

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4652414号

(P4652414)

(45) 発行日 平成23年3月16日(2011.3.16)

(24) 登録日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K	16/00	(2006.01)	C O 7 K	16/00	
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K	16/28	Z N A
C O 7 K	16/22	(2006.01)	C O 7 K	16/22	
C O 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 8 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2007-541410 (P2007-541410)	(73) 特許権者	501154035
(86) (22) 出願日	平成17年11月14日(2005.11.14)		ゼンコー・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2008-519860 (P2008-519860A)		X E N C O R、 I N C.
(43) 公表日	平成20年6月12日(2008.6.12)		アメリカ合衆国91016カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/041220		州モンロビア、ウエスト・レモン・アベニ
(87) 国際公開番号	W02006/053301		ュー111番
(87) 国際公開日	平成18年5月18日(2006.5.18)	(74) 代理人	100082005
審査請求日	平成19年7月10日(2007.7.10)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	60/627, 763	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成16年11月12日(2004.11.12)		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	60/642, 886		弁理士 箱田 篤
(32) 優先日	平成17年1月11日(2005.1.11)	(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】 F c R n との变化した結合を有する F c 変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型ヒト F c 領域と比較して修飾を含む F c 変異体であって、該修飾は 3 0 8 F であり、該 F c 変異体は該野生型 F c 領域と比較してヒト F c R n との増加した結合を示し、番号は E U I n d e x に従う、F c 変異体。

【請求項 2】

該 F c 変異体が追加のアミノ酸修飾を含み、該アミノ酸修飾が 3 8 5 H または 2 5 7 L である、請求項 1 に記載の F c 変異体。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の F c 変異体を含むタンパク質。

10

【請求項 4】

抗体、F c 融合体または免疫接着因子である、請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

該 F c 変異体が I g G 1 F c 領域または I g G 2 F c 領域を含む、請求項 3 または 4 に記載のタンパク質。

【請求項 6】

野生型 F c 領域を含むタンパク質と比較して、哺乳動物でのより長時間の血清半減期を有する、請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 7】

該動物がヒトである、請求項 6 に記載のタンパク質。

20

【請求項 8】

血管内皮増殖因子（VEGF）、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）、CD25、上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）およびIgEからなる群から選択される抗原に対する特異性を有する抗体である、請求項3から7のいずれか一項に記載のタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2004年11月12日に出願したUS 6,062,763；2005年1月11日に出願したUS 6,064,886；2005年2月2日に出願したUS 6,064,950；2005年3月15日に出願したUS 6,066,468；2005年4月6日に出願したUS 6,066,931；2005年5月16日に出願したUS 6,068,607；2005年6月13日に出願したUS 6,069,200；2005年7月5日に出願したUS 6,069,609；2005年7月27日に出願したUS 6,070,318；および、2005年8月12日に出願したUS 6,072,453（全て、参照により本明細書中に包含される。）に対し米国特許法119条(e)項の利益を請求する。

10

【0002】

発明の分野

本発明は、最適化IgG免疫グロブリン変異体、それらの作製のための製造方法、および特に治療目的でのそれらの適用に関する。

20

【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学的タンパク質である。ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳動物において、抗体は、一对の重鎖および軽鎖ポリペプチド鎖から構成される。各鎖は、個々の免疫グロブリン（Ig）ドメインから成り、故に、一般名である免疫グロブリンが、そのようなタンパク質に用いられる。各鎖は、可変領域（V領域）および定常領域と称される2個の異なる領域から成る。軽鎖可変領域（VL）および重鎖可変領域（VH）は、抗体間の著しい配列多様性を示し、標的抗原の結合に関与する。定常領域は、配列多様性をあまり示さず、多くの天然タンパク質の結合に関与して重要な生化学的事象を引き起こす。ヒトでは、IgA（IgA1およびIgA2サブクラスを含む）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4サブクラスを含む）、およびIgMを含む5種の異なるクラスの抗体がある。これらの抗体クラス間の顕著な特徴は、その定常領域であるが、わずかな相違がV領域に存在し得る。免疫グロブリンの一般的な構造的特徴を記載する例として本明細書中に用いる図1は、IgG1抗体を示す。IgG抗体は、2個の重鎖および2個の軽鎖からなる四量体タンパク質である。IgG重鎖は、N末端からC末端までVH-CH1-CH2-CH3（それぞれ、重鎖可変ドメイン、重鎖定常ドメイン1、重鎖定常ドメイン2、および重鎖定常ドメイン3を示す。）（また、VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3（それぞれ、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ドメインを示す。）とも称される。）の順で連結する4個の免疫グロブリンドメインからなる。IgG軽鎖は、N末端からC末端までVL-CL（それぞれ、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常ドメインを示す。）の順で連結した2個の免疫グロブリンドメインからなる。

30

40

【0004】

抗体の可変領域は、分子の抗原結合決定基を含み、故に、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と配列が最も異なるため、そのように称される。大部分の配列多様性は、相補性決定領域（CDR）中に生じる。重鎖および軽鎖あたりそれぞれ3個の、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3で示される、計6個のCDRがある。可変領域のうちCDR以外は、フレームワーク（FR）領域と称される。CDRほど多様で

50

はないが、配列多様性が、異なる抗体間のF R領域中に生じる。概して、抗体のこの特徴的構造は、実質的な抗原結合の多様性(C D R)が免疫系により探査され、広範囲の抗原に対する特異性を得ることを可能にする、安定な骨格(F R領域)を提供する。多くの高分解能構造が、異なる生物由来の多様な可変領域断片(いくつかは抗原と非結合、およびいくつかは抗原との複合体)に利用可能である。抗体可変領域の配列および構造的特徴は、よく特徴付けられており(Morea et al., 1997, Biophys Chem 68:9-16; Morea et al., 2000, Methods 20:267-279、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、抗体の保存的特徴は、多くの抗体作製技術の開発を可能にしている(Maynard et al., 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-376、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。例えば、ある抗体、例えばマウス抗体由来のC D Rを、他の抗体、例えばヒト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。この方法は、当技術分野で“ヒト化”と称され、非ヒト抗体由来の免疫原性の低い抗体治療剤の作製を可能とする。可変領域を含む断片は、抗体の他の領域を欠失して存在することができ、例えばV H-C γ 1およびV H-C Lを含む抗原結合断片(F a b)、V HおよびV Lを含む可変断片(F v)、同じ鎖中で共に連結するV HおよびV Lを含む単鎖可変断片(s c F v)、ならびに多様な他の可変領域断片が含まれる(Little et al., 2000, Immunol Today 21:364-370、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0005】

抗体のF c領域は、エフェクター機能と称される一連の重要な機能を与える、多くのF c受容体およびリガンドと相互作用する。I g Gに関して、図1および2に示す通り、F c領域は、I gドメインC γ 2およびC γ 3、およびC γ 2につながるN末端ヒンジを含む。I g Gクラスに関して重要なF c受容体ファミリーは、F cガンマ受容体(F c γ R)である。これらの受容体は、抗体と細胞性免疫応答とのコミュニケーションを仲介する(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290、両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒトにおいて、このタンパク質ファミリーには、イソ型F c γ R I a、F c γ R I b、およびF c γ R I cを含むF c γ R I (C D 6 4); イソ型F c γ R I I a (アロタイプH 1 3 1およびR 1 3 1を含む)、F c γ R I I b (F c γ R I I b-1およびF c γ R I I b-2を含む)、およびF c γ R I I cを含むF c γ R I I (C D 3 2); ならびに、イソ型F c γ R I I I a (アロタイプV 1 5 8およびF 1 5 8を含む)およびF c γ R I I I b (アロタイプF c γ R I I I b-NA 1およびF c γ R I I I b-NA 2を含む)を含むF c γ R I I I (C D 1 6)が含まれる(Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。これらの受容体は典型的に、F cとの結合を仲介する細胞外ドメイン、膜貫通領域、および細胞内のいくつかのシグナル伝達事象を仲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、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー(N K)細胞、および γ γ T細胞を含む、様々な免疫細胞において発現される。F c/F c γ R複合体の形成は、これらのエフェクター細胞を抗原結合部位に捕捉し、典型的に、炎症メディエーターの放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、食作用、および細胞傷害性攻撃のような細胞内のシグナル伝達事象ならびにその後の重要な免疫応答をもたらす。細胞傷害性および食作用エフェクター機能を仲介する能力は、抗体が標的細胞を破壊することによる可能性のある機序である。

【0006】

F c γ Rを発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞への抗体の結合を認識し、次いで標的細胞の溶解をもたらす細胞により仲介される反応は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(A D C C)と称される(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。F c γ Rを発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞への抗体の結合を認識し、次

10

20

30

40

50

いで標的細胞の食作用をもたらす細胞により仲介される反応は、抗体依存性細胞介在性食作用（ADCP）と称される。FcγRIIa（pdb受託コード1H9V、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737-749、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（pdb受託コード1FCG、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Maxwell et al., 1999, Nat Struct Biol 6:437-442、参照によりその全体が本明細書中に包含される）、FcγRIIb（pdb受託コード2FCB、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Sondermann et al., 1999, Embo J 18:1095-1103、参照によりその全体が本明細書中に包含される）；およびFcγRIIIb（pdb受託コード1E4J、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Sondermann et al., 2000, Nature 406:267-273、参照によりその全体が本明細書中に包含される）を含むヒトFcγRの細胞外ドメインの多くの構造が、解明されている。全てのFcγRは、図1に示す通り、Cγ2ドメインおよび前記ヒンジのN末端でFc上の同じ領域に結合する。この相互作用は、構造的によく特徴付けられており（Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737-749、参照によりその全体が本明細書中に包含される）、ヒトFcγRIIIbの細胞外ドメインに結合するヒトFcのいくつかの構造は、解明されており（pdb受託コード1E4K、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Sondermann et al., 2000, Nature 406:267-273、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（pdb受託コード1IISおよび1IIX、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477、参照によりその全体が本明細書中に包含される）、ならびにヒトIgE/FcεRIα複合体の構造を有する（pdb受託コード1F6A、参照によりその全体が本明細書中に包含される）（Garman et al., 2000, Nature 406:259-266、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。

【0007】

異なるIgGサブクラスは、FcγRに対して異なる親和性を有し、IgG1およびIgG3は典型的に、受容体に対してIgG2およびIgG4よりも実質的に結合する（Jeffers et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。全てのFcγRは、異なる親和性を有するがIgG/Fcの同じ領域に結合する：高親和性結合体であるFcγRIは、IgG1について $K_d = 10^{-8} M^{-1}$ を有するが、一方、低親和性受容体であるFcγRIIおよびFcγRIIIは、一般的に、それぞれ 10^{-6} および 10^{-5} で結合する。FcγRIIIaおよびFcγRIIIbの細胞外ドメインは、96%の同一性を有する；しかしながら、FcγRIIIbは、細胞内シグナル伝達ドメインを有さない。さらに、免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ（ITAM）を有する細胞内ドメインを有することにより特徴付けられるFcγRI、FcγRIIa/c、およびFcγRIIIaは、免疫複合体により誘発される活性化の正の調節因子であるが、FcγRIIbは、免疫受容体チロシン依存性阻害モチーフ（ITIM）を有し、故に阻害される。故に、前者は、活性化受容体と称され、FcγRIIbは、阻害受容体と称される。前記受容体はまた、様々な免疫細胞で発現パターンおよびレベルが異なる。さらに別の複雑度は、ヒトプロテオームにおける多くのFcγR多型の存在である。臨床的な重要性を有する特に関連する多型は、V158/F158 FcγRIIIaである。ヒトIgG1は、F158アロタイプよりもV158アロタイプにより強い親和性で結合する。この親和性の相違、およびADCCおよび/またはADCPに対する推定されるその効果が、抗CD20抗体であるリツキシマブ（リツキサン（登録商標）、BiogenIdec）の効果の重要な決定因子であることが明らかにされている。V158アロタイプを有する患者は、リツキシマブ処置に好ましく応答する；しかしながら、低い親和性のF158アロタイプを有する患者は、ほとんど応答しない（Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。ヒトの約10-20%が、V158/V158ホモ接合型であり、45%が、V158/F158ヘテロ接合型であり、そして35-45%が、F158/F158ホモ接合型である（Lehrnbecher et al., 1999, Blood 94:4220-4232；Cartron et al., 2002, Blood 99:754-7

10

20

30

40

50

58、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。故に、ヒトの80-90%が、ほとんど応答せず、すなわち、彼らは、F158 FcγRIIIaの少なくとも1個のアレルを有する。

【0008】

図1に示す通り、Fcの重複するが分離した部位は、補体タンパク質C1qのための接合部位として機能する。Fc/FcγR結合がADCCを仲介するのと同様に、Fc/C1q結合は、補体依存性細胞傷害(CDC)を仲介する。C1qは、セリンプロテアーゼであるC1rおよびC1sと複合体を形成し、C1複合体を形成する。C1qは、6個の抗体を結合し得るが、2個のIgGとの結合が、補体カスケードを活性化するのに十分である。FcのFcγRとの相互作用と同様に、様々なIgGサブクラスは、C1qに対して異なる親和性を有し、典型的に、IgG1およびIgG3は、FcγRに対してIgG2およびIgG4よりも実質的に結合する(Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0009】

IgGにおいて、Cg2ドメインとCg3ドメインの間のFc上の部位(図1)は、胎児性受容体(neonatal receptor: FcRn)との相互作用を仲介し、その結合は、エンドソームからエンドトーシスされた抗体を血流に戻して再利用する(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。この過程は、大きなサイズの全長分子であるため腎臓ろ過による除去と一緒にあって、結果として、1から3週間までの範囲である好ましい抗体の血清半減期となる。FcのFcRnとの結合はまた、抗体輸送において重要な役割を果たす。FcRnのためのFc上の結合部位は、細菌タンパク質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強い結合は、典型的に、タンパク質精製中に、タンパク質Aまたはタンパク質G親和性クロマトグラフィーを用いることにより抗体を精製するための手段として用いられる。故に、Fc上のこの領域の適合度は、抗体の臨床的特徴およびそれらの精製の両方に重要である。ラットFc/FcRn複合体(Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)、およびFcとタンパク質AおよびG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、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)の利用可能な構造は、Fcとこれらのタンパク質の相互作用に関する理解を提供する。FcRn受容体はまた、IgGの、胎児腸へのおよび大人の腸上皮内腔への輸送に参与する(Ghetie and Ward, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18:739-766; Yoshida et al., Immunity, 2004, 20(6):769-783、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0010】

ラットおよびヒトFcγドメインの研究は、FcRnの結合のためのいくつかのFc残基の重要性を証明している。ラットおよびヒト配列は、Fc領域中、約64%の配列同一性を有する(Kabatらの番号付けで、残基237-443)。Fc、FcRn重鎖、およびFcRn軽鎖(ベーター2-ミクログロブリン)のラット/ヒト配列に関しては、図3、4、および5を参照のこと。ヒトFc/FcRn複合体モデルは、ラットFc/FcRn複合体の既存構造から構築されている(Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ラットおよびヒト配列は、H310およびH435のようなFcRn結合に重要ないくつかの残基を共有する(Medesan et al., 1997 J. Immunol. 158(5):221-7; Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。しかしながら、多くの位置において、ヒトおよびラットタンパク質は異なるアミノ酸を有し、ヒト配列中に、ラット配列と異なる環境および可能ならば異なる同一性の残基を供する。この多様性は、ある相同体から他の相同体に特徴を伝達する能力を制限する。

【0011】

マウスFcγにおいて、T252、T254、およびT256位でのランダム変異およびファージ提示選択は、三重変異体であるT252L/T254S/T256Fをもたらす、それは、FcRn親和性の3.5倍増加、および血清半減期の1.5倍増加を有する（Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15(7): 637-640、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。

【0012】

ラットFc/FcRn複合体の結晶構造は、FcRn結合のための重要なFc残基を同定した（Burmeister et al. Nature. 372:379-383 (1994); Martin et al. Molecular Cell. 7:867-877 (2001)、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される）。最初のFc/FcRn複合体構造は、6 Åの解像度で1994年に解明された（表2a、Burmeister et al. Nature. 372:379-383 (1994)、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。より高い解像度の構造が、Marinらにより2001年に解明され、より詳細な側鎖の位置が示された（Martin et al. Molecular Cell. 7:867-877 (2001)、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。ラットFcRnに結合したラットFcのこの結晶構造は、変異T252G/I253G/T254G/H310E/H433E/H435E（それらは、FcRn結合を破壊する）を含む1個の単量体、および野生型Fc単量体を含む1個の単量体を有するFc二量体を用いて解明された。

【0013】

ヒトFcγにおける変異研究は、FcRnへの結合に重要な残基のいくつかで起こり、増加した血清半減期を証明している。ヒトFcγ1において、Hintonらは、3個の残基を、他の19個の共通アミノ酸に個々に変異させた。Hintonらは、いくつかの点変異の二重変異が、FcRn結合親和性を増加したことを発見した（Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。2個の変異は、サルにおいて増加した半減期を有した。Shieldsらは、Alaを除くほとんどの残基を変異させ、FcRnおよびFcγRの結合について研究した（Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。

【0014】

Dall'Acquaらは、増加した親和性でFcRnを結合するFc変異体を選択するためにファージ提示法を用いた（Dall'Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。選択されるDNA配列は、主に二重および三重変異であった。文献は、それらの選択された配列の多くによりコードされるタンパク質を示し、野生型Fcよりも強くFcRnに結合するものをいくつか発見した。

【0015】

治療剤としての抗体およびFc融合タンパク質の投与は、そのタンパク質の排除および半減期の特徴に関係して所定の頻度での注射を必要とする。より長時間のインビボ半減期は、より注射頻度を少なくするか、またはより少ない用量を可能にし、それは、明らかに有利である。Fcドメイン中の先の変異は、増加したFcRn結合親和性およびインビボ半減期を有するいくつかのタンパク質をもたらすが、これらの変異は、最適変異および増大したインビボ半減期を同定していない。

【0016】

Fc領域の1つの特徴は、図1に示す通り、N297に起こる保存されたN結合グリコシル化である。よく記載される通り、この炭水化物またはオリゴ糖は、抗体のために重要な構造的かつ機能的役割を果たし、抗体を哺乳動物発現系を用いて製造しなければならない原理的理由の1つである（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; Radaev et al.,

10

20

30

40

50

2001, J Biol Chem 276:16469-16477; および、Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325:979-989、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0017】

抗体は、治療的使用のために開発された。かかる治療剤に関係する代表的文献には、Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200, Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410, McLaughlin et al., 1998, J Clin Oncol 16:2825-2833, and Cobleigh et al., 1999, J Clin Oncol 17:2639-2648 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される) が包含される。現在、抗癌治療に関して、死亡率におけるどんな小さな改良も成功を示す。本明細書に記載の任意の IgG 変異体は、さらなる増殖を制限するために抗体の能力を増強するか、または少なくとも部分的に、標的癌細胞を破壊する。

10

【0018】

抗体の抗腫瘍効果は、ADCC、ADCP、およびCDCのような、細胞傷害性エフェクター機能を仲介するそれらの能力を増強することによる。例えば、Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:652-656; Clynes et al., 2000, Nat Med 6:443-446 and Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758 (両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される) が包含される。

【0019】

ヒトIgG1は、治療目的のために最も一般的に使用される抗体であり、工学的研究の大部分は、本明細書中にて構成された。しかしながら、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むIgGクラスの様々なイソ型が、独特の物理的、生物学的、および臨床的特徴を有する。当技術分野において、改良されたIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4変異体を設計する必要がある。FcRnへの結合および／または天然IgGポリペプチドと比較して増加したインビボ半減期を改善するために、かかる変異体を設計する必要がある。本発明は、これらおよび他の必要性を満たす。

20

【発明の開示】

【0020】

発明の概要

本発明は、FcRn受容体との増加した結合およびインビボでのより長時間の血清保持を有する、抗体、Fc融合体、および免疫接着において発見されたものを含むFcドメインの新規変異体の作製を開示する。本発明のさらなる局面は、特に、より低いpH、約pH6.0での野生型以上のFcRn結合の増加であり、エンドソーム中でのFc/FcRn結合を容易にすることである。本発明のさらなる局面は、約pH7.4での設計した変異体の結合と比較した、約pH6でのそれらの優先的結合であり、細胞の再利用後の血液へのFcの再放出を容易にすることである。

30

【0021】

本発明のさらなる局面は、FcRnへの減少した結合および減少したインビボ半減期を有するFc変異体の設計に関する。FcRn親和性および／またはインビボ半減期を減少する変異を含むかかるタンパク質は、放射線治療薬の送達およびモニタリングを含む多くの治療法および診断法において有用である(ここで、放射標識の理想的半減期は、そのタンパク質複合体のインビボ半減期とほぼ等しい。)。

40

【0022】

本発明のさらなる局面は、Fcドメインと、FcR、例えば、ヒトのFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIaとの結合の改変に関係する。これらの受容体は、抗体の様々なエフェクター機能の誘導に参与する。それ故に、本発明のさらなる局面は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)、および抗体依存性細胞介在性食作用(ADCP)のようなFcドメインエフェクター機能の改変に関係する。

【0023】

50

本発明のさらなる局面は、F c 含有タンパク質のインビボ半減期およびエフェクター機能の両方に影響を与える変化したF c R n 結合および変化したF c g 結合の両方を含むF c 変異体に関する。例えば、これらの変異体は、増加したインビボ半減期、ならびに改善したA D C Cを有し得る。該変異体は、例えば増加した半減期および減少したC D Cを有し得る。

【0024】

さらなる局面において、本発明は、変異F c タンパク質をコードする組換え核酸、発現ベクター、および宿主細胞を提供する。

【0025】

さらなる局面において、本発明は、変異F c 含有タンパク質を作製する方法であって、本発明の宿主細胞を、該タンパク質を発現するのに適する条件下で培養することを含む方法を提供する。

10

【0026】

さらなる局面において、本発明は、本発明の変異F c タンパク質および医薬的担体を含む医薬組成物を提供する。

【0027】

さらなる局面において、本発明は、本発明の変異F c 含有タンパク質を患者に投与することを含む、疾患を処置するための方法を提供する。

【0028】

さらなる局面において、本発明は、親ポリペプチドのF c 領域中に少なくとも1個の修飾を含む該親F c ポリペプチドのF c 変異領域を提供し、ここで、該変異タンパク質は、親ポリペプチドと比較してF c R n との変化した結合を示し、該F c 変異体は、246H、246S、247D、247T、248H、248P、248Q、248R、248Y、249T、249W、251D、251E、251H、251I、251K、251M、251N、251T、251V、251Y、252F、252L、253L、253T、253V、254H、254L、254N、254T、254V、[^]254N、255E、255F、255H、255K、255S、255V、256E、256H、256V、257A、257C、257D、257E、257F、257G、257H、257I、257K、257L、257M、257N、257Q、257R、257S、257T、257V、257W、257Y、258R、258V、279A、279C、279D、279F、279G、279H、279I、279K、279L、279M、279N、279P、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、280E、280H、[^]281A、[^]281D、[^]281S、[^]281T、282D、282F、282H、282I、282T、283F、283I、283L、283Y、284H、284K、284P、284Q、284R、284S、284Y、285S、285V、286[#]、286L、287H、287S、287V、287Y、288H、288Q、288R、288S、305H、305T、306F、306H、306I、306N、306T、306V、306Y、307D、307V、307Y、308A、308C、308D、308E、308F、308G、308H、308I、308K、308L、308M、308N、308P、308Q、308R、308S、308T、308W、308Y、309F、309H、309I、309N、309P、309Q、309V、309Y、310K、310N、310T、311H、311L、311S、311T、311V、311W、312H、313Y、315E、315G、315H、315Q、315S、315T、317H、317S、339P、340P、341S、374H、374S、376H、376L、378H、378N、380T、380Y、382H、383H、383K、383Q、384E、384G、384H、385A、385C、385D、385E、385F、385H、385I、385K、385L、385M、385N、385P、385Q、385R、385S、385T、385V、385W、385Y、386E、386H、386K、387[#]、387A、387H、387K、387Q、389E、389H、426E、426H、426L、426N、426R

20

30

40

50

、426V、426Y、427I、429D、429F、429K、429N、429Q
 、429S、429T、429Y、430D、430H、430K、430L、430Q
 、430Y、431G、431H、431I、431P、431S、432F、432H
 、432N、432S、432V、433E、433N、433P、433R、433S
 、434H、434Q、434S、434Y、435N、436E、436F、436H
 、436L、436Q、436V、436W、437E、437V、438E、438H
 および438K（ここで、番号は、EU Indexに従い、^は、表示の位置の後ろの
 挿入であり、そして#は、その表示の位置の欠失である。）からなる群から選択される少
 なくとも1個の修飾を含む。

【0029】

さらなる局面において、本発明は、246H、246S、247D、247T、248
 H、248P、248Q、248R、248Y、249T、249W、251D、251
 E、251H、251I、251K、251M、251N、251T、251V、251
 Y、252L、253L、253T、253V、254H、254L、254N、254
 V、^254N、255E、255F、255H、255K、255S、255V、25
 6H、256V、257A、257C、257D、257E、257F、257G、25
 7H、257I、257K、257L、257M、257N、257Q、257R、25
 7S、257T、257V、257W、257Y、258R、258V、279A、27
 9C、279D、279F、279G、279H、279I、279K、279M、27
 9N、279P、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、28
 0H、^281A、^281D、^281S、^281T、282D、282F、282
 H、282I、282T、283F、283I、283L、283Y、284H、284
 K、284P、284Q、284R、284S、284Y、285S、285V、286
 #、286L、287H、287S、287V、287Y、288H、288Q、288
 S、305H、305T、306F、306H、306I、306N、306T、306
 V、306Y、307D、307V、307Y、308C、308E、308F、308
 G、308H、308I、308K、308L、308M、308N、308P、308
 Q、308R、308S、308W、308Y、309F、309H、309N、309
 Q、309V、309Y、310K、310N、310T、311L、311T、311
 V、311W、312H、313Y、315E、315G、315H、315Q、315
 S、315T、317H、317S、339P、340P、341S、374H、374
 S、376H、376L、378H、378N、380T、380Y、382H、383
 H、383K、383Q、384E、384G、384H、385A、385C、385
 F、385H、385I、385K、385L、385M、385N、385P、385
 Q、385S、385T、385V、385W、385Y、386E、386H、386
 K、387#、387A、387H、387K、387Q、389E、389H、426
 E、426H、426L、426N、426R、426V、426Y、427I、429
 D、429F、429K、429N、429Q、429S、429T、429Y、430
 D、430H、430K、430L、430Q、430Y、431G、431H、431
 I、431P、431S、432F、432H、432N、432S、432V、433
 E、433N、433P、433S、434H、434Q、434S、435N、436
 E、436F、436L、436V、436W、437E、437V、438H、および
 438Kからなる群から選択される少なくとも1個の修飾を含むFc変異体を提供する。

【0030】

さらなる局面において、本発明は、246H、246S、247D、247T、248
 P、248Q、248Y、249T、249W、251D、251E、251H、251
 I、251T、251V、252L、253L、253T、253V、254H、254
 L、254N、254V、^254N、255E、255H、255K、255V、25
 6H、256V、257A、257C、257F、257G、257I、257L、25
 7M、257N、257Q、257S、257T、257V、257W、257Y、25

10

20

30

40

50

8 V、279 A、279 C、279 F、279 I、279 P、279 S、279 T、279 W、279 Y、 $\wedge$ 281 A、 $\wedge$ 281 D、 $\wedge$ 281 S、 $\wedge$ 281 T、282 F、282 I、282 T、283 F、283 I、283 L、283 Y、284 P、285 V、286 #、286 L、287 V、288 Q、288 S、305 T、306 F、306 H、306 I、306 N、306 T、306 V、306 Y、307 V、308 C、308 F、308 G、308 L、308 M、308 N、308 P、308 Q、308 S、308 W、308 Y、309 F、309 N、309 Q、309 V、309 Y、310 T、311 L、311 T、311 V、311 W、313 Y、315 G、315 Q、315 S、315 T、339 P、340 P、341 S、374 H、374 S、376 L、378 H、378 N、380 T、380 Y、382 H、383 Q、384 E、384 G、384 H、385 A、385 C、385 F、385 I、385 L、385 M、385 N、385 P、385 Q、385 S、385 T、385 V、385 W、385 Y、386 E、386 H、386 K、387 #、387 A、387 H、387 K、387 Q、389 H、426 L、426 N、426 V、426 Y、427 I、429 D、429 F、429 K、429 N、429 Q、429 S、429 T、429 Y、430 L、431 G、431 I、431 P、431 S、432 F、432 H、432 V、433 E、433 N、433 P、433 S、434 H、434 Q、434 S、435 N、436 F、436 L、436 V、436 W、437 E、および437 Vからなる群から選択される少なくとも1個の修飾を含むFc変異体を提供する。

【0031】

図面の簡単な説明

図1。抗体の構造および機能。p d b受託コード1 C E 1からのヒト化F a b構造(James et al., 1999, J Mol Biol 289:293-301、参照によりその全体が本明細書中に包含される)およびp d b受託コード1 D N 2からのヒトI g G 1 F c構造(DeLano et al., 2000, Science 287:1279-1283、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を用いてモデル化された、全長ヒトI g G 1抗体のモデルを示す。F a bおよびF c領域を連結するフレキシブルヒンジは示さず。I g G 1は、2個の軽鎖および2個の重鎖からなるヘテロ二量体のホモ二量体である。軽鎖のV_LおよびC_L、ならびに重鎖のV_H、Cガンマ1(C γ 1)、Cガンマ2(C γ 2)、およびCガンマ3(C γ 3)を含む、抗体を含むI gドメインが標識される。F c領域は標識される。可変領域中の抗原結合部位、ならびに領域中のF c γ Rs、F c Rn、C1qおよびタンパク質AおよびGの結合部位を含む、関連タンパク質の結合部位は標識される。

【0032】

図2。Kabat et alに記載の通りE U番号を付した本発明に用いるヒトI g G配列。

【0033】

図3。Kabatに記載の通りE U番号を付した本発明に用いるヒトおよびげっ歯動物I g G配列の例。

【0034】

図4。本発明に用いたヒトおよびげっ歯動物F c Rn重鎖配列の例。

【0035】

図5。本発明に用いたヒトおよびげっ歯動物ベクター2-ミクログロブリン配列の例。

【0036】

図6。ラット構造から作製されたヒトF c/F c Rn複合体モデル(Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。いくつかのヒスチジン残基は、F c Rn鎖(淡灰色)およびF cポリペプチド(濃灰色)上の空間充填(space-filling)原子で示される。

【0037】

図7。挿入または欠失を含む変異体の設計に用いるいくつかの概念の説明図。

【0038】

図8。本発明の変異体。

図 9。本発明の変異体。

図 10。本発明の変異体。

【0039】

図 11。Fc 変異体のコンストラクトに用いられ得るベクター p c D N A 3. 1 Z e o + の図。

【0040】

図 12。野生型 Fc および本発明の Fc 変異体の競合的 Fc R n 結合データ。各パネルにおいて、本発明の Fc 変異体は、左（赤色または濃灰色）曲線で示され、野生型トラスツズマブは、右（青色または淡灰色）曲線で示される。

【0041】

図 13。Fc 変異体の Fc R n 結合特性の概要。右から左の列は、Fc R n 結合の修飾、使用した免疫グロブリン、他の修飾、野生型と比較した Alpha ScreenTM 競合分析による相対的 Fc R n 親和性（中央値）、実施した分析数、およびタンパク質の参照数を示す。1. 0 より大きい相対的 Fc R n 親和性数は、野生型よりも増加した結合を証明する。

【0042】

図 14。本発明の Fc 変異体の Fc R n 結合データ。Fc 変異体は、アテムツズマブまたはトラスツズマブである。野生型と比較した結合の増加倍数を示す。

【0043】

図 15。Fc R n との改善した結合を有する Fc 変異体の表面プラズモン共鳴実験の概要。棒グラフは、野生型 Fc ドメインと比較した各変異体の Fc R n 結合親和性における増加倍数を示す。

【0044】

図 16。野生型抗体および本発明の変異体の表面プラズモン共鳴実験。示した線は、p H 6. 0 での、Fc R n との Fc 変異体抗体の結合および分離である。

【0045】

図 17。本発明の Fc 変異体と Fc R n との結合分析。p H 6. 0（a および b）および p H 7. 0（c）での、Alpha Screen（商標）により測定した直接結合分析を示す。

【0046】

図 18。本発明の Fc 変異体と Fc R n との結合分析。Fc 変異体と表面結合 Fc R n との結合により作製される表面プラズモン共鳴単位を示す。

【0047】

発明の詳細な説明

本発明は、抗体、Fc 融合体、および免疫接着において発見されるものを含む Fc ドメインの新規な変異体であって、Fc R n 受容体との増加した結合を有する変異体の作製を開示する。本明細書で記載の通り、Fc R n との結合は、インビボでのより長時間の血清保持をもたらす。

【0048】

インビボでの Fc タンパク質の保持を増加するためには、結合親和性は、p H 7. 4 付近での親和性の付随的増加なく、p H 6 付近で増加しなければならない。未だ試験中であるが、Fc 領域は、エンドソーム中 p H 6 での Fc R n との結合が Fc を隠すため、インビボでのより長時間の半減期を有すると考えられる（Ghetie and Ward, 1997 Immunol Today, 18(12): 592-598、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。その後、エンドソーム画分は、Fc を細胞表面に再生する。前記画分が細胞外空間（より高い p H ~ 7. 4）に開くと、血中に戻る Fc の放出を促進する。Dall' Acqua らは、p H 6 および p H 7. 4 にて増加した Fc R n 結合を有する Fc 変異体が、実際に、減少した血清濃度および野生型 Fc と同じ程度の半減期を有したことを示した（Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。p H 7. 4 での Fc R n に対する Fc の増加した親和性は、血中に戻る Fc の放出を妨げると

10

20

30

40

50

考えられる。故に、Fcのインビボでの半減期を増加させ得るFc変異は、理想的には、より高いpHでのFcの放出を可能にしながら、より低いpHでのFcRn結合を増加し得る。アミノ酸ヒスチジンは、pH6.0から7.4の範囲でその荷電状態が変わる。故に、Fc/FcRn複合体中の重要な部位でHis残基が発見されることは驚くことではない(図6)。

【0049】

本発明のさらなる局面は、エンドソーム中Fc/FcRn結合を促進する、特により低いpH、約pH6.0での、野生型に対するFcRn結合の増加である。また、FcγRとの異なる結合として、特にFcγRIIbとの増加した結合およびFcγRIIbとの減少した結合が、増加した効果をもたらすことが示されている、変化したFcRn結合および他のクラスのFc受容体(FcγR)との変化した結合を有するFc変異体を記載する。

10

【0050】

定義

本発明は、理解をより完全にし得るために、いくつかの定義を以下に記載する。かかる定義は、文法的同等物を包含することを意味する。

【0051】

本明細書で記載の“ADCC”または“抗体依存性細胞介在性細胞傷害”は、標的細胞上に結合した抗体を認識し、次いで標的細胞の溶解をもたらすFcγRを発現する非特異的細胞傷害性細胞である細胞により仲介される反応を意味する。

20

【0052】

本明細書で記載の“ADCP”または“抗体依存性細胞介在性食作用”は、標的細胞上に結合した抗体を認識し、次いで標的細胞の食作用を誘導するFcγRを発現する非特異的細胞傷害性細胞である細胞により仲介される反応を意味する。

【0053】

本明細書中、“アミノ酸修飾”は、ポリペプチド配列中の、アミノ酸置換、挿入、および/または欠失を意味する。

【0054】

本明細書中、“アミノ酸置換”または“置換”は、親ポリペプチド配列中、特定の位置での、あるアミノ酸の他のアミノ酸との置換を意味する。例えば、Fc変異体の場合において、E272Y置換は、272位のグルタミン酸をチロシンで置換される変異体ポリペプチドを意味する。

30

【0055】

本明細書で用いる“アミノ酸挿入”または“挿入”は、親ポリペプチド配列中、特定の位置でのアミノ酸の付加を意味する。例えば、-233Eまたは^233Eは、233位後および234位前へのグルタミン酸の挿入を意味する。さらに、-233ADEまたは^233ADEは、233位後および234位前へのAlaAspGluの挿入を意味する。

【0056】

本明細書で用いる“アミノ酸欠失”または“欠失”は、親ポリペプチド配列中、特定の位置でのアミノ酸の除去を意味する。例えば、E233-またはE233#は、233位でのグルタミン酸の欠失を意味する。さらに、EDA233-またはEDA233#は、233位から始まる配列GluAspAlaの欠失を意味する。

40

【0057】

本明細書で用いる“変異体タンパク質”または“タンパク質変異体”、または“変異体”は、少なくとも1個のアミノ酸修飾により親タンパク質と異なるタンパク質を意味する。タンパク質変異体は、タンパク質自体、該タンパク質またはそれをコードするアミノ配列を含む組成物を意味し得る。好ましくは、タンパク質変異体は、親タンパク質と比較して、少なくとも1個のアミノ酸修飾を有し、例えば、親タンパク質と比較して約1個から約10個のアミノ酸修飾、好ましくは約1個から約5個のアミノ酸修飾を有する。本明細

50

書中、タンパク質変異体配列は、好ましくは、親タンパク質配列と少なくとも約80%の相同性、最も好ましくは、少なくとも約90%の相同性、より好ましくは少なくとも約95%の相同性を有し得る。変異体タンパク質は、変異体タンパク質自体、該タンパク質変異体またはそれをコードするアミノ酸配列を含む組成物を意味し得る。従って、本明細書で用いる“抗体変異体”または“変異体抗体”は、少なくとも1個のアミノ酸修飾により親抗体とは異なる抗体を意味し、本明細書で用いる“I g G変異体”または“変異体 I g G”は、少なくとも1個のアミノ酸修飾により親 I g Gとは異なる抗体を意味し、そして本明細書で用いる“免疫グロブリン変異体”または“変異体免疫グロブリン”は、少なくとも1個のアミノ酸修飾により親免疫グロブリン配列とは異なる免疫グロブリン配列を意味する。変異体には、非天然アミノ酸が包含され得る。例えば、U S 6 5 8 6 2 0 7 ; W O 9 8 / 4 8 0 3 2 ; W O 0 3 / 0 7 3 2 3 8 ; U S 2 0 0 4 - 0 2 1 4 9 8 8 A 1 ; W O 0 5 / 3 5 7 2 7 A 2 ; W O 0 5 / 7 4 5 2 4 A 2 ; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS United States of America 99:11020-11024; and, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される) が包含される。

10

【0058】

本明細書で用いる“タンパク質”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。ペプチジル基は、天然に生じるアミノ酸およびペプチド結合、または合成ペプチド模倣構造物、すなわちペプチドのような“類似体”を含み得る (Simon et al., PNAS USA 89(20):9367 (1992) を参照のこと、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。当業者には認識されているように、アミノ酸は、天然に生じ得るか、または天然に生じない。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 (noreleucine) は、本発明の目的のアミノ酸と見なされ、D-およびL- (RまたはS) 配置のアミノ酸を用いることができる。本発明の変異体には、例えば、Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101(2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, and Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。) に記載の方法を含むが、それに限定されない、Schultzおよび同僚により開発された技術を用いて挿入された非天然アミノ酸の使用を含む修飾が包含され得る。さらに、ポリペプチドは、1個以上の側鎖または末端の合成誘導体化、グリコシル化、PEG化、円順列変異 (circular permutation)、環化、他の分子との結合、タンパク質またはタンパク質ドメインとの融合、およびペプチドタグまたは標識の付加を含み得る。

20

30

【0059】

本明細書で用いる“残基”は、タンパク質中の位置およびそこに関係するアミノ酸の特定を意味する。例えば、アスパラギン297 (Asn 297、またN 297とも称する) は、ヒト抗体 I g G 1中の残基である。

【0060】

本明細書で用いる“F a b”または“F a b領域”は、VH、CH1、VL、およびCL免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドを意味する。F a bは、単独のこの領域、または全長抗体もしくは抗体断片中のこの領域を意味し得る。

40

【0061】

本明細書で用いる“I g Gサブクラス修飾”は、1個の I g Gイソ型の1個のアミノ酸を、異なる整列した I g Gイソ型において対応するアミノ酸に変換するアミノ酸修飾を意味する。例えば、I g G 1はEU 296位にチロシンを含み、I g G 2はフェニルアラニンを有するため、I g G 2におけるF 296 Y置換は、I g Gサブクラス修飾と見なされる。

【0062】

本明細書で用いる“天然に生じない修飾”は、イソ型 (isotypic) ではないアミノ酸修

50

飾を意味する。例えば、I g Gは何れも、332位にグルタミン酸を含まないため、I g G1、I g G2、I g G3、またはI g G4におけるI332E置換は、天然に生じない修飾と見なされる。

【0063】

本明細書で用いる“アミノ酸”および“アミノ酸同一性”は、特定の定められた位置に存在し得る、20個の天然に生じるアミノ酸または何らかの天然に生じない類似体のうち1個を意味する。

【0064】

本明細書で用いる“エフェクター機能”は、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よりもたらされ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、それらに限定されない。

【0065】

本明細書で用いる“エフェクター細胞”は、1個以上のFc受容体を発現し、1個以上のエフェクター機能を仲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、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびγδT細胞が含まれるが、それらに限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含む何れかの生物を含むが、それらに限定されない生物由来であり得る。

【0066】

本明細書で記載の“I g G Fcリガンド”は、I g G抗体のFc領域に結合し、Fc/Fcリガンド複合体を形成する、何れかの生物由来の分子、好ましくはポリペプチドを意味する。Fcリガンドには、FcγR、FcγR、FcγR、FcRn、C1q、C3、マンナン結合レクチン、マンノース受容体、ブドウ球菌タンパク質A、ブドウ球菌タンパク質G、およびウイルスFcγRが含まれるが、それらに限定されない。Fcリガンドにはまた、FcγRと相同性のFc受容体ファミリーであるFc受容体相同体（FcRH）が含まれる（Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。Fcリガンドは、Fcに結合する未知の分子を含み得る。特定のI g G Fcリガンドは、FcRnおよびFcガンマ受容体である。本明細書で用いる“Fcリガンド”は、抗体のFc領域と結合し、Fc/Fcリガンド複合体を形成する、何れかの生物由来の分子、好ましくはポリペプチドを意味する。

【0067】

本明細書で用いる“Fcガンマ受容体”または“FcγR”は、I g G抗体Fc領域に結合し、FcγR遺伝子によりコードされる何れかのタンパク質ファミリーのメンバーを意味する。ヒトにおいて、このファミリーには、イソ型FcγRIa、FcγRIb、およびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；イソ型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）；ならびに、イソ型FcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIb（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、参照によりその全体が本明細書中に包含される）、ならびに何れかの未知のヒトFcγRまたはFcγRイソ型またはアロタイプが含まれるが、それらに限定されない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルを含むが、それらに限定されない何れかの生物由来であり得る。マウスFcγRには、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）、およびFcγRIII-2（CD16-2）、ならびに何れかの未知のマウスFcγRまたはFcγRイソ型またはアロタイプが含まれるが、それらに限定されない。

【0068】

本明細書で用いる“FcRn”または“胎児性Fc受容体”は、I g G抗体Fc領域に結合し、FcRn遺伝子により少なくともその一部をコードされるタンパク質を意味する

10

20

30

40

50

。FcRnは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルを含むが、それらに限定されない何れかの動物由来であり得る。当技術分野で公知の通り、機能的FcRnタンパク質は、しばしば、重鎖および軽鎖と称される2個のポリペプチドを含む。軽鎖は、ベーター2-ミクログロブリンであり、重鎖は、FcRn遺伝子によりコードされる。本明細書中に特に記載がなければ、FcRnまたはFcRnタンパク質は、FcRn重鎖とベーター2-ミクログロブリンの複合体を意味する。特定の目的のFcRnの配列、特にヒト種の配列を、図に示す。

【0069】

本明細書で用いる“親ポリペプチド”は、後に修飾され変異体を作製する未修飾ポリペプチドを意味する。親ポリペプチドは、天然に生じるポリペプチド、または天然に生じるポリペプチドの変異体または改変型であり得る。親ポリペプチドは、ポリペプチド自体、該親ポリペプチドまたはそれをコードするアミノ酸配列を含む組成物を意味し得る。従って、本明細書で用いる“親免疫グロブリン”は、修飾されて変異体を作製する未修飾免疫グロブリンポリペプチドを意味し、本明細書で用いる“親抗体”は、修飾されて変異体抗体を作製する未修飾抗体を意味する。“親抗体”には、下記に説明する通り、公知の商業的、組換え的に作製された抗体が含まれることに注目すべきである。

【0070】

本明細書で用いる“位置”は、タンパク質配列中の位置を意味する。位置は、連続して、または確立された形式、例えばKabatに記載のE U i n d e xに従い、番号付けされ得る。例えば、297位は、ヒト抗体IgG1中の位置である。

【0071】

本明細書で用いる“標的抗原”は、特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、または他の化合物であり得る。

【0072】

本明細書で用いる“標的細胞”は、標的抗原を発現する細胞を意味する。

【0073】

本明細書で用いる“可変領域”は、カッパ、ラムダ、および重鎖免疫グロブリン遺伝子領域それぞれからなるVκ、Vλ、および／またはVH遺伝子の何れかにより実質的にコードされる1個以上のIgドメインを含む免疫グロブリンの領域を意味する。

【0074】

本明細書で用いる“野生型またはWT”は、アレル変異体を含む、天然に見出されるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を意味する。WTタンパク質は、意図的に改変されていないアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を有する。

【0075】

本発明は、FcRnとの調節された結合を示す抗体を対象とする（調節には、結合の増加ならびに減少が包含される。）。例えば、いくつかの例において、増加した結合は、抗体の細胞再利用をもたらし、故に、例えば治療用抗体に関して増加した半減期をもたらす。あるいは、減少したFcRn結合が、例えば放射標識を含む診断用抗体または治療用抗体に関して望ましい。さらに、FcRnとの増加した結合、および他のFc受容体、例えばFcγRとの変化した結合を示す抗体は、本発明において利用され得る。従って、本発明は、抗体を提供する。

【0076】

抗体

本発明は、FcRnとの結合を調節するアミノ酸修飾を含む抗体を対象とする。特に興味があるのは、低pHでFcRnとの増加した結合親和性を示し、高pHで実質的に変化した結合を示さない、最小限にFc領域を含む抗体またはその機能的変異体である。

【0077】

古典的抗体構造単位には、典型的に、四量体が含まれる。各四量体は、典型的に、ポリペプチド鎖の2個の相同対（各対は、1個の“軽”鎖（典型的に、約25kDaの分子量

10

20

30

40

50

を有する。) および1個の“重”鎖(典型的に、約50-70kDaの分子量を有する。)を有する。)からなる。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダ軽鎖に分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のイソ型を定義する。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むが、それらに限定されない、いくつかのサブクラスを有する。IgMは、IgM1およびIgM2を含むが、これに限定されないサブクラスを有する。故に、本明細書で用いる“イソ型”は、それらの定常領域の化学特性および抗原特性により定義される免疫グロブリンのサブクラスのいずれかを意味する。既知のヒト免疫グロブリンイソ型は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgDおよびIgEである。

10

【0078】

各鎖のアミノ末端部位には、抗原認識に主要な役割を果たす、約100から110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域が含まれる。可変領域中、3つのループが、重鎖および軽鎖の各Vドメインに集合し、抗原結合部位を形成する。各ループは、相補性決定領域(以降、“CDR”と称する)と称され、そこでのアミノ酸配列中の変異は、最も重要である。

【0079】

各鎖のカルボキシ末端部位は、エフェクター機能に主要な役割を果たす定常領域を定義する。Kabatらは、重鎖および軽鎖の可変領域の多数の主要配列を集めた。該配列の保存の程度に基づき、彼らは、CDRおよびフレームワークに個々の主要配列を分類し、その

20

【0080】

免疫グロブリンのIgGサブクラスにおいて、重鎖には、いくつかの免疫グロブリンドメインが存在する。本明細書中、“免疫グロブリン(Ig)ドメイン”とは、異なる三次元構造を有する免疫グロブリンの領域を意味する。本発明において興味があるのは、重鎖定常(CH)ドメインおよびヒンジドメインを含む重鎖ドメインである。IgG抗体において、IgGイソ型はそれぞれ、3個のCH領域を有する。従って、IgGにおける“CH”ドメインは、下記である：“CH1”は、Kabatに記載のEU indexに従い、118-220位を示す。“CH2”は、Kabatに記載のEU indexに従い、237-340位を示し、“CH3”は、Kabatに記載のEU indexに従い、341-447位を示す。

30

【0081】

重鎖のIgドメインの他のタイプは、ヒンジ領域である。本明細書中、“ヒンジ”もしくは“ヒンジ領域”または“抗体ヒンジ領域”もしくは“免疫グロブリンヒンジ領域”は、抗体の第一および第二定常ドメイン間のアミノ酸を含むフレキシブルポリペプチドを意味する。構造的には、IgG CH1ドメインは、EU 220位で終わり、IgG CH2ドメインは、EU 237位の残基で始まる。故に、IgGに関して、抗体ヒンジは、本明細書中、221位(IgG1にてD221)から236位(IgG1にてG236)を含むと定義され、ここで、番号は、Kabatに記載のEU indexに従う。いくつかの態様において、例えばFc領域において、一般的に226位または230位に当たる“下流側ヒンジ(lower hinge)”が包含される。

40

【0082】

本発明において特に興味があるのは、Fc領域である。本明細書で用いる“Fc”または“Fc領域”は、免疫グロブリンドメインの第一の定常領域、いくつかの場合に、ヒンジの一部を除く、抗体の定常領域を含むポリペプチドを意味する。故に、Fcは、免疫グロブリンドメインIgA、IgD、およびIgGの残り2個の定常領域、ならびに免疫グロブリンドメインIgEおよびIgMの残り3個の定常領域、ならびにこれらのドメインのN末端のフレキシブルヒンジを意味する。IgAおよびIgMに関して、Fcには、J

50

鎖が含まれ得る。I g Gに関して、図1に示す通り、F cは、免疫グロブリンDメインCガンマ2およびCガンマ3（C g 2およびC g 3）、ならびにCガンマ1（C g 1）とCガンマ2（C g 2）の間の下流側ヒンジ領域を含む。F c領域の境界は変化し得るが、ヒトI g G重鎖F c領域は、通常、そのカルボキシル末端に残基C 2 2 6またはP 2 3 0を含むと定義され、ここで、番号は、Kabatに記載のE U i n d e xに従う。F cは、下記に記載の通り、単離したこの領域か、またはF cポリペプチド中のこの領域を意味し得る。本明細書で記載の“F cポリペプチド”は、F c領域の全てまたは一部を含むポリペプチドを意味する。F cポリペプチドは、抗体、F c融合体、単離されたF c、およびF c断片を含む。

【0083】

10

いくつかの態様において、抗体は全長である。本明細書中、“全長抗体”とは、本明細書に記載の通り、1個以上の修飾を含む可変および定常領域を含む抗体の天然の生物学的形態を構成する構造を意味する。

【0084】

あるいは、抗体は、それぞれ、抗体断片、モノクローナル抗体、二重特異的抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書中、“抗体模倣体”と称されることもある。）、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合体（本明細書中、“抗体複合体”と称されることもある。）、および各断片を含むが、それらに限定されない、多様な構造であり得る。

【0085】

抗体断片

20

1つの態様において、抗体は抗体断片である。特に興味があるのは、F c領域、F c融合体および重鎖の定常領域（C H 1－ヒンジ－C H 2－C H 3）を含み、さらにまた、重鎖定常領域融合体を含む、抗体である。

【0086】

特定の抗体断片には、（i）V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなるF a b断片、（i i）V HおよびC H 1ドメインからなるF d断片、（i i i）単一抗体のV LおよびV HドメインからなるF v断片；（i v）単一の可変領域からなるd A b断片（Ward et al., 1989, Nature 341:544－546、参照によりその全体が本明細書中に包含される）、（v）単離されたC D R領域、（v i）F（a b'）2断片、2つの結合したF a b断片を含む二価断片、（v i i）一本鎖F v分子（s c F v）（ここで、V HドメインおよびV Lドメインは、2個のドメインを結合させ、抗原結合部位を形成させるペプチドリンカーにより連結される（Bird et al., 1988, Science 242:423－426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879－5883、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。）、（v i i i）二重特異的一本鎖F v（W O 0 3 / 1 1 1 6 1、参照により本明細書中に包含される）、ならびに（i x）“二重抗体（diabody）”または“三重抗体（triabody）”、遺伝子融合により構築される多価または多特異的断片（Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461－479；W094/13804；Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444－6448、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される）が含まれるが、それらに限定されない。該抗体断片は、修飾され得る。例えば、分子は、V HおよびV Lドメインを連結するジスルフィド架橋の組込みにより安定化され得る（Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239－1245、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。

30

40

【0087】

キメラおよびヒト化抗体

いくつかの態様において、骨格成分は、異なる種由来の混合物であり得る。そういうものとして、問題の抗体がそのような抗体であるとき、かかる抗体は、キメラ抗体および／またはヒト化抗体であり得る。一般的に、“キメラ抗体”および“ヒト化抗体”は両方とも、2種以上由来の領域を組み合わせた抗体を意味する。例えば、“キメラ抗体”には、伝統的に、マウス（またはいくつかの場合に、ラット）由来の可変領域（複数可）およびヒト由来の定常領域（複数可）が含まれる。“ヒト化抗体”は、一般的に、ヒト抗体中に

50

見出される配列に置換した可変ドメインフレームワーク領域を有している非ヒト抗体を意味する。一般的に、ヒト化抗体において、C D Rを除く抗体全体は、ヒト起源のポリヌクレオチドにコードされるか、またはそのC D R内を除いてそのような抗体と同一である。そのいくつかまたは全てが非ヒト生物に由来する核酸によりコードされるC D Rは、ヒト抗体可変領域のベーターシートフレームワークに移植され、抗体を作製し、その特異性は、移植したC D Rにより決定される。そのような抗体の作製は、例えば、WO 92/11018、Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536 (全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載される。対応する供与側残基への選択した受容側フレームワーク残基の“復帰突然変異(Backmutation)”は、しばしば、初期の移植したコンストラクトで欠失している親和性を再び得るのに必要である(US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含み、故に、ヒトFc領域を典型的に含むだろう。ヒト化抗体はまた、遺伝子組み換えされた免疫系を有するマウスを用いて作製され得る(Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。非ヒト抗体のヒト化および再形成のための様々な技術および方法は、当技術分野でよく知られている(Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science(USA)およびそこで参照される文献、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒト化方法には、Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の方法が含まれるが、それらに限定されない。非ヒト抗体可変領域の免疫原性を減じるヒト化または他の方法には、例えば、Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973 (参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の表面再形成(resurfacing)方法が含まれ得る。1つの態様において、親抗体は、当技術分野で公知の通り、成熟した親和性を有する。構造に基づく方法は、例えばUS SN 11/004, 590に記載のヒト化および親和性成熟に用いられ得る。選択に基づく方法は、Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の方法を含むが、これらに限定されない、抗体可変領域のヒト化および/または親和性成熟に用いられ得る。他のヒト化方法は、US SN 09/810, 510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の方法を含むが、これらに限定されない、C D Rの一部のみの移植を伴い得る。

【0088】

二重特異的抗体

1つの態様において、本発明の多特異的抗体、特に二重特異的抗体はまた、“二重抗体”と称されることもある。これらは、2個(またはそれ以上)の異なる抗原に結合する抗体である。二重抗体は、当技術分野で公知の様々な方法で作製することができ(Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、例えば化学的に、またはハイブリッド・ハイブリドーマ(hy

10

20

30

40

50

brid hybridoma) から作製することができる。

【0089】

ミニボディ

1つの態様において、抗体はミニボディである。ミニボディは、CH3ドメインに結合したscFvを含む最小化抗体様タンパク質である (Hu et al., 1996, Cancer Res. 56: 3055-3061、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。いくつかの場合に、scFvは、Fc領域と結合することができ、ヒンジ領域のいくつかまたは全てを包含し得る。

【0090】

ヒト抗体

1つの態様において、抗体は、本明細書に記載の通り、少なくとも1個の修飾を有する全長ヒト抗体である。“全長ヒト抗体”または“完全ヒト抗体”は、本明細書に記載の修飾を有するヒト染色体に由来する抗体遺伝子配列を有するヒト抗体を意味する。

【0091】

抗体融合体

1つの態様において、本発明の抗体は、抗体融合タンパク質 (本明細書中、“抗体複合体”と称されることもある) である。抗体融合体の1つのタイプは、結合パートナーを有するFc領域を連結するFc融合体を含む。本明細書で用いる“Fc融合体”は、1個以上のポリペプチドが、作動可能にFc領域に連結されるタンパク質を意味する。本明細書中、Fc融合体は、従来技術 (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される) で用いられる通り、用語“免疫アドヘシン (immunoadhesin)”、“Ig融合体”、“Igキメラ”、および“受容体グロブリン” (ダッシュを付けることもある) と同義の意味である。Fc融合体は、一般的に、何れかのタンパク質または小分子であり得る融合パートナーを有する免疫グロブリンのFc領域を結合する。実際、何れかのタンパク質または小分子はFcと結合し、Fc融合体を作製し得る。タンパク質融合パートナーには、いずれかの抗体の可変領域、受容体の標的結合領域、接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン、ケモカイン、または他のタンパク質もしくはタンパク質ドメインが含まれ得るが、それらに限定されない。小分子融合パートナーは、Fc融合体を治療標的に向ける何れかの治療剤を含み得る。かかる標的は、何れかの分子、好ましくは疾患に関与する細胞外受容体であり得る。故に、IgG変異体は、1個以上の融合パートナーと結合し得る。1つの別の態様において、IgG変異体を、他の治療化合物と結合するか、または作動可能に連結する。該治療化合物は、細胞毒性剤、化学療法剤、毒物、放射性同位体、サイトカイン、または他の治療的活性剤であり得る。IgGは、様々な非タンパク性ポリマー、例えば、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、またはポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールのコポリマーのうち1つと結合し得る。

【0092】

Fc融合体に加えて、抗体融合体は、重鎖の定常領域と、1個以上の融合パートナー (何れかの抗体の可変領域を再び含む) の融合を含むが、一方、他の抗体融合体は、融合パートナーを有する実質的または完全な全長抗体である。1つの態様において、融合パートナーの役割は標的結合を仲介することであり、故に、それは、抗体の可変領域に機能的に類似する (そして、実際抗体可変領域であり得る)。実際、何れかのタンパク質または小分子は、Fcと結合し、Fc融合体 (または抗体融合体) を作製し得る。タンパク質融合パートナーは、受容体の標的結合領域、接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン、ケモカイン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み得るが、それらに限定されない。小分子融合パートナーは、Fc融合体を治療標的に向ける何れかの治療剤を含み得る。かかる標的は、何れかの分子、好ましくは疾患に関与する細胞外受容体であり得る。

【0093】

結合パートナーは、タンパク性または非タンパク性であり得る；後者は、一般的に、抗体および結合パートナーの官能基を用いて作製される。例えばリンカーは、当技術分野で公知である；例えば、ホモまたはヘテロ二官能性リンカーが、よく知られている（1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200を参照のこと、参照により本明細書中に包含される）。

【0094】

適する複合体には、下記の標識、薬剤、ならびに、細胞毒性剤（例えば、化学療法剤）または毒物またはかかる毒物の活性断片を含むが、これらに限定されない細胞毒性物質が含まれるが、それらに限定されない。適する毒物およびそれらの対応する断片には、ジフテリアA鎖、エクゾキトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンなどが含まれる。細胞毒性物質にはまた、放射性同位体と抗体を結合すること、または放射性核種と抗体に共有結合しているキレート剤を結合することにより作製される放射性化学物質が含まれる。さらなる態様が、カリケミシン、オーリスタチン（auristatin）、ゲルダナマイシン、マイタンシン、ならびにデュオカルマイシンおよび類似体を利用する；後者に関して、U. S. 2003/0050331A1を参照のこと、参照によりその全体が本明細書中に包含される。

10

【0095】

抗体の共有結合修飾（Covalent modification）

抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲内に包含され、常にではないが一般的に、翻訳後に行われる。例えば、抗体の共有結合修飾のいくつかのタイプは、抗体の特定のアミノ酸残基を、選択した側鎖またはN-もしくはC-末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることにより分子中に導入される。

20

【0096】

システイニル残基は、最も一般的に、 α -ハロ酢酸（および対応するアミン）、例えばクロロ酢酸またはクロロアセトアミドと反応し、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -ブロモ- β -(5-イミドゾール（imidozoyl）)プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル-2-ピリジルジスルフィオ、p-クロロマーキュリ安息香酸塩、2-クロロマーキュリ-4-ニトロフェノールまたはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサー-1, 3-ジアゾールなどと反応することにより誘導され得る。

30

【0097】

ヒスチジル残基は、ヒスチジル側鎖と比較的特異的に反応するピロ炭酸ジエチルとのpH 5.5-7.0での反応により誘導される。パラ-ブロモフェンアシルブロミドも有用である；反応は、好ましくは0.1Mカコジル酸ナトリウム中、pH 6.0にて行われる。

【0098】

リシニル（Lysinyl）およびアミノ末端残基を、無水コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの物質を用いる誘導体化は、リシニル残基の荷電を逆にする効果を有する。他の誘導体化に適する試薬であるアルファアミノ含有残基には、メチルピコリンイミダート；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロボロハイドライド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソウレア；2, 4-ペンタンジオン；および、グリオキシル酸を用いるトランスアミナーゼ触媒反応のようなイミドエステルが含まれる。

40

【0099】

アルギニル残基は、1個またはいくつかの常套試薬（とりわけ、フェニルグリオキサル、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサジオンおよびニンヒドリン）を用いる反応により修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基が高pKaであるためにアルカリ性条件で行うことが必要である。さらに、これらの試薬は、リシンの複数の基ならびにアルギニン イプシロン-アミノ基と反応し得る。

50

【0100】

チロシル残基の特定の修飾を、特に関心を持って、芳香族性ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によりチロシル残基中にスペクトル標識を導入することにより作製することができる。最も一般的には、N-アセチルイミジゾール (acetylimidazole) およびテトラニトロメタンを、O-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体それぞれを形成するために用いる。チロシル酸基を、ラジオイムノアッセイである適する上記のクロミンT法に用いるための標識タンパク質を調製するために125Iまたは131Iを用いてヨウ素化する。

【0101】

カルボキシル側基 (アスパルチルまたはグルタミル) は、カルボジイミド ($R'N=C=N-R'$) (式中、RおよびR'は、所望により、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドのような異なるアルキル基であり得る。)との反応により選択的に修飾される。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。

【0102】

二官能性物質を用いる誘導体化は、下記の方法だけでなく、様々な方法での使用のための不水溶性支持マトリックスまたは表面への抗体を架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス(サクシンイミジルプロピオネート)のようなジサクシンイミジルエステル、およびビス-N-マレイミド-1,8-オクタンのような二官能性マレイミドを含むホモ二官能性イミドエステルが含まれる。メチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートのような誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成し得る光活性化中間体を生じる。あるいは、臭化シアン活性化炭水化物のような反応性不水溶性マトリックスおよび米国特許番号第3,969,287号;同第3,691,016号;同第4,195,128号;同第4,247,642号;同第4,229,537号;および、同第4,330,440号(全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載の反応基質を、タンパク質固定化に用いる。

【0103】

グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、しばしば、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基に脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基の形態はどちらも、本発明の範囲内である。

【0104】

他の修飾には、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、N末端アミンのアセチル化、ならびに何れかのC末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。

【0105】

グリコシル化

共有結合修飾の他のタイプは、グリコシル化である。他の態様において、本明細書に記載のIgG変異体は、1個以上の改変された糖鎖 (glycoform) を含むように修飾され得る。本明細書で用いる“改変された糖鎖”は、IgGと共有結合する炭水化物組成物を意味し、ここで該炭水化物組成物は、親IgGと化学的に異なる。改変された糖鎖は、エフェクター機能を増強するかまたは減少することを含むが、これらに限定されない様々な目的に有用であり得る。改変された糖鎖は、当技術分野で公知の様々な方法により作製され得る (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; Sh

10

20

30

40

50

inkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6, 602, 684; US N 10/277, 370; US N 10/113, 929; PCT WO 00/6173 9 A 1; PCT WO 01/29246 A 1; PCT WO 02/31140 A 1; PCT WO 02/30954 A 1、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される; (Potelligent^{T M} technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAb (登録商標) glycosylation engineering technology [Glycart Biotechnology AG, Zuerich, Switzerland])。多くのこれらの技術は、フコシル化レベルを制御すること、および/または Fc 領域に共有結合するオリゴ糖を、例えば、遺伝子組み換えまたは他の様々な生物または細胞株 (例えば、Lec-13 CHO 細胞またはラットハイブリドーマ YB2/O 細胞) で IgG を発現することによるか、またはグリコシル化経路に参与する酵素 (例えば、FUT8 [α1, 6-フコシルトランスフェラーゼ] および/または β1-4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III [GnT III]) を調節することによるか、または IgG が発現された後、炭水化物 (複数可) を修飾することにより、2 つに切断することに基づく。改変された糖鎖は、典型的に、異なる炭水化物またはオリゴ糖と称される; 故に、IgG 変異体、例えば抗体または Fc 融合体は、改変された糖鎖に包含され得る。あるいは、改変された糖鎖は、異なる炭水化物またはオリゴ糖を含む IgG 変異体と称され得る。当技術分野で公知の通り、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列 (例えば、下記の、特定のグリコシル化アミノ酸残基の存在または不存在)、または該タンパク質を産生する宿主細胞もしくは生物に依存し得る。特定の発現系を以下に記載する。

【0106】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的に、N 結合または O 結合のいずれかである。N 結合は、アスパラギン酸基の側鎖への炭水化物部分の付加を意味する。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン (式中、X は、プロリンを除く任意のアミノ酸である。) は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。故に、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、可能性のあるグリコシル化部位をもたらす。O 結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸 (最も一般的にはセリンまたはトレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは 5-ヒドロキシリシンも使用可能である。) への糖の一種 (N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロース) の付加を意味する。

【0107】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、(N 結合グリコシル化部位のために) 1 個以上の上記トリペプチド配列を含むようにアミノ酸配列を改変することにより都合よく達成される。該改変はまた、(O 結合グリコシル化部位のために) 出発配列への 1 個以上のセリンまたはトレオニン残基の付加または置換により成され得る。簡単には、抗体のアミノ酸配列を、好ましくは DNA レベルでの変化により、特に、コドンが所望のアミノ酸に翻訳され得るように作製されるように予め選択された塩基にて、標的ポリペプチドをコードする DNA を変異させることにより、改変する。

【0108】

抗体上の炭水化物部分の数を増加する他の手段は、タンパク質へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによる。これらの方法は、N および O 結合グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞におけるタンパク質の産生を必要としない点で有利である。用いるカップリング法に依存して、糖 (糖類) を、(a) アルギニンおよびヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) システインの一部のような遊離スルフヒドリル基、(d) セリン、トレオニンまたはヒドロキシプロリンの一部のような遊離ヒドロキシル基、(e) フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトランの一部のような芳香族性残基、または (f) グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は、WO 87/05330 および Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される) に記載される。

【0109】

出発抗体に存在する炭水化物部分の除去を、化学的または酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸化合物、または等価化合物へのタンパク質の暴露を必要とする。この処理により、結果として、架橋している糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたは全ての糖鎖が切断されるが、一方、ポリペプチドは無傷のままである。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52、およびEdge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131（両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される）に記載される。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350（参照によりその全体が本明細書中に包含される）に記載の通り、様々なエンドーおよびエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。可能性のあるグリコシル化部位でのグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105（参照によりその全体が本明細書中に包含される）に記載の通り、ツニカマイシン化合物の使用により阻止することができる。ツニカマイシンは、タンパク質-N-グリコシド結合の形成を妨げる。

10

【0110】

抗体の共有結合修飾の他のタイプは、例えばNektar Therapeuticsから市販されている2005-2006 PEG Catalog (Nektar websiteで利用可能)、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号（全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される）に記載の方法で、抗体を、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンのような様々なポリオールを含むが、これらに限定されない様々な非タンパク性ポリマーに結合することを含む。さらに、当技術分野で公知の通り、アミノ酸置換を、PEGのようなポリマーの付加を促進するために抗体内の様々な部位に行うことができる。例えば、米国特許公開番号2005/0114037A1（参照によりその全体が本明細書中に包含される）を参照のこと。

20

【0111】

標識抗体

いくつかの態様において、本発明の抗体の共有結合修飾は、1個以上の標識の付加を含む。いくつかの場合において、これらは、抗体融合体と見なされる。用語“標識基”は、何れかの検出可能な標識を意味する。いくつかの態様において、標識基は、可能性のある立体障害を減じるために、多様な長さのスペーサーアームを介して抗体と結合させる。タンパク質を標識するための様々な方法が、当技術分野で公知であり、本発明の実施において用いられ得る。

30

【0112】

一般的に、標識は、それらが検出される分析に依存して様々なクラスに分類される：a) 放射性同位体または重同位体であり得るアイソトープ標識；b) 磁気標識（例えば、磁性粒子）；c) レドックス活性部分；d) 光学色素；酵素群（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；e) ビオチン化基；および、f) 二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー塩基対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグなど）。いくつかの態様において、標識基は、可能性のある立体障害を減じるために、多様な長さのスペーサーアームを介して抗体と結合させる。タンパク質を標識するための様々な方法が、当技術分野で公知であり、本発明の実施において用いられ得る。

40

【0113】

特定の標識は、発色団、蛍光体およびフルオロフォアを含むが、これらに限定されない光学色素が含まれ、多くの例において特に後者である。フルオロフォアは、“小分子”蛍光物質、またはタンパク性蛍光物質のどちらかであり得る。

【0114】

“蛍光標識”は、その固有の蛍光特性により検出され得る何れかの分子を意味する。適

50

する蛍光標識には、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルークマリン、ピレン、マラカイトグリーン (Malacite green)、スチルベン、黄色蛍光色素 (Lucifer Yellow)、Cascade Blue J、テキサスレッド、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy5、Cy5.5、LC Red 705、Oregon green、Alexa-Fluor 色素 (Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade Blue、Cascade Yellow および R-フィコエリトリン (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR)、FITC、ローダミン、およびテキサスレッド (Pierce, Rockford, IL)、Cy5、Cy5.5、Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA) が含まれるが、それらに限定されない。適するフルオロフォアを含む光学色素は、Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland (参照によりその全体が本明細書中に包含される) に記載される。

【0115】

適するタンパク性蛍光標識にはまた、ウミシイタケ (Renilla) 種、ウミエラ (Ptilosarcus) 種、またはオワンクラゲ (Aequorea) 種の GFP を含む緑色蛍光タンパク質 (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805)、EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank 受託番号 U55762)、青色蛍光タンパク質 (BFP、Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182)、増強黄色蛍光タンパク質 (EYFP、Clontech Laboratories, Inc.)、ルシフェラーゼ (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417)、 β -ガラクトシダーゼ (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) およびウミシイタケ (WO 92/15673、WO 95/07463、WO 98/14605、WO 98/26277、WO 99/49019、米国特許番号第 5292658 号、同第 5418155 号、同第 5683888 号、同第 5741668 号、同第 5777079 号、同第 5804387 号、同第 5874304 号、同第 5876995 号、同第 5925558 号) が含まれるが、それらに限定されない。この段落における上記の参考文献は全て、参照により本明細書中に明示的に包含される。

【0116】

IgG 変異体

1つの態様において、本発明は、IgG タンパク質変異体を提供する。最小限では、IgG 変異体は、重鎖の CH2-CH3 領域を含む抗体断片を含む。さらに、適する IgG 変異体は、Fc ドメイン (例えば、下流ヒンジ領域を含む) を含み、ならびに重鎖の定常領域 (CH1-ヒンジ-CH2-CH3) を含む IgG 変異体も本発明に有用であり、それらは全て、融合パートナーと融合し得る。

【0117】

IgG 変異体は、親 IgG ポリペプチドと比較して、いくつかの場合に野生型 IgG と比較して、1個以上のアミノ酸修飾を含む。IgG 変異体は、1個以上の最適化特性を有し得る。IgG 変異体は、少なくとも1個のアミノ酸修飾により、その親 IgG とアミノ酸配列が異なる。故に、IgG 変異体は、親と比較して少なくとも1個のアミノ酸修飾を有する。あるいは、IgG 変異体は、親と比較して2個以上のアミノ酸修飾、例えば親と比較して約1個から50個のアミノ酸修飾、好ましくは約1個から10個のアミノ酸修飾、最も好ましくは約1個から約5個のアミノ酸修飾を有し得る。

【0118】

故に、IgG 変異体の配列および親 Fc ポリペプチドの配列は、実質的に相同性である。例えば、本明細書中、変異体 IgG の変異体配列は、親 IgG 変異体配列と約 80% の相同性、好ましくは少なくとも約 90% の相同性、最も好ましくは少なくとも約 95% の

相同性を有し得る。修飾は、分子生物学を用いて遺伝子組み換え的にまたは酵素的または化学的に行われ得る。

【0119】

抗体のための標的抗原

実質的には、標的抗原の下記のリストに属するタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフおよび／またはエピトープが含まれるが、それらに限定されない全ての抗原は、IgG変異体により標的とされ得る。それらには、サイトカインおよび膜貫通受容体を含む膜結合因子のような両方に可溶性の因子が含まれる：17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケート-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRI B ALK-4、アクチビンRI IA、アクチビンRI IB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-V/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、B20CMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン(Osteogenin)、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、BMP-6 Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II(BRK-3)、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原(CEA)、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPi、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、

【0120】

CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMVUL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、C

XCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子 (Decay accelerating factor)、des (1-3)-IGF-I (脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セ렉チン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIC、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIa (GPIIb/IIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-capまたはNIP-cap)、

【0121】

HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFGEPM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-1、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン (INF)-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、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4/ベータ1、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5 (アルファV)、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP (TGF-1)、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイス-Y抗原、ルイス-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セ렉チン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキ

10

20

30

40

50

シンペータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、

【0122】

MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン (Muc1)、MUC18、ミュー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニューロツリン、神経成長因子 (NGF)、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-Cadherin、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ (PLAP)、PLGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレキシシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レキシシンA鎖、レキシシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス (RSV) F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-11、TACE、TACI、TAG-72 (腫瘍関連糖タンパク質-72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体 (例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI (ALK-5)、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、TmPo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2、DR4)、

【0123】

TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUND)、TNFRSF11A (RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD

10

20

30

40

50

137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25(DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11(TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド)、TNFSF12(TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITRリガンド AITRリガンド、TL6)、TNFSF1A(TNF-a コネクチン (Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B(TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC、p33)、TNFSF4(OX40リガンド gp34、TXGP1)、TNFSF5(CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6(Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7(CD27リガンド CD70)、TNFSF8(CD30リガンド CD153)、TNFSF9(4-1BBリガンド CD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEGFR-1(flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、ならびにホルモンおよび成長因子のための受容体。

【0124】

当業者は、標的の上記リストが、特定のタンパク質および生体分子のみでなく、それらを含む生化学的経路または経路群も意味することを理解するだろう。例えば、標的抗原としてのCTLA-4への言及は、CTLA-4、B7-1、B7-2、CD28、およびこれらのタンパク質に結合する全ての他の未知のリガンドまたは受容体を含む、T脂肪共刺激経路を形成するリガンドおよび受容体も標的であることを意味する。故に、本明細書で用いる抗原とは、特定の生体分子のみでなく、該標的と相互作用する一連のタンパク質および該標的が属する生化学的経路のメンバーも意味する。当業者は、上記の標的抗原のいずれか、それらに結合するリガンドもしくは受容体、またはその対応する生化学的経路の他のメンバーを、Fc融合体を作製するために本発明のFc変異体に作動可能に連結し得ることをさらに理解するだろう。故に、例えば、EGFRを標的とするFc融合体を、EGFRに結合するEGF、TGF- β 、または発見されたもしくは未知の全ての他のリガンドにFc変異体を作動可能に連結することにより構築することができる。従って、本発明のFc変異体は、EGFRに結合するEGF、TGF- β 、または発見されたもしくは未知の全ての他のリガンドに結合するFc融合体を作製するために、EGFRと作動可能に連結され得る。故に、実際、リガンド、受容体であろうといくつかの他のタンパク質もしくはタンパク質ドメインであろうと、それらの対応する生化学的経路を含む上記の標的およびタンパク質を含むが、それらに限定されない全てのポリペプチドを、Fc融合体を作製するために本発明のFc変異体に作動可能に連結することができる。

【0125】

適する抗原の選択は、所望の適用に依存する。抗癌処置に関して、その発現が癌細胞に限定される標的を有することが望ましい。とりわけ抗体治療に適していることが証明され

10

20

30

40

50

ているいくつかの標的が、シグナル伝達機能を有するものである。他の治療用抗体は、受容体とその同族リガンドとの結合を阻害することにより受容体のシグナル伝達を阻止して、それらの効果を発揮する。治療用抗体の他の作用機序は、受容体の下方制御を引き起こすことである。他の抗体は、それらの標的抗原を介するシグナル伝達により働かない。いくつかの場合において、感染性疾患剤に向けられた抗体が用いられる。

【0126】

1つの態様において、本発明のFc変異体は、サイトカインに対する抗体中に組み込まれる。あるいは、Fc変異体は、サイトカインと融合または結合される。本明細書で用いる“サイトカイン”は、細胞間メディエーターとして他の細胞に作用する、ある細胞集団により放出されるタンパク質の一般名を意味する。例えば、Penichet et al., 2001, J Immunol Methods 248:91-101（参照により明示的に本明細書中に包含される）に記載の通り、サイトカインは、抗体に融合され、一連の望ましい特性を提供する。かかるサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるものは、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のような成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）のような糖タンパク質ホルモン；肝臓の増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；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-ベータのような神経成長因子；血小板増殖因子；TGF-アルファおよびTGF-ベータのような形質転換成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-Iおよび-II；エリスロポイエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン-アルファ、ベータ、およびガンマのようなインターフェロン；マクロファージ-CSF（M-CSF）のようなコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；ならびに、顆粒球-CSF（G-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のようなインターロイキン（IL）；TNF-アルファまたはTNF-ベータのような腫瘍壊死因子；C5a；ならびに、LIFおよびkitリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。本明細書で用いる通り、用語サイトカインには、天然源由来または組換え細胞培養由来のタンパク質、および天然配列の生物学的に活性な同等物が含まれる。

【0127】

TNFスーパーファミリーメンバーのようなサイトカインおよび可溶性標的は、本発明の変異体を用いるための好ましい標的である。例えば、抗VEGF、抗CTLA-4および抗TNF抗体、またはそれらの断片は、FcRn結合を増加するFc変異体の使用のための特に良好な抗体である。これらの標的に対する治療剤は、しばしば、自己免疫性疾患の処置を伴い、長期間かけての多数回投与を必要とする。それ故、本発明の変異体によりもたらされるより長時間の血清半減期および処置頻度の低下は、特に好ましい。

【0128】

臨床試験または開発における使用を承認される多くの抗体およびFc融合体には、本発明のFc変異体により利点がもたらされ得る。本明細書中、これらの抗体およびFc融合体は、“臨床的製品および候補品”と称される。故に、好ましい態様において、本発明のFcポリペプチドは、臨床的製品および候補品の範囲で使用され得る。例えば、CD20を標的とする多くの抗体は、本発明のFcポリペプチドにより利点がもたらされ得る。例えば、本発明のFcポリペプチドは、リツキシマブ（Rituxan（登録商標）、IDEC/Genentech/Roche）（例えば、US 5,736,137を参照のこと）、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；HuMax-CD20、現在Genmabにより開発されている抗CD20、US 5,500,362に記載の抗CD20抗体、AME-133（Applied Molecular Evolution）、hA20（Immunomedics, Inc.）、Hum

10

20

30

40

50

a L Y M (Intracel)、および P R O 7 0 7 6 9 (P C T / U S 2 0 0 3 / 0 4 0 4 2 6、題名 “Immunoglobulin Variants and Uses Thereof”) と実質的に類似する抗体に使用され得る。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) を含む上皮細胞増殖因子受容体ファミリーのメンバーを標的とする多くの抗体は、本発明の F c ポリペプチドにより利点をもたらされ得る。例えば、本発明の F c ポリペプチドは、トラスツズマブ (ハーセプチン (登録商標)、Genentech) (例えば、U S 5, 6 7 7, 1 7 1 を参照のこと) と実質的に類似する抗体、乳癌の処置に承認されたヒト化抗 H e r 2 / n e u 抗体; Genentech により現在開発されているペルツズマブ (r h u M a b - 2 C 4、O m n i t a r g ^{T M}) ; U S 4, 7 5 3, 8 9 4 に記載の抗 H e r 2 抗体; セツキシマブ (E r b i t u x (登録商標)、Imclone) (U S 4, 9 4 3, 5 3 3 ; P C T W O 9 6 / 4 0 2 1 0)、様々な癌の臨床試験におけるキメラ抗 E G F R 抗体; Abgenix-Immunex-Amgen により現在開発されている A B X - E G F (U S 6, 2 3 5, 8 8 3) ; Genmab により現在開発されている H u M a x - E G F r (U S S N 1 0 / 1 7 2, 3 1 7) ; 4 2 5、E M D 5 5 9 0 0、E M D 6 2 0 0 0、および E M D 7 2 0 0 0 (Merck KGaA) (U S 5, 5 5 8, 8 6 4 ; 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) ; I C R 6 2 (Institute of Cancer Research) (P C T W O 9 5 / 2 0 0 4 5 ; 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) ; T h e r a C I M h R 3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba (U S 5, 8 9 1, 9 9 6 ; U S 6, 5 0 6, 8 8 3 ; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81) ; m A b - 8 0 6 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2):639-44) ; K S B - 1 0 2 (KS Biomedix) ; M R 1 - 1 (IVAX, National Cancer Institute) (P C T W O 0 1 6 2 9 3 1 A 2) ; ならびに、S C 1 0 0 (Scancell) (P C T W O 0 1 / 8 8 1 3 8) に使用され得る。

【0129】

他の好ましい態様において、本発明の F c ポリペプチドは、B 細胞慢性リンパ性白血病の処置に現在承認されたヒト化モノクローナル抗体であるアレムツズマブ (C a m p a t h (登録商標)、Millenium) に使用され得る。本発明の F c ポリペプチドは、Ortho Bio tech/Johnson & Johnson により開発された抗 C D 3 抗体であるムロモナブー C D 3 (O r t h o c l o n e O K T 3 (登録商標))、IDEC/Schering AG により開発された抗 C D 2 0 抗体であるイブリツモマブチウキセタン (ibritumomab tiuxetan) (Z e v a l i n (登録商標))、Celltech/Wyeth により開発された抗 C D 3 3 (p 6 7 タンパク質) 抗体であるゲムツマブ・オゾガマイシン (M y l o t a r g (登録商標))、Biogen により開発された抗 L F A - 3 F c 融合体であるアレファセプト (A m e v i v e (登録商標))、Centocor/Lilly により開発されたアブシキマブ (R e o P r o (登録商標))、Novartis により開発されたバシリキシマブ (S i m u l e c t (登録商標))、MedImmune により開発されたパリビズマブ (S y n a g i s (登録商標))、Centocor により開発された抗 T N F アルファ抗体であるインフリキシマブ (R e m i c a d e (登録商標))、Abbott により開発された抗 T N F アルファ抗体であるアダリムマブ (H u m i r a (登録商標))、Celltech により開発された抗 T N F アルファ抗体である H u m i c a d e ^{T M}、Immunex/Amgen により開発された抗 T N F アルファ F c 融合体であるエタネルセプト (E n b r e l (登録商標))、Abgenix により開発されている抗 C D 1 4 7 抗体である A B X - C B L、Abgenix により開発されている抗 I L 8 抗体である A B X - I L 8、Abgenix により開発されている抗 M U C 1 8 抗体である A B X - M A 1、Antisoma により開発中の抗 M U C 1 抗体である P e m t u m o m a b (R 1 5 4 9、9 0 Y - m u H M F G 1)、Antisoma により開発されている抗 M U C 1 抗体である T h e r e x (R 1 5 5 0)、An

10

20

30

40

50

tisoma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Thioplatin (AS1407)、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 抗体であるアンテグレン (登録商標) (ナタリズマブ)、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、Biogen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LTBR mAb、Cambridge Antibody Technologyにより開発されている抗TGF- β 2 抗体であるCAT-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1 抗体であるCAT-213、Cambridge Antibody Technologyおよびhuman Genome Sciences Inc.により開発されている抗Bly s 抗体であるLymphoStat-BTM、Cambridge Antibody Technologyおよびhuman Genome Sciences, Inc.により開発されている抗TRAIL-R1 抗体であるTRAIL-R1 mAb、Genentechにより開発されている抗VEGF 抗体であるアバスタチン (商標) (ベバシツマブ、rhumaB-VEGF)、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XolairTM (オマリズマブ)、GenentechおよびXomaにより開発されている抗CD11a 抗体であるRap tivaTM (エファリズマブ)、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、

【0130】

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、Genmabにより開発されているHuMax-TAC、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されているIDEC-131 および抗CD40L 抗体、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されている抗CD4 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、Imclone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性抗原 (CEA) 抗体であるCEA-CideTM (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LymphoCideTM (エプラツズマブ)、Immunomedicsにより開発されているAFP-Cide、Immunomedicsにより開発されているMyelomaCide、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、Medarex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MDX-070、Medarexにより開発されているMDX-018、MedarexおよびImmuno-Designed Moleculesにより開発されているOsidemTM (IDM-1) および抗Her2 抗体、MedarexおよびGenmabにより開発されている抗CD4 抗体であるHuMaxTM-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Centocor/J&Jにより開発されている抗TNF α 抗体であるCNTO 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CNTO 1275、MorphoSysにより開発されている抗細胞間接着分子-1

10

20

30

40

50

(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増殖因子受容体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Nuviion (登録商標) (ビシリズマブ)、Protein Design Labsにより開発されている抗ガンマインターフェロン抗体であるHuZAFTM、Protein Design Labsにより開発されているAnt- $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン、Protein Design Labsにより開発されている抗IL-12、Xomaにより開発されている抗EPCAM抗体であるING-1、ならびに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 (本段落中、上記の引用文献は全て、参照により明確に本明細書中に包含される) を含むが、それらに限定されない、他の臨床製品および候補品と実質的に類似する様々な抗体またはFc融合体に使用され得る。

10

【0131】

本発明のFcポリペプチドは、上記の臨床候補品および製品中、または実質的にそれらと類似である抗体およびFc融合体中に組み込まれ得る。本発明のFcポリペプチドは、いくつかの異なる方法でヒト化、親和性成熟、遺伝子組み換え、または修飾される上記の臨床候補品および製品中に組み込まれ得る。

【0132】

1つの態様において、本発明のFcポリペプチドは、自己免疫性疾患、炎症性疾患の処置、または移植適用に使用される。かかる疾患に関係のある標的抗原および臨床的製品および候補には、LDP-02のような抗 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン抗体、LDP-01のような抗ベータ2インテグリン抗体、5G1.1のような抗補体(C5)抗体、BTI-322のような抗CD2抗体、MEDI-507、OKT3のような抗CD3抗体、SMART抗CD3、IDEC-151のような抗CD4抗体、MDX-CD4、OKT4A、抗CD11a抗体、IC14のような抗CD14抗体、抗CD18抗体、IDEC152のような抗CD23抗体、ゼナパックスのような抗CD25抗体、5c8のような抗CD40L抗体、Antova、IDEC-131、MDX-33のような抗CD64抗体、IDEC-114のような抗CD80抗体、ABX-CBLのような抗CD147抗体、CDP850のような抗Eセレクトイン抗体、Reopro/Abciximaのような抗gpIIB/Ia抗体、ICM3のような抗ICAM-3抗体、VX-740のような抗ICE抗体、MDX-33のような抗FcR1抗体、rhumaB-E25のような抗IgE抗体、SB-240683のような抗IL-4抗体、SB-240563のような抗IL-5抗体、SCH55700、ABX-IL8のような抗IL-8抗体、抗インターフェロンガンマ抗体、CDP571のような抗TNF (TNF、TNFa、TNFa、TNF- α) 抗体、CDP870、D2E7、インフリキシマブ、MAK-195Fならびにアンテグレンのような抗VLA-4抗体が含まれるが、それらに限定されない。

20

30

【0133】

FcRnに対する増加した結合を有するような本発明のFc変異体を、増大した特性を与えるためにTNF阻害剤分子に利用可能である。有用なTNF阻害剤分子には、哺乳動物におけるTNF- α の作用を阻害する何れかの分子が包含される。適する例には、Fc融合体であるエンブレル (登録商標) (エタネルセプト) ならびに抗体であるヒュミラ (登録商標) (アダリムマブ) およびレミケード (登録商標) (インフリキシマブ) が含まれる。本FcFn結合を増加するために発明のFc変異体を用いて作製されたモノクローナル抗体 (レミケードおよびヒュミラのような) は、増加した半減期により、より有効に変換され得る。

40

【0134】

いくつかの態様において、感染症に対する抗体を用いる。真核細胞に対する抗体には、出芽酵母、メタノール資化性酵母 (Hansenula polymorpha)、乳糖資化性酵母 (Kluyveromyces fragilis) およびK. lactis)、メタノール資化性酵母 (Pichia guilliermondii) およびP. pastoris)、分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe)、熱帯熱マラリア原虫 (plas

50

modium falciparum)、およびアルカン資化性酵母 (Yarrowia lipolytica) を含むが、これらに限定されない酵母細胞を標的とする抗体が含まれる。

【0135】

カンジダグラブラータ (*Candida glabrata*)、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*)、カンジダクルセイ (*C. krusei*)、カンジダルシタニアンド (*C. lusitaniae*)、カンジダマルトーサ (*C. maltosa*) を含むカンジダ株、ならびに特にアスペルギルス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、コクシジオイデス、ブラストミセスおよびベニシリウム種と関係のある標的抗原を含む、さらなる真菌細胞に対する抗体はまた、有用である。

【0136】

原生動物と関係のある標的抗原に向けた抗体には、トリパノソーマ、ドノバンリーシュマニア (*Leishmania donovani*) を含むリーシュマニア種；マラリア原虫 (*Plasmodium* spp.)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、クリプトスポリジウム原虫 (*Cryptosporidium parvum*)、ジアルジア (*Giardia lamblia*)、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、およびサイクロスポーラ (*Cyclospora cayentanensis*) と関係のある抗体が含まれるが、それらに限定されない。

【0137】

バチルス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*) を含むバチルス属；ビブリオ属、例えば、コレラ菌 (*V. cholerae*)；エッシェリキア属 (*Escherichia*)、例えば、毒素性大腸菌 (*Enterotoxigenic E. coli*)；シゲラ属 (*Shigella*)、例えば、赤痢菌 (*S. dysenteriae*)；サルモネラ属、例えば、チフス菌 (*S. typhi*)；マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、例えば、結核菌 (*M. tuberculosis*)、ハンセン菌 (*M. leprae*)；クロストリジウム属、例えば、ボツリヌス菌、破傷風菌 (*C. tetani*)、クロストリジウム・ディフィシル (*C. difficile*)、ウェルシュ菌 (*C. perfringens*)；コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、例えば、ジフテリア菌 (*C. diphtheriae*)；連鎖球菌 (*Streptococcus*)、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*)、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)；ブドウ球菌、例えば、黄色ブドウ球菌；ヘモフィルス属、例えば、インフルエンザキーン；ナイセリア属 (*Neisseria*)、例えば、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*)、淋菌 (*N. gonorrhoeae*)；エルシニア属 (*Yersinia*)、例えば、エルシニア・ランブル (*Y. lamblia*)、ペスト菌 (*Y. pestis*)；シュードモナス属、例えば、緑膿菌、シュードモナス・プチダ (*P. putida*)；クラミジア属、例えば、クラミジアトラコマチス (*C. trachomatis*)；ボルデテラ属、例えば、百日咳菌 (*B. pertussis*)；トレポネーマ属、例えば、梅毒トレポネーマ (*T. Palladium*)；炭疽菌 (*B. anthracis*)、ペスト菌 (*Y. pestis*)、ブルセラ種、野兔病菌 (*F. tularensis*)、鼻疽菌 (*B. mallei*)、類鼻疽菌 (*B. pseudomallei*)、クロストリジウム・ボツリナム、サルモネラ種、ビブリオ菌毒素 B (SEB *V. cholerae* toxin B)、大腸菌 O157:H7、リステア種、トリコスポロン菌 (*Trichosporon beigeli*)、ロドトウラ種 (*Rhodotorula* species)、凝集性酵母 (*Hansenula anomala*)、エンテロバクター種 (*Enterobacter* sp.)、クレブシエラ種 (*Klebsiella* sp.)、リステリア種 (*Listeria* sp.)、マイコプラズマ種 (*Mycoplasma* sp.) などを含むが、これらに限定されない、病原性および非病原性の原核生物のような適する細菌に対する抗体を含む、原核抗原に対する抗体はまた、有用である。

【0138】

いくつかの局面において、抗体は、ウイルス感染に向けられる；これらのウイルスには、オルソミクソウイルス (orthomyxoviruse) (例えば、インフルエンザウイルス)、パラミキソウイルス (paramyxoviruse) (例えば、呼吸器多核体ウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス)、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、トガウイルス (例えば、風疹ウイルス (rubella virus))、パルボウイルス、ポックスウイルス (例えば、痘瘡ウイルス (variola virus)、ワクシニアウイルス)、エンテロウイルス (例えば、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス)、肝炎ウイルス (A、B および C を含む)、ヘルペスウイルス (例えば、単純ヘルペスウイルス、水痘瘡ウイルス

10

20

30

40

50

(varicella zoster virus)、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス)、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、ハンタウイルス、アレナウイルス、ラブドウイルス(例えば、狂犬病ウイルス(rabies virus))、レトロウイルス(HIV、HTLV IおよびIIを含む)、パポウイルス(例えば、パピローマウイルス)、ポリオーマウイルス、ならびにピコルナウイルスなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0139】

最適化IgG変異体特性

本発明はまた、様々な治療的に関連のある特性について最適化されるIgG変異体を提供する。1個以上の最適化特性を示すように組み込まれるまたは予測されるIgG変異体は、本明細書中、“最適化IgG変異体”と称される。最適化され得る最も好ましい特性には、FcRnに対する増大または減少した親和性、および増加または減少したインビボ半減期が含まれるが、これらに限定されない。適する態様には、低pH、例えばエンドソームと関係するpH、例えばpH6.0にてFcRnに対して増加した結合親和性を示すが、一方、抗pH、例えば7.4にて対応する増加した結合親和性を示さず、エンドソーム中により取り込まれ得るが、放出速度は通常通りである抗体が含まれる。同様に、修飾されたFcRn結合を有するこれらの抗体は、所望によりU.S.S. No. 11/174,287、11/124,640、10/822,231、10/672,280、10/379,392、および出願番号第_____号を有する2005年10月21日出願の発明の名称「IgG Immunoglobulin variants with optimized effector function」の特許出願に概略を説明する通り、修飾されたFcγR結合のような他の所望の特性を有し得る。すなわち、最適化特性にはまた、FcγRに対する増加または減少した親和性が含まれるが、それに限定されない。1つの任意の態様において、IgG変異体は、FcRn結合プロフィールに加えて、ヒト活性化FcγR、好ましくはFcγRIIIaに対する増加した親和性を有するように最適化される。さらに他の任意の別の態様において、IgG変異体は、ヒト阻害性受容体FcγRIIbに対して減少した親和性を有するように最適化される。すなわち、特定の態様は、FcRnに対する増加した結合、およびFcγRIIIaに対する増加した結合を示す抗体の使用を包含する。他の態様は、FcRnに対する増加した結合、およびFcγRIIIaに対する増加した結合を示す抗体の使用を利用する。これらの態様は、ヒトにおける増大した治療特性、例えば増大したエフェクター機能およびより大きな抗癌効果を有するIgGポリペプチドを提供することが予想される。別の態様において、IgG変異体は、FcRnに対する増加または減少した親和性、およびFcγRI、FcγRIIIa、FcγRIIb、FcγRIIIc、FcγRIIIa、およびFcγRIIIbを含むが、これらに限定されないヒトFcγR(それらのアレル変異体を含む)に対する増加または減少した親和性を有するように最適化される。これらの態様は、ヒトにおける増強された治療特性、例えば増加した血清半減期および減少したエフェクター機能を有するIgGポリペプチドを提供することが予定される。他の態様において、IgG変異体は、FcRnに対して増大した親和性、および1個以上のFcγRに対して増大した親和性を提供するが、1個以上の他のFcγRに対して減少した親和性を提供する。例えば、IgG変異体は、FcRnおよびFcγRIIIaに対して増大した結合を有し得るが、FcγRIIbに対して減少した結合を有し得る。あるいは、IgG変異体は、FcRnおよびFcγRに対して減少した結合を有し得る。他の態様において、IgG変異体は、FcRnに対して減少した親和性、およびFcγRIIbに対して増大した親和性を有し得るが、1個以上の活性化FcγRに対して減少した親和性を有し得る。さらに他の態様において、IgG変異体は、増加した血清半減期および減少したエフェクター機能を有し得る。

【0140】

好ましい態様は、ヒトFcRnおよびFcγRに対する結合の最適化を含むが、別の態様において、IgG変異体は、げっ歯動物および非ヒト霊長類を含むが、これらに限定されない非ヒト生物由来のFcRnおよびFcγRに対して増強または減少した親和性を有する。非ヒトFcRnに対する結合を最適化されるIgG変異体は、実験で使用され得る

10

20

30

40

50

。例えば、マウスモデルは、効果、毒性、および特定の薬剤候補についての薬物動態のような特性の検査を可能にする様々な疾患に利用可能である。当技術分野で公知の通り、異種移植と称される過程であるが、癌細胞を、ヒト癌を模倣するためにマウスに移植するかまたは注入し得る。FcRnに対して最適化されるIgG変異体を含むIgG変異体の試験は、タンパク質の除去特性、その除去機序などに関する有益な情報を提供し得る。IgG変異体はまた、グリコシル化形態の機能性および／または溶解特性を増大するために最適化され得る。Fcリガンドには、FcRn、FcγRs、C1q、ならびにプロテインAおよびGが含まれるが、これらに限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギまたはサルを含むが、これらに限定されない何れかの起源、好ましくはヒト由来であり得る。別の好ましい態様において、IgG変異体は、親IgG変異体のグリコシル化形態よりも安定かつ／または溶解性になるように最適化される。

10

【0141】

IgG変異体は、補体タンパク質、およびFc受容体相同体(FcRH)を含むが、これらに限定されないFcRnおよびFcγR以外のFcリガンドと相互作用するように調節される修飾を含み得る。FcRHには、FcRH1、FcRH2、FcRH3、FcRH4、FcRH5、およびFcRH6が含まれるが、これらに限定されない(Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190:123-136、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0142】

好ましくは、IgG変異体のFcリガンド特異性は、その治療的有用性を決定し得る。治療目的のための特定のIgG変異体の有用性は、標的抗原のエピトープまたは形態ならびに処置される疾患または適応症に依存して変わる。標的および適応症のほとんどについて、増強したFcRn結合は、増強したFcRn結合が、血清半減期の増加をもたらし得るために、好ましいであろう。より長時間の血清半減期は、治療剤のより低頻度の投与またはより低い投与量を可能にする。このことは、治療剤が、反復投与が必要とされる適応症に応じて与えられるとき、特に好ましい。いくつかの標的および適応症に関して、減少したFcRn親和性は、好ましいであろう。これは、増加した排除および減少した血清半減期を有する変異体Fcが、例えば造影剤または放射線治療剤として用いられるFcポリペプチドにおいて、望ましいとき、特に好ましいであろう。

20

【0143】

使用され得るIgG変異体には、増大した活性化FcγRおよび／または抑制性FcγRに対する減少した親和性を有するFcRnに対する増大した親和性を提供するIgG変異体が含まれる。いくつかの標的および適応症について、異なる活性化FcγRに対する異なる選択性を提供するIgG変異体を利用することは、さらに効果的であり得る；例えば、いくつかの場合に、FcγRIIaおよびFcγRIIIaに対する増加した結合は、望ましいかもしれないが、FcγRIには望ましくなく、一方、他の場合に、FcγRIIIaのみに対する増加した結合は、好ましいであろう。任意の標的および適応症について、FcRn結合を変化し、FcγRにより仲介されるおよび補体により仲介されるエフェクター機能の両方を増強するIgG変異体を利用することは、好ましいかもしれないが、一方、他の場合について、FcRn結合または血清半減期、およびFcγRにより仲介されるまたは補体により仲介されるエフェクター機能のどちらか、を増大するIgG変異体を利用するのが都合よいかもしれない。いくつかの標的または癌適応症について、1個以上のエフェクター機能を、例えばC1q、1個以上のFcγR、FcRn、または1個以上の他のFcリガンドへの結合をブロックアウトすることにより減少または改変することは、都合よいかもしれない。他の標的および適応症について、活性化FcγRへのWTレベル、減少または除去された結合であるが、阻害性FcγRIIbへの増大した結合を提供するIgG変異体を利用することが好ましいかもしれない。このことは、例えば、IgG変異体の目的が、炎症疾患または自己免疫性疾患を阻害すること、またはいくつかの方法で免疫を調節することであるとき、特に有用であり得る。自己免疫性疾患が一般的に長期にわたり、処置が反復投与で行われるため、増加した半減期および増加したFcRn結

30

40

50

合を有する F c 変異体でのその処置は、特に好ましい。

【0144】

修飾は、I g G 安定性、溶解性、機能性、または臨床用途を改善するために行われ得る。好ましい態様において、I g G 変異体は、ヒトにおける免疫原性を減少するための修飾を含み得る。最も好ましい態様において、I g G 変異体の免疫原性を、U S S N 1 1 / 0 0 4, 5 9 0 (参照によりその全体が本明細書中に包含される) に記載の方法を用いて減少させる。別の態様において、I g G 変異体は、ヒト化される (Clark, 2000, Immunol Today 21:397-402、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0145】

I g G 変異体は、免疫原性を減少する修飾を含み得る。免疫原性を減少する修飾には、親配列から M H C タンパク質に誘導された処理ペプチドの結合を減少する修飾が含まれ得る。例えば、アミノ酸修飾は、どんな一般的な M H C アレルにも高親和性で結合することが予測される免疫エピトープがないか、またはそれが最小数となるように、作製されるだろう。タンパク質配列中の M H C 結合エピトープを同定するいくつかの方法が、当技術分野で公知であり、I g G 変異体中のエピトープを数えるために用い得る。例えば、W O 9 8 / 5 2 9 7 6 ; W O 0 2 / 0 7 9 2 3 2 ; W O 0 0 / 3 3 1 7 ; U S S N 0 9 / 9 0 3 , 3 7 8 ; U S S N 1 0 / 0 3 9 , 1 7 0 ; U S S N 6 0 / 2 2 2 , 6 9 7 ; U S S N 1 0 / 7 5 4 , 2 9 6 ; P C T W O 0 1 / 2 1 8 2 3 ; および、P C T W O 0 2 / 0 0 1 6 5 ; Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: 942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561; W O 98/5924 4; W O 02/069232; W O 02/77187; Marshall et al., 1995, J. Immunol. 154: 5927-5933; and Hammer et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 2353-2358 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される) を参照のこと。配列に基づく情報は、所定のペプチド-M H C 相互作用の結合スコアを決定するために用い得る (例えば、Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: p942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561 を参照のこと、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

【0146】

I g G 変異体の作製

本発明の変異体を、様々な手段で設計することができる。本明細書に記載の通り、変異とは、挿入、欠失、置換、他の修飾、またはこれらの組み合わせおよび他の変化であり得る。本発明の特定の新しい態様は、F c ポリペプチドの F c リガンドへの結合を改善または減少する挿入または欠失の設計である。本明細書に記載の通り、挿入または欠失は、F c ポリペプチドの F c R n に対する親和性を増加または減少するように作製され得る。挿入および欠失は、合理的な方法により、または無作為または半無作為のライブラリー作製またはスクリーニングのような、使用または無作為要素を含む方法により、設計され得る。別の態様において、置換とは、F c ポリペプチドの F c R n への親和性を増加または減少することを開示する。

【0147】

挿入および欠失

変異体 F c ポリペプチドを、F c ポリペプチド中の位置で親アミノ酸の代わりに変異体アミノ酸を置換することにより作製することができる。F c ポリペプチド中の 1 個以上のアミノ酸を変異体アミノ酸に置換することにより、その位置で側鎖は変えられる。最も有用な置換は、F c 側鎖を変えることにより F c 特性を修飾する。置換された側鎖は、F c 機能または特性と関係する F c 結合パートナーと直接的または間接的に相互作用し得る。少なくとも 1 個の置換は、親 F c ポリペプチドの 1 個以上の側鎖の共有構造を変える。

【0148】

あるいは、変異体 F c ポリペプチドを、親 F c ポリペプチドの骨格の共有構造を変えることにより作製することができる。タンパク質中の骨格原子は、ペプチド窒素、アルファ炭素、カルボニルまたはペプチド炭素およびカルボニル酸素である。骨格の共有構造の変

10

20

30

40

50

化は、F c ポリペプチドの特性を変えるさらなる方法を提供する。F c 骨格の共有構造は、骨格中への原子の付加、例えば1個以上のアミノ酸の挿入により、または骨格からの原子の除去、例えば1個以上のアミノ酸の削除により、変えられ得る。骨格の共有構造はまた、骨格の個々の原子を他の原子に変えることにより変えられ得る (Deechongkit et al., J Am Chem Soc. 2004. 126(51):16762-71、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。当技術分野で公知かつ本明細書に説明する通り、F c ポリペプチドのアミノ酸の挿入または欠失は、F c ポリペプチドをコードするDNA中の対応するヌクレオチドを挿入または欠失することにより行うことができる。あるいは、当技術分野で公知の通り、アミノ酸の挿入または欠失を、F c ポリペプチドの合成中に行うことができる。

【0149】

1個以上の結合パートナー (例えば、F c ガンマR、F c R n、C1q) を有するF c ポリペプチドの相互作用を変えるアミノ酸の挿入または欠失の設計は、F c ポリペプチドとその結合パートナーの複合体の構造を考慮することにより行うことができる。あまり好ましくない態様において、設計を、F c ポリペプチドの構造、および結合パートナーの結合に關与するF c 領域についての情報を考慮することにより行うことができる。この情報は、変異誘発実験、ファージ提示実験、相同性比較、コンピューターモデリングまたは他の手段により得られる。

【0150】

アミノ酸配列中、F c 結合相互作用に影響するが、F c ポリペプチドの全体構造、安定性、発現または使用に影響しない挿入または欠失に好ましい位置は、F c /F c -結合パートナー相互作用に關与するループ中である。F c ポリペプチドへのF c R n結合を改変するために、244-257位、279-284位、307-317位、383-390位、および428-435位が、挿入または欠失のループ位置として好ましい (KabarのEU indexによる番号、Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。F c ポリペプチドへのF c ガンマ受容体結合を改変するために、229-239位、266-273位、294-299位、および324-331位が、挿入または欠失のループ位置として好ましい (KabarのEU indexによる番号、PDB code 1E4K.pdb S ondermann et al. Nature. 2000 406:267、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ループは、アルファヘリックスまたはベータシート構造に關与しないポリペプチドの領域である。ループ位置は、アルファヘリックスまたはベータ構造のどちらでもない位置である (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, Chapter 1 pp2-67、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ループ位置は、骨格原子が、典型的に、アルファヘリックスおよびベータシートの骨格原子と比較して、よりフレキシブルまたは水素結合にあまり關与しないために、好ましい。それ故に、1個以上のアミノ酸の挿入または欠失によるループの伸張または短縮は、安定性、発現または他の問題を含む、F c ポリペプチドの大きな破壊的変化をもたらす可能性は少ない。

【0151】

挿入および欠失は、ポリペプチドの長さを変えるために用いることができる。例えば、ループ領域中、ループの長さの変化は、ループの変化したフレキシビリティおよび立体配置エントロピーをもたらす。ループ中の挿入は、一般的に、ループの立体配置エントロピーを増加し得、それは、Boltzman定数と可能性のある立体配置の数の自然対数を乗じて定義され得る (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, pp78、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。少なくとも1個のアミノ酸のポリペプチドへの挿入により、ポリペプチドが利用可能な立体配置の全体数は増加する。これらのさらなる立体配置は、F c ポリペプチドが、F c 結合タンパク質を結合するさらなる立体構造の1つを利用し得るため、好ましいF c /F c -結合パートナー相互作用を形成するのに有益であり得る。この場合において、挿入は、F c /F c -結合パートナー相互作用の強化をもたらす。さらなる立体配置

が、結合表面に用いられないとき、挿入は、該さらなる立体配置が、結合に適する立体配置と競合するかもしれないため、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の弱化をもたらし得る。同様に、ポリペプチド断片の欠失はまた、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の強化または弱化のどちらかをもたらし得る。骨格構造の数の可能性を減少する断片の欠失が、結合に適する立体配置を排除するとき、欠失は、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の弱化をもたらし得る。欠失が、結合に適する立体配置を排除しないとき、欠失は、該欠失が、結合に適する立体配置と競合する立体配置を排除し得るため、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の強化をもたらし得る。

【0152】

挿入および欠失を、Fcポリペプチドにおけるアミノ酸の位置および方向の改変に用いることができる。挿入および欠失が、骨格の共有構造中に変化をもたらすため、それらは、必然的に骨格原子の位置の変化をもたらす。図7は、3つの異なる骨格中、いくつかのループ断片での骨格位置（L1からL4と表示する）を比較する。参照骨格構造は、4つのループ断片を含むが、一方、欠失骨格は、断片L1およびその前の付加的断片、すなわち、N末端から断片L1までを含む挿入断片を欠く。欠失および挿入は、挿入または欠失部位の近くで骨格構造中に最大の変化をもたらす。ループのN末端近くの断片、例えば断片L1の欠失によりループが短縮され、残りの断片がループN末端近くにその位置を移動する。これは、L2断片をL1断片の従前の位置方向に、かつループN末端方向に移動させる効果を有する。このL2断片のL1断片方向への位置変化は、Fc/Fc-結合パートナー複合体の結合を強化することができ、L2中に位置するアミノ酸または複数のアミノ酸が、L1中に位置するとき、Fc-結合パートナーと好ましい相互作用を作製することを示唆する先の情報があるとき、好ましい。例えば、L2が、アラニンおよびチロシンを含み、アラニンおよびチロシンの2個のL1アミノ酸の置換が、既に増加した結合を有するFc変異体をもたらすとき、L1の欠失は、Fc-結合パートナーに対して増加した親和性を有するFc変異体を作製し得る。

【0153】

同様に、ループのN末端側でのFcポリペプチドへのポリペプチド断片の挿入は、ループのC末端側へのループ断片の位置の移動をもたらす。図7において、その前への、すなわち、N末端から断片L1までへの1個以上のアミノ酸の挿入は、ループのC末端方向へのL1断片の移動を含む骨格立体配置を変化させる。このタイプの挿入は、該挿入が、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の強化をもたらし得るため、断片L1中に位置するアミノ酸が、L2位置に位置するとき、好ましい相互作用を作製することが公知であるとき、好ましい。Fc/Fc-結合パートナー相互作用の弱化が望ましいとき、該挿入は、新しい位置への好ましくないアミノ酸の移動に用いることができる。前記挿入、欠失および参照断片（図7中、L1からL4）は、Fcポリペプチド中、1個または2個以上のアミノ酸であり得る。

【0154】

あるいは、挿入または欠失は、ループのN末端での挿入または欠失と同様の方法を、ループのC末端に用いることができる。ループC末端への挿入は、ループN末端方向への、N末端の挿入位置の移動を導くかもしれない。ループC末端での欠失は、ループC末端方向への、N末端の欠失位置の移動を導くかもしれない。ループのN末端またはC末端での挿入または欠失の使用の選択は、ループ中に位置するアミノ酸、望まれる増加または減少したFc/Fc-結合パートナー親和性、および望ましい位置移動に基づく。

【0155】

挿入または欠失は、ループ、アルファヘリックス、およびベータシート領域を含む、Fcポリペプチドのいずれかの領域で用いることができる。挿入および欠失に好ましい位置には、アルファヘリックスまたはベータシート領域ではないループ領域が含まれる。ループは、それらが、一般的に、アルファヘリックスまたはベータシートよりも骨格において変更を受けるため、好ましい。タンパク質/タンパク質相互作用の強化をもたらす挿入または欠失に特に好ましい位置は、ループのN末端またはC末端である。ループ側鎖が、F

c / F c ー結合パートナー相互作用に關与するとき、末端での挿入または欠失は、結合相互作用における大きな不利益な変化をもたらしにくい。ループの正確な中心内の欠失は、F c / F c ー結合パートナー結合部分における重要な残基の除去をもたらしやすく、ループの正確な中心内の挿入は、F c / F c ー結合パートナー結合部分における好ましくない相互作用を作製しやすい。欠失または挿入される残基の数は、望まれる骨格変化のサイズにより決定され得、例えば、15個未満の残基の挿入または欠失が好ましく、10個未満の残基の挿入または欠失がより好ましく、5個未満の残基の挿入または欠失が最も好ましい。

【0156】

F c 欠失変異体の位置およびサイズが設計されると、ポリペプチド配列全体が、完全に決定され、ポリペプチドが、当技術分野で公知の方法により構築され得る。

10

【0157】

しかしながら、F c 挿入変異体は、挿入すべき少なくとも1個のアミノ酸の配列を設計するさらなる段階を有する。Ser、Thr、Asn、Gln、Ala、Gly、Hisを含む極性残基の挿入は、F c ポリペプチド中で露出されると予期される位置で好ましい。Ser、Thr、およびAlaを含むより小さいアミノ酸は、小さいサイズが、F c / F c ー結合パートナー相互作用の立体的干渉をもたらしにくいため好ましい。SerおよびThrはまた、F c ー結合パートナー上の原子と水素結合するための能力を有する。

【0158】

挿入はまた、挿入されたポリペプチドが、F c / F c ー結合パートナー結合の強化が望ましいとき、望まれ得るため、F c ー結合パートナーと好ましい相互作用を作製するように設計され得る、別のフレキシビリティを有する。骨格挿入の長さは、挿入すべき単純な一般的配列を有する変異体骨格をモデル化することにより決定することができる。例えば、異なる長さのポリセリン、ポリグリシンまたはポリアラニン挿入が、構築およびモデル化され得る。モデル化は、挿入を含む相同体の公知の三次元構造に基づく相同性モデリングを含む様々な方法により、およびMODEL L E R (M.A. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000) およびR O S E T T A (Kuhlman et al.(2003). Science 302, 1364-8) (両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を含むコンピューターによるモデリングにより行われ得る。典型的に、様々な骨格構造は、初めに作製され、最終的な骨格構造は、側鎖の同一性が確立された後に決定され得る。側鎖は、P D A (登録商標) アルゴリズム (U S 6, 1 8 8, 9 6 5 ; 6, 2 6 9, 3 1 2 ; 6, 4 0 3, 3 1 2 ; 6, 8 0 1, 8 6 1 ; 6, 8 0 4, 6 1 1 ; 6, 7 9 2, 3 5 6, 6, 9 5 0, 7 5 4、およびU S S N 0 9 / 7 8 2, 0 0 4 ; 0 9 / 9 2 7, 7 9 0 ; 1 0 / 1 0 1, 4 9 9 ; 1 0 / 6 6 6, 3 0 7 ; 1 0 / 6 6 6 3 1 1 ; 1 0 / 2 1 8, 1 0 2、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)により設計され得る。

20

30

【0159】

挿入および欠失は、本明細書に記載の方法によりF c ポリペプチドとは別の何れかのポリペプチド中に設計することができる。例えば、TNFスーパーファミリーメンバーであるA P R I L中の挿入または欠失は、その三次元構造を用いて設計することができる (P D B code 1XU1.pdb, Hymowitz, et al.(2005) J. Biol. Chem. 280:7218、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。挿入または欠失は、その受容体であるT A C IへのA P R I L結合を増加するように設計され得る。挿入または欠失部位に好ましいループ残基は、残基Ser118-Val124、Asp164-Phe167、Pro192-Ala198、Pro221-Lys226である。これらのループは、A P R I L / T A C I複合体中のT A C Iと相互作用し、結合を仲介する。

40

【0160】

変異体を含むポリペプチド

I g G変異体は、ヒトI g G配列に基づいてよく、故に、ヒトI g G配列は、他の配列が比較される、他の生物、例えばげっ歯動物および霊長類由来の配列を含むが、それ

50

らに限定されない“ベース”配列として用いられる。I g G変異体はまた、I g A、I g E、I g D、I g Mなどのような他の免疫グロブリンクラス由来の配列を含み得る。I g G変異体が、ある親I g Gに関して作製されるが、該変異体は、別の、第二の親I g Gに関して作製または“転換”され得ることが考慮される。これは、一般的に、I g Gの配列間の配列または構造同一性に基づき、第一および第二のI g G間の“等価”または“対応する”残基および置換基を決定することにより行われる。相同性を確立するために、本明細書に概説する第一のI g Gのアミノ酸配列を、第二のI g Gの配列と直接比較する。アライメントを維持するために必要な挿入および欠失を考慮し（すなわち、任意の欠失および挿入による保存残基の除去を避けて）、当技術分野で公知の1個以上の相同性アライメントプログラムを用いて（例えば、種間で保存された残基を用いて）配列をアライメント後、第一のI g G変異体の初めの配列において特定のアミノ酸と等価の残基が定義される。保存残基のアライメントは、好ましくはかかる残基の100%を保存すべきである。しかしながら、保存残基の75%以上またはわずか50%程度のアライメントも、等価残基を定義するのに適する。等価残基はまた、構造が決定されているI g Gの三次構造レベルで、第一および第二I g G間の構造的相同性を決定することにより定義され得る。この場合に、等価残基は、親または前駆体の特定のアミノ酸残基の2個以上の主鎖原子（NとN、CAとCA、CとCおよびOとO）の原子座標が、アライメント後、0.13 nm以内、好ましくは0.1 nmであると定義される。アライメントは、ベストモデルが、タンパク質の非水素タンパク質原子の原子座標の最大重複を与えるような方向および位置付けされた後、得られる。等価または対応する残基をどのように決定するかに関わらず、かつI g Gが作製される親I g Gの同一性に関わらず、伝えられるべきであるとされていることは、見出されたI g G変異体を、重要な配列またはI g G変異体と構造的相同性を有する何れかの第二の親I g Gに改変することができることである。故に、例えば、変異体抗体を、上記の方法または等価残基を決定するための他の方法を用いることにより作製するとき（ここで、親抗体はヒトI g G1である。）、変異体抗体は、異なる抗原と結合する別のI g G1親抗体、ヒトI g G2親抗体、ヒトI g A親抗体、マウスI g G2aまたはI g G2b親抗体などに改変され得る。さらに、上記の通り、親I g G変異体においては、I g G変異体を他の親I g Gに転換する能力に影響しない。

【0161】

I g G変異体を作製、産生およびスクリーニングするための方法を提供する。記載の方法は、何れかの特定の用途または操作理論にとらわれることを意味しない。むしろ、提供される方法は、一般的に、1個以上のI g G変異体が、最適化されたエフェクター機能を有するI g G変異体を実験的に得るために、作製、産生、およびスクリーニングされ得ることを説明することを意図する。様々な方法が、抗体の設計、産生、および試験、ならびにタンパク質変異体について、US SN 10/754, 296、およびUS SN 10/672, 280（両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される）に記載される。

【0162】

様々なタンパク質作製方法が、最適化したエフェクター機能を有するI g G変異体を設計するために用いられ得る。1つの態様において、構造に基づく作製方法を用いることができ、ここで利用可能な構造情報を、置換、挿入または欠失を誘導するために用いる。好ましい態様において、コンピューターを用いたスクリーニング法を用いることができ、ここで置換を、コンピューターによる計算においてそれらのエネルギー的適合に基づき設計する。例えばUS SN 10/754, 296およびUS SN 10/672, 280、ならびに本明細書中に引用される文献（全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される）を参照のこと。

【0163】

配列のアライメントを、表示の位置での置換を誘導するために用いることができる。当業者は、配列情報の使用が、タンパク質構造に有害な可能性のある置換の導入を阻止し得ることを理解するだろう。配列の源は、様々であってよく、Kabatデータベース（Northwe

stern University) ; Johnson & Wu, 2001, Nucleic Acids Res. 29:205-206 ; Johnson & Wu, 2000, Nucleic Acids Res. 28:214-218) 、 I M G T データベース (I M G T 、 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 V B A S E (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される) を含むが、これらに限定されない、1 個以上の公知のデータベースを含む。抗体配列情報を、哺乳動物を含むが、これに限定されない何れかの生物由来の、生殖細胞系配列または天然に生じる抗体の配列の配列アライメントから得る、蓄積する、および／または作製することができる。当業者は、ヒトまたは実質的にヒトである配列の使用が、ヒトに投与するとき、あまり免疫原性ではないという利点をさらに有し得ることを理解するだろう。より一般的な核酸またはタンパク質データベース、すなわち、特に抗体というわけではない他のデータベースには、SwissProt、GenBank、Entrez、および EMBL スクレオチド配列データベースが含まれるが、これらに限定されない。整列配列には、V H、V L、C H、および／または C L 配列が含まれ得る。当技術分野で公知の多数の配列に基づくアライメントプログラムおよび方法が存在し、これらは全て、配列アライメントの作製における使用できる。

10

【0164】

あるいは、無作為的または半無作為的変異誘導法を、所望の位置にアミノ酸修飾を作製するために用いることができる。これらの場合において、位置は無作為に選択され、またはアミノ酸変化は、単純な法則を用いて作製される。例えば、全ての残基を、アラニンに変化することができ、それはアラニンスクリーニングと称される。かかる方法は、より高レベルの配列多様性をスクリーニングする選択方法を用いる、より高度な工学的な方法と併用され得る。当技術分野で公知の通り、例えば、下記に記載のファージ提示法、リボソーム提示法、細胞表面提示法などのような提示技術を含む、かかる方法に使用することができる多様な選択技術が存在する。

20

【0165】

I g G 変異体の作製およびスクリーニング方法は、当技術分野で公知である。抗体分子生物学、発現、精製、およびスクリーニングのための一般的方法は、Antibody Engineering、Duebel & Kontermann 編集、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 に記載される。また、U S S N 1 0 / 7 5 4 , 2 9 6 ; U S S N 1 0 / 6 7 2 , 2 8 0 ; および、U S S N 1 0 / 8 2 2 , 2 3 1 ; ならびに、1 1 / 1 2 4 , 6 2 0 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される) に記載の方法を参照のこと。

30

【0166】

本発明の好ましい変異体には、図 8 に見られるものが含まれる。あるいは、本発明の好ましい変異体には、図 9 に見られるものが含まれる。さらに、あるいは、本発明の好ましい変異体には、図 10 に見られるものが含まれる。本発明の特に好ましい変異体には、G 3 8 5 H および N 4 3 4 Y が含まれる。本発明の最も好ましい変異体には、2 5 7 C、2 5 7 M、2 5 7 L、2 5 7 N、2 5 7 Y、2 7 9 Q、2 7 9 Y、3 0 8 F および 3 0 8 Y が含まれる。

40

【0167】

I g G 変異体の作製

I g G 変異体を、当技術分野で公知の何れかの方法により作製することができる。1 つの態様において、I g G 変異体配列を、メンバー配列をコードし、それ故に、要すれば宿主細胞中にクローニングされ、発現され、そして分析され得る核酸を作製するために用いる。これらの実施を、公知の方法、および 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) (両方とも、参照により

50

その全体が本明細書中に包含される)に記載の、使用され得る様々な方法を用いて行う。I g G変異体をコードする核酸を、タンパク質を発現するために、発現ベクター中に挿入することができる。発現ベクターは、典型的に、作動可能に連結した、すなわち、機能的に関係して挿入されたタンパク質を、制御または調節配列、選択可能マーカー、何れかの融合パートナー、および／またはさらなる要素と共に含む。I g G変異体は、タンパク質の発現を誘導または引き起こすのに適当な条件下で、I g G変異体をコードする核酸を含む、核酸、好ましくは発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養することにより作製され得る。哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞および酵母を含むが、これらに限定されない多様な適当な宿主細胞を、用いることができる。例えば、使用され得る多様な細胞系は、A T C C細胞系カタログ(American Type Culture Collectionにより利用可能、参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載される。宿主細胞中に外来の核酸を導入する方法は、当技術分野で公知であり、用いる宿主細胞により異なり得る。

10

【0168】

好ましい態様において、I g G変異体は、発現後に精製および単離される。抗体は、当業者に公知の多様な方法で単離または精製され得る。標準的精製方法には、クロマトグラフ法、電気泳動法、免疫学的方法、沈殿法、透析法、ろ過法、濃縮法およびクロマト分画技術が含まれる。当技術分野で公知の通り、様々な天然タンパク質、例えば細菌タンパク質A、G、およびLが抗体に結合し、これらのタンパク質は、精製で使用され得る。しばしば、精製は、特定の融合パートナーにより可能であり得る。例えば、タンパク質を、G S T融合が用いられるときグルタチオン樹脂、H i s タグが用いられるときN i ⁺2親和性クロマトグラフィー、またはフラグタグが用いられるとき固定化抗フラグ抗体を用いて精製することができる。適する精製技術における一般的ガイダンスについては、Antibody Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994(参照によりその全体が本明細書中に包含される)を参照のこと。

20

【0169】

I g G変異体のスクリーニング

I g G変異体を、インビトロ分析、インビボおよび細胞に基づく分析、および選択技術を用いる方法を含むが、これらに限定されない多様な方法を用いてスクリーニングすることができる。自動化高性能スクリーニング技術を、スクリーニング方法に利用することができる。スクリーニングには、融合パートナーまたは標識、例えば免疫標識、同位体標識、または蛍光もしくは比色色素のような小分子標識の使用を用いることができる。

30

【0170】

好ましい態様において、I g G変異体の機能的および／または生物物理的特徴を、インビトロ分析においてスクリーニングする。好ましい態様において、タンパク質を、機能性、例えばその反応を触媒する能力またはその標的に対するその結合親和性についてスクリーニングする。結合分析を、F R E T(蛍光共鳴エネルギー移動法)およびB R E T(生物発光共鳴エネルギー移動法)に基づく分析、A l p h a S c r e e n ^{T M}(増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法)、シンチレーション近接分析、E L I S A(酵素免疫測定法)、S P R(表面プラズモン共鳴、B I A C O R E(登録商標)としても公知)、等温滴定熱量計、示差走査熱量計、ゲル電気泳動法、およびゲルろ過法を含むクロマトグラフィー法を含むが、これらに限定されない当技術分野で公知の様々な方法を用いて行うことができる。これらおよび他の方法は、いくつかの融合パートナーまたは標識を利用し得る。分析には、発色標識、蛍光標識、発光標識、または同位体標識を含むが、これらに限定されない多様な検出方法を用いることができる。タンパク質の生物物理的特徴、例えば安定性および溶解性は、当技術分野で公知の様々な方法を用いてスクリーニングすることができる。タンパク質の安定性を、折りたたみ状態と非折りたたみ状態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、I g G変異体は、化学的変性剤、熱、またはp Hを用いて非折りたたみ状態にでき、この遷移を、円偏光二色性分光法、蛍光分光法、吸光度分光法、N M R分光法、熱量測定法、およびタンパク質分解法を含むが、これらに限定されない方法を用いて観察することができる。当業者に認められ得る通り、

40

50

折りたたみおよび非折りたたみ遷移の動力学的パラメーターを、これらおよび他の技術を用いて観察することもできる。I g G変異体の溶解性および全体的な構造的完全性を、当技術分野で公知の様々な方法を用いて定量的または定性的に決定することができる。I g G変異体の生物物理的性質を特徴付けるための使用され得る方法には、ゲル電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィーのようなクロマトグラフィー、質量分析法、紫外吸光度分光法、蛍光分光法、円偏光二色性分光法、等温滴定熱量計、示差走査熱量計、分析的超遠心分離法、動的光散乱、タンパク質分解法、および架橋法、濁度測定法、フィルター遅延分析 (filter retardation assay)、免疫分析、蛍光色素結合分析、タンパク質染色分析、顕微鏡法、および E L I S A または他の結合分析による会合体の検出が含まれる。X線結晶学的解析および N M R 分光法を用いる構造分析も、使用され得る。

10

【0171】

当技術分野で公知の通り、スクリーニング法の一部には、ライブラリーの好ましいメンバーを選択する方法が含まれる。該方法は、本明細書中、“選択方法”と称され、これらの方法は、I g G変異体のスクリーニングに使用される。タンパク質ライブラリーを、選択方法を用いてスクリーニングするとき、好ましい、すなわちいくつかの選択基準を満たすライブラリーのメンバーのみが、増殖され、単離され、および／または観察される。認められ得る通り、最も適合する変異体のみが観察されるため、かかる方法は、ライブラリーメンバーの個々の適合性を分析する方法によりスクリーニング可能なものより大きなライブラリーのスクリーニングを可能にする。選択は、何らかの方法、技術、または、共有結合もしくは非共有結合する融合パートナー（その遺伝子型を有するタンパク質の表現型、すなわち、それをコードする核酸を有するタンパク質の機能）により可能である。例えば、選択方法としてのファージ提示法の使用は、ライブラリーメンバーと遺伝子 I I I タンパク質の融合により可能である。この方法において、いくつかの基準、例えばタンパク質の標的との結合親和性を満たす、I g G変異体の選択または単離はまた、それをコードする核酸を選択または単離する。単離すると、その後、F c変異体をコードする遺伝子または複数の遺伝子を増幅することができる。パニング (panning) とも称されるこの単離および増幅方法を反復し、ライブラリー中での好ましい I g G変異体の富化を可能にし得る。付着した核酸の核酸配列決定は、最終的に、遺伝子の同定を可能にする。

20

【0172】

タンパク質ライブラリーのスクリーニングにおいて使用され得る様々な選択方法が、当技術分野で公知である。これらには、ファージ提示法 (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) およびファージ感染の選択 (Malmberg et al., 1997, J Mol Biol 273:544-551)、感染性ファージの選択 (Krebber et al., 1997, J Mol Biol 268:619-630)、および遅延感染性パニング法 (Benhar et al., 2000, J Mol Biol 301:893-904) のようなその誘導法、細菌上 (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)、酵母上 (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上 (Whitehorn et al., 1995, Bio/technology 13:1215-1219) の提示のような細胞表面提示法 (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399)、ならびにポリソーム提示 (Mattheakis et al., 1994, Proc Natl Acad Sci U S A 91:9022-9026)、リボソーム提示 (Hanes et al., 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942)、m R N A 提示 (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提示システム (Zhou et al., 2002, J Am Chem Soc 124, 538-543) のようなインビトロ提示技術 (Amstutz et al., 2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405) が含まれるが、これらに限定されない。本段落中の全ての参考文献は、参照によりその全体が本

30

40

50

明細書中に包含される。

【0173】

使用され得る他の選択方法には、ペリプラズム発現およびサイトメトリースクリーニング (Chen et al., 2001, Nat Biotechnol 19:537-542、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、タンパク質断片相補性分析 (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletier et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)、および選択法 (Visintin et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728、参照によりその全体が本明細書中に包含される) にて用いる酵母ツーハイブリッドスクリーニング (Felds & Song, 1989, Nature 340:245-246、参照によりその全体が本明細書中に包含される) が含まれるが、それらに限定されないインビボ方法のような、提示に依存しない方法が含まれる。別の態様において、選択は、発現ベクターに特異的な配列に結合する融合パートナーにより可能であり、それ故に、融合パートナーと共有または非共有結合し、Fc 変異体ライブラリーメンバーとそれらをコードする核酸とを関連付ける。例えば、US SN 09/642, 574; US SN 10/080, 376; US SN 09/792, 630; US SN 10/023, 208; US SN 09/792, 626; US SN 10/082, 671; US SN 09/953, 351; US SN 10/097, 100; US SN 60/366, 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 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される) は、そのような融合パートナー および使用され得る技術を記載する。別の態様において、インビボ選択は、タンパク質の発現が、いくらかの増殖、複製、または細胞に有利な生存を与えるとき、利用できる。

【0174】

“ 定向進化 (directed evolution) ” 法と称される選択方法の一部は、時折新規の変異の挿入を含む、選択中の好ましい配列のメイティング (mating) またはブレッディング (breeding) を含む方法である。当業者により認められる通り、定向進化法は、ライブラリーにおける最も好ましい配列の同定を容易にすることができ、スクリーニングされる配列の多様性を増加し得る。DNA シャフティング (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3)、エキソンシャフティング (US 6, 365, 377; Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428)、ファミリーシャフティング (Cramer et al., 1998, Nature 391:288-291; US 6,376,246)、RACHITTM (Coco et al., 2001, Nat Biotechnol 19:354-359; PCT WO 02/06469)、インビトロ組み換えの STEP およびランダムプライム法 (Zhao et al., 1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao et al., 1998, Nucleic Acids Res 26:681-683)、エキソヌクレアーゼにより仲介される遺伝子アセンブリー (US 6, 352, 842; US 6, 361, 974)、Gene Site Saturation MutagenesisTM (US 6, 358, 709)、Gene ReassemblyTM (US 6, 358, 709)、SCRATCHY (Lutz et al., 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253)、DNA 断片化法 (Kikuchi et al., Gene 236:159-167)、一本鎖 DNA シャフティング (Kikuchi et al., 2000, Gene 243:133-137)、および AME システムTM 定向進化タンパク質作工学技術 (Applied Molecular Evolution) (US 5, 824, 514; US 5, 817, 483; US 5, 814, 476; US 5, 763, 192; US 5, 723, 323) を含むが、それらに限定されない、IgG 変異体をスクリーニングするための方法において使用され得る多様な定向進化法が、当技術分野で公知である。本段落に引用される全ての参考文献は、参照によりその全体が本明細書中に包含される。

【0175】

好ましい態様において、IgG 変異体を、1 個以上の細胞に基づく分析またはインビボ分析を用いてスクリーニングする。そのような分析のためには、精製または非精製タンパ

ク質は典型的に、細胞が個々の変異体またはライブラリーに属する変異体の集合に暴露されるように、細胞外に添加される。これらの分析は、常にではないが一般的に、I g Gの機能に基づく；すなわち、I g Gの能力は、その標的に結合し、いくつかの生化学的事象、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仲介する。かかる分析はしばしば、I g Gに対する細胞の応答、例えば細胞生存、細胞死、細胞形態の変化、または例えば天然遺伝子またはレポーター遺伝子の細胞発現などの転写活性化、を観察することを含む。例えば、かかる分析は、A D C C、A D C P、またはC D Cを誘導するI g G変異体の能力を測定することができる。いくつかの分析に関して、標的細胞に加えて、さらなる細胞または成分、例えば血清補体、または末梢血単球（P B M C）、N K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10
添加細胞は、何れかの生物、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り得る。抗体は、標的を発現する任意の細胞系のアポトーシスを引き起こし得るか、またはその分析に添加される免疫細胞により標的細胞に対する攻撃を仲介し得る。細胞死または細胞生存を観察するための方法は、当技術分野で公知であり、それらには、色素、免疫化学的試薬、細胞化学的試薬、および放射性試薬の使用が包含される。例えば、カスパーゼ染色分析は、アポトーシスの観察を可能にし、放射性基質またはアラマブルーのような蛍光色素の取り込みまたは放出は、細胞増殖または活性化の観察を可能にする。好ましい態様において、D E L F I A（登録商標）E u T D Aに基づく細胞毒性分析（Perkin Elmer, MA）が用いられる。あるいは、標的細胞の死または損傷を、1個以上の天然の細胞内タンパク質、例えば乳酸脱水素酵素の放出を測定することにより観察することができる。20
転写活性化は、細胞に基づく分析において機能を分析するための方法にもなり得る。この場合、応答を、上方制御され得る天然の遺伝子またはタンパク質の分析により観察することができる。例えば任意のインターロイキンの放出を測定することができるか、あるいは、読み出し（readout）がレポーター構築物により可能となる。細胞に基づく分析はまた、タンパク質の存在に対する応答としての細胞の形態的变化の測定を含み得る。かかる分析のための細胞タイプは、原核または真核であってよく、当技術分野で公知の様々な細胞系を用いることができる。あるいは、細胞に基づくスクリーニングを、変異体をコードする核酸を用いて形質転換またはトランスフェクトした細胞を用いて行う。すなわち、I g G変異体を、細胞に対して細胞外に添加しない。例えば1つの態様において、細胞に基づくスクリーニングは、細胞表面提示法を利用する。細胞の表面上にI g G変異体の提示を可能にする融合パートナーを、用いることができる（Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。30

【0176】

好ましい態様において、I g G変異体の免疫原性は、1個以上の細胞に基づく分析法を用いて実験的に決定される。いくつかの方法を、エピトープの実験的確認に用いることができる。好ましい態様において、エクスビボT細胞活性化分析を用いて、免疫原性を実験的に定量する。この方法において、適合供与側由来の抗原提示細胞およびナイーブT細胞を、1回以上、目的のペプチドまたは全体タンパク質で刺激する。その後、T細胞活性化を、多くの方法を用いて、例えばサイトカイン産生を測定すること、またはトリチウム化チミジンの取り込みを測定することにより検出することができる。最も好ましい態様において、インターフェロンガンマ産生を、E l i s p o t分析を用いて測定する（Schmitte l et. al., 2000, J. Immunol. Meth. 24: 17-24、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。40

【0177】

I g G変異体の生物学的特徴を、細胞、組織および生物全体の実験により特徴付けることができる。当技術分野で公知の通り、薬剤をしばしば、疾患または疾患モデルに対する処置のための薬剤の効果を測定するため、または薬剤の薬物動態、毒性および他の特性を測定するために、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において試験する。動物は、疾患モデルと称され得る。治療剤をしばしば、ヌードマウス、S C I Dマウス、異種移植マウス、および遺伝子組み換えマウス50

(ノックインおよびノックアウトを含む)を含むが、それらに限定されないマウスにおいて試験する。かかる実験は、治療剤として用いられるタンパク質の可能性を決定するための意味のあるデータを提供することができる。何れかの生物、好ましくは哺乳動物を、試験に用いることができる。例えばヒトに遺伝的に類似するため、サルを適する治療モデルとすることができ、故に、I g Gの効果、毒性、薬物動態、または他の特性を試験するために用いることができる。ヒトにおける試験が、最終的に、薬剤としての承認に必要であり、故に、もちろんこれらの実験が意図される。従って、I g Gをヒトにおいて試験し、その治療効果、毒性、免疫原性、薬物動態、および／または他の臨床特性を決定し得る。

【0178】

I g G変異体の使用方法

I g G変異体は、様々な製品として使用され得る。1つの態様において、I g G変異体は、治療剤、診断剤、または実験試薬であり、好ましくは治療剤である。I g G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使用され得る。好ましい態様において、I g G変異体を、標的抗原を有する標的細胞、例えば癌細胞を殺すために使用する。別の態様において、I g G変異体を、標的抗原を阻止、アンタゴナイズまたはアゴナイズするため、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ために用いる。別の好ましい態様において、I g G変異体を、標的抗原を阻止、アンタゴナイズまたはアゴナイズするため、標的抗原を有する標的細胞を殺すために用いる。

【0179】

I g G変異体を、様々な治療目的に用いることができる。好ましい態様において、I g G変異体を含む抗体を、抗体関連疾患を処置するために患者に投与する。本目的に関して“患者”には、ヒトおよび他の動物、好ましくは哺乳動物が含まれ、最も好ましくはヒトである。本明細書中、“抗体関連疾患”または“抗体反応性疾患”または“状態”または“疾患”は、I g G変異体を含む医薬組成物の投与により緩和され得る疾患を意味する。抗体関連疾患には、自己免疫疾患、免疫学的疾患、感染症、炎症性疾患、神経疾患、および癌を含む腫瘍性および新生物性疾患が含まれるが、これらに限定されない。本明細書中、“癌”および“癌性”は、調節されない細胞増殖により典型的に特徴付けられる哺乳動物における生理的状态を意味するか、または記載する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫（脂肪肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍、中皮種、神経鞘腫（schwannoma）、髄膜腫、腺癌、黒色腫、ならびに白血病およびリンパ性悪性腫瘍が含まれるが、それらに

【0180】

1つの態様において、I g G変異体は、患者に投与される唯一の治療的活性剤である。あるいは、I g G変異体を、細胞毒性薬、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、血管形成阻害剤、心臓保護剤、または他の治療剤を含むが、それらに限定されない1個以上の他の治療剤と併用投与する。I g G変異体を、1個以上の他の治療レジメンと併用して投与し得る。例えば、I g G変異体を、化学療法、放射線治療、または化学療法と放射線治療の両方と共に、患者に投与し得る。1つの態様において、I g G変異体を、I g G変異体であるか、またはI g G変異体ではない1個以上の抗体と併用投与することができる。他の態様に従い、I g G変異体および1個以上の他の抗

【0181】

様々な他の治療剤が、I g G変異体との併用投与のために使用され得る。1つの態様において、I g Gを、血管形成阻害剤と併用投与する。本明細書で用いる“血管形成阻害剤”は、血管の発達を阻止、またはある程度妨げ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増殖因子または増殖因子受容体と結合する、小分子またはタンパク質、例えば抗体、Fc融合体もしくはサイトカインであり得る。本明細書中、好ましい抗血管形成因子は、血管内皮増殖因子（VEGF）と結合する抗体である。別

の態様において、I g Gは、適応的免疫応答を誘導または増大する治療剤、例えばC T L A－4を標的とする抗体と共に投与される。別の態様において、I g Gを、チロシンキナーゼ阻害剤と共に投与する。本明細書で用いる“チロシンキナーゼ阻害剤”は、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。別の態様において、I g G変異体を、サイトカインと共に投与する。

【0182】

医薬組成物とは、I g G変異体および1個以上の治療的活性剤が、製剤されることを意図する。I g G変異体の製剤は、所望の純度を有するI g Gを、所望により薬学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980、参照によりその全体が本明細書中に包含される）と共に混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態に保存用に調製される。インビボ投与に使用される製剤を、好ましくは滅菌する。これは、滅菌ろ過膜を通する過または他の方法により容易に達成される。本明細書に記載のI g G変異体および他の治療的活性剤は、免疫リポソーム、および／またはマイクロカプセル封入としても製剤され得る。

【0183】

製剤中の治療的に活性なI g G変異体の濃度は、約0.1から100重量%で変化し得る。好ましい態様において、I g Gの濃度は、0.003から1.0モルの範囲内である。患者を処置するために、I g G変異体の治療的有效用量を投与することができる。本明細書中、“治療的有效用量”とは、それが投与されて効果を生じる用量を意味する。正確な用量は、処置の目的に依存して変化し、公知の技術を用いて当業者により確認され得る。投与量は、体重1kg当たり0.01から100mgまたはそれ以上、例えば体重1kg当たり0.01、0.1、1.0、10、または50mgの範囲であり得、1から10mg/kgが好ましい。当技術分野で公知の通り、タンパク質分解、全身的对局所送達、および新しいタンパク質合成の速度、ならびに年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与の時間、薬剤の相互作用および状態の重症度に関する調整が必要であり、当業者により常套的実験にて確認され得る。

【0184】

好ましくは滅菌水溶液の形態でI g G変異体を含む医薬組成物の投与を、経口、皮下、静脈内、非経腸的、経鼻的、耳内（intraotically）、眼内（intraocularly）、経直腸、経腔的、経皮的、局所的（例えば、ジェル、軟膏、ローション、クリームなど）、腹腔内、筋肉内、肺内（例えば、Aradigmにより市販されるA E R x（登録商標）吸入可能技術、またはNektar Therapeuticsにより市販されるI n h a n c e（登録商標）肺送達システムなど）を含むが、それらに限定されない様々な方法で行うことができる。本明細書に記載の治療剤を、他の治療剤と併用して投与することができ、すなわち、本明細書に記載の治療剤を、例えば小分子、他の生物学的製剤、放射線治療、外科手術などを含む、他の治療または治療剤と併用し得る。

【実施例】

【0185】

実施例

本発明を説明するために、以下に実施例を提供する。これらの実施例は、どんな特定の適用または操作理論にも本発明を制限することを意味しない。本発明で検討した全ての位置に関して、番号は、Kabatに記載のE U i n d e x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、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。抗体分野の当業者は、この決まりが、免疫グロブリンファミリーの保存された位置を参照して標準化し得る、免疫グロブリン配列の特定領域における不連続の番号からなることを理解するだろう。従って、E U i n d e xに定義される何れかの特定の免疫グロブリンの位置は、その連続的配列に対応する必要はない。

【0186】

実施例1：F c変異体のD N A構築物、発現および精製

Fc 変異体を、ヒト IgG1 Fc ドメインおよびトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標）、Genentech）の可変ドメインを用いて構築した。Fc ポリペプチドは、アレムツズマブ、トラスツズマブまたは AC10 の一部であった。アレムツズマブ（Campath（登録商標）、Millenium の登録商標）は、B 細胞慢性リンパ性白血病の処置に現在認可されているヒトモノクローナル抗体である（Hale et al., 1990, Tissue 抗原 35:118-127、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標）、Genentech の登録商標）は、転移性乳癌の処置のための抗 HER2/neu 抗体である。AC10 は、抗 CD30 モノクローナル抗体である。ハーセプチン可変領域を、リカーシブ PCR を用いて組み立てた。その後、この可変領域を、図 11 に示す p c D N A 3.1/Zeo (+) ベクター（Invitrogen）中にヒト IgG1 と共にクローニングした。プラスミドを、One Shot TOP10 大腸菌細胞（Invitrogen）中で増殖させ、Hi-Speed Plasmid Maxi Kit（Qiagen）を用いて精製した。プラスミドを、クローニングしたインサートの存在を確かめるために配列決定した。

10

【0187】

部位特異的変異誘発を、QuickchangeTM 方法（Stratagene）を用いて行った。所望の置換、挿入および欠失を含むプラスミドを、One Shot TOP10 大腸菌細胞（Invitrogen）中で増殖させ、Hi-Speed Plasmid Maxi Kit（Qiagen）を用いて精製した。DNA を、配列の適合度を確認するために配列決定した。

【0188】

重鎖遺伝子（VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3）（野生型または変異体）を含むプラスミドを、293T 細胞中に、軽鎖遺伝子（VL-C γ ）を含むプラスミドと共に共トランスフェクトした。培地を、トランスフェクションの 5 日後に集め、抗体を、タンパク質 A 親和性クロマトグラフィー（Pierce）を用いて上清から精製した。抗体濃度を、ビシンコン酸（BCA）分析（Pierce）により決定した。

20

【0189】

実施例 2：結合親和性測定

Fc ポリペプチドと Fc リガンドの結合を、表面プラズモン共鳴（SPR）測定で分析した。表面プラズモン共鳴測定を、BIAcore 3000 装置（BIAcore AB）を用いて行った。野生型または変異体抗体を、固定したタンパク質 L（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を用いて捕捉し、受容体分析物との結合を測定した。タンパク質 L を、5 μ l/分の流速で、N-ヒドロキシスクシンイミド/N-エチル-N'-(-3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド（NHS/EDC）を用いて、CM5 センサーチップ上 10 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.5 中、1 μ M のに濃度で CM5 センサーチップと共有結合させた。各センサーチップのフローセル 1 を、結合のネガティブコントロールとして NHS/EDC を用いた。泳動緩衝液は、0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005 % v/v 界面活性剤 P20（HBS-EP, Biacore, Uppsala, Sweden）であり、チップ再生緩衝液は、10 mM グリシン-HCl pH 1.5 であった。125 nM の野生型または変異体トラスツズマブ抗体を、1 μ l/分にて 5 分間、HBS-EP 中タンパク質 L CM5 チップに結合させた。1 から 250 nM の連続希釈中で、FcRn-His-GST 分析物である His タグおよびグルタチオン S トランスフェラーゼと融合した FcRn を、HBS-EP 中、10 μ l/分にて、20 分間の結合、10 分間の解離のために注入した。レゾナンスユニット（RU）で測定された応答を、ほぼ定常状態の結合を表す、受容体注入の 1200 秒後に得た。抗体および緩衝液を用いた 1 サイクルのみが、ベースライン応答を提供した。RU 対 1/log 濃度プロットを作製し、GraphPad Prism での非線形回帰を用いて S 字状の用量応答に合わせる。

30

40

【0190】

Fc ポリペプチドと Fc リガンドの結合をまた、AlphaScreenTM（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）を用いて行った。AlphaScreenTM は、ビーズに基づく非放射性発光近接分析である。供与側ビーズのレーザー励起

50

は、酸素を励起し、受容側ビーズとの接近が十分なとき、化学発光事象のカスケードを生じ、最終的に520–620nmで蛍光放出をもたらし得る。AlphaScreenTMの主な利点は、その感度である。1つの供与側ビーズが、1秒当たり最大60,000までの励起酸素分子を放出するため、シグナル増幅が非常に高く、アトモル濃度(10⁻¹⁸)レベルまで下げての検出が可能である。野生型抗体を、ストレプトアビジン供与側ビーズとの結合のための標準的方法によりビオチン化させ、タグ付きFcリガンド、例えばFcRnを、グルタチオンキレート供与側ビーズに結合させた。AlphaScreenTMを、Fc/Fcリガンド相互作用が、供与側および需要側ビーズを結合させる直接的結合分析として用いた。さらに、AlphaScreenTMを、目的のFcポリペプチドをスクリーニングするための競合分析として用いた。競合するFcポリペプチドの不存在において、野生型抗体およびFcRnが相互作用し、520–620nmでのシグナルを生じる。タグの付いていないFcドメインは、野生型Fc/FcRn相互作用と競合し、相対的結合親和性の決定を可能にするために蛍光を定量的に減少させる。

10

【0191】

実施例3：Fc変異体のFcRn結合特性。

IgG1 FcからFcRnの結合親和性を、AlphaScreenTMを用いて変異体抗体と共に測定した。Fcポリペプチドは、アレムツズマブまたはトラスツズマブの一部であった。アレムツズマブ(CamPATH(登録商標)、Ilex)は、B細胞慢性リンパ性白血病の処置のために現在認可されているヒト化モノクローナル抗体である(Hale et al., 1990, Tissue 抗原 35:118–127、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標)、Genentech)は、転移性乳癌の処置のための抗HER2/neu抗体である。

20

【0192】

競合的AlphaScreenTMデータを、野生型抗体と比較して、pH6.0でのFc変異体の相対的結合を測定するために収集した。競合的抗体の機能としてのAlphaScreenTMシグナルの例を、図12に示す。P257L、P257N、V279E、V279Q、V279Y、A281S、E283F、V284E、L306Y、T307V、V308F、およびQ311Vの12個の変異体の曲線を示し、各変異体曲線が、それらのボックス内で野生型曲線の左に遷移するとき、増加した親和性を証明する。本発明のFc変異体についての競合的AlphaScreenTMデータを、図13および14にまとめる。野生型と比較した変異体の相対的FcRn結合を一覧にする。1以上の値は、野生型と比べてFc変異体とFcRnの改善された結合を証明する。例えば、変異体E283LおよびV284Eは、野生型よりもそれぞれ9.5倍および26倍強力な結合を有する。多くの変異体の表面プラズモン共鳴測定はまた、図15および16に示す通り、FcRnとの増加した結合を示す。

30

【0193】

257位にて、イミノ酸、プロリンを除去し、骨格Nを有さない1個のアミノ酸を側鎖共有結合に置換する全ての変異体が、Fcドメインをより自由にし、FcRnとのより良好な結合を可能にするより大きなフレキシビリティを骨格に供する。特に、257位でのLおよびNへの変異体は、pH6でのFcRn結合を強くし、4個の原子側鎖および側鎖のガンマ分岐パターンが、Fcドメインを生産的にする、すなわちFcRn相互作用を強くするのを助ける。308位は、257位と相互作用することを証明する。これらの位置の両方は、Fc/FcRn相互作用に直接関係するH310と順に相互作用する(表2、Burmeister et al(1994) Nature 372:379–383、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。Fc変異体V308FおよびV308Yは、野生型よりも2.9倍および4.3倍増加したFcRn親和性を有する(図13)。279位および385位は、変異体V279E、V279QおよびV279YならびにG385HおよびG385N(全て、より強いFcRn相互作用を有する。)としてFcRnと相互作用する。これらの変異体は全て、水素結合の可能なアミノ酸である。

40

【0194】

50

Fc変異体N434Yは、図13に示す通り、特に、pH6.0にてFcRnとの強い結合を有する。単一変異体N434Yは、16倍増加した結合を有する。この変異体と他の修飾の組み合わせは、さらに強い結合をもたらした。例えば、P257L/N434Y、[^]281S/N434Y、およびV308F/N434Yは、830倍、180倍、および350倍増加したFcRn結合を示す。

【0195】

実施例4：挿入および欠失を組み込む変異体

Fc/FcRn相互作用の強さを変える挿入および欠失を構築し、様々なFcリガンドとのそれらの結合特性を測定した。残基281と282（KabatらのEU番号を用いる）の間に挿入したSer残基を有するFc変異体を、FcドメインのFcRn結合特性を増加するために設計した。この変異体は、特定の位置の後ろへの挿入を意味する“[^]”を含む、[^]281Sと称される。2個以上の残基であり得る挿入配列は、位置番号の後ろに供される。このFc変異体を、本明細書に記載の方法を用いて、カップIgG1抗体トラストズマブ（ハーセプチン（登録商標）、Genetech）が構築された。残基281と282の間の挿入は、残基281のFcループ残基C末端をループのC末端方向へ移動させ、側鎖位置を変化させる。282位、283位、および284位での置換を含むFc変異体は、このループのC末端への移動が有益であることを示唆する（図14を参照のこと）。他の変異体であるN286の欠失（しばしば、N286#と称される。）をまた、このFcRn結合ループの位置を移動させるために構築した。これらの変異体は両方とも、pH6.0でのFcRnに対する増加した結合親和性を示す。

【0196】

AlphaScreenTMデータは、[^]281S変異体および他の変異体とFcRnの結合を示す。このAlphaScreenTMデータは、直接結合分析として集められる。化学発光シグナルのより高レベルが、より強い結合を証明する。変異体の濃度が、該分析で上昇するため、強力なシグナルが生じる。図17aおよび17b中、pH6.0でのこれらのデータは、[^]281S、P257L、P257L/[^]281S（置換/挿入変異体の組み合わせ）および他の変異体の、野生型Fcよりも増加した親和性を証明する。また、サルにおける増加した血清半減期を有することが以前に示された、二重置換であるT250Q/M428Lが示される（Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。挿入である[^]281Sのみが、Fc/FcRn結合を増加する。さらに、[^]281Sは、2個の修飾が、~40nMデータ点に示す通り、変異体P257L/[^]281Sに組み込まれるとき、P257Lの結合がさらに増加する。図17cのデータは、これらの変異体が、pH7.0での増加したFcRn結合を示さないことを証明する。pH7.0での減少した親和性は、Fc再利用に重要な工程である、FcRnから細胞外空間へのFcポリペプチドの放出を可能にするため、増加したインビボ半減期に望ましい。

【0197】

表面プラズモン共鳴実験はまた、[^]281SとFcRnの改善した結合を証明する。図18は、チップ表面上のFcRnに結合する様々なFc変異体として作製される応答単位（response unit）を示す。変異体がチップに十分に結合するのを可能にした後、応答単位を記録し、縦座標に示した。挿入[^]281Sは、本明細書に記載の他の変異体と同様の結合特性を示し、野生型よりもFcRnへの増加した親和性を有する（例えば、図13、14および15を参照のこと）。

【0198】

N286の欠失を含む欠失変異体であるN286#はまた、野生型よりも、FcRnとの増加した親和性を示す。この変異体は、図13に示す通り、FcRn親和性の2.0倍増加を有する。図中のデータはまた、pH6.0での競合的実験として集められたAlphaScreenTMデータである。変異体を、供与側ビーズと結合した野生型Fcと、受容側ビーズと結合したFcRnの結合を阻害するために用いる。2倍少ない遊離のN286#は、遊離の野生型Fcより必要であり、Fc/FcRn複合体を介する供与側/受

容側ビーズの結合を阻害する。これは、野生型よりも、N 2 8 6 # の 2 倍強い結合を証明する。

【0199】

挿入または欠失を含む他の F c 変異体は、F c R n に対して減少した親和性を有する。挿入変異体である Δ 254 N は、変異体の性質および位置から予期される通り、大幅に減少した F c R n 結合を有する。この変異体は、F c R n 結合ループの中間に、A s n の挿入を有する。この挿入は、野生型の結合親和性の結合の 1.1 % しか有さない（図 13）。

【0200】

本発明の特定の態様は、説明を目的として上記されるが、多数の変形が、添付の特許請求の範囲に記載の通り、本発明から逸脱しない範囲で作製され得ることは、当業者に認められるだろう。本明細書中に引用された全ての参考文献は、参照によりその全体が本明細書中に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0201】

【図1】図1。抗体の構造および機能。p d b 受託コード 1 C E 1 からのヒト化 F a b 構造 (James et al., 1999, J Mol Biol 289:293-301、参照によりその全体が本明細書中に包含される) および p d b 受託コード 1 D N 2 からのヒト I g G 1 F c 構造 (DeLano et al., 2000, Science 287:1279-1283、参照によりその全体が本明細書中に包含される) を用いてモデル化された、全長ヒト I g G 1 抗体のモデルを示す。F a b および F c 領域を連結するフレキシブルヒンジは示さず。I g G 1 は、2 個の軽鎖および 2 個の重鎖からなるヘテロ二量体のホモ二量体である。軽鎖の V_L および C_L、ならびに重鎖の V_H、Cガンマ1 (C γ 1)、Cガンマ2 (C γ 2)、および Cガンマ3 (C γ 3) を含む、抗体を含む I g ドメインが標識される。F c 領域は標識される。可変領域中の抗原結合部位、ならびに領域中の F c γ R s、F c R n、C l q およびタンパク質 A および G の結合部位を含む、関連タンパク質の結合部位は標識される。

【図2】図2。Kabat et al に記載の通り E U 番号を付した本発明に用いるヒト I g G 配列。

【図3】図3。Kabat に記載の通り E U 番号を付した本発明に用いるヒトおよびげっ歯動物 I g G 配列の例。

【図4】図4。本発明に用いたヒトおよびげっ歯動物 F c R n 重鎖配列の例。

【図5】図5。本発明に用いたヒトおよびげっ歯動物ベクター 2-ミクログロブリン配列の例。

【図6】図6。ラット構造から作製されたヒト F c / F c R n 複合体モデル (Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。いくつかのヒスチジン残基は、F c R n 鎖 (淡灰色) および F c ポリペプチド (濃灰色) 上の空間充填 (space-filling) 原子で示される。

【図7】図7。挿入または欠失を含む変異体の設計に用いるいくつかの概念の説明図。

【図8】図8。本発明の変異体。

【図9】図9。本発明の変異体。

【図10】図10。本発明の変異体。

【図11】図11。F c 変異体のコンストラクトに用いられ得るベクター p c D N A 3.1 Z e o + の図。

【図12】図12。野生型 F c および本発明の F c 変異体の競合的 F c R n 結合データ。各パネルにおいて、本発明の F c 変異体は、左 (赤色または濃灰色) 曲線で示され、野生型トラスツズマブは、右 (青色または淡灰色) 曲線で示される。

【図13】図13。F c 変異体の F c R n 結合特性の概要。右から左の列は、F c R n 結合の修飾、使用した免疫グロブリン、他の修飾、野生型と比較した A l p h a S c r e e n^{T M} 競合分析による相対的 F c R n 親和性 (中央値)、実施した分析数、およびタンパ

10

20

30

40

50

ク質の参照数を示す。1. 0より大きい相対的FcRn親和性数は、野生型よりも増加した結合を証明する。

【図14】図14。本発明のFc変異体のFcRn結合データ。Fc変異体は、アテムツズマブまたはトラスツズマブである。野生型と比較した結合の増加倍数を示す。

【図15】図15。FcRnとの改善した結合を有するFc変異体の表面プラズモン共鳴実験の概要。棒グラフは、野生型Fcドメインと比較した各変異体のFcRn結合親和性における増加倍数を示す。

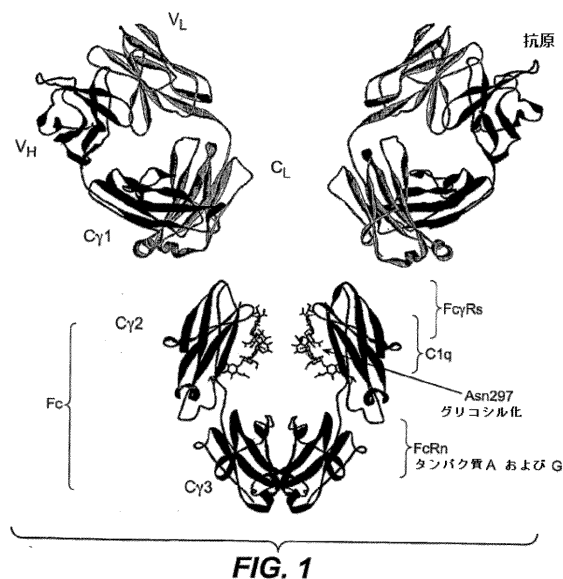
【図16】図16。野生型抗体および本発明の変異体の表面プラズモン共鳴実験。示した線は、pH6.0での、FcRnとのFc変異体抗体の結合および分離である。

【図17】図17。本発明のFc変異体とFcRnとの結合分析。pH6.0(aおよびb)およびpH7.0(c)での、AlphaScreen(商標)により測定した直接結合分析を示す。

【図18】図18。本発明のFc変異体とFcRnとの結合分析。Fc変異体と表面結合FcRnとの結合により作製される表面プラズモン共鳴単位を示す。

10

【図1】



【図2】

ヒンジ領域		Fc領域 →	
EU	221	222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236	
IgG1	D	- - K T H T C P P C P A P E L L G	
IgG2	-	V - E - - - - - P V A -	
IgG3	L G D T	- - - - - R	
IgG4	-	- - P P S	F

CH2ドメイン	
EU	237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263
IgG1	G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V
IgG2	
IgG3	
IgG4	

EU	264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290
IgG1	V D V S H E D P E Y K F N W Y V D G Q V E V H N A K T K
IgG2	Q
IgG3	Q K
IgG4	Q

EU	291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317
IgG1	P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K
IgG2	F F
IgG3	F
IgG4	F

EU	318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340
IgG1	E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
IgG2	G
IgG3	T
IgG4	G S S

CH3ドメイン	
EU	341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367
IgG1	G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C
IgG2	E M
IgG3	E M
IgG4	Q E M

EU	368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394
IgG1	L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
IgG2	
IgG3	S
IgG4	H

EU	395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421
IgG1	P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
IgG2	H
IgG3	H
IgG4	R E

EU	422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447
IgG1	V F S C E V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
IgG2	
IgG3	
IgG4	R F L

FIG. 2

【図 3】

Fc ヒト	1DN2.pdb	237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253
Fc ラット	111A.pdb	237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253
Fc ヒト	1DN2.pdb	254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
Fc ラット	111A.pdb	254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
Fc ヒト	1DN2.pdb	271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287
Fc ラット	111A.pdb	271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287
Fc ヒト	1DN2.pdb	288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304
Fc ラット	111A.pdb	288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304
Fc ヒト	1DN2.pdb	305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321
Fc ラット	111A.pdb	305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321
Fc ヒト	1DN2.pdb	322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338
Fc ラット	111A.pdb	322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338
Fc ヒト	1DN2.pdb	339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355
Fc ラット	111A.pdb	339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355
Fc ヒト	1DN2.pdb	356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372
Fc ラット	111A.pdb	356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372
Fc ヒト	1DN2.pdb	373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389
Fc ラット	111A.pdb	373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389
Fc ヒト	1DN2.pdb	390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406
Fc ラット	111A.pdb	390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406
Fc ヒト	1DN2.pdb	407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423
Fc ラット	111A.pdb	407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423
Fc ヒト	1DN2.pdb	424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440
Fc ラット	111A.pdb	424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440
Fc ヒト	1DN2.pdb	441 442 443
Fc ラット	111A.pdb	441 442 443

FIG. 3

【図 4】

FcRn ヒト	1EXU.pdb	4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
FcRn ラット	111A.pdb	4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
FcRn ヒト	1EXU.pdb	17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
FcRn ラット	111A.pdb	17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
FcRn ヒト	1EXU.pdb	37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56
FcRn ラット	111A.pdb	37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56
FcRn ヒト	1EXU.pdb	57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76
FcRn ラット	111A.pdb	57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76
FcRn ヒト	1EXU.pdb	77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94
FcRn ラット	111A.pdb	77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94
FcRn ヒト	1EXU.pdb	95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114
FcRn ラット	111A.pdb	95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114
FcRn ヒト	1EXU.pdb	115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134
FcRn ラット	111A.pdb	115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134
FcRn ヒト	1EXU.pdb	135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154
FcRn ラット	111A.pdb	135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154
FcRn ヒト	1EXU.pdb	155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174
FcRn ラット	111A.pdb	155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174
FcRn ヒト	1EXU.pdb	175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194
FcRn ラット	111A.pdb	175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194
FcRn ヒト	1EXU.pdb	195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214
FcRn ラット	111A.pdb	195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214
FcRn ヒト	1EXU.pdb	215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234
FcRn ラット	111A.pdb	215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234
FcRn ヒト	1EXU.pdb	235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254
FcRn ラット	111A.pdb	235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254
FcRn ヒト	1EXU.pdb	255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267
FcRn ラット	111A.pdb	255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267

FIG. 4

【図 5】

AA 番号		1EXU.pdb																	111A.pdb																
ペータミクログロブリン, ヒト		経路 1EXU.pdb																	経路 111A.pdb																
ペータミクログロブリン, ラット		経路 1EXU.pdb																	経路 111A.pdb																
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28																		
S	R	H	P	A	E	N	G	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S																		
S	R	H	P	P	E	N	G	K	P	N	F	L	N	C	Y	V	S																		
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46																		
G	F	H	P	S	D	I	E	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I																		
G	F	H	P	P	S	D	I	E	V	D	L	L	K	N	G	E	R																		
47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64																		
E	K	V	E	H	S	D	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L																		
P	N	I	E	M	S	D	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L																		
65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82																		
L	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V																		
L	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V																		
83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99																			
N	H	V	T	L	S	Q	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M																			
K	H	V	T	L	K	E	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M																			

FIG. 5

【図 6】

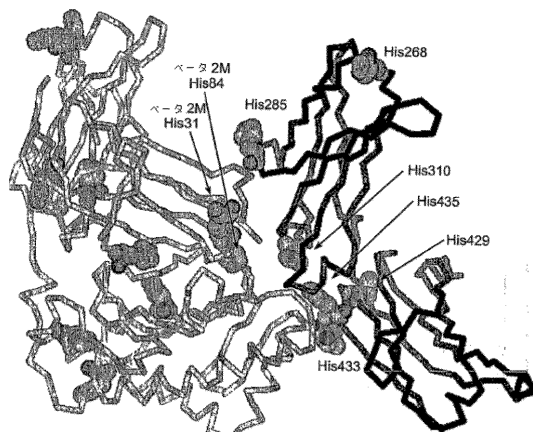
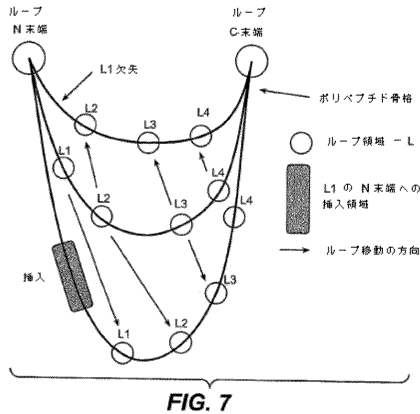


FIG. 6

【図 7】



【図 8 a】

ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基
K	246H	R	255E	V	279D	V	284K
K	246S	R	255F	V	279F	V	284P
P	247D	R	255H	V	279G	V	284Q
P	247T	R	255K	V	279H	V	284R
K	248H	R	255S	V	279I	V	284S
K	248P	R	255V	V	279K	V	284Y
K	248Q	T	256E	V	279L	H	285S
K	248R	T	256H	V	279M	H	285V
K	248Y	T	256V	V	279N	N	286#
D	249T	P	257A	V	279P	N	286L
D	249W	P	257C	V	279Q	A	287H
L	251D	P	257D	V	279R	A	287S
L	251E	P	257E	V	279S	A	287V
L	251H	P	257F	V	279T	A	287Y
L	251I	P	257G	V	279W	K	288H
L	251K	P	257H	V	279Y	K	288Q
L	251M	P	257I	D	280E	K	288R
L	251N	P	257J	D	280H	K	288S
L	251T	P	257L	^	^281A	V	305H
L	251V	P	257M	^	^281D	V	305T
L	251Y	P	257N	^	^281S	L	306F
M	252F	P	257Q	^	^281T	L	306H
M	252L	P	257R	V	282D	L	306I
I	253L	P	257S	V	282F	L	306N
I	253T	P	257T	V	282H	L	306T
I	253V	P	257V	V	282I	L	306V
S	254H	P	257W	V	282T	L	306Y
S	254L	P	257Y	E	283F	T	307D
S	254N	E	258R	E	283I	T	307V
S	254T	E	258V	E	283L	T	307Y
S	254V	V	279A	E	283Y	V	308A
^	^254N	V	279C	V	284H	V	308C

FIG. 8a

【図 8 b】

ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基
V	308D	N	315E	G	385N	E	430H
V	308E	N	315G	G	385P	E	430K
V	308F	N	315H	G	385Q	E	430L
V	308G	N	315Q	G	385R	E	430Q
V	308H	N	315S	G	385S	E	430Y
V	308I	N	315T	G	385T	A	431G
V	308K	K	317H	G	385V	A	431H
V	308L	K	317S	G	385W	A	431I
V	308M	A	339P	G	385Y	A	431P
V	308N	K	340P	Q	386E	A	431S
V	308P	G	341S	Q	386H	L	432F
V	308Q	P	374H	Q	386K	L	432H
V	308R	P	374S	P	387#	L	432N
V	308S	D	376H	P	387A	L	432S
V	308T	D	376L	P	387H	L	432V
V	308W	A	378H	P	387K	H	433E
V	308Y	A	378N	P	387Q	H	433N
L	309F	E	380T	N	389E	H	433P
L	309H	E	380Y	N	389H	H	433R
L	309I	E	382H	S	426E	H	433S
L	309N	S	383H	S	426H	N	434H
L	309P	S	383K	S	426L	N	434Q
L	309Q	S	383Q	S	426N	N	434S
L	309V	N	384E	S	426R	N	434Y
L	309Y	N	384G	S	426V	H	435N
H	310K	N	384H	S	426Y	Y	436E
H	310N	G	385A	V	427I	Y	436F
H	310T	G	385C	H	429D	Y	436H
Q	311H	G	385D	H	429F	Y	436Q
Q	311L	G	385E	H	429K	Y	436L
Q	311S	G	385F	H	429N	Y	436Q
Q	311T	G	385H	H	429Q	Y	436W
Q	311V	G	385I	H	429S	T	437E
Q	311W	G	385K	H	429T	T	437V
D	312H	G	385L	H	429Y	Q	438E
W	313Y	G	385M	E	430D	Q	438H
						Q	438K

FIG. 8b

【図 9 a】

ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基
K	246H	R	255S	V	279N	A	287S
K	246S	R	255V	V	279P	A	287V
P	247D	T	256H	V	279Q	A	287Y
P	247T	T	256V	V	279R	K	288H
K	248H	P	257A	V	279S	K	288Q
K	248P	P	257C	V	279T	K	288S
K	248Q	P	257D	V	279W	V	305H
K	248R	P	257E	V	279Y	V	305T
K	248Y	P	257F	D	280H	L	306F
D	249T	P	257G	^	^281A	L	306H
D	249W	P	257H	^	^281D	L	306I
L	251D	P	257I	^	^281S	L	306N
L	251E	P	257K	^	^281T	L	306T
L	251H	P	257L	V	282D	L	306V
L	251I	P	257M	V	282F	L	306Y
L	251K	P	257N	V	282H	T	307D
L	251M	P	257Q	V	282I	T	307V
L	251N	P	257R	V	282T	T	307Y
L	251T	P	257S	E	283F	V	308C
L	251V	P	257T	E	283I	V	308E
L	251Y	P	257V	E	283L	V	308F
M	252L	P	257W	E	283Y	V	308G
I	253L	P	257Y	V	284H	V	308H
I	253T	E	258R	V	284K	V	308I
I	253V	E	258V	V	284P	V	308K
S	254H	V	279A	V	284Q	V	308L
S	254L	V	279C	V	284R	V	308M
S	254N	V	279D	V	284S	V	308N
S	254V	V	279F	V	284Y	V	308P
^	^254N	V	279G	H	285S	V	308Q
R	266E	V	279H	H	285V	V	308R
R	265F	V	279I	N	286#	V	308S
R	265H	V	279K	N	286L	V	308W
R	265K	V	279M	A	287H	V	308Y

FIG. 9a

【図 9 b】

ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基
L	309F	E	382H	S	426H	H	433S
L	309H	S	383H	S	426L	N	434H
L	309N	S	383K	S	426N	N	434Q
L	309Q	S	383Q	S	426R	N	434S
L	309V	N	384E	S	426V	H	435N
L	309Y	N	384G	S	426Y	Y	436E
H	310K	N	384H	V	427I	Y	436F
H	310N	G	385A	H	429D	Y	436L
H	310T	G	385C	H	429F	Y	436V
Q	311L	G	385F	H	429K	Y	436W
Q	311T	G	385H	H	429N	T	437E
Q	311V	G	385I	H	429Q	T	437V
Q	311W	G	385K	H	429S	Q	438H
D	312H	G	385L	H	429T	Q	438K
W	313Y	G	385M	H	429Y		
N	315E	G	385N	E	430D		
N	315G	G	385P	E	430H		
N	315H	G	385Q	E	430K		
N	315Q	G	385S	E	430L		
N	315S	G	385T	E	430Q		
N	315T	G	385V	E	430Y		
K	317H	G	385W	A	431G		
K	317S	G	385Y	A	431H		
A	339P	Q	386E	A	431I		
K	340P	Q	386H	A	431P		
G	341S	Q	386K	A	431S		
P	374H	P	387#	L	432F		
P	374S	P	387A	L	432H		
D	376H	P	387H	L	432N		
D	376L	P	387K	L	432S		
A	378H	P	387Q	L	432V		
A	378N	N	389E	H	433E		
E	380T	N	389H	H	433N		
E	380Y	S	426E	H	433P		

FIG. 9b

【図 10 a】

ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基
K	246H	P	257I	N	286L	W	313Y
K	246S	P	257L	A	287V	N	315G
P	247D	P	257M	K	288Q	N	315Q
P	247T	P	257N	K	288S	N	315S
K	248P	P	257Q	V	305T	N	315T
K	248Q	P	257S	L	306F	A	339P
K	248Y	P	257T	L	306H	K	340P
D	249T	P	257V	L	306I	G	341S
D	249W	P	257W	L	306N	P	374H
L	251D	P	257Y	L	306T	P	374S
L	251E	E	258V	L	306V	D	376L
L	251H	V	279A	L	306Y	A	378H
L	251I	V	279C	T	307V	A	378N
L	251T	V	279F	V	308C	E	380T
L	251V	V	279I	V	308F	E	380Y
M	252L	V	279P	V	308G	E	382H
I	253L	V	279S	V	308L	S	383Q
I	253T	V	279T	V	308M	N	384E
I	253V	V	279W	V	308N	N	384G
S	254H	V	279Y	V	308P	N	384H
S	254L	A	*281A	V	308Q	G	385A
S	254N	A	*281D	V	308S	G	385C
S	254V	A	*281S	V	308W	G	385F
A	*254N	A	*281T	V	308Y	G	385I
R	255E	V	282F	L	309F	G	385L
R	255H	V	282I	L	309N	G	385M
R	255K	V	282T	L	309Q	G	385N
R	255V	E	283F	L	309V	G	385P
T	256H	E	283I	L	309Y	G	385Q
T	256V	E	283L	H	310T	G	385S
P	257A	E	283Y	Q	311L	G	385T
P	257C	V	284P	Q	311T	G	385V
P	257F	H	285V	Q	311V	G	385W
P	257G	N	286#	Q	311W	G	385Y

FIG. 10a

【図 10 b】

ヒト IgG1 WT	位置 置換基	ヒト IgG1 WT	位置 置換基
Q	386E	N	434H
Q	386H	N	434Q
Q	386K	N	434S
P	387#	H	435N
P	387A	Y	436F
P	387H	Y	436L
P	387K	Y	436V
P	387Q	Y	436W
N	389H	T	437E
S	426L	T	437V
S	426N		
S	426V		
S	426Y		
V	427I		
H	429D		
H	429F		
H	429K		
H	429N		
H	429Q		
H	429S		
H	429T		
H	429Y		
E	430L		
A	431G		
A	431I		
A	431P		
A	431S		
L	432F		
L	432H		
L	432V		
H	433E		
H	433N		
H	433P		
H	433S		

FIG. 10b

【図 11】

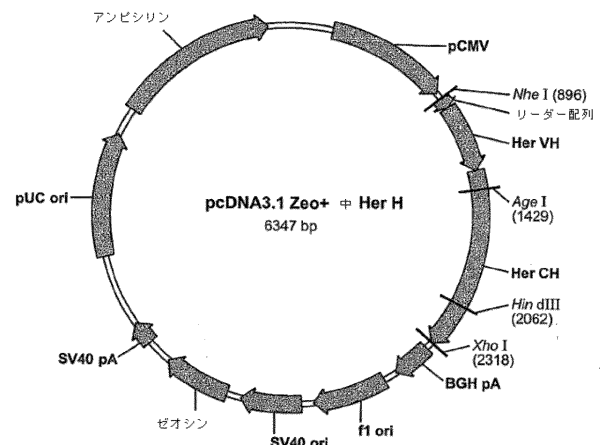


FIG. 11

【図 12 a】

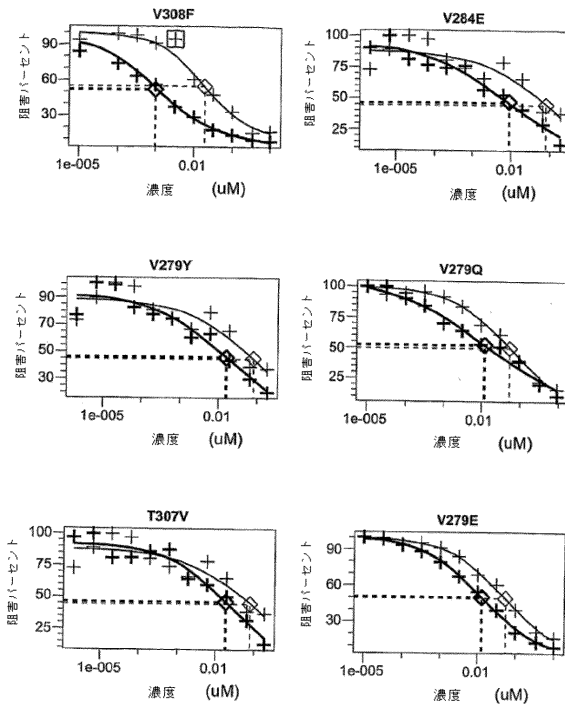


FIG. 12a

【図 12 b】

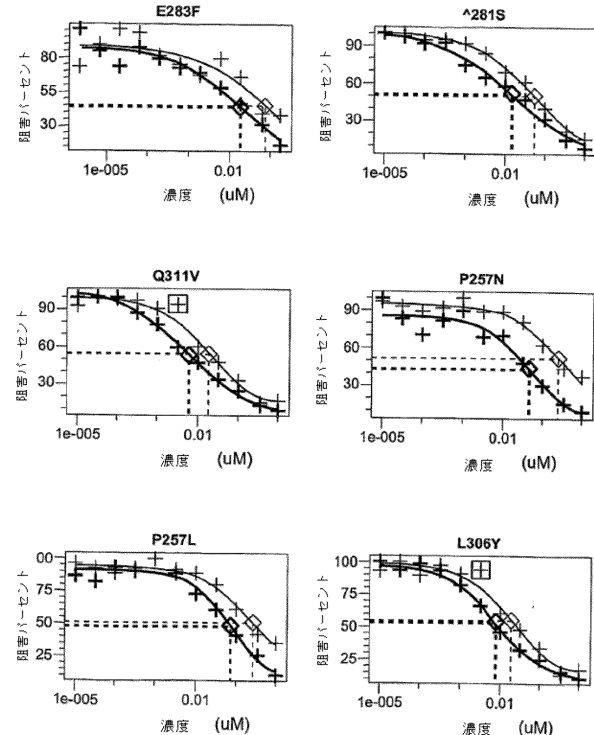


FIG. 12b

【図 13 a】

変異体	可変・Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数 中央値	N
WT	ハーセブチン-IgG1		1.00	19
WT	ハーセブチン-IgG2		0.45	2
K246H	ハーセブチン-IgG1		0.85	1
K246S	ハーセブチン-IgG1		0.55	1
P247D	ハーセブチン-IgG1		1.45	1
P247T	ハーセブチン-IgG1		0.23	1
K248H	ハーセブチン-IgG1		0.62	2
K248P	ハーセブチン-IgG1		0	0
K248Q	ハーセブチン-IgG1		1.00	1
K248R	ハーセブチン-IgG1		0.44	1
K248Y	ハーセブチン-IgG1		2.09	3
D249T	ハーセブチン-IgG1		0	0
D249W	ハーセブチン-IgG1		0.56	1
T250Q	ハーセブチン-IgG1		0	0
T250QM428L	ハーセブチン-IgG1		2.06	13
L251D	ハーセブチン-IgG1		0.28	2
L251E	ハーセブチン-IgG1		0.07	1
L251H	ハーセブチン-IgG1		0.57	1
L251I	ハーセブチン-IgG1		0.28	1
L251K	ハーセブチン-IgG1		0.10	1
L251M	ハーセブチン-IgG1		0.26	1
L251N	ハーセブチン-IgG1		0.10	1
L251T	ハーセブチン-IgG1		1.12	1
L251V	ハーセブチン-IgG1		0.29	1
L251Y	ハーセブチン-IgG1		0.55	1
M252F	ハーセブチン-IgG1		0.70	1
M252L	ハーセブチン-IgG1		0.10	1
M252W	ハーセブチン-IgG1		7.55	7
M252Y	ハーセブチン-IgG1		0	0
M252Y/S254T/T256E	ハーセブチン-IgG1		0	0
M252Y/P257L	ハーセブチン-IgG1		1.22	1
M252Y/P257N	ハーセブチン-IgG1		25.48	3
M252Y/V279Q	ハーセブチン-IgG1		5.62	3
M252Y/V308F	ハーセブチン-IgG1		1.44	2
I253L	ハーセブチン-IgG1		0.32	1
I253T	ハーセブチン-IgG1		0	0
I253V	ハーセブチン-IgG1		0.28	1
S254H	ハーセブチン-IgG1		1.34	2
S254L	ハーセブチン-IgG1		0.61	1
S254N	ハーセブチン-IgG1		0.15	1
S254T	ハーセブチン-IgG1		0.61	1
S254V	ハーセブチン-IgG1		0.62	1
^254N	ハーセブチン-IgG1		0.01	1

FIG. 13a

【図 13 b】

変異体	可変・Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数 中央値	N
R255E	ハーセブチン-IgG1		0	0
R255F	ハーセブチン-IgG1		0	0
R255H	ハーセブチン-IgG1		0.69	2
R255K	ハーセブチン-IgG1		0.22	1
R255S	ハーセブチン-IgG1		0	0
R255V	ハーセブチン-IgG1		0.46	1
T256E	ハーセブチン-IgG1		0	0
T256H	ハーセブチン-IgG1		0.06	1
T256V	ハーセブチン-IgG1		0.29	1
P257A	ハーセブチン-IgG1		1.88	1
P257C	ハーセブチン-IgG1		15.69	1
P257D	ハーセブチン-IgG1		0.08	1
P257E	ハーセブチン-IgG1		0.13	1
P257F	ハーセブチン-IgG1		0.05	1
P257G	ハーセブチン-IgG1		0.76	1
P257H	ハーセブチン-IgG1		0.49	1
P257I	ハーセブチン-IgG1		1.80	2
P257K	ハーセブチン-IgG1		0.07	1
P257L	ハーセブチン-IgG1		2.63	6
P257L	ハーセブチン-IgG1	I332E	5.04	1
P257L	ハーセブチン-IgG1	S239D/S332E	3.96	2
P257L/^281S	ハーセブチン-IgG1		11.26	3
P257L/G386H	ハーセブチン-IgG1		0.41	2
P257L/V279E	ハーセブチン-IgG1		3.01	3
P257L/V279Q	ハーセブチン-IgG1		12.40	3
P257L/V279Q/V284E	ハーセブチン-IgG1		0	0
P257L/V279Y	ハーセブチン-IgG1		0.75	1
P257L/V284E	ハーセブチン-IgG1		0.65	1
P257L/V308F	ハーセブチン-IgG1		6.68	4
P257L/V308Y	ハーセブチン-IgG1		3.50	3
P257L/Q311V	ハーセブチン-IgG1		23.30	3
P257L/G386N	ハーセブチン-IgG1		3.03	2
P257L/M428L	ハーセブチン-IgG1		3.73	1
P257L/N434Y	ハーセブチン-IgG1		835.00	3
P257M	ハーセブチン-IgG1		8.32	1
P257N	ハーセブチン-IgG1		2.66	8
P257N/V279E	ハーセブチン-IgG1		6.00	3
P257N/V279Q	ハーセブチン-IgG1		4.05	1
P257N/V279Q/V284E	ハーセブチン-IgG1		0	0
P257N/V279Y	ハーセブチン-IgG1		6.22	3
P257N/^281S	ハーセブチン-IgG1		5.99	3
P257N/V284E	ハーセブチン-IgG1		5.92	2
P257N/V284E/V308F	ハーセブチン-IgG1		0	0
P257N/G386H	ハーセブチン-IgG1		0.84	2
P257N/L306Y	ハーセブチン-IgG1		1.29	2
P257N/V308F	ハーセブチン-IgG1		0.88	4
P257N/V308Y	ハーセブチン-IgG1		48.20	1
P257Q	ハーセブチン-IgG1		0.25	2
P257Q/V279Q	ハーセブチン-IgG1		0.71	2
P257Q/V284E	ハーセブチン-IgG1		0	0

FIG. 13b

【図 13 c】

変異名	可変 -Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数 中央値	N
P257R	ハーセブチン-IgG1		0.29	1
P257S	ハーセブチン-IgG1		1.94	2
P257T	ハーセブチン-IgG1		1.85	1
P257V	ハーセブチン-IgG1		1.90	1
P257W	ハーセブチン-IgG1		0.24	1
P257Y	ハーセブチン-IgG1		3.40	2
P257Y/V279Q	ハーセブチン-IgG1		1.78	2
P257Y/P281S	ハーセブチン-IgG1			0
P257Y/V308F	ハーセブチン-IgG1			0
E258R	ハーセブチン-IgG1		0.19	1
E258V	ハーセブチン-IgG1		0.22	1
V279A	ハーセブチン-IgG1		5.20	1
V279C	ハーセブチン-IgG1		3.93	1
V279D	ハーセブチン-IgG1		0.93	2
V279E	ハーセブチン-IgG1		0.47	5
V279E/G385H	ハーセブチン-IgG1		0.61	3
V279E/V284E	ハーセブチン-IgG1		3.91	2
V279F	ハーセブチン-IgG1			0
V279G	ハーセブチン-IgG1		1.27	1
V279H	ハーセブチン-IgG1			0
V279I	ハーセブチン-IgG1		15.12	1
V279K	ハーセブチン-IgG1			0
V279L	ハーセブチン-IgG1		0.30	1
V279M	ハーセブチン-IgG1		2.89	1
V279N	ハーセブチン-IgG1			0
V279P	ハーセブチン-IgG1		0.31	1
V279Q	ハーセブチン-IgG1		0.50	9
V279Q/V264E	ハーセブチン-IgG1		0.68	2
V279Q/L308Y	ハーセブチン-IgG1		3.93	3
V279Q/V308F	ハーセブチン-IgG1		4.60	3
V279Q/Q311V	ハーセブチン-IgG1			0
V279Q/G385H	ハーセブチン-IgG1		1.08	4
V279R	ハーセブチン-IgG1		1.11	1
V279S	ハーセブチン-IgG1		0.98	1
V279T	ハーセブチン-IgG1		0.75	3
V279W	ハーセブチン-IgG1		0.44	1
V279Y	ハーセブチン-IgG1		0.67	5

FIG. 13c

【図 13 d】

変異名	可変 -Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数 中央値	N
V279Y/G385H	ハーセブチン-IgG1		0.58	3
V279Y/V284E	ハーセブチン-IgG1			0
V279Y/V308F	ハーセブチン-IgG1		1.59	4
D280E	ハーセブチン-IgG1		0.28	1
D280H	ハーセブチン-IgG1		0.53	2
V281A	ハーセブチン-IgG1			0
V281D	ハーセブチン-IgG1		0.89	3
V281S	ハーセブチン-IgG1		0.62	7
V281S/V284E	ハーセブチン-IgG1			0
V281S/V308F	ハーセブチン-IgG1		2.13	2
V281S/V308Y	ハーセブチン-IgG1		1.46	1
V281S/V434Y	ハーセブチン-IgG1		176.70	3
V281T	ハーセブチン-IgG1		0.58	1
V282D	ハーセブチン-IgG1		0.25	1
V282F	ハーセブチン-IgG1		0.42	1
V282H	ハーセブチン-IgG1		0.31	1
V282I	ハーセブチン-IgG1		0.36	1
V282T	ハーセブチン-IgG1		0.58	1
E283F	ハーセブチン-IgG1		0.79	3
E283F/V284E	ハーセブチン-IgG1		1.93	1
E283I	ハーセブチン-IgG1		1.15	2
E283L	ハーセブチン-IgG1		1.85	5
E283L/V284E	ハーセブチン-IgG1			0
E283Y	ハーセブチン-IgG1			0
V284D	ハーセブチン-IgG1			0
V284E	ハーセブチン-IgG1		0.68	10
V284E/G385H	ハーセブチン-IgG1		1.13	3
V284E/L306Y	ハーセブチン-IgG1		0.68	3
V284E/V308F	ハーセブチン-IgG1		3.96	3
V284E/V308Y	ハーセブチン-IgG1		0.22	1
V284H	ハーセブチン-IgG1			0
V284K	ハーセブチン-IgG1		0.15	1
V284P	ハーセブチン-IgG1			0
V284Q	ハーセブチン-IgG1		1.60	2
V284R	ハーセブチン-IgG1			0
V284S	ハーセブチン-IgG1		0.48	2
V284Y	ハーセブチン-IgG1		0.55	1
H285F	ハーセブチン-IgG1		0.98	1
H285S	ハーセブチン-IgG1		0.89	2
H285V	ハーセブチン-IgG1		0.74	2
deleteN286	ハーセブチン-IgG1		1.95	1
N286D	ハーセブチン-IgG1		10.18	1
N286L	ハーセブチン-IgG1		1.45	1

FIG. 13d

【図 13 e】

変異名	可変 -Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数 中央値	N
A287H	ハーセブチン-IgG1		0.81	1
A287S	ハーセブチン-IgG1		1.27	2
A287V	ハーセブチン-IgG1		0.74	1
A287Y	ハーセブチン-IgG1		0.52	1
K288D	ハーセブチン-IgG1			0
K288H	ハーセブチン-IgG1		0.53	2
K288Q	ハーセブチン-IgG1		0.33	1
K288R	ハーセブチン-IgG1		0.27	3
K288S	ハーセブチン-IgG1		0.03	1
V305H	ハーセブチン-IgG1		0.51	1
V305T	ハーセブチン-IgG1		0.55	1
L306E	ハーセブチン-IgG1			0
L306F	ハーセブチン-IgG1		0.46	1
L306H	ハーセブチン-IgG1			0
L306I	ハーセブチン-IgG1		0.70	2
L306N	ハーセブチン-IgG1		0.91	1
L306T	ハーセブチン-IgG1		0.64	2
L306V	ハーセブチン-IgG1		0.34	1
L306Y	ハーセブチン-IgG1		1.18	6
T307D	ハーセブチン-IgG1		0.82	1
T307V	ハーセブチン-IgG1		0.57	3
T307Y	ハーセブチン-IgG1			0
V308A	ハーセブチン-IgG1		1.38	1
V308C	ハーセブチン-IgG1		2.84	1
V308D	ハーセブチン-IgG1		0.02	1
V308E	ハーセブチン-IgG1			0
V308F	ハーセブチン-IgG1		2.87	14
V308F	ハーセブチン-IgG1	S298A/E333A/K334A	38.04	1
V308F	ハーセブチン-IgG1	I332E	1.82	3
V308F	ハーセブチン-IgG1	S239D/R332E	1.91	3
V308F/Q311V	ハーセブチン-IgG1		11.73	1
V308F/G385H	ハーセブチン-IgG1		1.62	3
V308F/G385N	ハーセブチン-IgG1			0
V308F/M428L	ハーセブチン-IgG1		11.79	1
V308F/N434Y	ハーセブチン-IgG1		353.73	3

FIG. 13e

【図 13 f】

変異名	可変 -Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数 中央値	N
V309G	ハーセブチン-IgG1		0.18	1
V308H	ハーセブチン-IgG1			0
V308I	ハーセブチン-IgG1		0.48	1
V308K	ハーセブチン-IgG1		0.53	1
V308L	ハーセブチン-IgG1		0.48	1
V308M	ハーセブチン-IgG1		0.45	1
V308N	ハーセブチン-IgG1		1.22	3
V308P	ハーセブチン-IgG1			0
V308Q	ハーセブチン-IgG1		0.58	1
V308R	ハーセブチン-IgG1		1.56	1
V308S	ハーセブチン-IgG1		0.15	1
V308T	ハーセブチン-IgG1		0.45	2
V308V	ハーセブチン-IgG1		9.57	1
V308Y	ハーセブチン-IgG1		4.25	4
V308Y/G385H	ハーセブチン-IgG1			0
L309F	ハーセブチン-IgG1		0.36	1
L309H	ハーセブチン-IgG1			0
L309I	ハーセブチン-IgG1		0.34	2
L309N	ハーセブチン-IgG1			0
L309P	ハーセブチン-IgG1			0
L309Q	ハーセブチン-IgG1		0.15	1
L309V	ハーセブチン-IgG1		0.59	3
L309Y	ハーセブチン-IgG1		0.20	1
H310K	ハーセブチン-IgG1		0.62	2
H310N	ハーセブチン-IgG1		0.39	1
H310T	ハーセブチン-IgG1		0.39	2
Q311A	ハーセブチン-IgG1		2.52	1
Q311H	ハーセブチン-IgG1		0.87	1
Q311L	ハーセブチン-IgG1		2.34	1
Q311S	ハーセブチン-IgG1			0
Q311T	ハーセブチン-IgG1		1.47	1
Q311V	ハーセブチン-IgG1		3.15	3
Q311W	ハーセブチン-IgG1		0.69	1
D312H	ハーセブチン-IgG1		0.38	1
W313Y	ハーセブチン-IgG1		0.48	1
N315E	ハーセブチン-IgG1		0.53	1
N315G	ハーセブチン-IgG1			0
N315H	ハーセブチン-IgG1		0.45	1
N315Q	ハーセブチン-IgG1		0.79	3
N315R	ハーセブチン-IgG1		0.48	1
N315S	ハーセブチン-IgG1		0.31	1
N315T	ハーセブチン-IgG1		1.72	1
K317H	ハーセブチン-IgG1		0.71	1
K317S	ハーセブチン-IgG1			0
A339P	ハーセブチン-IgG1			0

FIG. 13f

【図 13 g】

変異体	可変 -Fc 領域	バックグラウンド		増加倍数 中央値	N
		変異			
K340P	ハーセブチン-IgG1			0.54	1
G341S	ハーセブチン-IgG1			0.77	1
P374H	ハーセブチン-IgG1				0
P374S	ハーセブチン-IgG1			0.59	1
D378H	ハーセブチン-IgG1			0.42	1
D378L	ハーセブチン-IgG1			0.49	1
A378H	ハーセブチン-IgG1			0.50	1
A378N	ハーセブチン-IgG1			0.58	1
E380T	ハーセブチン-IgG1				0
E380Y	ハーセブチン-IgG1			0.35	1
E382H	ハーセブチン-IgG1			0.43	3
S383H	ハーセブチン-IgG1			0.96	1
S383K	ハーセブチン-IgG1				0
S383Q	ハーセブチン-IgG1			0.90	1
N384E	ハーセブチン-IgG1			0.57	1
N384G	ハーセブチン-IgG1			0.38	1
N384H	ハーセブチン-IgG1			0.57	1
G385A	ハーセブチン-IgG1			0.27	1
G385C	ハーセブチン-IgG1			0.36	1
G385D	ハーセブチン-IgG1			0.64	1
G385E	ハーセブチン-IgG1			6.12	1
G385F	ハーセブチン-IgG1				0
G385H	ハーセブチン-IgG1			1.05	5
G385H	ハーセブチン-IgG1	G32E		1.37	3
G385H	ハーセブチン-IgG1	S239D/A332E		17.37	2
G389	ハーセブチン-IgG1				0
G389K	ハーセブチン-IgG1			0.38	1
G389L	ハーセブチン-IgG1				0
G389M	ハーセブチン-IgG1				0
G389N	ハーセブチン-IgG1			2.94	2
G389P	ハーセブチン-IgG1				0
G389Q	ハーセブチン-IgG1				0
G389R	ハーセブチン-IgG1			0.11	1
G389S	ハーセブチン-IgG1			0.18	1
G389T	ハーセブチン-IgG1			0.16	1
G389V	ハーセブチン-IgG1			0.13	1
G389W	ハーセブチン-IgG1			0.08	1
G389Y	ハーセブチン-IgG1				0
Q389E	ハーセブチン-IgG1			0.85	1
Q389H	ハーセブチン-IgG1			0.98	1
Q389K	ハーセブチン-IgG1			0.05	1

FIG. 13g

【図 13 h】

変異体	可変 -Fc 領域	バックグラウンド		増加倍数 中央値	N
		変異			
deleteP387	ハーセブチン-IgG1				0
P387A	ハーセブチン-IgG1			0.26	1
P387H	ハーセブチン-IgG1			1.04	1
P387K	ハーセブチン-IgG1			0.86	1
P387Q	ハーセブチン-IgG1			1.06	1
N389E	ハーセブチン-IgG1			0.78	1
N389H	ハーセブチン-IgG1			0.53	1
S428E	ハーセブチン-IgG1			0.60	1
S428H	ハーセブチン-IgG1			1.14	1
S428L	ハーセブチン-IgG1			1.30	1
S428N	ハーセブチン-IgG1			0.25	1
S428R	ハーセブチン-IgG1			1.47	1
S428V	ハーセブチン-IgG1			1.38	1
S428Y	ハーセブチン-IgG1			0.53	1
V427A	ハーセブチン-IgG1			0.81	1
V427I	ハーセブチン-IgG1			0.64	1
M428L	ハーセブチン-IgG1			2.92	5
H428D	ハーセブチン-IgG1			0.47	2
H428F	ハーセブチン-IgG1			0.13	1
H428K	ハーセブチン-IgG1				0
H428N	ハーセブチン-IgG1			0.50	2
H428Q	ハーセブチン-IgG1			1.40	1
H429S	ハーセブチン-IgG1			0.53	3
H429T	ハーセブチン-IgG1			0.66	3
H429Y	ハーセブチン-IgG1			0.13	1
E430D	ハーセブチン-IgG1			0.20	1
E430H	ハーセブチン-IgG1			0.35	1
E430K	ハーセブチン-IgG1				0
E430L	ハーセブチン-IgG1			0.50	1
E430Q	ハーセブチン-IgG1			0.26	1
E430Y	ハーセブチン-IgG1				0
A431G	ハーセブチン-IgG1			0.05	1
A431H	ハーセブチン-IgG1			0.45	3
A431I	ハーセブチン-IgG1			0.55	1
A431P	ハーセブチン-IgG1				0
A431S	ハーセブチン-IgG1			0.51	1
L432F	ハーセブチン-IgG1			0.39	1
L432H	ハーセブチン-IgG1				0
L432N	ハーセブチン-IgG1			0.45	1
L432S	ハーセブチン-IgG1			0.57	1
L432V	ハーセブチン-IgG1			0.73	3
H433E	ハーセブチン-IgG1				0
H433N	ハーセブチン-IgG1			0.19	1
H433P	ハーセブチン-IgG1			1.18	1
H433R	ハーセブチン-IgG1			0.88	1
H433S	ハーセブチン-IgG1				0

FIG. 13h

【図 13 i】

変異体	可変 -Fc 領域	バックグラウンド		増加倍数 中央値	N
		変異			
N434A	ハーセブチン-IgG1			3.23	6
N434H	ハーセブチン-IgG1			3.91	1
N434L	ハーセブチン-IgG1			0.16	1
N434Q	ハーセブチン-IgG1			0.15	1
N434S	ハーセブチン-IgG1			0.28	1
N434Y	ハーセブチン-IgG1			18.25	3
H435N	ハーセブチン-IgG1			0.19	1
Y436E	ハーセブチン-IgG1			0.39	1
Y436F	ハーセブチン-IgG1			0.39	2
Y436H	ハーセブチン-IgG1			0.48	1
Y436L	ハーセブチン-IgG1			0.28	1
Y436Q	ハーセブチン-IgG1			0.24	1
Y436V	ハーセブチン-IgG1			0.51	1
Y436W	ハーセブチン-IgG1			0.30	1
T437E	ハーセブチン-IgG1				0
T437V	ハーセブチン-IgG1			0.16	1
Q438E	ハーセブチン-IgG1			0.28	1
Q438H	ハーセブチン-IgG1			0.24	1
Q438K	ハーセブチン-IgG1			0.24	1

FIG. 13i

【図 13 j】

変異体	可変 -Fc 領域	バックグラウンド		増加倍数 中央値	N
		変異			
WT	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc v1			1.45	6
WT	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
P257L	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
V308F	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
G385H	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
WT	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
P257L	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
V308F	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
G385H	ハーセブチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
P257L	AC10-IgG1				0
V308F	AC10-IgG1				0
G385H	AC10-IgG1				0
P257L	AC10-IgG1	S239D/A332E			0
V308F	AC10-IgG1	S239D/A332E			0
G385H	AC10-IgG1	S239D/A332E			0
P257L	AC10-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
V308F	AC10-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
G385H	AC10-IgG1/2 ハイブリッド Fc				0
P257L	AC10-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
V308F	AC10-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
G385H	AC10-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/A332E			0
T250Q	AC10-IgG1	S239D/A332E		0.59	1
V284D	AC10-IgG1	S239D/A332E		0.88	1
V284E	AC10-IgG1	S239D/A332E		0.17	1
M428L	AC10-IgG1	S239D/A332E		1.82	1

FIG. 13j

【図 14 a】

実質	FoRn 結合比 実質 / WT
D221K	5.66
D221Y	2.74
K222Y	1.31
T223E	2.04
T223K	2.97
H224E	5.11
H224Y	1.68
T225E	4.89
T225K	5.68
T225W	6.88
P227E	1.49
P227G	1.67
P227K	1.45
P228G	1.77
P228K	1.55
P228Y	1.45
P230E	1.01
P230G	1.16
P232K	1.56
E233G	2.09
E233M	1.13
E233R	1.05
E233S	1.10
E233T	1.19
E233W	1.64
E233Y	1.86
L234D	1.54
L234E	1.25
L234F	1.46
L234G	2.54
L234H	1.48
L234I	1.28
L234M	1.03
L234N	1.06
L234R	1.19
L234V	1.45
L234Y	1.90
L235N	1.32
L235Q	1.67
L235S	1.51
L235T	1.65
L235V	1.31
L235Y	1.02
G236A	1.75
G236D	1.53

FIG. 14a

G236A	1.75
G236D	1.53
G236E	1.46
G236F	1.75
G236H	1.48
G236I	1.33
G236K	1.38
G236M	1.60
G236N	1.89
G236P	1.41
G236Q	1.46
G236R	1.99
G236S	1.77
G236T	1.56
G236V	1.35
G236W	1.52
G236Y	1.52
G237D	1.84
G237E	1.36
G237H	1.48
G237I	1.01
G237K	1.47
G237L	5.91
G237M	73.39
G237N	1.39
G237P	2.80
G237Q	1.39
G237R	1.36
G237S	1.29
G237T	1.32
G237W	1.20
G237Y	1.92
P238D	1.03
P238E	3.71
P238F	2.41
P238G	1.53
P238H	1.46
P238I	1.44
P238K	5.01
P238L	1.71
P238M	2.33
P238N	1.15
P238S	1.12
P238T	1.12
P238V	1.43
P238W	1.30

【図 14 b】

P238W	1.30
S238D	1.73
S238D/D265H/N297 D/I332E	1.26
S238D/D265H/N297D I332E	1.81
S238D/E272S/I332E	1.49
S238D/E272Y/I332E	1.31
S238D/I332D	1.12
S238D/I332E	1.22
S238D/K326T/I332E	2.22
S238D/N297D/I332E	3.09
S238E	1.47
S238E/I332E	1.34
S238E/N297D/I332E	2.36
S238E/V264I/A330Y/ I332E	2.71
S238E/V264I/I332E	2.71
S238E/V264I/S298A/ A330Y/I332E	10.14
S239G	1.16
S239L	4.60
S239M	1.03
S239Q/I332E	1.33
S239Q/I332N	1.11
S239Q/I332Q	1.04
S239Q/V264I/I332E	1.04
S239R	1.04
S239T	1.12
S239V	1.17
S239Y	1.28
V240I	2.50
V240M	2.51
V240T	1.09
F241E	1.99
F241L	1.37
F241L/V262I	1.70
F241W	1.12
F241W/F243W/V262 A/V264A	1.91
F241Y/F243Y/V262I N294T	1.89

F241Y/F243Y/V262I N294T	1.89
F243E	1.14
F243L/V262I/V264W	1.35
F243W	4.63
K248H	4.02
K248Y	2.47
D249Q	2.06
D249Y	2.57
R255E	1.16
R255Y	12.88
E258Y	1.07
T260D	1.71
T260E	5.49
T260H	7.30
T260Y	7.51
V262E	9.27
V263I	2.71
V264A	1.12
V264D	7.67
V264F	1.07
V264I	1.32
V264I/A330L/I332E	1.13
V264I/I332E	1.70
V264N	3.39
V264S	5.13
V264T	1.66
D265F/N297E/I332E	1.36
D265G	1.74
D265P	1.18
D265R	1.16
V265I	1.28
S267E	2.24
S267K	1.70
S267L/A327S	1.05
H268E	1.71
H268M	1.88
E269F	1.51
E269G	1.34
E269I	1.28
E269K	1.23
E269M	1.11
E269P	1.23
E269S	1.31
E269V	1.38
E269W	1.19
E269Y	24.75

FIG 14b

【図 14 c】

E269Y	24.75
D270I	1.23
D270S	1.03
P271A	1.01
P271I	1.99
P271S	1.14
P271T	3.88
P271V	1.06
P271Y	1.48
E272D	1.37
E272H	1.45
E272I	1.05
E272L	1.81
E272P	2.17
E272R	1.83
E272T	2.46
E272V	1.77
E272W	1.82
E272Y	2.08
K274E	1.06
K274F	1.02
K274G	1.04
K274I	1.08
K274M	1.01
K274N	1.26
K274T	1.08
N276D	1.18
N276F	1.19
N276H	1.19
N276L	1.21
N276R	1.19
N276V	1.27
N276W	2.00
Y278D	1.79
Y278I	1.52
Y278L	1.74
Y278M	1.28
Y278N	1.33
Y278R	1.23
Y278S	1.23
Y278V	1.27
G281D	1.33
G281Y	1.48
V282E	1.91

FIG. 14c

V282E	1.91
V282G	1.16
V282K	1.44
V282Y	1.92
E283H	9.25
E283K	2.74
E283L	9.25
E283P	1.33
E283R	1.86
E283Y	1.42
V284E	25.76
V284I	1.51
V284T	1.15
H285D	2.40
H285E	1.93
H285K	1.76
H285Q	1.38
H285W	1.33
H285Y	1.25
N286E	2.12
N286P	2.90
N286Y	1.45
K288Y	1.10
P291H	2.58
P291I	1.15
P291Q	1.24
R292D	1.67
R292E	1.45
R292Y	1.38
E294G	1.25
E294I	1.09
E294K	1.16
Q295T	3.82
Q295V	1.19
Y296E	1.23
Y296I	1.71
Y296L	2.78
Y296S	1.54
S298E	1.15
S298F	3.99
S298H	2.13
S298T	1.86
T299F	2.03
T299H	1.09
T299W	3.86

【図 14 d】

T299Y	3.85
Y300A	1.04
Y300E	1.27
Y300G	1.07
Y300K	1.01
Y300M	1.10
Y300N	1.14
Y300Q	1.11
Y300V	1.09
R301E	2.92
V302I	2.44
V302E	1.53
V303Y	1.15
S304N	1.19
S304T	2.86
E318L	3.61
E318R	1.17
E318Y	6.14
K320H	1.13
K320L	1.07
K320N	2.01
K320W	1.11
S324D	1.27
S324G	2.74
S324T	1.07
N325F	1.45
N325M	1.22
N325T	1.43
N325V	1.01
A327D	1.01
A327H	1.29
A327K	1.01
A327L	1.55
A327M	1.08
A327Y	1.23
L328A	1.32
L328D/I332E	11.84
L328E/I332E	1.44
L328F	2.06
L328G	1.16
L328H/I332E	1.16
L328I/I332E	2.21
L328N/I332E	1.16
L328Q/I332E	4.29
L328R	1.82

L328R	1.82
L328W	1.35
P329K	1.27
P329R	1.54
P329W	3.16
A330F	25.29
A330G	1.01
A330H	9.87
A330I	1.50
A330L/I332E	1.50
A330P	5.46
A330R	1.78
A330V	1.02
A330W	1.63
A330Y/I332E	1.63
P331F	3.91
P331L	1.77
P331Y	6.06
I332D	1.75
I332E	1.32
I332H	1.24
I332N	1.20
I332Q	1.02
I332T	69.27
I332V	1.43
I332Y	1.96
E333F	1.03
E333L	5.46
E333M	1.19
T335F	1.16
T335H	1.41
T335I	1.50
T335L	1.35
T335M	1.23
T335N	1.45
T335P	1.42
T335S	1.25
T335V	1.35
T335W	8.11
I336E	12.12

FIG. 14d

【図 15】

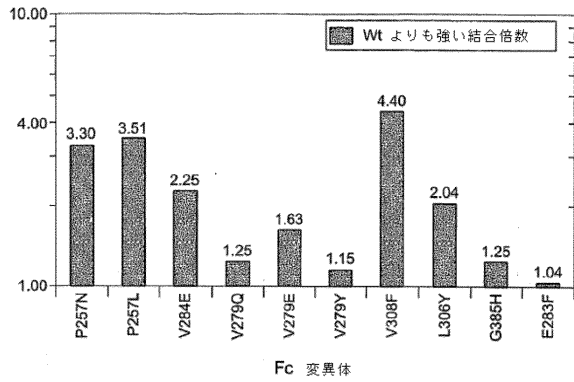


FIG. 15

【図 16 a-1】

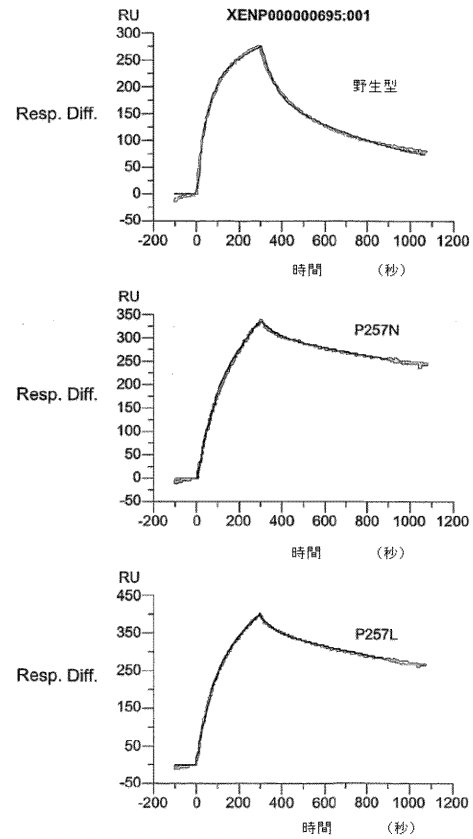


FIG. 16a-1

【図 16 a-2】

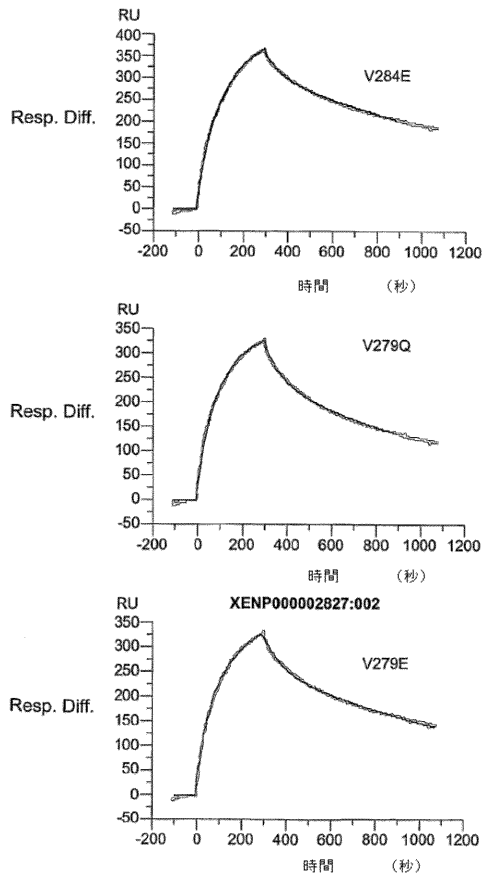


FIG. 16a-2

【図 16 b-1】

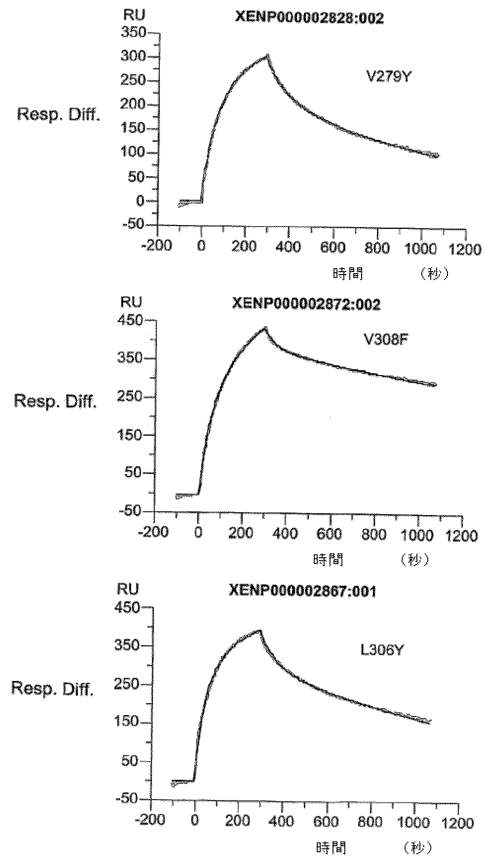


FIG. 16b-1

【図 16b-2】

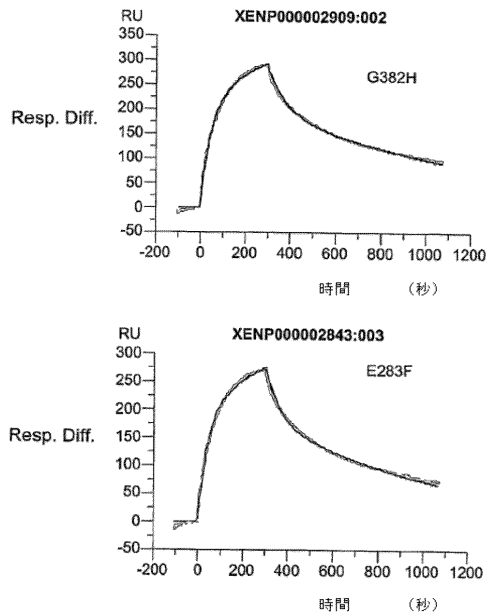


FIG. 16b-2

【図 17a】

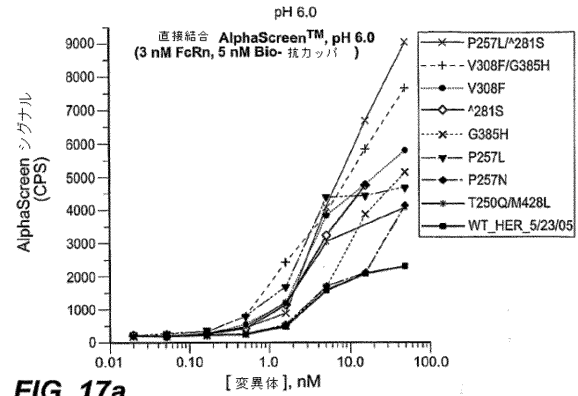


FIG. 17a

【図 17b】

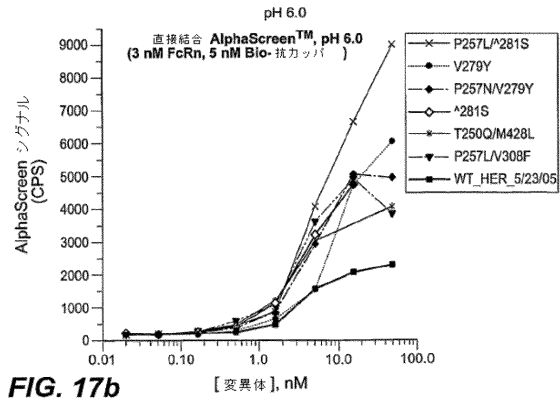


FIG. 17b

【図 17c】

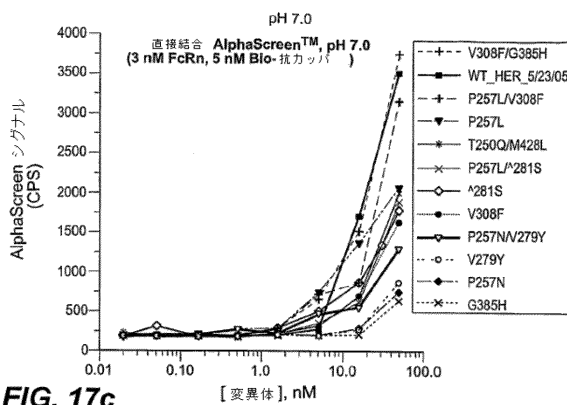


FIG. 17c

【図 18】

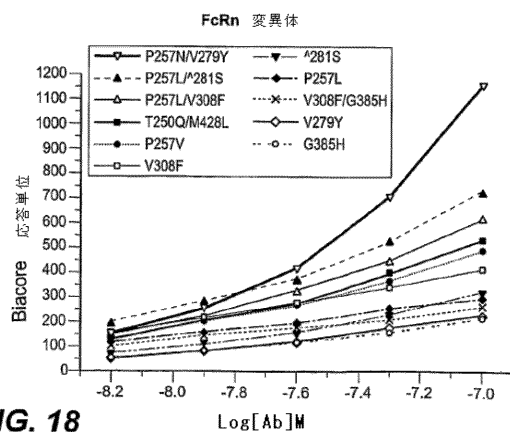


FIG. 18

【配列表】

0004652414000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/649,508
(32)優先日 平成17年2月2日(2005.2.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/662,468
(32)優先日 平成17年3月15日(2005.3.15)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/669,311
(32)優先日 平成17年4月6日(2005.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/681,607
(32)優先日 平成17年5月16日(2005.5.16)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/690,200
(32)優先日 平成17年6月13日(2005.6.13)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/696,609
(32)優先日 平成17年7月5日(2005.7.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/703,018
(32)優先日 平成17年7月27日(2005.7.27)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/726,453
(32)優先日 平成17年10月12日(2005.10.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (74)代理人 100114007
弁理士 平山 孝二
- (72)発明者 アーロン・キース・チェインバーレイン
アメリカ合衆国91107カリフォルニア州パサディナ、イースト・デル・マー・ブルバード2
445番、ナンバー405
- (72)発明者 ジョン・アール・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、ノース・ミシガン・アベニュー1030
番
- (72)発明者 シャー・バハドゥル・カーキ
アメリカ合衆国91767カリフォルニア州ポモナ、プロビデンス・ウェイ2833番
- (72)発明者 グレゴリー・アラン・ラザー
アメリカ合衆国91007カリフォルニア州アルカディア、アルカディア・アベニュー750番、
ナンバー6
- (72)発明者 ヨスト・フィールメッター
アメリカ合衆国91001カリフォルニア州アルタデナ、アラメダ・ストリート495番
- (72)発明者 シーン・クリストファー・ヨダー
アメリカ合衆国93063カリフォルニア州シミ・バレー、オロンテス・ウェイ4168ーシー番

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 国際公開第98/023289 (WO, A1)
J. Biol. Chem., vol. 276, pages 6591-6604 (2001)
J. Immunol., vol. 169, pages 5171-5180 (2002)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 16/00

C12N 15/09

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)