを浮動

【0243】

表 4 3

【表 4 3】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
239 B	境界 XM	S	L	L:194 T:122 S:120 E:111 D:79 K:71 A:62 Q:57 R:43 H:43 N:37 I:24 W:24 V:13
265 B	境界 XM	D	W	Y:248 W:233 F:198 K:84 D:57 E:55 H:42 R:28 Q:20 A:10 T:10 N:8 S:7
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	境界 XM	T	Y	Y:493 F:380 H:76 T:31 E:10 D:4 A:3 S:3

30

PDA (登録商標) 技法; D129G 1E4K 鋳型構造; 一炭水化物; 117C、119C、129C、152Cを浮動

【0244】

表 4 4

【表 4 4】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	全 20	S	R	E	P	L	L	F	P	P	L	L
265 B	全 20	D	D	K	S	F	S	Y	A	M	A	D
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	全 20	T	Y	Y	Y	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y

40

SPA (商標) 技法; D129G 1E4K 鋳型構造; 一炭水化物; 117C、119C、129C、152Cを浮動

50

【0245】

表45

【表45】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周囲のアミノ酸
239 A	境界 XM	S	E	E:251 L:125 D:120 Q:112 S:73 K:65 I:61 A:58 T:45 N:35 R:28 V:23 W:4
265 A	境界 XM	D	Y	Y:216 H:153 K:135 D:109 W:104 F:86 R:54 T:38 E:29 Q:22 A:21 N:17 S:13 L:3
297 A	Asp	N	D	D:1000

10

PDA(登録商標)技法; D129G 1IIIS 鋳型構造; 一炭水化物; 299A、120C、122C、132C、155Cを浮動

【0246】

表46

【表46】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	全 20	S	S	L	E	L	Q	Q	E	Q	Q	E
265 A	全 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

20

SPA(商標)技法; D129G 1IIIS 鋳型構造; 一炭水化物; 299A、120C、122C、132C、155Cを浮動

【0247】

表47

【表47】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周囲のアミノ酸
239 B	境界 XM	S	L	L:158 S:137 T:125 E:115 D:86 K:75 A:62 Q:56 H:43 R:39 N:35 W:30 I:24 V:15
265 B	境界 XM	D	Y	Y:188 W:159 F:156 D:122 K:77 E:71 H:61 Q:44 R:39 A:24 S:22 N:19 T:18
297 B	Asp	N	D	D:1000

30

PDA(登録商標)技法; D129G 1E4K 鋳型構造; 一炭水化物; 299B、117C、119C、129C、152Cを浮動

【0248】

表48

【表48】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	全 20	S	S	E	P	P	E	S	P	L	F	L
265 B	全 20	D	A	K	A	M	K	F	Y	D	F	F
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

40

SPA(商標)技法; D129G 1E4K 鋳型構造; 一炭水化物; 299B、117C、119C、129C、152Cを浮動

【0249】

表49

【表 4 9】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	境界 XM	T	Y	T:123 Y:64 H:64 K:64 Q:64 F:64 R:63 D:63 E:63 S:63 L:63 N:62 I:57 A:54 V:52 W:17

PDA (登録商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 2 3 9 A、2 6 5 A、1 2 0 C、1 2 2 C、1 3 2 C、1 5 5 C を浮動

【0 2 5 0】

表 5 0

【表 5 0】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	全 20	T	K	K	K	K	F	F	K	K	K	K

SPA (商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 I I S 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 2 3 9 A、2 6 5 A、1 2 0 C、1 2 2 C、1 3 2 C、1 5 5 C を浮動

【0 2 5 1】

表 5 1

【表 5 1】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	境界 XM	T	Y	T:123 F:64 Y:64 H:64 S:63 N:61 Q:61 D:61 E:60 K:58 V:57 A:57 R:54 I:52 L:51 W:50

PDA (登録商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 2 3 9 B、2 6 5 B、1 1 7 C、1 1 9 C、1 2 9 C、1 5 2 C を浮動

【0 2 5 2】

表 5 2

【表 5 2】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	全 20	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

SPA (商標) 技法 ; D 1 2 9 G 1 E 4 K 鋳型構造 ; 一炭水化物 ; 2 3 9 B、2 6 5 B、1 1 7 C、1 1 9 C、1 2 9 C、1 5 2 C を浮動

【0 2 5 3】

非グリコシル化Fcを最適化するために、グリコシレーションの非存在下で溶媒に露出する位置で、それらが安定し、Fc構造を維持し、凝集する傾向のないように、好都合な置換を設計することにより、コンピューター処理スクリーニング計算を実行した。N297炭水化物は、通常なら他のIgドメインとのタンパク質-タンパク質相互作用の接点であったであろう露出した疎水性区画を覆い、Fcの安定性および構造的完全性を維持し、Cy2ドメインが中心軸を超えて凝集しないようにしている。設計の鍵となる残基は、Cy2上で炭水化物の陰にあるF241、F243、V262およびV264、並びに、向かい合うCy2ドメインに向かって内側に面する露出した非極性残基であるL328、I332およびI336などの残基であり、これは、以前に提示した計算において考慮され

10

20

30

40

50

た。これらのC γ 2残基の重要性は、配列アラインメントにより対応するC γ 3ドメイン中の残基が、2個のC γ 3ドメイン間の非極性相互作用を媒介しているか、またはC γ 3コアに埋もれているかのいずれかであることを留意することにより支持される。これらの設計計算の結果を表53に提示する。

【0254】

表53

【表53】

位置	考慮されるアミノ酸	WT	基底状態	基底状態周辺のアミノ酸
241 A	表面	F	E	E:190 R:172 K:138 H:117 T:93 Q:91 D:85 S:49 N:49 A:16
243 A	表面	F	R	R:190 H:164 Q:152 E:149 K:92 T:71 D:64 N:58 S:42 A:18
262 A	表面	V	D	D:416 E:164 N:138 Q:87 T:83 R:44 S:32 K:24 A:11 H:1
264 A	表面	V	H	R:368 H:196 K:147 E:108 Q:68 T:34 N:33 D:25 S:15 A:6

10

PDA(登録商標)技法; 1 I I S 鋳型構造; 一炭水化物

【0255】

計算の最終セットでは、SPA(商標)コンピューター処理スクリーニング法を適用し、全ての選択された可変位置の全20個のアミノ酸による置き換えを評価した。全20個のアミノ酸の最低エネルギーの回転異性体の立体構造を決定し、このエネルギーをその可変位置でのそのアミノ酸の置換のエネルギーとして定義した。従って、これらの計算は、各可変位置で20アミノ酸の各々について置換のエネルギーをもたらした。これらのデータは、Fc/Fc γ Rの親和性、Fcの安定性、Fcの溶解性、炭水化物の立体構造およびヒンジの立体構造の最適化を含む、グリコシル化および非グリコシル化の両方のFcを目指す様々な設計目標に有用であった。さらに、これらの計算は好都合と不都合の両方の置換についてエネルギーを提供するので、それらは、活性化対阻害性Fc γ R類への異なる結合を可能にし得る置換を先導する。様々な鋳型構造を使用した。計算は両鎖上の置換を探索した。これらの計算の結果並びに関連パラメーターおよび情報を、下記表54-59に提示する。列1は、1 I I S 鋳型構造の鎖AおよびB上の可変位置を列挙する。列2は、各可変位置の野生型アミノ酸本体を列挙する。残りの20列は、天然の20個のアミノ酸(最上行に示す)の各々のエネルギーを提供する。全置換を、0エネルギーに設定した最低エネルギー置換に関して標準化した。例えば、表54中、鎖AのL235について、セリンが最低エネルギー置換であり、L235AはL235Sよりも0.9 kcal/mol安定性が低い。極度に高いエネルギーは、20ないし50 kcal/molのエネルギーについて20 kcal/mol、そして50 kcal/molより高いエネルギーについて50 kcal/molに設定した。好都合な置換は、各位置についての最低エネルギーの置換、および最低エネルギー置換とのエネルギー差が小さい置換、例えば1-2、1-3、1-5または1-10 kcal/mol以内の置換であると考えられる。

20

30

40

【0256】

【表 5 4】

表 5 4

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0.9	2.8	2.8	1.5	3.2	3.2	3.4	4.9	1.6	2.1	3.2	0.9	0.3	1.3	0.7	0.0	1.7	4.3	6.5	3.2
236 A	G	0.0	1.9	5.1	6.7	10.0	2.3	4.3	17.2	5.7	20.0	4.6	3.2	12.6	5.6	6.1	0.6	6.2	12.0	6.7	20.0
237 A	G	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	20.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0
239 A	S	0.2	4.3	2.6	0.0	12.8	4.5	6.9	11.3	1.7	0.1	2.1	1.7	7.9	1.2	2.6	0.3	5.7	11.0	20.0	20.0
265 A	D	9.0	8.1	6.3	7.8	5.1	0.0	7.3	50.0	8.2	9.9	7.7	6.0	50.0	9.0	8.5	7.8	20.0	50.0	20.0	5.8
267 A	S	2.1	3.3	7.3	1.4	50.0	7.3	20.0	20.0	0.9	2.2	5.0	4.8	0.0	2.2	3.1	2.9	20.0	20.0	50.0	50.0
269 A	E	0.5	2.1	1.3	0.6	1.6	3.9	2.0	1.2	1.1	1.3	2.7	0.0	50.0	0.6	1.1	0.3	0.8	1.0	5.6	1.2
270 A	D	0.3	2.8	2.3	2.0	4.0	4.0	3.4	2.4	1.2	0.0	2.3	2.1	20.0	2.0	2.3	1.4	1.8	4.2	5.4	6.0
296 A	Y	2.7	2.0	1.4	0.0	50.0	0.0	50.0	4.6	2.1	2.4	3.3	1.2	50.0	0.2	1.5	1.3	4.6	4.4	16.3	18.2
298 A	S	0.7	2.4	6.7	3.4	20.0	3.9	20.0	6.7	0.0	4.1	1.4	4.1	50.0	1.8	1.1	0.2	2.2	6.3	17.8	20.0
299 A	T	0.6	2.8	11.5	10.1	20.0	6.1	20.0	10.7	7.1	20.0	4.3	6.8	50.0	6.3	12.0	0.0	3.0	7.1	14.8	20.0
234 B	L	2.1	3.2	4.1	4.2	1.6	5.3	0.1	0.7	0.6	1.0	2.0	1.7	50.0	2.8	0.3	2.3	1.7	2.6	13.0	0.0
235 B	L	0.6	2.3	2.5	0.7	5.4	4.8	1.4	3.6	0.1	0.0	2.0	1.7	16.6	0.5	1.2	0.7	0.7	5.3	6.8	5.5
236 B	G	3.1	1.3	4.4	8.2	5.2	0.0	1.9	20.0	3.1	20.0	4.1	2.7	50.0	3.7	16.0	1.2	20.0	20.0	20.0	11.3
237 B	G	20.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
239 B	S	0.9	2.4	3.4	1.8	5.4	5.6	2.7	3.0	0.9	0.0	2.0	1.6	50.0	1.8	1.8	1.4	1.4	5.1	20.0	5.3
265 B	D	4.5	5.1	4.6	4.6	4.9	0.0	3.8	9.0	2.0	2.5	4.1	2.1	50.0	4.5	5.1	4.4	5.9	9.2	11.4	5.8
327 B	A	1.8	3.4	4.7	3.9	20.0	7.0	20.0	20.0	0.8	0.0	1.9	1.5	20.0	3.0	2.6	3.2	20.0	20.0	20.0	20.0
328 B	L	3.7	3.6	4.0	3.7	50.0	8.4	6.8	50.0	3.8	0.0	2.1	4.1	50.0	3.6	8.1	4.9	3.0	12.5	50.0	50.0
329 B	P	3.4	8.6	20.0	20.0	50.0	8.0	16.8	50.0	20.0	20.0	16.9	20.0	0.0	20.0	20.0	1.3	17.1	16.5	50.0	50.0
330 B	A	0.5	2.0	2.6	0.5	2.4	3.8	1.4	4.2	0.0	2.0	2.2	0.8	20.0	0.1	0.6	0.9	0.3	5.1	8.0	2.7
332 B	I	1.5	2.7	1.2	1.6	11.9	6.8	12.9	1.2	2.9	0.0	1.4	1.7	50.0	1.3	4.9	1.8	1.7	3.0	20.0	20.0

SPA™ 技法； 111S 鋳型構造；+炭水化物原子、浮動位置なし

【表 5 5】

表 5 5

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0.9	2.8	2.6	1.7	3.3	3.3	3.4	5.0	1.6	2.1	3.3	1.0	0.3	1.4	1.8	0.0	1.9	3.6	6.6	3.3
236 A	G	0.0	1.7	5.2	6.0	11.3	2.3	4.4	17.2	5.8	19.0	4.9	3.3	8.2	5.6	6.0	0.8	5.6	11.8	6.6	20.0
237 A	G	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	20.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0
238 A	P	8.6	8.0	10.5	13.4	6.4	0.0	5.0	50.0	12.4	11.3	9.7	9.3	3.2	12.4	20.0	8.6	50.0	50.0	20.0	8.4
239 A	S	0.1	4.2	2.5	0.0	20.0	4.5	9.0	10.8	1.8	0.2	2.1	1.8	9.1	1.3	2.5	0.3	5.7	10.7	20.0	19.7
240 A	V	1.3	2.4	2.3	6.3	20.0	7.2	20.0	5.1	10.8	6.2	5.7	2.0	1.1	9.5	13.1	2.5	0.5	0.0	20.0	20.0
241 A	F	0.1	1.6	1.2	0.3	0.2	4.1	1.2	10.0	1.3	0.1	2.1	0.4	14.7	0.5	1.1	0.1	0.0	8.3	3.6	0.4
242 A	L	3.0	3.4	5.5	8.3	14.4	8.5	11.1	3.3	13.9	2.2	2.7	5.5	0.9	7.9	17.1	3.8	2.3	0.0	20.0	17.5
243 A	F	1.6	2.2	2.7	0.2	1.4	5.6	2.5	0.0	2.2	2.0	3.0	2.3	10.2	0.5	1.6	1.3	0.9	1.2	5.3	1.6
244 A	P	1.2	1.8	3.8	0.8	10.2	3.8	4.6	20.0	0.2	2.9	2.0	2.8	2.0	0.9	1.7	0.0	19.3	20.0	7.6	12.2
245 A	P	3.9	20.0	20.0	20.0	20.0	9.1	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.0	20.0	20.0	8.0	20.0	50.0	20.0	20.0
246 A	K	1.3	2.7	2.0	2.0	2.9	5.7	2.9	1.4	1.4	1.5	3.1	0.2	0.0	1.2	1.5	1.7	1.4	1.2	5.4	3.0
247 A	P	1.2	2.1	0.3	0.7	4.0	3.9	3.7	1.8	1.6	1.7	3.3	0.0	0.5	0.9	1.5	0.7	1.1	1.3	6.9	3.7
248 A	K	0.9	2.7	1.5	0.8	3.1	4.7	3.4	3.3	2.0	1.9	2.6	1.2	3.6	1.5	2.3	0.7	0.0	2.5	5.6	2.7
249 A	D	1.2	3.7	1.6	0.0	20.0	7.3	19.7	50.0	1.7	20.0	2.2	1.4	20.0	1.5	3.4	2.5	18.3	50.0	20.0	20.0
250 A	T	0.0	1.8	3.8	5.8	50.0	6.0	20.0	4.5	6.3	6.3	0.3	3.2	50.0	8.7	9.3	1.8	1.3	1.9	20.0	50.0
251 A	L	1.1	1.9	1.2	0.5	5.8	5.1	1.9	5.6	0.9	0.7	2.4	1.4	50.0	0.0	1.4	0.5	0.8	6.9	8.9	5.8
252 A	M	0.3	1.2	0.6	0.0	3.0	3.8	3.4	3.9	1.0	0.3	2.2	0.3	17.4	0.1	1.1	0.1	0.2	4.6	4.2	3.3
253 A	I	0.7	1.7	1.1	0.2	1.8	3.5	2.2	2.0	0.3	1.2	0.8	0.8	0.3	0.0	1.1	0.3	0.5	2.8	2.4	1.9
254 A	S	0.7	1.7	0.4	0.7	2.2	3.6	2.0	0.3	1.2	1.9	2.4	0.0	20.0	0.3	1.2	0.3	0.8	0.7	3.8	1.9
255 A	R	1.4	2.8	2.4	2.5	0.2	5.4	1.1	17.0	1.0	2.2	1.5	1.7	50.0	2.1	0.0	2.3	50.0	17.2	4.0	0.5
256 A	T	0.6	1.8	1.2	1.1	2.7	3.4	2.1	1.4	0.7	1.5	2.4	0.0	0.4	0.1	0.2	0.4	0.9	1.2	5.6	2.7
257 A	P	0.0	7.8	20.0	12.9	50.0	6.2	50.0	20.0	12.3	12.8	14.4	20.0	0.1	13.1	20.0	2.9	16.0	20.0	50.0	50.0
258 A	E	0.0	1.6	4.8	2.6	1.0	4.3	2.2	14.8	4.4	6.2	3.2	2.9	10.4	7.4	6.0	1.0	6.2	17.6	20.0	1.0
259 A	V	3.9	4.3	5.1	8.7	20.0	10.3	6.8	2.3	9.6	2.8	6.2	4.1	50.0	9.2	20.0	5.2	2.1	0.0	20.0	20.0
260 A	T	1.7	2.3	3.3	1.1	20.0	6.6	8.6	0.0	0.2	1.8	2.8	1.8	1.1	0.8	0.9	1.7	0.4	1.9	7.1	20.0

表55 (続き)

261 A	C	0.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	3.9	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
262 A	V	1.9	3.2	0.0	3.3	20.0	7.2	20.0	8.3	2.9	2.9	2.2	0.6	50.0	3.8	5.2	3.4	3.0	1.7	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
263 A	V	2.2	2.7	6.0	17.4	20.0	8.8	20.0	10.0	7.1	7.6	16.9	5.2	50.0	19.8	17.7	2.8	1.4	0.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
264 A	V	1.9	3.3	2.8	2.2	0.0	6.4	2.1	0.7	2.6	0.9	2.7	2.1	2.3	2.6	2.7	2.2	1.1	0.6	3.9	0.1			
265 A	D	9.0	8.1	5.9	8.6	5.3	0.0	7.3	50.0	7.9	9.7	7.5	5.5	50.0	10.2	8.6	7.9	20.0	50.0	20.0	5.7			
266 A	V	4.9	5.3	7.1	12.1	20.0	11.2	20.0	0.4	12.2	20.0	8.8	7.1	50.0	12.2	20.0	6.1	3.8	0.0	20.0	20.0			
267 A	S	2.3	3.5	7.2	1.3	50.0	7.4	20.0	20.0	0.7	1.4	3.9	4.7	0.0	2.3	3.1	3.0	20.0	20.0	50.0	50.0			
268 A	H	1.2	1.9	2.2	1.5	3.7	5.0	4.9	0.4	0.5	3.7	2.7	1.7	0.0	1.4	1.7	1.1	0.2	0.9	6.1	3.7			
269 A	E	0.3	1.9	1.3	0.5	1.3	3.7	1.9	1.1	0.8	1.2	2.5	0.0	50.0	0.6	0.8	0.2	0.6	0.7	4.0	1.0			
270 A	D	0.2	2.6	2.1	1.9	5.2	3.9	3.1	2.1	1.2	0.0	2.2	1.9	20.0	1.9	1.8	1.2	1.7	4.1	5.1	7.0			

【表 5 7】

表 5 5 (続き)

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
271 A	P	0.0	5.3	8.1	9.3	20.0	3.1	9.1	20.0	6.0	9.5	5.3	7.3	5.9	5.9	5.9	1.6	4.1	15.2	20.0	20.0
272 A	Q	0.8	1.9	0.9	1.2	3.0	3.2	3.7	3.7	1.6	1.8	3.2	0.3	50.0	1.1	1.6	0.0	1.0	3.5	4.0	3.4
273 A	V	1.2	2.9	1.8	20.0	20.0	7.1	20.0	6.8	20.0	20.0	20.0	0.0	2.8	20.0	20.0	2.1	1.4	1.7	20.0	20.0
274 A	K	0.4	1.8	1.4	0.8	1.9	3.9	2.4	1.4	0.7	1.1	2.9	0.9	20.0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.7	3.3	2.3
275 A	F	8.0	9.5	10.3	9.5	0.0	13.5	5.1	10.1	6.2	6.3	6.0	9.1	6.1	9.1	15.1	9.6	7.2	6.1	13.5	4.3
276 A	N	1.3	2.4	2.4	2.2	0.8	5.1	0.8	1.2	0.6	2.3	2.5	1.8	50.0	1.6	2.5	1.2	0.0	0.3	4.2	3.6
277 A	W	5.5	7.4	8.4	6.4	15.4	11.2	3.2	8.2	1.9	3.9	3.6	6.6	3.5	5.5	15.4	6.9	6.1	14.1	0.0	20.0
278 A	Y	1.6	2.7	3.9	1.6	1.0	7.3	3.4	17.7	1.4	7.5	2.1	0.0	50.0	1.9	2.2	2.6	9.9	20.0	15.8	1.4
279 A	V	3.1	4.1	4.0	2.2	20.0	8.1	9.7	8.5	0.0	1.4	3.1	3.3	20.0	1.9	4.6	4.3	3.4	4.2	20.0	20.0
280 A	D	1.8	2.6	2.7	0.2	11.5	2.9	8.8	20.0	3.4	3.2	2.8	3.8	50.0	0.0	3.7	0.6	6.8	12.7	11.9	11.4
281 A	G	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
282 A	V	0.9	2.1	1.6	1.1	2.9	4.2	3.5	1.4	1.5	1.8	3.6	0.4	18.9	0.5	1.0	0.0	0.6	0.9	4.7	3.1
283 A	E	0.7	1.6	0.7	0.5	1.0	4.4	1.4	0.4	1.2	1.8	1.9	0.0	0.4	0.6	1.5	0.4	0.3	1.2	4.1	0.9
284 A	V	0.0	2.2	3.1	1.2	20.0	5.0	20.0	4.0	0.7	2.6	0.8	2.6	50.0	0.8	0.7	0.8	0.1	1.5	20.0	20.0
285 A	H	0.2	1.4	3.1	1.3	3.0	2.0	2.4	3.6	1.1	2.6	3.0	0.7	2.2	0.2	0.8	0.0	1.1	4.7	4.9	4.0
286 A	N	0.8	2.5	1.2	1.1	2.4	4.7	2.7	2.1	0.0	0.7	1.8	0.6	20.0	1.2	0.7	0.9	1.7	2.1	5.2	2.7
287 A	A	0.6	2.6	5.8	3.3	10.4	5.4	9.1	11.3	0.0	4.4	1.3	3.6	50.0	2.6	2.3	1.0	1.9	12.5	9.1	10.4
288 A	K	0.8	2.6	2.0	1.3	3.0	3.4	3.8	2.3	1.4	1.7	2.5	0.3	50.0	0.5	1.3	0.0	0.4	2.0	4.5	3.6
289 A	T	0.3	1.9	4.7	1.1	3.1	3.6	2.9	10.5	0.4	2.7	1.6	2.1	8.2	1.2	2.0	0.0	0.4	12.0	3.9	3.2
290 A	K	1.7	2.2	0.5	0.6	3.0	1.3	3.0	3.7	1.7	2.1	3.2	0.0	50.0	0.7	2.0	0.3	1.3	3.3	5.6	3.3
291 A	P	1.6	3.1	1.8	0.5	1.9	5.5	1.8	0.1	0.5	1.5	1.2	1.2	0.7	0.0	2.9	2.2	0.9	1.3	2.6	0.9
292 A	R	1.1	2.2	3.1	0.8	5.9	4.4	8.0	5.0	0.0	1.6	2.1	1.1	8.4	0.2	0.4	1.0	1.3	4.7	8.3	5.7
293 A	E	2.2	6.5	9.0	17.9	16.3	0.0	13.2	50.0	12.8	10.3	10.3	7.2	5.5	15.1	14.5	3.5	20.0	50.0	14.5	17.1
294 A	E	1.5	2.1	2.1	0.7	8.1	2.8	3.3	2.0	2.6	1.8	2.8	1.0	50.0	1.3	1.3	0.5	0.0	3.4	11.2	10.2
295 A	Q	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
296 A	Y	2.8	2.3	1.1	0.4	50.0	0.0	50.0	4.6	2.2	2.3	3.1	0.9	50.0	0.2	1.8	1.3	4.7	4.8	18.2	20.0

【0 2 6 0】

10

20

30

40

【表 5 8】

表 5 5 (続き)

297 A	N	0.0	6.5	8.4	5.3	20.0	3.4	20.0	13.8	2.7	20.0	4.8	9.3	50.0	4.4	4.4	1.5	1.6	15.5	20.0	20.0
298 A	S	0.8	2.4	5.7	2.2	20.0	3.7	20.0	6.2	0.9	9.2	1.8	3.3	50.0	1.7	2.1	0.0	2.2	7.3	15.6	20.0
299 A	T	1.9	3.4	6.0	3.1	1.0	7.1	2.9	3.1	0.0	2.7	2.6	3.6	50.0	2.2	2.5	1.1	2.2	5.4	3.6	1.4
300 A	Y	2.8	2.9	2.7	4.5	20.0	4.0	7.5	13.1	1.2	0.0	2.2	2.3	50.0	3.3	4.0	2.6	1.1	1.1	11.0	2.4
301 A	R	3.0	3.5	3.8	2.8	0.8	3.4	1.8	0.0	1.3	0.7	2.6	2.5	50.0	2.6	2.3	2.9	1.8	0.9	9.8	1.8
302 A	V	2.7	4.6	6.7	3.9	2.8	8.9	1.2	6.9	2.7	2.0	2.2	4.8	50.0	4.7	3.2	4.3	7.7	3.8	0.0	8.4
303 A	V	0.0	2.2	3.3	1.0	6.7	4.5	5.3	1.4	2.5	3.1	2.0	3.1	1.0	2.1	2.9	0.4	0.4	2.9	10.9	6.2
304 A	S	0.0	12.1	10.8	20.0	20.0	6.2	20.0	20.0	17.2	20.0	11.9	16.6	50.0	20.0	16.6	2.2	14.2	17.9	20.0	20.0
305 A	V	1.1	2.3	3.3	1.2	0.3	5.4	1.2	0.0	0.9	1.1	2.8	1.1	3.9	1.1	1.4	1.2	0.9	0.0	0.8	0.8

【表 5 9】

表 5 5 (続き)

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
306 A	L	4.3	6.2	7.1	5.9	2.8	10.4	3.4	13.7	3.0	0.0	3.5	6.0	50.0	5.9	9.9	6.2	5.3	11.4	9.6	10.3
307 A	T	1.4	3.2	3.8	2.2	6.5	5.5	4.2	0.5	0.3	4.2	3.0	2.2	0.0	1.9	1.3	1.4	0.9	1.2	6.2	6.5
308 A	V	1.8	5.5	6.5	8.0	50.0	7.9	20.0	4.5	20.0	5.5	19.4	7.6	50.0	7.7	15.5	0.0	0.7	5.9	50.0	50.0
309 A	L	1.1	2.7	0.7	0.7	1.3	4.6	2.7	0.7	1.7	1.0	2.8	0.0	1.6	0.7	1.3	1.0	0.6	0.5	5.0	2.1
310 A	H	2.0	2.6	0.9	4.1	50.0	5.6	0.2	6.8	4.0	7.1	4.0	0.0	0.2	4.9	10.0	2.0	2.5	6.4	50.0	50.0
311 A	Q	0.6	2.5	1.6	1.6	2.5	4.3	1.6	1.4	0.6	0.9	2.9	0.9	1.7	0.8	0.9	0.0	0.3	2.2	4.6	2.0
312 A	N	5.4	5.1	5.9	1.3	20.0	0.0	20.0	10.0	3.4	4.8	3.3	7.1	50.0	2.7	3.9	4.1	3.2	11.9	20.0	20.0
313 A	W	4.6	6.4	5.5	5.6	1.1	10.8	5.0	11.0	5.8	5.2	7.6	5.4	50.0	4.8	12.9	6.0	3.8	6.6	0.0	2.6
314 A	L	2.1	2.9	4.3	2.2	5.7	6.1	7.9	5.4	0.7	0.0	1.7	2.3	50.0	1.6	1.6	3.0	4.7	6.3	8.0	6.0
315 A	D	0.3	1.4	1.5	0.1	3.3	4.2	1.9	1.8	0.8	0.5	1.8	0.6	50.0	0.0	0.7	0.0	0.9	2.4	6.2	3.7
316 A	G	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
317 A	K	0.0	14.0	18.4	17.9	50.0	5.0	50.0	20.0	8.5	12.5	12.7	20.0	15.9	17.2	13.5	2.8	9.2	20.0	50.0	50.0
318 A	E	2.0	3.0	2.7	1.7	2.7	6.7	2.6	0.0	1.1	1.6	1.3	1.7	20.0	1.4	2.6	2.2	1.3	0.0	6.1	9.5
319 A	Y	2.9	4.4	3.9	3.4	0.0	8.8	1.8	20.0	0.5	5.2	0.7	3.2	50.0	3.1	5.6	3.4	3.6	20.0	20.0	0.2
320 A	K	2.3	3.1	3.0	2.7	20.0	7.8	20.0	9.4	0.0	0.6	2.7	1.3	50.0	2.4	1.9	3.3	3.3	7.2	20.0	20.0
321 A	C	0.0	3.2	20.0	18.8	20.0	6.9	20.0	20.0	20.0	20.0	10.4	20.0	50.0	19.6	20.0	1.5	8.7	18.3	20.0	20.0
322 A	K	2.0	2.5	3.5	2.8	2.7	6.4	2.1	0.2	0.1	1.2	2.7	2.7	50.0	2.1	0.0	2.3	1.6	0.9	14.5	2.8
323 A	V	1.5	2.8	7.3	11.9	20.0	8.1	20.0	6.0	9.6	20.0	4.9	8.5	50.0	13.6	20.0	2.8	1.6	0.0	20.0	20.0
324 A	S	2.0	2.1	0.6	0.0	1.9	4.9	3.9	1.5	2.8	0.7	1.9	0.9	50.0	0.8	2.9	2.7	1.9	2.1	3.8	2.5
325 A	N	2.8	3.9	8.4	3.0	20.0	8.3	20.0	0.0	7.7	20.0	6.2	1.6	13.4	0.5	20.0	3.1	0.1	1.3	20.0	20.0
326 A	K	1.0	2.7	3.0	1.6	3.7	4.1	3.1	3.2	1.7	2.4	3.7	1.2	0.0	0.6	1.4	1.0	1.9	2.6	5.6	3.6
327 A	A	0.9	2.8	5.8	3.1	20.0	6.3	16.7	14.7	2.8	20.0	2.5	5.3	20.0	1.3	4.1	0.0	5.2	13.7	20.0	20.0
328 A	L	6.0	6.3	7.0	4.1	50.0	8.6	20.0	50.0	5.7	0.0	7.1	6.0	50.0	3.7	8.2	6.6	50.0	50.0	20.0	50.0
329 A	P	1.0	2.5	0.9	0.6	4.0	3.4	3.3	1.7	1.9	2.5	3.6	0.0	0.3	0.7	1.5	0.1	1.1	1.1	6.2	3.6
330 A	A	0.9	2.0	1.3	0.7	3.4	3.8	3.0	2.0	1.4	2.0	3.4	0.0	20.0	0.6	1.2	0.2	0.6	1.9	7.0	3.4

【0 2 6 2】

10

20

30

40

表55 (続老)

331A	P	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
332A	I	1.9	3.7	4.6	1.7	5.0	7.0	1.9	3.8	1.8	0.0	2.5	3.9	20.0	0.8	2.4	2.3	2.6	4.4	20.0	5.9
333A	E	0.0	3.1	3.2	0.8	4.1	4.4	4.2	16.9	3.6	2.8	2.8	2.5	1.6	1.3	3.2	1.3	1.4	7.7	4.0	4.8
334A	K	1.7	2.9	2.5	0.0	1.0	6.1	3.3	1.0	1.5	0.5	3.5	1.5	4.4	0.1	2.7	2.2	0.9	1.3	4.9	1.8
335A	T	0.5	3.2	4.5	2.7	4.2	4.9	4.1	20.0	2.1	3.1	3.0	1.2	0.0	2.3	2.8	1.4	1.4	7.3	5.1	4.5
336A	I	1.2	1.6	5.0	1.5	20.0	6.1	16.8	0.7	3.4	7.8	2.5	3.2	20.0	2.8	1.4	0.7	0.6	0.0	20.0	20.0
337A	S	4.8	4.8	7.5	11.5	10.1	0.0	5.5	50.0	9.9	7.0	7.9	5.0	50.0	11.4	12.7	4.5	2.3	50.0	19.3	10.6
338A	K	1.0	2.7	2.3	2.2	4.6	5.9	2.4	50.0	0.0	2.1	1.9	1.0	50.0	1.5	0.9	0.7	10.3	50.0	5.4	4.9
339A	A	1.0	2.5	0.8	1.1	4.4	3.7	3.7	2.1	1.8	2.6	3.6	0.0	0.8	0.6	1.6	0.6	0.9	2.4	6.8	3.8
340A	K	1.3	2.4	2.3	2.0	1.7	4.1	2.3	1.9	0.0	2.3	1.8	1.0	1.9	0.9	1.3	0.5	0.8	1.7	4.9	2.4

【表 6 1】

表 55 (続き)

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
232 B	P	1.3	3.2	2.2	2.2	4.1	2.9	3.6	1.8	2.1	2.8	3.9	1.1	0.0	1.1	1.6	0.7	1.4	3.0	6.2	4.1
233 B	E	0.5	2.2	1.7	0.5	2.6	3.7	2.9	4.4	1.4	1.1	3.2	0.6	2.7	0.4	1.6	0.0	1.2	6.9	5.5	2.6
234 B	L	2.9	4.0	4.8	4.9	2.0	6.1	0.8	1.5	0.0	1.9	2.7	2.6	20.0	3.6	1.2	3.1	2.5	3.4	13.4	0.5
235 B	L	0.6	2.3	2.4	0.9	5.7	4.9	1.4	3.7	0.0	0.0	1.9	1.9	17.3	0.6	1.4	0.8	0.7	5.2	7.8	5.3
236 B	G	3.6	2.5	5.1	11.8	6.8	0.0	2.8	20.0	5.0	20.0	4.5	3.5	50.0	5.5	19.9	2.6	20.0	20.0	20.0	14.1
237 B	G	20.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
238 B	P	3.5	4.7	8.5	4.2	20.0	9.8	20.0	0.0	5.6	9.6	4.6	8.1	1.3	5.8	20.0	4.9	4.4	1.3	20.0	20.0
239 B	S	1.0	2.5	3.4	2.0	7.2	5.7	3.1	3.1	0.6	0.0	2.0	1.9	50.0	1.7	1.1	1.5	1.5	5.2	20.0	5.2
240 B	V	0.1	2.3	7.0	11.9	20.0	6.5	20.0	8.1	12.7	20.0	12.0	7.6	0.0	11.6	20.0	1.2	1.9	0.8	20.0	20.0
241 B	F	0.0	2.0	1.4	0.8	1.0	4.0	2.0	6.5	1.1	0.6	2.3	0.2	50.0	0.3	1.5	0.1	0.9	5.7	4.1	1.1
242 B	L	2.2	3.3	6.5	6.6	6.9	7.9	4.3	0.0	8.7	3.9	4.8	5.3	0.0	9.1	6.8	2.9	1.1	0.5	20.0	8.7
243 B	F	0.8	2.6	1.9	1.7	0.8	4.9	2.0	3.6	1.2	0.8	2.5	0.0	50.0	1.6	2.7	0.1	1.8	3.9	4.3	1.0
244 B	P	1.1	2.1	4.0	1.1	11.9	3.5	5.4	20.0	1.4	3.2	3.0	2.0	1.8	1.2	1.3	0.0	19.6	20.0	9.1	11.0
245 B	P	3.2	20.0	20.0	20.0	20.0	8.6	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.0	20.0	20.0	6.0	20.0	50.0	20.0	20.0
246 B	K	0.5	2.6	1.4	1.2	2.1	4.4	1.6	0.6	0.9	1.4	2.5	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.0	2.0	4.9	2.4
247 B	P	0.8	2.5	0.7	1.0	3.6	3.9	2.6	6.2	1.8	2.1	2.9	0.3	0.0	0.8	1.5	0.3	0.7	9.5	6.6	3.4
248 B	K	0.2	2.2	0.2	0.6	2.2	4.1	2.5	2.4	1.7	1.0	2.2	0.0	1.3	0.8	1.7	0.5	0.7	2.8	4.7	2.3
249 B	D	2.8	3.3	0.0	4.6	10.1	8.2	6.5	50.0	4.6	6.2	4.4	0.5	50.0	4.7	6.3	3.5	6.1	50.0	20.0	7.2
250 B	T	0.0	2.2	4.9	2.8	20.0	6.3	20.0	2.2	4.3	3.2	3.0	9.2	50.0	3.4	4.9	1.3	2.3	3.1	20.0	20.0
251 B	L	0.0	2.4	1.6	1.2	5.6	3.6	2.2	7.4	1.2	0.6	2.3	0.5	50.0	0.6	1.8	0.4	2.5	8.7	8.2	5.9
252 B	M	1.3	2.4	0.8	0.0	1.8	5.7	2.3	0.6	1.6	0.6	2.5	1.0	50.0	1.0	1.6	1.5	1.3	0.8	5.1	1.6
253 B	I	1.6	3.0	2.0	1.2	3.7	4.5	3.5	2.9	0.8	2.4	2.4	1.1	1.0	0.0	1.5	1.2	1.4	3.4	4.4	3.6
254 B	S	1.0	1.5	0.8	0.6	3.8	3.8	3.2	0.5	1.9	2.5	3.1	0.3	6.2	0.5	1.7	0.0	0.1	1.1	5.5	3.7
255 B	R	0.9	2.0	2.0	1.7	0.0	5.4	1.4	20.0	1.0	1.6	1.3	0.8	50.0	1.4	1.1	1.5	20.0	20.0	3.7	0.8
256 B	T	0.6	2.0	1.8	1.1	2.5	3.7	1.9	1.6	1.0	1.4	2.2	0.0	1.2	0.5	0.1	0.8	1.2	1.2	5.5	2.4

【0 2 6 4】

10

20

30

40

表55 (続老)

257 B	P	2.5	20.0	20.0	20.0	20.0	50.0	9.0	50.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.0	20.0	4.8	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0
258 B	E	1.5	2.4	2.7	1.4	2.7	6.4	4.2	0.0	0.2	5.4	2.4	1.1	50.0	1.3	2.5	2.2	1.1	1.0	19.1	3.0	
259 B	V	2.9	4.2	6.3	5.2	20.0	9.3	20.0	0.0	8.1	8.9	5.5	5.6	50.0	6.2	20.0	4.5	2.5	0.0	20.0	20.0	
260 B	T	0.0	1.6	5.3	1.9	20.0	4.9	20.0	0.6	1.1	2.8	1.4	3.9	0.2	2.3	2.6	0.4	0.1	2.7	20.0	20.0	
261 B	C	0.0	10.0	20.0	20.0	20.0	2.6	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	2.0	16.6	20.0	20.0	20.0	
262 B	V	2.1	2.4	2.7	2.4	2.4	8.1	7.2	3.8	1.8	3.5	8.6	3.4	2.7	50.0	3.2	4.8	2.9	1.9	0.0	14.7	9.1
263 B	V	2.2	3.7	4.7	11.2	20.0	9.1	20.0	15.0	13.7	2.8	20.0	5.4	50.0	13.0	20.0	3.6	2.1	0.0	20.0	20.0	
264 B	V	2.1	3.0	4.6	2.7	8.6	6.8	6.6	0.0	1.8	1.8	3.7	3.6	10.1	3.0	2.2	2.6	2.2	1.0	12.7	20.0	
265 B	D	4.5	5.2	4.8	4.7	5.0	0.0	3.8	8.5	1.8	2.6	4.1	1.8	50.0	4.5	5.3	4.5	6.0	9.2	12.2	5.6	
266 B	V	5.3	5.5	7.2	12.7	20.0	12.0	20.0	2.1	20.0	20.0	20.0	5.7	50.0	18.3	20.0	5.9	4.7	0.0	50.0	50.0	
267 B	S	2.8	4.3	6.2	3.8	0.0	7.4	1.0	50.0	1.0	0.3	3.2	3.2	0.5	1.5	0.8	3.3	11.6	50.0	6.3	50.0	

【表 6 3】

表 5 5 (続き)

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
268 B	H	2.6	3.7	5.1	4.1	4.9	6.0	1.8	2.6	0.0	2.5	3.8	2.6	3.4	2.1	1.8	2.5	3.8	2.7	7.8	5.5
269 B	E	0.4	2.4	1.7	0.8	2.8	3.7	2.6	1.0	1.0	1.6	3.0	0.0	12.8	0.5	0.7	0.3	0.7	0.6	5.1	2.7
270 B	D	0.0	1.6	1.1	7.3	4.8	4.3	2.6	20.0	3.8	14.5	3.8	1.2	5.9	6.3	2.1	0.3	1.9	5.4	16.3	5.6
271 B	P	1.1	3.3	5.6	3.4	4.1	5.5	4.2	20.0	1.9	3.6	3.9	3.3	7.4	2.7	0.0	1.5	2.2	5.2	4.8	4.4
272 B	Q	0.9	1.9	1.0	0.6	3.0	3.9	2.9	1.5	1.7	2.2	3.5	0.6	4.9	0.0	1.4	0.2	0.6	1.4	3.9	3.2
273 B	V	3.5	4.8	6.2	8.3	20.0	9.2	20.0	4.6	8.4	3.1	3.5	7.4	50.0	10.6	20.0	2.0	0.0	4.8	20.0	20.0
274 B	K	0.1	1.6	0.4	0.9	1.7	3.8	1.8	1.9	0.4	0.5	2.4	0.3	15.6	0.1	0.0	0.0	0.2	1.6	2.2	1.9
275 B	F	5.7	7.0	8.4	9.2	0.0	11.2	3.5	9.2	7.9	5.7	5.1	7.0	4.1	9.7	12.3	6.9	4.5	3.3	10.3	5.0
276 B	N	0.0	6.2	6.9	6.4	20.0	4.7	12.1	20.0	9.3	10.0	7.4	3.8	50.0	6.4	9.2	2.8	20.0	20.0	20.0	20.0
277 B	W	8.3	10.0	10.6	9.2	2.6	14.2	7.4	12.7	6.7	7.4	6.4	10.8	6.8	9.3	11.9	9.7	8.0	14.4	0.0	15.9
278 B	Y	0.0	2.3	17.4	4.0	50.0	5.1	50.0	20.0	2.8	20.0	2.1	12.6	11.0	4.4	2.0	0.8	2.5	19.8	20.0	4.2
279 B	V	3.1	3.5	4.2	2.9	20.0	8.5	13.9	0.4	0.0	2.9	2.0	3.4	20.0	1.4	4.0	4.2	2.4	1.2	20.0	20.0
280 B	D	0.5	3.0	2.1	1.5	6.7	3.1	4.7	12.6	2.9	1.6	2.9	1.6	20.0	1.4	3.1	0.0	2.7	5.5	8.1	7.3
281 B	G	5.6	5.8	5.5	4.8	7.9	0.0	7.2	6.5	5.3	5.7	7.1	3.4	50.0	4.0	5.3	3.6	3.2	6.4	10.3	7.6
282 B	V	0.4	1.9	1.1	0.6	2.9	4.1	2.1	1.3	1.0	1.4	2.9	0.2	50.0	0.0	0.7	0.0	0.4	0.7	6.1	2.8
283 B	E	0.6	1.9	4.3	1.7	6.7	4.2	5.2	2.9	0.5	4.4	0.3	2.5	0.0	1.5	1.6	1.0	1.5	3.9	7.9	6.7
284 B	V	0.4	2.4	2.5	1.1	20.0	5.9	20.0	1.1	1.2	6.2	0.8	2.4	50.0	1.5	3.3	0.0	1.5	1.8	20.0	20.0
285 B	H	1.3	2.4	2.1	1.7	2.4	3.4	1.2	1.8	0.7	2.3	2.7	0.0	1.6	0.9	0.8	0.5	0.4	2.0	5.8	2.4
286 B	N	1.2	2.7	1.0	1.1	3.0	3.1	2.6	0.8	2.0	1.9	2.9	0.0	50.0	0.4	1.6	1.1	0.5	2.9	4.9	3.0
287 B	A	2.5	4.4	6.1	7.5	0.0	8.2	3.0	10.2	5.1	16.5	4.5	0.3	12.3	8.1	9.1	4.1	3.3	7.1	3.4	0.8
288 B	K	0.4	1.9	1.9	0.0	2.9	3.5	2.9	2.5	1.8	2.1	2.5	0.9	15.4	0.6	1.1	0.2	0.9	3.8	5.9	2.7
289 B	T	0.1	1.5	3.7	1.4	2.7	3.9	2.6	1.8	0.0	2.2	1.6	1.5	1.8	1.1	1.7	0.0	0.4	2.3	3.4	2.5
290 B	K	0.9	1.8	0.8	0.5	2.4	0.8	2.7	3.0	1.3	1.3	2.6	0.2	50.0	0.7	1.5	0.0	0.6	2.9	5.0	2.7
291 B	P	1.2	2.1	2.5	0.5	3.9	4.6	3.4	0.7	0.0	3.4	1.5	1.1	0.6	0.1	1.1	1.1	0.9	1.5	3.2	2.6
292 B	R	0.8	2.6	3.3	1.2	4.9	3.6	6.8	3.1	2.0	2.4	2.2	2.2	16.6	1.5	1.8	0.1	0.0	3.2	7.6	5.2
293 B	E	0.0	3.0	4.1	2.8	7.3	3.6	5.8	5.8	2.6	4.5	3.2	2.2	1.3	2.2	2.5	0.0	1.2	7.8	7.0	6.9

【表 6 4】

表 5 5 (続き)

294 B	E	2.5	3.3	3.9	2.3	8.3	6.8	4.4	5.6	3.6	2.3	3.7	4.1	0.0	3.3	5.0	2.1	2.9	5.0	6.7	11.9
295 B	Q	1.1	2.2	1.9	0.6	3.8	2.8	3.1	8.0	1.4	2.2	3.4	1.0	0.4	0.4	1.1	0.0	3.9	6.6	6.1	3.5
296 B	Y	1.5	2.7	1.2	1.2	4.1	4.1	3.5	1.1	1.8	2.7	3.5	0.0	20.0	0.6	1.9	1.2	1.4	1.3	6.4	4.0
297 B	N	3.9	4.5	10.1	6.0	15.5	7.3	16.7	6.6	0.0	5.1	4.6	7.3	20.0	4.4	4.2	3.6	4.1	7.9	18.0	15.0
298 B	S	1.7	2.5	3.5	2.5	2.5	3.7	2.4	3.0	0.0	1.8	2.3	0.4	50.0	1.2	1.0	0.9	2.2	3.3	5.5	2.0
299 B	T	0.0	2.7	7.2	11.1	20.0	4.8	20.0	7.5	6.9	20.0	7.1	4.8	50.0	9.8	17.9	0.3	1.3	5.8	20.0	20.0
300 B	Y	3.8	5.2	8.0	4.3	20.0	8.6	20.0	12.2	0.0	4.3	3.2	6.5	50.0	4.0	3.8	4.3	3.6	9.1	20.0	6.4
301 B	R	1.2	1.8	2.3	1.1	20.0	5.8	11.3	5.2	0.3	5.0	2.0	1.6	14.1	0.6	0.4	1.8	1.1	0.0	17.9	20.0
302 B	V	3.5	4.8	5.5	3.7	0.2	9.6	1.1	0.5	2.6	3.5	2.5	4.7	9.6	4.1	0.6	4.3	2.0	0.0	20.0	0.2
303 B	V	0.2	0.0	0.1	1.0	20.0	5.0	13.3	5.1	1.7	10.4	1.9	2.0	8.6	2.0	4.7	0.6	0.5	1.3	20.0	20.0
304 B	S	1.5	2.3	8.2	20.0	20.0	7.6	20.0	7.6	20.0	20.0	20.0	6.3	50.0	20.0	20.0	0.0	2.7	3.8	20.0	20.0

【表 6 5】

表 5 5 (続き)

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
304 B	S	1.5	2.3	8.2	20.0	20.0	7.6	20.0	7.6	20.0	20.0	20.0	6.3	50.0	20.0	20.0	0.0	2.7	3.8	20.0	20.0
305 B	V	0.1	1.2	3.3	1.1	20.0	4.6	20.0	3.2	1.1	11.0	1.5	1.8	50.0	0.6	2.0	0.6	0.0	0.7	20.0	20.0
306 B	L	4.7	6.8	6.3	4.3	10.4	11.1	7.8	4.2	3.0	0.0	3.8	5.7	13.4	4.4	14.1	5.5	4.3	6.0	20.0	12.1
307 B	T	1.5	3.0	2.7	1.7	4.1	5.2	3.0	1.6	1.9	3.1	3.4	1.7	0.0	1.7	1.9	1.5	1.4	2.0	4.4	4.3
308 B	V	0.0	0.6	7.6	20.0	20.0	6.6	20.0	20.0	16.1	15.1	20.0	12.4	50.0	20.0	20.0	1.2	3.6	4.3	20.0	20.0
309 B	L	1.4	3.0	2.2	1.1	3.0	6.0	3.5	20.0	2.4	1.7	3.6	0.2	0.0	1.6	2.3	1.8	14.3	20.0	5.1	3.3
310 B	H	2.4	2.9	2.7	4.9	20.0	6.8	4.4	4.8	3.1	15.0	3.4	0.0	2.3	4.6	7.0	1.8	1.6	3.8	20.0	20.0
311 B	Q	0.0	2.2	1.3	0.7	2.1	3.3	2.4	12.6	0.6	0.9	2.3	0.6	3.2	0.4	0.8	0.2	1.6	18.8	4.6	2.0
312 B	N	0.0	1.0	0.2	0.3	6.0	5.4	2.3	12.0	2.1	2.9	1.6	0.9	50.0	1.3	5.7	0.1	5.6	3.8	8.0	7.8
313 B	W	5.3	6.6	7.3	5.4	0.0	11.4	6.2	20.0	4.0	5.2	4.3	8.0	50.0	6.5	8.9	6.6	17.2	20.0	2.1	0.9
314 B	L	1.7	2.2	3.1	0.0	6.4	5.6	1.5	2.1	0.6	0.2	1.1	1.9	50.0	0.8	1.0	1.7	0.9	3.1	3.7	11.3
315 B	D	1.4	2.3	2.4	0.7	6.0	5.5	2.3	4.8	2.2	1.0	2.9	1.8	50.0	1.0	2.2	0.2	0.0	4.5	8.5	6.8
316 B	G	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
317 B	K	0.9	2.3	4.3	2.8	1.2	4.0	0.6	13.9	0.0	4.8	1.6	1.3	50.0	4.2	0.9	0.4	13.8	10.1	20.0	1.7
318 B	E	0.7	1.2	3.1	1.0	7.0	5.1	8.2	0.4	1.0	5.7	1.7	2.3	3.8	1.0	1.6	0.4	0.0	1.0	3.8	7.7
319 B	Y	6.5	7.1	8.5	8.8	0.0	12.5	3.9	3.1	5.2	5.4	8.4	7.2	50.0	9.0	13.7	7.2	5.8	3.9	20.0	1.7
320 B	K	3.1	4.3	7.3	4.3	20.0	8.6	15.0	1.4	0.0	11.6	3.6	6.6	50.0	2.9	2.4	4.0	3.3	2.0	20.0	20.0
321 B	C	0.0	6.5	20.0	20.0	20.0	6.6	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	19.7	20.0	20.0	3.1	11.2	20.0	20.0	20.0
322 B	K	2.3	3.2	3.5	1.8	20.0	7.9	20.0	1.1	0.6	4.9	3.7	2.2	50.0	0.9	0.3	3.3	1.6	0.0	20.0	20.0
323 B	V	4.0	4.6	6.9	8.1	20.0	10.6	20.0	9.0	17.1	7.9	8.1	10.5	50.0	8.7	20.0	5.6	4.6	0.0	20.0	20.0
324 B	S	1.3	3.0	1.4	0.0	2.1	6.0	4.4	1.3	2.4	0.6	2.7	2.2	50.0	1.3	3.6	1.5	1.6	1.8	3.6	2.4
325 B	N	3.4	5.1	9.0	4.7	20.0	8.2	20.0	16.6	16.6	20.0	20.0	0.0	50.0	6.3	20.0	4.6	8.8	17.8	20.0	20.0
326 B	K	0.3	2.1	2.0	0.9	1.0	3.5	2.0	2.9	0.9	2.9	2.8	0.1	4.4	0.0	1.1	0.1	3.2	2.1	5.2	0.7
327 B	A	1.9	3.3	4.7	3.5	20.0	7.0	20.0	20.0	0.3	0.0	1.9	1.9	20.0	3.0	2.3	3.3	20.0	20.0	20.0	20.0
328 B	L	3.7	3.6	3.8	4.4	50.0	8.4	7.0	50.0	3.8	0.0	2.6	4.0	50.0	4.2	8.7	4.8	2.9	12.3	50.0	50.0
329 B	P	3.3	8.5	20.0	20.0	50.0	8.0	16.5	50.0	18.5	20.0	14.7	20.0	0.0	20.0	20.0	1.4	17.1	16.4	50.0	50.0

【表 6 6】

表 5 5 (続き)

330 B	A	0.5	2.0	2.8	0.5	2.4	3.9	1.2	4.0	0.0	2.0	2.1	0.8	20.0	0.0	0.5	0.8	0.2	4.6	8.2	2.6
331 B	P	1.7	3.8	6.4	10.1	20.0	4.7	11.0	10.1	7.5	20.0	5.5	5.0	0.0	7.6	7.4	2.6	20.0	10.1	17.6	20.0
332 B	I	1.7	2.9	1.3	1.7	14.8	7.0	13.9	1.7	3.1	0.0	1.7	1.7	50.0	1.8	5.3	2.0	1.9	3.4	20.0	20.0
333 B	E	1.9	2.5	1.9	0.0	8.9	5.9	8.2	1.2	3.0	6.4	3.4	2.0	3.1	1.1	2.3	1.8	1.6	1.6	8.9	9.3
334 B	K	2.9	3.9	3.7	2.6	20.0	8.3	12.1	1.5	2.6	5.3	3.7	4.3	50.0	1.9	0.0	3.4	1.8	1.4	9.9	20.0
335 B	T	0.0	2.1	7.2	7.0	4.2	0.4	3.3	17.3	6.5	7.7	5.2	5.5	3.5	7.0	5.7	0.2	5.5	11.5	5.2	3.1
336 B	I	0.5	1.6	2.1	0.7	20.0	5.0	6.1	0.0	1.3	5.3	2.1	1.8	20.0	0.6	3.1	1.1	0.8	0.7	19.4	20.0
337 B	S	1.1	2.1	4.0	2.0	3.1	3.2	2.0	50.0	0.0	1.6	0.9	1.9	15.8	1.1	2.2	1.4	50.0	50.0	5.5	3.9
338 B	K	0.6	2.3	3.0	3.0	9.4	5.3	10.6	2.2	1.1	0.0	3.2	1.5	16.2	2.7	2.7	1.1	2.8	3.5	8.1	11.0
339 B	A	1.1	2.4	1.2	0.8	4.3	3.6	3.7	2.6	1.8	2.6	3.5	0.0	2.3	0.5	1.3	0.2	0.8	2.0	6.7	3.8
340 B	K	0.9	2.0	1.4	0.8	3.0	3.4	2.9	2.1	0.8	2.5	2.3	0.2	1.0	0.1	1.2	0.0	0.5	2.0	5.5	3.2

SPA 技法：11IS 鋳型構造；「炭水化物、浮動位置なし

【表 6 7】

表 5 6

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	0.2	4.6	2.7	0.0	20.0	4.6	14.5	11.0	1.9	0.3	2.0	1.9	8.1	1.4	2.6	0.4	5.7	11.6	20.0	20.0
240 A	V	1.5	2.4	2.4	6.9	20.0	7.4	20.0	5.1	9.9	5.9	5.5	2.4	1.1	12.3	13.1	2.6	0.5	0.0	20.0	20.0
263 A	V	2.3	2.8	6.3	16.5	20.0	8.8	20.0	9.6	7.3	7.3	15.3	4.8	50.0	16.4	17.4	2.8	1.4	0.0	20.0	20.0
264 A	V	1.8	3.1	2.6	1.8	0.0	6.3	1.9	0.6	2.4	0.8	2.7	2.1	1.6	2.3	2.7	2.3	1.1	0.5	3.5	0.0
266 A	V	4.9	5.2	6.9	12.3	20.0	11.1	20.0	0.8	11.9	20.0	8.5	6.6	50.0	12.5	20.0	6.1	3.7	0.0	20.0	20.0
296 A	Y	3.4	2.7	1.1	0.0	50.0	0.7	50.0	5.0	3.6	3.5	4.2	0.9	50.0	0.9	2.9	2.2	5.3	5.5	16.1	18.4
299 A	T	0.7	3.2	9.9	10.4	20.0	6.2	20.0	10.7	6.7	20.0	4.1	12.9	50.0	5.9	11.8	0.0	2.5	8.2	13.3	20.0
325 A	N	2.5	3.5	7.7	2.5	20.0	8.0	20.0	0.0	6.1	20.0	7.8	1.2	12.8	0.8	20.0	2.7	0.0	1.0	20.0	20.0
328 A	L	6.1	6.3	7.1	4.2	50.0	8.8	20.0	50.0	4.6	0.0	7.2	6.1	50.0	4.0	8.3	6.7	50.0	50.0	20.0	50.0
330 A	A	0.9	1.8	1.2	0.0	2.5	4.0	2.9	1.7	1.2	1.6	2.8	0.0	20.0	0.4	1.0	0.2	0.5	1.7	6.2	2.9
332 A	I	1.9	3.8	4.6	1.3	5.1	7.1	1.8	3.4	0.2	0.0	2.6	3.8	20.0	0.6	2.4	2.3	2.5	4.2	20.0	5.6
239 B	S	1.0	2.4	3.5	2.0	6.7	5.6	2.9	3.1	0.3	0.0	1.9	2.1	50.0	1.5	1.8	1.4	1.4	5.2	20.0	4.2
240 B	V	0.3	2.4	6.9	11.7	20.0	6.6	20.0	8.3	12.3	20.0	14.2	7.4	0.0	13.4	20.0	1.3	1.9	0.9	20.0	20.0
263 B	V	2.4	3.9	4.5	12.5	20.0	9.3	20.0	15.8	17.1	2.1	20.0	5.3	50.0	13.8	20.0	3.9	2.2	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.2	3.2	4.8	2.7	7.4	6.9	6.0	0.0	1.9	1.9	3.8	3.7	9.9	3.1	2.2	2.7	2.4	0.9	14.7	18.2
266 B	V	5.4	5.5	7.5	13.2	20.0	12.1	20.0	2.6	20.0	20.0	20.0	5.4	50.0	16.1	20.0	6.0	4.7	0.0	50.0	50.0
296 B	Y	1.5	2.7	1.3	1.2	4.0	4.1	3.6	1.1	1.9	2.6	3.5	0.0	20.0	0.7	1.8	1.1	1.4	1.3	6.5	4.2
299 B	T	0.0	2.2	7.5	10.2	20.0	4.8	20.0	7.7	5.8	20.0	10.3	5.1	50.0	10.2	18.4	0.3	1.1	5.4	20.0	20.0
325 B	N	3.4	5.1	8.6	5.0	20.0	8.2	20.0	16.7	20.0	20.0	20.0	0.0	19.7	6.3	20.0	4.6	8.6	18.2	20.0	20.0
328 B	L	3.6	3.5	3.8	3.9	50.0	8.3	7.0	50.0	2.9	0.0	1.9	3.8	50.0	3.4	8.4	4.7	2.9	12.5	50.0	50.0
330 B	A	0.7	2.1	2.9	0.7	2.7	4.0	1.4	4.8	0.0	2.2	2.3	0.8	20.0	0.2	0.8	1.1	0.2	4.7	7.8	3.2
332 B	I	1.8	2.9	1.2	1.8	13.5	7.0	9.9	1.7	3.2	0.0	1.7	1.9	50.0	1.2	5.4	2.0	2.0	3.3	20.0	20.0

S P ATM 技法；D129G 111S 鑄型構造；+ 炭水化物

10

20

30

40

【表 6 8】

表 5 7

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.2	3.5	1.7	0.0	20.0	5.8	11.0	6.6	2.9	3.9	3.9	2.7	8.5	1.3	2.7	0.6	3.5	5.4	20.0	20.0
240 A	V	1.2	2.4	6.0	14.0	20.0	7.1	20.0	6.7	9.4	10.1	7.5	4.4	1.8	14.8	20.0	2.0	0.4	0.0	20.0	20.0
263 A	V	0.0	0.4	1.0	8.7	20.0	6.9	4.4	11.7	4.9	16.0	19.2	0.8	50.0	11.7	20.0	1.4	0.1	1.0	20.0	20.0
264 A	V	2.9	3.7	6.3	2.8	11.6	7.6	13.2	0.0	3.2	3.4	4.1	4.2	7.1	2.9	3.4	3.1	1.9	0.8	12.8	16.3
266 A	V	4.8	5.9	6.8	9.5	50.0	10.3	20.0	3.5	12.7	12.2	12.7	4.1	50.0	11.9	11.9	5.2	2.9	0.0	50.0	50.0
296 A	Y	0.8	2.0	1.5	0.1	0.2	3.4	1.5	6.6	1.7	0.6	1.8	1.2	2.6	0.0	1.6	0.2	2.5	5.6	3.8	0.0
299 A	T	1.9	3.7	7.5	0.0	20.0	7.9	14.2	2.9	0.8	3.4	4.4	2.3	50.0	1.9	3.0	3.5	4.1	3.3	20.0	20.0
325 A	N	1.0	1.4	3.1	2.8	20.0	7.4	20.0	8.5	7.7	10.4	6.1	2.8	15.4	5.4	20.0	0.0	0.1	3.8	20.0	20.0
328 A	L	2.5	5.3	4.0	1.9	50.0	7.5	20.0	20.0	1.6	0.2	0.0	2.9	50.0	0.4	4.8	3.2	2.9	7.0	50.0	50.0
330 A	A	0.9	2.1	1.8	1.2	2.4	2.7	3.1	3.1	1.4	2.1	3.5	0.5	20.0	0.8	1.0	0.0	0.5	2.9	5.2	2.9
332 A	I	2.9	3.7	3.9	0.9	6.1	7.8	2.5	0.0	2.7	0.8	2.8	3.5	50.0	0.7	3.7	2.9	2.5	1.0	8.1	6.9
239 B	S	1.9	3.1	3.0	1.9	1.5	6.2	2.3	14.1	1.8	1.4	2.9	1.8	0.0	1.9	3.2	1.9	2.3	7.7	6.6	15.8
240 B	V	0.5	1.7	5.0	13.3	20.0	6.6	20.0	1.2	12.4	12.1	8.8	4.6	6.3	20.0	20.0	1.0	0.2	0.0	20.0	20.0
263 B	V	2.9	3.2	6.4	18.2	10.1	9.2	6.9	12.8	6.0	20.0	10.3	5.7	50.0	17.5	20.0	3.2	2.2	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.9	3.6	4.4	3.0	8.8	7.1	6.2	0.0	2.3	1.9	4.5	3.4	1.7	3.2	3.5	3.5	2.0	0.9	12.0	16.4
266 B	V	4.4	4.6	2.6	6.6	20.0	10.7	20.0	0.0	4.9	1.7	8.5	5.6	50.0	6.0	12.4	5.3	4.6	1.5	20.0	50.0
296 B	Y	0.0	7.1	6.7	7.2	20.0	0.1	18.6	50.0	7.0	2.7	6.6	6.8	50.0	7.2	9.3	2.3	50.0	50.0	20.0	14.1
299 B	T	0.0	3.2	10.4	6.0	20.0	5.5	20.0	15.9	3.2	5.9	4.4	6.4	50.0	5.7	9.4	1.2	1.4	13.7	20.0	20.0
325 B	N	1.4	2.5	5.0	0.0	20.0	7.0	20.0	20.0	1.0	2.2	1.0	0.3	1.9	1.1	20.0	2.6	5.1	20.0	20.0	20.0
328 B	L	0.4	1.3	5.6	0.0	50.0	4.5	50.0	50.0	1.9	2.4	2.4	8.3	50.0	0.8	16.4	1.0	1.2	50.0	50.0	50.0
330 B	A	0.6	1.4	2.5	0.9	3.1	2.5	1.2	20.0	0.0	2.4	2.1	0.3	20.0	0.4	0.6	0.0	4.0	20.0	13.5	3.4
332 B	I	4.3	5.3	5.7	0.0	11.4	9.3	4.3	2.5	5.8	2.0	4.0	6.5	17.9	3.7	5.9	4.6	4.2	3.7	20.0	11.6

S P ATM 技法； D1296 11IX 鑄型構造； + 炭水化物

10

20

30

40

【表 6 9】

表 5 8

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239A	S	1.2	2.3	2.2	1.8	7.9	5.5	7.6	0.5	0.2	1.8	2.6	1.4	0.9	1.3	1.9	1.5	0.8	0.0	8.6	9.6
240A	V	0.7	2.9	6.8	4.3	20.0	6.5	20.0	0.0	10.7	20.0	3.1	9.1	2.1	7.7	20.0	1.4	1.1	2.4	20.0	20.0
263A	V	1.7	2.9	4.6	18.8	20.0	8.4	5.8	15.1	2.3	14.5	2.1	3.2	50.0	20.0	15.0	3.6	1.2	0.0	20.0	20.0
264A	V	2.7	3.3	3.6	1.5	13.9	6.7	5.9	0.0	2.3	4.9	3.7	3.2	1.9	2.5	3.0	3.0	2.5	0.7	19.9	19.0
266A	V	3.5	3.5	5.7	12.4	20.0	10.0	20.0	5.7	6.3	7.8	7.4	5.2	50.0	16.6	20.0	4.2	1.7	0.0	20.0	50.0
296A	Y	2.6	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	18.5	18.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	13.6
299A	T	0.2	0.7	6.6	1.2	20.0	5.6	9.6	1.6	0.8	1.5	1.8	4.8	50.0	1.0	9.2	0.0	0.0	1.6	20.0	20.0
325A	N	3.1	3.6	7.3	2.4	20.0	7.7	20.0	20.0	20.0	10.0	13.1	3.6	50.0	0.0	20.0	4.0	9.7	20.0	20.0	20.0
328A	L	0.6	0.0	1.5	5.4	50.0	1.6	50.0	50.0	3.1	4.2	9.6	1.4	50.0	6.9	9.6	0.6	0.1	50.0	50.0	50.0
330A	A	1.9	2.5	4.1	2.8	4.5	4.1	3.0	3.2	1.0	2.7	3.5	2.1	20.0	2.4	2.6	1.3	0.0	3.9	7.6	5.3
332A	I	2.3	3.5	2.2	0.8	20.0	6.8	9.6	0.0	3.4	0.2	2.6	2.8	14.5	3.3	4.6	2.6	1.3	0.9	10.5	20.0
239B	S	1.4	3.6	2.5	1.4	16.8	5.8	6.2	5.0	2.5	1.4	2.0	3.8	0.3	0.5	2.4	0.0	1.6	5.3	20.0	19.5
240B	V	0.0	2.6	12.8	18.6	20.0	5.7	20.0	12.7	10.4	20.0	8.5	15.1	3.1	20.0	20.0	1.0	0.2	2.4	20.0	20.0
263B	V	1.1	2.4	3.6	20.0	20.0	7.8	17.7	11.8	4.5	20.0	6.3	3.3	50.0	20.0	20.0	3.2	1.2	0.0	20.0	20.0
264B	V	3.3	4.0	5.0	2.9	14.2	7.5	4.8	0.0	2.6	3.6	4.6	3.5	1.7	3.1	4.1	3.9	2.9	1.3	6.9	20.0
266B	V	2.9	3.3	4.9	11.3	50.0	9.5	20.0	20.0	20.0	7.9	15.0	4.5	50.0	4.9	20.0	1.9	0.0	3.6	50.0	50.0
296B	Y	2.8	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	17.7	18.7	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	11.3
299B	T	0.0	3.8	12.6	9.2	20.0	5.9	20.0	7.3	4.8	3.2	4.3	8.0	50.0	12.3	8.8	0.2	2.1	4.4	20.0	20.0
325B	N	0.3	2.0	5.5	2.2	50.0	6.1	20.0	0.0	10.5	15.5	14.6	1.3	10.0	2.4	20.0	2.3	2.0	1.0	20.0	50.0
328B	L	5.4	5.7	7.3	4.4	50.0	9.8	20.0	50.0	2.5	0.0	5.1	5.9	50.0	2.8	7.4	6.1	6.4	50.0	50.0	50.0
330B	A	0.6	1.4	3.2	1.3	3.9	3.2	2.7	4.0	1.3	3.7	3.1	0.7	20.0	0.6	1.3	0.0	0.4	4.2	8.2	3.6
332B	I	1.9	3.1	2.7	1.7	5.2	6.9	3.1	0.4	1.3	0.0	1.9	2.6	7.7	1.3	2.2	2.3	1.6	2.0	10.4	5.6

S P A ™ 技法 ; D129G 1E4K 鑄型構造 ; + 炭水化物

10

20

30

40

【表 7 0】

表 5 9

位置	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.4	2.6	3.1	1.0	20.0	5.7	4.8	3.4	2.0	1.2	2.6	1.6	4.8	0.0	2.1	1.3	2.1	3.3	13.8	19.6
240 A	V	2.9	3.5	3.7	4.6	20.0	8.2	10.8	0.0	9.1	3.2	5.4	3.1	4.8	5.5	17.5	4.0	1.8	1.2	20.0	20.0
263 A	V	3.6	4.9	6.2	8.7	20.0	9.9	20.0	3.7	4.2	0.5	6.7	6.1	50.0	9.5	20.0	5.1	3.6	0.0	20.0	20.0
264 A	V	1.8	2.8	3.3	2.0	2.9	6.2	3.1	0.0	2.4	0.8	3.0	2.4	6.1	1.4	2.8	2.4	1.9	0.8	10.2	2.2
266 A	V	4.4	5.2	4.9	7.1	20.0	10.6	20.0	1.0	12.1	4.8	9.1	4.6	50.0	7.9	12.6	5.8	3.5	0.0	20.0	20.0
296 A	Y	1.2	2.9	0.7	1.4	3.1	3.9	2.7	2.4	2.3	1.9	2.2	0.0	1.6	1.4	3.0	0.9	1.0	3.5	6.0	2.6
299 A	T	0.0	2.6	6.0	11.5	20.0	5.3	20.0	20.0	6.0	20.0	4.4	3.0	50.0	14.1	13.2	0.9	3.8	15.1	15.0	20.0
325 A	N	5.2	7.0	6.6	6.9	50.0	11.3	20.0	1.3	14.3	13.5	13.9	0.0	5.0	6.0	20.0	6.0	4.6	3.2	20.0	50.0
328 A	L	4.8	5.5	7.0	3.2	20.0	10.5	20.0	50.0	5.1	0.0	8.5	5.5	50.0	3.5	8.2	5.5	13.4	50.0	20.0	50.0
330 A	A	0.9	1.8	1.1	0.9	3.5	4.0	3.0	2.3	1.2	1.6	2.8	0.0	14.5	0.9	1.1	0.1	0.4	2.0	6.4	3.2
332 A	I	5.3	6.4	6.7	4.8	8.2	9.9	5.2	3.1	0.0	3.6	6.2	6.8	20.0	3.5	4.6	5.5	4.8	4.0	11.2	7.1
239 B	S	0.7	2.3	2.6	2.0	5.3	5.1	3.3	1.7	0.0	0.0	2.0	0.8	15.5	0.9	0.8	0.7	0.7	3.3	8.2	6.0
240 B	V	2.3	3.0	4.1	7.3	20.0	8.1	20.0	5.1	20.0	11.8	10.9	3.8	2.0	17.0	20.0	3.6	1.3	0.0	20.0	20.0
263 B	V	3.2	4.3	7.3	8.3	20.0	9.6	20.0	13.3	8.5	0.6	20.0	6.0	50.0	8.5	20.0	4.6	4.0	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.1	3.2	3.7	2.7	17.8	6.6	11.5	0.0	2.0	0.8	3.5	3.0	7.8	2.0	1.5	2.5	1.3	1.0	13.9	20.0
266 B	V	5.0	5.0	5.2	16.3	20.0	11.2	20.0	2.3	20.0	14.3	17.3	2.5	50.0	11.6	20.0	5.4	3.9	0.0	20.0	20.0
296 B	Y	0.9	2.3	1.0	0.5	2.7	3.7	2.5	1.2	1.3	2.1	3.0	0.0	7.0	0.4	1.1	0.3	0.8	1.8	6.0	2.4
299 B	T	1.1	2.2	7.6	5.4	20.0	6.4	12.8	1.8	3.9	17.5	6.9	3.9	20.0	4.6	10.3	0.8	0.0	1.9	20.0	20.0
325 B	N	10.1	11.5	13.1	11.2	20.0	15.7	20.0	8.6	14.3	17.1	20.0	0.0	16.1	10.6	20.0	11.1	10.9	10.5	20.0	20.0
328 B	L	2.9	4.1	4.8	3.5	50.0	8.5	1.7	9.6	1.5	0.0	1.5	3.5	50.0	3.3	2.0	3.3	1.9	5.2	50.0	50.0
330 B	A	0.1	2.0	1.4	1.8	1.6	4.0	3.0	2.0	0.5	0.5	2.6	0.0	20.0	0.7	2.0	0.3	0.6	2.1	4.4	2.4
332 B	I	3.4	4.4	3.5	3.1	6.1	8.2	4.1	0.0	3.3	1.3	3.3	4.0	15.7	0.8	2.1	3.9	2.7	1.1	20.0	6.1

SPA™ 技法: Fe/Fe r r I I b モデル鑄型構造: -炭水化合物

【 0 2 7 3 】

上記表 1 - 5 9 で提示した設計計算の結果を使用して、実験的産生およびスクリーニング用の一連の F c 変異体ライブラリーを構築した。実験用ライブラリーは、コンピューター処理および実験的スクリーニングの連続ラウンドで設計した。後の F c ライブラリーの設計は、先行ライブラリーのフィードバックから利益を得、従って典型的に以前のスクリーニングで好都合な特性を示した F c 変異体の組合せを含んだ。構築され、実験的に試験

10

20

30

40

50

された F c 変異体の全セットを、表 6 0 に示す。この表では、行 1 は、可変位置を列挙し、続く行は、W T および F c 変異体について、それらの可変位置のアミノ酸を示す。例えば、変異体 1 8 は、以下の 4 つの変異を有する：F 2 4 1 E、F 2 4 3 Y、V 2 6 2 T および V 2 6 4 R。このセットの F c 変異体を構成する可変位置の残基を図 3 に構造的に図解し、ヒト I g G 1 F c 配列に関して図 4 に提示する。

【 0 2 7 4 】

【表 7 1】

表 6 0

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
1												A																		
2												L																		
3												I																		
4					W																									
5					L																									
6						W																								
7						L																								
8					L	L						I																		
9					W	W						A																		
10					W	W																								
11					L							I																		
12						L																								
13						L						W																		
14					Y	Y						T																		
15					E	R						R																		
16					E	Q						E																		
17					R	Q						T																		
18					E	Y						R																		
19																														
20																									M					
21																									E					
22																									F					
23																												E		
24							H																		M			E		
25								A																						
26									V																					
27																					F									
28							H	A	V																					
29									G																					
30												I																E		

【表 7 2】

表 6 0 (続き)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
31					E	R				E		R															E			
32					E	Q				T		E															E			
33					R	Q				T		R															E			
34					E	Y				T		R															E			
35																			A											
36																			A											
37																			A								E			
41			E																A									A	A	
42			Q																								E			
43			E																								E			
44																														
45												G	N																	
46			E									G	N																	
47			E									N																		
48			E									Q																		
49																	E													
50																	Q													
51																			T											
52																			N											
53																				I										
54																										S				
55																										N				
56																										S				
57															Q											S				
58															L											S				
59																										L				
60																									F					
61																										L				
62																										Y				D

【表 7 3】

表 6 0 (続き)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
62																		S									D			
63																		D												
64																		S										E		
65																		D										E		
66																		E										E		
67																		D										E		
68												Y						D										E		
69												Y						D										E		
70												F						E										E		
71																									I			E		
72																									Q			E		
73																												N		
74																												Q		
75											T																			
76										F																				
77				I																										
78										I																				
79														I																
80																			A											
81																			S											
82																			V											
83																						Q								
84																						L								
85																						I								
86			D																											
87			N																											
88			F																											
89			D																									D		
90			D																									E		
91			D																									N		
92			D																									Q		

10

20

30

40

【表 7 4】

表 6 0 (続き)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
93			E																									D		
94			E																									N		
95			E																									Q		
96			N																									D		
97			N																									E		
98			N																									N		
99			N																									Q		
100			Q																									D		
101			Q																									N		
102			Q																									Q		
103																							E							
104																	D													
105																	N													
106					Y	Y				T		T						D										E		
107																											Y	E		
108												I															Y	E		
109																											L	E		
110												I															L	E		
111	D																													
112	E																													
112	N																													
114	Q																													
115	T																													
116	H																													
117	Y																													
118	I																													
119	V																													
120	F																													
121																														
122			S																											

【表 7 5】

表 6 0 (続 き)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	F	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
123		N																												
124		Q																												
125		T																												
126		H																												
127		Y																												
128		I																												
129		V																												
130		F																												
131			T																											
132			H																											
133			Y																											
134				A																										
135				T																										
136				M																										
137										A	T																			
138											M																			
139																														
140												M																		
141											Y																			
142														A																
143														T																
144														M																
145																H														
146																Y														
147																F														
148																R														
149																	S													
150																	T													
151																	L													
152																	I													

【表 7 6】

表 6 0 (続き)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334	
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K	
153																			H												
154																															
155																															
156																											V	I			
157																															
158																											F				
159																											R				
160																											H				
161																						D									
162																						E									
163																						A									
164																						T									
165																						V									
166																						H									
167																								D			E				
168																								E			E				
169																								N			E				
170																								Q			E				
171																								V			E				
172																								T			E				
173																								H			E				
174																								I			E				
175																								A							
176																											T	H			
177																											Y				
178																															
179			E									I																A			
180			Q								I																	E			
181			E								I																	E			
182			E								I								A								Y	E			

【表 7 7】

表 6 0 (続き)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
183			D														D										E			
184			E														D										E			
185			D										V				D										E			
186			D										I				D										E			
187			D										L				D										E			
188			D										F				D										E			
189			D										Y				D										E			
190			D										H				D										E			
191			D										T				D										E			
192										E							D										E			
193																D	D										E			
194																E	D										E			
195																N	D										E			
196																Q	D										E			
197																H	D										E			
198																T	D										E			
199																	D			V							E			
200																	D			I							E			
201																	D			L							E			
202																	D			F							E			
203																	D			H							E			
204																	D			E							E			
205																	D										Y	E		
206																	D		A							Y	E			
207			D																							Y	E			
208			N																							Y	E			
209			D																							L	E			
210			N																							L	E			
211											I								A								E			
212			D																A								E			

【表 7 8】

表 6 0 (続 き)

位 置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
WT	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
213			N																A									E		
214			D									I																E		
215			D									I							A									E		
216			D									I															L	E		

実施例 2 : F c ライブラリーの実験的産生およびスクリーニング

F c 変異体の実験法の大部分は、抗癌抗体アレムツズマブ (Campath^(登録商標)、Ilex Pharmaceuticals LPの登録商標) に関して実行した。アレムツズマブは、その標的抗原である C D 5 2 中の短い線状のエピトープに結合する (Hale et al., 1990, Tissue Antigens 35:118-127; Hale, 1995, Immunotechnology 1:175-187)。アレムツズマブは、その効力が一部にはそのエフェクター細胞を募らせる能力によるので (Dyer et al., 1989, Blood 73:1431-1439; Friend et al., 1991, Transplant Proc 23:2253-2254; Hale et al., 1998, Blood 92:4581-4590; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410)、そして結合アッセイにおけるその抗原の産生と使用が比較的簡単であるので、主たる工学処理の鋳型として選択された。他の抗体に関して本発明の最適化 F c 変異体を評価するために、選択された F c 変異体を抗 C D 2 0 抗体リツキシマブ (Rituxan^(登録商標)、IDEC Pharmaceuticals Corporation の登録商標) および抗 H e r 2 抗体トラスツズマブ (Herc eptin^(登録商標)、Genentechの登録商標) で評価した。スクリーニング目的でのアレムツズマブ、リツキシマブおよびトラスツズマブの使用は、本発明をいかなる特定の抗体にも制限することを意味しない。

【0283】

アレムツズマブ、リツキシマブおよびトラスツズマブについて、I g G 1 の完全長の軽鎖 (V_L-C_L) および重鎖 ($V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$) の抗体の遺伝子を、サブクローニングを補助するための便利な末端制限部位と共に構築した。これらの遺伝子を哺乳動物発現ベクターである p c D N A 3 . 1 Z e o (Invitrogen) にライゲーションした。p c D N A 3 . 1 z e o 中のこの $V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$ クローンを、F c 領域の変異誘発の鋳型として使用した。このクローンに、P C R をベースとする変異誘発技法を使用して変異を導入した。F c 変異体を配列解読し、配列の忠実度を確認した。重鎖遺伝子 ($V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$) (野生型または変異体) を含有するプラスミドを、軽鎖遺伝子 (V_L-C_L) を含有するプラスミドと共に 2 9 3 T 細胞に形質移入した。形質移入の 5 日後に培地を回収した。ペルオキシダーゼ結合ヤギー抗ヒト I g G (Jackson ImmunoResearch, catalog # 109-035-088) を使用するウェスタンで形質移入体の培養上清をスクリーニングすることにより、免疫グロブリンの発現をモニタリングした。図 6 は、野生型アレムツズマブおよび変異体 1 ないし 1 0 の 2 9 3 T 細胞における発現を示す。プロテイン A 親和性クロマトグラフィー (Pierce, Catalog # 20334) を使用して上清から抗体を精製した。図 7 は、W T アレムツズマブについて、タンパク質精製の結果を示す。抗体の F c 変異体は、W T と類似の発現および精製結果を示した。炭水化物の非存在下でのそれらの溶解性と機能的特性を測定するために、いくつかの F c 変異体を脱グリコシル化した。脱グリコシル化抗体を得るために、精製したアレムツズマブ抗体をペプチド-N-グリコシダーゼ (P N G a s e F) と 3 7 °C で 2 4 時間インキュベートした。図 8 は、いくつかの F c 変異体および W T アレムツズマブの脱グリコシル化を確認する S D S P A G E のゲルを提示する。

【0284】

これらの条件下で産生されたアレムツズマブの機能的忠実度を確認するために、G S T に融合させた抗原性 C D 5 2 ペプチドを、I P T G 誘導下、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) で発現させた。非誘導および誘導サンプルの両方を、S D S P A G E ゲルで流し、P V D F 膜に転写した。ウェスタン分析のために、Sotec由来のアレムツズマブ (最終濃度 2 . 5 n g / u l) または形質移入 2 9 3 T 細胞の培地 (最終アレムツズマブ濃度約 0 . 1 - 0 . 2 n g / u l) を一次抗体として使用し、ペルオキシダーゼ結合ヤギー抗ヒト I g G を二次抗体として使用した。図 9 は、これらの結果を提示する。標的抗原に結合する能力は、発現されたアレムツズマブの構造および機能的忠実度を確認するものである。W T アレムツズマブと同じ可変領域を有する F c 変異体は、匹敵する抗原への結合親和性を維持すると予想される。

【0285】

F c / F c γ R 結合をスクリーニングするために、ヒト V 1 5 8 F c γ R I I I a、

ヒトF158 FcγRIIIa、ヒトFcγRIIIb、ヒトFcγRIIIaおよびマウスFcγRIIIの細胞外領域を発現させ、精製した。図10は、ヒトV158 FcγRIIIaの発現と精製の結果を示すSDSPAGEゲルを提示する。この受容体の細胞外領域は、Mammalian Gene Collection (MGC:22630)から得られたクローンからのPCRにより入手した。受容体をグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) と融合させ、スクリーニングを可能にした。タグ付きFcγRIIIaを293T細胞に形質移入し、分泌されたFcγRIIIaを含有する培地を3日後に回収し、精製した。ウェスタン分析のために、膜を抗GST抗体でプローブした。

【0286】

全ての設計したFc変異体について、ビーズをベースとする非放射性発光近接アッセイであるAlphaScreen^(商標)アッセイ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (ALPHA), PerkinElmer, Wellesley, MA) を使用して、FcγRIIIaおよびFcγRIIIbへの結合親和性を測定した。ドナービーズのレーザー励起が酸素を励起し、それがアクセプタービーズに十分近ければ、化学発光事象のカスケードを生成させ、最終的に520-620nmでの蛍光放射を導く。AlphaScreen^(商標)アッセイを、Fc変異体をスクリーニングするための競合アッセイとして適用した。ストレプトアビジンのドナービーズに取り付けるためにWTアレムツズマブ抗体を標準的方法でビオチン化し、GSTタグ付きFcγRをグルタチオンキレートアクセプタービーズに結合させた。競合するFc変異体の非存在下では、WT抗体とFcγRは相互作用し、520-620nmのシグナルを奏する。タグのないFc変異体の添加はWT Fc/FcγR相互作用と競合し、
20 蛍光を定量的に減少させ、相対的結合親和性の測定を可能にする。全Fc変異体を、AlphaScreen^(商標)アッセイを使用してV158 FcγRIIIa結合についてスクリーニングした。選択されたFc変異体を、その後FcγRIIIb並びに他のFcγR類およびFcリガンド類への結合についてスクリーニングした。

【0287】

図11は、選択されたFc変異体によるヒトV158 FcγRIIIaの結合について、AlphaScreen^(商標)のデータを示す。低濃度および高濃度の競合抗体でのベースラインにより各々与えられる最大および最小発光シグナルに対して結合データを標準化した。非線形回帰を使用してデータを一部位競合モデルにフィットさせた。これらのフィットは
30 図中で曲線により表す。これらのフィットは、各抗体について阻害濃度50% (IC50) (即ち、50%阻害に必要とされる濃度) をもたらし (図11中、破線で図解)、故にFc変異体の相対的結合親和性を定量的に決定することを可能にする。ここで、WTアレムツズマブは $(4.63 \times 10^{-9}) \times (2) = 9.2 \text{ nM}$ のIC50を有し、一方S239Dは $(3.98 \times 10^{-10}) \times (2) = 0.8 \text{ nM}$ のIC50を有する。従って、S239Dアレムツズマブは、WTアレムツズマブよりも $9.2 \text{ nM} / 0.8 \text{ nM} = 11.64$ 倍緊密にヒトV158 FcγRIIIaに結合する。同様の計算を全Fc変異体のヒトV158 FcγRIIIaに対する結合について実施した。選択されたFc変異体を、ヒトFcγRIIIbへの結合についてもスクリーニングした。これらのAlphaScreen^(商標)結合データを図12に示す。表61は、AlphaScreen^(商標)アッセイにより測定したFc変異体のヒトV158 FcγRIIIa (列3) およびヒトFcγRIIIb (列4) に対する結合について、親抗体と比較した増強倍率または低減倍率を提示する。これらのデータについて、1より大きい倍率は、結合親和性の増強を示し、1より低い倍率は、WT Fcと比較した結合親和性の低減を示す。トラスツズマブに関して試験したアスタリスク (*) で示したものを除き、全データはアレムツズマブに関して得られた。

【0288】

表61

10

20

30

40

【表 7 9】

表 6 1

変異体	置 換 (群)	FcγRIIIa 倍率	FcγRIIb 倍率	FcγIIIa-倍率 : FcγIIb-倍率	
1	V264A	0.53			
2	V264L	0.56			
3	V264I	1.43			
4	F241W	0.29			
5	F241L	0.26			10
6	F243W	0.51			
7	F243L	0.51			
8	F241L/F243L/V262I/V264I	0.09			
9	F241W/F243W	0.07			
10	F241W/F243W/V262A/V264A	0.04			
11	F241L/V262I	0.06			
12	F243L/V264I	1.23			
13	F243L/V262I/V264W	0.02			
14	F241Y/F243Y/V262T/V264T	0.05			
15	F241E/F243R/V262E/V264R	0.05			
16	F241E/F243Q/V262T/V264E	0.07			20
17	F241R/F243Q/V262T/V264R	0.02			
18	F241E/F243Y/V262T/V264R	0.05			
19	L328M	0.21			
20	L328E	0.12			
21	L328F	0.24			
22	I332E	6.72	3.93	1.71	
23	L328M/I332E	2.60			
24	P244H	0.83			
25	P245A	0.25			
26	P247V	0.53			
27	W313F	0.88			
28	P244H/P245A/P247V	0.93			30
29	P247G	0.54			
30	V264I/I332E	12.49	1.57*	7.96	
31	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E	0.19			
32	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E				
33	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E				
34	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E	0.10			
35	S298A	2.21			
36	S298A/I332E	21.73			
37	S298A/E333A/K334A	2.56			
41	S239E/I332E	5.80	3.49	1.66	
42	S239Q/I332E	6.60	4.68	1.41	40
43	S239E	10.16			
44	D265G	<0.02			
45	D265N	<0.02			
46	S239E/D265G	<0.02			
47	S239E/D265N	0.02			
48	S239E/D265Q	0.05			
49	Y296E	0.73	1.11	0.66	
50	Y296Q	0.52	0.43	1.21	

【 0 2 8 9 】

【表 8 0】

表 6 1 (続き)

変異体	置 換 (群)	FcγRIIIa 倍率	FcγRIIb 倍率	FcγIIa-倍率: FcγIIb-倍率	
51	S298T	0.94	<0.02		
52	S298N	0.41	<0.02		
53	T299I	<0.02			
54	A327S	0.23	0.39	0.59	
55	A327N	0.19	1.15	0.17	10
56	S267Q/A327S	0.03			
57	S267L/A327S	<0.02			
58	A327L	0.05			
59	P329F	<0.02			
60	A330L	0.73	0.38	1.92	
61	A330Y	1.64	0.75	2.19	
62	I332D	17.80	3.34	5.33	
63	N297S	<0.02			
64	N297D	<0.02			
65	N297S/I332E	<0.02			
66	N297D/I332E	0.08	<0.02		20
67	N297E/I332E	<0.02			
68	D265Y/N297D/I332E	<0.02			
69	D265Y/N297D/T299L/I332E	<0.02			
70	D265F/N297E/I332E	<0.02			
71	L328I/I332E	7.03			
72	L328Q/I332E	1.54			
73	I332N	0.39			
74	I332Q	0.37			
75	V264T	2.73			
76	V264F	0.16			
77	V240I	3.25			
78	V263I	0.10			30
79	V266I	1.86			
80	T299A	0.03			
81	T299S	0.15			
82	T299V	<0.02			
83	N325Q	<0.02			
84	N325L	<0.02			
85	N325I	<0.02			
86	S239D	11.64	4.47*	2.60	
87	S239N	<0.02			
88	S239F	0.22	<0.02		
89	S239D/I332D	14.10			40
90	S239D/I332E	56.10	19.71*	2.85	
91	S239D/I332N	7.19			
92	S239D/I332Q	9.28			
93	S239E/I332D	9.33			
94	S239E/I332N	11.93			
95	S239E/I332Q	3.80			
96	S239N/I332D	3.08			
97	S239N/I332E	14.21			
98	S239N/I332N	0.43			

【 0 2 9 0】

【表 8 1】

表 6 1 (続き)

異性体	置 換 (群)	FcγRIIIa 倍率	FcγRIIb 倍率	FcγIIa-倍率: FcγIIb-倍率
99	S239N/I332Q	0.56		
100	S239Q/I332D	5.05		
101	S239Q/I332N	0.39		
102	S239Q/I332Q	0.59		
103	K326E	3.85		
104	Y296D	0.62		
105	Y296N	0.29		
106	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E	0.15		
107	A330Y/I332E	12.02	4.40	2.73
108	V264I/A330Y/I332E	12.00	3.54	3.39
109	A330L/I332E	10.34	2.03	5.09
110	V264I/A330L/I332E	11.15	1.79	6.23
111	L234D	0.21		
112	L234E	1.34	2.21	0.61
113	L234N	0.56	1.39	0.40
114	L234Q	0.37		
115	L234T	0.35		
116	L234H	0.33		
117	L234Y	1.42	1.08	1.31
118	L234I	1.55	1.14	1.36
119	L234V	0.38		
120	L234F	0.30		
121	L235D	1.66	3.63	0.46
122	L235S	1.25		
123	L235N	0.40		
124	L235Q	0.51		
125	L235T	0.52		
126	L235H	0.41		
127	L235Y	1.19	10.15	0.12
128	L235I	1.10	0.94	1.17
129	L235V	0.48		
130	L235F	0.73	3.53	0.21
131	S239T	1.34		
132	S239H	0.20		
133	S239Y	0.21		
134	V240A	0.70	0.14	5.00
135	V240T			
136	V240M	2.06	1.38	1.49
137	V263A			
138	V263T	0.43		
139	V263M	0.05		
140	V264M	0.26		
141	V264Y	1.02	0.27	3.78
142	V266A	<0.02		
143	V266T	0.45		
144	V266M	0.62		
145	E269H	<0.02		
146	E269Y	0.12		

【0 2 9 1】

【表 8 2】

表 6 1 (続き)

異性体	置 換 (群)	FcγRIIIa 倍率	FcγRIIb 倍率	FcγIIIa-倍率: FcγIIb-倍率	
147	E269F	0.16			
148	E269R	0.05			
149	Y296S	0.12			
150	Y296T	<0.02			
151	Y296L	0.22			10
152	Y296I	0.09			
153	A298H	0.27			
154	T299H	<0.02			
155	A330V	0.43			
156	A330I	1.71	0.02	85.5	
157	A330F	0.60			
158	A330R	<0.02			
159	A330H	0.52			
160	N325D	0.41			
161	N325E	<0.02			
162	N325A	0.11			20
163	N325T	1.10			
164	N325V	0.48			
165	N325H	0.73			
166	L328D/I332E	1.34			
167	L328E/I332E	0.20			
168	L328N/I332E	<0.02			
169	L328Q/I332E	0.70			
170	L328V/I332E	2.06			
171	L328T/I332E	1.10			
172	L328H/I332E	<0.02			
173	L328I/I332E	3.49			
174	L328A	0.20			30
175	I332T	0.72			
176	I332H	0.46			
177	I332Y	0.76			
178	I332A	0.89			
179	S239E/V264I/I332E	15.46			
180	S239Q/V264I/I332E	2.14			
181	S239E/V264I/A330Y/I332E	8.53			
182	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E				
183	S239D/N297D/I332E	0.28			
184	S239E/N297D/I332E	0.06			
185	S239D/D265V/N297D/I332E				
186	S239D/D265I/N297D/I332E				40
187	S239D/D265L/N297D/I332E	<0.02			
188	S239D/D265F/N297D/I332E	<0.02			
189	S239D/D265Y/N297D/I332E	0.02			
190	S239D/D265H/N297D/I332E	0.04			
191	S239D/D265T/N297D/I332E	<0.02			
192	V264I/N297D/I332E	0.05			
193	Y296D/N297D/I332E				
194	Y296E/N297D/I332E	<0.02			

【0 2 9 2】

【表 8 3】

表 6 1 (続き)

異性体	置 換 (群)	FcγRIIIa 倍率	FcγRIIb 倍率	FcγIIIa- 倍率: FcγIIb- 倍率
195	Y296N/N297D/I332E	0.04		
196	Y296Q/N297D/I332E	<0.02		
197	Y296H/N297D/I332E	<0.02		
198	Y296T/N297D/I332E	<0.02		
199	N297D/T299V/I332E	<0.02		
200	N297D/T299I/I332E	<0.02		
201	N297D/T299L/I332E	<0.02		
202	N297D/T299F/I332E	<0.02		
203	N297D/T299H/I332E	<0.02		
204	N297D/T299E/I332E	<0.02		
205	N297D/A330Y/I332E	0.43		
206	N297D/S298A/A330Y/I332E			
207*	S239D/A330Y/I332E	129.58		
208*	S239N/A330Y/I332E	14.22		
209*	S239D/A330L/I332E	138.63	7.50	18.48
210*	S239N/A330L/I332E	12.95		
211*	V264I/S298A/I332E	16.50		
212*	S239D/S298A/I332E	295.16	6.16	47.92
213*	S239N/S298A/I332E	32.14	5.15	6.24
214*	S239D/V264I/I332E	36.58	14.39	2.54
215*	S239D/V264I/S298A/I332E			
216*	S239D/V264I/A330L/I332E			

【0293】

実施例3：FcγR類への結合の選択的増強

FcγRIIIaおよびFcγRIIbのスクリーニングから、最適化特性を有する数々の有望なFc変異体を得た。表61は、FcγRIIIaにより緊密に結合し、従って抗体およびFc融合体のエフェクター機能改良のための候補であるFc変異体を提供する。これらには、239、264、330および332で置換を含む数々の変異体が含まれる。図13は、これらのFc変異体のいくつかについて、AlphaScreen^(商標)結合データを示す。これらのFc変異体の大部分は、S298A/E333A/K334Aよりも実質的に大きいFcγRIIIa結合増強を提供する。

【0294】

Fc変異体の大部分を抗体アレムツズマブに関してスクリーニングしたが、選択されたFc変異体は、リツキシマブおよびトラスツズマブに関するスクリーニングした。選択されたFc変異体の、リツキシマブおよびトラスツズマブに関するヒトV158 FcγRIIIaに対する結合のAlphaScreen^(商標)データを、図14および15に各々示す。結果は、抗体に関係なく、Fc変異体が一貫した結合の増強を発揮し、従って本発明のFc変異体が抗体およびFc融合体に広く適用可能であることを示す。

【0295】

FcγRIIIaとFcγRIIbに対して異なって増強された結合を示すFc変異体を得られた。論じたように、最適なエフェクター機能は、活性化FcγR類への親和性が阻害性FcγRIIbへの親和性より大きいFc変異体から生じ得る。この特異的プロフィールを有する2つのFc変異体について、FcγRIIIaとFcγRIIbへの結合

を直接比較するAlphaScreen^(商標)データを、図16aおよび16bに示す。この概念は、活性化FcγRの増強または低減倍率(表61、列3)を、阻害性FcγRの増強または低減倍率(表61、列4)で割ることにより定量的に定義でき、本明細書ではFcγRIIa倍率:FcγRIIb倍率の比と呼ぶ。この値を表61の列5に提供する。表61は、Fc変異体が、最高で86:1のFcγRIIa倍率:FcγRIIb倍率の比で、この特異的プロフィールを提供することを示す。

【0296】

エフェクター機能の増強について最も有望ないくつかの本発明のFc変異体は、FcγRIIaに対する親和性の実質的な増加および好都合なFcγRIIa倍率:FcγRIIb倍率の比の両方を有する。これらには、例えば、S239D/I332E(FcγRIIa倍率=56、FcγRIIa倍率:FcγRIIb倍率=3)、S239D/A330Y/I332E(FcγRIIa倍率=130)、S239D/A330L/I332E(FcγRIIa倍率=139、FcγRIIa倍率:FcγRIIb倍率=18)およびS239D/S298A/I332E(FcγRIIa倍率=295、FcγRIIa倍率:FcγRIIb倍率=48)が含まれる。図17は、これらおよび他のFc変異体について、ヒトV158 FcγRIIaに対するAlphaScreen^(商標)結合データを示す。

【0297】

エフェクター機能に寄与する数々のFcγR類があるので、Fc変異体を他の受容体に対してさらにスクリーニングする価値があり得る。図18は、選択されたFc変異体のヒトR131 FcγRIIaに対する結合のAlphaScreen^(商標)データを示す。見られるように、好都合な結合増強および特異的プロフィールを有するこれらの上述の変異体は、この活性化受容体についても結合の増強を示す。FcγRIIa、FcγRIIbおよびFcγRIIcのスクリーニングへの使用は、実験的試験をこれらの特定のFcγR類に制限することを意味しない;以前に説明したように、ヒト、マウス、ラット、サルなどに由来する無数のFcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIのアイソフォームおよびアロタイプを含むがこれらに限定されるものではない他のFcγR類が、スクリーニングに企図されている。

【0298】

図11-18および表61に提供されるFcγR結合データは、全部合わせて、位置234、235、239、240、243、264、266、325、328、330および332における数々の置換が、抗体およびFc融合体のエフェクター機能の改善のために有望な候補であることを示す。これらの置換のいくつかの組合せは典型的に相加的または共同的な結合の改善をもたらしたので、まだ探索されていない表61に提供されるFc変異体の組合せも、好都合な結果を提供すると予想される。従って、表61中の全てのFc変異体の組合せが企図されている。同様に、表61のFc変異体のいずれかと、既発見または未発見のFc変異体との組合せも、好ましい特性を提供し得、これらの組合せも企図されている。さらに、これらの結果から、位置234、235、239、240、243、264、266、325、328、330および332での他の置換も、好都合な結合増強および特異性を提供し得、従って、表61に提示したもの以外のこれらの位置での置換も企図されている。

【0299】

実施例4:FcγR類への結合の低減

論じたように、より高いエフェクター機能への要望があるが、いくつかの抗体治療には、低減または排除されたエフェクター機能が望ましいことがある。表61中のいくつかのFc変異体は、実質的にFcγR結合を低減または除去し、従ってエフェクター機能が望ましくない抗体およびFc融合体において用途を見出し得る。そのような変異体のいくつかの例について、AlphaScreen^(商標)結合データを図19aおよび19bに示す。これらのFc変異体並びにそれらの組み合わせの使用は、望ましい場合に、例えばその作用メカニズムが阻害または拮抗作用を含むが標的抗原を有する細胞の殺傷を含まない抗体および

Fc融合体において、エフェクター機能を除去するのに用途を見出し得る。

【0300】

実施例5：非グリコシル化Fc変異体

論じたように、本実験の1つの目標は、最適化非グリコシル化Fc変異体を得ることであった。いくつかのFc変異体は、この目標に対して有意な進歩を提供する。グリコシレーション部位であるので、N297での置換は、非グリコシル化Fcをもたらす。N297での置換を有する他の全てのFc変異体は完全にFcγRIIIaへの結合親和性を有する。この結果の正確な理由はこの変異体の高解像度の構造がないので不確かであるが、コンピューター処理スクリーニング予想は、これは新しい好都合なFc/FcγR相互作用と好都合な静電的特性の組合せによる可能性があることを示唆する。実際に、他の静電的置換が、さらなる非グリコシル化Fcの最適化のために構想されている。表61は、S239D/N297D/I332EおよびN297D/A330Y/I332Eなどの他の非グリコシル化Fc変異体が、FcγRIIIaに対する親和性をグリコシル化WTアレムツズマブの各々0.28ーおよび0.43倍にする結合の増強をもたらすことを示す。これらの変異体の他のFcγR結合を増強するFc変異体との組合せが企図されており、グリコシル化親Fcとほぼ同等かまたはより良好な親和性を有する1またはそれ以上のFcγR類に結合する非グリコシル化Fc変異体を得ることを目標としている。さらなる有望なFc変異体のセットは、炭水化物の非存在下で安定性と溶解性の増強をもたらす。FcγR結合を媒介しないが炭水化物とFcとの間の接点を決定する位置である位置241、243、262および264で置換を含むFc変異体は、恐らくそれらが炭水化物の立体構造を乱すので、FcγR結合を除去する。しかしながら、脱グリコシル化形態では、Fc変異体F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264RおよびF241E/F243Y/V262T/V264Rは、図21のAlphaScreen^(商標)データで示すように、グリコシル化形態よりも強いFcγRIIIaへの結合を示す。この結果は、これらが非グリコシル化Fcの構造、安定性、溶解性および機能の最適化の鍵となる位置であることを示す。これらの結果は共に、タンパク質工学処理を使用して、炭水化物の非存在下で、抗体およびFc融合体の好都合な機能および溶解特性を回復でき、これらおよび他のFc位置で置換を含む好都合な溶解特性および十分な機能性を有する非グリコシル化抗体およびFc融合体への道を開くことができることを示唆する。

【0301】

実施例6．多型のFcγRIIIaに対するFc変異体の親和性

上記で論じた通り、Fc-媒介エフェクター機能の重要なパラメーターは、FcγRIIIaのV158とF158の両多型に対するFcの親和性である。選択された変異体の2つの受容体アロタイプへの結合を比較するAlphaScreen^(商標)データを、図22a (V158 FcγRIIIa) および図22b (F158 FcγRIIIa) に示す。見られるように、全変異体は、両FcγRIIIaアロタイプへの結合を改善する。これらのデータは、エフェクター機能が増強された本発明のこれらのFc変異体が全患者群に広く適用可能であり、臨床効力への増強は、それを最も必要とする低応答患者群に対して潜在的に最大であることを示す。

【0302】

これらのFc変異体のFcγR結合親和性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) (Biacore, Uppsala, Sweden) を使用してさらに調べた。SPRは、タンパク質-タンパク質相互作用の結合親和性の測定を可能にする鋭敏かつ極度に定量的な方法であり、Fc/FcγR結合を有効に測定するために使用されてきた (Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483)。従って、SPRは、AlphaScreen^(商標)アッセイに優れた補足的結合アッセイを提供する。His-タグ付きV158 FcγRIIIaをSPRチップに固定し、WTおよびFc変異体のアレムツズマブ抗体を広範囲の濃度でチップ上に流した。標準

的な曲線フィット法を使用してデータをフィットさせることにより結合定数を得た。表62は、SPRを使用して得られた選択されたFc変異体のV158 FcγRIIIaおよびF158 FcγRIIIaへの結合についての解離定数(Kd)を提示し、これらをAlphaScreen^(商標)アッセイから得られたIC50と比較する。各変異体のKdおよびIC50をWTアロタイプマブのそれで割ることにより、WTに対する改善倍率(倍率)を得る。

【0303】

表62

【表84】

	SPR V158 FcγRIIIa Kd (nM) 倍率		SPR F158 FcγRIIIa Kd (nM) 倍率		AlphaScreen™ V158 FcγRIIIa IC50 (nM) 倍率		AlphaScreen™ F158 FcγRIIIa IC50 (nM) 倍率	
WT	68		730		6.4		17.2	
V264I	64	1.1	550	1.3	4.5	1.4	11.5	1.5
I332E	31	2.2	72	10.1	1.0	6.4	2.5	6.9
V264I/I332E	17	4.0	52	14.0	0.5	12.8	1.1	15.6
S298A	52	1.3	285	2.6	2.9	2.2	12.0	1.4
S298A/E333A/ K334A	39	1.7	156	4.7	2.5	2.6	7.5	2.3

【0304】

SPRデータは、AlphaScreen^(商標)アッセイで観察されたFcγRIIIa親和性の改善を補強する。表62はさらに、V264I/I332EおよびI332EがS298AおよびS298A/E333A/K334Aよりも優位であることを示す；S298A/E333A/K334AはV158およびF158 FcγRIIIaへのFc結合を各々1.7倍および4.7倍改善するが、一方I332Eは、各々2.2倍および10.1倍の結合の増強を示し、V264I/I332Eは、各々4.0倍および14倍の結合の増強を示す。V264I/I332EのF158 FcγRIIIaに対する親和性(52 nM)が、WTのV158アロタイプに対するそれ(68 nM)より良好であることも留意に値する。これは、このFc変異体並びにさらに大きい結合の改善を伴うものは、低応答患者群のための抗体の臨床的効力が高応答者のために現在可能なものを達成することを可能にする。SPRとAlphaScreen^(商標)の結合測定の間接性を図23a-23dに示す。図23aおよび23bは、各々V158 FcγRIIIaおよびF158 FcγRIIIaに対する結合についてKd-IC50の相関を示し、図23cおよび23dは、各々V158 FcγRIIIaおよびF158 FcγRIIIaへの結合についての倍率-改善の相関を示す。これらのデータの直線への良好なフィット($r^2=0.9$ 、 $r^2=0.84$ 、 $r^2=0.98$ および $r^2=0.90$)は、AlphaScreen^(商標)測定の正確さを支持し、Fc変異体の相対的FcγR結合親和性の測定のためのその使用の妥当性を立証する。

【0305】

実施例7. Fc変異体のADCC

エフェクター機能に対する効果を測定するために、選択されたFc変異体の細胞をベースとするADCCアッセイを実施した。精製ヒト末梢血単球(PBMC)をエフェクター細胞として用いるDELFIA^(登録商標)EuTDAベースの細胞傷害作用アッセイ(Perkin Elmer, MA)を使用して、ADCCを測定した。標的細胞にBATDAを 1×10^6 細胞/mlで載せ、4回洗浄し、96ウェルプレートに10,000細胞/ウェルで播いた。次いで、明記した最終濃度でFc変異体またはWTの抗体を使用して、標的細胞をオプソニン化した。ヒトPBMCを指示された過剰倍率の標的細胞で添加し、プレートを37℃で4時間インキュベートした。一緒に培養した細胞を500xgで遠心分離し、上清を別のプレートに移し、Eu溶液とインキュベートし、Packard Fusion^(商標)リーダー(Packard Biosciences, IL)を使用して相対的蛍光ユニットを測定した。サンプルを3重(triplicate)とし、誤差評価を得た($n=3$ 、+/-S.D.)。PCRを使用して、

P B M CをV 1 5 8またはF 1 5 8 F c γ R I I I aアロタイプについてアロタイプ分析した。

【0306】

D o H H-2リンパ腫標的細胞を使用して、F c変異体およびW TアレムツズマブのA D C Cアッセイを行った。図24aは、これらのタンパク質の10ng/ml抗体でのA D C Cを示す棒グラフである。結果は、アレムツズマブF c変異体I 3 3 2 E、V 2 6 4 IおよびI 3 3 2 E/V 2 6 4 IがW Tアレムツズマブと比較して実質的に増強されたA D C Cを有することを示し、相対的A D C C増強は、AlphaScreen^(商標)アッセイおよびS P Rで示されたそれらのF c γ R I I I aへの結合の改善に比例する。A D C Cの抗体濃度に対する用量依存性を図24bに示す。これらのデータは、抗体の低濃度および高濃度でベースラインにより各々もたらされる最小および最大発光シグナルに対して標準化した。非線形回帰を使用して、データをS字型用量反応モデルにフィットさせた。これは、図中の曲線で表される。このフィットは、各F c変異体について相対的なA D C Cの増強を提供する50%有効濃度(E C 5 0)(即ち、50%の効力に必要なとされる濃度)の決定を可能にする。これらの結合データのE C 5 0は、AlphaScreen^(商標)競合データから得られたI C 5 0に類似し、従って、これらの値の派生物は、実施例2および図11に記載したものと類似する。図24b中、W T、V 2 6 4 I/I 3 3 2 EおよびS 2 3 9 D/I 3 3 2 Eアレムツズマブのデータへのフィットから得られるlog(E C 5 0)は、各々0.99、0.60および0.49であり、従って、それらの各々のE C 5 0は、9.9、4.0および3.0である。故に、V 2 6 4 I/I 3 3 2 EおよびS 2 3 9 E/I 3 3 2 Eは、ヘテロ接合性V 1 5 8/F 1 5 8 F c γ R I I I aを発現しているP B M Cを使用して、W Tアレムツズマブの各々2.5倍および3.3倍のA D C C増強をもたらす。これらのデータを下記表63にまとめる。

【0307】

表63

【表85】

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	W Tに対する改善倍率
W T	0.99	9.9	
V264I/I332E	0.60	4.0	2.5
S239D/I332E	0.49	3.0	3.3

【0308】

これらのA D C C増強が抗体に広く適用可能であるか否かを判定するために、選択されたF c変異体をリツキシマブおよびトラスツズマブに関して評価した。W I L 2-Sリンパ腫標的細胞を使用して、A D C CアッセイをV 2 6 4 I/I 3 3 2 E、W TおよびS 2 9 8 A/D 3 3 3 A/K 3 3 4 Aリツキシマブに行った。図25aは、これらのタンパク質の1ng/ml抗体でのA D C Cを示す棒グラフを提示する。結果は、V 2 6 4 I/I 3 3 2 EリツキシマブがW Tリツキシマブと比較して実質的に増強されたA D C C、並びにS 2 9 8 A/D 3 3 3 A/K 3 3 4 Aより優れたA D C Cをもたらすことを示し、これはAlphaScreen^(商標)アッセイおよびS P Rで観察されたF c γ R I I I a結合の改善と一致する。図25bは、抗体濃度に対するA D C Cの用量依存性を示す。これらのデータのフィットから得られるE C 5 0およびA D C Cの相対的改善倍率を下記表64に提供する。見られるように、V 2 6 4 I/I 3 3 2 Eリツキシマブは、ホモ接合性F 1 5 8/F 1 5 8 F c γ R I I I aを発現しているP B M Cについて、W Tの11.3倍のE C 5 0の増強をもたらす。リツキシマブについて観察されたアレムツズマブに対して高い改善は、恐らくヘテロ接合性V 1 5 8/F 1 5 8 F c γ R I I I aのP B M Cではなくホモ接合性F 1 5 8/F 1 5 8 F c γ R I I I aを使用したためであり、また異なる抗体および標的細胞株を使用したためである可能性もある。

【0309】

表 6 4

【表 8 6】

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WTに対する改善倍率
WT	0.23	1.7	
S298A/E333A/K334A	-0.44	0.37	4.6
V264I/I332E	-0.83	0.15	11.3

【0310】

2つの乳癌腫標的細胞株BT474およびSk-BR-3を使用して、Fc変異体およびWTのトラスツズマブにADCCアッセイを行った。図26は、1ng/ml抗体でのADCCを図解する棒グラフを示す。結果は、V264IおよびV264I/I332Eトラスツズマブが、WTトラスツズマブと比較して実質的に増強されたADCCをもたらし、相対的なADCC増強は、AlphaScreen^(商標)アッセイおよびSPRにより示されたFcγRIIIaへの結合の改善に比例することを示す。図26bは、抗体濃度に対するADCCの用量依存性を示す。これらのデータのフィットから得られるEC50およびADCCの相対的改善倍率を下記表65に提供する。I332Eトラスツズマブについて、A330LおよびA330Yと組み合わせた場合に、有意なADCCの改善が観察される。

10

【0311】

表 6 5

【表 8 7】

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WTに対する改善倍率
WT	1.1	11.5	
I332E	0.34	2.2	5.2
A330Y/I332E	-0.04	0.9	12.8
A330L/I332E	0.04	1.1	10.5

20

【0312】

図26cは、トラスツズマブ変異体について、様々な抗体濃度での用量反応ADCCデータをもう1セット示す。これらのデータのフィットから得られるEC50およびADCCの相対的改善倍率を下記表66に提供する。結果は、トラスツズマブFc変異体S239D/I332E、S239D/S298A/I332E、S239D/A330Y/I332EおよびS239D/A330L/I332Eが、WTトラスツズマブおよびS298A/E333A/K334Aと比較して実質的なADCC増強をもたらすことを示し、これはAlphaScreen^(商標)アッセイおよびSPRで観察されたFcγR結合データと一致する。S239D/A330L/I332Eトラスツズマブは、これまでに観察された最大のエフェクター機能の増加を示し、ホモ接合性F158/F158 FcγRIIIaを発現しているPBMCにWTの約50倍のEC50の増強をもたらす。

30

【0313】

表 6 6

40

【表 8 8】

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WTに対する改善倍率
WT	0.45	2.83	
S298A/E333A/K334A	-0.17	0.67	4.2
S239D/I332E	-0.18	0.66	4.3
S239D/A330Y/I332E	-0.29	0.51	5.5
S239D/S298A/I332E	-0.52	0.30	9.4
S239D/A330L/I332E	-1.22	0.06	47.2

10

【0314】

実施例 8. Fc 変異体による補体結合および活性化

補体タンパク質 C1q は、Fc 上の FcγR 結合部位に近接する部位に結合し、従って、Fc 変異体が補体を募り活性化するそれらの能力を維持するか否かを判定することが賢明であった。AlphaScreen^(商標)アッセイを使用して、選択された Fc 変異体の補体タンパク質 C1q への結合を測定した。実施例 2 に記載のようにストレプトアビジンドナービーズに付着したビオチン化 WT アレムツズマブ抗体を用いて、そしてアクセプタービーズに直接結合させた C1q を使用して、アッセイを実行した。図 27a に示す選択された Fc 変異体の結合データは、C1q 結合が損なわれていないことを示す。選択された Fc 変異体の細胞をベースとする CDC アッセイも実施し、Fc 変異体が補体を活性化する能力を維持するか否かを調べた。Amar Blue を使用して、Fc 変異体および WT のリツキシマブでオプソニン化された WIL2-S リンパ腫細胞のヒト血清補体 (Quidel, San Diego, CA) による溶解をモニタリングした。図 27b に示す選択された Fc 変異体についての結果は、CDC が損なわれていないことを示す。

20

【0315】

実施例 9. Fc 変異体によるプロテイン A の結合

論じたように、細菌のプロテイン A は、Cγ2 と Cγ3 のドメインの間の Fc 領域に結合し、抗体の精製に頻繁に用いられる。AlphaScreen^(商標)アッセイを使用して、実施例 2 に記載のようにストレプトアビジンドナービーズに付着したビオチン化 WT アレムツズマブ抗体を使用して、そしてアクセプタービーズに直接結合させたプロテイン A を使用して、選択された Fc 変異体のプロテイン A への結合を測定した。図 28 に示す選択された Fc 変異体についての結合データは、Fc 変異体のプロテイン A に結合する能力が損なわれていないことを示す。これらの結果は、新生児 Fc 受容体 FcRn やタンパク質 G などの、プロテイン A と同じ Fc の部位に結合する他の Fc リガンドに対する Fc 変異体の親和性も影響されないことを示唆する。

30

【0316】

実施例 10. Fc 変異体のマウス FcγR に結合する能力

非ヒト FcγR 類の Fc 最適化は、動物モデルで Fc 変異体を実験的に試験するのに有用であり得る。例えば、マウス (例えば、ヌードマウス、SCID マウス、異種移植マウスおよび/または遺伝子組換えマウス) で試験する場合、1 またはそれ以上のマウス FcγR について最適化された Fc 変異体を含む抗体および Fc 融合体は、効力、作用メカニズムなどに関して価値ある情報を提供し得る。本発明の Fc 変異体がそのような実験に有用であり得るか否かを評価するために、選択された Fc 変異体のマウス FcγRIII に対する親和性を、AlphaScreen^(商標)アッセイを使用して測定した。実施例 2 に記載のようにストレプトアビジンドナービーズに付着したビオチン化 WT アレムツズマブ、および実施例 2 に記載の通り発現および精製した、グルタチオンキレートアクセプタービーズに結合した GST タグ付きマウス FcγRIII を使用して、AlphaScreen^(商標)アッセイを実行した。これらの結合データを図 29 に示す。結果は、ヒト FcγRIIIa への結合を増強するいくつかの Fc 変異体は、マウス FcγRIII への結合も増強することを示す。この結果は、本発明の Fc 変異体または非ヒト FcγR 類について最適化された他

40

50

のFc変異体が、動物モデルを使用する実験において用途を見出し得ることを示す。

【0317】

実施例11. CHO細胞で発現されたFc変異体の妥当性

本発明のFc変異体をスクリーニングの目的で293T細胞に発現させたが、大スケールでの抗体の産生は、典型的にチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株での発現により実行される。CHOで発現されたFc変異体の特性を評価するために、選択されたFc変異体およびWTのアレムツズマブを、実施例2に記載の通りにCHO細胞で発現させ、精製した。図30は、CHOおよび293Tで発現させたFc変異体およびWTのアレムツズマブのヒトV158 FcγRIIIaへの結合を比較するAlphaScreen^(商標)データを示す。結果は、293TまたはCHOのどちらで発現されても、本発明のFc変異体が同等のFcγR結合の増強を示すことを示す。

10

【0318】

実施例12. Fc変異体の治療適用

本発明について記載された数々のFc変異体は、抗癌抗体の治療効力の改善に有意な潜在能力を有する。例示説明のために、数々の本発明のFc変異体を抗体リツキシマブの配列に組み込んだ。US5,736,137に記載されたWTリツキシマブの軽鎖および重鎖を図31aおよび31bに提供する。改善された抗CD20抗体の配列を図31cに提供する。改善された抗CD20抗体の配列は、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅およびX₆からなる群から選択される非WTアミノ酸を少なくとも含む。これらの改善された抗CD20抗体の配列は、置換Z₁も含み得る。ここでのリツキシマブの使用は、単なる例示であり、Fc変異体の適用をこの抗体または何らかの他の特定の抗体またはFc融合体に制限することを意味しない。

20

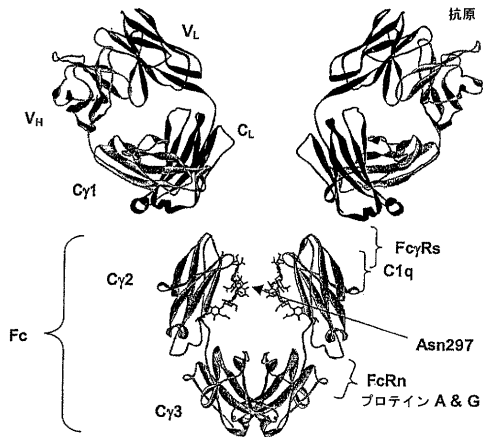
【0319】

全参考文献は、出典明示により本明細書の一部とする。

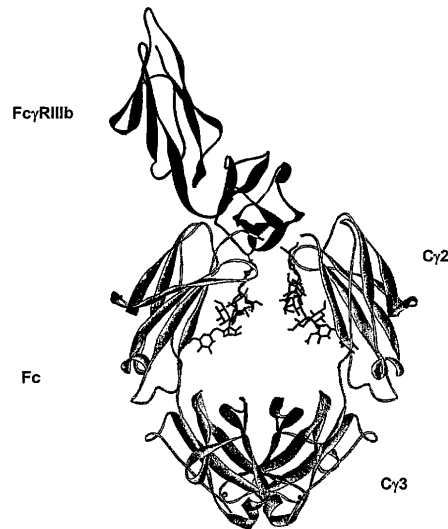
【0320】

例示説明のために本発明の特定の実施態様を上に記載したが、添付の特許請求の範囲に記載した本発明から逸脱せずに、膨大な詳細の変形をなし得ることが当業者に理解される。

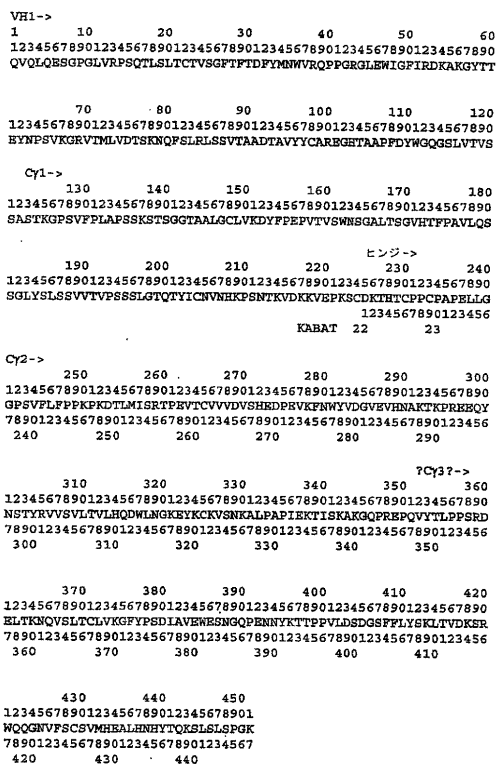
【図 1】



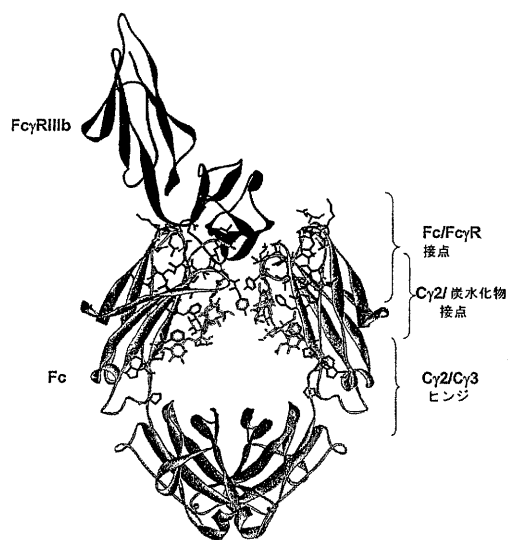
【図 2】



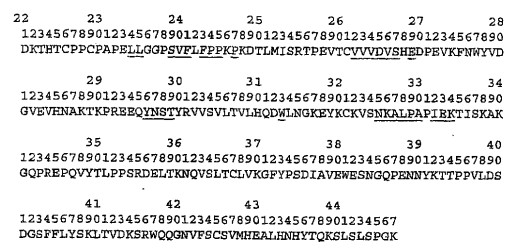
【図 3】



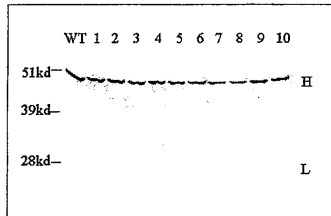
【図 4】



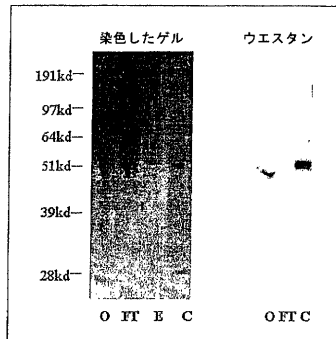
【図 5】



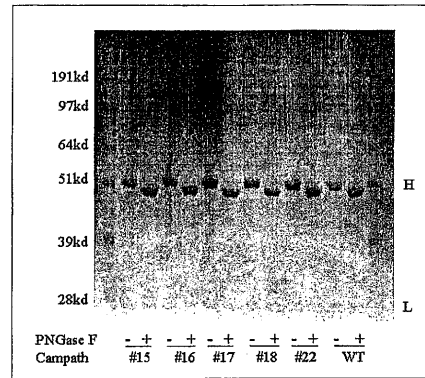
【図 6】



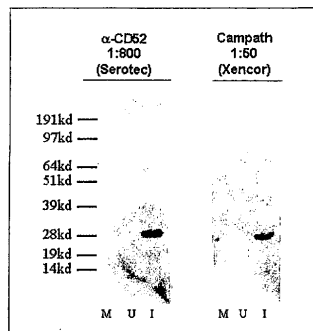
【図 7】



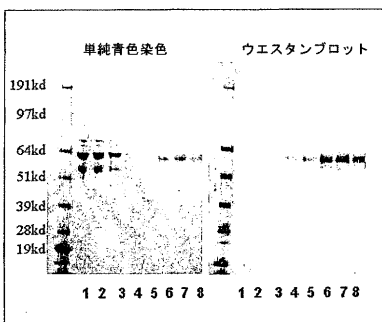
【図 8】



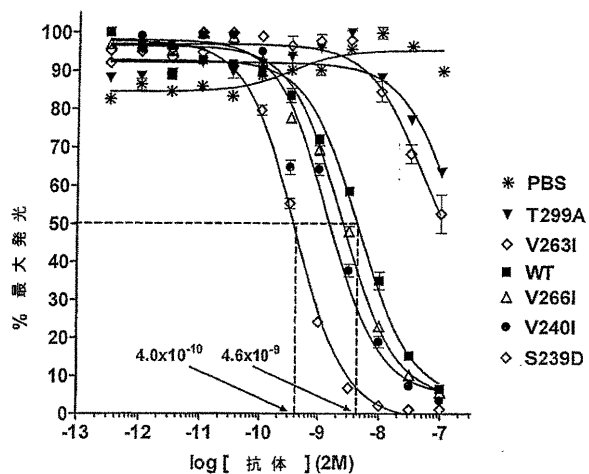
【図 9】



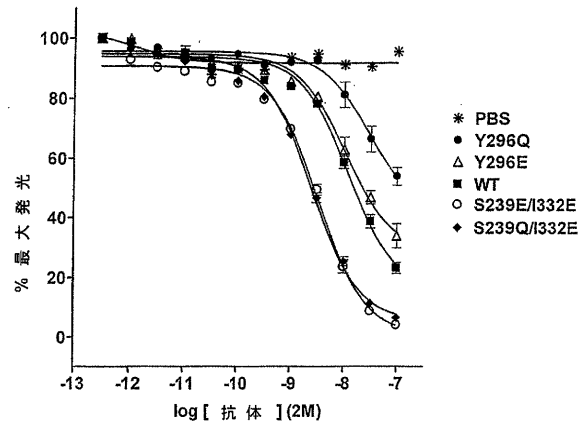
【図 10】



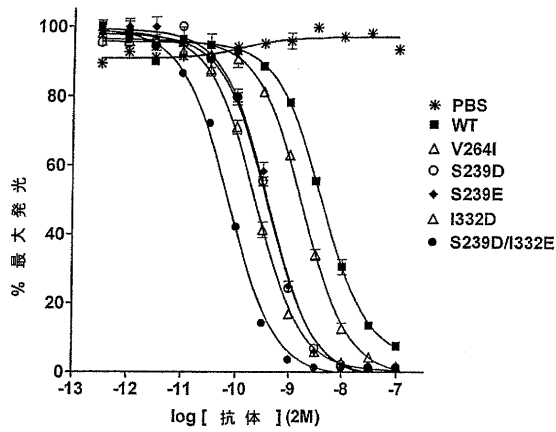
【図 11】



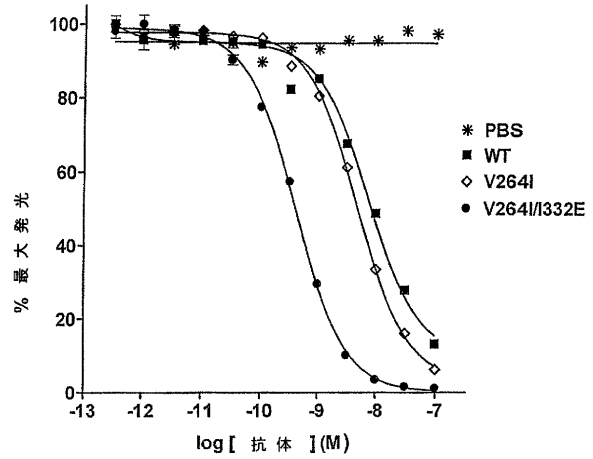
【図 12】



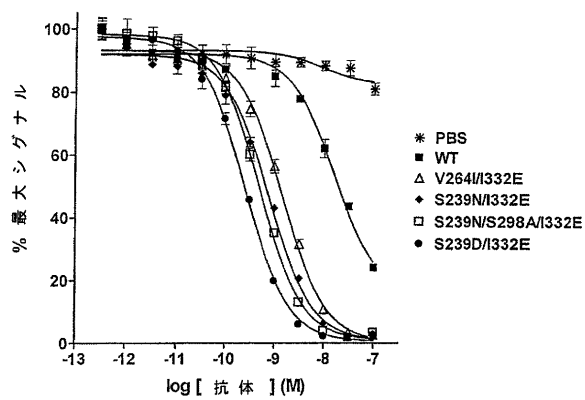
【図 1 3】



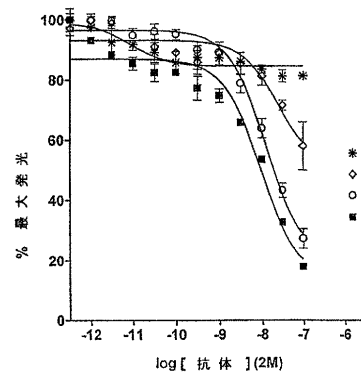
【図 1 4】



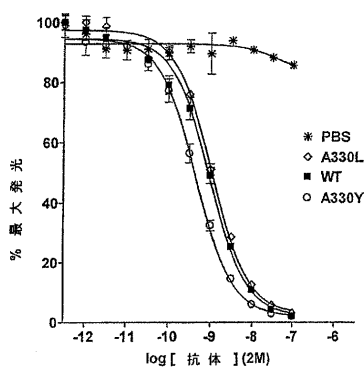
【図 1 5】



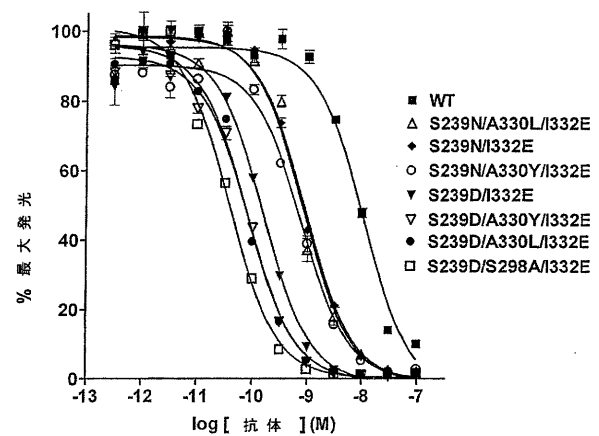
【図 1 6 b】



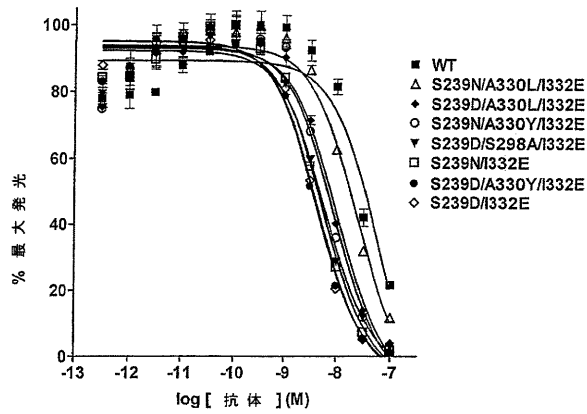
【図 1 6 a】



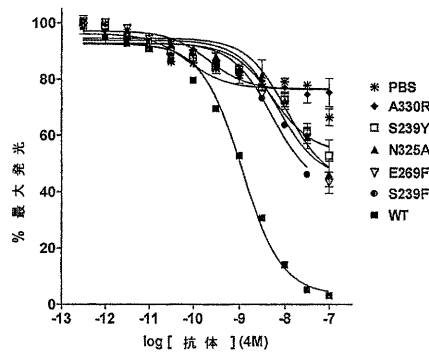
【図 1 7】



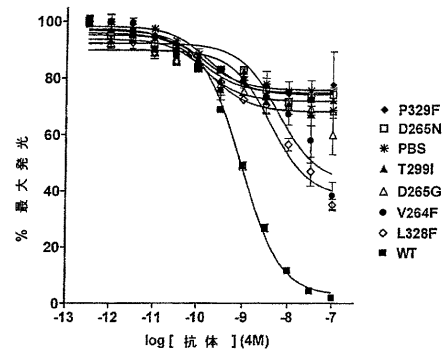
【図 18】



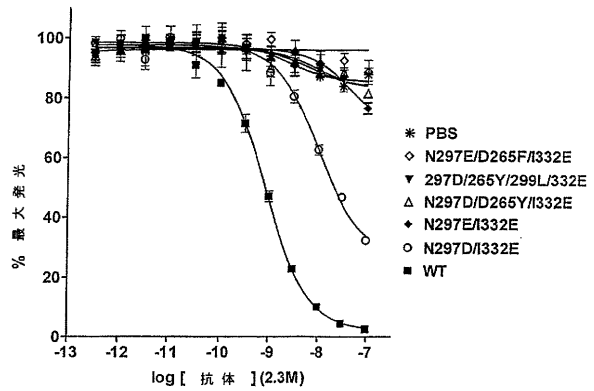
【図 19 b】



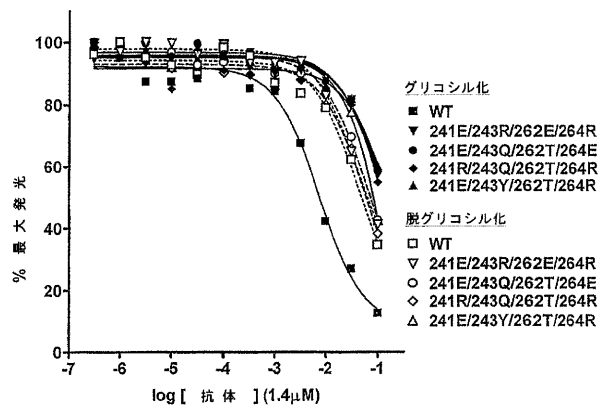
【図 19 a】



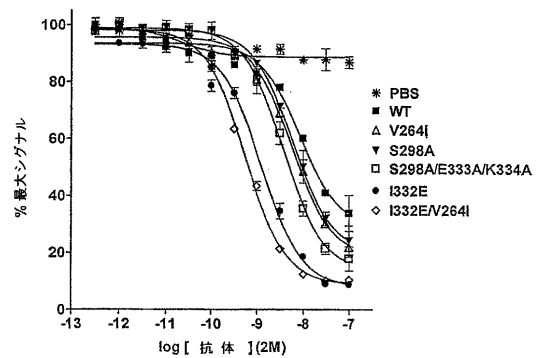
【図 20】



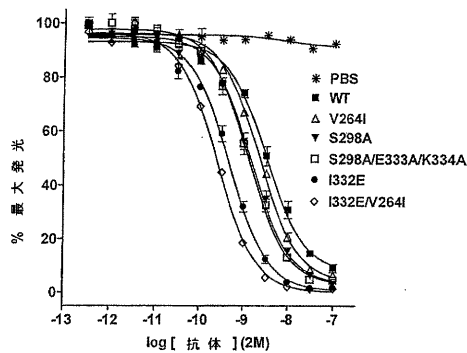
【図 21】



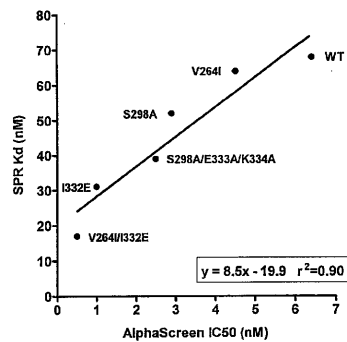
【図 22 b】



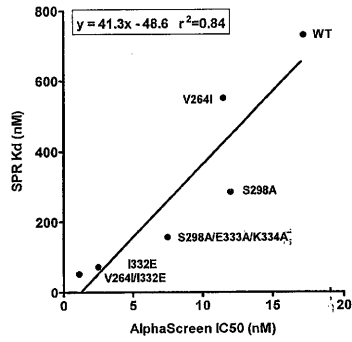
【図 22 a】



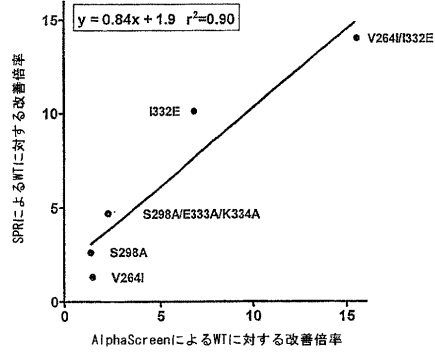
【図 23 a】



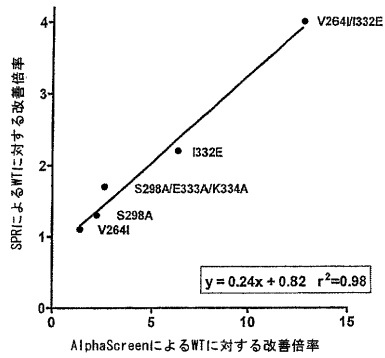
【図 2 3 b】



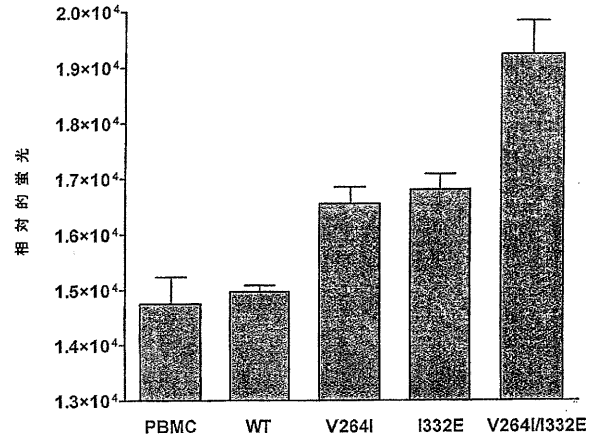
【図 2 3 d】



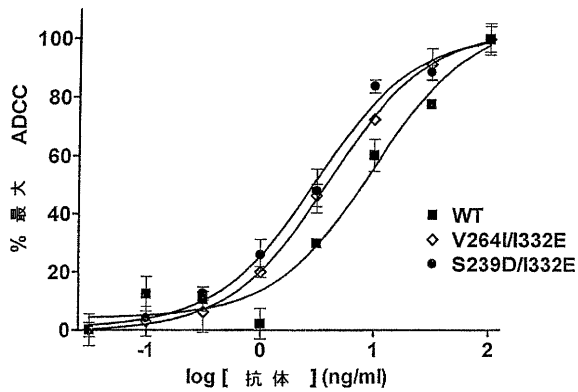
【図 2 3 c】



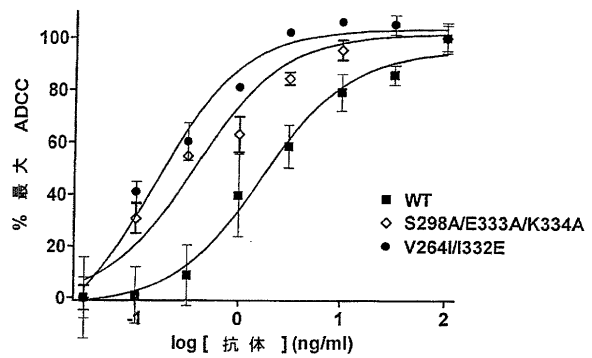
【図 2 4 a】



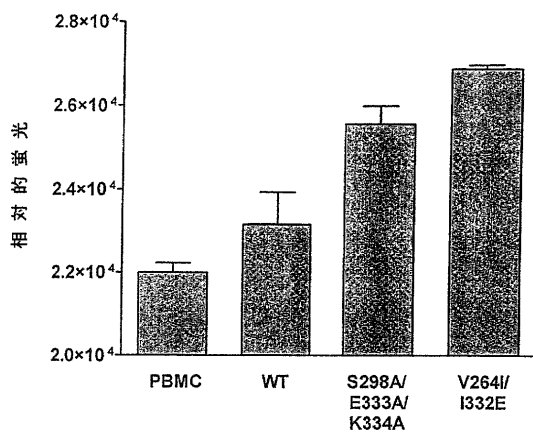
【図 2 4 b】



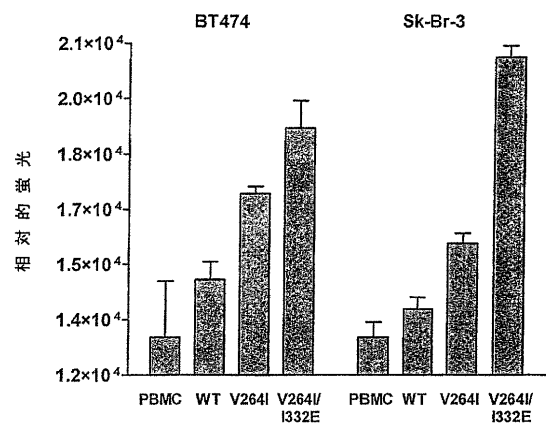
【図 2 5 b】



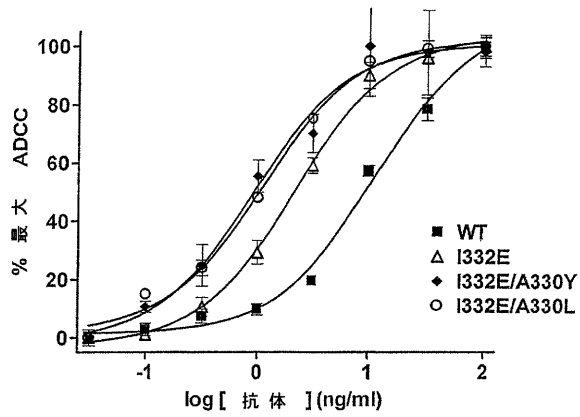
【図 2 5 a】



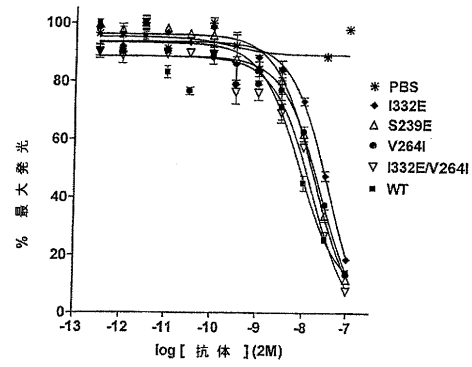
【図 2 6 a】



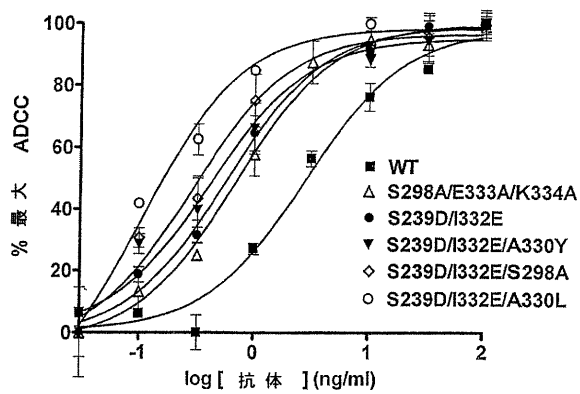
【図 26 b】



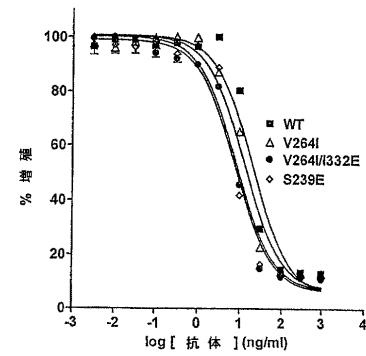
【図 27 a】



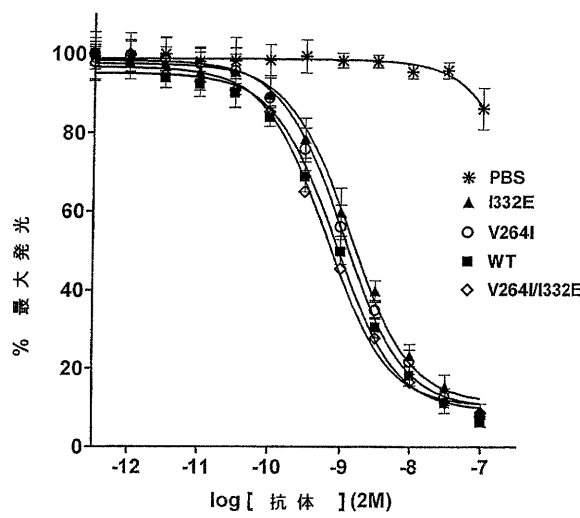
【図 26 c】



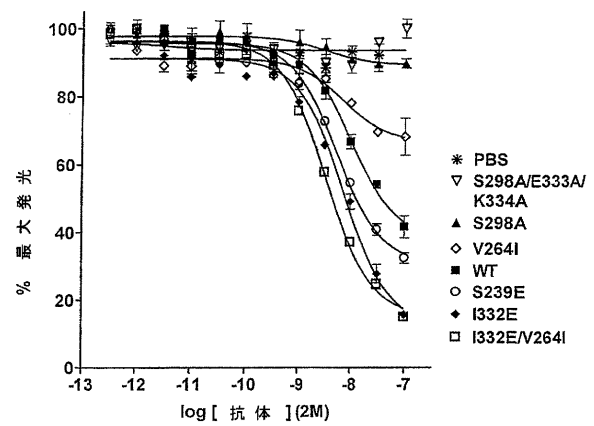
【図 27 b】



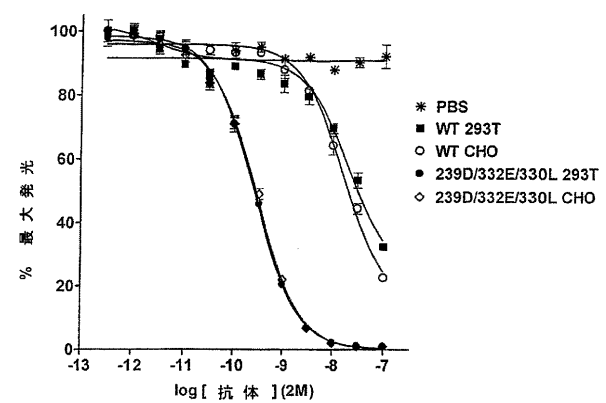
【図 28】



【図 29】



【図 30】



【図 3 1 a】

抗CD20軽鎖
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSG
TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLS
SPVTKSFNRGEC

【図 3 1 b】

抗CD20重鎖
QVOLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIPGNGDTSYNQKFK
GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWAGATTVTYSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図 3 1 c】

可能なFc変異体を含む抗CD20重鎖
QVOLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIPGNGDTSYNQKFK
GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWAGATTVTYSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VWXDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYXZTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPX₆PX₆EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

位置	WT	可能な置換
X ₁	S	D, E, N, Q, T
X ₂	V	I, M
X ₃	V	I, T, Y
X ₄	N	D
X ₅	A	Y, L, I
X ₆	I	D, E, N, Q
Z ₁	S	A

【配列表】

0005242502000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/467,606
(32)優先日 平成15年5月2日(2003.5.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/477,839
(32)優先日 平成15年6月12日(2003.6.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100137626
弁理士 田代 玄
- (72)発明者 グレゴリー・アラン・ラザー
アメリカ合衆国91202カリフォルニア州グレンデイル、ナンバー114、ウエスト・ドライデン・ストリート268番
(72)発明者 アーサー・ジェイ・チリノ
アメリカ合衆国91106カリフォルニア州カマリロ、プエブロ・ビスタ6816番
(72)発明者 ダン・ウェイ
アメリカ合衆国91106カリフォルニア州パサディナ、アパートメント312、ブランチ・ストリート1111番
(72)発明者 ジョン・ルドルフ・デスジャーレイス
アメリカ合衆国91104カリフォルニア州パサディナ、イースト・クレアリー・ストリート2096番
(72)発明者 スティーブン・コール・ドーバースタイン
アメリカ合衆国91106カリフォルニア州パサディナ、ナンバー202、サウス・レイク・アベニュー700番
(72)発明者 ロバート・ジェイ・ヘイズ
アメリカ合衆国91103カリフォルニア州パサディナ、アロヨ・テラス190番
(72)発明者 シャー・バハドウル・カーキ
アメリカ合衆国91101カリフォルニア州パサディナ、ノース・エル・モリノ・アベニュー300番
(72)発明者 オミッド・バファ
アメリカ合衆国91016カリフォルニア州モンロビア、オーシャン・ビュー・アベニュー724番

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 特表2006-512407(JP, A)
特表2003-512019(JP, A)
The Journal of biological chemistry. 2001, Vol.276, No.9, p.6591-6604
Journal of immunological methods. 1994, Vol.168, No.2, p.149-165
CHAPPEL M SUZANNE, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1993年, V268 N33, P25124-25131
Nature, 1988年, Vol. 332, p. 563-564
SHIELDS R L, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 米国, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, 2001年 3月 2日, V276 N9, P6591-6604
JEFFERIS ROY, IMMUNOLOGY LETTERS, 2002年 6月 3日, V82 N. 1 - 2, P57-65

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-19/00
WPIDS/BIOSIS/CAPLUS (STN)
JSTPLUS (JDreamII)
PubMed
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq