

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5055603号
(P5055603)

(45) 発行日 平成24年10月24日 (2012. 10. 24)

(24) 登録日 平成24年8月10日 (2012. 8. 10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 C
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 M
請求項の数 7 (全 112 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2007-524825 (P2007-524825)	(73) 特許権者	512182289
(86) (22) 出願日	平成17年7月18日 (2005. 7. 18)		メントリック・バイオテック・リミテッド
(65) 公表番号	特表2008-511292 (P2008-511292A)		・ライアビリティ・カンパニー
(43) 公表日	平成20年4月17日 (2008. 4. 17)		MENTRIK BIOTECH, LLC
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/025276		アメリカ合衆国75251テキサス州ダラス、コイト・ロード12400番、スイート570
(87) 国際公開番号	W02006/020114	(74) 代理人	100068526
(87) 国際公開日	平成18年2月23日 (2006. 2. 23)		弁理士 田村 恭生
審査請求日	平成20年7月16日 (2008. 7. 16)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	60/598, 855		弁理士 鯨島 睦
(32) 優先日	平成16年8月4日 (2004. 8. 4)	(74) 代理人	100126778
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 品川 永敏
(31) 優先権主張番号	60/602, 953	(74) 代理人	100150500
(32) 優先日	平成16年8月19日 (2004. 8. 19)		弁理士 森本 靖
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異 F c 領域

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軽鎖および重鎖を含む抗 C D 2 0 抗体であって、該軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 2 9 からなり、かつ、該重鎖のアミノ酸配列は配列番号 3 1 からなることを特徴とする、抗 C D 2 0 抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 抗体および医薬的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 3】

有効成分として請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 抗体を含む、リンパ腫を治療するための医薬。

【請求項 4】

2 つの軽鎖および 2 つの重鎖を含む抗 C D 2 0 抗体であって、各軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 2 9 からなり、かつ、各重鎖のアミノ酸配列は配列番号 3 1 からなることを特徴とする、抗 C D 2 0 抗体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の抗 C D 2 0 抗体および医薬的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 6】

有効成分として請求項 4 に記載の抗 C D 2 0 抗体を含む、リンパ腫を治療するための医薬。

【請求項 7】

(a) 重鎖をコードする核酸であって、該重鎖のアミノ酸配列は配列番号 31 からなる、核酸；および

(b) 軽鎖および重鎖をコードする核酸であって、該軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 29 からなり、該重鎖のアミノ酸配列は配列番号 31 からなる、核酸；
からなる群から選択される、単離された核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な変異 Fc 領域を含むポリペプチドに関する。具体的には、本発明の新規な変異 Fc 領域は、本願明細書において記載される少なくとも 1 つのアミノ酸置換で含
み、アミノ酸置換が欠失している母体免疫グロブリンと比べて、本発明の変異 Fc 領域を
含む免疫グロブリンにおけるエフェクター機能又は血清半減期を改変する。更に、本発明
は、モノクローナル抗体のエフェクター機能を改変する方法、又は、本発明の変異 Fc 領
域が作動可能な状態で付着されるポリペプチドの血清半減期を延長させる方法を提供す
る。ポリペプチド、タンパク質、特にモノクローナル抗体の治療的な使用が開示される。

【背景技術】

【0002】

ヒト治療法における使用において、米国で現在承認される少なくとも 17 種類のモノク
ローナル抗体が存在する。更に、例えば、移植拒絶、ガン、炎症性疾患、敗血症、腎炎、
アルツハイマー疾患、アレルギー、糖尿病、自己免疫疾患、関節炎、多発性硬化症、及び
、感染症を含む様々な疾患又は障害の治療のため、臨床試験中の数百種類のモノクロー
ナル抗体、及び、前臨床前試験中の数千種類のモノクローナル抗体が存在する。治療用モノ
クローナル抗体の分野は、近年において急成長する位置づけとなっている。ワクチン後、
抗体（又は免疫グロブリン「Ig」）は、2 番目に多くの一般的な種類の臨床的に試験さ
れる生物薬剤を構成する（Stockwin, L. H. 他 Biochemical
Society Transactions, 31: 433-436, 2003）。

【0003】

実質的に、遺伝子工学は、治療用モノクローナル抗体の分野の成長に関与する。潜在す
る治療用モノクローナル抗体の効果は、抗体のタンパク質配列への適度な変化によって異
なる。モノクローナル抗体の可変領域における単一アミノ酸変化は、抗体属性（例えば K
on 速度又は Koff 速度）と同様、抗体が抗原エпитープに結合する親和性を改変する
潜在性を有する。このようなアミノ酸変化は、治療用としてモノクローナル抗体の成功又
は失敗を測定することができる。同様に、モノクローナル抗体の Fc 領域のアミノ酸配列
における適度の変化は、Fc 領域が作動可能な状態で結合される抗体のエフェクター機能
の属性又はタンパク質の半減期において重大な変化を引き起こす。

【0004】

抗体の Fc 領域（つまり、CH2 領域、CH3 領域、及び一部のヒンジ領域にわたる抗
体の重鎖のカルボキシ末端（図 1 参照））は、変異性において制限され、抗体が果たす生
理的役割をもたらすのに関与する。抗体の Fc 領域に起因するエフェクター機能は、抗体
の分類及びサブクラスによって異なり、かつ、(i) 例えば、抗体を覆われた粒子の食細
胞活動及び破壊、免疫複合体の除去、炎症伝達物質の放出、抗体の経胎盤伝達、並びに、
免疫グロブリン産生の制御を含む、Fc 領域を介して様々な生物反応を誘発する細胞上の
特定の Fc 受容体（「FcR」）への抗体の結合と、(ii) Fc 領域が C1q 補体成分
と結合することによって、標的細胞溶解現象を導く補体活性化の古典経路を開始する補体
依存性細胞障害作用（「CDC」）と、(iii) 特定のヒト免疫系細胞、例えば、Fc
γ 受容体を介した貪食細胞及び NK 細胞が、免疫細胞上の特異抗体結合する受容体を介し
て抗体の Fc 領域に結合し、その後、抗体が結合する物質の破壊の信号を送る、抗体依存
の細胞媒介性細胞障害反応（「ADCC」）と、及び、(iv) 肥満細胞、好塩基球、及び、
好酸球への結合と、を含む。Fc 領域が特定の FcR（例えば FcRn）に結合する
か、或いは、Fc 領域が CDC 又は ADCC を媒介することができるレベルが治療用タン

パク質、特に、モノクローナル抗体の有効性又は半減期を測定するための重要な要素である。

【0005】

ヒト IgG の Fc 領域におけるアミノ酸の詳細な修飾は、治療用タンパク質、特にモノクローナル抗体の開発に関連する構造機能相関情報を得る研究の活発な領域である（Fc 領域が作動可能に結合されるポリペプチドの血清半減期の改変に関する米国特許第 6, 165, 745 号明細書及び国際公開第 2004/035752 号パンフレット、及び、修飾された Fc 領域を含むモノクローナル抗体のエフェクター機能の改変に関する米国特許第 6, 737, 056 号明細書及び国際公開第 2004/029207 号パンフレットを参照）。

10

【0006】

新規な治療用タンパク質（特にモノクローナル抗体）の開発は、対象とする抗体に所望の有益な属性を与えるように特定のアミノ酸改質によって Fc 領域を合理的に設計することによって利益をもたらす。Fc 領域における同じ特定のアミノ酸改質によって、全てのモノクローナル抗体が治療用として改善されることが期待されるというわけでない。ある標的抗原と結合する治療用モノクローナル抗体は、特定のエフェクター機能における増加によって利益をもたらす一方、異なる標的抗原と結合する異なる治療用モノクローナル抗体が、異なるエフェクター機能の増加又は減少によって利益をもたらす。ある治療用モノクローナル抗体は、大きな親和性で特定の Fc 受容体と結合することによって利益をもたらす一方、別の抗体は、低い親和性において Fc 受容体に結合し、速い速度で身体から除去することによって治療的に改善される。更にまた、特定の Fc 領域アミノ酸改質又は置換、及び、治療用抗体に利点をもたらす効果は、抗体が結合する抗原標的及び／又は抗体によって改善する疾患又は障害に依存する。

20

【0007】

抗体の Fc 領域に関連する特定のエフェクター機能を改変する方法及び組成物は、所望の属性を有する新規な治療用抗体を生成するとともに、既存の治療用抗体の属性を改善するのに必要である。変異 Fc 領域を有するモノクローナル抗体は、例えば、炎症性疾患、ガン、自己免疫不全、細胞信号伝達障害、及び感染症を含む様々な疾患又は障害を治療するために使用される。更に、血清半減期を増加させて少量の用量に抑えるか、或いは、血清半減期を減少させて身体から速く除去させるように促すといった、治療用タンパク質の血清半減期を改変する方法及び組成物は、治療用抗体のみならず他のタンパク質の産生の利点をもたらす。

30

【0008】

治療用タンパク質（特にモノクローナル抗体）の有効性を改善するために必要とされるものは、改善した属性を有する変異 Fc 領域である。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、変異 Fc 領域（即ち、本願明細書に記載のアミノ酸置換を含む Fc 領域（例えば表 1 参照））を提供し、前記変異 Fc 領域を含むポリペプチドに有益な属性を与える。

40

【0010】

本発明の変異 Fc 領域を生成するアミノ酸置換の母体 Fc 領域の Fc の位置は、279 位、341 位、343 位、及び 373 位であり、Fc 領域における残基の番号付け、つまり、位置番号は、Kabat の EU インデックスの番号付けである（本願明細書中の図 2 を参照）。本発明は、母体 Fc 領域の 279 位、341 位、343 位、又は 373 位、或いは、それらの組合せにおけるアミノ酸置換を含む変異 Fc 領域を提供する。母体 Fc 領域は、279 位、341 位、343 位、及び 373 位以外の位置における変性のアミノ酸残基を任意に有する。ヒト IgG の位置における天然のアミノ酸残基は、バリン（279）、グリシン（341）、プロリン（343）、及びチロシン（373）である。

50

【0011】

本発明の全体にわたる好ましい実施形態において、母体Fc領域に存在して置換されるアミノ酸残基は、自然発生のアミノ酸残基である。特に明記しない限り、母体Fc領域は、天然又は変性のFc領域であり、好ましくはヒト起源又は実質的にヒト起源のFc領域である。母体Fc領域のアミノ酸配列は、好ましくは配列番号1、2、3、又は4で示される。好ましくは、母体Fc領域は、本発明の変異Fc領域を生成するために置換される位置に存在する天然のアミノ酸残基を有する。更に、全体にわたって、本願明細書に記載されているように、変異Fc領域は、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように修飾される母体Fc領域であることが理解される。更に、母体Fc領域が変異Fc領域を生成するために置換されるアミノ酸残基を含む、全長Fc又はその一部であると理解される。

10

【0012】

更なる本発明は、ポリペプチド（好ましくはモノクローナル抗体）を提供し、母体Fc領域と比較して、279位、341位、343位、又は373位において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む変異Fc領域（又はその機能性フラグメント）を含む。Fc位置である279位、341位、343位、又は373位において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む変異Fc領域は、変異Fc領域と同じ種類の天然のFc領域に存在するアミノ酸残基と比較して、少なくとも1つの付加的なアミノ酸置換をFc領域に更に含む。

【0013】

一実施形態において、変異Fc領域（即ち、母体Fc領域の変異体）は、以下から選択される少なくとも1、2、3、又はそれ以上のアミノ酸置換を含む。

20

235G、235R、236F、236R、236Y、237K、237N、237R、
238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、
244L、245R、247A、247D、247E、247F、247M、247N、
247Q、247R、247S、247T、247W、247Y、248F、248P、
248Q、248W、249L、249M、249N、249P、249Y、251H、
251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、
254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254V、
254W、254Y、255K、255N、256H、256I、256K、256L、
256V、256W、256Y、257A、257I、257M、257N、257S、
258D、260S、262L、264S、265K、265S、267H、267I、
267K、268K、269N、269Q、271T、272H、272K、272L、
272R、279A、279D、279F、279G、279H、279I、279K、
279L、279M、279N、279Q、279R、279S、279T、279W、
279Y、280T、283F、283G、283H、283I、283K、283L、
283M、283P、283R、283T、283W、283Y、285N、286F、
288N、288P、292E、292F、292G、292I、292L、293S、
293V、301W、304E、307E、307M、312P、315F、315K、
315L、315P、315R、316F、316K、317P、317T、318N、
318P、318T、332F、332G、332L、332M、332S、332V、
332W、339D、339E、339F、339G、339H、339I、339K、
339L、339M、339N、339Q、339R、339S、339W、339Y、
341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、
341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、
341Y、343A、343D、343E、343F、343G、343H、343I、
343K、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、
343V、343W、343Y、373D、373E、373F、373G、373H、
373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373S、
373T、373V、373W、375R、376E、376F、376G、376H、
376I、376L、376M、376N、376P、376Q、376R、376S、
376T、376V、376W、376Y、377G、377K、377P、378N

30

40

50

、 379N、379Q、379S、379T、380D、380N、380S、380T
 、 382D、382F、382H、382I、382K、382L、382M、382N
 、 382P、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y
 、 385E、385P、386K、423N、424H、424M、424V、426D
 、 426L、427N、429A、429F、429M、430A、430D、430F
 、 430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430P
 、 430Q、430R、430S、430T、430V、430W、430Y、431H
 、 431K、431P、432R、432S、438G、438K、438L、438T
 、 438W、439E、439H、439Q、440D、440E、440F、440G
 、 440H、440I、440K、440L、440M、440Q、440T、440V 10
 、又は442K。

【0014】

好ましい実施形態において、変異Fc領域は、以下から選択される少なくとも1、2、3、又はそれ以上のアミノ酸置換を含む。

235G、236F、236R、236Y、237K、237N、237R、238E
 、 238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、245R
 、 247A、247D、247E、247F、247M、247N、247Q、247R
 、 247T、247W、247Y、248F、248P、248Q、248W、249L
 、 249M、249N、249P、249Y、251H、251I、251W、254D 20
 、 254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M
 、 254N、254P、254Q、254R、254V、254W、254Y、255K
 、 255N、256H、256I、256K、256L、256W、257A、257I
 、 257M、257N、257S、258D、260S、262L、264S、265K
 、 265S、267H、267I、267K、268K、269N、269Q、271T
 、 272H、272K、272R、279A、279D、279G、279H、279N
 、 279Q、279S、279T、279W、279Y、280T、283F、283H
 、 283K、283M、283R、283W、285N、286F、288N、288P
 、 292E、292G、292I、301W、304E、307E、307M、312P
 、 315F、315L、315P、316F、317P、317T、318N、318P
 、 318T、332L、332M、332R、332S、332W、339D、339F 30
 、 339I、339K、339M、339N、339Q、339R、339S、339W
 、 339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L
 、 341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V
 、 341W、341Y、343D、343E、343G、343H、343K、343N
 、 343Q、343R、343S、343T、343W、343Y、373D、373E
 、 373G、373H、373I、373K、373L、373M、373Q、373R
 、 373S、373T、373W、375R、376G、376N、376P、376Q
 、 376R、376S、376T、376V、376W、376Y、377G、377K
 、 377P、378D、378N、379N、379Q、379T、380N、380S
 、 380T、382D、382F、382I、382K、382L、382Q、382R 40
 、 382S、382T、382V、382W、382Y、385E、386K、423N
 、 424H、424M、424V、426D、426L、427N、429A、429F
 、 429M、430A、430D、430F、430G、430H、430I、430K
 、 430L、430M、430N、430P、430Q、430R、430S、430T
 、 430V、430W、430Y、431H、431K、431P、432R、432S
 、 438K、438L、438T、438W、439E、440D、440I、又は440L。

【0015】

本発明の変異Fc領域は、好ましくは、本願明細書において記載される多くの実験法の1つを使用することを特徴とする。このような変異Fc領域は、変異Fc領域を含むモノ 50

クローナル抗体において改変したエフェクター機能又は改変した血清半減期、或いは、変異 F c 領域が作動可能な状態で付着されるポリペプチドにおいて改変した血清半減期を示す。

【0016】

好ましくは、本発明の変異 F c 領域の母体 F c 領域は、I g G、I g A、I g E、I g M、及び I g D からなる群から選択されるヒト起源の天然又は生殖細胞系をコードした F c 領域、もしくはその多形性の変異体、或いは、その機能性フラグメントである。母体 F c 領域は、好ましくは I g G F c 領域であり、より好ましくは I g G 1、I g G 3 又は I g G 4 F c 領域 である。母体 F c 領域は、天然の F c 領域と比較して、本願明細書に記載される（つまり、表 1 に列挙される置換）以外の 1 つ以上の付加的なアミノ酸置換、特に、当該分野で公知、又は、米国特許第 6, 165, 745 号明細書又は米国特許第 6, 737, 056 号明細書、国際公開第 2004/035752 号パンフレット又は国際公開第 2004/029207 号パンフレット（これらは全体において本願明細書に組み込まれる）に記述されるような 1 つ以上のアミノ酸置換を任意に含み、このようなアミノ酸置換もまた、母体 F c 領域に存在する場合、変異 F c 領域を生成するために、その後置換される位置にない限り、本発明の変異 F c 領域及び本発明の変異 F c 領域を含むポリペプチドにおける変異 F c 領域に存在する。

10

【0017】

本発明は、ポリペプチド、好ましくはモノクローナル抗体を提供し、本発明の変異 F c 領域、又はその機能性フラグメントを含む。好ましい実施形態において、本発明の変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、キメラ抗体である。より好ましい実施態様において、本発明の変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体は、抗体に存在するフレームワーク配列、及び、定常領域配列が、実質的にヒト起源であるヒト化抗体又はヒト抗体である。キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、好ましくは、全長抗体又は単鎖抗体である。本発明の変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体が、ヒト治療として使用される場合、F c 領域は、好ましくは、実質的にヒト起源である。

20

【0018】

好ましくは、本発明の変異 F c 領域を含む、或いは、本発明の変異 F c 領域が作動可能な状態で付着されるポリペプチド（つまり、「変異ポリペプチド」）は、母体 F c 領域と比較して、変異 F c 領域における少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有し、及び、前記変異 F c 領域の母体 F c 領域を含むポリペプチドと比較して改変したエフェクター機能又は血清半減期を呈し、「変異 F c 領域における少なくとも 1 つのアミノ酸置換」とは、(i) F c 領域の 279、341、343、又は 373 位における任意のアミノ酸置換、又は、(ii) F c 領域における、少なくとも 1 つの以下のアミノ酸置換：235 G、235 R、236 F、236 R、236 Y、237 K、237 N、237 R、238 E、238 G、238 H、238 I、238 L、238 V、238 W、238 Y、244 L、245 R、247 A、247 D、247 E、247 F、247 M、247 N、247 Q、247 R、247 S、247 T、247 W、247 Y、248 F、248 P、248 Q、248 W、249 L、249 M、249 N、249 P、249 Y、251 H、251 I、251 W、254 D、254 E、254 F、254 G、254 H、254 I、254 K、254 L、254 M、254 N、254 P、254 Q、254 R、254 V、254 W、254 Y、255 K、255 N、256 H、256 I、256 K、256 L、256 V、256 W、256 Y、257 A、257 I、257 M、257 N、257 S、258 D、260 S、262 L、264 S、265 K、265 S、267 H、267 I、267 K、268 K、269 N、269 Q、271 T、272 H、272 K、272 L、272 R、279 A、279 D、279 F、279 G、279 H、279 I、279 K、279 L、279 M、279 N、279 Q、279 R、279 S、279 T、279 W、279 Y、280 T、283 F、283 G、283 H、283 I、283 K、283 L、283 M、283 P、283 R、283 T、283 W、283 Y、285 N、286 F、288 N、288 P、292 E、292 F、292 G、292 I、292 L、293 S、293 V、301 W

30

40

50

、304E、307E、307M、312P、315F、315K、315L、315P
 、315R、316F、316K、317P、317T、318N、318P、318T
 、332F、332G、332L、332M、332S、332V、332W、339D
 、339E、339F、339G、339H、339I、339K、339L、339M
 、339N、339Q、339R、339S、339W、339Y、341D、341E
 、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P
 、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343A
 、343D、343E、343F、343G、343H、343I、343K、343L
 、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343V、343W
 、343Y、373D、373E、373F、373G、373H、373I、373K
 、373L、373M、373N、373Q、373R、373S、373T、373V
 、373W、375R、376E、376F、376G、376H、376I、376L
 、376M、376N、376P、376Q、376R、376S、376T、376V
 、376W、376Y、377G、377K、377P、378N、379N、379Q
 、379S、379T、380D、380N、380S、380T、382D、382F
 、382H、382I、382K、382L、382M、382N、382P、382Q
 、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、385E、385P
 、386K、423N、424H、424M、424V、426D、426L、427N
 、429A、429F、429M、430A、430D、430F、430G、430H
 、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430Q、430R
 、430S、430T、430V、430W、430Y、431H、431K、431P
 、432R、432S、438G、438K、438L、438T、438W、439E
 、439H、439Q、440D、440E、440F、440G、440H、440I
 、440K、440L、440M、440Q、440T、440V、又は442K、或い
 は、(i i i) 上記の(i)又は(i i)に列挙される少なくとも2つのアミノ酸置換、
 (i v) 上記の(i)又は(i i)に列挙されていない少なくとも1つのFc領域アミノ
 酸置換に加えて、上記の(i)又は(i i)に列挙されている少なくとも1、2、又は3
 つのアミノ酸置換である。改変したエフェクター機能は、好ましくは、Fc領域(即ち、
 母体Fc領域)においてアミノ酸置換を欠失する前記ポリペプチドに比べて、ADCCを
 増加、ADCCを減少、CDCを増加、CDCを減少、C1q結合能を増加、C1q結合
 能を減少、FcR(好ましくはFcRn)結合能を増加、又はFcR(好ましくはFcR
 n)結合能を減少させる。

【0019】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域
 を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体F
 c領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大したADCCを呈する。247A、247
 F、247M、247T、247V、247Y、249E、249Y、254F、254
 M、254Y、256A、258D、279A、283A、283I、283K、283
 M、283R、288N、292A、311A、311D、311N、311T、311
 V、311Y、315L、318N、318P、318T、318V、332T、332
 V、339D、339F、339G、339I、339K、339M、339N、339
 Q、339R、339S、339T、376A、376V、377G、377K、379
 N、380N、380S、382A、382I、385E、427N、429M、434
 W、436I、440G、440H、440I、又は440L、[好ましくは、247A
 、247F、247M、247T、247V、247Y、254F、254Y、258D
 、279A、283M、288N、292A、311D、311N、311T、315L
 、318N、318P、318T、318V、339D、339I、339K、339M
 、339N、339Q、339R、339S、376A、376V、377K、379N
 、380N、382A、440I、又は440L]。

【0020】

10

20

30

40

50

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少したADCC活性を呈する。235Q、235R、235S、236F、236R、236Y、237E、237K、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、247G、247R、249L、249P、250K、250M、250R、251H、251I、251W、252Y、254L、254P、254Q、254T、254V、256V、257A、257I、257M、257N、257S、257V、260S、262L、264S、265H、265K、265S、267G、267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K、270M、270N、271T、272H、272K、272L、272N、272R、279D、279F、279K、279L、279W、283D、283F、283G、283H、283L、283W、283Y、285N、288P、292E、292F、292G、292I、293S、293V、301W、304E、307A、307E、307M、311F、311I、311K、311S、312P、314F、314I、314V、314W、315F、315P、316F、317P、327T、328V、329Y、332G、332K、332L、332R、332W、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341W、341Y、343A、343D、343E、343F、343G、343H、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343V、343W、343Y、373A、373D、373E、373F、373G、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373S、373T、373V、373W、375R、376A、376E、376F、376G、376H、376W、376Y、379Q、382D、382S、430H、430K、430N、430Q、430R、430W、432R、432S、434I、440D、440T、440V、又は442K、[好ましくは、235R、236F、236Y、237E、237K、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、247R、250K、251H、254T、257I、257M、257N、257S、257V、265H、265K、265S、267G、267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K、270M、270N、271T、272N、272R、288P、292E、301W、304E、316F、317P、327T、328V、329Y、332K、332R、341F、341I、341M、341P、341Q、341R、341T、341W、341Y、343W、373A、373E、373G、373S、376A、376W、432R、又は432S]。

【0021】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大したFcRnの結合親和性を呈する。238L、244L、245R、249P、252Y、256P、257A、257I、257M、257N、257S、257V、258D、260S、262L、270K、272L、272R、279A、279D、279G、279H、279M、279N、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、283A、283D、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283N、283P、283Q、283R、283S、283T、283W、283Y、285N、286F、288N、288P、293V、307E、307M、311A、311I、311K、311L、311M、311V、311W、312P、316K、317P、318N、318T、332F、332H、332K、332L、332M、332R、332S、332W、339N、339T、339W、341P、343E、343H、343K、343Q、343R、343T、343Y、375R、376G、376I、376M、37

6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 6 T、4 3 8 K、4 3 8 L、4 3 8 T、4 3 8 W、4 4 0 K、又は4 4 2 K、
 [好ましくは、2 4 5 R、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 F、2 8 3 H、2 8 3 K、2 8 3 R、2 8 5 N、2 8 6 F、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 2 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 S、3 3 9 W、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 7 5 R、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 K、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 V、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 K、4 3 4 F、4 3 4 G、4 3 4 H、4 3 4 W、4 3 4 Y、4 3 6 I、4 3 6 L、4 3 8 K、4 3 8 L、又は4 3 8 W]。

【0 0 2 2】

本発明は、F c 領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異F c 領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異F c 領域を含むモノクローナル抗体は、母体F c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少したF c R n の結合親和性を呈する。2 3 5 Q、2 3 6 Y、2 3 7 K、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 W、2 4 7 A、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 G、2 4 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 R、2 4 7 S、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 A、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 E、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 Y、2 5 1 F、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 F、2 5 6 H、2 5 6 I、2 5 6 K、2 5 6 M、2 5 6 R、2 5 6 W、2 5 6 Y、2 6 4 S、2 6 5 S、2 6 5 Y、2 6 7 G、2 6 7 I、2 6 8 D、2 6 8 K、2 7 0 A、2 7 0 M、2 7 9 I、2 7 9 K、2 7 9 L、2 8 0 T、2 9 2 E、2 9 2 F、2 9 2 G、2 9 2 I、2 9 2 L、3 1 1 D、3 1 1 E、3 1 1 F、3 1 1 G、3 1 1 N、3 1 1 R、3 1 1 Y、3 1 5 F、3 1 5 K、3 1 5 P、3 1 6 F、3 1 7 T、3 2 6 W、3 2 7 T、3 3 9 E、3 3 9 G、3 3 9 L、3 3 9 R、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 M、3 4 3 V、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 D、3 7 3 G、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 S、3 7 3 T、3 7 3 V、3 7 3 W、3 7 6 H、3 7 6 L、3 7 6 W、3 7 6 Y、4 2 4 M、4 2 4 V、4 2 6 D、4 2 9 A、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 D、4 3 0 W、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 9 Q、4 4 0 A、4 4 0 D、4 4 0 E、4 4 0 F、又は4 4 0 M、[好ましくは、2 3 7 R、2 4 7 D、2 4 7 E、2 4 7 F、2 4 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 M、2 4 7 N、2 4 7 Q、2 4 7 W、2 4 7 Y、2 4 8 A、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4 9 Y、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 F、2 5 4 G、2 5 4 H、2 5 4 I、2 5 4 K、2 5 4 M、2 5 4 N、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 R、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 4 W、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 5 N、2 5 6 F、2 5 6 H、2 5 6 K、2 5 6 M、2 5 6 R、2 5 6 W、2 6 5 Y、2 8 0 T、2 9 2 G、2 9 2 I、3 1 1 D、3 1 1 E、3 1 1 G、3 1 1 N、3 1 5 F、3 1 5 P、3 1 6 T、3 1 7 T、3 2 7 T、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 L、3 4 1 Y、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 G、3 7 3 M、3 7 3 Q、3 7 6 W、3 7 6

10

20

30

40

50

Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S]。

【0023】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体に比べて増大したCDC活性を呈する。

236Y、244L、247A、247D、247E、247G、247N、247Q、247R、247S、247W、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249N、249P、249Y、251F、251H、251I、251W、254A、254F、254K、254L、254M、254R、254Y、255K、256A、256G、256I、256L、256M、256P、256Q、256W、256Y、260S、268D、279Q、279S、279W、279Y、280K、280T、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283M、283N、283P、283R、283S、283W、292L、307A、307M、311F、311I、311K、311L、311M、311T、311V、311W、311Y、312P、314F、314I、314V、314W、314Y、315F、315K、315L、315P、315R、316K、317P、317T、318N、318T、332A、332D、332E、332F、332G、332L、332M、332Q、332S、332T、332V、332W、332Y、339D、339F、339G、339H、339I、339K、339N、339Q、339R、339S、339T、339W、339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343A、343D、343E、343G、343H、343K、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343W、343Y、373D、373E、373F、373H、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373T、373V、373W、375R、376A、376F、376G、376H、376L、376N、376P、376Q、376R、376S、376T、376V、377P、379N、379Q、379S、379T、380A、380N、380S、380T、382I、382L、382Q、382V、386K、426D、426L、429A、429F、429M、430A、430D、430F、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430R、430S、430T、430V、430W、430Y、431H、431P、432R、432S、434W、434Y、438L、438W、440Q、又は440Y、[好ましくは、236Y、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249N、249Y、251H、251I、251W、254F、254K、254L、254M、254R、254Y、255K、256A、256G、256I、256L、256M、256P、256Q、256W、260S、280K、283W、307M、311F、311I、311K、311L、311M、311T、311V、311W、311Y、314I、314V、314W、314Y、315P、317P、332D、332L、332M、332S、332W、339D、339F、339I、339K、339N、339S、339W、339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343D、343E、343G、343H、343K、343N、343Q、343R、343S、343T、343W、343Y、373E、373F、373H、373I、373K、373L、373Q、373R、373T、373W、376A、376G、376N、376P、376Q、376R、376S、376T、376V、377P、379N、379Q、379T、382I、382L、386K、426D、426L、429F、429M、430A、430D、430F、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430P、430R、430S、430T、430V、430W、430Y、431H、431P、43

10

20

30

40

50

4 Y、4 3 8 L、又は4 4 0 Y]。

【0 0 2 4】

本発明は、F c 領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異F c 領域を含むモノクローナル抗体を提供し、変異F c 領域を含むモノクローナル抗体は、母体F c 領域を含むモノクローナル抗体に比べて減少したCDC活性を呈する。2 3 5 G、2 3 5 S、2 3 6 R、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 A、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R、2 4 7 H、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 T、2 4 7 Y、2 5 0 M、2 5 2 Y、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 I、2 5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 5 N、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 H、2 6 5 Y、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、2 7 2 L、2 7 2 N、2 9 2 A、2 9 3 S、3 0 1 W、3 0 7 E、3 1 1 E、3 1 1 S、3 1 6 F、3 1 8 P、3 2 7 T、3 2 8 V、3 2 9 Y、3 3 0 K、3 3 0 R、3 3 2 E、3 3 2 M、3 4 3 I、3 7 3 S、3 7 8 D、3 8 0 D、3 8 2 D、3 8 2 F、3 8 2 N、3 8 2 P、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 W、3 8 2 Y、3 8 5 E、3 8 5 P、4 2 3 N、4 2 4 H、4 2 4 M、又は4 2 7 N

[好ましくは、2 3 5 G、2 3 5 S、2 3 6 R、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 A、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R、2 4 7 I、2 4 7 L、2 4 7 T、2 5 0 M、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 H、3 0 1 W、3 1 1 S、3 2 7 T、3 2 9 Y、3 3 0 K、3 7 8 D、3 8 5 E、4 2 3 N、又は4 2 4 H]。

【0 0 2 5】

更に、本発明は、本発明の変異F c 領域を含むモノクローナル抗体を具現化し、前記抗体は、特にヒト標的抗原と結合する。好ましくは、標的抗原は、CD 3、CD 2 0、CD 2 5、TNF (α)、Her 2/neu、CD 3 3、CD 5 2、EGFR、EpCAM、MUC 1、GD 3、CEA、CA 1 2 5、HLA-DR、TGF (β)、VEGF、GDF 8、GDF 1 1、グレリン、又は任意の前駆体、或いは、その機能性フラグメントから選択される。

【0 0 2 6】

本発明は、F c 領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異F c 領域を含む変異ポリペプチドを提供し、変異ポリペプチドは、母体ポリペプチド（即ち、変異ポリペプチドと同一のポリペプチドであるが、上記に列挙されるアミノ酸置換がない）に比べて増大した血清半減期を呈する。

2 3 8 L、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S、2 6 2 L、2 7 0 K、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 3 A、2 8 3 D、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L、2 8 3 N、2 8 3 P、2 8 3 Q、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 3 V、3 0 7 E、3 0 7 M、3 1 1 A、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 R、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R、3 7 6 G、3 7 6 I、3 7 6 M、3 7 6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D、3 7 8 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L

、430M、430N、430Q、430R、430S、430T、430V、430Y、
 431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I
 、436L、436T、438K、438L、438T、438W、440K、又は44
 2K、[好ましくは、245R、252Y、256P、257A、257I、257M、
 257N、257S、257V、258D、260S、262L、279A、279D、
 279G、279H、279N、279Q、279S、279T、279W、279Y、
 283F、283H、283K、283R、285N、286F、307E、307M、
 311I、311K、311L、311M、312P、318N、318T、332S、
 339W、343E、343H、343K、343Q、343R、375R、377K、
 378D、378N、380S、380T、382F、382K、382Q、382R、
 382S、382T、382V、382W、382Y、423N、427N、430A、
 430F、430H、430I、430L、430M、430N、430Q、430R、
 430S、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、
 434W、434Y、436I、436L、438K、438L、又は438W]。

10

【0027】

本発明は、Fc領域における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域
 を含む変異ポリペプチドを提供し、変異ポリペプチドは、母体ポリペプチド（即ち、変異
ポリペプチドと同一のポリペプチドであるが、上記に列挙されるアミノ酸置換がない）に

比べて減少した血清半減期を呈する。235Q、236Y、237K、237R、238
 E、238G、238H、238W、247A、247D、247E、247F、247
 G、247H、247I、247L、247M、247N、247Q、247R、247
 S、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248W、249
 E、249L、249M、249Y、251F、251H、251I、251W、254
 D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254
 M、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254
 Y、255K、255N、256F、256H、256I、256K、256M、256
 R、256W、256Y、264S、265S、265Y、267G、267I、268
 D、268K、270A、270M、279I、279K、279L、280T、292
 E、292F、292G、292I、292L、311D、311E、311F、311
 G、311N、311R、311Y、315F、315K、315P、316F、317
 T、326W、327T、339E、339G、339L、339R、341D、341
 E、341F、341I、341K、341L、341M、341N、341Q、341
 R、341S、341T、341V、341W、341Y、343M、343V、343
 W、373A、373D、373G、373K、373L、373M、373N、373
 Q、373S、373T、373V、373W、376H、376L、376W、376
 Y、424M、424V、426D、429A、429F、429M、430D、430
 W、431P、432R、432S、439Q、440D、440E、440F、又は4
 40M [好ましくは、237R、247D、247E、247F、247H、247L
 、247M、247N、247Q、247W、247Y、248A、248F、248P
 、248Q、248W、249L、249M、249Y、251H、251I、251W
 、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254M
 、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y
 、255K、255N、256F、256H、256K、256M、256R、256W
 、265Y、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N
 、315F、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F
 、341I、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q
 、376W、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は43
 2S]。

20

30

40

【0028】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナ

50

ル抗体（又はその機能性フラグメント）のADCC活性を増加させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。247A、247F、247H、247I、247L、247M、247T、247V、247Y、249E、249Y、251F、254F、254M、254Y、256A、256M、258D、268D、268E、279A、280A、280K、283A、283I、283K、283M、283R、288N、292A、311A、311D、311N、311T、311V、311Y、315L、318N、318P、318T、318V、330K、332T、332V、339D、339F、339G、339I、339K、339M、339N、339Q、339R、339S、339T、376A、376V、377G、377K、379N、380N、380S、382A、382I、385E、427N、429M、434W、436I、440G、440H、440I、又は440L [好ましくは、247A、247F、247M、247T、247V、247Y、254F、254Y、258D、279A、283M、288N、292A、311D、311N、311T、315L、318N、318P、318T、318V、339D、339I、339K、339M、339N、339Q、339R、339S、376A、376V、377K、379N、380N、382A、440I、又は440L]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子に、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的な抗体をコードする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）と作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、（即ち、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の）変異Fc領域をコードする核酸に作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のADCC活性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することを含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より大きい（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上大きい）ADCC活性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを含む。本発明は、モノクローナル抗体又はその機能性フラグメントを更に具現化し、その方法によって生成される変異Fc領域を含む。

【0029】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体（又はその機能性フラグメント）のADCC活性を減少させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。235Q、235R、235S、236F、236R、236Y、237E、237K、237N、237R、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、247G、247R、249L、249P、250K、250M、250R、251H、251I、251W、252Y、254L、254P、S254Q、254T、254V、256V、257A、257I、257M、257N、257S、257V、260S、262L、264S、265H、265K、265S、267G、S267H、267I、267K、269N、269Q、270A、270G、270K、270M、270N、271T、272H、272K、272L、272N、272R、279D、279F、279K、279L、279W、283D、283F、283G、283H、283L、283T、283W、283Y、285N、288P、292E、292F、292G、292I、293S、293V、301W、304E、307A、307E、307M、311F、311I、311K、311S、312P、314F、314I、314V、314W、315F、315P、316F、317P、327T、328V、329Y、332G、332K、332L、332R、332W、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、

3 4 1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 W、
 3 4 1 Y、3 4 3 A、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 F、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 L、
 3 4 3 M、3 4 3 N、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T、3 4 3 V、3 4 3 W、
 3 4 3 Y、3 7 3 A、3 7 3 D、3 7 3 E、3 7 3 F、3 7 3 G、3 7 3 I、3 7 3 K、
 3 7 3 L、3 7 3 M、3 7 3 N、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 S、3 7 3 T、3 7 3 V、
 3 7 3 W、3 7 5 R、3 7 6 A、3 7 6 E、3 7 6 F、3 7 6 G、3 7 6 H、3 7 6 W、
 3 7 6 Y、3 7 9 Q、3 8 2 D、3 8 2 S、4 2 9 A、4 2 9 F、4 3 0 H、4 3 0 K、
 4 3 0 N、4 3 0 Q、4 3 0 R、4 3 0 W、4 3 2 R、4 3 2 S、4 3 4 I、4 4 0 D、
 4 4 0 T、4 4 0 V、又は4 4 2 K [好ましくは、2 3 5 R、2 3 6 F、2 3 6 R、2
 3 6 Y、2 3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2
 3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 7 R、2 4 9 P、2 5 0 K、2
 5 1 H、2 5 4 T、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 5 H、2
 6 5 K、2 6 5 S、2 6 7 G、2 6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2
 7 0 A、2 7 0 G、2 7 0 K、2 7 0 M、2 7 0 N、2 7 1 T、2 7 2 R、2 8 8 P、2
 9 2 E、3 0 1 W、3 0 4 E、3 1 6 F、3 1 7 P、3 2 7 T、3 2 9 Y、3 3 2 K、3
 3 2 R、3 4 1 F、3 4 1 I、3 4 1 M、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 T、3
 4 1 W、3 4 1 Y、3 4 3 W、3 7 3 A、3 7 3 E、3 7 3 G、3 7 3 S、3 7 6 W、4
 2 9 A、4 3 2 R、又は4 3 2 S]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸
 分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように（例えば、母体Fc領域又は
 天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的な抗体をコードする
 核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。
 また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、（即ち、上記に列挙され
 る少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の）変異Fc領域をコードする核酸を作動可能
 な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗
 体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記
 載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のADCC活性、及び母体Fc
 領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することを含む。この方法は、母体Fc領
 域を含むモノクローナル抗体より少ない（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、1
 4%、16%、18%、20%以上少ない）ADCC活性を有する変異Fc領域を含むモノ
 クローナル抗体を選択することを更に含む。本発明はモノクローナル抗体又はその機能
 性フラグメントを更に具現化し、その方法によって生成される変異Fc領域を含む。

【0030】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナ
 ル抗体（又はその機能性フラグメント）のFcRn結合親和性を増加させる方法を提供し
 、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸
 を設計することを含む。2 3 8 L、2 4 4 L、2 4 5 R、2 4 9 P、2 5 2 Y、2 5 6 P
 、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2 5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 5 8 D、2 6 0 S
 、2 6 2 L、2 7 0 K、2 7 2 L、2 7 2 R、2 7 9 A、2 7 9 D、2 7 9 G、2 7 9 H
 、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y
 、2 8 3 A、2 8 3 D、2 8 3 F、2 8 3 G、2 8 3 H、2 8 3 I、2 8 3 K、2 8 3 L
 、2 8 3 N、2 8 3 P、2 8 3 Q、2 8 3 R、2 8 3 S、2 8 3 T、2 8 3 W、2 8 3 Y
 、2 8 5 N、2 8 6 F、2 8 8 N、2 8 8 P、2 9 3 V、3 0 7 A、3 0 7 E、3 0 7 M
 、3 1 1 A、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 2 P
 、3 1 6 K、3 1 7 P、3 1 8 N、3 1 8 T、3 3 2 F、3 3 2 H、3 3 2 K、3 3 2 L
 、3 3 2 M、3 3 2 R、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 9 N、3 3 9 T、3 3 9 W、3 4 1 P
 、3 4 3 E、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 Q、3 4 3 R、3 4 3 T、3 4 3 Y、3 7 5 R
 、3 7 6 G、3 7 6 I、3 7 6 M、3 7 6 P、3 7 6 T、3 7 6 V、3 7 7 K、3 7 8 D
 、3 7 8 N、3 8 0 N、3 8 0 S、3 8 0 T、3 8 2 F、3 8 2 H、3 8 2 I、3 8 2 K
 、3 8 2 L、3 8 2 M、3 8 2 N、3 8 2 Q、3 8 2 R、3 8 2 S、3 8 2 T、3 8 2 V
 、3 8 2 W、3 8 2 Y、4 2 3 N、4 2 7 N、4 3 0 A、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H

、430I、430K、430L、430M、430N、430Q、430R、430S、430T、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I、436L、436T、438K、438L、438T、438W、440K、又は442K [好ましくは、245R、252Y、256P、257A、257I、257M、257N、257S、257V、258D、262L、279A、279D、279G、279H、279N、279Q、279S、279T、279W、279Y、283F、283H、283K、283R、285N、286F、307A、307E、307M、311I、311K、311L、311M、312P、318N、318T、332S、339W、343E、343H、343K、343Q、343R、375R、377K、378D、378N、380S、380T、382F、382K、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、423N、427N、430A、430F、430H、430I、430L、430M、430N、430Q、430R、430S、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I、436L、438K、438L、又は438W]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、更に、追加的な抗体をコードする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、（即ち、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の）変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のFcRn結合親和性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することを更に含む。方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より大きい（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上大きい）FcRn結合親和性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを更に含む。更なる本発明はモノクローナル抗体又はその機能性フラグメントを具現化し、その方法によって生成される変異Fc領域を含む。

【0031】

一実施形態において、本発明は、ポリペプチド（好ましくは治療用ポリペプチド）のインビボ血清半減期を増加させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域をコードする核酸を含む核酸を設計することを含む。238L、244L、245R、249P、252Y、256P、257A、257I、257M、257N、257S、257V、258D、260S、262L、270K、272L、272R、279A、279D、279G、279H、279M、279N、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、283A、283D、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283N、283P、283Q、283R、283S、283T、283W、283Y、285N、286F、288N、288P、293V、307A、307E、307M、311A、311I、311K、311L、311M、311V、311W、312P、316K、317P、318N、318T、332F、332H、332K、332L、332M、332R、332S、332W、339N、339T、339W、341P、343E、343H、343K、343Q、343R、343T、343Y、375R、376G、376I、376M、376P、376T、376V、377K、378D、378N、380N、380S、380T、382F、382H、382I、382K、382L、382M、382N、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、423N、427N、430A、430F、430G、430H、430I、430K、430L、430M、430N、430Q、430R、430S、430T、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I、436L

、436T、438K、438L、438T、438W、440K、又は442K、[好ましくは、245R、252Y、256P、257A、257I、257M、257N、257S、257V、258D、262L、279A、279D、279G、279H、279N、279Q、279S、279T、279W、279Y、283F、283H、283K、283R、285N、286F、307A、307E、307M、311I、311K、311L、311M、312P、318N、318T、332S、339W、343E、343H、343K、343Q、343R、375R、377K、378D、378N、380S、380T、382F、382K、382Q、382R、382S、382T、382V、382W、382Y、423N、427N、430A、430F、430H、430I、430L、430M、430N、430Q、430R、430S、430V、430Y、431H、431K、434F、434G、434H、434W、434Y、436I、436L、438K、438L、又は438W]。変異Fc領域をコードする核酸分子は、治療用タンパク質をコードする核酸分子に、作動可能な状態で結合される。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、(例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から)設計され、更に、追加的なポリペプチドをコードする核酸(例えば、融合タンパク質の非Fc領域をコードする核酸配列)に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、非Fc融合パートナーをコードする核酸に上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸に、その後作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むポリペプチド、及び母体Fc領域を含むポリペプチドのインビボ血清半減期を測定することも含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドを選択することを更に含み、該ポリペプチドが、母体Fc領域を含むポリペプチドに比べて増加した(即ち、好ましくは、少なくとも5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上増加した)血清半減期を有する。本発明は、方法によって生成される変異Fc領域を含むポリペプチド(即ち、融合ポリペプチド)を更に具現化する。

【0032】

一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体(又はその機能性フラグメント)のFcRn結合親和性を減少させる方法を提供し、少なくとも1つの以下のアミノ酸置換を含む変異Fc領域をコードする核酸を設計することを含む。235Q、236Y、237K、237R、238E、238G、238H、238W、247A、247D、247E、247F、247G、247H、247I、247L、247M、247N、247Q、247R、247S、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249Y、251F、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256I、256K、256M、256R、256W、256Y、264S、265S、265Y、S267G、267I、268D、268K、270A、270M、279I、279K、279L、280T、292E、292F、292G、292I、292L、311D、311E、311F、311G、311N、311R、311Y、315F、315K、315P、316F、317T、326W、327T、339E、339G、339L、339R、341D、341E、341F、341I、341K、341L、341M、341N、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343M、343V、343W、373A、373D、373G、373K、373L、373M、373N、373Q、373S、373T、373V、373W、376H、376L、376W、376Y、424M、424V、426D、429A、429F、429M、430D、430W、431P、432

R、432S、434I、439Q、440A、440D、440E、440F、又は440M [好ましくは、237R、247D、247E、247F、247H、247L、247M、247N、247Q、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248Q、249L、249M、249Y、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254M、254N、254P、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256K、256M、256R、256W、265Y、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N、315F、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、変異Fc領域をコードする核酸分子は、追加的な抗体配列をコードする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のFcRn結合親和性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することも含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より少ない（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上少ない）FcRn結合親和性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを更に含む。本発明は、その方法によって生成される（変異Fc領域を含む）モノクローナル抗体を更に具現化する。

【0033】

別の実施形態において、本発明は、ポリペプチド（好ましくは治療用ポリペプチド）のインビボ血清半減期を減少させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む変異Fc領域をコードする核酸を設計することを含む。235Q、236Y、237K、237R、238E、238G、238H、238W、247A、247D、247E、247F、247G、247H、247I、247L、247M、247N、247Q、247R、247S、247W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249Y、251F、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254L、254M、254N、254P、254Q、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256I、256K、256M、256R、256W、256Y、264S、265S、265Y、S267G、267I、268D、268K、270A、270M、279I、279K、279L、280T、292E、292F、292G、292I、292L、311D、311E、311F、311G、311N、311R、311Y、315F、315K、315P、316F、317T、326W、327T、339E、339G、339L、339R、341D、341E、341F、341I、341K、341L、341M、341N、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343M、343V、343W、373A、373D、373G、373K、373L、373M、373N、373Q、373S、373T、373V、373W、376H、376L、376W、376Y、424M、424V、426D、429A、429F、429M、430D、430W、431P、432R、432S、434I、439Q、440A、440D、440E、440F、又は440M [好ましくは、237R、247D、247E、247F、247H、247L、247M、247N、247Q、247

W、247Y、248A、248F、248P、248Q、248Q、249L、249M、249Y、251H、251I、251W、254D、254E、254F、254G、254H、254I、254K、254M、254N、254P、254R、254T、254V、254W、254Y、255K、255N、256F、256H、256K、256M、256R、256W、265Y、280T、292G、292I、311D、311E、311G、311N、315F、315P、316T、317T、327T、341D、341E、341F、341L、341Y、343W、373A、373G、373M、373Q、376W、376Y、424M、424V、430D、430W、431P、又は432S]。Fc変異体領域をコードする核酸は、治療用タンパク質をコードする核酸に作動可能な状態で結合される。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、核酸分子は、追加的なポリペプチドをコードする核酸（例えば、融合タンパク質の非Fc領域をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、非Fc融合パートナーをコードする核酸に上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸に、その後作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むポリペプチドの発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むポリペプチド、及び母体Fc領域を含むポリペプチドのインビボ血清半減期を測定することも含む。この方法は、変異Fc領域を含むポリペプチドを選択することを更に含み、該ポリペプチドが、母体Fc領域を含むポリペプチドに比べて減少した（即ち、好ましくは、少なくとも5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上減少した）血清半減期を有する。本発明は、方法によって生成される変異Fc領域を含むポリペプチド（即ち、融合ポリペプチド）を更に具現化する。

【0034】

別の実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクローナル抗体のCDC活性を増加させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含むように抗体のFc領域を構築することを含む。236Y、244L、247A、247D、247E、247G、247N、247Q、247R、247S、247W、248F、248P、248Q、248W、249E、249L、249M、249N、249P、249Y、250K、250R、251F、251H、251I、251W、254A、254F、254K、254L、254M、254R、254Y、255K、256A、256G、256I、256L、256M、256P、256Q、256W、256Y、260S、268D、279Q、279S、279W、279Y、280K、280T、283F、283G、283H、283I、283K、283L、283M、283N、283P、283R、283S、283W、292L、307A、307M、311F、311I、311K、311L、311M、311T、311V、311W、311Y、312P、314F、314I、314V、314W、314Y、315F、315K、315L、315P、315R、316K、317P、317T、318N、318T、332A、332D、332E、332F、332G、332H、332L、332M、332N、332Q、332S、332T、332V、332W、332Y、339D、339F、339G、339H、339I、339K、339N、339Q、339R、339S、339T、339W、339Y、341D、341E、341F、341H、341I、341K、341L、341M、341N、341P、341Q、341R、341S、341T、341V、341W、341Y、343A、343D、343E、343G、343H、343K、343L、343M、343N、343Q、343R、343S、343T、343W、343Y、373D、373E、373F、373H、373I、373K、373L、373M、373N、373Q、373R、373T、373V、373W、375R、376A、376F、376G、376H、3

7 6 L、3 7 6 N、3 7 6 P、3 7 6 Q、3 7 6 R、3 7 6 S、3 7 6 T、3 7 6 V、3
7 7 P、3 7 9 N、3 7 9 Q、3 7 9 S、3 7 9 T、3 8 0 A、3 8 0 N、3 8 0 S、3
8 0 T、3 8 2 I、3 8 2 L、3 8 2 Q、3 8 2 V、3 8 6 K、4 2 6 D、4 2 6 L、4
2 9 A、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3 0 H、4
3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P、4 3 0 R、4 3 0 S、4
3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3 2 S、4
3 4 W、4 3 4 Y、4 3 8 L、4 3 8 W、4 4 0 Q、又は4 4 0 Y [好ましくは、2 3
6 Y、2 4 8 F、2 4 8 P、2 4 8 Q、2 4 8 W、2 4 9 E、2 4 9 L、2 4 9 M、2 4
9 N、2 4 9 Y、2 5 0 K、2 5 0 R、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 W、2 5 4 A、2 5
4 F、2 5 4 K、2 5 4 L、2 5 4 M、2 5 4 R、2 5 4 Y、2 5 5 K、2 5 6 A、2 5
6 G、2 5 6 I、2 5 6 L、2 5 6 M、2 5 6 P、2 5 6 Q、2 5 6 W、2 6 0 S、2 8
0 K、2 8 3 W、3 0 7 M、3 1 1 F、3 1 1 I、3 1 1 K、3 1 1 L、3 1 1 M、3 1
1 T、3 1 1 V、3 1 1 W、3 1 1 Y、3 1 4 I、3 1 4 V、3 1 4 W、3 1 4 Y、3 1
5 P、3 1 7 P、3 3 2 D、3 3 2 L、3 3 2 M、3 3 2 S、3 3 2 W、3 3 2 Y、3 3
9 D、3 3 9 F、3 3 9 I、3 3 9 K、3 3 9 N、3 3 9 S、3 3 9 T、3 3 9 W、3 3
9 Y、3 4 1 D、3 4 1 E、3 4 1 F、3 4 1 H、3 4 1 I、3 4 1 K、3 4 1 L、3 4
1 M、3 4 1 N、3 4 1 P、3 4 1 Q、3 4 1 R、3 4 1 S、3 4 1 T、3 4 1 V、3 4
1 W、3 4 1 Y、3 4 3 D、3 4 3 E、3 4 3 G、3 4 3 H、3 4 3 K、3 4 3 N、3 4
3 Q、3 4 3 R、3 4 3 S、3 4 3 T、3 4 3 W、3 4 3 Y、3 7 3 D、3 7 3 E、3 7
3 H、3 7 3 I、3 7 3 K、3 7 3 L、3 7 3 Q、3 7 3 R、3 7 3 T、3 7 3 W、3 7
6 A、3 7 6 G、3 7 6 N、3 7 6 P、3 7 6 Q、3 7 6 R、3 7 6 S、3 7 6 T、3 7
6 V、3 7 7 P、3 7 9 N、3 7 9 Q、3 7 9 T、3 8 2 I、3 8 2 L、3 8 6 K、4 2
6 D、4 2 6 L、4 2 9 F、4 2 9 M、4 3 0 A、4 3 0 D、4 3 0 F、4 3 0 G、4 3
0 H、4 3 0 I、4 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 M、4 3 0 N、4 3 0 P、4 3 0 R、4 3
0 S、4 3 0 T、4 3 0 V、4 3 0 W、4 3 0 Y、4 3 1 H、4 3 1 P、4 3 2 R、4 3
4 Y、4 3 8 L、又は4 4 0 Y]。この方法によって、変異 F c 領域をコードする核酸分
子は、上記の少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体 F c 領域又は
天然の F c 領域をコードする核酸分子から）設計され、核酸分子は、追加的な抗体をコード
する核酸（例えば、I g 重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着され
る。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、上記に列挙される
少なくとも 1 つのアミノ酸置換の導入後の変異 F c 領域をコードする核酸を作動可能な状態
で付着されることを更に含む。この方法は、変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体の
発現及び精製も含む。この方法は、母体 F c 領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精
製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によっ
て、変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体の C D C 活性、及び母体 F c 領域を含むモノ
クローナル抗体の活性を測定することを含む。この方法は、母体 F c 領域を含むモノクロー
ナル抗体より大きい（即ち、好ましくは、5 %、1 0 %、1 2 %、1 4 %、1 6 %、1
8 %、2 0 % 以上大きい）C D C 活性を有する変異 F c 領域を含むモノクローナル抗体を
選択することを更に含む。本発明は、この方法によって生成される変異 F c 領域を含むモノ
クローナル抗体を更に具現化する。

【0 0 3 5】

別の実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体、好ましくは治療用モノクロー
ナル抗体の C D C 応答を減少させる方法を提供し、以下のアミノ酸置換の少なくとも 1 つ
を含むように抗体の F c 領域を構築することを含む。2 3 5 G、2 3 5 S、2 3 6 R、2
3 7 E、2 3 7 K、2 3 7 N、2 3 7 R、2 3 8 A、2 3 8 E、2 3 8 G、2 3 8 H、2
3 8 I、2 3 8 L、2 3 8 V、2 3 8 W、2 3 8 Y、2 4 5 R、2 4 7 H、2 4 7 I、2
4 7 L、2 4 7 T、2 4 7 Y、2 5 0 M、2 5 2 Y、2 5 4 D、2 5 4 E、2 5 4 I、2
5 4 P、2 5 4 Q、2 5 4 T、2 5 4 V、2 5 5 N、2 5 7 A、2 5 7 I、2 5 7 M、2
5 7 N、2 5 7 S、2 5 7 V、2 6 2 L、2 6 4 S、2 6 5 H、2 6 5 Y、2 6 7 G、2
6 7 H、2 6 7 I、2 6 7 K、2 6 8 K、2 6 9 N、2 6 9 Q、2 7 0 G、2 7 0 M、2

70N、271T、272H、272L、272N、292A、293S、301W、307E、311E、311S、316F、318P、327T、328V、329Y、330K、330R、332K、339E、339M、343I、373S、378D、380D、382D、382F、382N、382P、382R、382S、382W、382Y、385E、385P、423N、424H、424M、又は427N [好ましくは、235G、235S、236R、237E、237K、237N、237R、238A、238E、238G、238H、238I、238L、238V、238W、238Y、245R、247I、247L、247T、250M、257A、257I、257M、262L、264S、267G、267H、267I、267K、268K、269N、269Q、270G、270M、270N、271T、272H、301W、311S、327T、329Y、330K、330R、378D、385E、423N、又は424H]。この方法によって、変異Fc領域をコードする核酸分子は、上記の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むように、（例えば、母体Fc領域又は天然のFc領域をコードする核酸分子から）設計され、核酸分子は、追加的な抗体をコードする核酸（例えば、Ig重鎖の残部をコードする核酸配列）に作動可能な状態で付着される。また、この方法は、その後、追加的な抗体をコードする核酸に、上記に列挙される少なくとも1つのアミノ酸置換の導入後の変異Fc領域をコードする核酸を作動可能な状態で付着されることを更に含む。この方法は、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の発現及び精製も含む。この方法は、当該技術で利用される方法、又は本願明細書に記載の方法によって、変異Fc領域を含むモノクローナル抗体のCDC活性、及び母体Fc領域を含むモノクローナル抗体の活性を測定することも含む。この方法は、母体Fc領域を含むモノクローナル抗体より少ない（即ち、好ましくは、5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%以上少ない）CDC活性を有する変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を選択することを更に含む。本発明は、この方法によって生成される変異Fc領域を含むモノクローナル抗体を更に具現化する。

【0036】

別の実施形態において、本発明は、本発明の変異Fc領域又はその機能性フラグメントをコードする核酸分子を含む単離核酸分子を提供する。より好ましくは、単離核酸分子は、本発明の変異Fc領域を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。好ましくは、前記核酸によってコードされる変異Fc領域ポリペプチドは、変異体の母体Fc領域と比較して、表1に示すようなアミノ酸置換を有する。好ましくは、ポリペプチドはモノクローナル抗体であり、更に好ましくは、モノクローナル抗体は全長抗体又は単鎖抗体である。モノクローナル抗体は、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はヒトモノクローナル抗体である。

【0037】

別の実施形態において、本発明はベクターを提供し、好ましくは、本発明の変異Fc領域ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、組換え発現ベクター、酵母発現ベクター、又はレトロウイルス発現ベクターを提供する（但し、これらに制限されない）。

【0038】

別の実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。好ましくは、本発明の宿主細胞は、本発明の核酸分子を含む1つ以上のベクター又はコンストラクトを含む。本発明の宿主細胞は、本発明のベクターが導入された（例えば、形質転換、形質導入、感染、トランスフェクション、エレクトロポレーションなどによる）細胞であり、前記ベクターは、本発明の変異Fc領域ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。任意に、ベクターは、宿主細胞染色体に安定して組み込まれる。宿主細胞タイプは、哺乳類、細菌、植物、及び酵母細胞を含む。好ましくは、宿主細胞は、CHO細胞、COS細胞、SP2/O細胞、NSO細胞、酵母細胞、又はあらゆる好ましい細胞種の誘導体又は子孫である。

【0039】

別の実施形態において、本発明は、本発明の変異Fc領域又はその機能性フラグメントを含むポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。好ましくは、ポリペプチドはモノクローナル抗体であり、より好ましくは治療用モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はヒトモノクローナル抗体である。あるいは、ポリペプチドは、本発明の変異Fc領域が作動可能な状態で結合され、及び共発現することによって改変した血清半減期から利益がもたらされる抗体以外のポリペプチドである。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる担体を更に含む。前記医薬組成物において、変異Fc領域を含むポリペプチドは有効成分である。好ましくは、医薬組成物は、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の相同又は実質的に相同な集団を含む。治療的に使用される医薬組成物は、好ましくは無菌であり、かつ、凍結乾燥される。

10

【0040】

本発明は、哺乳類、好ましくはヒトにおけるタンパク質の活性を抑制する方法は、治療的に有効量又は予防的に有効量の（前記哺乳類に本発明の変異Fc領域を含むポリペプチド（好ましくはモノクローナル抗体）を、それらを必要とする前記哺乳類に投与することを含む。好ましくは、変異Fc領域を含むポリペプチドは、抑制されるタンパク質の結合パートナーである。本発明は、抗原エпитープに本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体が結合して生じる細胞情報伝達の抑制によって、改善する疾患又は障害を治療又は予防する方法を提供し、このような治療又は予防を必要とする患者（例えばヒト）に、治療的又は予防的に有効量の本発明のモノクローナル抗体を投与することを含む。

20

【0041】

本発明は、抗原エпитープに本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体が結合して生じる細胞情報伝達の抑制によって、改善する疾患又は疾患を治療又は予防する方法を提供し、このような治療又は予防を必要とする患者（例えばヒト）に、治療上又は予防上有効量の本発明のモノクローナル抗体を投与することを含む。本発明は包装材料、および該包装材料内に包含された本発明の変異Fc領域ポリペプチドを含むポリペプチドを含む製品を具現化する。本発明は、本願明細書に記載の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体及び外因性のポリペプチドを含む組成物、並びに、生理的又は薬学的に許容できる担体又は希釈剤を更に具現化する。

30

【0042】

ある実施形態において、本発明は、i) 天然のヒトフレームワーク領域（「FR」）（例えば、自然発生のヒトフレームワークに対して改変されていない）、及び、ii) 変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する。ある実施形態において、前記未修飾のヒトフレームワークは、ヒト生殖細胞系フレームワークである。他の実施形態において、本発明は、ポリペプチドを含む組成物を提供し、ポリペプチドは、i) 少なくとも1つのランダム化CDR配列、及び、ii) 本発明の変異Fc領域を含む。他の実施形態において、本発明は、ポリペプチドを含む組成物を提供し、ポリペプチドは、i) 未修飾のヒトフレームワーク（例えば、ヒト生殖細胞系フレームワーク）、ii) 少なくとも1つのランダム化CDR配列、及び、iii) 本発明の変異Fc領域を含む。

40

【0043】

本発明は、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体外因性のポリペプチドの治療及び診断的な使用を意図し、本願明細書において開示される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

本願明細書及び本願請求の範囲全体において、免疫グロブリン中の重鎖（Fc領域）のアミノ酸残基に対する番号づけは、Kabata他、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) により、EUインデックスに

50

よる。「K a b a tによるE Uインデックスフォーマット」とは、ヒト I g G抗体における残基の番号づけを意味し、本願明細書の図2に示される。例えば、438位において、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、及びマウス I g G 3の全ては、Qアミノ酸を有し、マウス I g G 1はIアミノ酸を有し、マウス I g G 2 aはTアミノ酸を有し、及び、マウス I g G 2 BはKアミノ酸を有する。更に、本願明細書において、置換は、置換が生じたアミノ酸位置番号、その後に母体 F c領域の同位置にあったアミノ酸に代替するアミノ酸が続いて指定される（例えば、249 Gは、母体 F c領域の249位において置換されるグリシン残基を示す）。番号は、母体 F c領域がヒト I g G 1であるか否かに関わらずヒト I g G 1の位置に言及する。母体 F c領域がヒト I g G 1でなく、ある位置でヒト I g Gと共に整列する場合、番号は母体 F c領域における相同性の位置に言及する。

10

【0045】

本願明細書で使用される場合において、「被験者」及び「患者」という用語は、本発明の変異 F c領域を含むポリペプチドが治療的に使用される任意の動物に言及し、このような治療によって利益を享受するヒトのみならず他の哺乳類（例えば、ペット用動物（イヌ、ネコ等）、スポーツ用の動物（例えばウマ）、及び家畜動物（ウシ、ブタ、及びヒツジ）を含む。

【0046】

本願明細書で使用される場合において、「治療又は予防」という用語は、異常なレベルのタンパク質と関連し、タンパク質の活性又はレベルを改変することによって利益が得られる疾患又は障害に言及する。

20

【0047】

「単離された」という用語は、天然環境において回収された、少なくとも1つの混入核酸と同定及びその核酸から単離された核酸に関連して使用される。単離された核酸は天然において見られるのとは異なる型及び環境に存在する。したがって、単離核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。単離核酸分子は、通常、例えば、核酸分子がプラスミド又は染色体中の天然細胞とは異なる位置でポリペプチドを発現する、細胞中に含まれる核酸分子を含む。単離された核酸は、一本鎖又は二本鎖の状態が存在する。単離核酸分子がタンパク質を発現するために使用されるとき、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは最低限センス鎖又はコード鎖を含むが、センス鎖及びアンチセンス鎖（即ち、二本鎖である）を含んでもよい。

30

【0048】

核酸は、他の核酸分子と機能的な関係におかれた場合に、「作動可能に結合」又は「作動可能に付着」される。例えば、プロモーター又はエンハンサーがコード配列の転写に作用する場合、核酸のコード配列に作動可能な状態で結合されるか、又は、リボソーム結合部位が翻訳を容易にするために配置される場合、核酸のコード配列に作動可能な状態で結合される。変異 F c領域をコードする核酸分子は、発現した融合タンパク質が、変異 F c領域ポリペプチドに上流又は下流で付着する外因性のタンパク質又はその機能性フラグメントを含むように配置される場合、外因性のタンパク質（即ち、自然界に存在するように F c領域を含まないタンパク質又はその機能性フラグメント）をコードする核酸分子に作動可能な状態で結合され、外因性のタンパク質は、変異 F c領域ポリペプチドにすぐに付着されるか、或いは、あらゆる長さ及び組成のリンカー配列によって分離される。同様に、ポリペプチドが別のポリペプチドとの機能的な関係に配置されるとき、ポリペプチド（本願明細書において「タンパク質」と同義的に使用される）分子は、「作動可能に結合」又は「作動可能に付着」される。

40

【0049】

本願明細書で使用される場合において、「機能性フラグメント」という用語は、ポリペプチド又はタンパク質（例えば、変異 F c領域又はモノクローナル抗体）に関して使用される場合、全長ポリペプチドの少なくとも1つの機能において保持するタンパク質のフラグメントに関連する。フラグメントは、6つのアミノ酸から全長ポリペプチドの全アミノ

50

酸配列から1つのアミノ酸を除く大きさにおいて様々である。本願明細書において定義されるように、本発明の変異Fc領域ポリペプチドの機能性フラグメントは少なくとも1つの「アミノ酸置換」を保持する。変異Fc領域ポリペプチドの機能性フラグメントは、Fc領域に関連する公知の少なくとも1つの機能（例えば、ADCC、CDC、Fc受容体への結合、C1qへの結合、細胞表面レセプターの下方制御は、例えば、Fc領域が作動可能に付着されるポリペプチドのインビボ又はインビトロでの半減期を増加させる）を保持する。

【0050】

「精製された」又は「精製する」という用語は、サンプルから少なくとも1つの混入物の実質的な除去を意味する。例えば、抗原特異的な抗体は、少なくとも1つの混入する非免疫グロブリンタンパク質を完全又は実質的に（少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%以上、好ましくは、96%、97%、98%、又は99%）除去することにより精製することができ、また、それらは同一の抗原に結合しない免疫グロブリンを除去することにより精製することができる。非免疫グロブリンタンパク質及び／又は特定の抗原に結合しない免疫グロブリンを除去することにより、サンプル中の抗原特異的な免疫グロブリンの割合が増大する。他の例では、ポリペプチド（例えば免疫グロブリン）を細菌の宿主細胞中で発現させ、宿主細胞のタンパク質を完全又は実質的に除去して精製することにより、サンプル中のポリペプチドの割合が増大する。

【0051】

用語「天然」という用語は、ポリペプチド（例えばFc領域）に言及し、自然又は自然に発生する多型現象において共通に発生するポリペプチドのアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を、ポリペプチドが有するというを示すために本願明細書において使用する。天然ポリペプチド（例えば天然のFc領域）は、組換え手段によって生成されるか、又は自然発生源から単離される。

【0052】

本願明細書で使用される場合において、「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列及び特定の宿主生体で作動可能に結合されたコード配列の発現に必要な適当な核酸配列を含む組み換えDNA分子を意味する。

【0053】

本願明細書で使用される場合において、「宿主細胞」という用語は、インビトロ又はインビボのいずれかに存在する、任意の真核細胞及び原核細胞（例えば、大腸菌等の細菌、CHO細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、及び昆虫細胞）を意味する。例えば、宿主細胞はトランスジュニク動物中に存在するものでもよい。

【0054】

本願明細書で使用される場合において、「母体ポリペプチド」とは、変異体（変異ポリペプチド）を生成するために変更又は改変（例えばアミノ酸置換）されてもよいアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは、天然又は非天然のFc領域、つまり、自然発生するFc領域又は少なくとも一部又はアミノ酸配列の修飾を伴うFc領域を含む。ある実施形態において、母体ポリペプチドよりも長い、あるいは短い変異体が特に意図される。特に好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは、変異体と比べ機能（例えば、増大又は減少したエフェクター機能、レセプター結合等）の点で相違する。

【0055】

本願明細書で使用されている場合において、「母体ポリペプチドの変異体」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸置換により、母体ポリペプチドと異なるアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。ある実施形態において、変異体はFc領域の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%、或いは最も好ましくは少なくとも95%、97%、又は99%（つまり、Fc領域の「一部」）を含む。好ましい実施例において、母体ポリペプチドの変異Fc領域は母

10

20

30

40

50

体ポリペプチドからの少なくとも1つのアミノ酸置換、Fc領域において行なわれる置換を含む。母体ポリペプチドは、天然ポリペプチドであってもなくてもよい。

【0056】

本願明細書で使用される場合において、「Fc領域」という用語は、(例えば図1に示したような)免疫グロブリン重鎖のC末端領域を意味する。「Fc領域」は、Fc領域の天然配列であってもよく、又は変異Fc領域であってもよい。広く受け入れられている免疫グロブリン重鎖におけるFc領域の境界は変動しうるが、ヒトIgG重鎖のFc領域は、通常226位のCys又は230位のProから、カルボキシル末端まで及ぶと定義されている。ある実施形態において、変異体はFc領域の一部のみを含み、カルボキシル末端は含んでも含まなくてもよい。免疫グロブリンのFc領域は、例えば、図1に示すよう

10

【0057】

ヒトIgGのFc領域の「CH2領域」(「Cy2」領域とも呼ばれる)は、通常231位付近のアミノ酸から340位付近のアミノ酸に至る。CH2領域は、他の領域と緊密に対形成していない点で際立っている。2つのN結合性分岐糖鎖が、正常なIgG分子の2つのCH2領域の間に介在する。

【0058】

ヒトIgGのFc領域の「CH3領域」(「Cy3」領域とも呼ばれる)は、一般にFc領域の341位付近のアミノ酸残基から447位付近のアミノ酸残基に至る、Fc領域のC末端からCH2領域までの残基の範囲である。

20

【0059】

「機能的なFc領域」は、天然の配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。本発明の変異Fc領域を含むポリペプチドの少なくとも1つのエフェクター機能は、天然のFc領域又は変異体の母体Fc領域を含むポリペプチドに関して増加又は減少する。エフェクター機能の例としては、C1qへの結合、補体依存性細胞毒性(CDC)、抗体依存細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、食作用、細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター、BCR)の下方制御等が挙げられるが、これらに限定されない。そのようなエフェクター効果は、Fc領域が結合領域(例えば抗体の可変領域)に作動可能に結合されることを必要とする場合もあり、種々のアッセイ(例えば、Fc結合アッセイ、ADCCアッセイ、CDCアッセイ、全血又は部分血サンプルからの標的細胞の消失等)により評価することができる。

30

【0060】

「天然配列Fc領域」又は「野生型Fc領域」は、広く天然において見られるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を意味する。天然配列ヒトFc領域の例を図2に示すが、これらには、天然配列ヒトIgG1Fc領域(f及びa, zアロタイプ、つまり非Aアロタイプ及びAアロタイプ)、天然配列ヒトIgG2Fc領域、天然配列ヒトIgG3Fc領域、及び天然配列ヒトIgG4Fc領域並びに天然に存在するこれらの変異体が含まれる。天然配列マウスFc領域も図2に示す。

40

【0061】

「変異Fc領域」は、本願明細書で定義されるように、少なくとも1つの「アミノ酸置換」により天然配列Fc領域(又はそのフラグメント)と異なるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態において、変異Fc領域は、天然配列Fc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは、天然配列Fc領域又は母体ポリペプチドのFc領域において、1、2、3、4、又は5のアミノ酸置換、好ましくは約1~約5のアミノ酸置換を有する。他の実施形態において、変異Fc領域は、本願明細書に開示される方法に従って生成され、この変異Fc領域は選択した外因性のポリペプチド、例えば、レセプター又はリガンドの結合ドメインなどの抗体可変ドメイン又は非抗体ポリペプチドに融合することがで

50

きる。

【0062】

本願明細書で使用される場合、ポリペプチドにおける「誘導体」という用語は、それを含むポリペプチド、及び、アミノ酸残基置換の導入によって改変したアミノ酸配列に言及する。本願明細書において使用する場合、「誘導体」という用語は、あらゆる種類の分子がポリペプチドへの共有結合することによって修飾されるポリペプチドに言及する。例えば、抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸エステル化、アミド化、公知の保護基／封鎖基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンド又は他のタンパク質に対する結合などによって修飾されるが、これらに制限されない。ポリペプチド誘導体は、特定の化学開裂、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含むがこれには限定されない当業者にとって公知の技術を使用し、化学修飾によって生成される。更に、ポリペプチド誘導体は、誘導元のポリペプチドと同様又は同一の機能を有する。本発明の変異Fc領域を含むポリペプチドは、本願明細書で定義されるように誘導体であると理解され、好ましくは、誘導体化はFc領域において発生する。

10

【0063】

ポリペプチド（例えばFc領域又はモノクローナル抗体）に関連して本願明細書で使用される場合、「実質的にヒト由来」は、ポリペプチドは、天然のヒトアミノポリペプチドと少なくとも80%、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、又はそれ以上、より好ましくは、少なくとも95%、95%、97%、98%、又は99%相同であるアミノ酸配列を有することを示す。

20

【0064】

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、Fc領域（例えば抗体のFc領域）に結合するレセプターを意味する。好ましいFcRは、天然の配列FcRである。更に、好ましいFcRは、IgG抗体と結合し（γレセプター）、FcγRI、FcγRII、FcγRIIサブクラスのレセプターを含み、このレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的にスプライスされた形態を含む。FcγRIIレセプターは、FcγRIIA（「活性化レセプター」）、及びFcγRIIB（「抑制化レセプター」）を含み、その細胞質ドメインにおいて主に異なる同様のアミノ酸配列を有する。FcRは、Ravetch及びKinetによって研究されている。Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel, 他, Immunomethods 4: 25-34 (1994); and de Haas 他, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)。別の好ましいFcRは、母体のIgGの胎児への移動に関与する新生児レセプター（FcRn）を含む（Guyer 他, J. Immunol. 117: 587 (1976) and Kim 他, J. Immunol. 24: 249 (1994)）。将来、特定されるFcRを含む他のFcRは、本願明細書において用語「FcR」に包含される。

30

【0065】

本願明細書で使用される場合において、「抗体依存細胞媒介性細胞毒性」及び「ADCC」という語句は、非特異的なFcRを発現した（例えば非特異的な）細胞障害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、標的細胞の溶解を起こす細胞に媒介された反応を意味する。ADCCを媒介する細胞であるNK細胞は、FcγRIIのみを発現するが、単球は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。

40

【0066】

本願明細書で使用される場合において、「エフェクター細胞」という語句は、1種又は複数のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす白血球（好ましくはヒト）を意味する。好ましくは、エフェクター細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介する白血球の例としては、PBMC、NK細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が挙げられる。エフェクター細胞は、天然供給源から（例えば血液又はPBMCから）単離されてもよい。

50

【0067】

「改変した」FcRn結合親和性を有する変異ポリペプチドは、pH 6.0 のとき、その変異体の母体ポリペプチド又は天然配列Fc領域を有するポリペプチドと比べてFcR結合親和性は、強化（増大）又は減退（減少）してよい。FcRnに対し増大した結合又は結合性を示す変異ポリペプチドは、FcRと母体ポリペプチドよりも高い親和性で結合する。FcRnに対し減少した結合又は結合性を示す変異ポリペプチドは、FcRと母体ポリペプチドよりも低い親和性で結合する。FcRnに対し減少した結合性を示す変異体は、結合性をほとんど又は全く検知できず、例えば、母体ポリペプチドに比べ、0～20%の結合性を有する。FcRnに対し「高い親和性」で結合する変異ポリペプチドは、母体ポリペプチドと比較して、結合アッセイにおいて変異ポリペプチドと母体ポリペプチドの量がほぼ同一で、その他の条件も同一な場合、1種のFcRnと母体抗体よりも高い結合親和性で結合する。例えば、高いFcRn結合親和性を有する変異ポリペプチドは、例えば、ELISAアッセイにおいて、FcRn結合親和性が、母体ポリペプチドと比べ、約1.10倍～100倍（より典型的には約1.2倍～約50倍）増加することを示す。

10

【0068】

本願明細書で使用される場合において、「アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸配列中に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を、他の「代替」アミノ酸残基に置き換えることを意味する。代替残基は、「天然に存在する（遺伝子によりコードされた）アミノ酸残基」であり、アラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン（Cys）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）ロイシン（Leu）、リジン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、スレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、及びバリン（Val）から選択されてもよい。1又は複数の天然に存在しないアミノ酸残基による置換も、本願明細書におけるアミノ酸置換の定義に包含される。「天然に存在しないアミノ酸残基」とは、上に挙げた天然に存在するアミノ酸残基以外の残基を意味し、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基と共有結合することができる。天然に存在しないアミノ酸の例としては、ノルロイシン、オミシン、ノルバリン、ホモセリン、及び本願明細書に参照として組み込まれるElieman他，Meth. Enzym. 202:301-336（1991）に記載のもの等の他のアミノ酸残基アナログが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0069】

「アッセイシグナル」という用語は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出する任意の方法からの出力を意味し、比色アッセイからの吸光度、蛍光強度、又は1分あたりの分解速度が含まれるが、これらに限定されない。アッセイのフォーマットとして、ELISA、facs、又は他の方法を含んでもよい。「アッセイシグナル」の変化は、細胞の生存率及び／又は解離速度、結合速度、若しくは両者の変化を反映させることができる。「高いアッセイシグナル」とは、測定された出力の値が他の値よりも高いこと（例えば、変異体は、ELISAアッセイにおいて、母体ポリペプチドに比べて高い（大きい）値を示すことがある）を意味する。「より低い」アッセイシグナルとは、測定された出力の値が他の値よりも低いこと（例えば、変異体は、ELISAアッセイにおいて、母体ポリペプチドに比べてより低い（小さい）値を示すことがある）を意味する。

40

【0070】

「結合親和性」という用語は、個々のFcレセプター-Fc結合相互作用に関する解離平衡定数（濃度の単位で示される）を意味する。結合親和性は、解離速度（通常、 秒^{-1} 等の時間の逆数の単位で示される）を結合速度（通常、モル／秒等の単位、濃度／単位時間の単位で示される）で割った比に直接関係する。一般に、解離平衡定数の変化が、結合速度、解離速度、又は両者の変化によるものであるかについては、それらの値を（例えば、BIACORE又はSAPIDYNE測定によって）実験的に測定しないと、明確にすることはできない。

50

【0071】

本願明細書で使用される場合において、「ヒンジ領域」という用語は、ヒトIgG1のGlu216(216)からPro230にわたる、ヒトIgG1における一連のアミノ酸を意味する。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間S-S結合を同じ位置で形成する最初と最後のシステイン残基の位置を決定することにより、IgG1配列について整列することができる。

【0072】

「C1q(C1q)」とは、免疫グロブリンのFc領域に対する結合部位を含むポリペプチドを意味する。C1q(C1q)と2つのセリンプロテアーゼC1r及びC1sは、共に、CDC経路の第1成分である複合体C1を形成する。

10

【0073】

本願明細書で使用される場合において、「抗体」という用語は、「免疫グロブリン」又は「Ig」と同義であり、そして、最も広い意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多特異的(multispecific)(例えば二特異的(bispecific)抗体、及び所望の生物学的活性又は機能的活性を示す任意の抗体のフラグメントを包含する。単鎖抗体、及びキメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又は霊長類化抗体(CDRを移植された)、更に、キメラ抗体又はCDRを移植した単鎖抗体は、異なる種に由来する部分を含み、本発明及び「抗体」という用語に包含される。これらの抗体の部分は、従来の技術によって、合成的に、化学的に結合することができ、また、遺伝子工学技術を使用して連続したタンパク質として調製することができる。例えば、キメラ抗体又はヒト化抗体の鎖をコードする核酸は、連続したタンパク質を生成するために発現させることができる。米国特許第4,816,567号明細書;欧州特許第0125023 B1号明細書;米国特許第4,816,397号明細書;欧州特許第0120694 B1号明細書;国際公開第86/01533号明細書;欧州特許第0194276 B1号明細書;米国特許第5,225,539号明細書;欧州特許第0239400 B1号明細書、及び米国特許第5,585,089号明細書、及び、米国特許第5,698,762号明細書を参照。また、単鎖抗体に関する、Newman, R. 他 BioTechnology, 10:1455-1460, 1993, regarding primatized antibody、及びLadner 他、米国特許第4,946,778号明細書、及び、Bird, R. E. 他, Science, 242:423-426, 1988も参照。Fc領域(又はその部分)を含む抗体の全ての形態は、「抗体」という用語で本願明細書において包含されると理解される。更にまた、抗体は、固相に固定され、及び/又は、公知技術の方法に従って異種化合物(例えば、エンザイム又は毒素)によって結合して検出可能な標識で標識化される。

20

30

【0074】

本願明細書で使用される場合において、「抗体のフラグメント」という用語は、完全な抗体の一部を意味する。抗体のフラグメントの例としては、直鎖抗体、一本鎖抗体分子、Fc又はFc'ペプチド、Fab及びFabフラグメント、及び抗体のフラグメントから形成される多特異的(multispecific)抗体が挙げられるが、これらに限定されない。抗体のフラグメントは、好ましくはヒンジ領域の少なくとも一部及び必要に応じてIgG重鎖のCH1領域を保持する。他の好ましい実施形態において、抗体のフラグメントはCH2領域の少なくとも一部又はCH2領域全体を含む。

40

【0075】

本願明細書で使用される場合において、「機能性フラグメント」という用語は、モノクローナル抗体に関して使用される場合、機能的活性を保持するモノクローナル抗体の一部を意味することが意図される。機能的活性は、例えば、抗原結合活性又は特異性、レセプター結合活性又は特異性、エフェクター機能活性などである。モノクローナル抗体の機能性フラグメントとしては、重鎖又は軽鎖単独及び、VL、FH及びFd等のそれらのフラグメント、Fv、Fab及びFab'等の一価フラグメント、F(ab')₂等の二価フ

50

ラグメント、一本鎖Fv (scFv)、及びFcフラグメント等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの用語は、例えば、Harlowe and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston他, Cell Biophysics, 22: 189-224 (1993); Pluckthun and Skerrra, Meth. Enzymol., 178: 497-515 (1989) 及び、Day, E. D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990) に記載される。機能性フラグメントという用語は、例えば、プロテアーゼによるモノクローナル抗体の消化又は短縮、及び公知の組み換えDNA法により生成されたフラグメントを含むことが意図される。

10

【0076】

本願明細書で使用される場合、「フラグメント」という用語は、別のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5、15、20、25、40、50、70、90、100以上連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドに言及する。好ましい実施形態において、ポリペプチドのフラグメントは、全長ポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

20

【0077】

本願明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、1価、2価、又は多価の免疫グロブリンを含む。1価のキメラ抗体は、キメラ軽鎖とジスルフィド架橋を介して結合するキメラ重鎖によって形成される二量体である。2価のキメラ抗体は、少なくとも1つのジスルフィド架橋で結合される2つの重鎖-軽鎖二量体によって形成される四量体である。ヒトに用いられる抗体のキメラ重鎖は、非ヒト抗体の重鎖に由来する抗原結合性領域を含み、少なくとも一部のヒト重鎖定常領域（例えばCH1又はCH2）に結合される。ヒトに用いられる抗体のキメラ軽鎖は、非ヒト抗体の軽鎖に由来する抗原結合領域を含み、少なくとも一部のヒト軽鎖定常領域（CL）に結合される。また、抗体、同一又は異なる可変領域結合特性のキメラ重鎖、及び、キメラ軽鎖を有するフラグメント又は誘導体は、公知の方法に従って、個々のポリペプチド鎖の適切な結合によって調製することができる。本方法において、キメラ重鎖を発現する宿主は、キメラ軽鎖を発現する宿主から別々培養され、そして、免疫グロブリン鎖は、別々に回収及び結合される。あるいは、宿主は共培養され、培養液において自然に結合させることができ、その後、組み立てられた免疫グロブリン又はフラグメント又は両方が回収され、重鎖及び軽鎖が同一の宿主細胞において発現される。キメラ抗体を生成する方法は、公知技術である（米国特許第6, 284, 471号明細書；米国特許第5, 807, 715号明細書；米国特許第4, 816, 567号明細書；及び米国特許第4, 816, 397号明細書を参照）。

30

【0078】

本願明細書で使用される場合において、非ヒト（マウス等）抗体がヒト化した状態（つまり、ヒト化抗体）とは、非ヒト免疫グロブリンから誘導される最小限の配列を含む、あるいは全く含まない抗体を意味する。大部分は、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエント由来の超可変領域が、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類等の非ヒト種由来の、所望の特異性、親和性及び能力を有する超可変領域由来の残基（ドナー抗体）で置換される。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト由来の残基で置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体において見出されない残基を含んでもよい。これらの改変は、一般に抗体の特性を更に改善するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常は2つの可変領域のほぼ全体を含んでおり、超可変ループ（CDR）の全体又はほぼ全体は、非ヒト免疫グロブリンの同一部位に対応しており、F

40

50

Rの全体又はほぼ全体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト化抗体はまた、通常、ヒト免疫グロブリン由来のイニムノグロブリン (i n i m u n o g l o b u l i n) の定常領域 (F c) の少なくとも一部を含む。ヒト化抗体を生成するために使用される例示的な方法は、米国特許第 5, 2 2 5, 5 3 9 号明細書に記載される。

【0079】

本願明細書で使用される場合において、「イムノアドヘシン」という用語は、外因性の「アドヘシン」タンパク質（例えば、レセプター、リガンド又は酵素）の結合領域を、免疫グロブリンの定常領域に結合させた抗体類似の分子を表す。構造的に、イムノアドヘシンは、所望の結合特性を有し、抗体の抗原認識及び結合部位（抗原結合部位）とは異なる（「外因性の」）アドヘシンのアミノ酸配列と免疫グロブリン定常領域配列が融合した構造を含む。

10

【0080】

本願明細書で使用される場合において、「リガンド結合ドメイン」という用語は、任意の天然レセプター又は少なくとも対応する天然レセプターの定性的なリガンド結合能を保持したその誘導体を意味する。ある実施形態において、レセプターは、免疫グロブリンの超遺伝子族のメンバーと相同な細胞外ドメインを有する細胞表面ポリペプチドに由来する。特にこの定義に含まれる、免疫グロブリン超遺伝子族に属しない他のレセプターとして、特にチロシンキナーゼ活性を有するサイトカインレセプター（チロシンキナーゼレセプター）、ヘマトポイエチン及び神経成長因子スーパーファミリー、及び細胞接合分子（例えば、E-、L-、及びP-セレクチン）がある。

20

【0081】

本願明細書で使用される場合において、「レセプター結合ドメイン」という用語は、任意のレセプターに対する天然のリガンドを意味し、細胞接合分子、又は、対応する天然のリガンドの少なくとも定性的な結合能を保持した天然のリガンドの任意の領域又は誘導体を意味する。

【0082】

本願明細書で使用される場合において、「抗体-イムノアドヘシンキメラ」という用語は、抗体の少なくとも1つの結合ドメインに少なくとも1つのイムノアドヘシンで結合する分子を含む。例としては、B e r g 他, P N A S (U S A) 8 8 : 4 7 2 3 - 4 7 2 7 (1 9 9 1) 及び C h a r n o w 他, J . I m m u n o l . , 1 5 3 : 4 2 6 8 (1 9 9 4) に記載の二特異性 C D 4 - I g G キメラを含むが、これらに限定されない。

30

【0083】

本願明細書で使用される場合において、「単離した」ポリペプチドとは、同定及び単離され、かつ／又はその天然環境 (e n v i r o m n e n t) 下での成分から回収されたものである。天然環境での混入成分は、ポリペプチドの診断又は治療用途への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質、又は非タンパク質性の溶質が含まれる。ある実施形態において、単離したポリペプチドは、(1) L o w r y 法により決定された場合にポリペプチドの95重量%、好ましくは99重量%を上回るまで、(2) スピニングカップシークエネーターを用いて、少なくとも15のN末端又は内部 (i n t e m a l) のアミノ酸配列を得るのに適当な程度に、又は(3)還元又は非還元条件下で、クマシーブルー又は銀染色を用いた S D S - p a g e で単一性を示すまで精製される。単離したポリペプチドは、ポリペプチドの天然環境の少なくとも1つの成分を含まないため、そのままでは組み換え細胞内のポリペプチドを含んでいる。しかし、通常単離したポリペプチドは、少なくとも1つの精製工程を経て調製される。

40

【0084】

本願明細書で使用される場合において、「治療」という用語は、治療的な処置及び予防又は防止の方法を意味する。治療を必要とする人には、すでに疾患を発症している人及び疾患を予防する必要がある人が含まれる。

【0085】

本願明細書で使用される場合において、「障害」及び「疾患」という用語は、同義的に

50

使用され、変異ポリペプチド（本発明の変異体Fcを含むポリペプチド）を用いた治療により利益を享受することができる任意の状態を意味し、慢性及び急性の障害又は疾患（例えば、患者が特定の疾患にかかりやすくなるような病的状態）を含む。ある実施形態において、病気はガンである。ある実施形態において、「自己免疫疾患」という用語は、「自己免疫不全」という用語と同義的に使用され、被験者の細胞、組織及び／又は器官との被検者自身の免疫反応によって引き起こされる細胞損傷、組織損傷及び／又は臓器損傷を特徴とした被検者の症状に言及する。用語「炎症性疾患」は、用語「炎症性疾患」によって同義的に使用され、炎症を特徴とする被検者の症状に言及する。自己免疫不全は、炎症と関連していてもいなくてもよい。更に、炎症は、自己免疫不全によって引き起こされてもなくてもよい。特定の疾患は、自己免疫疾患及び炎症性疾患の両方を特徴とする。

10

【0086】

本願明細書で使用される場合において、「ガン」及び「ガン性の」という用語は、典型的には、無秩序な細胞成長によって特徴づけられる哺乳類の生理学的状態を意味し、記述する。ガンの例としては、上皮性悪性腫瘍、リンパ腫、芽細胞種、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。より具体的には、それらのガンとしては、扁平上皮ガン、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、肺腺ガン、肺扁平上皮ガン、腹膜ガン、肝細胞ガン、胃ガン、膵臓ガン、グリア芽腫、子宮頸ガン、卵巣ガン、肝ガン、膀胱ガン、肝ガン、乳ガン、大腸ガン、結腸直腸ガン、子宮内膜又は子宮ガン、唾液腺ガン、腎臓ガン、肝臓ガン、前立腺ガン、外陰部ガン、甲状腺ガン、肝腫瘍、及び数種の頭部及び頸部ガンが挙げられる。本願明細書で使用される場合において、「標識」という用語は、ポリペプチドと直接又は間接的に結合する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身が検出可能なもの（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）であってもよく、酵素標識の場合には、検出可能な基質又は組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

20

【0087】

本願明細書で使用される場合において、「レセプター」という用語は、少なくとも1つのリガンドに結合することが可能なポリペプチドを意味する。好ましいレセプターは、細胞外リガンド結合ドメイン、及び、必要に応じて、他のドメイン（例えば、膜貫通ドメイン、細胞間ドメイン及び／又は膜アンカー）を有する細胞表面又は可溶性のレセプターである。本願明細書に記載のアッセイにより評価されるレセプターは、完全なレセプターでもよく、そのフラグメント又は誘導体（例えば、1又は複数の外因性ポリペプチドに融合した、レセプターの結合ドメインを有する融合タンパク質）でもよい。更に、結合能が評価されるレセプターは、細胞内にあってもよく、又は単離され、必要に応じてアッセイプレート又は他の固相に塗布されていてもよく、又は直接標識されプローブとして使用されてもよい。

30

【0088】

本願明細書で使用される場合において、「抗体応答性疾患」という用語は、抗体療法により少なくとも部分的に治療が可能であることが示される任意の疾患又は病状を意味する。そのような疾患又は病状の例としては、リンパ腫（RITUXANにより治療可能であることが示されている）、感染症（SYNAGISで治療可能であることが示されている呼吸器シンシチウムウイルス）、腎臓移植（ZENAPAXが有効であることが示されている）、クローン病及び関節リウマチ（REMICADEで治療可能であることが示されている）、乳ガン（HERCAPTINにより治療可能であることが示されている）、及び大腸ガン（EDRECOLUMABにより治療可能であることが示されている）が挙げられるが、これらに限定されない。本願明細書で使用される場合において、「イムノアドヘシン応答性疾患」という用語は、アドヘシン療法により少なくとも部分的に治療が可能であることが示される任意の疾患又は病状を意味する。

40

【0089】

本願明細書で使用される場合において、母体ポリペプチドよりも「ヒトエフェクター細胞の存在下で抗体依存細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を効率的に媒介する」変異ポリペプチドとは、インビトロ又はインビボにおいて、アッセイに用いた変異ポリペプチド及び

50

母体抗体の量がほぼ同じである場合に、A D C Cの媒介が顕著に有効なポリペプチドである。例えば、そのような変異体は、同一のA D C Cアッセイにおいて、母体ポリペプチドよりもあるA D C Cアッセイにおいてより多くの標的細胞の溶解を起こす。そのような変異体は、例えばA D C Cアッセイにより同定することができるが、A D C C活性を決定する他のアッセイ又は方法（例えば動物モデル）を用いてもよい。好ましい実施形態において、変異ポリペプチドは、母体ポリペプチドよりも、A D C Cの媒介において約1.2倍、1.5倍、50倍、100倍、約500倍、又は約1000倍以上有効である。

【0090】

「抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患の症状」という用語は、通常、特定の疾患に関連するそれらの症状を意味する。例えば、症状は通常クローン病に関連する症状であり、腹痛、下痢、直腸出血、体重の減少、発熱、食欲の減退、脱水、貧血、膨張、線維症、腸管の炎症、及び栄養失調を含む。「症状が軽減するような条件下で」という語句は、任意の抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患の検出可能な症状における、任意の定性的又は定量的な減少を意味し、疾患からの回復速度における検出可能な影響（例えば体重の増加）、又は、通常特定の疾患に関連する少なくとも1つの疾患の軽減（例えば、抗体又はイムノアドヘシン応答性疾患がクローン病の場合には、腹痛、下痢、直腸出血、体重の減少、発熱、食欲の減退、脱水、貧血、膨張、線維症、腸管の炎症、及び栄養失調の少なくとも1つの軽減）の症状を含むが、それらに限定されない。

【0091】

モノクローナル抗体及びレセプター

天然に存在する全長抗体（「免疫グロブリン」又は「I g」）は、4つのペプチド鎖、ジスルフィド結合によって相互接続する2つの重（H）鎖（完全長では約50-70 k D a）及び2つの軽（L）鎖（完全長では約25 k D a）からなる免疫グロブリン分子である。各鎖のアミノ末端は、抗原認識に主に関与する約100-110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のC末端部は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を定義する。

【0092】

軽鎖は、 κ 又は λ として分類され、特定の定常領域を特徴とする。重鎖は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 又は ϵ として分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれI g G、I g M、I g A、I g D、及びI g Eとして定義する。各重鎖タイプは、特定の定常領域を特徴とする。

【0093】

各重鎖は、重鎖可変領域（本願明細書では「H C V R」）、及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、I g G、I g D、及び、I g Aに関する3つのドメイン（C H 1、C H 2、及びC H 3）、及び4つのドメイン（C H 1、C H 2、C H 3、及びC H 4）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本願明細書「L C V R」）、及び、軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン（C L）からなる。H C V R及びL C V R領域は、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超可変性の領域に更に再分割され、そして、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる保護領域が点在する。各H C V R及びL C V Rは、3つのC D R及び4つのF Rからなり、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端を構成する。各ドメインに対するアミノ酸の帰属は、周知の規則に従う [K a b a t, " S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t, " N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h, B e t h e s d a, M d. (1991)]。

特定の抗原と結合する抗体の機能的な能力は、集合的に6つのC D Rで決定される。しかしながら、完全なF a bより低い親和性であるにもかかわらず、抗原に関する特定の3つのC D Rだけを含む単一の可変ドメインですら抗原を認識及び結合する能力を有する。

【0094】

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、公知技術のハイブリドーマ技術のみならず、組み換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術又はこのような容易な公知の技術の

組合せを使用して生成することができる。本願明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、制限されないが、ハイブリドーマ技術で生成される抗体である。「モノクローナル抗体」は、例えば、あらゆる成熟核、原核生物、又はファージクローンを含む単一のコピー又はクローンに由来する抗体に言及し、かつ、その抗体が生成される方法に言及しない。「モノクローナル抗体」は完全 (i n t a c t) (完全 (c o m p l e t e) 又は全長) な抗体、実質的に完全な抗体、抗体の機能性フラグメントであり、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体であってよい。

【0095】

「モノクローナル抗体」の集団は、相同又は実質的に相同な（又は純粋な）抗体集団に言及し、つまり、集団における抗体の少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、又はそれ以上、より好ましくは、少なくとも約97%又は98%、最も好ましくは少なくとも99%が同一であり、同じ抗原又はエピトープに対してE L I S A 分析において拮抗する。

10

【0096】

本願明細書において使用する場合、「特異的に結合する」又は「選択的に結合する」という用語は、特異結合の対の片方は、その特異結合パートナー以外の分子に、有意に結合しない状態に言及する。また、この用語は、例えば、本発明の抗体の抗原結合性ドメインは、多くの抗原によって担持される特定のエピトープに特異的であり、抗原結合性ドメインを担持する特異抗体が、エピトープを担持する様々な抗原に結合する場合に適用できる。

20

【0097】

F c 領域は、酵素パインでの消化によって生成される完全抗体（例えばI g G）の部分に言及する（図1を参照）。F c 領域は、C H 2 及びC H 3 ドメイン同様ヒンジ領域の部分からなる各鎖を有するホモ二量体である。F c 領域は、C H 3 ドメイン間のヒンジ領域間及び複数の非共有結合間で形成される鎖間ジスルフィド架橋による二量体である。I g G は、身体のもっとも多い種類のI g であって、総免疫グロブリンのほぼ75%を構成し、血管内プール及び血管外プールの中に均等に分布する。I g G は、抗原に一次応答の初期のステージにおいてほとんど生成されないが、二次応答において生成される抗体の主な形状である。

【0098】

上述したように、抗体には主としてC H 2 及びC H 3 領域が存在し、非抗原性の結合機能に参与する。また、これらの領域及びリンカーの部分は、通常、F c 領域として知られており、エフェクター分子の結合により媒介されるいくつかのエフェクター効果を有する。

30

【0099】

抗体のF c 領域に媒介されるエフェクター機能は、（1）抗体が抗原に結合した後に作用するエフェクター効果（これらの効果は、例えば、補体カスケード又はF c レセプター（F c R）を有する細胞に参与する）、及び（2）抗原への結合とは無関係に作用するエフェクター効果（これらの効果は、循環し続けること及びトランスサイトーシスにより細胞間障壁を越えて輸送される能力によりもたらされる）の2つのカテゴリーに分類することができる。例えば、補体のC 1 q （C 1 q）成分の抗体への結合により補体系が活性化される。オプソニン化に続く、補体の活性化が細胞病原体の溶解にとって重要である。補体の活性化はまた、炎症応答を刺激し、自己免疫過敏にも参与する場合がある。更に、抗体はF c 領域を介して、抗体のF c 領域上のF c レセプター結合部位で、細胞上のF c R に結合することにより細胞に結合する。I g G、I g E、I g A、及びI g Mを含む種々の抗体には、特異的な多くのF c Rが存在する。本発明は、いずれかの特定のメカニズムに限定されないが、細胞表面におけるF c Rへの抗体の結合は、抗体に覆われた粒子の吞噬及び破壊、免疫複合体の除去、キラー細胞による抗体で覆われた標的細胞の溶解（A D C C）、炎症性メディエータ、胎盤通過及び免疫グロブリンの産生の制御を含む多くの重要で多様な生物学的応答を引き起こす。

40

50

【0100】

いくつかの抗体のエフェクター機能は、抗体のFc領域に結合するFcRに媒介される。FcRは、免疫グロブリンのアイソタイプに対する特異性によって定義され、IgG抗体に対するFcレセプターはFcγR、IgEに対するものはFcεR、IgAに対するものはFcαR等と呼ばれる。FcγRの3つのサブクラス、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII(CD16)が同定されている。

【0101】

FcγRのそれぞれのサブクラスは2つ又は3つの遺伝子によりコードされており、選択的RNAスプライシングにより多重転写が起こり、FcγRアイソフォームの幅広い多様性が存在する。FcγRIサブクラスをコードする3つの遺伝子(FcγRIA、FcγRIB及びFcγRIC)は、第1染色体長腕の1q21.1領域に一団となって存在しており、FcγRIIサブクラスをコードする3つの遺伝子(FcγRIIA、FcγRIIB及びFcγRIIC)及びFcγRIIIサブクラスをコードする2つの遺伝子(FcγRIIIA、及びFcγRIIIB)は全て領域1q22に一団となって存在する。これらの異なるFcRサブタイプは、異なる細胞種において発現する(例えば、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991))。例えば、ヒトにおいて、FcγRIIIBは好中球のみにおいて見られるが、FcγRIIIAはマクロファージ、単球、NK細胞、及びT細胞の亜集団において見られる。特に、FcγRIIIAは、ADCCに関与する細胞種の一つであるNK細胞に存在する。

【0102】

ヒトFcγRIIIA(CD16)レセプターは、細胞外ドメインの158位に、この位置にフェニルアラニン又はバリンをコードする共通の多型を有する。FcγRIIIのV型対立遺伝子は、ヒトIgG1に対しF型対立遺伝子よりも高い親和性を有する。V158対立遺伝子はまた、ADCCを効率的に媒介する。臨床データは、RITUXANによる治療を行っている患者におけるFcγRIIIAの遺伝子型と、処置及び治療に対する応答との間に相関を示した。臨床及び分子レベルでの応答並びに進行時間は、FcγRIIIA-158V遺伝子型(人口の約20%)と同型の患者が優れていることが示された。それに対して、異型又はより親和性の低いFcγRIIIA-158F遺伝子型(人口の約80%)の患者の応答は鈍くなる。これらのデータは、ADCCを促進する158FのFc変異キャリアはガンの抗体治療の臨床での有効性を高める可能性があることを示唆する。遺伝子多型は、ヒトFcγRIII(CD32)レセプターの、細胞外ドメインの131位にも存在し、ヒスチジン(H)又はアルギニン(R)のいずれかをコードする。131位における多型は、ヒトIgGに対する結合に影響を与えることが見出されている。最近のデータによれば、FcγRIIIAの131位における多型とRITUXANに対する臨床応答との間に相関が存在することが示されている。

【0103】

H131対立遺伝子と同型である患者は、他の2つの群よりも優位に高い応答速度を有する。FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIは、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)レセプターであり、FcγRIは細胞外ドメインに3つのIgSFドメインを有する一方、FcγRII及びFcγRIIIは、細胞外ドメインに2つのIgSFドメインしか有しない。他のタイプのFcレセプターは新生児Fcレセプター(FcRn)である。FcRnは、主要組織適合複合体(MHC)と構造的に同一であり、β2-マイクログロブリンと非共有結合したα鎖を含む。

【0104】

変異Fc領域

本発明は、変異ポリペプチド、変異ポリペプチドをコードする核酸配列、及び、変異ポリペプチドを生成する方法を提供する。好ましくは、本発明の変異ポリペプチドは、母体ポリペプチドと少なくとも1つのアミノ酸の修飾、好ましくはアミノ酸置換を有する点で異なる。「母体」、「野生型」、「出発物質となる」又は「非変異体」ポリペプチドは、

10

20

30

40

50

好ましくは抗体Fc領域の少なくとも一部を含み、変異体ポリペプチドはFc領域の中で発生する。Fc領域を含む母体ポリペプチドは、Fc領域またはその部分を含むポリペプチドを生成する当該技術分野で用いられる手法を用いて調製することができる。好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは抗体である。しかし、母体ポリペプチドは、少なくともFc領域の一部を含む他のポリペプチド（例えばイムノアドヘシン）であってもよい。母体ポリペプチドのFc領域の部分は天然配列又は非天然配列のものであり、好ましくは、ヒト起源の天然配列である。ある実施形態において、変異Fc領域は（例えば、本願明細書に記載の方法によって）生成することができ、抗体の可変領域又はレセプター若しくはリガンド、或いは治療用ポリペプチドの結合ドメイン等の選択された外因性のポリペプチドに融合させてもよい。

10

【0105】

好ましい実施形態において、母体ポリペプチドは、Fc領域又はその機能部位を含む。一般的に、母体ポリペプチドのFc領域は天然配列Fc領域、及び好ましくはヒト天然配列Fc領域を含む。しかし、母体ポリペプチドのFc領域は、1又は複数のすでに存在する天然配列Fc領域からのアミノ酸配列の変更又は修飾（例えばアミノ酸置換）を有していてもよい。例えば、Fc領域のC1q（C1q）結合活性がすでに変更させられていてもよく、またFc領域のFcγR結合親和性に変更されてもよい。関連する変異Fc領域をコードする所望の変異Fc領域又は核酸は構築してから、変異Fc領域（例えば、抗体可変領域、外因性のタンパク質）の所望の融合パートナーに作動可能に付着されるように設計される。さらなる実施形態において、母体ポリペプチドのFc領域は仮想的（例えば、思考上のもの又はコンピューター若しくは紙面上に可視的に表現されたもの）であり、それは物理的に存在しないが、抗体技術者は所望の変異Fc領域のアミノ酸配列を決定し、その配列又は所望の変異Fc領域のアミノ酸配列のDNAコーディングを含むポリペプチドを生成することができる。しかし、好ましい実施形態において、母体ポリペプチドのFc領域をコードする核酸配列を得ることができ、この核酸配列を変更して変異Fc領域をコードする変異性核酸配列を生成することができる。

20

【0106】

母体ポリペプチド（又は単に変異Fc領域）の変異体をコードする核酸は、具体的な配列についての本願明細書の教示を用いて、公知の方法により調製することができる。これらの方法には、ポリペプチドをコードするすでに調製された核酸への部位特異的（又はオリゴヌクレオチド媒介性）突然変異誘発法、PCR突然変異誘発法（e.g., Vallette他, Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989)、及びカセット式突然変異誘発法（e.g., Wells他, Gene 34:315-323 (1985)）が含まれるが、それらに限定されない。部位特異的突然変異誘発法は、変異体を調製するための好ましい方法である。この手法は当該技術において公知である（例えば、Carter他, Nucleic Acids Res. 13:4431-4443 (1985)）及びKunkel他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1987)を参照）。

30

【0107】

あるいは、又は更に、変異ポリペプチドをコードする所望のアミノ酸配列を決定することができ、このような変異ポリペプチド（即ち、本願明細書に記載されるように、アミノ酸置換からなる変異Fc領域を含むポリペプチド）のアミノ酸配列を合成的に生成することができる。これは、母体Fc領域が変異Fc領域の分子前駆体ではないが、代わりに、所望のアミノ酸置換の非存在下の母体に存在するFc領域のアミノ酸配列であった場合であるにもかかわらず、母体Fc領域の変異Fc領域であると未だに考慮される。

40

【0108】

母体ポリペプチドのアミノ酸配列は、インビトロ及び／又はインビボで変更された結合親和性又は活性を有し、かつ／又はインビトロ及び／又はインビボで変更されたADCCを有する変異Fc領域を生成するために修飾されてもよい。また、母体ポリペプチドのアミノ酸配列は、変更された補体結合特性及び／又は循環半減期を有する変異Fc領域を生

50

成するために修飾されてもよい。

【0109】

Fc領域の生物学的性質の実質的な改変は、(a)例えば、シート又はヘリックスコンホメーションの置換された領域のポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子、又は側鎖全体における電荷又は疎水性、(d)糖質との相互作用、又は(e)ドメインの運動柔軟性を変化させる効果の点で有意に異なるアミノ酸置換を選択することにより達成される。天然に存在するアミノ酸残基は、共通の側鎖の性質に基づき、下記のように分類される。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile
- (2) 中性かつ親水性：cys、ser、thr
- (3) 酸性：asp、glu
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg
- (5) 配向に影響を与える残基：gly、pro
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe

10

【0110】

非保存的置換により、これらの分類の1つに属するアミノ酸は他の分類に属するアミノ酸に交換される。保存的置換により、これらの分類の1つに属するアミノ酸は同一の分類に属するアミノ酸に交換される。

【0111】

以下の実施例で示されるように、改変した活性（エフェクター機能及び薬物動態）を有する変異Fc領域を設計することができる。例えば、Fc領域の1又は複数のアミノ酸残基を、ADCC活性又はCDD活性或いはFcRn結合親和性を改変（例えば、増大又は減少）するために修飾することができる。好ましい実施例において、修飾は、本願明細書の表1のリストに記載される置換である。一般的に、ADCC活性に影響することを本願明細書で確認したFc領域の残基について、そのような変異Fc領域を生成するために1又は複数のアミノ酸置換を行う。好ましい実施形態において、1～約10以下のFc領域の残基を置換する。ここで、1又は複数のアミノ酸置換を有するFc領域は、好ましくは、母体Fc領域又は天然ヒトFcの配列の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%を保持する。

20

【0112】

母体Fc領域に適当なアミノ酸配列の修飾を導入することにより、（母体Fc領域と比較して）(a)ADCCをヒトエフェクター細胞の存在下で効率的又は非効率的に媒介し、かつ／又は、(b)CDCをヒトエフェクター細胞の存在下で効率的又は非効率的に媒介し、かつ／又は、(c)C1qに、所望の親和性で結合し、かつ／又は、(d)Fcγレセプター（FcγR）又は新生児Fcレセプター（FcRn）に所望の親和性で結合することができる変異Fc領域を生成することができる。そのような変異Fc領域は、通常少なくとも1つのアミノ酸の修飾をFc領域に含む。好ましくは、修飾は、アミノ酸置換（より好ましくは、本願明細書の表1～9に列挙されるようなアミノ酸置換）である。

30

【0113】

好ましい実施形態において、母体ポリペプチドのFc領域は、ヒトFc領域又はその機能性フラグメント、例えば、天然ヒトFc領域IgG1（f及びa、zアロタイプ）、IgG2、IgG3、IgG4、及び任意の種について知られている又は発見された全てのアロタイプである。そのような領域は図2（配列番号1～8）及び図3（配列番号9～12）に示した配列を有する。

40

【0114】

ある実施形態において、増大したADCC活性を有する変異Fc領域を生成するために、母体ポリペプチドは、ADCCをすでに有するもの（例えば、母体ポリペプチドはヒトIgG1又はヒトIgG3のFc領域を含む）であることが好ましい。ある実施形態において、変異体は、母体ポリペプチドに比べて増大したADCC活性（例えば、本願明細書に記載されるADCC分析に従って母体に比べて大きなレベル）を有する。即ち、変異F

50

c 領域から成っているモノクローナル抗体は、母体 F c 領域或いは天然 I g G 1 又は I g G 3 の F c 領域配列からなるモノクローナル抗体に対して同一の環境、又は、変異 F c 領域からなるモノクローナル抗体と同一の下で比較して増大した A D C C 活性を有する。

【0115】

好ましい実施形態において、アミノ酸置換は F c 領域の C H 2 及び／又は C H 3 領域に導入される。好ましい実施形態において、これらの変異体を生成するためのテンプレートとして用いた母体ポリペプチドは、ヒト I g G の F c 領域を含む。

【0116】

ある実施形態において、増大した C D C 活性を有する変異 F c 領域を生成するために、母体ポリペプチドは、C D C をすでに有していることが好ましい。ある実施形態において、変異体は、母体ポリペプチドに比べて増大した C D C 活性（例えば、本願明細書に記載される C D C 分析に従って母体に比べて大きなレベル）を有する。即ち、変異 F c 領域から成っているモノクローナル抗体は、母体 F c 領域或いは天然 I g G 1 又は I g G 3 の F c 領域配列からなるモノクローナル抗体に対して同一の環境、又は、変異 F c 領域からなるモノクローナル抗体と同一の下で比較して増大した C D C 活性を有する。

【0117】

上述の変異ポリペプチドには、望ましい又は意図されるポリペプチドの使用に応じて更に修飾を行ってもよい。そのような修飾には、例えば、アミノ酸配列のさらなる変更（アミノ酸配列の置換、挿入及び／又は欠失）、糖質の改変、外因性ポリペプチドとの融合及び／又は共有結合による修飾が含まれる。そのようなさらなる改変は、F c レセプターとの結合及び／又は A D C C 活性の変更をもたらす、本願明細書に開示したアミノ酸の修飾の前、同時、又は後に行うことができる。

【0118】

あるいは、又は更に、アミノ酸の修飾を C l q (C l q) との結合及び／又は F c 領域の C D C 機能を改変させる 1 又は複数のさらなるアミノ酸の修飾と組み合わせることが有用な場合がある。例えば、出発物質となったポリペプチドは、C l q (C l q) に結合することができず、かつ／又は C D C を媒介できないが、本願明細書の教示に従い、これらのさらなるエフェクター機能を獲得するように改変することができる。更に、すでに C l q (C l q) 結合能を有し、必要に応じて C D C 媒介能をも更に有するポリペプチドを、これらの活性の一方又は両方を増大（或いは、減少）させるように改変することもできる。C l q (C l q) 結合を変化させ、かつ／又は C D C 活性を改変する特定の F c 領域アミノ酸の修飾については、本願明細書（表 2、7、8、及び 10 を参照）又は、国際公開第 00/42072 号パンフレットに記載される。

【0119】

上に開示したように、F c 領域又はその一部を、例えば、C D C 活性及び／又は A D C C 活性を改変することにより、エフェクター機能を変化させるようにデザインすることができる。例えば、改善した C D C 活性及び A D C C 活性を有する変異 F c 領域を生成することができる。あるいは、エフェクター機能を減少させ、あるいは除去したい場合には、C D C 活性及び／又は A D C C 活性が減少した変異 F c 領域を設計することができる。他の実施形態において、これらの活性の一方を増大させ、必要に応じて他方の活性を減少させ、例えば、増大した A D C C 活性を有するが C D C 活性が減少した F c 領域変異体、及びその逆の変異 F c 領域を生成することができる。更に、F c R n、プロテイン A、及び／又は他の F c 結合性タンパク質に対する結合親和性が改変した変異 F c 領域を設計することができる。

【0120】

ある実施形態において、本発明は、母体ポリペプチドの変異体を含む組成物を提供し、前記変異体は F c 領域を有し、F c 領域の中において少なくとも 1 つのアミノ酸の修飾を有する（例えば、Deisenhofer, Biochemistry, 20:2361-70, April 1981, 及び W00042072 を参照）。他の実施形態において、本発明は、F c 領域を有する母体ポリペプチドの変異体を含む組成物を提供

し、該変異体はFc領域において少なくとも1つの非表面残基のアミノ酸の修飾を含む。さらなる実施形態において、本発明は、Fc領域を有する母体ポリペプチドの変異体を含む組成物を提供し、該変異体は、Fc領域において、少なくとも1つの表面残基のアミノ酸の修飾及び少なくとも1つの非表面残基のアミノ酸の修飾の両方を含む。

【0121】

複合変異体

ある実施形態において、本発明の変異Fc領域は、2つ以上アミノ酸の修飾（例えば置換）からなる。このような複合変異体は、例えば、上記で詳述される（例えば、表1を参照）アミノ酸置換、又は当該技術分野において公知の置換に加えて表1に列挙されるような1つ以上のアミノ酸置換の2つ以上を選択して生成される。

10

【0122】

表10に示した複合変異体及び他の複合変異体（国際公開第00/42072号パンフレットに開示され、本願明細書において開示される組合せで使用する）は、所定の活性（例えば、FcRn結合活性、ADCC活性、及びCDC活性）について、種々のアッセイ（下記の実施例を参照）によりテストすることができる。こうして、有用な複合変異体を同定することができる。

【0123】

ある好ましい実施形態において、複数のアミノ酸置換はADCC活性を増大させる1つのアミノ酸置換、及び変異Fc領域を含むポリペプチドの新生児Fcレセプター（FcRn）への結合親和性（例えば、pH6.0における）を増大させる1つのアミノ酸の修飾を有する本発明の変異Fc領域において存在する。他の実施形態において、本発明の複合変異体は、本発明の少なくとも変異Fc領域の1つの表面残基のアミノ酸の修飾及び少なくとも1つの非表面残基のアミノ酸の修飾を含む。本発明の変異Fc領域のさらなる複合変異体は、本願明細書に記載の2又はそれ以上のアミノ酸置換、又は本願明細書に記載の少なくとも1つのアミノ酸の修飾、及び世界公開第00/42072号パンフレットに記載のアミノ酸の修飾を組み合わせることにより生成することができる。

20

【0124】

変異ポリペプチドのアッセイ

本発明は、Fc領域変異体又は本発明の変異Fc領域を含むポリペプチドをスクリーニングする種々のアッセイを提供する。スクリーニングアッセイを、有用な変異体の発見及び検証のために用いることができる。例えば、複合変異体（表10参照）をスクリーニングし、FcRへの結合が変化した、かつ／又はADCC活性が変化した、かつ／又はCDC活性が変化した（例えば、ADCC又はCDC活性が増大又は減少した）、かつ／又は全血からの標的細胞（例えばB細胞）の除去能が改変を受けた変異体を見出すことができる。また、以下に述べるように、本発明のアッセイを用いて、（例えば、抗体又は免疫応答性疾患の症状を有するヒト等の）被験者に対する有用な治療効果を有する変異体を発見し検証することができる。種々のアッセイのタイプを用いて、変異体における母体ポリペプチドに対する任意の変更を評価することができる（国際公開第00/42072号パンフレットに記載のスクリーニングアッセイを参照）。他のアッセイの例は以下に示す。

30

40

【0125】

好ましい実施形態において、変異ポリペプチド、（つまり、本発明の変異Fc領域を含むポリペプチド）は、母体ポリペプチドと比べ（つまり、例えば、結合能は、好ましくは非変異ポリペプチドの約20分の1、10分の1、7分の1、5分の1より小さい）特異抗原（未改変の抗原結合領域又は改変を受けた抗原結合領域を介した）の結合能をほぼ保持するモノクローナル抗体である。変異ポリペプチドの抗原への結合能は、ELISA、蛍光活性化細胞分類（FACS）分析、又は放射性免疫沈降法（RIA）等の手法により決定することができ、例えば、FcR結合アッセイは、本発明の変異体を評価するために使用される。例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIII、FcRn等のFcレセプターへの結合は、変異ポリペプチドを滴定し、結合した変異ポリ

50

ペプチドを、E L I S Aのフォーマット（下記の実施例を参照）において特異的に変異ポリペプチドに結合する抗体を用いて測定することにより決定することができる。例えば、抗体を含む変異体について標準的なE L I S Aアッセイによりスクリーニングを行い、p H 6 . 0及びp H 7 . 0又は7 . 4におけるF c R nを決定する。ストレプトアビジン又はニュートラアビジンを塗布した固体表面を用いてビオチン標識したF c R nを、マウス又はヒト等の他の種から捕捉することができる。ブロッキングを行った後、変異ポリペプチド（例えば抗体）で捕捉したレセプターをバッファー中p H 6 . 0又はp H 7 . 0で希釈し、インキュベートすることができる。次の工程において、ヒト抗体に特異的な分子（例えば、ヤギ（F a b '）2抗ヒトF a b抗体と酵素のコンジュゲート）を加える。その後、基質を加え、p H 6 . 0又はp H 7 . 0又は0 H 7 . 4において固定化したF c R n 10への変異ポリペプチドの結合量を決定する。本アッセイの結果を母体（非変異体）ポリペプチドの同一のF c Rへの結合能と比較することができる。他の好ましい実施形態において、（例えば、F c R nとの）E L I S Aを行い変異体のスクリーニングを行うための成分は、キットとして（例えば取扱説明書と共に）パッケージ化されている。

【0126】

また、A D C Cアッセイは、本発明の変異体をスクリーニングするために使用される。A D C Cアッセイはインビトロ及び／又はインビボで行うことができる。変異ポリペプチドのA D C C活性の評価を行うために、A D C Cアッセイを種々のエフェクター：標的比で行って（p e r f o n n e d）もよい。例示的なA D C Cアッセイにおいて、次の標的抗原：C D 2 0、C D 2 2、C D 3 3、C D 4 0、C D 6 3、E G Fレセプター、h e r 20 ー2レセプター、前立腺特異的膜抗原、L e w i s Y糖質、G D 2及びG D 3ガングリオシド、l a m p - i、C O - 0 2 9、L 6、及びe p h A 2のいずれかが発現した標的細胞系を用いることができる。エフェクター細胞は健康なドナーから（例えば、実験当日に）得ることができ、P B M Cは、H i s t o p a q u e（S i g m a社製）を用いて精製することができる。その後、標的細胞を本発明の変異F c領域を含むI g G変異体と、エフェクター細胞と、例えば、4 0：1、2 0：1、及び1 0：1のエフェクター：標的比で混合する前に、例えば0 . 1～1 0 0 0 n g / m lで3 0分間プレインキュベートする。その後、A D C C活性を、損傷を受けた細胞の細胞質から上澄み中に放出された乳酸脱水素酵素（L D H）活性の測定に基づき、細胞の死及び溶解の定量を行うためのC y t o t o x i c i t y D e t e c t i o n K i t（R o c h e M o l e c u l a r 30 B i o c h e m i c a l s社製）を用いて、比色定量法により測定する。A D C C活性は、クロムを導入した標的細胞のアッセイにより、細胞の死又は溶解の結果放出されたクロムを測定することによっても測定することができる。抗体非依存性細胞毒性は、抗体の非存在下で標的細胞及びエフェクター細胞由来のL D H活性を測定することにより決定することができる。全放出量は、1 % T r i t o n - Xを標的細胞及びエフェクター細胞に添加した後で測定することができる。標的細胞及びエフェクター細胞のインキュベーションは、最適化された時間（0 . 5 4～1 8時間）、3 7 °C、5 . 0 % C O 2中で行い、次いでアッセイプレートの遠心分離を行うことにより行う（p e r f o n n e d）ことができる。その後上澄みを9 6ウェルプレートに移し、L D H検出試薬を加え、3 0分間2 5 °C 40でインキュベートする。資料の吸光度は、4 9 0 n mでマイクロプレートリーダーを用いて測定することができる。細胞毒性の割合は、下式により計算することができる。

$$\text{細胞毒性の割合}(\%) = \{ (\text{実験値} - \text{低対照値}) / (\text{高対照値} - \text{低対照値}) \} \times 100$$

抗C D - 2 0及び変異体における細胞毒性の割合は、同量のR I T U X A Nと直接比較することができ、相対有効性の測定値が得られる。例示的なA D C Cアッセイにおいては、C D 2 0抗原を過剰発現したS K W 6 . 4細胞（例えば、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nより購入）を、標的細胞源として用いることができる。このアッセイの多くの変形が知られている（例えば、Z u c k e r m a n他、C R C C r i t R e v M i c r o b i o l 1 9 7 8；7（1）：1 - 2 6を参照）。

10

20

30

40

50

【0127】

このようなアッセイに有用な細胞としては、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、及び他の末PBM Cが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、又は更には、本発明の変異ポリペプチドのADCC活性は、インビボで、Clynes他、PNAS（USA）95：652－656（1998）に開示されたような動物モデル等を用いて評価することができる。

【0128】

本発明の変異体は、補体の活性化によってもスクリーニングすることができる。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro他、J. Immunol. Methods, 202：163（1996））を参照。）例えば、種々の濃度の変異ポリペプチド及びヒト補体をバッファーで希釈してもよい。変異ポリペプチドが結合する抗原が発現した細胞を、 1×10^6 個/mlの密度まで希釈することができる。変異ポリペプチド、希釈されたヒト補体、及び抗原を発現した細胞の混合物を、平底の組織培養用96ウェルプレートに加え、2時間、37℃、5% CO₂中でインキュベートし、補体依存性細胞溶解を促進する。その後、50 µlのアラマブルー（Accumed International社製）をそれぞれのウェルに加え、37℃で州やインキュベートする。96ウェル蛍光光度計を用いて、励起波長530 nm、発光波長590 nmで吸光度の測定を行うことができる。結果は、相対蛍光単位（RFU）によって表される。サンプルの濃度は標準曲線により計算することができ、非変異ポリペプチドと比較した活性の割合を、対象となる変異ポリペプチドについて求めることができる。

【0129】

ある実施形態において、本発明の変異体は補体を活性化しない、又は、十分に活性しない。例えば、変異ポリペプチドは、本アッセイにおいて、変異を有しないIgG1 Fc領域を有する対照抗体と比べ約0～10%のCDC活性を示す。好ましくは、変異体は上述のCDCアッセイにおいて全くCDC活性（例えば、バックグラウンドレベル以上の）を示さないように見える。他の実施形態において、本発明の変異体は、母体ポリペプチドと比べ増大したCDCを示す（例えば、好ましくは、IC50値の比較において、インビトロ又はインビボで約1.1、1.5、1.7、又は2～約100倍（又はそれ以上）に増大したCDC活性を示す）ことが見出される。

【0130】

本発明の変異ポリペプチドは、全血サンプルにおける標的細胞の消失によってもスクリーニングすることができる。例えば、種々の濃度のCD20標的特異性を有する変異ポリペプチドを、全血サンプルにおけるB細胞の消失についてfacsを用いてスクリーニングすることができる（Vugmeyer他、2003 Cytometry 52A, 101－109）。新たに採取した血液を種々の濃度の変異ポリペプチドと37℃、5% CO₂中で4時間（時間は変化させてもよい）インキュベートする。インキュベート後、赤血球を製造者の説明書に従い、塩化アンモニウム試薬（Beckton-Dickinson、カタログ番号555899）により溶解し、蛍光標識を有するB細胞特異的な抗体（抗CD19抗体等）を用いて、facs法によりB細胞を検出する。結果は、未処理のサンプル又は無関係な（非消失性の）抗体とインキュベートしたサンプルのいずれかに対するB細胞の消失率（%）として表される。

【0131】

好ましい実施形態において、変異体はB細胞を母体ポリペプチドよりも効率的に消失させることができる。変異ポリペプチドは、B細胞を、例えば、母体ポリペプチドより約2倍以上、好ましくは約5倍以上消失させることができる。また、変異体は、B細胞の消失について高い能力を示すことができる。例えば、変異体は、母体ポリペプチドと同じ割合のB細胞を消失させるが、約1/5、好ましくは約1/10の抗体しか用いる必要がない。変異体に媒介される標的細胞の消失は、母体ポリペプチドと比べ、約2倍、3倍、5倍～約1000倍以上、好ましくは、約5倍～約1000倍に増大する。

【0132】

本発明の変異体は、インビボでもスクリーニングすることができる。任意のタイプのインビボアッセイを用いることができる。1つのタイプのアッセイの具体例について以下に示す。本例に示したアッセイにより、Fc変異体のインビボでの臨床前評価が可能になる。テストされる変異体は、何らかの活性を有することが知られている特定の抗体のFc領域に取り込まれてもよい。例えば、変異体を抗CD20 IgGのFc領域に、変異誘発法により組み込むことができる。これにより、母体IgG及びFc変異性IgGをRITUXAN（腫瘍の縮小を促進することが知られている）と直接比較することが可能になる。臨床前評価は、2つのフェーズ（薬物動態フェーズ及び薬力学フェーズ）により行うことができる。第1フェーズの薬物動態試験の目標は、Fc領域変異性IgG及びインビボ活性が既知の抗体（例えばRITUXAN）との間で、排出速度が相違するか否かを決定することである。排出速度が異なると、血清中のIgGの定常状態レベルが異なる。かくして、定常状態濃度の相違が検出された場合には、正確な比較が可能のように規格化しなければならない。第2フェーズの薬力学試験の目標は、Fc変異体の、この場合には腫瘍の成長に及ぼす効果を決定することである。RITUXANを用いた過去の試験では、単回投与が用いられ腫瘍の成長を完全に阻害した。この試験では定量的な違いを測定できないため、容量範囲を用いる必要がある。

10

【0133】

第1フェーズでのFc変異体、野生型の母体Fc、及びRITUXANの薬物動態の比較は、例えば、次の方法により行われる。まず、動物1頭あたり40 µg（試験用に他の用量）を静脈注射し、IgGの血漿中濃度を、0、0.25、0.5、1、24、48、72、96、120、168、及び336時間後に定量する。データを、例えば、ゼロ遅延2-コンパートメント薬物動態モデル薬物動態プログラム（WinNonLin）によりフィッティングし、排出速度を用いることができる。排出速度を用いて、次の式により定常状態での血漿内濃度を定義することができる。

20

$$C = (\text{投与量}) / (\text{排出速度} \times \tau)$$

ここで、 τ は投与間隔、Cは定常状態での血漿内濃度を表す。薬物動態実験は、腫瘍を有しないマウスを、例えば、1つの時間ポイントあたり少なくとも5頭のマウスを用いて行うことができる。

【0134】

30

次のフェーズのために、下記の方法により例示的な動物モデルを用いることができる。CB17-SCIDマウスの右脇腹の皮下に、106個のRaji細胞を埋め込む。Fc変異体、野生型Fc、及びRITUXANの静脈注入を、埋め込み後すぐに開始し、腫瘍のサイズが直径2 cmを超えるまで続行する。毎週月、水、金曜日に、腫瘍の長さ、幅、及び高さをノギスで測定することにより、腫瘍の体積を決定する（腫瘍の体積 = $W \times L \times D$ ）。腫瘍の体積-時間プロットより、腫瘍成長速度が得られ、薬力学計算が行なわれる。群毎に、少なくとも約10頭の動物を用いる必要がある。

【0135】

第2フェーズでの変異性Fc抗体、野生型の母体Fc、及びRITUXANの薬力学の比較は、次の方法により行われる。文献値に基づき、毎週10 µg/gのRITUXANは、インビボで完全に腫瘍の成長を阻害する（Clynes他、Nat. Med. 6:443-6, 2000）。したがって、週当たりの用量範囲10 µg/g、5 µg/g、1 µg/g、0.5 µg/g、及び0 µg/gについてテストすることができる。腫瘍の成長を50%阻害する定常状態での血漿中濃度を、定常状態での血漿中濃度及び効果の関係からグラフを用いて決定する。定常状態での血漿中濃度を、上述のように計算することができる。必要ならば、 τ をそれぞれの変異性Fc抗体及び野生株Fc抗体について、薬物動態特性に応じて調節し、RITUXANと同程度の定常状態での血漿中濃度を達成することができる。母体ポリペプチド（例えばFc野生株）と比較して、Fc変異体及びRITUXANの薬力学値が統計的に改善し、一般的に変異性Fc抗体の活性がインビボにおいて改善することを示す。

40

50

【0136】

変異性Fc抗体、野生型Fc、及びRITUXANのさらなる薬力学的比較は、カニクイザルを用いて文献記載の方法(Reff他, Blood, 83, 435-445, 1994)により行うことができる。末梢B細胞及びリンパ節B細胞の消失における用量反応を用いて、静脈投与及び／又は皮下投与されたFc変異体と、野生型Fc及びRITUXANの相対効果を比較することができる。母体ポリペプチド(例えばFc野生株)と比較して、Fc変異体及びRITUXANの薬力学値が統計的に改善し、一般的に変異性Fc抗体の活性がインビボにおいて改善することを示す。

【0137】

さらなる実施形態において、本発明の変異体(本発明の変異Fc領域を含むポリペプチド又はその機能的な部分)はスクリーニングされ、少なくとも2種類の種に対して治療的に有用な変異体が同定される。そのような変異体は、本願明細書で「複数種の改善した変異体」と呼ばれ、特にヒトに対する治療効果を有する変異体の同定に有用であり、動物モデルにおいても有効性を示す(又は有効性を示す傾向がある)。この点で、本発明は、動物モデルのデータが政府の監督官庁(例えば米国食品医薬品局)に提出した全てのヒトに対する試験結果を強く支持するため、ヒトに対する臨床試験で承認される見通しの高い変異体を同定する方法を提供する。

【0138】

ある実施形態において、複数種の改善した変異体は、まずヒトエフェクター細胞を用いたADCCアッセイを行い、改善した変異体を見出し、次いでマウス、ラット又は非ヒト霊長類エフェクター細胞を用いた第2のADCCアッセイを行い、複数種の改善した変異体である改善した変異体のサブセットを見出すことにより同定される。ある実施形態において、本発明は、a) i) 標的細胞、ii) 少なくともFc領域の一部を有する母体ポリペプチドの候補変異体で、候補変異体は、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、候補変異体は、標的細胞に対する細胞毒性を、第1の種(例えばヒト)のエフェクター細胞の存在下で母体ポリペプチドよりも効率的に媒介する候補変異体、及びiii) 第2の種(例えば、マウス、ラット又は非ヒト霊長類)のエフェクター細胞を提供すること、かつ、b) 組成物を候補変異体が標的細胞と結合することにより標的細胞に結合した候補変異体を生成させる条件下で標的細胞とインキュベートすること、c) 第2の種のエフェクター細胞を、候補変異体が結合した標的細胞と混合すること、並びに、d) 候補変異体に媒介された標的細胞に対する細胞毒性を測定することを含む、複数種の改善した変異体を同定する方法を提供する。

【0139】

ある実施形態において、該方法は、工程e) 候補変異体が第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞に対する細胞毒性を媒介するか否かを決定することを更に含む。ある実施形態において、該方法は、工程f) 候補変異体を、第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞に対する細胞毒性を媒介する複数種の改善した変異体として同定することを更に含む。好ましい実施形態において、同定された複数種の改善した変異体は、その後1又は複数種での動物アッセイによりスクリーニングされる。

【0140】

ある実施形態において、複数種の改善した変異体は、まずヒトの血液を用いた全血アッセイを行い、改善した変異体を見出し、次いでマウス、ラット又は非ヒト血液を用いた第2の全血アッセイを行い、複数種の改善した変異体である改善した変異体のサブセットを見出すことにより同定される。ある実施形態において、本発明は、a) i) 標的細胞、ii) 少なくともFc領域の一部を有する母体ポリペプチドの候補変異体で、候補変異体は、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、標的細胞の消失を、第1の種(例えばヒト)のエフェクター細胞の存在下で母体ポリペプチドよりも効率的に媒介し、及びiii) 第2の種(例えばマウス、ネズミ又は非人間的な霊長類)の血液、かつ、b) 組成物を候補変異体が標的細胞と結合することにより標的細胞に結合した候補変異体を

生成させる条件下で標的細胞とインキュベートすること、c) 第2の種のエフェクター細胞を、候補変異体が結合した標的細胞と混合すること、並びに、d) 候補変異体に媒介された標的細胞の消失を測定することを含む、複数種の改善した変異体を同定する方法を提供する。ある実施形態において、該方法は、工程e) 候補変異体が第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞の消失を媒介するか否かを決定することを更に含む。ある実施形態において、該方法は、工程f) 候補変異体を、第2の種のエフェクター細胞の存在下で、母体ポリペプチドよりも効率的に標的細胞の消失を媒介する複数種の改善した変異体として同定することを更に含む。好ましい実施形態において、同定された複数種の改善した変異体は、その後1又は複数種での動物アッセイによりスクリーニングされる。

10

【0141】

ある実施形態において、複数種の改善した変異体は、ヒトの成分（例えば、ヒト細胞、ヒトFcR）を用いた上述のいずれかのアッセイを行うことにより同定され、改善した変異体を同定し、その後、ヒト以外の成分（例えば、マウス細胞、マウスFcR）を用いた同様のアッセイ（あるいは異なるアッセイ）を行う。このようにして、ヒトに基づくアッセイ及び第2の種に基づくアッセイの両者において、上記の基準によく従い機能する変異体のサブセットを同定することができる。

【0142】

複数種の改善した変異体を同定するための方法の例は下記のとおりである。まず、IgGのFc領域の少なくとも一部をコードする核酸配列を、発現したアミノ酸配列は、少なくとも1つのアミノ酸が変化するように変異させ、それにより変異体を生成する。次に、この発現したIgG変異体は、ヒトPBMC又はサブセット（例えば、NK細胞又はマクロファージ）を用いたADCCアッセイにより評価される。増大したADCC活性が観測されると、変異体は、マウス又はラットPBMCを用いた第2のADCCアッセイによりスクリーニングされる。あるいは、又は更に、クローニングされたげっ歯類レセプター又は細胞系に結合する変異体を用いてアッセイを行うことができる。最後に、変異体について、複数種の改善した変異体であることを特徴づける、第2のアッセイにおける改善が観測された場合、変異体はマウス又はラットにおいてインビボでスクリーニングされる。

20

【0143】

変異Fc領域を含む分子の例

30

本発明の変異Fc領域は、大きな分子の一部であってもよい。大きな分子は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二特異性抗体、イムノアドヘシン等であってもよい。更に、本発明の変異Fc領域は、改変した（増加又は減少した）半減期を示す非抗体ポリペプチドに作動可能に付着される。このように、本発明の変異Fc領域は、広汎な用途を有することは明らかである。

【0144】

抗体を含む変異Fc領域

好ましい実施形態において、変異Fc領域を含む分子（例えばポリペプチド）は抗体である。抗体を生成する手法は、以下に述べるとおりである。

【0145】

(1) 抗原の選択及び調製

40

通常、変異Fc領域を含む分子が抗体である場合、抗体は、対象となる抗原に対する。好ましくは、抗原はポリペプチドであり、抗原分子の量又は活性の減少から利益がもたらされる疾患又は障害にかかっている哺乳類への抗体の投与は、該哺乳類に対して治療の利益をもたらす。しかし、非ポリペプチド抗原（ガンに関連する糖脂質抗原等；米国特許第5,091,178号明細書を参照）に対する抗体を用いることもできる。

【0146】

抗原の例としては、レニン、ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモン等の成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、リポタンパク質、 α - α -アンチトリプシン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、プロインスリン、卵胞刺激

50

ホルモン、カルシトニン、黄体形成ホルモン、グルカゴン、因子V I I I C、因子I X、組織因子(T F)、及びフォンウィレブラント等の凝固因子、タンパク質C等の抗凝固因子、心房性ナトリウム利尿因子、肺サーファクタント、ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化因子等(t-P A)のプラスミノゲン活性化因子、ボンベシン、トロンビン、造血成長因子、腫瘍壊死因子- α 及び- β 、エンケファリナーゼ、R A N T E S (r e g u l a t e d o n a c t i v a t i o n n o r m a l l y T c e l l e x p r e s s e d a n d s e c r e t e d)、ヒトマクロファージ炎症タンパク質(M I P-1- α)、ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン、ミュー管抑制物質、リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、プロリラキシン、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、 β -ラクタマーゼ等の微生物タンパク質、D N a s e、I g E、C T L A-4等の細胞毒性T-リンパ球関連抗原(C T L A)、インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子(V E G F)、ホルモン又は成長因子のレセプター、タンパク質A又はD、リウマチ因子、骨誘導性神経栄養因子(B D N F)、ニュートロフィン-3、-4、-5、又は-6(N T-3、N T-4、N T-5、又はN T-6)、又は神経成長因子等の神経栄養因子、血小板誘導成長因子(P D G F)、 α F G F及び β F G F等の繊維芽細胞増殖因子、内皮成長因子(E G F)、T G F-1、T G F-2、T G F-3、T G F-4、又はT G F-5等のT G F- α 及びT G F- β 、等の形質転換成長因子(T G F)、インスリン様成長因子-I及び-I 1(I G F-I及びI G F-I I)、d e s (1-3)-I G F-I(脳I G F-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質、C D 3、C D 4、C D 8、C D 19及びC D 20等のC Dタンパク質、エリスロポイエチン、骨誘導因子、イムノトキシン、骨形成タンパク質(B M P)、成長分化因子(例えばG D F 8)インターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン、M-C S F、G M-C S F、及びG-C S F等のコロニー刺激因子(C S F)、I L-IからI L-25までのインターロイキン(I L)、スーパーオキシドジスムターゼ、T 25-細胞レセプター、表面膜タンパク質、分解促進因子、例えばA I D Sエンベロープの一部等のウイルス性抗原、輸送タンパク質、ホーミングレセプター、アドレシン、調節タンパク質、C D 11 a、C D 11 b、C D 11 c、C D 18、I C A M、V L A 4及びV C A M等のインテグリン、H E R 2、H E R 3又はH E R 4レセプター等のガン関連抗原、グレリン、アポトーシス経路の構成分子、及び上述のポリペプチドのフラグメント又は前駆体等の分子を含むがこれらに限定されない。

【0147】

好ましい抗原としては、C D 3、C D 4、C D 8、C D 19、C D 20及びC D 34及び等のC Dタンパク質、E G Fレセプター、H E R 2、H E R 3又はH E R 4レセプター等のE r b Bレセプターファミリー、L F A-1、M a c 1、p 150. 95、V L A-4、I C A M-1、V C A M、a 4/p 7インテグリン、及びa 5又はサブユニットの一方(例えば、抗C D I I a、抗C D 18、又は抗C D I I b抗体)を含むX v/p 3インテグリン等の細胞接着分子、V E G F等の成長因子、組織因子(T F)、 α インターフェロン(α -I F N)、G D F-8等の成長分化因子、I L-8等のインターロイキン、I g E、血液型抗原、f l k 2/f l t 3レセプター、肥満(O B)レセプター、m p lレセプター、C T L A-4、タンパク質C、及びグレリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0148】

必要に応じて他の分子と結合した可溶性の抗原又はそのフラグメントを、抗体を形成するための抗原として用いることができる。レセプター、それらのフラグメント(例えば、レセプターの膜貫通領域)等の膜貫通分子を免疫抗原(i r n m u n o g e n)として用いることができる。あるいは、膜貫通分子を発現している細胞を抗原として用いることができる。そのような細胞は、天然の供給源(例えばガン細胞系)から誘導することであってもよく、又は組み換え手法により膜貫通タンパク質を発現させてもよい。抗体を調製するのに有用な他の抗原及びその型は、当業者にとって明らかである。

【0149】

(i i) ポリクローナル抗体

本発明は、変異Fc領域を有するポリクローナル抗体を提供する。例えば、改変したG1定常領域を含むヒト免疫グロブリンレパートリーを、免疫グロブリンを不活性化されたマウスに移植し、改変したFc領域を含むIgGレパートリーを発現したマウスを得ることができる（例えば、Mendez, MJ他, Nature Genetics 15: 146 (1997) を参照）。ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原及びアジュバントの頻回皮下注射（sc）又は腹腔内（ip）注射により動物内で発現する。関連抗原を、免疫する種に対する免疫原性を有するタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビター）に、二官能性又は誘導化剤（例えば、システイン残基で結合させる場合のマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル、リジン残基で結合させる場合のN-ヒドロキシスクシンイミド、グルタルアルデヒド、スクシニルアルデヒド、SOC12、又はR1N=C=NR（式中、R及びR1は異なるアルキル基を表す））を用いて結合させることは有用である。

10

【0150】

一般的なウサギ又はマウスに対する免疫のプロトコルは、以下のとおりである。動物を抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して、例えば、100 µg又は5 µg（それぞれ、ウサギ及びマウスに対する量）のタンパク質又はコンジュゲートを3倍容の完全フロインドアジュバントと混合し、腹腔内の複数個所に注射することにより免疫する。1ヵ月後、動物を、元の量の1/5又は1/10の完全フロインドアジュバント中のタンパク質又はコンジュゲートを腹腔内の複数個所に注射し免疫性を高める。7～14日後に動物から採血し、血清を抗体力価によりアッセイする。力価が一定値に達するまで動物の免疫性を高める。好ましくは、動物は同一の抗原のコンジュゲートであるが、異なるタンパク質及び／又は異なるクロスリンク試薬により結合させたコンジュゲートにより抗原性を高められる。コンジュゲートは、組み換え細胞の培養により、融合タンパク質として製造することもできる。更に、ミョウバン等の凝集剤を、免疫応答を高めるために好適に用いることができる。

20

【0151】

(i i i) モノクローナル抗体

本発明は、変異Fc領域を有するモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler他, Nature, 256: 495, 1975に記載の方法）又は組み換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照）を含む種々（number）の方法により製造することができる。

30

【0152】

ハイブリドーマ法では、マウス又はハムスター又はマカクザル等の適当な宿主動物を免疫し、免疫に用いるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する又は産生能を有するリンパ球を誘導する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。その後リンパ球を、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する。このようにして調製したハイブリドーマ細胞を接種し、好ましくは未融合の母体骨髓腫細胞の生存を阻害する1又は複数の物質を含む適当な培地で培養する。例えば、母体骨髓腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR T又はHPR T）を欠く場合には、ハイブリドーマの培地には通常ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み（HAT培地）、これらの物質はHGPR T欠損細胞の成長を阻害する。

40

【0153】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、抗体産生細胞を選択することにより、安定した高レベルの抗体の産生を支え、HAT培地等の培地に感受性を有する。これらの中で、好ましい骨髓腫細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス、の腫瘍から誘導されたもの、及びAme

50

rican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2又はX63-Ag8-653細胞等のマウス骨髓腫系である。ヒト骨髓腫細胞及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系も、ヒトモノクローナル抗体の製造について記載されている(例えば、Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984))。

【0154】

ハイブリドーマ細胞を培養する培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生のためにアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法、又は、RIA若しくは酵素共役免疫結合アッセイELISA等のインビトロ結合アッセイによって決定される。ハイブリドーマ細胞が、所望の特異性、親和性及び／又は活性を有する抗体を産生することが同定されると、クローンは、限界希釈法によりサブクローンし、標準培地で培養することができる。この目的に好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地である。更に、ハイブリドーマ細胞は、インビボで、動物の腹水ガン細胞として培養することができる。サブクローンから分泌されるモノクローナル抗体は、培地、腹水、又は血清から、例えば、プロテインAセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製法により好適に単離される。

【0155】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来法(例えば、モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブの使用)により容易に単離及び配列決定することができる。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源としての機能を果たす。一旦単離されると、DNAを発現ベクターに組み込むことができ、その後、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞等の、他の免疫グロブリンを産生しない宿主細胞にトランスフェクトし、組み換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成物を得る。組み換え法による抗体の産生については、以下により詳細に説明する。

【0156】

ある実施形態において、抗体又は抗体のフラグメントは、例えば、McCafferty他, Nature, 348:552-554(1990)に記載の手法を用いて生成された抗体ファージライブラリーから単離される。Clackson他, Nature, 352:624-628(1991)及びMarks他, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)には、それぞれ、マウス及びヒト抗体のファージライブラリーを用いた単離について記載されている。下記の文献には、チェーンシャフリング(Marks他, Biotechnology, 10:779-783(1992))、また、組み合わせ感染及びインビボ組み換えを、非常に大きいファージライブラリーを構築するための戦略として用いた高親和性(nM範囲)ヒト抗体の産生(例えば、Waterhouse他, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))について記載されている。このように、これらの手法及び同様の手法は、モノクローナル抗体の単離のための当該技術分野において公知の抗体ハイブリドーマ法の、実行可能な代替技術である。また、DNAは、例えば、相同なマウスの配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常領域をコードする配列を用いること(例えば、米国特許第4,816,567号明細書及びMorrison他, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンをコードする配列に、非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全部又は一部を共有結合させることにより修飾することができる。

【0157】

通常、そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常領域の代わりに用いられ、又は、それらは、抗体の1つの抗原結合部位の変換領域の代わりに用いられ、キメラ抗原及び異なる抗原に対する特異性を有する他の抗原結合部位に対する特異性を有する1

10

20

30

40

50

つの抗原結合部位を含む二価抗体が生成される。

【0158】

i v) ヒト化抗体及びヒト抗体

本発明は、本発明の変異Fc領域を有するヒト化抗体及びヒト抗体を提供する。好ましい実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列と共にヒト抗体由来でないアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、ヒト化抗体中のヒト配列はフレームワーク領域(FR)を含み、ヒト配列由来でない配列又は残基は、1又は複数のCDRを含む。FR及びCDRは、重鎖及びVL領域におけるアミノ酸残基の番号づけに基づいて定義可能であることは注目すべきである。CDRという用語は、重鎖及び軽鎖の両者のポリペプチドの可変領域においてみられる非連続な抗原結合部位を意味する。これらの領域は、Kabatら(J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977) 及びKabat他, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991); 以下「Kabat」という)、Chothiaら(J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); 以下「Chothia」という)、及びMacCallumら(J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); 以下「MacCallum」という)により定義され、これらの定義を互いに比較すると、重複やアミノ酸残基のサブセットが含まれる。それでもなお、これらの全ての定義を、単独で(例えば、Kabatの定義を)、あるいは組み合わせて(あくまで例示であるが、Kabat及びChothiaの定義の組み合わせ)用いることにより、抗体(ヒト化抗体を含む)のCDRを定義することは、本願明細書での用語の定義及び使用の範囲内に含まれる。

【0159】

また、「フレームワーク」という用語は、抗体可変領域について使用される場合、抗体可変領域内に含まれるがCDRの外にある全てのアミノ酸残基を意味する。したがって、可変領域フレームワークは、約100~120アミノ酸の長さを有するが、CDRの外に存在するアミノ酸のみを指す。「フレームワーク領域」という用語は、CDRにより隔てられたそれぞれのフレームワークのドメインを意味する。したがって、Kabatの定義によるVH領域及びCDRの具体例として、フレームワーク領域1(FR1)は、アミノ酸1~30を含む可変領域のドメインに相当し、フレームワーク領域2(FR2)は、アミノ酸36~49を含む可変領域のドメインに相当し、フレームワーク領域3(FR3)は、アミノ酸66~94を含む可変領域のドメインに相当し、フレームワーク領域4(FR4)は、アミノ酸103から可変領域のC末端までを含む可変領域のドメインに相当する。軽鎖可変領域におけるFRも、同じようにそれぞれの軽鎖可変領域のCDRによって隔てられている。同様に、Chothia又はMacCallumによるCDRの定義又はそれらのCDRの定義の任意の組み合わせを用いて、フレームワークの境界はCDRによって上述のようにして区分される。CDRについて複数の定義が存在するが、Kabatの定義によりCDRを定義するのが好ましい。

【0160】

ヒト化抗体中のヒト抗体に由来しない残基は、他の種(マウスが含まれるが、これに限定されない)から導入された、又は派生したものであってよく、あるいは、これらの配列は(例えば、ランダム化された核酸配列から生成された)ランダムアミノ酸配列であってもよく、これらは、ヒト化抗体配列に挿入される。上述したように、ヒト化抗体中のヒトアミノ酸配列は、好ましくは、FRであり、ヒト抗体由来でない残基は、(他の種から誘導されたものであれ、ランダムアミノ酸配列であれ)好ましくは、CDRに相当する。しかし、ある実施形態において、1又は複数のFRは、1又は複数の非ヒト由来アミノ酸配列を含んでいてもよい。他のヒトフレームワークへの改変又は修飾(例えば、非ヒト由来残基の導入)の場合、改変又は修飾されたFRを、他の種由来の修飾されたCDR又はランダムCDR配列に隣接させることが可能であるが、他の実施形態において、改変したFRは、他の種由来の改変したCDR配列又はランダムCDR配列に隣接しない。ある実施形態において、ヒト化抗体のフレームワーク配列は、完全にヒト由来(ヒトフレームワー

クに対するフレームワークの変更は行われない)である。好ましい実施形態において、ヒト化抗体のフレームワーク配列は、完全にヒト生殖細胞系由来(ヒト生殖細胞系フレームワークに対するフレームワークの変更は行われない)である。

【0161】

他の種由来の非ヒトアミノ酸残基、又はランダム配列は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、通常「インポート」可変領域から取り込まれる。ヒト化は、基本的にWinterらの方法(例えば、Jones他, Nature, 321:522-525(1986); Riechmann他, Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen他, Science, 239:1534-1536(1988))に従い、ヒト抗体の対応するCDR配列を、げっ歯類(又は他の哺乳類)のCDR又はCRC配列に置換することにより行われる。また、完全なヒト可変領域よりもはるかに短い部分は、非ヒト種由来の対応する配列によって置換された抗体を生成することもできる(例えば米国特許第4,816,567号明細書)。実際に、ヒト化抗体は、通常、いくつかのCDR残基及び可能なばいくつかのFR残基がげっ歯類抗体の対応する部位によって置換され、又は、上述のように、CDR配列がランダム配列によって置換されたヒト抗体である。非限定的な例示に過ぎないが、ドナーCDRの抗体アクセプター可変領域フレームワークへの結合親和性を比較する方法が、国際公開第01/27160号パンフレット、及び米国特許出願第09/434,870号明細書及び米国特許出願第09/982,464号明細書に記載されている。

【0162】

ヒト可変領域(重鎖及び軽鎖)を、ヒト化抗体の作成のために選択することは、免疫原性の減少のために重要である。いわゆる「ベストフィット」法によると、ヒト化するげっ歯類抗体の可変領域の配列は、既知のヒト可変領域配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。げっ歯類配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として採用する(例えば、Sims他, J. Immunol., 151:2296(1993), 及びChothia他, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法においては、特定の軽鎖及び重鎖のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導された特定のフレームワークを用いる。同一のフレームワーク法を、いくつかの異なるヒト化抗体に用いることができる(例えば、Carter他, Proc. Natl. Acad. USA, 89:4285(1992); Presta他, J. Immunol., 151:2623(1993))。

【0163】

他の実施形態において、特定のヒト抗体フレームワークを「予備選択」する必要はない(最も相同性が高いヒトフレームワーク又はヒト化される所定の候補抗体と配列の同一性を有する配列を選択する必要がない)。これらの実施形態において、共通又は万能ヒトフレームワークを、1又は複数の非ヒトCDRを受容するために用いることができる。好ましい実施形態において、1つの普遍的完全ヒトフレームワークを、候補抗体のフレームワーク配列との相同性に関わりなく、ヒト化される全ての抗体のフレームワークとして用いられる。このように、フレームワーク領域に改変を施さずにヒト化抗体を生成させることができる。この普遍的完全ヒトフレームワークは、1又は複数のCDR配列を受容することができる。1つの実施形態において、1又は複数のCDR配列は、他の種に由来する完全な抗体中の対応するCDRと比べ修飾されている他の種(例えば、マウス又はネコ)に由来する抗体のCDR配列である(CDRの導入及び普遍的ヒトフレームワーク(framework)に導入されたCDRの修飾が同時である)。1又は複数のアミノ酸に対応する修飾は、他の種に由来する完全な抗体中の対応するCDRと比べて(修飾されたCDRにおいて)変化する。1つの実施形態において、CDR中の全てのアミノ酸残基はライブラリーに含まれるが、他の実施形態においては、CDRのアミノ酸残基の全てがライブラリーに含まれるわけではない。他の実施形態において、1又は複数のCDR配列は、CDR配列を置換するランダム配列である。

【0164】

好ましい実施形態において、抗体は、抗原に対する高い親和性及び他の好ましい生物学的性質を保持したままヒト化される。ある実施形態において、ヒト化抗体の抗原に対する親和性は、対応する非ヒト化抗体、完全抗体又はそれらのフラグメント又は一部（例えばげっ歯類候補抗体）の親和性よりも高い。この点において、ある実施形態において、ヒト化抗体は母体配列の分析の過程で、母体配列及びヒト化配列の3次元モデルを用いた種々の仮想的なヒト化抗体により調製される。3次元免疫グロブリンモデルは広く入手可能であり、当業者によく知られている。可能性のある候補免疫グロブリン配列のコンホメーションの3次元構造を図示し表示するコンピュータープログラムが入手可能である。これらの表示を検討することにより、候補免疫グロブリン配列の機能において残基が果たす可能性のある役割の解析、例えば、候補免疫グロブリンが抗原に結合する能力に影響を与える残基の解析が可能になる。このようにして、FR残基をレシピエントから選択して組み合わせることができ、標的に対する増大した親和性等の所望の抗体特性インポート配列が得られる。一般的に、CDR残基は直接的及び最も実質的に、抗原への結合に関与する。

【0165】

当業者によく知られた種々の具体的な方法を用いて、抗体CDR（又は抗体CDRの代わりにランダム配列）を抗体フレームワークに導入することができる（例えば、米国特許出願第09/434,879号明細書及び米国特許出願第09/982,464号明細書参照）。ある実施形態において、重複オリゴヌクレオチドを抗体遺伝子又はその一部（例えば、ヒト化抗体をコードする遺伝子）の合成に用いることができる。他の実施形態において、抗体テンプレートの変異発現は、Kunkelらの方法（上掲）により、例えば、修飾CDR又はランダム配列をCDRの代わりに用いることにより行うことができる。ある実施形態において、軽鎖及び重鎖可変領域を別個にヒト化し、その後ヒト化可変領域として共発現させる。他の実施形態において、ヒト化可変領域は、完全抗体の可変領域を形成する。ある実施形態において、ヒト化可変領域を含む完全抗体のFc領域は修飾を受けている（例えば、少なくとも1つのアミノ酸の修飾をFc領域において受けている）。例えば、ランダム化CDRによってヒト化され、フレームワークについて改変を受けていない抗体は、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸の修飾を含んでいてもよい。

【0166】

他の実施形態において、内在性の免疫グロブリン産生能を有しておらず、免疫するとヒト抗体の完全なレパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（マウス等）を用いる。例えば、キメラマウス又は生殖細胞系変異マウスにおいて、抗体の重鎖結合領域（JH）遺伝子の同型欠失により、内在性抗体の産生は完全に阻害されることが記述されている。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイをそのような生殖細胞系変異マウスに導入すると、抗原の攻撃に対しヒト抗体を産生する（例えば、Jakobovits他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551（1993）, 及びJakobovits他, Nature, 362:255-258（1993））。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーからも誘導することができる（例えば、Hoogenboom他, J. Mol. Biol., 227:381（1991）, 及びVaughan他, Nature Biotech 14:309（1996））。

【0167】

本発明は、本願明細書で列举されるような少なくとも1つのアミノ酸置換を（アミノ酸置換のないFc領域を有する母体ポリペプチドと比べて）Fc領域に含むヒト化抗体（及び抗体のフラグメント）を産生する方法を提供する。そのようなヒト化抗体を生成する他の方法について以下に述べる。本発明はまた、これらの方法により生成された抗体及び抗体のフラグメント組成物を提供する。以下に述べるヒト化方法、及び（例えば上述の）他のヒト化方法を本発明の変異Fc領域と組み合わせることができることは重要である。こうして、改変した独自のFc領域を有するヒト化抗体が、本発明にしたがって構築される。

【0168】

ある実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が提

10

20

30

40

50

供され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、アクセプターのVH領域中のFRの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成する方法を含み、該FRの一部は、第2の参照配列と比べて修飾を受けておらず、第2のオリゴヌクレオチドの集団は、i) 修飾された第1のCDRの少なくとも一部をコードし、該第1のCDRは、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3からなる群から選択され、該修飾された第1のCDRは、第1の参照配列中の対応するドナーのCDRと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、ii) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVH領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

10

【0169】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が提供され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、アクセプターのVL領域中のFRの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成する方法を含み、該FRの一部は、第2の参照配列と比べて修飾を受けておらず、第2のオリゴヌクレオチドの集団は、i) 修飾された第1のCDRの少なくとも一部をコードし、該第1のCDRは、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3からなる群から選択され、該修飾された第1のCDRは、第1の参照配列中の対応するドナーのCDRと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、ii) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVL領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

20

30

【0170】

ある実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、

A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) K a b a t及びC h o t h i aの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、B) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、HCDR1(1)、HCDR2、及びHCDR3からなる群から選択される第1のCDRの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのCDRと比べて、修飾された第1のCDRは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、第2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのVH領域中のFRの一部をコードし、該FRの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、ii) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハイブリダイズすることができるCDRの1又は複数の部分をコードし、C) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させること、並びに、D) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集

40

50

団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVH領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

【0171】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が提供され、A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、B) 該方法は、a) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3からなる群から選択される第1のCDRの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのCDRと比べて、修飾された第1のCDRは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのVL領域中のFRの一部をコードし、該FRの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、ii) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハリブリダイズすることができるCDRの1又は複数の部分をコードし、C) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させること、並びに、D) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVL領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

【0172】

ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。ある実施形態において、該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団を、VH領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。ある実施形態において、合成は化学合成を含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、工程(d)の処理は、ポリメラーゼで伸長することを含む。

【0173】

別の実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) 3つのCDRを含み、第2の参照配列はVH領域を含み、b) 該方法は、改変したVH領域抗体の遺伝子配列の集団を合成する方法を含み、該改変したVH領域のFRは、第2の参照配列のFRと同一であり、改変した抗体の可変領域の少なくとも第1のCDRは修飾され、修飾された該第1のCDRは、第1の参照配列の対応するドナーCDRと比べて、1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含む方法である。

【0174】

ある実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) 3つのCDRを含み、第2の参照配列はFRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、改変したVL領域抗体の遺伝子配列の集団を合成する方法を含み、該改変したVL領域のFRは、第2の参照配列のFRと同一であり、改変した抗体のVL領域の少なくとも第1のCDRは修飾され、修飾された該第1のCDRは、第1の参照配列の対応するドナーCDRと比べて、1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含む方法である。

【0175】

ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。ある実施形態において、該方法は、更に改変したVL領域をコードする核酸の集団を、VH領

域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、合成は重複オリゴヌクレオチドを使用することを含む。

【0176】

更に別の実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域を含み、b) 該方法は、改変したVH領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVH領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体の可変領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

10

【0177】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域を含み、b) 該方法は、改変したVL領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVL領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体のVL領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

【0178】

更に別の実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、

20

a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むヒトのアクセプターのVH領域を含み、

b) 該方法は、改変したVH領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVH領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体の可変領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

ある実施形態において、参照配列の表現は、電子的な形態をとる。

【0179】

別の実施形態において、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法が意図され、a) 該方法は、参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、参照配列は、FRを含むヒトのアクセプターのVL領域を含み、b) 該方法は、改変したVL領域の抗体遺伝子配列の集団を合成することを含み、改変したVL領域のFRは、参照配列のFRと同一であり、改変した抗体のVL領域の少なくとも第1のCDRは、ランダムアミノ酸配列を含む方法である。

30

【0180】

ある実施形態において、参照配列の表現は、電子的な形態をとる。ある実施形態において、該方法は、更に改変したVL領域をコードする核酸の集団を、VH領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。ある実施形態において、合成において重複オリゴヌクレオチドを使用することを含む。ある実施形態において、CDRは、Kabatの定義により定義される。

40

【0181】

ある実施形態において、1又は複数のFRは、1又は複数の修飾されたCDRの導入と同時に修飾されている。他の実施形態において、修飾されたフレームワークは修飾されたCDRに隣接する。

【0182】

ある実施形態において、本発明は、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含

50

み、b) 該方法は、a) 修飾されたVH領域中のFR又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該VH領域のFR又はその一部分は、アクセプターのフレームワーク領域の参照配列の位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したCDRをコードし、該改変したCDR又はその一部は、対応するドナーのCDRのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、ii) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。別の実施形態において、該方法は、更に改変したVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。さらなる実施形態において、合成は化学合成を含む。ある実施形態において、アクセプターはヒトである。好ましい実施形態において、1又は複数の改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団は、Fc領域を含む抗体の一部であり、該Fc領域は、Fc領域を有する母体ポリペプチドと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

【0183】

別の実施形態において、本発明は、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたVL領域中のFR又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該VL領域のFR又はその一部分は、アクセプターのフレームワーク領域の参照配列の位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したCDRをコードし、該改変したCDR又はその一部は、対応するドナーのCDRのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、ii) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。他の実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。更なる実施形態において、該方法は、更に改変したVL領域をコードする核酸の集団を、VH領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。

【0184】

ある実施形態において、該方法は、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたVH領域中のフレームワーク領域又

はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該VH領域のFR又はその一部分は、アクセプターのフレームワークの位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したCDRをコードし、該改変したCDR又はその一部は、対応するドナーのCDRのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、ii) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下でDNAポリメラーゼを有する重複オリゴヌクレオチドを伸長することを含む方法である。

【0185】

更に別の実施形態において、本発明は、改変したVL領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、a) 修飾されたVL領域中のFR又はその一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、該VL領域のFR又はその一部分は、アクセプターのFRの参照配列の位置と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークの位置と比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成し、該第2のオリゴヌクレオチドは、i) 少なくとも1つ改変したCDRをコードし、該改変したCDR又はその一部は、対応するドナーのCDRのアミノ酸参照配列と比べて1又は複数の部位において異なるアミノ酸を含み、及び、ii) オリゴヌクレオチドの第1の集団にハイブリダイズすることができる隣接したFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下でDNAポリメラーゼを有する重複オリゴヌクレオチドを伸長することを含む方法である。

【0186】

ある実施形態において、1又は複数のフレームワーク領域は、1又は複数の修飾されたCDRの導入と同時に修飾されている。修飾されたCDRは、参照配列中の対応するCDRと比べ1又は複数のアミノ酸の修飾を含んでいてよい。ある実施形態において、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、i) オリゴヌクレオチドの第1の集団を合成することを含み、少なくとも1つの修飾されたCDRをコードし、該修飾されたCDRは、対応するドナーのCDRのアミノ酸配列と比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、ii) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、VHフレームワークの修飾された部分をコードするオリゴヌクレオチドを含み、修飾を受けた部分は、アクセプターのフレームワーク領域の参照配列と比べて1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークと比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され

、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部がハイブリダイズするような条件下で混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態において、第1及び第2の参照配列の表現は、電子的な形態をとる。更なる実施形態において、該方法は、更に改変したVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e)を更に含む。さらなる実施形態において、アクセプターはヒトである。

【0187】

別の実施形態において、本発明は、改変したVL領域の集団をコードする核酸を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVL領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及び、ii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVL領域の配列を含み、b) 該方法は、i) オリゴヌクレオチドの第1の集団を合成することを含み、少なくとも1つの修飾されたCDRをコードし、該修飾されたCDRは、対応するドナーのCDRのアミノ酸配列と比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、ii) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、VLフレームワークの修飾された部分をコードするオリゴヌクレオチドを含み、修飾を受けた部分は、アクセプターのFRの参照配列と比べ1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更されたフレームワークの位置は、第1の参照配列におけるドナーのフレームワークと比べて、対応する位置で異なっている第2の参照配列におけるアクセプターにおけるフレームワークの位置から選択され、c) 該方法は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの集団を、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部がハイブリダイズするような条件下で混合して、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下で重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。

【0188】

ある実施形態において、Fc変異体及び改変した変異領域を含む抗体又は抗体のフラグメントを生成することができる。例えば、ある実施形態において、本発明は、改変したVH領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) FR及びii) Kabat及びChothiaの定義の組み合わせにより定義される3つのCDRを含み、第2の参照配列は、FRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b) 該方法は、A) アクセプターのVH領域中のFRの一部をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該FRの一部は、第2の参照配列と比べて修飾されず、かつ、B) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、第1又は第2のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、i) 修飾された第1のCDRの少なくとも一部をコードし、該第1のCDRは、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3からなる群から選択され、該修飾された第1のCDRは、第1の参照配列中の対応するドナーのCDRと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、ii) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるFRの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したVH領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVH領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。ある実施形態において、該方法は、更に改変したVH領域をコードする核酸の集団を、VL領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。

【0189】

別の実施形態において、本発明は、改変したV L領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及び、i i) K a b a t 及びC h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、b) 該方法は、a) アクセプターのV L領域中のF Rの一部分をコードする第1のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該F Rの一部は、第2の参照配列と比べて修飾されず、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、第1又は第2のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、i) 修飾された第1のC D Rの少なくとも一部をコードし、該第1のC D Rは、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3からなる群から選択され、該修飾された第1のC D Rは、第1の参照配列中の対応するドナーのC D Rと比べて、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、i i) 修飾を受けていない、第1のオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるF Rの1又は複数の部分をコードし、c) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドの集団と混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、d) 該方法は、改変したV L領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したV L領域をコードする核酸にコードされたF Rは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

10

【0190】

別の実施形態において、本発明は、改変したV H領域の集団をコードする核酸を構築する方法を提供し、A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV H領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及びi i) K a b a t 及びC h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV H領域の配列を含み、B) 該方法は、a) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、H C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3からなる群から選択される第1のC D Rの少なくとも一部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのC D Rと比べて、修飾された第1のC D Rは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、b) 第2のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該2のオリゴヌクレオチドは、i) アクセプターのV H領域中のF Rの一部分をコードし、該F Rの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、i i) 第1のオリゴヌクレオチドの集団にハイブリダイズすることができるC D Rの1又は複数の部分をコードし、C) 該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、D) 該方法は、改変したV H領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したV H領域をコードする核酸にコードされたF Rは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

20

30

【0191】

ある実施形態において、該方法は、更に改変したV H領域をコードする核酸の集団を、V L領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程を更に含む。

40

【0192】

別の実施形態において、本発明は、改変したV L領域をコードする核酸の集団を構築する方法を提供し、A) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) F R及びi i) K a b a t 及びC h o t h i a の定義の組み合わせにより定義される3つのC D Rを含み、第2の参照配列は、F Rを含むアクセプターのV L領域の配列を含み、B) 該方法は、a) 第1のオリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3からなる群から選択される第1のC D Rの少なくとも一

50

部をそれぞれコードし、第1の参照配列の対応するドナーのCDRと比べて、修飾された第1のCDRは、1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、かつ、b)第2のオリゴヌクレオチドを合成することを含み、該2のオリゴヌクレオチドは、i)アクセプターのVL領域中のFRの一部をコードし、該FRの一部は、参照配列と比べて修飾を受けておらず、かつ、ii)第1のオリゴヌクレオチドの集団にハリブリダイズすることができるCDRの1又は複数の部分をコードし、C)該方法は、第1のオリゴヌクレオチドの集団を第2のオリゴヌクレオチドと混合し、重複オリゴヌクレオチドを生成させることを含み、並びに、D)該方法は、改変したVL領域をコードする核酸の集団が構築される条件下において重複オリゴヌクレオチドを処理することを含み、該改変したVL領域をコードする核酸にコードされたFRは、第2の参照配列に対して修飾を受けていない方法である。

10

【0193】

他の実施形態において、本発明は、変異を有するヒト化抗体可変領域の結合親和性を向上させる方法を提供し、a)該方法は、第1の変異を有するヒト化抗体の可変領域をコードする核酸配列を提供することを含み、該変異可変領域は、(i)野生型ヒト抗体フレームワーク、(ii)3つの非ヒト重鎖CDR、及び、(iii)3つ非ヒト軽鎖CDRを含み、CDRは、Kabata及びChothiaの組合せによって定義され、少なくとも1つの該軽鎖CDRは、少なくとも1つの位置で少なくとも1つの異なるアミノ酸を有する変異を有する軽鎖CDRであり、第1の変異を有するヒト化抗体の可変領域は、対応する変異を有さない抗体の可変領域より高い結合能を有し、b)該方法は、第1の変異を有する抗体可変領域コードする核酸配列を、第2の変異を有するヒト化抗体可変領域がコードされるような条件下で変異させることを含み、第2の変異を有するヒト化抗体可変領域は、少なくとも更に1つの異なるアミノ酸を、変異を含むCDRの少なくとも1つの位置に含み、さらなる変異は、最初の変異と共に、高い結合親和性をもたらす方法である。ある実施形態において、第1の変異を有するヒト化抗体の可変領域の変異を有する軽鎖CDRは、CDR3(LCDR3)である。

20

【0194】

他の実施形態において、第1の変異を有するヒト化抗体可変領域における少なくとも1つの非ヒト重鎖CDRは、異なるアミノ酸が、対応する野生型非ヒトCDRと比べ少なくとも1つの位置でコードされているような変異を含む。更なる実施形態において、重鎖CDR変異は、HCDR3において行なわれる。

30

【0195】

ある実施形態において、本発明は、改変したVH領域核酸をコードする核酸の集団を構築すると共に、少なくとも1つのCDRと少なくとも1つのFRを同時に修飾する方法を提供し、

a)該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのVH領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i)4つのFR及びii)Kabata及びChothiaを組み合わせて定義される3つのCDRを含み、第2の参照アミノ酸配列は、Kabata及びChothiaを組み合わせて定義されるように、4つのFRを含むアクセプターのVH領域の配列を含み、b)該方法は、i)修飾される各FRのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾されたFR又はその部分をコードし、該修飾されたFR又はその部分は、アクセプターのVH領域の参照配列において対応するフレームワーク領域に比べて、1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更される該FR位置は、第1の参照配列のドナーのフレームワーク領域の位置と比べて、対応する位置において異なる第2の参照配列のアクセプターのフレームワーク位置の中から選択され、ii)修飾される各CDRのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾したCDR又はその部分をコードし、該修飾したCDRは、対応するドナーのCDRのアミノ酸配列と比べて1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、iii)天然及び修飾を受けていない各FRのために、FRをコードするオリゴヌクレオチ

40

50

ド又はその部分を合成することを含み、F R又はその部分は、第2の参照アクセプター配列の対応するF Rと同一の配列を有し、i v) 天然及び修飾を受けていない各C D Rのために、C D Rをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、C D R又はその部分は、第1の参照ドナー配列の対応するC D Rと同一の配列を有し、V H領域の隣接部分をコードする(i) ~ (i v) から、各オリゴヌクレオチドは、それらの末端において重複配列を有し、c) 該方法は、重複ヌクレオチドを精製するように、各オリゴヌクレオチドの重複配列のハイブリダイズを行なうという条件下において、各工程b) で合成されるオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドの集団を混合させることを含み、d) 該方法は、改変したV H領域の集団をコードするヌクレオチドが形成される条件下で、重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態(embodiment)において、参照配列の表現は、電子的な形態をとる。さらなる実施形態において、修飾を受けるフレームワーク領域は、H F R 1、H F R 2 及びH F R 3 からなる群より選択される。他の実施形態において、修飾されるC D Rは、H C D R 3 である。他の実施形態において、該方法は、更にV H領域をコードする核酸の集団を、V L領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e) を更に含む。異なる実施形態において、該方法は、更にV H領域をコードする核酸の集団を、V L領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e) を更に含む。

【0196】

他の実施形態において、改変したV L領域をコードする核酸の集団を構築すると共に、少なくとも1つのC D Rと少なくとも1つのF Rを同時に修飾する方法を提供し、該方法は、a) 該方法は、第1及び第2の参照アミノ酸配列の表現を提供することを含み、該第1の参照配列はドナーのV L領域の配列を含み、該ドナーの可変領域は、i) 4つのF R 及びi i) K a b a t 及びC h o t h i a を組み合わせて定義される3つのC D Rを含み、第2の参照アミノ酸配列は、K a b a t 及びC h o t h i a を組み合わせて定義されるように、4つのF Rを含むアクセプターのV Lの領域の配列を含み、b) 該方法は、i) 修飾される各F Rのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾されたF R又はその部分をコードし、該修飾されたF R又はその部分は、アクセプターのV L領域の参照配列において対応するフレームワーク領域に比べて、1又は複数の位置において複数の変更されたアミノ酸を含み、変更される該F R位置は、第1の参照配列のドナーのF R位置と比べて、対応する位置において異なる第2の参照配列のアクセプターのF R位置の中から選択され、かつ、i i) 修飾される各C D Rのために、オリゴヌクレオチドの集団を合成することを含み、各オリゴヌクレオチドは、修飾したC D R又はその部分をコードし、該修飾したC D Rは、対応するドナーのC D Rのアミノ酸配列と比べて1又は複数の位置において異なるアミノ酸を含み、i i i) 天然及び修飾を受けていない各F Rのために、F Rをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、F R又はその部分は、第2の参照アクセプター配列の対応するF Rと同一の配列を有し、i v) 天然及び修飾を受けていない各C D Rのために、C D Rをコードするオリゴヌクレオチド又はその部分を合成することを含み、C D R又はその部分は、第1の参照ドナー配列の対応するC D Rと同一の配列を有し、(i) ~ (i v) のV L領域の隣接部分をコードする各オリゴヌクレオチドは、それらの末端において重複配列を有し、c) 該方法は、重複ヌクレオチドを精製するように、各オリゴヌクレオチドの重複配列のハイブリダイズを行なうという条件下において、各工程b) で合成されるオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドの集団を混合させることを含み、d) 該方法は、改変したV L領域の集団をコードするヌクレオチドが形成される条件下で、重複オリゴヌクレオチドを処理することを含む方法である。ある実施形態において、該方法は、更にV L領域をコードする核酸の集団を、V H領域をコードする核酸と共発現させ、改変したヘテロメリックな可変領域の多様な集団を産生する工程(e) を更に含む。

【0197】

(v) 多特异性抗体

本発明は、変異Fc領域を含む多特異性抗体を提供する。多特異性抗体は、少なくとも2種類の異なる抗原に対し結合特異性を有する。そのような分子は通常2種類の抗原にしか結合しないが(二特異性抗原、BsAb)、三特異性抗原等のさらなる特異性を有する抗体も、本願明細書で使用される場合においてこの表現に包含される。BsAbの例としては、一方の腕がガン細胞抗原を対象とし、他方の腕が細胞毒性誘発分子を対象とする、抗FcγRI/抗CD15、抗p185HER2/FcγRIII(CD16)、抗CD3/抗悪性B細胞(1D10)、抗CD3/抗p185HER2、抗CD3/抗p97、抗CD3/抗腎細胞ガン、抗CD3/抗OVCA-R-3、抗CD3/L-DI(L-D1)(抗大腸ガン)、抗CD3/抗メラニン細胞刺激ホルモン(hor none)アナログ、抗EGFレセプター/抗CD3、抗CD3/抗CAMA I(CAMA1)、抗CD3/抗CD19、抗CD3/MoV18、抗神経細胞接着分子(NCAM)/抗CD3、抗葉酸結合タンパク質(FBP)/抗CD3、抗腫瘍関連抗原(AMOC-31)/抗CD3;腫瘍抗原に特異的に結合する1本の腕と毒素に特異的に結合する1本の腕を有する抗サポリン/抗id-1等のBsAbs、抗CD22/抗サポリン、抗CD7/抗サポリン、抗CD38/抗サポリン、抗CEA/抗リシンA鎖、抗インターフェロン-α(IFN-α)/抗ハイブリドーマイデオタイプ、抗CEA/抗ピンカアルカロイド酵素により活性化されたプロドラッグを変換するための抗CD30/抗アルカリホスファターゼ(リン酸マイトマイシンプロドラッグのマイトマイシンアルコールへの変換を触媒する)等のBsAb;線維素溶解剤として使用可能な抗フィブリン/抗組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)等のBsAb、抗フィブリン/抗ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA);細胞表面レセプターに対する免疫複合体を標的にする抗低密度リボタンパク質(LDL)/抗Fcレセプター(例えば、FcγRI、FcγRIII又はFcγRIII)等のBsAb;感染症の治療に用いられる抗CD3/抗単純ヘルペスウィルス(HSV)、抗T細胞レセプター:CD3複合体/抗インフルエンザ、抗FcγR/抗HIV等のBsAb;インビトロ又はインビボでの腫瘍の検出のための抗CEA/抗EOTUBE、抗CEA/抗DPTA、抗p185HER2/抗ハプテン等のBsAb;ワクチンのアジュバントとして用いられるBsAb;及び治療のツールとして用いられる抗ウサギIgG/抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)/抗ホルモン、抗ソマトスタチン/抗物質P、抗HRP/抗FITC、抗CEA/抗p-ガラクトシダーゼ等のBsAbが挙げられるが、これらに限定されない。

【0198】

三特異性抗体の例としては、抗CD3/抗CD4/抗CD37、抗CD3/抗CD5/抗CD37及び抗CD3/抗CD8/抗CD37が挙げられるが、これらに限定されない。二特異性抗体は、全長抗体又は抗体のフラグメント(例えば、F(ab')₂二特異性抗体)として調製することができる。二特異性抗体を作成する方法は公知である。従来法による全長二特異性抗体の製造は、2つの分子鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現によるものである(例えば、Millstein他, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の配列の任意の組み合わせにより、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の可能な異なる抗体分子の混合物を生成し、そのうち1つだけが正しい二特異性構造を有する。正しい分子の精製はアフィニティークロマトグラフィー工程により行うことができる。同様の方法は、国際公開第93/08829号パンフレット及びTrauncker他, EMBO J., 10:3655-3659(1991)。

【0199】

他のアプローチにおいて、所望の結合特異性を有する抗体の可変領域(抗体-抗原結合部位)を、免疫グロブリンの定常領域配列に融合させる。融合体は、好ましくは、ヒンジ、CH2及びCH3領域の少なくとも一部分を含む免疫グロブリンの重鎖定常領域を有する。軽鎖との結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を、融合体の少なくとも1つに有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体、及び、所望に応じて、免疫グロブリンの軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクター中に挿入され、適当な宿

10

B. イムノアドヘシン分子

20

通常、そのような融合体において、コードされたキメラポリペプチドは、少なくとも免疫グロブリンの重鎖定常領域中の機能的に活性なヒンジ、CH2及びCH3領域を保持する。融合は、定常領域中のFc領域のC末端部分、又は重鎖CH1領域のN末端付近若しくは軽鎖の対応する領域において行うこともできる。融合が行われた正確な位置は決定的に重要ではないが、イムノアドヘシンの生物学的活性、分泌、又は結合特性を最適化することができる特定の位置はよく知られており、その位置を選択することができる。

30

40

50

合し、2つのジスルフィド結合を有する免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含む免疫グロブリン様構造を提供する。このような構造の調製に適した方法は、例えば、米国特許第4,816,567号明細書に開示されている。

【0204】

好ましい実施形態において、イムノアドヘシンは、アドヘシンの一部分をインフレイムにコードするcDNA配列を免疫グロブリンcDNA配列に融合させることにより構築される。しかし、ゲノムの免疫グロブリンフラグメントへの融合も用いることができる。一般に、後者のタイプの融合体は、発現のためにIgG制御配列を必要とする。IgG重鎖定常領域をコードするcDNAは、脾臓又は末梢血リンパ球から誘導されたcDNAライブラリーより公開された配列に基づいて、ハイブリダイゼーション又はPCR手法により単離することができる。イムノアドヘシンの「アドヘシン」及び免疫グロブリン部位をコードするcDNAは、選択された宿主細胞において有効な発現を目的とするプラスミドベクターに連続的に挿入することができる。

10

【0205】

異性体ポリペプチドの改変した半減期

新生児Fcレセプター「FcRn」は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の相合体であり、妊娠中に、母子間でIgGを移行させるだけでなく、IgGの血清半減期の制御にも関係する。最近のFcRnの研究においては、Ghetie, V and E. S. Ward, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000を参照。FcRnは、pH依存でIgGに結合し、この結合は、弱酸性のpHにおいて発生し、pH7.4では発生しない。IgGは、FcRnを発現する細胞及びによって回収され、酸性のエンドソームが入ることによってFcRn-IgG相互作用が発生すると仮定される。次に、IgGは、細胞表面に輸送されると、中性に近いpHで放出される。細胞での摂取後、FcRnに結合しないIgGは、リソソームコンパートメントに運ばれ、分解する。この形式によって一致するのは、増大した親和性を有するFcRnに結合する変異Fc領域は、少ない親和性を有するFcRnに結合する変異Fc領域より長い血清半減期を有するという仮説である。

20

【0206】

IgG輸送体としてのFcRnの役割は、FcRnに対して改変した親和性を有する変異Fc領域は、モノクローナル抗体内において、又は外因性のタンパク質、即ち、非抗体に作動可能に付着されるときに、治療上の有用性も有することを示す。被検者又は患者から急激に除去されることによって、又は胎盤膜全体に輸送されないことによって利益をもたらす治療用ポリペプチド、例えば、放射性標識されたポリペプチドは、減少したFcRn結合能を示すFc領域が作動可能に付着されることによって利益をもたらす。また、長い血清半減期を有することによってより投与回数を減らすだけでよく、又は、胎盤膜を通して輸送することによって利益をもたらすポリペプチドは、増大されたFcRn結合能を示すFc領域(表2、5、及び6を参照)に、選択的に作動可能に付着される。Fcの特性の多数の組合せが意図される、例えば、増大されたFcRn結合能を有するFc領域は、CDC又はADCCがほとんど又は全くない場合、増大したFcRn結合能を有するFc領域は、表2に列挙されるFcRn結合能を増大する1又は複数のFcアミノ酸置換をCDC及びACDD活性を減少させるアミノ酸置換との組合せにおいてIgG1の母体Fc領域に組み込むことによって生成される。

30

40

【0207】

母体ポリペプチドと比べて増大したFcRn結合能を示す本発明の変異Fc領域が作動可能に付着されることによって増大した血清半減期から利益を享受する好ましいポリペプチドは、例えば、レニン；成長ホルモン；ヒト成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；グレリン；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポ蛋白質；インシュリンA鎖；インシュリンB鎖； α 1-抗トリプシン；PAI-1；プロインスリン；トロンボポエチン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；VIIIC因子、第IX因子、組織因子、及びフォンウィルブラント因子などの凝血因子

50

；タンパク質Cなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム（n a t u r i e t i c）利尿因子；肺表面活性物質；ウロキナーゼ又は人尿又は組織型プラスミノゲンアクチベーター（t - P A）などのプラスミノゲン（p l a m i n o g e n）アクチベーター活性化因子；ボンベシン；トロピン；造血成長因子；I L - 1 ~ I L - 1 0、I L - 2 0などのインターロイキン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；エンケファリナーゼ；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミューラー管抑制因子；リラキシンA鎖；リラキシン軽鎖；プロリラキシン；マウスの性腺刺激ホルモン関連ペプチド； β -ラクタマーゼなどの微生物タンパク；D n a s e；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞成長因子（V E G F）；ホルモン類又は成長因子のためのレセプター；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；脳由来神経栄養因子（B D N F）、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6（N T - 3、N T - 4、N T - 5、N T - 6）又はN G F - β などの神経成長因子（カーディオトロフィン-1（C T - 1）などのカーディオトロフィン（心筋細胞肥大因子））などの神経栄養因子；血小板由来成長因子（P D G R）；（例えばa F G F、及び、b F G F、上皮成長因子（E G F）又はそのレセプター）などの線維芽細胞成長因子；例えば、T G F - α 、及び、T G F - β 1、T G F - β 2、T G F - β 3、T G F - β 4、又はT G F - β 5を含むT G F - β などのトランスフォーミング成長因子（T G F）；インスリン様成長因子-I及び-II；d e s（1-3）-I G F - I（脳I G F - I）（I G F結合蛋白質）；C D - 3、C D - 4、C D - 8、及びC D - 1 9などのC Dタンパク質；エリスロポイエチン；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形成医薬品（成長分化因子（例えばG D F - 8））；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ のようなインターフェロン；コロニー形成刺激因子（C S F）、例えば、M - C S F；G M - C S F、及び、G - C S F；I g Gの天然のF c領域を有さない抗-HER-2抗体；I g Gの天然のF c領域を有さない抗-ニワトリ肉腫ウイルス抗体；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表層膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス抗原、例えば、H I V - 1エンベロプタンパク質（p r o t i o n）；輸送蛋白質；ホーミングレセプター；アドレシン；収縮調節蛋白；I g Gの天然のF c領域を有さない抗体などの分子を含む哺乳類の治療用ポリペプチド、及び、上記のポリペプチドのいずれのフラグメント又は前駆体である。

【0208】

作動可能に付着されるポリペプチドにおいて改変した血清半減期（即ち、増大したF c R n結合能を）を示す本発明のアミノ酸置換からなる変異F c領域は、好ましくは関連するポリペプチドのカルボキシ末端又はアミノ末端に作動可能に付着され、これにより融合タンパク質を生成する。

【0209】

変異F c領域をコードする核酸配列

本発明はまた、変異F c領域をコードする核酸配列と同様、F c領域変異体をコードする核酸配列を含む組成物、ベクター、及び宿主細胞を提供する。本発明はまた、変異F c領域を生成するための組み換え方法を提供する。

【0210】

一般に、組み換え法による変異体の生成のためには、変異体をコードする核酸配列を単離し、ベクターに挿入する。宿主細胞に、ベクターを用いてトランスフェクトすることができ、それにより核酸配列を増幅させ、かつ／又は変異体ペプチドを製造させることができる。本発明のペプチド変異体をコードする核酸配列を、従来法（例えば、変異体をコードする配列に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブの使用）により単離し、整列することができる。一般に、変異体をコードする核酸配列は、シグナル配列（例えば分泌性シグナル配列）、複製起点、少なくとも1つのマーカー遺伝子、エンハンサー、プロモーター、又は転写ターミネーター等の他の要素に作動可能に結合される。ある実施形態において、宿主細胞は変異体をコードする核酸により安定にトランスフェクトされ、特定の変異体を発現する細胞系を生成する。好ましい実施形態において、変異体は、C H O、N S O、S p 2 / 0、P E R . C 6、又はH E K 2 9 3細胞内で発現される。組み換え方法は、周知の技術である。

【0211】

核酸配列は、変異Fc領域が生成されるように変異をしていてもよい。例えば、母体Fc領域をコードする核酸配列（例えば配列番号1～12）は、核酸配列が発現した場合に少なくとも1つのアミノ酸の改変が生じるように変異をしていてもよい。また、母体Fc領域の少なくとも一部分をコードする核酸配列は、少なくとも変異Fc領域の一部分を含むアミノ酸配列を産生するように変異をしていてもよい。

【0212】

ある実施形態において、コドンを用いた合成を用いて変異を有する配列を生成する。コドンを用いた合成の例としては、例えば、米国特許第5,264,563号明細書、米国特許第5,523,388号明細書及び米国特許第5,808,022号明細書に記載の方法が挙げられる。要約すると、コドンを用いた合成は、別個の担体の上でモノマーを順次カップリングさせ、少なくとも2つの異なる連続配列（tuplet）を生成する。カップリングは、別個の反応容器中で行うことができ、その後反応容器から担体を混合し、混合した担体を2つ以上の別個の反応容器に分別し、カップリング、混合及び分別工程を反応容器中で1又は複数回反復し、混合又は分別工程で修了する。更に、オリゴヌクレオチドを、担体から切り離すことができる。

【0213】

治療への使用及び製剤

ある実施形態において、本発明は変異体を含む治療用の製剤を提供する。本発明は、治療用組成物の特定の性質に限定されるものではない。例えば、そのような組成物は変異ポリペプチド（又はその一部分）を含むことができ、生理学的に許容される液体、ゲル、固体担体、希釈剤、アジュバント及び賦型剤、並びにこれらの組み合わせと共に提供される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. 編（1980）を参照）。

【0214】

更に、変異ポリペプチドは、サリチル酸塩、ステロイド、免疫抑制剤、抗体又は抗生物質を含むがこれらに限定されない他の治療剤と同時、前、又は後に用いることができる。本発明の変異体と共に用いることができる具体的な治療剤としては、アゾベンゼン化合物（米国特許第4,312,806号明細書）、ベンジル置換ローダミン誘導体（米国特許第5,216,002号明細書）、L-カルノシン亜鉛塩（米国特許第5,238,931号明細書）、3-フェニル-5-カルボキシピラゾール及びイソチアゾール（米国特許第5,294,630号明細書）、IL-10（米国特許第5,368,854号明細書）、キノリンロイコトリエン合成阻害剤（米国特許第5,391,555号明細書）、2'-ハロ-2'-デオキシアデノシン（米国特許第5,506,213号明細書）、フェノール及びベンズアミド化合物（米国特許第5,542,439号明細書）、トリブチリン（米国特許第5,569,680号明細書）、ある種のペプチド（米国特許第5,756,449号明細書）、 ω -3ポリ不飽和酸（米国特許第5,792,795号明細書）、VLA-4ブロッカー（米国特許第5,932,214号明細書）、メタスルホ安息香酸プレドニソロン（米国特許第5,834,021号明細書）、サイトカイン抑制剤（米国特許第5,888,969号明細書）、及びニコチン（米国特許第5,889,028号明細書）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0215】

変異ポリペプチドは、細胞の生存率又は増殖能力を減少させる薬剤と共に用いることができる。細胞の生存率又は増殖能力を減少させる薬剤は、例えば、DNA合成の阻害、細胞分裂の阻害、アポトーシスの誘導、又は非アポトーシス誘導性の細胞の殺傷等の種々の経路により機能を果たすものであってもよい。細胞毒性薬及び細胞増殖抑制剤の具体例としては、ヨウシュヤマゴボウ抗菌タンパク質、アブリン、リシン、及びそれらのA鎖、ドキソルビシン、シスプラチン、ヨウ素131、イットリウム90、レニウム188、ビスマス212、タキソール、5-フルオロウラシル、VP-16、ブレオマイシン、メトトレキセート、ビンデシン、アドリアマイシン、ビンクリスチン、BCNU、マイトマイシ

ン、及びシクロホスファミド、及び、TNF- α 、TNF- β 等のある種のサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。このように、細胞毒性薬及び細胞増殖抑制剤は、例えば、放射性元素、化学療法剤、タンパク質、及びレクチンを含んでいてもよい。

【0216】

治療用の組成物は、例えば、バインダー、充填剤、担体、保存料、安定化剤、乳化剤、緩衝剤、及び賦型剤等として、例えば、医薬品グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常用いられる添加物を含んでいてもよい。これらの組成物は、通常、1～95%の有効成分、好ましくは、2～70%の有効成分を含む。

【0217】

本発明の変異ポリペプチドはまた、適用可能で生理学的に許容される希釈剤又は賦型剤と混合することもできる。好適な希釈剤又は賦型剤は、例えば、水、生理的食塩水、デキストロース、グリセロール等、及びこれらの組み合わせである。更に、所望により、組成物は保湿剤又は乳化剤、安定化剤又はpH調整剤等の微量の補助剤を含んでいてもよい。

【0218】

ある実施形態において、本発明の治療用組成物は、液体状の溶液又は懸濁液として、スプレーとして、又は固形剤のいずれかとして調製される。経口製剤は、通常、例えば、バインダー、充填剤、担体、保存料、安定化剤、乳化剤、緩衝剤、及び賦型剤等として、例えば、医薬品グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常用いられる添加物を含む。これらの組成物生物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放剤、又は粉末の形態をとり、通常、1～95%の有効成分、好ましくは、2～70%の有効成分を含む。本発明の治療用の組成物を投与するのに有用な経口用組成物の一例は、米国特許第5,643,602号明細書に記載されている。

【0219】

局所投与等の他の形態での投与に適した他の製剤としては、軟膏、チンキ剤、クリーム、ローション、経皮パッチ、及び座薬が挙げられる。軟膏及びクリームには、従来のバインダー、担体及び賦型剤は、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドを含んでいてもよい。全身投与法の一例は、米国特許第5,834,016号明細書に記載されている。他のリポソームを用いた投与法（例えば、米国特許第5,851,548号明細書及び米国特許第5,711,964号明細書を参照）を用いてもよい。

【0220】

製剤はまた、特定の治療への適応に対する、必要に応じて2種以上の活性化化合物を含んでいてもよく、好ましくは、それらは相補的な活性を有しており互いに悪影響を及ぼさない。そのような分子は、意図した目的に有効な量で好適に共存する。

【0221】

徐放調剤を調製することも可能である。徐放調剤の好適な例としては、変異ポリペプチドを含む固体の疎水性ポリマーからなる半透性マトリックスが挙げられ、マトリックスは、例えばフィルム、マイクロカプセル等の成型体の構造をとる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（メタクリル酸2-ヒドロキシエチル）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド、L-グルタミン酸及びL-グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性のエチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）生分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられるが、これらに限定されない。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール（glycolic）酸等のポリマーは、100日以上にわたり分子の放出を行うことを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短期間しか放出することができない。

【0222】

本発明の変異ポリペプチドは、被検者を治療するために使用される。そのような治療剤

10

20

30

40

50

は、疾患にかかった被験者に投与してもよく、被験者（例えば、疾患にかかりやすい被験者）に予防的に投与してもよい。治療することができる健康状態の例としては、ガン（変異ポリペプチドが、例えば、HER2レセプター、CD20、又は血管内皮成長因子（VEGF）に結合する）、喘息等のアレルギー症状（抗IgE抗体に結合する）、及びLFA-1媒介性の病気（変異ポリペプチドは、例えば、抗LFA-I又は抗ICAM-I抗体である）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0223】

好ましい実施形態において、被験者の治療に用いられるポリペプチド変異体は、抗体又はイムノアドヘンシを含む。また、好ましい実施形態において治療される疾患は、抗体又はイムノアドヘンシに応答する疾患である。抗体に応答する疾患及び病状の例としては、リンパ腫（抗CD20抗体であるRITUXANにより治療可能であることが示されている）、感染症（呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質を対象とする抗体であるSYNAGISにより治療可能であることが示されている）、腎移植（抗IL-2レセプター抗体であるZENAPAXが有効であることが示されている）、クローン病及び関節リウマチ（抗TNF α 抗体であるREMICADEにより治療可能であることが示されている）、乳ガン（抗HER2抗体であるHERCEPTINにより治療可能であることが示されている）、及び大腸ガン（抗17-1A（IA）抗体であるEDRECOLOMABにより治療可能であることが示されている）が挙げられるが、これらに限定されない。ガンを治療するために使用される変異ポリペプチドは、好ましくは、本発明のFc領域アミノ酸置換からなり、該ポリペプチドに増大したADCC活性及び又は増大したCDC活性を付与する。

【0224】

ある実施形態において、改善したADCC活性を有する変異ポリペプチドは、組織又は外来微生物の破壊又は除去が望ましい疾患又は障害の治療に用いられる。例えば、変異体はガン、炎症性疾患、感染（例えば、細菌、ウイルス、真菌又はイーストの感染）、及び組織の除去が望ましい他の健康状態（甲状腺腫等）の治療に用いることができる。他の実施形態において、変異ポリペプチドは、ADCC活性が減退する。そのような変異体は、長い半減期を有するFc領域を含むポリペプチドが望ましいが、ポリペプチドが望ましくないエフェクター機能を有しない方が好ましい場合において疾患又は障害の治療に用いることができる。例えば、Fc領域を含むポリペプチドは、抗組織因子（TF）抗体、抗IgE抗体、及び抗インテグリン抗体（例えば抗 α （ α ）437抗体）であってもよい。そのようなFc領域を含むポリペプチドの望ましい作用機構は、リガンドーレセプター結合対をブロックすることであってもよい。更に、ADCC活性が減退したFc領域を含むポリペプチドは、アゴニスト抗体であってもよい。

【0225】

ガンを治療するために使用される変異ポリペプチドは、好ましくは、本発明のFc領域アミノ酸置換（例えば、本願明細書の表2を参照）からなり、該ポリペプチドに増大したADCC活性及び又は増大したCDC活性を付与する。

【0226】

本発明の変異ポリペプチドは、非経口、皮下、局所、腹膜内、肺内、及び鼻腔内、並びに病巣内投与（例えば、局所免疫抑制治療のため）等の任意の適当な方法により投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、及び皮下投与が含まれる。更に、ポリペプチド変異体は、特に、変異ポリペプチドの用量を減少させる場合にはパルス注入により好適に投与される。好ましくは、投与は注射により行われ、最も好ましくは、部位や投与が短期化長期化に応じて静脈又は皮下注射により行われる。

【0227】

疾患の予防又は治療のためのポリペプチド変異体の適切な用量は、疾患のタイプ、重症度及び経過、変異ポリペプチドの投与が予防目的か治療目的か、これまでの治療、患者の病歴及びポリペプチド変異体に対する応答、並びに担当する医師の判断に依存する。変異ポリペプチドは、患者に対し、1度だけ又は一連の治療期間を通して適切に投与される。

【0228】

例えば、疾患のタイプ及び重篤度にもよるが、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 15 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.120 \text{mg}/\text{kg}$ ）の変異ポリペプチドが、患者に対し、例えば、1回又は複数回に分けて、又は連続注入によって投与される初期試験用量である。通常の1日用量は、上述の条件にもよるが、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上の範囲内である。数日間又はそれ以上にわたる反復投与については、病状にもよるが、治療は症状が充分減少するか消失するまで継続される。この治療の進展は、従来の手法及びアッセイにより簡単にモニターすることができ、治療効果を達成するための用量の調節に利用することができる。

【0229】

変異ポリペプチドのこれらの提案された量は、多くの治療的な裁量による。適切な投与量及び投与計画は、得られた結果となる。この内容において考慮される要因は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、病因、抗体の送達部位、特定の種類の抗体、投与方法、投与計画、及び医師にとって公知の他の要因である。

【0230】

治療上有効な変異ポリペプチドの投与量は、患者が治療を受けている疾患の症状を軽減させるために必要とされる用量レベルである。更に、治療上有効量は、遅延するか又は、疾患の発症、例えば、ガンの進行を遅延させるか、最小化するか、予防するのに十分な量の治療薬の量に言及する。治療上有効量は、治療薬（例えば変異ポリペプチド）の量に言及し、また、被検者の疾患の治療（treatment）又は管理において治療的な利点を提供する治療薬の量に言及する。更に、本発明の治療薬に関する治療上の有効量は、治療薬単独の量、又は他の治療との組合せに言及し、治療又は被検者の疾患の管理において治療的な利点を提供する。変異ポリペプチドは、必ずしも必要ではないが、対象となる病気の治療に近年使用されている1又は複数の薬剤と共に必要に応じて調剤される。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する変異ポリペプチドの量、病気又は治療のタイプ、及び上述の他の因子に依存する。第1の予防薬又は治療薬（例えば本発明又はその機能性フラグメントの変異Fc領域からなる変異ポリペプチド又はポリペプチド）は、障害を持つ被験者に第2の予防薬又は治療薬を投与する前、同時、後に投与することができる。

【0231】

本発明の治療薬は、使用前に貯蔵用に凍結、凍結乾燥され、及び、適切な無菌の担体において再構成される。凍結乾燥及び再構成は、抗体活性損失の変化させる程度に行なうことができる。投薬量は、調製して補正する必要がある。通常、pH 6～8が好ましい。

【0232】

モノクローナル抗体が結合する抗原は、有害である又はどの抗原の減少したレベルから利点を享受する、前記疾患の少なくとも1つ（例えばガン）を治療又は予防するための、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の使用は、本願明細書において意図される。前記疾患の少なくとも1つの治療用医薬の製造において使用される、本発明の変異Fc領域を含むモノクローナル抗体の使用は、本願明細書において意図される。

【0233】

本願明細書で使用される場合、用語「治療」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を得るということに言及する。その効果は、その疾患又は症状を完全に又は部分的に予防する観点から予防的であり、及び／又は、疾患及び／又は疾患に対する有害作用を部分的又は完全な治療の観点から治療的である。本願明細書において使用される場合、「治療」は、哺乳類、特にヒトにおいて疾患又は症状を治療する、本発明の化合物を投与することを含み、かつ、（a）それを有するように、疾患の素因を持つが、まだ罹患したと診断されていない被験者において、その疾患が発症するのを予防することと、（b）疾患を抑制、つまり、発現を抑制することと、（c）疾患又は障害の退行を引き起こすか、又は症状又はその症状の複雑化を緩和することを含む。薬剤投与計画を提供し、最適所望の反応（例えば治療反応又は予防反応）を調整する。例えば、1回の注入によって投与してもよく、数回に分けて時間ごとに投与してもよく、又は、投与量は

10

20

30

40

50

治療的な状況の緊急性によって示されるように比例して増減させてもよい。

【0234】

抗CD20抗体

本発明の変異Fc領域から成っている抗CD20抗体は、本発明の範囲内において意図される（本願明細書における実施例4及び図4を参照）。一実施形態において、抗CD20抗体は、本発明の変異Fc領域又はその一部を含み、本願明細書の表1～10に列挙されるアミノ酸置換を含み、更に、配列番号13、14、15、又は16で表される配列を有するペプチドを含む。一実施形態において、抗CD20抗体は、本発明の変異Fc領域又はその一部を含み、本願明細書の表1～10に列挙されるアミノ酸置換を含み、更に、

- a) 配列番号13及び配列番号14；
- b) 配列番号15及び配列番号16；
- c) 配列番号17、18、19、20、21、及び22；又は
- d) 配列番号23、24、25、26、27、及び28で表される配列を有するペプチドを含む。

10

【0235】

更に好ましくは、抗CD20抗体は、本発明の変異Fc領域又はその一部を含み、

- a) 247I及び339D；
- b) 247I及び339Q、及び、
- c) 378Dからなる群から選択されるアミノ酸置換を含み、及び、
- a) 配列番号13及び配列番号14；
- b) 配列番号15及び配列番号16；
- c) 配列番号17、18、19、20、21、及び22、かつ、
- d) 配列番号23、24、25、26、27、及び28からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。

20

【0236】

変異Fc領域の他の利用

本発明の変異体、及び変異体をコードする核酸配列は、多くの方法で 사용할 ことができる。例えば、本発明の変異体を薬剤のスクリーニングアッセイに使用することができる。例えば、候補化合物を、変異体を候補化合物と接触させ、候補化合物の変異体に対する結合能を決定することにより、Fc領域のエフェクター機能を改変又は阻害する能力を評価することができる。変異体は、GST-変異体融合タンパク質を、グルタチオンを含むポリマービーズの表面に結合させる等の周知の方法により固定化することができる。GST融合タンパク質をコードするキメラDNAは、対象となる変異体をコードするDNAをGSTのカルボキシル末端をコードするDNAに融合させることにより構築される（例えば、Smith他，Gene，67：31（1988））。融合コンストラクトは、その後、GST融合タンパク質の発現がイソプロピルー-f-D-チオガラクトピラノシド（ITPG）により誘導される適当な発現系（例えば大腸菌XA90）に移される。ITPGによる誘導により、融合タンパク質が可溶性の細胞性タンパク質の主成分として得られる。融合タンパク質は、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法により精製することができる。候補化合物の変異体への結合は、該化合物が1又は複数のエフェクター機能を阻害する能力と相関する。

30

40

【0237】

他のスクリーニング方法において、変異体又は選択されたFcRのいずれかが、プラスチック製マイクロタイタープレート上への吸着又はGST融合タンパク質のグルタチオンを含むポリマービーズ上への特異的な結合等の公知の方法により固定化される。例えば、GST-変異体は、グルタチオン-セファロースビーズ上に結合する。固定化した変異体を、その後FcR及び候補化合物と接触させる。結合していないペプチドを除去し、複合体を可溶化して分析し、結合した標識ペプチドの量を決定する。結合量の減少は、候補化合物が変異体とFcRとの相互作用を阻害することを意味する。このスクリーニング方法

50

は、増大した量の本発明の変異体を用いると特に有用である。この方法の変形法は、先に形成した変異体／Fcレセプター複合体を分解することが可能な化合物のスクリーニングを可能にする。例えば、ある実施形態において、FcRに結合した変異体を含む複合体を上述のように固定化し、候補化合物と接触させる。候補化合物による複合体の分解は、化合物がテストする変異体とFcRとの相互作用を破壊又は阻害する能力と相関する。このようにして、（例えば、ヒトに対する）治療能力を有する化合物（例えば、自己免疫疾患等のヒトの疾患を治療するのに有用な化合物）を同定することができる。

【0238】

薬剤をスクリーニングするための他の手法は、変異体ペプチドに対する好適な結合親和性を有する化合物に対する高スループットのスクリーニング方法を提供し、国際公開第84/03564号パンフレットに詳細に記載されている。要約すると、多くの異なる小ペプチド供試化合物を、プラスチックのピン又は他の表面等の固体担体上で合成する。ペプチド供試化合物を変異体ペプチドと反応させ、洗浄する。結合したペプチドを、その後周知の方法により検出する。

【0239】

他の手法では、変異体ペプチドを対象とする抗体を用いる。変異体ペプチドに特異的に結合することができる抗体は、ある変異体との結合について供試化合物と拮抗する。このようにして、変異体ペプチドと1又は複数の抗原性決定基を共有する任意のペプチドの存在を、抗体を用いて検出することができる。

【0240】

本発明は、化合物をスクリーニングする他の多くの方法を意図する。上述の実施例は、単に用いることが可能な手法の範囲を説明するために示される。当業者にとって、多くの他のスクリーニング方法を用いることができることは認識される。

【0241】

特に、本発明は、少なくとも1つの変異Fc領域をコードする核酸がトランスフェクトされた細胞系の化合物の活性をスクリーニングするための使用を意図し、特に、高スループットの化合物の組み合わせライブラリー（例えば、104以上の化合物を含むライブラリー）からのスクリーニングを意図する。本発明の細胞系は、多くのスクリーニング方法において使用することができる。

【0242】

本発明の変異体は、アフィニティー精製剤として使用することができる。例えば、変異体をセファデックス又はろ紙等の固相上に、公知の方法を用いて固定することができる。固定化した変異体を、精製しようとする抗原を含むサンプルと接触させ、その後、サンプル中に含まれる、固定化したポリペプチド変異体に結合した精製しようとする抗原以外のほぼ全ての物質を除去する適当な溶媒で担体を洗浄する。最後に、担体を、pH 5.0のグリシンバッファー等の他の適当な溶媒で洗浄すると、変異ポリペプチドから抗原が切り離される。

【0243】

変異ポリペプチドはまた、診断アッセイ（例えば、細胞、組織、又は血清における、対象となる抗原の発現の検出）にも有用である。診断に応用するためには、変異体は通常検出可能な残基で標識されている（そのような標識は、上述のFc領域のアッセイにおいても有用である）。放射性同位体（例えば、³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I）、蛍光標識（例えば、希土類キレート（ユーロピウムキレート）又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、Lissamine、フィコエリスリン、並びにテキサスレッド）、及び種々の酵素－基質標識（例えば、米国特許第4,275,149号明細書参照）、及びルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、3-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素）、ヘテロ環オキシダー

ゼ（ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ等）を含むがこれらに限定されない多くの標識が利用可能である。酵素－基質の組み合わせとしては、例えば、（i）西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）と基質としての過酸化水素（染料の前駆体（例えば、o－フェニレンジアミン（OPD）又は3, 3', 5, 5'－テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））を酸化する）；（ii）アルカリホスファターゼ（AP）と、発色性基質としてリン酸p－ニトロフェニル；及び（iii）－D－ガラクトシダーゼ（R－D－Gal）と、発色性基質又は蛍光性基質が挙げられる。

【0244】

本発明の変異体は、インビボでの診断アッセイにも使用することができる。例えば、変異ポリペプチドは、抗原又は抗原を発現している細胞の位置を、免疫シンチグラフィーで特定できるように放射性元素で標識される。

【表 1 - 1】

表 1 F c 変異体

位置⁺ アミノ酸置換*

235	G, R	
236	F, R, Y	
237	K, N, R	
238	E, G, H, I, L, V, W, Y	
244	L	
245	R	10
247	A, D, E, F, M, N, Q, R, S, T, W, Y	
248	F, P, Q, W	
249	L, M, N, P, Y	
251	H, I, W	
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y	
255	K, N	
256	H, I, K, L, V, W, Y	
257	A, I, M, N, S	
258	D	
260	S	20
262	L	
264	S	
265	K, S	
267	H, I, K	
268	K	
269	N, Q	
271	T	
272	H, K, L, R	
279	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y	
280	T	30
283	F, G, H, I, K, L, M, P, R, T, W, Y	
286	F	
288	N, P	
292	E, F, G, I, L	
293	S, V	
301	W	
304	E	
307	E, M	
312	P	
315	F, K, L, P, R	40
316	F, K	
317	P, T	
318	N, P, T	
332	F, G, L, M, S, V, W	
339	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, W, Y	
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
343	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
373	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W	

【表 1 - 2】

375	R	
376	E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
377	G, K, P	
378	D, N	
379	N, Q, S, T	
380	D, N, S, T	
382	D, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
385	E, P	10
386	K	
423	N	
424	H, M, V	
426	D, L	
427	N	
429	A, F, M	
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
431	H, K, P	
432	R, S	20
438	G, K, L, T, W	
439	E, H, Q	
440	D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, T, V	
442	K	

+ EU番号付けによるFcアミノ酸位

* 例えば、249位：249L、249M、249N、又は249Y

【表 2 - 1】

表 2 Fc 変異体：エフェクター機能の変化

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
235G						X	
235Q		X		X			
235R		X					
235S		X				X	
236F		X					
236R		X				X	10
236Y		X		X	X		
237E		X				X	
237K		X		X		X	
237N		X				X	
237R		X		X		X	
238A		X				X	
238E		X		X		X	
238G		X		X		X	
238H		X		X		X	
238I		X				X	
238L		X	X			X	20
238V		X				X	
238W		X		X		X	
238Y		X		X		X	
244L			X		X		
245R		X	X			X	
247A	X			X	X		
247D				X	X		
247E				X	X		
247F	X			X			
247G		X		X	X		
247H	X			X		X	
247I	X			X		X	30
247L	X			X		X	
247M	X			X			
247N				X	X		
247Q				X	X		
247R		X		X	X		
247S				X	X		
247T	X					X	
247V	X						
247W				X	X		
247Y	X			X		X	
248A				X			
248F				X	X		40
248P				X	X		
248Q				X	X		
248W				X	X		

【表 2 - 2】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
249E	X			X	X		
249L		X		X	X		
249M				X	X		
249N					X		
249P		X	X		X		
249Y	X			X	X		10
250K		X			X		
250M		X	X			X	
250R		X		X	X		
251F	X			X	X		
251H		X		X	X		
251I		X		X	X		
251W		X		X	X		
252Y		X	X			X	
254A				X	X		
254D				X		X	
254E				X		X	
254F	X			X	X		20
254G				X			
254H				X			
254I				X		X	
254K				X	X		
254L		X		X	X		
254M	X			X	X		
254N				X			
254P		X		X		X	
254Q		X		X		X	
254R				X	X		
254T		X		X		X	30
254V		X		X		X	
254W				X	X		
254Y	X			X	X		
255K				X	X		
255N				X		X	
256A	X		X		X		
256F	X			X			
256G			X		X		
256H				X			
256I				X	X		
256K				X			40
256L					X		
256M	X			X	X		
256P			X		X		
256Q				X	X		
256R				X			
256V		X					

【表 2 - 3】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
256W				X	X		
256Y				X	X		
257A		X	X			X	
257I		X	X			X	
257M		X	X			X	
257N		X	X			X	
257S		X	X			X	10
257V		X	X			X	
258D	X		X				
260S		X	X		X		
262L		X	X			X	
264S		X		X		X	
265H		X				X	
265K		X					
265S		X		X			
265Y		X		X		X	
267G		X		X		X	
267H		X				X	20
267I		X		X		X	
267K		X				X	
268D	X			X	X		
268E	X		X				
268K				X		X	
269N		X				X	
269Q		X				X	
270A		X		X		X	
270G		X				X	
270K		X	X			X	
270M		X		X		X	
270N		X				X	30
271T		X				X	
272H		X	X			X	
272K		X	X				
272L		X	X			X	
272N		X				X	
272R		X	X				
279A	X		X				
279D		X	X				
279F		X					
279G			X				
279H			X				40
279I				X			
279K		X		X			
279L		X		X			
279M			X				
279N			X				

【表 2 - 4】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
279Q			X		X		
279R			X				
279S			X		X		
279T			X				
279W		X	X		X		
279Y			X		X		
280A	X			X			10
280K	X				X		
280T				X	X		
283A	X		X				
283D		X	X				
283F		X	X		X		
283G		X	X		X		
283H		X	X		X		
283I	X		X		X		
283K	X		X		X		
283L		X	X		X		
283M	X				X		
283N			X		X		20
283P			X		X		
283Q			X				
283R	X		X		X		
283S			X		X		
283T			X				
283W		X	X		X		
283Y		X	X				
285N		X	X				
286F			X				
288N	X		X				
288P		X	X				
292A	X					X	30
292E		X		X			
292F		X		X			
292G		X		X			
292I		X		X			
292L				X	X		
293S		X				X	
293V		X	X				
301W		X				X	
304E		X					
307A		X	X		X		
307E		X	X			X	40
307M		X	X		X		
311A	X		X				
311D	X			X			
311E				X		X	

【表 2 - 5】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
311F		X		X	X		
311G				X			
311I		X	X		X		
311K		X	X		X		
311L			X		X		
311M			X		X		
311R				X	X		10
311N	X			X			
311S		X				X	
311T	X				X		
311V	X		X		X		
311W			X		X		
311Y	X			X	X		
312P		X	X		X		
314F		X		X	X		
314I		X			X		
314V		X		X	X		
314W		X		X	X		
314Y					X		20
315F		X		X	X		
315K				X	X		
315L	X				X		
315P		X		X	X		
315R					X		
316F		X		X		X	
316K			X		X		
317P		X	X		X		
317T				X	X		
318N	X		X		X		
318P	X					X	
318T	X		X		X		
318V	X						30
326W		X		X	X		
327T		X		X		X	
328V		X				X	
329Y		X				X	
330K	X					X	
330R						X	
332A					X		
332D	X				X		
332E	X				X		
332F			X		X		
332G					X		
332H		X	X		X		40
332K		X	X			X	
332L		X	X		X		

【表 2 - 6】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
332M			X		X		
332N					X		
332Q					X		
332R		X	X				
332S			X		X		
332T	X				X		
332V	X				X		10
332W		X	X		X		
332Y					X		
339D	X				X		
339E				X		X	
339F	X				X		
339G	X			X	X		
339H					X		
339I	X				X		
339K	X				X		
339L				X			
339M	X					X	
339N	X		X		X		20
339Q	X				X		
339R	X			X	X		
339S	X				X		
339T	X		X		X		
339W			X		X		
339Y					X		
341D		X		X	X		
341E		X		X	X		
341F		X		X	X		
341H		X			X		
341I		X		X	X		30
341K		X		X	X		
341L		X		X	X		
341M		X		X	X		
341N		X		X	X		
341P		X	X		X		
341Q		X		X	X		
341R		X		X	X		
341S		X		X	X		
341T		X		X	X		
341V				X	X		
341W		X		X	X		
341Y		X		X	X		40
343A		X			X		
343D		X			X		
343E		X	X		X		
343F		X					

【表 2 - 7】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
343G		X			X	
343H		X	X		X	
343I						X
343K			X		X	
343L		X			X	
343M		X		X	X	
343N		X			X	
343Q		X	X		X	
343R		X	X		X	
343S		X			X	
343T		X	X		X	
343V		X		X		
343W		X		X	X	
343Y		X	X		X	
373A		X		X		
373D		X		X	X	
373E		X			X	
373F		X			X	
373G		X		X		
373H					X	
373I		X			X	
373K		X		X	X	
373L		X		X	X	
373M		X		X	X	
373N		X		X	X	
373Q		X		X	X	
373R		X			X	
373S		X		X		X
373T		X		X	X	
373V		X		X	X	
373W		X		X	X	
375R		X	X		X	
376A	X		X		X	
376E		X				
376F		X			X	
376G		X	X		X	
376H		X		X	X	
376I			X			
376L				X	X	
376M			X			
376N					X	
376P			X		X	
376Q					X	
376R					X	
376S					X	
376T			X		X	

10

20

30

40

【表 2 - 8】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC	
376V	X		X		X		
376W		X		X			
376Y		X		X			
377G	X						
377K	X		X				
377P					X		
378D			X			X	10
378N			X				
379N	X				X		
379Q		X			X		
379S					X		
379T					X		
380A			X		X		
380D						X	
380N	X		X		X		
380S	X		X		X		
380T			X		X		
382A	X						
382D		X				X	20
382F	X		X			X	
382H			X				
382I	X		X		X		
382K			X				
382L			X		X		
382M			X				
382N			X			X	
382P						X	
382Q			X		X		
382R			X			X	
382S		X	X			X	
382T			X				30
382V			X		X		
382W			X			X	
382Y			X			X	
385E	X					X	
385P						X	
386K					X		
423N			X			X	
424H						X	
424M		X		X		X	
424V				X			
426D				X	X		
426L					X		40
427N	X		X			X	
429A		X		X	X		
429F		X		X	X		

【表 2 - 9】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
429M	X			X	X	
430A			X		X	
430D				X	X	
430F			X		X	
430G			X		X	
430H		X	X		X	
430I			X		X	
430K		X	X		X	
430L			X		X	
430M			X		X	
430N		X	X		X	
430P					X	
430Q		X	X			
430R		X	X		X	
430S			X		X	
430T			X		X	
430V			X		X	
430W		X		X	X	
430Y			X		X	
431H			X		X	
431K			X			
431P				X	X	
432R		X		X	X	
432S		X		X	X	
434G			X			X
434H			X			X
434I		X		X		X
434W	X		X		X	
434Y			X		X	
436I	X		X			X
436L			X			
436T			X			X
438G						X
438K			X			
438L			X		X	
438T			X			X
438W			X		X	
439E						X
439H						X
439Q				X		X
440A				X		X
440D		X		X		
440E				X		
440F				X		X
440G	X					X
440H	X		X			

【表 2 - 1 0】

変異体*	増大した ADCC	減少した ADCC	増大した FcRn結合性	減少した FcRn結合性	増大した CDC	減少した CDC
440I	X					X
440K			X			X
440L	X		X			X
440M				X		X
440N						
440Q					X	
440R						
440T		X				
440V		X				
440W						
440Y					X	
442K		X	X			

* 抗CD20抗体、IgG1のFc領域において試験される変異体

【表 3】

表 3 増大したADCC

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
247	A, F, H, I, L, M, T, V, Y	
249	E, Y	
251	F	
254	F, M, Y	
256	A, M	
258	D	10
268	D, E	
279	A	
280	A, K	
283	A, I, K, M, R	
288	N	
292	A	
311	A, D, N, T, V, Y	
315	L	
318	N, P, T, V	
330	K	20
332	T, V	
339	D, F, G, I, K, M, N, Q, R, S, T	
376	A, V	
377	G, K	
379	N	
380	N, S	
382	A, I	
385	E	
427	N	
429	M	30
434	W	
436	I	
440	G, H, I, L	

⁺ EU番号付けによるFcアミノ酸位

^{*} 例えば、249位：249L、249M、249N、又は249Y

【表 4 - 1】

表 4 減少したADCC

位置⁺ アミノ酸置換^{*}

235	Q, R, S	
236	F, R, Y	
237	E, K, N, R	
238	E, G, H, I, L, V, W, Y	
247	G, R	
249	L, P	10
250	K, M, R	
251	H, I, W	
252	Y	
254	L, P, Q, T, V	
256	V	
257	A, I, M, N, S, V	
260	S	
262	L	
264	S	
265	H, K, S	20
267	G, H, I, K	
269	N, Q	
270	A, G, K, M, N	
271	T	
272	H, K, L, N, R	
279	D, F, K, L, W	
283	D, F, G, H, L, T, W, Y	
285	N	
288	P	
292	E, F, G, I	30
293	S, V	
301	W	
304	E	
307	A, E, M	
311	F, I, K, S	
312	P	
314	F, I, V, W	
315	F, P	
316	F	
317	P	
327	T	40
328	V	
329	Y	
332	G, K, L, R, W	
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y	
343	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
373	A, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W	
375	R	

【表 4 - 2】

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]
376	A, E, F, G, H, W, Y
379	Q
382	D, S
429	A, F
430	H, K, N, Q, R, W
432	R, S
434	I
440	D, T, V
442	K

10

⁺ EU番号付けによるFcアミノ酸位

【表 5】

表 5 増大した F c R n 結合能
位置⁺ アミノ酸置換*

238	L	
244	L	
245	R	
249	P	
252	Y	
256	P	10
257	A, I, M, N, S, V	
258	D	
260	S	
262	L	
270	K	
272	L, R	
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y	
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y	
285	N	
286	F	20
288	N, P	
293	V	
307	A, E, M	
311	A, I, K, L, M, V, W	
312	P	
316	K	
317	P	
318	N, T	
332	F, H, K, L, M, R, S, W	
339	N, T, W	30
341	P	
343	E, H, K, Q, R, T, Y	
375	R	
376	G, I, M, P, T, V	
377	K	
378	D, N	
380	N, S, T	
382	F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
423	N	
427	N	40
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y	
431	H, K	
434	F, G, H, W, Y	
436	I, L, T	
438	K, L, T, W	
440	K	
442	K	

* EU番号付けによる F c アミノ酸位

【表 6】

表 6 減少した F c R n 結合能

位置 ⁺	アミノ酸置換*	
235	Q	
236	Y	
237	K, R	
238	E, G, H, W	
247	A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, W, Y	10
248	A, F, P, Q, W	
249	E, L, M, Y	
251	F, H, I, W	
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y	
255	K, N	
256	F, H, I, K, M, R, W, Y	
264	S	
265	S, Y	
267	G, I	
268	D, K	20
270	A, M	
279	I, K, L	
280	T	
292	E, F, G, I, L	
311	D, E, F, G, N, R, Y	
315	F, K, P	
316	F	
317	T	
326	W	
327	T	30
339	E, G, L, R	
341	D, E, F, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	
343	M, V, W	
373	A, D, G, K, L, M, N, Q, S, T, V, W	
376	H, L, W, Y	
424	M, V	
426	D	
429	A, F, M	
430	D, W	
431	P	40
432	R, S	
434	I	
439	Q	
440	A, D, E, F, M	

⁺ EU番号付けによる F c アミノ酸位

【表 7 - 1】

表 7 増大した CDC

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
236	Y	
244	L	
247	A, D, E, G, N, Q, R, S, W	
248	F, P, Q, W	
249	E, L, M, N, P, Y	
250	K, R	10
251	F, H, I, W	
254	A, F, K, L, M, R, Y	
255	K	
256	A, G, I, L, M, P, Q, W, Y	
260	S	
268	D	
279	Q, S, W, Y	
280	K, T	
283	F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, W	
292	L	20
307	A, M	
311	F, I, K, L, M, T, V, W, Y	
312	P	
314	F, I, V, W, Y	
315	F, K, L, P, R	
316	K	
317	P, T	
318	N, T	
332	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y	
339	D, F, G, H, I, K, N, Q, R, S, T, W, Y	30
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y	
343	A, D, E, G, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y	
373	D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W	
375	R	
376	A, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, T, V	
377	P	
379	N, Q, S, T	
380	A, N, S, T	
382	I, L, Q, V	
386	K	40

【表 7 - 2】

426	D, L
429	A, F, M
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
431	H, P
432	R, S
434	W, Y
438	L, W
440	Q, Y

⁺ EU番号付けによるFcアミノ酸位

【表 8】

表 8 減少した C D C

位置 ⁺	アミノ酸置換 [*]	
235	G, S	
236	R	
237	E, K, N, R	
238	A, E, G, H, I, L, V, W, Y	
245	R	
247	H, I, L, T, Y	10
250	M	
252	Y	
254	D, E, I, P, Q, T, V	
255	N	
257	A, I, M, N, S, V	
262	L	
264	S	
265	H, Y	
267	G, H, I, K	
268	K	20
269	N, Q	
270	G, M, N	
271	T	
272	H, L, N	
292	A	
293	S	
301	W	
307	E	
311	E, S	
316	F	30
318	P	
327	T	
328	V	
329	Y	
330	K, R	
332	E, M	
343	I	
373	S	
378	D	
380	D	40
382	D, F, N, P, R, S, W, Y	
385	E, P	
423	N	
424	H, M	
427	N	

⁺ EU番号付けによる F c アミノ酸位

【実施例】

【0245】

以下の実施例は、本発明の一つの好ましい実施形態及び側面を示し、より詳しく説明するためのものであり、これらの範囲を限定するものではない。

【0246】

A D C Cアッセイにおける変異F c領域のスクリーニング

本実施例では、A D C Cアッセイにおいて、どのように抗体（例えば抗C D 2 0）に関連する変異F c領域をスクリーニングするかについて述べる。

【0247】

i. 抹消血単核細胞（P B M C）の単離

約50mLの抹消血を健康なドナーから採取し、pH7.0リン酸緩衝生理食塩水（P B S）で1：2に希釈する。チューブを穏やかに回転させることにより溶液を混合する。約12mLのH i s t o p a q u e - 1 0 7 7（S i g m a社カタログ番号1077-1）を希釈血液サンプルの下に注意深く加えて層状にした後、S o r v o l l社製R T 6 0 0 0 B遠心器中で、バケットローターを、ブレーキをオフにして1000rpmで10分間回転させ遠心分離する。グラジエントの上相を吸引して廃棄し、白色のP B M Cを含む界面相を回収し、H a n k s ' B a l a n c e d S a l t S o l u t i o n（G i b c o社カタログ番号14025-092）で3回洗浄する。洗浄した細胞ペレットを約20mLの、10%ウシ胎児血清（F B S）（O m e g a S c i e n t i f i c社カタログ番号F B - 0 1）を含むR P M I 1 6 4 0培地に懸濁させる。再懸濁させたP B M Cを2つのT - 1 7 5培養フラスコに分注し、30mLの、10%F B Sを含むR P M Iをそれぞれに加え、37℃において5%CO₂インキュベーター中で終夜インキュベートする。翌日、非接着性のP B M Cを50mLファルコンチューブ中に回収後、上記と同様に遠心分離し、1%F B Sを含むフェノールレッド欠損R P M I中に再懸濁させる。少量の再懸濁細胞を10倍に希釈し、血球計でカウントする。残りのP B M Cは、必要となるまでインキュベーターに保存する。

【0248】

i i. 標的細胞系（抗C D 2 0 A D C Cアッセイに特有）

C D 2 0を発現した、W i l . 2及びS K W 6 . 4 B細胞系は、A T C Cより入手し、推奨される条件で培養した。使用する1日前に細胞を2等分する。翌日、細胞数を4×10⁵個/mLに調節し、50μLずつ96ウェル組織培養プレートに加える。

【0249】

i i i. I g G希釈液

スクリーニングの前に、本発明のF c変異体を含むI g Gを発現させ、生成し、標準的なE L I S Aを用いて定量する。一点法によるA D C C一次スクリーニングのために、I g G変異体を、1%P B Sを含むフェノールレッド欠損R P M I培地中で40mg/mLに希釈する。アッセイに用いられるI g Gの最終濃度を4倍に希釈する（最終濃度10ng/mL）。50μLのI g G希釈液を標的細胞に加え、15分間37℃でインキュベートした後、オプソニン化された標的細胞にエフェクター細胞を加える。

【0250】

I g Gの滴定を行うと、I g G濃度は、約0.001~1μg/mLの範囲で変化する。I g G希釈液を、96ウェルマイクロタイタープレート中で、1%P B Sを含むフェノールレッド欠損R P M I中のサンプルを希釈することにより調製する。希釈したI g Gサンプルを、標的細胞を含むアッセイプレートに加える。

【0251】

i v. エフェクター細胞

P B M Cの濃度を、エフェクター細胞：標的細胞比が、10~20：1（2~4×10⁶個/mL）の範囲内となるよう調節する。100μLの再懸濁したP B M Cをそれぞれのウェルのオプソニン化された標的細胞に加える。プレートを、5%CO₂の存在下37℃で3~4時間インキュベートする。

【0252】

v. 乳酸脱水素酵素（L D H）の放出の検出

標的細胞の溶解を、損傷を受けた細胞の細胞質から上澄みへのLDH酵素の放出を検出することにより測定する。オプソニン化した標的細胞をエフェクター細胞とインキュベートした後、アッセイプレートを2000rpmで5分間遠心する。ペレット化した細胞及び破砕物を避けつつ、約75μLの細胞培養液の上澄みを注意深く取り去る。この上澄みを直接マイクロタイタープレートに加え、これに75μLのLDH検出試薬(Roche社カタログ番号1644793)を加える。その後、プレートを約15～30分間インキュベートし、490nmにおける吸光度を、Molecular Devices Vmax Kinetic Microplate Readerにより読み取る。

【0253】

vi. データの解析

ADCCスクリーニングアッセイは、全て2回行った。それぞれのアッセイプレートは、自然溶解、IgG非存在下でのエフェクター細胞及び標的細胞の溶解、及び標的細胞の完全溶解のコントロール群を含む。標的細胞の完全溶解は、1% Triton-X100を標的細胞に加えることにより達成される。野生型コントロール群をそれぞれのアッセイプレートに含めておき、得られるADCCシグナルを平均する。自然分解コントロール群から得られるバックグラウンド値を、それぞれのサンプルから差し引く。希釈IgG液から得られるバックグラウンド値をそれぞれのサンプルから差し引く。データを、吸光度から、自然溶解及び完全溶解に対する特異的溶解の割合に変換する。特異的溶解の割合は、次の式により計算される。

(%特異的溶解) = (測定値A490 - バックグラウンドA490) / (最大A490 - バックグラウンドA490) × 100

ここで、バックグラウンドA490は、IgG非存在下でのエフェクター及び標的細胞、及び粗製IgG上澄み中に存在するLDH混入物によるIgGバックグラウンドの和(supernatant)である。Fc変異体の活性の割合は、野生型コントロールの平均値に対して規格化される。2度のアッセイについての規格化された活性の割合は平均され、個々のサンプルについてそれぞれのアッセイプレート間の標準偏差を計算する。

【0254】

vii. 結果

相対ADCC特異性活性を表9(一置換)及び表10(組合せ置換)に示す。この表に示したCDCの値は、本願明細書の実施例9の記載に従い得られたものであり、表9に示したFcRn結合アッセイの値は、本願明細書の実施例3の記載に従い得られたものである。更に、結果は、上記の表1及び2に示される。一置換単独より高いADCCを得た組合せ置換は、247F, 339D; 247I, 339D; 247L, 339D; 247L, 339T; 及び247I, 339Qである。単独でテストした場合に野生型ADCCより高いADCCを有するにも関わらず、野生型ADCCの80%以下のADCCであった組合せ置換は、247A, 339D; 247Y, 339H; 247I, 339I; 247T, 339I; 247L, 339N; 247A, 339Q; 及び247A, 339Rである。単独でテストした場合に野生型ADCCより高いADCCを有するにも関わらず、野生型ADCCの10%以下のADCCであった組合せ置換は、247I, 339I; 247T, 339I; 及び247L, 339Nである。

【表 9 - 1】

表 9

位置及び WT* 変異体*		ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	WT (a,z)	100		100		100		
L	235A	87	23.2	102	11.9	67	7.9	2
L	235E	80	17.4	87	16.2	48	35.8	2
L	235G	93	30.3	85	21.2	58	46.0	2
L	235Q	86	1.8	81	14.4	98	25.1	2
L	235R	45	10.5	93	34.1	110	13.8	2
L	235S	92	2.0	85	40.0	0	262.9	2
G	236F	0	942.1	88	7.9	0	283.3	2
G	236R	0	228.7	101	20.6	14	110.1	4
G	236Y	8	72.7	76	10.0	168	0.3	2
G	237E	0	89.2	93	35.0	36	28.8	4

10

【表 9 - 2】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn	pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
G	237K	0	113.3		78	12.8	12	136.0	4
G	237N	0	107.5		91	16.3	22	31.5	4
G	237R	0	81.3		56	60.6	28	10.5	4
P	238A	0	205.8		90	9.6	29	49.5	4
P	238E	0	20.6		76	6.7	24	101.0	4
P	238G	0	92.8		66	6.9	23	120.5	4
P	238H	0	48.9		72	11.4	11	206.3	4
P	238I	0	180.4		94	6.4	18	54.1	4
P	238L	0	37.4		115	13.6	34	50.1	4
P	238V	46	11.8		102	8.3	67	19.2	4
P	238W	0	66.6		87	5.4	23	103.4	4
P	238Y	0	34.0		74	15.8	16	288.8	4
P	244L	77	23.4		124	9.6	134	6.0	2
P	245R	62	15.0		188	7.2	42	5.3	2
P	247A	122	16.2		97	0.3	116	0.9	2
P	247D	95	23.4		54	2.8	131	1.1	2
P	247E	95	10.3		52	8.7	118	0.0	2
P	247F	144	18.8		6	1258.9	71	34.1	6
P	247G	82	16.1		75	4.2	137	0.9	2
P	247H	145	11.2		35	252.4	79	7.5	6
P	247I	140	22.9		79	30.7	22	198.3	6
P	247L	144	10.1		57	33.7	0	722.7	16
P	247M	127	21.0		18	1599.0	114	7.2	6
P	247N	91	37.2		41	38.7	109	4.0	2
P	247Q	103	8.5		26	294.3	137	3.7	4
P	247R	58	15.5		72	1.2	127	4.9	2
P	247S	106	38.6		81	15.0	130	2.6	2
P	247T	129	11.2		75	27.5	37	34.8	10
P	247V	120	13.5		Na	na	na	na	2
P	247W	102	6.5		0	1314.2	122	0.5	2
P	247Y	143	8.4		7	na	88	7.1	6
K	248A	100	5.4		15	179.9	102	2.4	2
K	248F	107	18.0		0	559.4	202	4.0	2
K	248P	103	9.1		34	99.4	226	1.3	2
K	248Q	101	0.5		38	89.3	174	17.9	2
K	248W	102	9.4		30	54.5	166	8.3	2
D	249E	110	6.7		78	22.4	258	16.1	4
D	249L	73	1.4		15	179.9	214	3.2	2
D	249M	101	9.6		50	4.5	163	1.2	2
D	249N	94	15.9		112	14.0	255	10.9	4
D	249P	56	4.0		138	21.0	119	0.2	2
D	249Y	110	8.8		41	28.3	170	6.6	2
T	250K	38	27.1		96	30.1	199	13.5	6
T	250M	78	11.0		165	7.4	47	6.6	4
T	250R	84	0.7		62	34.0	288	13.9	4
L	251F	125	6.0		64	47.6	160	16.6	10

10

20

30

40

【表 9 - 3】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=	
L	251H	59	11.6	46	5.6	167	22.7	2	
L	251I	84	9.8	7	333.3	190	18.8	2	
L	251W	95	2.9	0	na	161	17.3	2	
M	252Y	61	5.8	964	27.9	62	46.1	4	
I	253A	103	6.1	0	12.0	81	23.9	4	
S	254A	99	20.1	7	733.0	139	11.2	4	
S	254D	101	14.2	7	113.9	74	31.2	2	10
S	254E	102	3.8	6	107.9	72	35.2	2	
S	254F	121	11.2	0	1087.4	206	14.4	6	
S	254G	100	14.7	7	86.8	102	6.1	2	
S	254H	108	20.0	0	74.3	85	22.0	4	
S	254I	99	2.5	25	64.3	80	11.5	4	
S	254K	109	14.8	9	77.2	137	6.1	2	
S	254L	89	9.8	74	12.6	227	12.1	6	
S	254M	89	11.9	0	212.1	248	13.4	6	
S	254N	90	13.3	8	5.6	76	34.6	2	
S	254P	78	17.7	3	141.4	75	25.2	2	20
S	254Q	84	12.6	9	121.2	74	25.2	2	
S	254R	99	1.3	14	128.2	152	4.8	2	
S	254T	54	51.9	32	34.7	75	12.1	2	
S	254V	68	40.5	31	40.5	84	4.4	2	
S	254W	98	6.0	0	116.1	188	7.7	6	
S	254Y	117	9.4	0	129.1	211	15.7	6	
R	255K	96	3.5	41	65.9	276	9.3	4	
R	255N	84	17.7	27	162.7	81	18.1	2	
T	256A	115	16.5	160	3.0	190	19.6	2	
T	256D	97	5.3	544	10.6	86	23.2	6	
T	256E	91	12.9	339	8.4	104	7.2	6	30
T	256F	119	3.3	5	435.0	128	26.6	2	
T	256G	95	20.0	162	8.0	221	24.5	2	
T	256H	103	6.3	26	6.1	91	11.9	2	
T	256I	93	11.5	72	3.7	157	16.2	4	
T	256K	100	6.7	31	20.6	92	20.2	2	
T	256L	93	3.9	78	60.5	267	22.7	4	
T	256M	122	17.4	35	78.9	200	14.8	10	
T	256N	102	7.2	229	6.4	86	23.2	2	
T	256P	109	11.8	190	6.1	260	11.8	8	
T	256Q	100	17.2	64	14.2	152	11.3	4	
T	256R	94	8.8	33	60.0	71	47.1	2	40
T	256S	103	5.3	169	3.1	101	15.9	2	
T	256V	82	11.1	114	30.5	109	11.0	2	
T	256W	96	8.5	14	84.5	170	14.4	4	
T	256Y	97	7.2	68	18.6	127	18.0	2	
P	257A	86	11.5	319	15.0	34	53.7	4	
P	257I	54	16.4	1022	14.5	46	22.4	6	
P	257M	26	11.0	835	19.1	48	48.4	4	

【表 9 - 4】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=	
P	257N	27	13.1	867	15.7	62	31.4	4	
P	257S	28	28.8	184	6.8	46	30.1	4	
P	257V	18	97.9	447	41.5	27	143.5	2	
E	258D	115	7.0	361	20.5	110	9.6	4	
T	260S	93	5.6	124	7.4	171	17.1	2	
V	262L	61	2.9	525	15.1	30	48.0	2	
V	264S	10	39.8	78	20.0	50	36.7	2	10
D	265H	8	118.9	79	36.1	81	0.5	2	
D	265K	10	146.2	107	34.3	84	46.4	2	
D	265S	9	106.3	66	28.9	103	13.3	2	
D	265Y	3	7.6	33	88.8	62	21.5	2	
S	267G	29	8.6	86	0.9	60	18.1	4	
S	267H	0	48.4	86	16.8	47	41.1	4	
S	267I	0	78.0	83	11.8	50	37.8	4	
S	267K	0	73.3	102	14.2	26	47.1	4	
H	268D	110	7.8	68	32.4	122	10.7	6	
H	268E	110	8.3	126	17.8	100	8.4	8	
H	268K	98	17.6	86	10.4	24	112.7	4	20
E	269N	23	74.0	92	17.0	30	69.4	4	
E	269Q	47	3.6	98	3.5	22	82.8	4	
D	270A	41	35.5	87	6.0	36	66.5	4	
D	270G	0	102.2	108	16.5	37	21.8	4	
D	270K	15	465.5	122	8.4	0	462.9	4	
D	270M	49	19.2	81	5.2	25	606.9	4	
D	270N	28	1185.2	94	8.2	34	103.7	4	
P	271T	26	53.9	96	20.4	32	89.1	4	
E	272H	73	13.6	157	23.0	53	34.8	2	
E	272K	70	8.9	320	20.4	118	28.7	4	
E	272L	78	21.1	129	3.9	71	3.1	2	30
E	272N	90	7.5	110	33.0	71	34.6	2	
E	272R	50	2.1	351	3.3	102	1.2	2	
V	279A	114	14.6	214	5.0	106	21.2	2	
V	279D	87	12.1	367	0.3	98	8.5	2	
V	279F	81	4.8	113	14.3	106	10.0	2	
V	279G	98	2.4	256	11.6	109	18.0	2	
V	279H	79	28.1	173	29.6	127	22.7	6	
V	279I	101	1.6	83	1.3	100	21.0	2	
V	279K	91	1.5	79	26.1	106	0.7	2	
V	279L	96	3.0	78	13.9	100	5.7	2	40
V	279M	107	8.3	122	3.5	91	10.3	2	
V	279N	102	32.0	204	19.5	85	50.2	6	
V	279Q	85	28.3	181	8.0	139	8.1	6	
V	279R	105	4.8	130	10.7	98	8.7	2	
V	279S	94	29.8	242	18.3	122	16.7	6	
V	279T	95	15.5	265	6.9	110	12.8	10	
V	279W	68	24.8	162	22.8	125	10.5	6	

【表 9 - 5】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
V	279Y	82	26.8	139	8.6	144	13.2	6
D	280A	111	44.9	55	50.1	135	28.7	2
D	280K	137	47.6	120	27.2	192	33.5	2
D	280T	108	na	60	12.6	122	8.7	4
E	283A	107	2.1	126	0.2	96	17.9	2
E	283D	84	8.4	110	4.0	92	10.3	2
E	283F	74	0.1	168	38.6	127	20.4	2
E	283G	93	3.1	137	4.4	135	8.5	2
E	283H	87	6.1	206	6.5	123	15.9	2
E	283I	106	1.9	143	5.6	126	12.3	2
E	283K	109	5.8	246	5.1	133	8.0	2
E	283L	92	3.1	126	1.3	120	0.1	2
E	283M	112	7.4	95	13.8	120	2.4	2
E	283N	102	3.8	119	7.4	135	23.4	6
E	283P	97	11.9	136	3.9	118	11.8	4
E	283Q	95	5.3	117	8.0	122	22.9	2
E	283R	102	0.3	282	8.1	144	16.7	2
E	283S	91	1.5	143	11.1	119	12.3	2
E	283T	103	3.2	143	12.4	108	11.0	2
E	283W	90	2.8	117	2.1	159	1.3	2
E	283Y	81	6.7	142	4.1	136	17.2	2
H	285N	93	2.6	202	19.8	113	21.1	4
N	286F	107	7.1	307	32.3	108	16.1	4
K	288N	110	8.7	162	13.2	118	19.1	4
K	288P	45	1.1	119	3.0	116	15.7	2
R	292A	114	2.9	85	67.5	74	21.1	4
R	292E	35	21.4	65	48.5	92	32.1	2
R	292F	73	16.4	64	7.6	101	8.3	2
R	292G	94	2.5	60	35.9	119	32.8	2
R	292I	79	1.5	56	23.6	106	3.7	2
R	292L	96	3.9	68	40.0	123	7.2	2
E	293S	68	7.4	101	23.0	98	0.1	2
E	293V	73	12.5	127	18.0	107	24.0	2
R	301W	5	105.4	119	18.1	49	31.1	4
S	304E	24	32.9	101	8.7	122	11.3	2
T	307A	87	4.4	233	14.5	115	6.5	4
T	307E	88	7.9	492	34.6	81	2.4	4
T	307M	82	5.3	302	23.7	150	6.5	4
Q	311A	106	2.4	139	7.0	89	28.3	2
Q	311D	111	6.0	38	22.2	83	13.6	2
Q	311E	102	1.7	46	17.7	78	0.7	2
Q	311F	89	6.9	64	7.5	212	20.7	2
Q	311G	98	1.9	58	21.5	92	9.6	2
Q	311I	87	8.2	437	9.6	236	11.3	8
Q	311K	80	13.4	165	5.5	170	9.3	6
Q	311L	107	6.7	186	9.2	191	8.1	4

10

20

30

40

【表 9 - 6】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=	
Q	311M	97	7.2	387	15.0	252	16.3	6	
Q	311N	115	1.9	54	10.5	126	23.3	2	
Q	311P	99	8.0	89	300.5	172	67.9	4	
Q	311R	96	8.5	14	84.5	170	14.4	2	
Q	311S	86	8.8	97	10.5	0	92.8	2	
Q	311T	111	10.2	131	14.0	168	23.4	2	
Q	311V	108	1.7	558	19.5	240	23.3	4	10
Q	311W	104	8.2	215	2.8	251	18.7	4	
Q	311Y	107	3.0	94	0.3	211	25.0	2	
D	312P	97	1.4	546	16.1	148	11.6	2	
L	314F	70	7.8	42	41.2	108	5.5	2	
L	314I	83	13.0	86	22.7	184	14.2	4	
L	314V	65	14.0	21	128.8	179	10.9	4	
L	314W	79	11.0	5	80.2	190	2.0	4	
L	314Y	87	13.6	64	81.4	238	3.2	4	
N	315F	83	12.8	51	38.3	140	15.3	2	
N	315K	108	3.5	88	10.2	148	8.2	2	20
N	315L	112	6.2	103	10.5	145	5.5	2	
N	315P	62	10.2	14	289.1	231	9.1	4	
N	315R	96	24.4	71	38.3	135	0.4	2	
G	316F	54	26.0	34	72.4	81	10.0	2	
G	316K	77	28.8	131	8.9	143	8.6	2	
K	317P	54	21.5	145	1.6	190	4.7	4	
K	317T	99	10.9	49	4.8	118	4.0	2	
E	318N	123	7.2	216	7.5	120	7.0	4	
E	318P	120	10.8	75	27.1	79	17.0	4	
E	318T	109	5.7	304	56.8	118	10.5	4	
E	318V	116	3.4	114	21.2	95	11.5	4	30
K	326W	74	17.9	93	5.7	214	9.7	2	
A	327T	4	13.4	54	19.5	7	206.2	2	
L	328V	76	3.2	101	6.3	56	13.9	4	
P	329Y	53	41.5	107	13.2	25	90.3	4	
A	330K	134	9.3	108	51.4	43	23.9	6	
A	330R	103	5.5	121	39.4	31	36.6	6	
I	332A	100	6.1	96	27.6	130	5.0	4	
I	332D	143	3.1	78	33.7	151	11.5	6	
I	332E	168	10.6	86	22.2	143	9.8	18	
I	332F	97	14.5	108	3.4	149	11.0	4	
I	332G	74	19.8	94	1.4	121	11.5	2	40
I	332H	82	4.3	129	1.1	150	11.5	2	
I	332K	12	114.5	146	7.0	67	15.5	2	
I	332L	94	0.9	127	2.6	154	5.1	2	
I	332M	98	2.2	128	16.1	178	6.6	2	
I	332N	95	15.3	92	16.1	137	5.1	4	
I	332Q	99	8.4	98	7.9	148	8.5	6	
I	332R	12	135.5	114	7.2	88	30.0	2	

【表 9 - 7】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
I	332S	96	4.9	263	64.1	177	16.5	2
I	332T	112	7.5	100	5.3	124	4.5	4
I	332V	109	1.1	115	19.5	147	25.1	2
I	332W	81	16.8	123	3.7	150	9.7	2
I	332Y	93	13.1	93	12.3	152	5.3	2
A	339D	131	10.4	80	26.4	183	20.3	6
A	339E	100	0.4	75	4.2	91	0.1	2
A	339F	104	3.3	120	24.6	217	8.5	6
A	339G	107	3.7	67	6.5	118	0.3	2
A	339H	114	23.4	107	10.0	136	0.5	2
A	339I	136	14.6	80	30.6	205	22.8	6
A	339K	129	24.2	83	29.0	201	21.0	6
A	339L	97	8.7	83	9.8	104	8.7	2
A	339M	115	6.8	111	7.2	57	8.8	2
A	339N	110	6.3	146	3.5	240	17.5	4
A	339Q	128	15.8	102	19.8	138	11.0	6
A	339R	117	14.4	82	13.4	128	2.1	2
A	339S	124	13.0	95	23.6	170	22.5	6
A	339T	142	14.2	138	6.2	220	20.2	10
A	339W	92	13.4	156	11.4	243	10.6	6
A	339Y	97	17.0	92	19.8	265	21.9	10
G	341D	62	6.9	52	37.8	172	3.5	2
G	341E	73	6.9	50	18.1	161	3.8	2
G	341F	24	100.8	52	41.9	227	14.7	6
G	341H	54	9.3	65	63.7	245	16.0	6
G	341I	44	15.5	36	17.2	173	5.3	2
G	341K	77	3.9	67	18.9	161	2.6	2
G	341L	64	24.3	54	19.8	171	4.2	2
G	341M	55	39.8	79	9.7	232	11.1	6
G	341N	83	9.1	53	17.0	162	9.5	2
G	341P	35	47.2	127	9.9	228	16.2	6
G	341Q	59	18.7	72	1.0	166	7.7	2
G	341R	59	14.9	78	7.4	168	7.5	2
G	341S	65	26.6	55	12.2	224	9.2	6
G	341T	0	866.0	68	54.0	176	10.0	2
G	341V	65	171.0	69	15.0	213	9.6	4
G	341W	14	25.8	76	8.9	178	8.7	2
G	341Y	26	24.5	54	5.2	184	14.3	2
P	343A	75	18.6	110	37.7	143	5.9	2
P	343D	69	11.5	102	7.9	157	18.3	2
P	343E	65	34.9	345	6.4	157	17.6	2
P	343F	74	20.6	89	13.0	99	1058.4	4
P	343G	75	29.1	110	14.9	244	11.1	6
P	343H	78	33.8	191	1.2	159	3.1	2
P	343I	92	26.8	114	16.7	86	10.5	2
P	343K	74	37.7	232	2.6	185	9.1	2

10

20

30

40

【表 9 - 8】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=	
P	343L	63	17.2	125	3.8	127	5.6	2	
P	343M	60	35.1	83	13.7	134	18.7	4	
P	343N	67	8.9	105	19.9	196	18.2	2	
P	343Q	72	0.5	442	14.0	178	3.0	2	
P	343R	94	1.3	198	10.4	179	9.9	4	
P	343S	84	7.5	101	14.3	207	11.9	6	
P	343T	69	4.2	126	16.1	151	4.4	2	
P	343V	70	1.9	77	5.3	107	12.0	2	10
P	343W	48	22.3	56	6.4	194	17.9	2	
P	343Y	63	9.9	112	7.2	270	14.4	6	
Y	373A	56	3.7	33	15.0	121	28.7	2	
Y	373D	74	17.7	74	32.5	227	10.2	6	
Y	373E	41	23.6	106	20.8	151	19.5	2	
Y	373F	76	2.6	110	12.7	117	1.0	2	
Y	373G	39	21.6	38	25.4	75	33.7	2	
Y	373H	79	34.2	100	13.9	169	8.2	4	
Y	373I	65	9.0	73	14.0	154	6.4	2	
Y	373K	76	12.2	70	2.9	246	6.9	6	20
Y	373L	76	21.4	66	17.0	189	6.2	6	
Y	373M	78	1.2	53	25.8	115	3.2	2	
Y	373N	64	21.5	61	23.3	148	12.1	2	
Y	373Q	63	11.0	55	24.7	158	17.7	2	
Y	373R	81	20.5	107	24.1	221	4.0	6	
Y	373S	52	3.7	74	1.9	72	24.8	2	
Y	373T	70	3.0	82	16.6	151	5.7	2	
Y	373V	73	2.1	69	14.3	115	1.1	2	
Y	373W	77	23.3	75	18.5	237	20.8	6	
S	375R	69	10.9	595	15.9	166	1.1	2	
D	376A	111	18.2	155	26.7	180	5.2	2	30
D	376E	85	12.3	82	29.5	98	13.5	2	
D	376F	84	7.3	116	12.6	119	8.6	2	
D	376G	73	3.1	135	3.9	164	0.6	2	
D	376H	74	16.1	81	18.6	118	5.6	2	
D	376I	100	14.1	144	7.2	101	50.5	10	
D	376L	88	16.7	78	3.0	142	3.2	2	
D	376M	86	21.6	129	1.4	91	15.1	2	
D	376N	93	14.5	94	24.2	173	14.9	4	
D	376P	85	15.1	203	12.9	153	19.6	6	
D	376Q	88	5.0	116	22.7	176	19.9	4	
D	376R	95	6.0	103	12.3	166	4.6	2	40
D	376S	85	21.4	134	27.3	209	25.3	2	
D	376T	102	20.0	160	11.2	224	10.1	6	
D	376V	112	8.1	251	15.0	210	11.1	12	
D	376W	53	22.0	1	1719.9	89	34.8	2	
D	376Y	78	4.2	53	25.8	98	39.9	2	
I	377G	107	2.4	76	28.8	92	7.6	2	

【表 9 - 9】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn	pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
I	377K	117	10.0		167	27.7	90	11.3	4
I	377P	99	11.3		98	32.4	245	6.5	4
A	378D	98	6.6		163	13.9	19	91.9	6
A	378N	101	7.1		180	3.0	90	30.7	2
V	379N	96	19.5		74	39.0	204	5.5	4
V	379Q	113	3.2		85	27.3	218	4.1	4
V	379S	80	18.4		86	13.4	137	1.4	2
V	379T	101	16.6		109	14.9	237	2.2	4
E	380A	106	3.2		152	28.8	139	4.2	2
E	380D	102	2.1		73	44.2	78	0.7	2
E	380N	111	7.7		142	19.0	139	7.3	2
E	380S	110	8.5		230	24.1	131	0.1	2
E	380T	100	1.2		172	11.0	115	4.8	2
E	382A	110	6.0		103	7.8	82	29.6	2
E	382D	95	0.8		73	25.7	80	34.2	2
E	382F	121	13.8		222	16.6	67	28.2	6
E	382H	89	17.9		135	2.8	84	20.4	2
E	382I	109	6.4		131	6.2	219	5.4	6
E	382K	96	2.6		153	30.2	92	15.6	4
E	382L	93	16.5		126	11.1	156	7.7	2
E	382M	89	14.6		135	8.6	126	20.3	2
E	382N	99	1.1		137	5.2	69	4.5	2
E	382P	85	16.8		122	22.0	69	14.6	2
E	382Q	105	12.2		162	12.0	140	19.3	2
E	382R	104	8.4		165	2.7	85	3.0	4
E	382S	85	2.9		151	10.0	75	4.1	2
E	382T	89	10.2		172	5.2	109	30.0	2
E	382V	83	32.5		173	6.2	167	0.4	2
E	382W	97	10.5		172	5.2	73	1.9	2
E	382Y	105	11.5		188	14.5	78	3.3	4
G	385E	108	5.5		98	18.8	0	1586.3	2
G	385P	100	3.2		101	23.2	82	15.8	2
Q	386K	96	9.5		115	4.8	266	1.6	4
F	423N	107	8.5		158	2.1	48	27.5	2
S	424H	116	29.8		97	7.3	58	9.3	2
S	424M	91	3.5		60	60.0	75	14.4	2
S	424V	103	9.3		57	35.4	115	10.5	4
S	426D	105	24.3		65	10.0	318	12.7	4
S	426L	91	35.3		117	14.3	193	20.4	4
V	427N	108	5.5		192	5.9	64	23.1	2
H	429A	44	81.7		61	11.4	147	1.9	2
H	429F	70	11.1		77	16.5	288	12.8	4
H	429M	103	0.7		83	12.2	173	3.2	2
E	430A	100	8.3		179	6.6	204	7.1	2
E	430D	96	8.2		44	25.5	190	4.6	4
E	430F	111	13.0		218	19.4	203	8.1	2

【表 9 - 1 0】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
E	430G	97	7.8	131	10.6	252	7.5	6
E	430H	91	7.7	192	8.0	227	4.2	6
E	430I	87	19.3	308	6.6	297	17.2	6
E	430K	66	9.5	131	12.6	203	16.0	4
E	430L	98	33.3	242	8.7	263	10.6	6
E	430M	102	16.1	195	8.7	227	4.6	6
E	430N	82	24.6	171	13.0	162	2.2	2
E	430P	103	13.1	86	16.7	254	23.5	8
E	430Q	79	8.3	320	12.8	97	4.9	8
E	430R	75	7.5	249	6.6	227	7.9	8
E	430S	88	30.1	183	3.4	221	18.5	2
E	430T	82	22.9	137	23.7	249	8.2	6
E	430V	79	35.6	281	7.0	276	17.5	6
E	430W	78	8.3	11	95.0	171	5.4	2
E	430Y	77	44.5	126	12.5	231	na	2
A	431H	81	44.0	151	11.5	236	na	2
A	431K	98	26.6	176	4.4	113	25.0	2
A	431P	62	12.0	29	13.8	210	8.0	2
L	432R	58	23.1	38	15.6	175	13.3	2
L	432S	58	55.4	70	3.6	124	0.2	2
N	434F	na	na	1008	1.4	na	na	4
N	434G	105	17.9	358	20.2	26	128.9	4
N	434H	90	12.9	855	20.4	57	9.1	6
N	434I	81	9.3	6	725.4	73	8.9	2
N	434W	108	6.6	1335	18.8	138	1.7	2
N	434Y	106	7.7	1615	38.8	291	15.5	4
Y	436I	119	18.0	194	24.2	35	8.7	2
Y	436L	112	27.2	172	8.1	90	16.3	4
Y	436T	90	35.0	115	7.2	48	20.3	2
Q	438G	93	32.1	98	14.4	68	26.2	2
Q	438K	99	31.7	169	12.3	116	43.0	2
Q	438L	94	32.5	200	14.7	190	5.5	4
Q	438T	96	37.4	126	9.5	56	26.8	2
Q	438W	93	32.5	164	8.2	126	1.7	2
K	439E	103	28.9	94	9.0	53	40.3	2
K	439H	91	37.3	99	0.9	77	17.8	2
K	439Q	90	38.2	74	0.9	64	26.5	2
S	440A	79	42.3	82	2.0	85	22.5	2
S	440D	82	18.4	72	4.7	99	9.4	2
S	440E	104	4.0	73	2.8	87	35.3	2
S	440F	111	16.1	87	8.2	73	18.5	2
S	440G	106	1.9	101	8.1	83	8.5	2
S	440H	108	2.1	110	2.1	96	18.3	2
S	440I	121	1.9	96	6.2	86	2.6	2
S	440K	116	16.7	132	7.8	71	26.4	4
S	440L	112	6.4	126	2.2	77	4.5	4

10

20

30

40

【表 9 - 1 1】

WT*	位置及び 変異体*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
S	440M	84	51.0	80	8.2	81	20.6	2
S	440N	78	34.3	82	25.4	108	15.8	2
S	440Q	73	43.1	81	33.5	132	16.6	2
S	440R	91	11.3	88	16.2	85	29.8	2
S	440T	89	2.1	71	39.0	115	17.4	2
S	440V	85	11.3	98	18.7	110	16.4	2
S	440W	114	17.6	85	13.8	132	14.8	2
S	440Y	109	6.8	100	14.2	224	14.1	16
S	442K	80	51.9	138	4.5	100	11.1	2

10

N a = 該当なし又は未実施

* 例えば、L 2 3 5 A は、F c を示し、F c アミノ酸番号 2 3 5 (E U 番号付けによる) に存在するロイシンは、アラニン残基で置換される

試験：F c 領域は I g G 1 F c であり、抗体は抗 C D 2 0 抗体である

【表 10-1】

表 10 変異体の組合せ－ADCC

変異体	ADCC平均値 (野生型の割合%)	CV%	n=
野生型	100	2.42	2
247A,339D	71.50	0.50	2
247F,339D	134.95	2.54	2
247H,339D	118.45	8.46	4
247I,339D	187.21	20.45	2
247L,339D	156.73	3.30	2
247T,339D	126.46	4.71	2
247Y,339D	121.93	4.58	2
247A,339H	125.35	0.60	2
247F,339H	101.54	4.53	2
247H,339H	114.24	4.91	2
247I,339H	126.94	5.22	2
247L,339H	120.92	2.44	2
247T,339H	97.96	5.71	2
247Y,339H	74.75	2.43	2
247A,339I	96.95	3.05	2
247F,339I	116.53	5.52	2
247H,339I	108.27	2.97	2
247I,339I	-4.07	-47.26	2
247L,339I	109.76	5.95	2
247T,339I	5.48	9.51	2
247Y,339I	100.84	9.58	2
247A,339K	86.90	13.51	2
247F,339K	105.85	10.11	2
247H,339K	97.59	7.67	2
247I,339K	97.41	14.89	2

10

20

30

【表 10 - 2】

変異体	ADCC 平均値 (野生型の割合%)	CV%	n=
247L,339K	104.36	7.07	2
247T,339K	83.02	6.07	2
247Y,339K	95.79	3.69	2
332E	180.96	0.72	2
247A,339N	83.60	9.91	2
247F,339N	100.36	8.95	2
247H,339N	86.70	7.62	2
247I,339N	119.62	13.07	2
247T,339N	114.38	4.83	4
247Y,339N	113.18	1.50	2
332E	187.19	9.53	2
247A,339Q	69.94	8.45	2
247F,339Q	130.42	2.35	2
247H,339Q	138.96	1.32	2
247I,339Q	146.44	2.27	2
247L,339Q	140.50	4.58	2
247T,339Q	119.70	4.03	2
247Y,339Q	109.40	2.24	2
247A,339R	68.57	8.33	2
247F,339R	114.38	11.85	2
247H,339R	105.46	9.89	2
247I,339R	124.96	16.31	2
247L,339R	119.77	12.03	2
247T,339R	109.42	12.17	2
247Y,339R	98.58	13.09	2
247L,339T	148.48	7.08	4

w t = 野生型

C V % =

n = 測定及び平均したサンプルの数

10

20

30

【表 1 1】

表 1 1 増大したADCCを有する変異体の組合せ

Fc変異体	ADCC EC50 (ng/ml)
野生型	6.8
247L	2.2
330K	3.1
332E	1.5
339T	3.8
247L, 330K	1.5
247L, 332E	0.73
247L, 339T	2.0
330K, 332E	0.73
330K, 339T	2.0
332E, 339T	1.0
247L, 332E, 339T	0.75
247L, 330K, 332E	0.25
247L, 330K, 339T	1.5
330K, 332E, 339T	0.25
247L, 330K, 332E, 339T	0.25

* ADCC活性は、滴定曲線から計算する

【表 1 2】

表 1 2 変異体の組合せ

変異	ADCC	CV%	FcRn6.0	CV%	CDC	CV%	n=
野生型	100		100		100		
247H339D	118	8.5	N/D	N/D	N/D	N/D	4
247L251F330R332E	184	13.3	50	5.9	43	1.3	2
247L251F376I	77	29.7	61	8.7	124	11.3	2
247L332E	168	7.3	78	4.9	65	6.2	6
247L332E376I	137	8.1	74	8.0	76	4.3	4
247T339N	114	4.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
251F332E	147	12.4	72	2.2	196	2.6	6
251F332E376I	136	15.9	68	5.0	160	10.9	4
251F376I	114	8.1	66	2.9	102	9.4	4
256P311I	107	0.2	268	1.2	357	10.0	2
256P314Y332E440Y	146	3.1	86	19.5	190	4.5	2
256P314Y440Y	112	22.6	79	3.0	226	9.4	2
256P332E	174	16.3	121	8.2	189	3.9	4
256P332E440Y	184	25.4	117	6.5	230	10.0	2
256P430Q	109	2.6	150	5.3	354	3.3	4
256P434H	105	1.2	342	3.1	299	2.9	2
256P440Y	169	19.7	122	0.7	247	26.6	2
257I311I	52	7.7	409	3.9	61	6.7	2
257I311I434H	48	12.2	553	4.9	75	8.8	6
257I430Q	26	8.1	304	0.6	55	12.9	4
257I434H	67	7.0	472	6.3	61	14.0	2
268D332E	137	12.4	92	13.7	128	4.1	4
268E332E	178	5.3	88	2.0	160	4.7	4
272R279L	56	0.2	156	1.2	72	5.1	2
279A288N	107	3.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N311T318V	110	9.0	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318N	110	5.4	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318T	116	5.1	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318V	118	8.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A311T318T	110	7.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
288N311T318T	115	9.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
311T318T	107	5.3	N/D	N/D	N/D	N/D	4
314Y332E440Y	156	5.4	82	0.9	155	0.0	2
314Y440Y	125	12.7	78	8.5	108	2.6	2
330K332D	179	2.9	88	8.3	43	0.3	2
330K332E	202	5.6	94	0.0	42	1.0	2
330R332D	152	6.3	88	6.3	44	1.5	2
330R332E	161	4.3	94	2.1	59	4.0	4
332E376I	132	8.6	102	7.6	193	5.2	6
332E376V	139	1.9	132	3.5	261	8.6	6
332E440Y	203	13.0	94	5.7	159	5.9	4
343R345D	121	16.0	143	1.6	291	3.3	2
376V430Q	92	1.5	212	4.2	256	12.2	4
376V430R	84	2.7	188	9.1	191	1.0	2
376V434H	97	3.3	382	3.3	95	6.1	4

10

20

30

40

【表 1 3】

表 1 3 変異体の組合せ

変異	CV		n=
	FcRn6.0	%	
野生型	100		
258D272R	382.8	8.2	2
258D283R	411.1	3.7	2
258D286F	445.0	1.7	2
258D307E	237.1	4.8	2
258D311I	522.0	7.0	2
258D376V	415.1	4.3	2
272R283R	439.3	21.7	2
272R286F	338.4	8.9	2
272R311I	396.1	14.4	2
272R376V	368.7	8.1	2
279D307E	522.4	8.8	2
283R307E	400.2	9.1	2
283R311I	531.3	6.1	2
283R376V	474.8	1.1	2
286F307E	431.2	3.8	2
286F311I	412.3	0.0	2
286F376V	348.9	1.5	2
307E376V	480.1	4.3	2
311I376V	413.5	39.1	2

10

20

【0 2 5 5】

実施例 2 - 変異体の CDC 活性の評価

本実施例では、どのようにして種々の変異 Fc 領域の CDC 活性を決定したかについて述べる。

【0 2 5 6】

本アッセイは、Ramos (RA#1) 細胞 (ATCC 社カタログ番号 CRL-1596) 上のヒト補体 (Quidel Corp., カタログ番号 A113) を用いて行う。Ramos 細胞を、10% FBS を含む Gibco 社製 RPMI 1640 培地中 37℃、5% CO₂ 中で培養した。アッセイの前日に、T175 フラスコ中に細胞を 1×10⁶ 個接種する。翌日、細胞を、1% FBS を含むフェノールレッド欠損 RPMI 1640 中に、3.57×10⁵ 個/ml となるよう再懸濁する。Costar 社製 3917 平底プレート中に、70 μl/ウェルずつ細胞を分注した。滴定曲線を得るために、変異 Fc 領域を有する IgG を RPMI 1640 培地中 3 倍連続希釈法により調製する。一点法ライブラリスクリーニングアッセイを行うために、一時的に培地の上澄み中で発現させた IgG 変異体を、mock 培地で 1 μg/ml に規格化する。30 μl の変異性 IgG (最終濃度 200 ng/ml) 及び、RPMI 1640+1% FBS で 1:5 に希釈したヒト補体 (Quidel Corp., カタログ番号 A113) 50 μl を、標的細胞に加え、穏やかにピペティングすることにより混合する。プレートを、5% CO₂ の存在下 37℃ で 1.5 時間インキュベートする。15 μl/ウェルのアラマブルー (Serotec 社カタログ番号 BUF012B) を加えた後、インキュベーションを終夜継続する。次に、Perkin Elmer 社製 EnVision 2100 多標識リーダーを用いて、励起波長 560 nm、発光波長 590 nm において蛍光シグナルを測定する。

30

40

【0 2 5 7】

i i. データの解析

一点法によるアッセイは、全て 2 回行う。それぞれのアッセイプレートは、IgG 非存在下でのヒト補体による標的細胞の自然溶解、及び 1% Triton-X100 存在下での標的細胞の完全溶解のコントロール群を含む。3 つの野生型コントロール群をそれぞれ

50

のアッセイプレートに含めておき、得られるC D Cシグナルを平均する。自然分解コントロール群から得られるバックグラウンド値を、それぞれのサンプルから差し引く。データを、蛍光シグナルから、自然溶解及び完全溶解コントロール群に対する特異的溶解の割合に変換する。特異的溶解の割合は、次の式により計算される。

(%特異的溶解) = (蛍光シグナルの測定値 - 自然分解シグナル) / (最大分解シグナル - 自然分解シグナル) × 100

3つの野生型コントロール群の平均値に対するFc変異体の活性の割合を計算する。野生型コントロール群の平均値に対する2つのアッセイプレートについての活性の割合を平均し、それぞれのアッセイプレート間の標準偏差を計算する。

【0258】

実施例3 - FcRnの結合の評価

本実施例では、Fc新生児レセプター (FcRn) への変異Fc領域を有するIgGの結合に対するアッセイについて述べる。

【0259】

丸底96ウェルELISAプレート (Costar) を、50 µl / ウェルの2 µg / ml ニュートラビジン (Pierce Biotechnology社カタログ番号31000) 50 mM炭酸バッファー (pH 9.3) 溶液を用いて、4 °Cで終夜コートした。結合していないニュートラビジンを除去し、プレートをPBST (0.1% Tween 20を含むPBS) で3回洗浄する。ビオチン標識した可溶性FcRnの2.5 µg / ml PBS溶液を、50 µl / ウェルずつ加え、室温で1時間インキュベートする。その後、75 µlのカゼインブロッキングバッファー (Pierce Biotechnology社カタログ番号37528) をプレートに1時間加える。ELISAプレートをPBSTで洗浄し、50 µl / ウェルの変異性IgGでインキュベートする。滴定曲線を得るために、テストされるIgGをFcRn結合バッファー (100 mM NaPO₄, 0.05% Tween-20、種々のpH (6.0 ~ 7.4)) 中で3倍連続希釈法により調製する。一点法スクリーニングを行うために、一時的に培地の上澄み中で発現させた変異性IgGを、最終濃度50 ng / mlに規格化し、pHを、FcRn結合バッファーを用いて6.0に調整する。以下のステップにおいて、同様のpHのFcRn結合バッファーを用いてプレートの洗浄及び試薬の希釈を行なう。結合反応を室温で1時間行う。3回洗浄後、結合したIgGを、ヤギ (Fab') 2抗ヒトFab-HRPコンジュゲートを用いて1時間で検出する。HRP活性は、Pierce社のHRP基質 (Turbo TM B-ELISA、カタログ番号34022) を用いて、5 ~ 30分で明らかにする。50 µlの2 M H₂SO₄を加えて反応を停止させ、450 nmにおける吸光度を、VMAXマイクロプレートリーダー (Molecular Devices社製) を用いて測定する。

【0260】

実施例4 - 抗CD20-I332E Fc変異体によるヒトの治療

インビトロでの研究及びマウス腫瘍モデル (Clynes RA他, Nat Med. 6:443 (2000)) より、ADCCが、RITUXAN等の抗CD20抗体の抗ガン効果において役割を果たす証拠を得る。ヒト患者を、抗CD20-I332E Fc変異体抗体、又はRITUXANを用いて、Cartoon他, Blood 99:754 (2002) に開示された方法と同様の方法により治療してもよい。例えば、Ann-Arborの分類でステージII ~ IVの疾患を発症しており、少なくとも1つの測定可能な病巣を有し、GELFの基準による全身腫瘍組織量の低い患者には、4回の総用量が約375 mg / m²の、抗CD20-Fc変異体又はRITUXANを、静脈内注射により投与 (1日、8日、15日、及び22日間) することができる。一次有効性エンドポイントは、客観的奏功率、即ち、国際専門化委員会により最近提案された基準による完全寛解 (CR)、未確認完全寛解 (CrU)、又は部分寛解 (PR) に至った患者の割合である。臨床反応は、2月目 (M2) に評価することができる。患者の経過について1年経過時 (M12) において評価してもよい。

10

20

30

40

50

【0261】

I 3 3 2 E 変異体によりもたらされる増大された A D C C を定量できるように、効果 M 2 及び M 1 2 における、R I T U X A N 又は抗 C D 2 0 - F c 変異体で治療される患者の客観的奏功率を比較してもよい。同様の実施例を、他の抗 C D 2 0 変異体（例えば、表 1 ～ 1 0 に示した組み合わせ）について繰り返すこともできる。

【0262】

更に、変異体の向上した能力により、他の投与経路、注射の回数の減少、及び／又は少容量の投与が可能になる。上記の明細書において言及される全ての出版物、及び、特許に記載された本発明の方法及びシステムの種々の改変及び変形は、当業者にとって、本発明の範囲及び精神から逸脱することのない明白なものであろう。本発明について特に好ましい実施形態と関連づけて記載したが、特許請求の範囲に記載の発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきものではない。実際、記載された本発明の実施形式に対する、化学、及び分子生物学又は関連する分野の当業者にとって明白な改変は、特許請求の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0263】

【図1】種々の領域及び区分を表示した I g G 分子の略図を示す図である。

【図2】ヒト I g G 1（非 a 型及びアロタイプを示す配列番号 1）、ヒト I g G 2（配列番号 2）、ヒト I g G 3（配列番号 3）、ヒト I g G 4（配列番号 4）、マウス I g G 1（配列番号 5）、マウス I g G 2 A（配列番号 6）、マウス I g G 2 B（配列番号 7）、マウス I g G 3（配列番号 8）を含む、母体 F c アミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図3】ヒト I g G 1 の C H 2 領域（配列番号 9）、及び C H 3 領域（配列番号 10）、同じく f アロタイプ（配列番号 11）、及び a、z アロタイプ（配列番号 12）の配列を含む、C H 1、ヒンジ、C H 2、及び C H 3 領域を含むヒト I g G 1 の種々のアミノ酸配列を示す図である。

【図4】（a）抗 C D 2 0 抗体の軽鎖可変領域（L C V R）（i）（配列番号 13）；（b）抗 C D 2 0 抗体の重鎖可変領域（H C V R）（i）（配列番号 14）；（c）抗 C D 2 0 抗体の L C V R（i i）（配列番号 15）；（d）抗 C D 2 0 抗体の H C V R（i i）（配列番号 16）内に含まれる様々なアミノ酸配列；（e）抗 C D 2 0 抗体の可変領域内に含まれるアミノ酸配列を示す（2003年5月20日に出願された米国特許仮出願第 60/471,958 号明細書、及び、米国特許第 5,843,439 号明細書を参照。これらは本願明細書に組み込まれる）図である。

【図5】（a）抗 C D 2 0 抗体 A M E 1 3 3 に関する全長軽鎖アミノ酸配列；（b）A M E 1 3 3 に関する全長軽鎖核酸配列を示す図である。

【図6】抗 C D 2 0 抗体 A M E 1 3 3 の 3 つの好ましい変異体の全長重鎖のアミノ酸配列及び核酸配列を示す図である。具体的には、（a）2 4 7 I / 3 3 9 Q 変異体の全長重鎖のアミノ酸配列；（b）2 4 7 I / 3 3 9 Q 変異体の全長重鎖の核酸配列；（c）2 4 7 I / 3 3 9 D 変異体の全長重鎖のアミノ酸配列；（d）2 4 7 I / 3 3 9 D 変異体の全長重鎖の核酸配列；（e）3 7 8 D 変異体の全長重鎖のアミノ酸配列；（f）3 7 8 D 変異体の全長重鎖の核酸配列を示す図である。

10

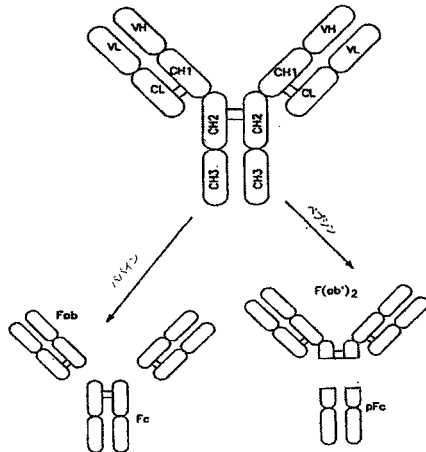
20

30

40

【図 1】

FIG. 1



【図 2】

FIG. 2

[illegible]

【図 3】

FIG. 3

A. 母体 CH2 (SEQ ID NO:9)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

B. 母体 CH3 (SEQ ID NO:10)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

C. 母体ポリペプチド(fアロタイプ) (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCKVDFPEFPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYLSIFSLVSPFSGLSDTGTQYIVCNVHNSGTGVKIVDFKREKPSCKDRHTCCPCPAPBLEGG
PSVFLFPPKPKDMLTMIERTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNQYVNDVGEVHNAAIKPKEERQNI
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYYCKVSNKALPAPIETKSISKAKQPREPVYTLPPSREE
MIRTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTKTPEVLSDDGGFFLYSKLTVDKSRW
CQGNFVSCVMHEALHNNHYSLSLSFPGK

D. 母体ポリペプチド (a, z アロタイプ) (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCKVLYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GSLYLSSIVSTYPSSELGTQYTYCNVNHKPSNTVCKVKEPKCDKTHTCPCPAELGLG
PSYFLPPKPKDTLLI¹SRTEPELVYVDSHEDPEVKFNIVDGEVHNAAKTRFEQGNL
STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTI²SKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKQVSTLTKVKGYPDSI³YVAWESMGQPPENNYKTT⁴PPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRW
QNVFSVCMTHLEAHNYHQ⁵TQKSLSSPGK

【図 4】

FIG. 4

A. (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASSVP YIHWYQKPG QAPRLLIYAT
SALASGIPDR FSGSGSGTDF TLTISRLEPE DFAVYYCQOW LSNPTF

B. (SEQ ID NO: 14)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGRTFT SYNMHVVRQM PGKGLEWMGA
IYPLTGDTSY NQSKSLQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYICARST
YVGGDWQFDV W

C. 抗CD20 LCVR (II) (SEQ ID NO: 15)

QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIHWFQQKPG SSPKFWIYAT
SNLASGVFVR FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQOW TSNPPTF

D. 抗CD20 HCVR (II) (SEQ ID NO: 16)

QVQLQQPGAE LVKAGASVKM SCKASGYTFT SYNHWVKQT PGRGLEWIGA
 IYPNGDTSY NQFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST
 YYGGDWYFNV W

E. 抗CD20 (I)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 17): RASSSVPIYIH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 18): ATSAIAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 19): QQWLSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 20): GRTFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 21): AIYPLTGDTSYNQKSKL
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 22): STYVGGDWQFDV

抗CD20 (II)
LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 23): RASSSVSYIH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 24): ATSNLAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 25): QQWTSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 26): GYTFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 27): AIYPGNGDTSYNQKFKG
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 28): STYYGGDWYFNV

【配列表】

0005055603000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	W
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
		C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 60/604,339
 (32)優先日 平成16年8月25日(2004.8.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/609,101
 (32)優先日 平成16年9月10日(2004.9.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/638,442
 (32)優先日 平成16年12月23日(2004.12.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/643,718
 (32)優先日 平成17年1月13日(2005.1.13)
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(74)代理人 100162695
 弁理士 釜平 双美
 (72)発明者 バレット・アラン
 アメリカ合衆国9 2 0 2 4カリフォルニア州エンシニタス、サン・ディエゴト・ドライブ5 4 2番
 (72)発明者 ウェイドン・ジャン
 アメリカ合衆国9 4 0 8 6カリフォルニア州サニーバイル、ナンバー3、アカラネス・ドライブ2
 3 4番
 (72)発明者 タン・イン
 アメリカ合衆国9 2 1 2 9カリフォルニア州サンディエゴ、パーク・ビレッジ・ロード7 1 7 9番
 (72)発明者 ジェフリー・ディーン・ワトキンス
 アメリカ合衆国9 2 0 2 4カリフォルニア州エンシニタス、フォーチュナ・ランチ・ロード3 4 4
 2番

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 4 / 0 6 3 3 5 1 (WO, A 1)
 国際公開第8 8 / 0 0 7 0 8 9 (WO, A 1)
 SARMA G, MOLECULAR IMMUNOLOGY, 米国, 1 9 9 2年, V29 N5, P633-639

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00-15/90
 MEDLINE/CapIus/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 UniProt/GeneSeq