

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2014年2月27日(27.02.2014)(10) 国際公開番号
WO 2014/030750 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/072598
- (22) 国際出願日: 2013年8月23日(23.08.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2012-185865 2012年8月24日(24.08.2012) JP
- (71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 井川 智之(IGAWA, Tomoyuki); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 村田 絵里子(MURATA, Eriko); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 味元 風太(MIMOTO, Futa); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て(規則 4.17(ii))

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: MOUSE Fc γ RII-SPECIFIC Fc ANTIBODY(54) 発明の名称: マウス Fc γ RII 特異的 Fc 抗体(57) Abstract: In the present invention, the inventors succeeded in discovering many Fc mutants in which binding activity and/or binding selectivity with mouse Fc γ RII was prominently increased by introducing an amino acid modification to the Fc region.(57) 要約: 本発明者らは、Fc領域にアミノ酸改変を導入することにより、マウス Fc γ RII に対する結合活性および/または結合選択性が顕著に増大した Fc 変異体を多数見出すことに成功した。

明 細 書

発明の名称：マウスFc γ RII特異的Fc抗体

技術分野

[0001] 本発明は、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドに関する。また、本発明は、該Fc変異体を用いて、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける作用を予測する方法に関する。さらに、本発明は、該方法を用いて得られた情報をもとに作製されたポリペプチドおよびそれを有効成分として含むヒト疾患の治療または予防剤に関する。

背景技術

[0002] 抗体は血中での安定性が高く、副作用も少ないとから医薬品として注目されている（非特許文献1、非特許文献2）。現在上市されている抗体医薬のほとんどがヒトIgG1サブクラスの抗体である。IgGクラスの抗体の機能の1つとして、抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性と表記する）が知られている（非特許文献3）。抗体がADCC活性を発揮するためには、抗体のFc領域とキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体結合レセプターであるFc γ レセプター（以下、Fc γ Rと表記する）との結合が必要である。

[0003] ヒトでは、Fc γ Rのタンパク質ファミリーには、Fc γ RIa (CD64A)、Fc γ RIIa (CD32A)、Fc γ RIIb (CD32B)、Fc γ RIIIa (CD16A)、Fc γ RIIIb (CD16B)のアイソフォームが報告されており、それぞれのアロタイプも報告されている（非特許文献7）。Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIaは免疫活性的な機能を有するため活性型Fc γ Rと呼ばれ、Fc γ RIIbは免疫抑制的な機能を有し、抑制型Fc γ Rと呼ばれる（非特許文献8）。

[0004] Fc領域とFc γ Rとの結合については、抗体のヒンジ領域及びCH2ドメイン内のいくつかのアミノ酸残基およびCH2ドメインに結合しているEUナンバリング

297番目のAsnに付加される糖鎖が重要であることが示されている（非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献47）。これらの箇所へ変異を導入した抗体を中心に、これまでに様々なFc γ R結合特性を持つ変異体が研究され、活性型Fc γ Rに対するより高い結合活性を有するFc変異体が得られている（特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献6、特許文献7、特許文献8）。

[0005] 活性型Fc γ Rは免疫複合体で架橋されると、細胞内ドメインもしくは相互作用相手であるFcR common γ -chainに含まれるimmunoreceptor tyrosine-based activating motifs (ITAMs) のリン酸化を引き起こし、シグナル伝達物質であるSYKを活性化し、活性化シグナルカスケードを開始することで炎症性免疫反応を引き起こす（非特許文献9）。

[0006] Fc γ RIIbはB細胞に発現している唯一のFc γ Rである（非特許文献10）。Fc γ RIIbに対して抗体のFc領域が相互作用することで、B細胞の初回免疫が抑制されることが報告されている（非特許文献11）。また、B細胞上のFc γ RIIbとB細胞受容体（B cell receptor : BCR）とが血中の免疫複合体を介して架橋されると、B細胞の活性化が抑制され、B細胞の抗体産生が抑制されることが報告されている（非特許文献12）。このBCRとFc γ RIIbを介した免疫抑制的なシグナルの伝達にはFc γ RIIbの細胞内ドメインに含まれるimmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) が必要である（非特許文献13、非特許文献14）。シグナルが入り、ITIMがリン酸化されると、SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) がリクルートされ、他の活性型Fc γ Rのシグナルカスケードの伝達を阻害し、炎症性免疫反応を抑制する（非特許文献15）。また、Fc γ RIIbのみを会合化することによっても、BCR非依存的にIgM産生B細胞をアポトーシスすることなく、B細胞の増殖とBCRの架橋によるカルシウム流入を一過的に抑制することが報告されている（非特許文献16）。

[0007] また、Fc γ RIIbは樹状細胞、マクロファージ、活性化された好中球、マスト細胞、好塩基球でも発現している。これらの細胞においても、Fc γ RIIbはp

hagocytosisや炎症性サイトカインの放出等の活性型Fc γ Rの機能を阻害し、炎症性免疫反応を抑制する（非特許文献8）。

- [0008] Fc γ RIIbの免疫抑制的な機能の重要性については、これまでにFc γ RIIbノックアウトマウスを用いた研究により明らかにされてきた。Fc γ RIIbノックアウトマウスでは、液性免疫が適切に制御されず（非特許文献17）、コラーゲン誘導関節炎（CIA）に対する感受性が増加したり（非特許文献18）、ループス（lupus）様の症状を呈したり、グッドパスチャー（Goodpasture）シンドローム様の症状を呈したりする（非特許文献19）ことが報告されている。
- [0009] また、Fc γ RIIbの調節不全はヒトの自己免疫疾患との関連も報告されている。例えば、Fc γ RIIbのプロモーター領域や細胞膜貫通領域における遺伝子多型と、全身性エリテマトーデス（SLE）の発症頻度との関連（非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22、非特許文献23、非特許文献24）や、SLE患者のB細胞表面におけるFc γ RIIbの発現低下が報告されている（非特許文献25、非特許文献26）。
- [0010] このようにマウスモデルおよび臨床上の知見から、Fc γ RIIbはB細胞との関与を中心に、自己免疫疾患、炎症性疾患を制御する役割を果たしていると考えられ、自己免疫疾患、炎症性疾患を制御するための有望な標的分子である。
- [0011] 市販の抗体医薬として主に用いられているIgG1はFc γ RIIbだけでなく、活性型Fc γ Rにも強く結合することが知られている（非特許文献27）。Fc γ RIIbに対する結合を増強した、あるいは活性型Fc γ Rと比較してFc γ RIIbへの結合の選択性を向上させたFc変異体を利用することで、IgG1と比べて免疫抑制的な性質を有した抗体医薬の開発可能性が考えられる。例えば、BCRに結合する可変領域と、Fc γ RIIbに対する結合を増強したFc変異体を有する抗体を利用することで、B細胞の活性化を阻害する可能性が示唆されている（非特許文献28）。B細胞上のFc γ RIIbとB-cell receptorに結合したIgEとが架橋されることで、B細胞のプラズマ細胞への分化、その結果として起こるIgE産生が抑制され、ヒトPBMCを移植したマウスにおいてヒトIgGやIgM濃度は維持されて

いるが、ヒトIgE濃度は減少することが報告されている（非特許文献29）。IgEだけではなく、B-cell receptor複合体を形成するCD79bとFc γ RIIBとを抗体で架橋した場合にはin vitroにおいてB細胞の増殖が抑制され、コラーゲン関節炎モデルにおいて症状を緩和したことが報告されている（非特許文献30）。

- [0012] B細胞以外にも、IgEの受容体であるFc ϵ RIと結合するIgEのFc部分とFc γ RIIbに対する結合を増強したIgGのFc部分とを融合させた分子を使って、マスト細胞上のFc ϵ RIとFc γ RIIbとを架橋することで、Fc γ RIIbのリン酸化を引き起こし、Fc ϵ RI依存的なカルシウムの流入を抑制することが報告されており、これはFc γ RIIbに対する結合を増強することでFc γ RIIbの刺激を介した脱顆粒の阻害が可能であることを示唆している（非特許文献31）。
- [0013] これらのことから、Fc γ RIIbに対する結合活性を向上させたFc変異体を持つ抗体が自己免疫疾患等の炎症性疾患の治療薬として有望であることが示唆される。
- [0014] また、Fc γ RIIbに対する結合を増強した変異体は、自己免疫疾患等の炎症性疾患の治療薬に加えてがん治療薬としても有望であることが示唆されている。これまでに、Fc γ RIIbは TNFレセプターファミリーに対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性においても重要な役割を果たすことが明らかにされている。具体的にはTNFレセプターファミリーに含まれるCD40、DR4、DR5、CD30、CD137に対する抗体のアゴニスト活性にはFc γ RIIbとの相互作用が必要であることが示唆されている（非特許文献32, 33, 34, 35, 36, 37）。非特許文献32においては、Fc γ RIIbに対する結合を増強した抗体を用いることで、抗CD40抗体の抗腫瘍効果が増強することが示されている。このことから、Fc γ RIIbに対する結合を増強した抗体はTNFレセプターファミリーに対する抗体を始めとするアゴニスト抗体のアゴニスト作用を増強する効果があると期待される。
- [0015] これまでにFc γ RIIbに対する結合活性を向上させたFc変異体を持つ抗体についての報告はなされている（非特許文献28）。この文献中では、抗体のFc領域にS267E/L328F、G236D/S267E、S239D/S267E等の改変を加えることで、Fc

γ RIIbに対する結合活性を向上させていた。この中で、S267E/L328Fの変異を導入した抗体が最も強くFc γ RIIbに対して結合し、Fc γ RIaおよびFc γ RIIaのH型に対する結合は天然型IgG1と同程度に維持していた。しかし、別の報告によると、この改変はFc γ RIIaのR型に対する結合がFc γ RIIbに対する結合と同程度に数百倍増強しており、Fc γ RIIa R型と比較した場合、Fc γ RIIbに対する結合の選択性が向上していない（特許文献5）。さらに、同文献内においてこのS267E/L328Fの変異を導入した抗体のマウスFc γ RII（Fc γ RIIbのマウスホモログ）に対する結合活性が評価されているが、結合活性の増強は見られておらず、Fc γ RIIb結合増強における種交差性の低さが示唆されている。

いくつかの抗体医薬においてはIgGとFc γ Rとの相互作用に由来する副作用が報告されている。例えば、VEGFに対する抗体であるbevacizumabが投与された患者群では血栓塞栓症の頻度が上昇することが知られている（非特許文献38）。また、CD40リガンドに対する抗体の臨床開発試験においても同様に血栓塞栓症が観察され、臨床試験が中止された（非特許文献39）。血小板の細胞上には活性型Fc γ レセプターであるFc γ RIIaが発現している（非特許文献40）が、動物モデルなどを使ったその後の研究により、投与されたいずれの抗体も血小板上のFc γ RIIaに対する結合を介して血小板が凝集し、その結果血栓を形成することが示唆されている（非特許文献41、非特許文献42）。自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデスの患者においてはFc γ RIIa依存的な機構によって血小板が活性化し、血小板の活性化が重症度と相関すると報告されている（非特許文献43）。

また、これまでに動物モデルを用いた研究により、抗体と多価抗原の免疫複合体が活性型Fc γ Rを介してアナフィラキシーを誘導することも報告されている（非特許文献44）。

加えて、活性型のFc γ Rを介して多価抗原と抗体の免疫複合体が取り込まれることにより、その抗原に対する抗体価の産生が高くなることが報告されている（非特許文献45、非特許文献46）。この結果は多価抗原を認識する抗体医薬品の場合、抗体医薬品自身に対する抗体が産生しやすくなる可能性を示

唆している。抗体医薬品に対する抗体が産生された場合、その血中動態が悪化する、あるいは中和抗体が医薬品の効果を減弱させることが考えられる。

このように、抗体が多価抗原と結合することで免疫複合体を形成し、その複合体が活性型Fc γ Rと相互作用することで様々な副作用を誘導することが考えられ、抗体の医薬品としての価値を減じてしまう。この問題を回避しながらも、Fc γ RIIbを介した作用を維持するためには、Fc γ RIIbに対する結合は維持しつつ、活性型Fc γ Rに対する結合を選択的に減弱することが望ましい。しかし、マウスFc γ Rに対してこのような特徴を備えたFc変異体の報告はない。

[0016] 上述のようにヒトFc γ Rに対してはFc γ RIIbに対する結合の選択性を一部向上させたFc変異体の報告はあるが、マウスFc γ Rに対してその対応するホモログであるFc γ RIIに対する結合の選択性を向上させたFc変異体の報告は存在しない。このようなFc変異体が存在しないために、マウスにおいて確立されている様々な病態モデルにおいて、Fc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体の効果は十分に検証されていない。従来は、Fc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体の効果を評価するために、ヒトFc γ RIIbトランスジェニックマウスを利用する（非特許文献30、31、32）、あるいはヒトPBMCを移植したSCIDマウスを利用する（非特許文献29、31）などの方法で検証してきた。しかし、前者については病態モデルとの交配をしなければ、Fc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体の病態モデルにおける効果を検証することはできず、トランスジェニックマウスにおける導入遺伝子の機能が必ずしも本来の機能を発揮するとは限らないという問題点がある。後者については、血球系の細胞についてはヒトFc γ RIIbを発現しているが、それ以外の組織においてはマウス由来のFc γ Rが発現しており、ヒトFc γ RIIbを介した効果のみを評価することができない。そのため、マウスにおいて確立されている様々な病態モデルにおいて、Fc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体の効果はこれまで十分に評価できていない。しかし、マウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を創出することができれば、上記のような制約はなく、様々な

病態モデルマウスにおける効果を検証することが可能となり、Fc γ RIIb に対して選択的に結合するFc変異体のヒトにおける効果を見極めるのに極めて有用である。このような観点から、マウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体の創出が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0017] 特許文献1 : WO 2000/42072

特許文献2 : WO 2006/019447

特許文献3 : WO 2004/99249

特許文献4 : WO 2004/29207

特許文献5 : US2009/0136485

特許文献6 : US2004/0132101

特許文献7 : WO2007/041635

特許文献8 : WO2008/150494

非特許文献

[0018] 非特許文献1 : Nat Biotechnol, 23(9), 1073-1078, 2005

非特許文献2 : Eur J Pharm Biopharm, 59(3), 389-96, 2005

非特許文献3 : Chem Immunol, 65, 88-110, 1997

非特許文献4 : J Biol Chem, 276(19), 16478-16483, 2001

非特許文献5 : Eur J Immunol, 23(5), 1098-1104, 1993

非特許文献6 : Immunology, 86(2), 319-324, 1995

非特許文献7 : Immunol Lett, 82(1-2), 57-65, 2002

非特許文献8 : Nat Rev Immunol, 10(5), 328-343, 2010

非特許文献9 : Nat Rev Immunol, 8(1), 34-47, 2008

非特許文献10 : Eur J Immunol, 19(8), 1379-1385, 1989

非特許文献11 : J Exp Med, 129(6), 1183-1201, 1969

非特許文献12 : Immunol Lett, 88(2), 157-161, 2003

非特許文献13 : Science, 256(5065), 1808-1812, 1992

- 非特許文献14 : Nature, 368(6466), 70-73, 1994
- 非特許文献15 : Science, 290(5489), 84-89, 2000
- 非特許文献16 : J Immunol, 181(8), 5350-5359, 2008
- 非特許文献17 : J Immunol, 163(2), 618-622, 1999
- 非特許文献18 : J Exp Med, 189(1), 187-194, 1999
- 非特許文献19 : J Exp Med, 191(5), 899-906, 2000
- 非特許文献20 : Hum Genet, 117(2-3), 220-227, 2005
- 非特許文献21 : J Biol Chem, 282(3), 1738-1746, 2007
- 非特許文献22 : Arthritis Rheum, 54(12), 3908-3917, 2006
- 非特許文献23 : Nat Med, 11(10), 1056-1058, 2005
- 非特許文献24 : J Immunol, 176(9), 5321-5328, 2006
- 非特許文献25 : J Exp Med, 203(9), 2157-2164, 2006
- 非特許文献26 : J Immunol, 178(5), 3272-3280, 2007
- 非特許文献27 : Blood, 113(16), 3716-3725, 2009
- 非特許文献28 : Mol Immunol, 45(15), 3926-3933, 2008
- 非特許文献29 : J Allergy Clin Immunol, 129(4), 1102-1115, 2012
- 非特許文献30 : Arthritis Rheum, 62(7), 1933-1943, 2010
- 非特許文献31 : Immunol Lett, 143(1), 34-43, 2012
- 非特許文献32 : Science, 333(6045), 1030-1034, 2011
- 非特許文献33 : Cancer Cell, 19(1), 101-113, 2011
- 非特許文献34 : J Clin Invest, 122 (3), 1066-1075, 2012
- 非特許文献35 : J Immunol, 171(2), 562-568, 2003
- 非特許文献36 : Blood, 108(2), 705-710, 2006
- 非特許文献37 : J Immunol, 166(8), 4891-4898, 2001
- 非特許文献38 : J Natl Cancer Inst, 99(16), 1232-1239, 2007
- 非特許文献39 : Arthritis Rheum, 48(3), 719-727, 2003
- 非特許文献40 : J Exp Med, 203(9), 2157-2164, 2006
- 非特許文献41 : J Thromb Haemost, 7(1), 171-181, 2009

非特許文献42 : J Immunol, 185(3), 1577-1583, 2010

非特許文献43 : Sci Transl Med, 2(47), 47-63, 2010

非特許文献44 : Blood, 119(24), 5640-5649, 2012

非特許文献45 : Scand J Immunol, 64(3), 177-184, 2006

非特許文献46 : J Immunol, 163(2), 618-622, 1999

非特許文献47 : Mol Immunol, 29(1), 53-59, 1992

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0019] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的はマウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを提供することにある。また、該Fc変異体を用いて、ヒトFc γ R IIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける作用を予測する方法を提供することにある。さらに、本発明は、該方法を用いて得られた情報をもとに作製されたポリペプチドおよびそれを有効成分として含むヒト疾患の治療または予防剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0020] 本発明者らは、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドについて鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、Fc領域にアミノ酸改変を導入することにより、マウスFc γ R IIに対する結合活性および／または結合選択性が顕著に増大したFc変異体を多数見出すことに成功した。

[0021] 本発明は、このような知見に基づくものであり、具体的には以下の発明に関する。

[1] Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を含み、かつ [マウスFc γ RIIIに対するKD値] / [マウスFc γ RIIに対するKD値] の比が6以上であるポリペプチド。

[2] Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に少なくとも一つ

のアミノ酸改変を含み、かつマウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上しているポリペプチド。

[3] マウスFc γ RIIに対するKD値が20nM以下である、〔1〕または〔2〕に記載のポリペプチド。

[4] マウスFc γ RIIに対する結合活性が親ポリペプチドより10倍以上増強している、〔1〕または〔2〕に記載のポリペプチド。

[5] マウスFc γ RIIIに対するKD値が1μM以上である、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載のポリペプチド。

[6] マウスFc γ RIIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱している、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載のポリペプチド。

[7] アミノ酸改変が、EUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のアミノ酸のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸の改変である、〔1〕から〔6〕のいずれかに記載のポリペプチド。

[8] アミノ酸改変が、EUナンバリング；
230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、
231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、

232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、

237番目のアミノ酸のGluへの置換、
238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、
239番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、
240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、
241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、

266番目のアミノ酸のLeuへの置換、
267番目のアミノ酸のAla、GluまたはMetへの置換、
268番目のアミノ酸のAspへの置換、
271番目のアミノ酸のLeuへの置換、
295番目のアミノ酸のLeuへの置換、
296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、
298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、
324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、
326番目のアミノ酸のAspへの置換、
327番目のアミノ酸のGlyへの置換、
330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、
331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、
333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、
334番目のアミノ酸のArgへの置換、
335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、
337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、
のグループから選択される少なくとも一つの改変である、〔7〕に記載のポリペプチド。

〔9〕 Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、〔1〕から〔8〕のいずれかに記載のポリペプチド。

〔10〕 ポリペプチドが抗体である、〔1〕から〔9〕のいずれかに記載のポリペプチド。

〔11〕 Fc領域を含む親ポリペプチドを改変して、〔マウスFc γ RIIIに対するKD値〕／〔マウスFc γ RIIに対するKD値〕の比を6以上にする方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも

一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

[12] Fc領域を含む親ポリペプチドを改変して、マウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性を親ポリペプチドより5倍以上向上させる方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

[13] アミノ酸改変が、EUナンバリング；

230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、

231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、

232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、

237番目のアミノ酸のGluへの置換、

238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、

239番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、

240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、

241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、

266番目のアミノ酸のLeuへの置換、

267番目のアミノ酸のAla、GluまたはMetへの置換、

268番目のアミノ酸のAspへの置換、

271番目のアミノ酸のLeuへの置換、

295番目のアミノ酸のLeuへの置換、

296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、

298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、

324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、

326番目のアミノ酸のAspへの置換、
327番目のアミノ酸のGlyへの置換、
330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、
331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、
333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、
334番目のアミノ酸のArgへの置換、
335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、
337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、
のグループから選択される少なくとも一つの改変である、〔11〕または〔12〕に記載の方法。

〔14〕 Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、〔11〕から〔13〕のいずれかに記載の方法。

〔15〕 ポリペプチドが抗体である、〔11〕から〔14〕のいずれかに記載の方法。

〔16〕 Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、〔マウスFc γ RIIIに対するKD値〕／〔マウスFc γ RIIに対するKD値〕の比が6以上のポリペプチドを製造する方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

〔17〕 Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上したポリペプチドを製造する方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを

含む方法。

- [18] アミノ酸改変が、EUナンバリング；
- 230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、
231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、
232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、
237番目のアミノ酸のGluへの置換、
238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、
239番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、
240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、
241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、
266番目のアミノ酸のLeuへの置換、
267番目のアミノ酸のAla、GluまたはMetへの置換、
268番目のアミノ酸のAspへの置換、
271番目のアミノ酸のLeuへの置換、
295番目のアミノ酸のLeuへの置換、
296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、
298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、
324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、
326番目のアミノ酸のAspへの置換、
327番目のアミノ酸のGlyへの置換、
330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、
331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、
333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、
334番目のアミノ酸のArgへの置換、
335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、

337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、
のグループから選択される少なくとも一つの改変である、〔16〕または〔
17〕に記載の方法。

〔19〕 Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、〔16〕から〔18〕のいずれかに記載の方法。

〔20〕 ポリペプチドが抗体である、〔16〕から〔19〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕 〔16〕から〔20〕のいずれかに記載の方法により製造されたポリペプチド。

〔22〕 マウスFc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域にEUナンバリング；

230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、

231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、

232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、

237番目のアミノ酸のGluへの置換、

238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、

239番目のアミノ酸のAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、

240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、

241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、

266番目のアミノ酸のLeuへの置換、

267番目のアミノ酸のGluまたはMetへの置換、

268番目のアミノ酸のAspへの置換、

271番目のアミノ酸のLeuへの置換、

295番目のアミノ酸のLeuへの置換、

296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、

298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、
324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、
326番目のアミノ酸のAspへの置換、
327番目のアミノ酸のGlyへの置換、
330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、
331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、
333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、
334番目のアミノ酸のArgへの置換、
335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、
337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、
のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸改変を含むポリペプチド。

[23] さらに、EUナンバリング；

239番目のアミノ酸のAspまたはGluへの置換、
267番目のアミノ酸のAlaへの置換、
のグループから選択されるアミノ酸改変を含む、[22]に記載のポリペプチド。

[24] Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、[22]または[23]に記載のポリペプチド。

[25] ポリペプチドが抗体である、[22]から[24]のいずれかに記載のポリペプチド。

[26] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の疾患の治療または予防効果を予測する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および[1]から[10]、[21]から[25]のいずれかに記載のFc変異体を含むポ

リペプチドを作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが前記ヒト疾患の治療または予防に有効であると判断する工程。

[27] 工程 (b) (c) に加えて、

(b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型 IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程を含み、かつ工程 (d) が、

(d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが前記ヒト疾患の治療または予防に有効であると判断する工程である、[26] に記載の方法。

[28] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患を選択する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および [1] から [10]、[21] から [25] のいずれかに記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに

投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患として前記ヒト疾患を選択する工程。

[29] 工程 (b) (c) に加えて、

(b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型 IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程を含み、かつ工程 (d) が、

(d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患として前記ヒト疾患を選択する工程である、〔28〕に記載の方法。

[30] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原を選択する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および〔1〕から〔10〕、〔21〕から〔25〕のいずれかに記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原として前記マウス抗原に対応するヒト抗原を選択する工程。

[31] 工程 (b) (c) に加えて、

(b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型 IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程を含み、かつ工程 (d) が、

(d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原として前記マウス抗原に対応するヒト抗原を選択する工程である、[30] に記載の方法。

[32] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した抗原結合領域を選択する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) 同一のマウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを複数取得する工程、

(b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および [1] から [10]、[21] から [25] のいずれかに記載のFc変異体を含むポリペプチドをそれぞれ作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスにそれぞれ投与する工程、および

(d) 工程 (c) の結果、より強い治療または予防効果を示したポリペプチドの抗原結合領域を、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた前記ヒト疾患の治療または

予防に適した抗原結合領域として選択する工程。

[33] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の安全性または毒性を予測する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および[1]から[10]、[21]から[25]のいずれかに記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程(b)で作製されたポリペプチドをマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程(c)で得られた、工程(b)のポリペプチドのマウスにおける安全性または毒性の結果を、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける安全性または毒性として類推する工程。

[34] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の薬物動態を予測する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および[1]から[10]、[21]から[25]のいずれかに記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程(b)で作製されたポリペプチドをマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程(c)で得られた、工程(b)のポリペプチドのマウスにおける薬物動態の結果を、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合

領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける薬物動態として類推する工程。

[35] 疾患が免疫炎症性疾患である、[26]から[32]のいずれかに記載の方法。

[36] 免疫炎症性疾患が自己免疫疾患である、[35]に記載の方法。

[37] マウスがヒト抗原を発現する遺伝子改変マウスである、[26]から[36]のいずれかに記載の方法。

[38] Fc領域がIgGのFc領域である、[26]から[37]のいずれかに記載の方法。

[39] ポリペプチドが抗体である、[26]から[38]のいずれかに記載の方法。

[40] [30]または[31]に記載の方法により選択された標的抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチド。

[41] [32]に記載の方法により選択された抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチド。

[42] Fc領域がIgGのFc領域である、[40]または[41]に記載のポリペプチド。

[43] ポリペプチドが抗体である、[40]から[42]のいずれかに記載のポリペプチド。

[44] [40]から[43]のいずれかに記載のポリペプチドを有効成分として含む、ヒト疾患の治療または予防剤。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]マウスFc γ RII（本明細書ではmFc γ RIIまたはmFc γ RIIとも表記される）

（配列番号：21）およびマウスFc γ RIII（本明細書ではmFc γ RIIIまたはmFc γ RIIIとも表記される）（配列番号：22）の7位から267位までのアミノ酸

の配列を比較した結果を示す図である。 $mFc\gamma RII$ および $mFc\gamma RIII$ において、*J Mol Biol* (2001) 309, 737-749で示されているhuman IgGのFc領域と相互作用するhuman Fc γ Rの部位と対応する部位を太線で囲んだ。また、その部位内における、 $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ とで残基が異なる部分の下に*を表示した。[図2] $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合の比較を示す図であり、実施例3で使用した改変を導入した改変体にラベルした。直線は $mFc\gamma RII$ に対する結合活性の増強度合と $mFc\gamma RIII$ に対する結合活性の増強度合が一致するところを示す。

[図3] $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合の比較を示す図であり、EUナンバリングで239番目のSerをAspに置換した改変体、および、この改変に加えてさらにもう一つ改変を導入した改変体にラベルした。

[図4] $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合の比較を示す図であり、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際に $mFc\gamma RII$ に対する相対的結合活性が200倍以上増強した改変体にラベルした。

[図5]EUナンバリング231番目と232番目のアミノ酸置換による $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合の変化を示す図である。

[図6] $mFc\gamma RII$ に対する結合および $mFc\gamma RII/III$ 間の選択性の比較を示す図であり、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際に $mFc\gamma RII$ に対する相対的結合活性が200倍以上あるいは相対的I/Aが25倍以上の改変体にラベルした。

[図7] $mFc\gamma RII$ に対する結合および $mFc\gamma RII/III$ 間の選択性に対して、EUナンバリングで239番目のアミノ酸の種類が各鑄型に及ぼす効果を比較した図である。

[図8] $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合の比較を示す図であり、H237-MB397/MRAL-k0と比較した際に $mFc\gamma RII$ に対する相対的結合活性が1.1倍以上の改変体にラベルした。

[図9] $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合の比較を示す図であり、H237-MB390/MRAL-k0と比較した際に $mFc\gamma RII$ に対する相対的結合活性が1.1倍以上の改変体にラベルした。

[図10]H237-MB367/L104-mk1、H237-mF46/L104-mk1が、ノーマルマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された各抗体の濃度推移を示す図である。

[図11-1]マウスIgGの重鎖定常領域（配列番号：24～27）、Fc領域を構成するアミノ酸残基と、KabatナンバリングおよびEUナンバリング（本明細書においてEU INDEXとも呼ばれる）との関係を表す。その中のCH1ドメインを示す。KabatナンバリングおよびEUナンバリングは非特許文献（SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST VOL.1）の記載内容に基づいて番号を付与した。mIgG1については、同文献中において[CELL, 18, 559-568 (1979); NATURE, 277, 627-633 (1979); GENE, 9, 87-97 (1980)]を参照とする配列(81)を参照した。mIgG2aについては、同文献中において[NUC. ACIDS RES., 8, 3143-3155 (1980); PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 78, 2442-2446 (1981); NUC. ACIDS RES., 9, 1365-1381 (1981); CELL, 32, 515-523 (1983)]を参照とする配列(92)を参照した。mIgG2bについては、同文献中において[SCIENCE, 206, 1303-1306 (1979)]を参照とする配列(86)を参照した。mIgG3については、同文献中において[EMBO J., 3, 2041-2046 (1984)]を参照とする配列(79)を参照した。

[図11-2]図11-1の続きの図である。その中のヒンジ部を示す。

[図11-3]図11-2の続きの図である。その中のCH2ドメインを示す。

[図11-4]図11-3の続きの図である。その中のCH3ドメインを示す。

[図12]ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4の重鎖定常領域（配列番号：28～31）、Fc領域を構成するアミノ酸残基と、EUナンバリング（本明細書においてEU INDEXとも呼ばれる）との関係を表す。

[図13]mFc γ RIIに対する結合およびmFc γ RII/III間の選択性の比較を示す図であり、各templateと比較した際に相対的I/Aが0.75倍以上の改変体にラベルした。

[図14]mFc γ RIIに対する結合およびmFc γ RII/III間の選択性の比較を示す図であり、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際に相対的I/Aが70倍以上の改変体に

ラベルした。

[図15]mFc γ RIIに対する結合およびmFc γ RII/III間の選択性に対して、EUナンバリングで239番目のアミノ酸の種類が各鑄型に及ぼす効果を比較した図である。

[図16]mFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合の比較を示す図であり、鑄型としたH237-MB630/MRAL-k0にラベルした。直線は mFc γ RIIに対する結合活性の増強度合とmFc γ RIIIに対する結合活性の増強度合が一致するところを示す。

[図17]mFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合の比較を示す図であり、鑄型としたH237-MB716/MRAL-k0にラベルした。直線は mFc γ RIIに対する結合活性の増強度合とmFc γ RIIIに対する結合活性の増強度合が一致するところを示す。

[図18]mFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合の比較を示す図であり、鑄型とした7つの改変体にラベルした。

[図19]mFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合の比較を示す図であり、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際にmFc γ RIIに対する相対的結合活性が0.5倍以上2.0倍以下、かつ相対的I/Aが5倍以上の改変体にラベルした。

[図20]H237-mIgG1/L104-mk1、H237-MB477/L104-mk1、およびH237-MB492/L104-mk1がノーマルマウスに投与されたときの、当該マウスの血漿中における各抗体と同時に投与された抗原の濃度推移を示す図である。

[図21]H237-mIgG1/L104-mk1、H237-MB477/L104-mk1、およびH237-MB492/L104-mk1がノーマルマウスに投与されたときの、当該マウスの血漿中における投与された各抗体の濃度推移を示す図である。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明は、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体に関する。

[0024] 本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を含み、かつ [マウスFc γ RIIIに対するKD値] / [マウスFc γ RIIに対するKD値] の比が6以上であるポリペプチドを提供する。また、本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に少なく

とも一つのアミノ酸改変を含み、かつマウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上しているポリペプチドを提供する。

[0025] 本発明のポリペプチドは、Fc領域を含む親ポリペプチドにおいて、該Fc領域に適当なアミノ酸改変を加えることにより作製することができる。アミノ酸改変の位置や個数、改変の種類などは特に限定されておらず、改変されてできたFc変異体を含むポリペプチドが以下のようない性質を有していれば、どのような改変であっても構わない。

- ・ [マウスFc γ RIIIに対するKD値] / [マウスFc γ RIIに対するKD値] の比が6以上であること、あるいは
- ・ マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上していること。

[0026] マウスFc γ RIIとマウスFc γ RIIIの選択性は、マウスFc γ RIIに対する結合活性とマウスFc γ RIIIに対する結合活性の比によって表わすことができる。マウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性を、[マウスFc γ RIIIに対するKD値]を[マウスFc γ RIIに対するKD値]で割った値（本明細書においてはI/Aとも表記される）として定義する場合、その値が大きければマウスFc γ RIIに対する選択性が高いことを意味し、逆にその値が小さければマウスFc γ RIIに対する選択性が低いことを意味する。親ポリペプチドのI/Aおよび改変ポリペプチドのI/Aをそれぞれ算出して、親ポリペプチドのI/Aを1としたときの改変ポリペプチドのI/A（本明細書においては相対的I/Aとも表記される）を求めると、相対的I/Aが1を上回れば当該改変によりマウスFc γ RIIに対する選択性が向上したことを意味し、相対的I/Aが1を下回れば当該改変によりマウスFc γ RIIに対する選択性が低下したことを意味する。

[0027] 本発明のポリペプチドにおける [マウスFc γ RIIIに対するKD値] / [マウスFc γ RIIに対するKD値] の比は、6以上であり、好ましくは10以上、15以上、20以上、25以上、30以上であり、さらに好ましくは35以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上である。また、本発明のポリペプチド

におけるマウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性は、親ポリペプチドより5倍以上向上しており、好ましくは10倍以上、15倍以上、20倍以上、25倍以上、30倍以上向上しており、さらに好ましくは35倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上向上している。

[0028] 本発明のポリペプチドが有する好ましい性質の一つとして、マウスFc γ RIIに対して強く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のような性質を有することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIに対するKD値が20nM以下であること、あるいは
- ・マウスFc γ RIIに対する結合活性が親ポリペプチドより10倍以上増強していること。

[0029] 本発明のポリペプチドのマウスFc γ RIIに対するKD値は、20nM以下であり、好ましくは10nM以下、4nM以下、2nM以下であり、さらに好ましくは1.5nM以下、1nM以下、0.7nM以下、0.5nM以下である。また、本発明のポリペプチドのマウスFc γ RIIに対する結合活性は親ポリペプチドより10倍以上増強しており、好ましくは20倍以上、50倍以上、100倍以上増強しており、さらに好ましくは150倍以上、200倍以上、300倍以上、400倍以上増強している。

[0030] また、後述のように、KD値の代りに結合量を指標に用いることもできる。すなわち、本明細書においては、マウスFc γ RIIに対する結合活性をマウスFc γ RIIに対する結合量と読み替えてよく、マウスFc γ RIIIに対する結合活性をマウスFc γ RIIIに対する結合量と読み替てもよい。

[0031] 上記のような性質を付与することのできるアミノ酸改変として、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング240番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング266番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング268番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング271番目

のアミノ酸の改変、EUナンバリング295番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング296番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング324番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング326番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング327番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング330番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング331番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング333番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング334番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング335番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング337番目のアミノ酸の改変などが挙げられる。これらのアミノ酸改変は1箇所であってもよく、また2箇所以上であってもよい。

- [0032] さらに好ましいアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸をAsp、Glu、Ile、Pro、Gln、またはValに置換する改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpに置換する改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Leu、Asn、Val、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸をGlu、Pro、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング240番目のアミノ酸をGlu、His、Gln、またはTrpに置換する改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸をTrpまたはTyrに置換する改変、EUナンバリング266番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸をAlaまたはGluに置換する改変、EUナンバリング268番目のアミノ酸をAspに置換する改変、EUナンバリング271番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング295番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング296番目のアミノ酸をGlu、Asn、Thr、またはTrpに置換する改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸をLeuまたはMetに置換する改変、EUナンバリング324番目のアミノ酸をAsp、Leu、またはMetに置換する改変、EUナンバリング326番目のアミノ酸をAspに置換する改変、EUナンバリング327番目のアミノ酸をGlyに置換する改変、EUナンバリング330番目のアミノ酸をGly、Lys、またはGlnに置

換する改変、EUナンバリング331番目のアミノ酸をAsp、Phe、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング333番目のアミノ酸をAsn、Val、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング334番目のアミノ酸をArgに置換する改変、EUナンバリング335番目のアミノ酸をAsnまたはTyrに置換する改変、EUナンバリング337番目のアミノ酸をIle、Lys、またはTrpに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変の好ましい例として、表2～17、表24、25に記載の改変などが挙げられる。

[0033] 本発明には、マウスFc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に特定のアミノ酸改変を含むポリペプチドが含まれる。そのようなアミノ酸改変としては、EUナンバリング230番目のアミノ酸をAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValに置換する改変、231番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpに置換する改変、232番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrに置換する改変、238番目のアミノ酸をGlu、ProまたはGlnに置換する改変、239番目のアミノ酸をAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrに置換する改変、240番目のアミノ酸をGlu、His、GlnまたはTrpに置換する改変、241番目のアミノ酸をTrpまたはTyrに置換する改変、266番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、267番目のアミノ酸をGluに置換する改変、268番目のアミノ酸をAspに置換する改変、271番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、295番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、296番目のアミノ酸をGlu、Asn、Thr、またはTrpに置換する改変、298番目のアミノ酸をLeuまたはMetに置換する改変、324番目のアミノ酸をAsp、Leu、またはMetに置換する改変、326番目のアミノ酸をAspに置換する改変、327番目のアミノ酸をGlyに置換する改変、330番目のアミノ酸をGly、Lys、またはGlnに置換する改変、331番目のアミノ酸をAsp、Phe、またはTyrに置換する改変、333番目のアミノ酸をAsn、Val、またはTyrに置換する改変、334番目のアミノ酸をArgに置換する改変、335番目のアミノ酸をAsnまたはTyrに置換する改変、337番目のアミノ酸をIle、Lys

、またはTrpに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。

[0034] さらに、これらのアミノ酸改変に加えて、別のアミノ酸改変を含んでいてもよい。そのようなアミノ酸改変としては、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAspまたはGluに置換する改変、267番目のアミノ酸をAlaに置換する改変などが好ましい。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。これらの改変の好ましい例として、表2～17、表24、25に記載の改変などが挙げられる。これらのポリペプチドは、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合する特徴を有する点において有用である。

[0035] 本発明のポリペプチドが有する別の好ましい性質として、マウスFc γ RIIIに対して弱く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のような性質を有することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIIに対するKD値が1μM以上であること、あるいは
- ・マウスFc γ RIIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱していること。

[0036] 本発明のポリペプチドのマウスFc γ RIIIに対するKD値は、1μM以上であり、好ましくは1.2μM以上、1.5μM以上、2μM以上であり、さらに好ましくは2.5μM以上、3μM以上、4μM以上、5μM以上である。また、本発明のポリペプチドのマウスFc γ RIIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱しており、好ましくは0.20倍以下、0.18倍以下、0.16倍以下、0.14倍以下に減弱しており、さらに好ましくは0.12倍以下、0.10倍以下、0.08倍以下、0.06倍以下に減弱している。

[0037] また、後述のように、KD値の代りに結合量を指標に用いることもできる。すなわち、本明細書においては、マウスFc γ RIIに対する結合活性をマウスFc γ RIIに対する結合量と読み替えてよく、マウスFc γ RIIIに対する結合活性をマウスFc γ RIIIに対する結合量と読み替てもよい。

[0038] 上記のような性質を付与することのできるアミノ酸改変として、例えば、E

Uナンバリング230番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング237番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸の改変などが挙げられる。これらのアミノ酸改変は1箇所であってもよく、また2箇所以上であってもよい。

[0039] さらに好ましいアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸をGlu、Ile、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸をAla、Asp、Asn、Pro、またはThrに置換する改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸をAla、Lys、Asn、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング237番目のアミノ酸をGluに置換する改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸をAspまたはGluに置換する改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAsp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸をAsp、GluまたはThrに置換する改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸をMetに置換する改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸をHisに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変の好ましい例として、表18～23、表26、27に記載の改変などが挙げられる。

[0040] 本発明には、マウスFc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に特定のアミノ酸改変を含むポリペプチドが含まれる。そのようなアミノ酸改変としては、EUナンバリング230番目のアミノ酸をGlu、Ile、またはGlnに置換する改変、231番目のアミノ酸をAla、Asp、Asn、Pro、またはThrに置換する改変、232番目のアミノ酸をAla、Lys、Asn、またはTyrに置換する改変、237番目のアミノ酸をGluに置換する改変、238番目のアミノ酸をAspまたはGluに置換する改変、239番目のアミノ酸をPhe、Lys、Leu、Asn、Trp、またはTyrに置換する改変、241番目のアミノ酸をAsp、GluまたはThrに置換する改変、266番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、267番目のアミノ酸をMetに置換する改

変、298番目のアミノ酸をHisに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。

[0041] さらに、これらのアミノ酸改変に加えて、別のアミノ酸改変を含んでいてもよい。そのようなアミノ酸改変としては、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAspまたはGluに置換する改変などが好ましい。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。これらの改変の好ましい例として、表18～23、表26、27に記載の改変などが挙げられる。これらのポリペプチドは、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合する特徴を有する点において有用である。

[0042] 本発明のポリペプチドが有する別の好ましい性質として、マウスFc γ RIIに対しては親ポリペプチドと同等かそれ以上の強さで結合し、かつマウスFc γ RIIIに対しては親ポリペプチドと比較して弱く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のような性質を有することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIに対するKD値が400nM以下であり、かつマウスFc γ RIIIに対するKD値が1μM以上であること、あるいは
- ・マウスFc γ RIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.5倍以上であり、かつマウスFc γ RIIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.25倍以下であること。

[0043] 本発明のポリペプチドのマウスFc γ RIIに対するKD値は、400nM以下であり、好ましくは360nM以下、320nM以下、280nM以下であり、さらに好ましくは250nM以下、200nM以下、150nM以下、100nM以下であり、かつマウスFc γ RIIIに対するKD値は、1μM以上であり、好ましくは1.2μM以上、1.5μM以上、2μM以上であり、さらに好ましくは2.5μM以上、3μM以上、4μM以上、5μM以上である。また、本発明のポリペプチドのマウスFc γ RIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.5倍以上であり、好ましくは0.6倍以上、0.75倍以上、1.0倍以上であり、さらに好ましくは1.5倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上であり、かつマウスFc γ RIIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.25倍以下であり、好ましくは0.20倍以下、0.18倍以下、0.16倍以下、0.14倍以下であ

り、さらに好ましくは0.12倍以下、0.10倍以下、0.08倍以下、0.06倍以下である。

また、後述のように、KD値の代りに結合量を指標に用いることもできる。すなわち、本明細書においては、マウスFc γ RIIに対する結合活性をマウスFc γ RIIに対する結合量と読み替えてよく、マウスFc γ RIIIに対する結合活性をマウスFc γ RIIIに対する結合量と読み替てもよい。

[0044] 本発明におけるポリペプチドとは、複数のアミノ酸を有するペプチド、あるいはタンパク質を指す。それらは生物由来の配列からなるポリペプチドであってもよいし、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。

[0045] Fc γ 受容体（本明細書ではFc γ レセプター、Fc γ R、Fc γ gRと記載することがある）とは、IgGサブクラスのモノクローナル抗体のFc領域に結合し得る受容体をいい、実質的にFc γ 受容体遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合し得る受容体をいい、このファミリーには、アイソフォームFc γ RIa、Fc γ RIbおよびFc γ RIcを含むFc γ RI (CD64)；アイソフォームFc γ RIIa (アロタイプH131 (H型) およびR131 (R型) を含む)、Fc γ RIIb (Fc γ RIIb-1およびFc γ RIIb-2を含む) およびFc γ RIIcを含むFc γ RII (CD32)；およびアイソフォームFc γ RIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFc γ RIIIb (アロタイプFc γ RIIIb-NA1およびFc γ RIIIb-NA2を含む) を含むFc γ RIII (CD16)、並びにいかなる未発見のヒトFc γ R類またはFc γ Rアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトFc γ 受容体の好適な例としてはヒトFc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIB (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16)、Fc γ RIIIB (CD16)が挙げられる。マウスFc γ Rとは、マウスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3モノクローナル抗体のFc領域に結合し得る受容体をいい、実質的にFc γ 受容体遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する

。マウスFc γ R類には、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16) およびFc γ RIII-2 (CD16-2、またはFc γ IV)、並びにいかなる未発見のマウスFc γ R類またはFc γ Rアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。マウスFc γ 受容体の好適な例としてはマウスFc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16)、Fc γ RIII-2 (CD16-2、またはFc γ IV) が挙げられる。Fc γ Rは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル由来のものが含まれるが、これらに限定されず、いかなる生物由来でもよい。

- [0046] ヒトFc γ RIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：10 (NM_000566.3) 及び11 (NP_000557.1) に、
ヒトFc γ RIIAのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：12 (BC020823.1) 及び13 (AAH20823.1) に、
ヒトFc γ RIIBのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：14 (BC146678.1) 及び15 (AAI46679.1) に、
ヒトFc γ RIIIAのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：16 (BC033678.1) 及び17 (AAH33678.1) に、及び
ヒトFc γ RIIIBのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：18 (BC128562.1) 及び19 (AAI28563.1) に記載されている（カッコ内はRefSeq登録番号を示す）。
ヒトFc γ RIIaには、Fc γ RIIaの131番目のアミノ酸がヒスチジン (H型) あるいはアルギニン (R型) に置換された2種類の遺伝子多型が存在する (J. Exp. Med., 172, 19-25, 1990)。

- [0047] ヒトFc γ RIIbにはスプライシングバリエントとしてFc γ RIIb1とFc γ RIIb2とが報告されている。また、それ以外にもFc γ RIIb3というスプライシングバリエントも報告されている (J. Exp. Med., 1989, 170: 1369)。ヒトFc γ RIIbにはこれらに加えて、NCBIに登録されているNP_001002273.1、NP_001002274.1、NP_001002275.1、NP_001177757.1、NP_003992.3のスプライシングバリエントを全て含む。また、ヒトFc γ RIIbには既存の報告されたあらゆる遺伝

子多型を含み、Fc γ RIIb (Arthritis Rheum, 2003, 48: 3242-52, Hum Mol Genet, 2005, 14: 2881-92, Arthritis Rheum. 2002 May;46(5):1242-54.) も含まれ、また今後報告されるあらゆる遺伝子多型も含まれる。

- [0048] マウスFc γ RIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：33 (NM_010186.5) 及び20 (NP_034316.1) に、
マウスFc γ RIIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：34 (NM_010187.2) 及び21 (NP_034317.1) に、
マウスFc γ RIIIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：35 (NM_010188.5) 及び22 (NP_034318.2) に、及び
マウスFc γ RIVのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：36 (NM_144559.2) 及び23 (NP_653142.2) にそれぞれ記載されている（カッコ内はNCBI Reference Sequence登録番号を示す）。
- [0049] マウスFc γ RIIにはFc γ RIIb1とFc γ RIIb2のスプライシングバリエントが報告されており、それぞれGenBank accession NoはM16367、X04648である。その他のスプライシングバリエントがJ. Immunol, 1996, 157: 189やJ. Immunol, 1996, 157: 4707に報告されており、これらもマウスFc γ RIIに含まれる。
マウスFc γ RIIには既存の報告されたあらゆる遺伝子多型を含み、また今後報告されるあらゆる遺伝子多型も含まれる。
- [0050] 後述の実施例にも示されている通り、マウスFc γ RIIと最も配列同一性の高いマウスFc γ RはマウスFc γ RIIIであり（細胞外領域の配列同一性93%）、また、マウスIgG1は4種類のマウスFc γ Rのうち、マウスFc γ RI、Fc γ RIVには結合せず、マウスFc γ RII、Fc γ RIIIにのみ結合を示す（Science, 310, 1510-1512, 2005）ことなどからすると、マウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体としては、天然型IgGのFc領域に比べて、Fc γ RIIに対する結合活性がより高く、Fc γ RIIIに対する結合活性がより低い性質を有することが望ましい。本明細書において、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体とは、当該Fc領域の〔マウスFc γ RIIIに対するKD値〕を〔マウスFc γ RIIに対するKD値〕で割った値が、天然型マウスIgGのFc領

域の〔マウスFc γ RIIIに対するKD値〕を〔マウスFc γ RIIに対するKD値〕で割った値より大きいFc領域を意味する。

- [0051] 天然型IgGとは天然に見出されるIgGと同一のアミノ酸配列を包含し、免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。例えば天然型マウスIgGとは天然型マウスIgG1、天然型マウスIgG2a、天然型マウスIgG2b、天然型マウスIgG3などを意味する。天然型ヒトIgGとは天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3、天然型ヒトIgG4などを意味する。天然型IgGにはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。
- [0052] 天然型IgGの重鎖定常領域とは、天然に見出されるIgGを起源とする重鎖定常領域と同一のアミノ酸配列を包含する重鎖定常領域を意味する。例えば天然型マウスIgGを起源とする重鎖定常領域とは、天然型マウスIgG1を起源とする重鎖定常領域、天然型マウスIgG2aを起源とする重鎖定常領域、天然型マウスIgG2bを起源とする重鎖定常領域、天然型マウスIgG3を起源とする重鎖定常領域を意味する。天然型ヒトIgGを起源とする重鎖定常領域とは、天然型ヒトIgG1を起源とする重鎖定常領域、天然型ヒトIgG2を起源とする重鎖定常領域、天然型ヒトIgG3を起源とする重鎖定常領域、天然型ヒトIgG4を起源とする重鎖定常領域を意味する。天然型IgGの重鎖定常領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。天然型マウスIgGの重鎖定常領域は図11-1～図11-4（配列番号：24～27）に、天然型ヒトIgGの重鎖定常領域は図12（配列番号：28～31）に示されている。天然型IgGの重鎖定常領域には既存の報告されたあらゆる遺伝子多型、および今後報告されるあらゆる遺伝子多型も含まれる。例えば、天然型マウスIgG1の重鎖定常領域としては、配列番号：24に記載のアミノ酸配列からなるものが知られているが、GenBank accession No. J00453やJ35252などの遺伝子多型も全て天然型マウスIgG1に含まれる。本発明において改変が加えられる主要な位置のアミノ酸残基は、これらの遺伝子多型においても全て共通していることから、本発明はこれらの遺伝子多型に対しても有効である。

- [0053] Fc領域とは、抗体分子中の、ヒンジ部若しくはその一部、CH2、CH3ドメインからなる領域のことをいう。IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリング（本明細書ではEU INDEXとも呼ばれる）（図11-1～図11-4、図12参照）で、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。
- [0054] 天然型IgGのFc領域とは、天然に見出されるIgGを起源とするFc領域と同一のアミノ酸配列を包含するFc領域を意味する。例えば天然型マウスIgGを起源とするFc領域とは、天然型マウスIgG1を起源とするFc領域、天然型マウスIgG2aを起源とするFc領域、天然型マウスIgG2bを起源とするFc領域、天然型マウスIgG3を起源とするFc領域を意味する。天然型ヒトIgGを起源とするFc領域とは、天然型ヒトIgG1を起源とするFc領域、天然型ヒトIgG2を起源とするFc領域、天然型ヒトIgG3を起源とするFc領域、天然型ヒトIgG4を起源とするFc領域を意味する。天然型IgGのFc領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。天然型マウスIgGのFc領域は図11-1～図11-4（配列番号：24～27）中に含まれる一部として、天然型ヒトIgGのFc領域は図12（配列番号：28～31）中に含まれる一部として示されている。
- [0055] Fc領域は、IgGモノクローナル抗体等をペプシン等の蛋白質分解酵素にて部分消化した後に、プロテインAあるいはプロテインGカラムに吸着された画分を再溶出することによって好適に取得され得る。かかる蛋白分解酵素としてはpH等の酵素の反応条件を適切に設定することにより制限的にFabやF(ab')2を生じるように全長抗体を消化し得るものであれば特段の限定はされず、例えば、ペプシンやパパイン等が例示できる。
- [0056] 本明細書で「親ポリペプチド」とは、本発明のポリペプチドの作製の基礎となるポリペプチドを意味する。すなわち、Fc領域を含むポリペプチドであって、該Fc領域にアミノ酸改変が加えられる前のポリペプチドを意味する。本発明における好ましい親ポリペプチドの例は、抗体（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）、特にIgGのFc領域を含むポリペプチドであり、さらに好ましくはマウスまたはヒトIgGのFc領域を含むポリペプチドであり、特に好ましくは、マ

ウスIgG1のFc領域を含むポリペプチドである。また、親ポリペプチドは、天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドであってもよく、あるいは天然型IgGのFc領域に本発明のアミノ酸改変以外の改変が加えられたFc変異体を含むポリペプチドであってもよい。

[0057] 本発明のFc領域は、抗体（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）、特にIgGのFc領域であれば限定されないが、好ましくはマウスIgG（IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3）またはヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のFc領域であり、さらに好ましくはマウスIgG1のFc領域である。マウスおよびヒトIgGのFc領域のアミノ酸配列は図11-1～図11-4（配列番号：24～27）および図12（配列番号：28～31）に示されているように公知である。

[0058] 本発明のポリペプチドは、Fc領域を含むものであれば特に限定されないが、好ましくは抗原結合領域（可変領域、Fab、F(ab')2、Fv、CDRなど）およびFc領域を含むものである。特に好ましくは抗体（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）である。抗体の好ましい例としてIgG、特にマウスIgG（IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3）またはヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）を挙げることができる。さらに好ましくはマウスIgG1である。マウスおよびヒトIgGの重鎖定常領域のアミノ酸配列は図11-1～図11-4（配列番号：24～27）および図12（配列番号：28～31）に示されているように公知である。

[0059] 本発明のポリペプチドとして、他に好ましいのはFc融合タンパク質である。融合されるタンパク質としては、生理活性ペプチド、接着分子、リガンド／受容体、酵素等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。具体的には、TNFR、IL1R、VEGFR、CTLA4等の受容体細胞外領域（Nat Med 2003, 9 (1), 47-52、BioDrugs 2006, 20(3), 151-60）、scFv（W02005/037989）、単ドメイン抗体（W02004/058821, W02003/002609）、DARPins（W02002/020565）、Affibody（W01995/001937）、Avimer（W02004/044011, W02005/040229）、Adnectin（W02002/032925）等の抗体様分子（Current Opinion in Biotechnology 2006, 17, 653-658、Current Opinion in Biotechnology 2007, 18, 1-10、Current Opinion in Structural Biology 1997, 7, 463-469、Protein

Science 2006, 15, 14-27)、アセチルコリン受容体、デスマグレイン1、デスマグレイン3、double stranded-DNA、histidine-tRNA ligase、リボヌクレオタンパク質、snRNPコアタンパク質、Ro/SS-A、La/SS-B、centromere、Ri、トポイソメラーゼ-1、ヒストン、ヌクレオポリン62、Sp100核抗原、ヌクレオポリン210kDa、ガングリオシドGQ1B、ガングリオシド GD3、ガングリオシド GM1、アクチン、トロンビン、リン脂質、好中球細胞質抗原、好中球核周囲抗原、細胞内酵素、平滑筋細胞膜抗原、ミトコンドリア、muscle-specific kinase(MUSK)、voltage-gated calcium channel (P/Q-type)、ヨウ化物ペルオキシダーゼ(microsomal)、TSH受容体、Hu、小脳プルキンエ細胞、アミノフィリン、voltage-gated potassium channel (VGKC)、基底核、N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD65)、アンフイフィシン、aquaporin-4等の自己抗体によって認識される自己抗原等が挙げられる。本発明のポリペプチドは、一般的な抗体のように、一種類の標的分子あるいはエピトープに結合するものであってもよいし、多重特異性抗体のように、複数種類の標的分子あるいはエピトープに結合するものであってもよい。

- [0060] 本発明のポリペプチドに、FcRnに対する結合活性を向上させるアミノ酸置換 (J Immunol 2006 Jan 1; 176(1), 346-356、J Biol Chem 2006 Aug 18; 281(33), 23514-23524、Int Immunol 2006 Dec; 18(12), 1759-1769、Nat Biotechnol 2010 Feb; 28(2), 157-159、W02006/019447、W02006/053301、W02009/086320) や、抗体のヘテロジエニティーや安定性を向上させるためのアミノ酸置換 (W02009/041613) を加えてもよい。あるいは、本発明のポリペプチドに、抗原の消失を促進させるためのアミノ酸置換 (W02011/122011、PCT/JP 2011/072550) や、複数分子の抗原に繰り返し結合させるためのアミノ酸置換 (W02009/125825、PCT/JP2011/077619) を加えてもよい。
- [0061] 本発明におけるアミノ酸改変の種類は、例えばアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入、修飾のいずれか、またはそれらの組み合わせであってもよいが、好みしくはアミノ酸の置換である。

- [0062] 本発明における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、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、抗体変異体、抗体断片、多特異性抗体（多重特異性抗体）（例えば、二特異性抗体（二重特異性抗体））、キメラ抗体、ヒト化抗体等、如何なる抗体も含まれる。
- [0063] 本発明の抗体は、抗原の種類や由来となる動物などは限定されず、いかなる抗体でもよい。抗体の由来としては、特に限定されないが、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、サル抗体などを挙げることができる。本発明の抗体として、好ましくはマウスまたはヒトの抗体であり、さらに好ましくはマウスの抗体である。
- [0064] 抗体を作製する方法は当業者によく知られているが、例えばモノクローナル抗体の場合ハイブリドーマ法 (Kohler and Milstein, Nature 256, 495 (1975))、組換え方法（米国特許第4,816,567号）により製造してもよい。また、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい (Clackson et al, Nature 352, 624-628 (1991) ; Marks et al, J Mol Biol 222, 581-597 (1991))。
- [0065] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るために一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。
- [0066] 3つのCDRと4つのFRが連結された抗体可変領域をコードするDNAとヒト抗体定常領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト化抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に產生される（欧州特許公開EP 239400、国際公開W01996/002576参照）。
- [0067] 必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように

FRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。

- [0068] ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開W01993/012227、W01992/003918、W01994/002602、W01994/025585、W01996/034096、W01996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。
- [0069] さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該可変領域配列を所望のヒト抗体定常領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開W01992/001047、W01992/020791、W01993/006213、W01993/011236、W01993/019172、W01995/001438、W01995/015388参照）。
- [0070] 本発明の抗体を構成する可変領域は、任意の抗原を認識する可変領域であることが出来る。
- [0071] 本明細書において抗原は特に限定されず、どのような抗原でもよい。抗原の例としては、例えば、リガンド（サイトカイン、ケモカインなど）、受容体、癌抗原、MHC抗原、分化抗原、免疫グロブリンおよび免疫グロブリンを一部に含む免疫複合体が好適に挙げられる。
- [0072] サイトカインの例としては、インターロイキン1～18、コロニー刺激因子（G-CSF、M-CSF、GM-CSFなど）、インターフェロン（IFN

- α 、IFN- β 、IFN- γ など)、成長因子(EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、TGF、HGFなど)、腫瘍壞死因子(TNF- α 、TNF- β)、リンホトキシン、エリスロポエチン、レプチン、SCF、TPO、MCAF、BMPを挙げることができる。

[0073] ケモカインの例としては、CCL1～CCL28などのCCケモカイン、CXCL1～CXCL17などのCXCケモカイン、XCL1～XCL2などのCケモカイン、CX3CL1などのCX3Cケモカインを挙げができる。

[0074] 受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては、多数の文献、例えば、Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ ed. New Comprehensive Biochemistry Vol 18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV、Patthy (Cell (1990) 61(1), 13-14)、Ullrichら (Cell (1990) 61(2), 203-212)、Massague (eにはアキュート・アクセント記号が付く) (Cell (1992) 69(6), 1067-1070)、Miyajimaら (Annu Rev Immunol (1992) 10, 295-331)、Tagaら (FASEB J (1992) 6, 3387-3396)、Fantlら (Annu Rev Biochem (1993), 62, 453-481)、Smithら (Cell (1994) 76(6), 959-962)、Flower DR (Biochim Biophys Acta (1999) 1422(3), 207-234) 等に記載されている。

[0075] 上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、ヒト又はマウスエリスロポエチン(EPO)受容体(Blood (1990) 76(1), 31-35、Cell (1989) 57(2), 277-285)、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体(Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87(22), 8702-8706、mG-CSFR、

Cell (1990) 61(2), 341-350)、ヒト又はマウストロンボポエチン (TPO) 受容体 (Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89(12), 5640-5644、EMBO J (1993) 12(7), 2645-53)、ヒト又はマウスインスリン受容体 (Nature (1985) 313(6 005), 756-761)、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体 (Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91(2), 459-463)、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体 (Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85(10), 3435-3439)、ヒト又はマウスインターフェロン (IFN) - α 、 β 受容体 (Cell (1990) 60(2), 225-234及びCell (1994) 77(3), 391-400)、ヒト又はマウスレプチニン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン (GH) 受容体、ヒト又はマウスインターロイキン (IL) -10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子 (IGF) -I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子 (LIF) 受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体等が好適に例示される。

[0076] 癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌抗原であり、癌糖鎖抗原とも呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、上記の受容体としてGPIアンカー型受容体ファミリーに属し、肝癌を初めとする幾つかの癌において発現しているGPC3 (Int J Cancer (2003) 103 (4), 455-65)、肺癌を初めとする複数の癌で発現するEpCAM (Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86(1), 27-31)、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA-1 (SLX) 等が好適に挙げられる。

[0077] MHC抗原は、主にMHC class I抗原とMHC class II抗原に分類され、MHC class I抗原には、HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G、-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR、-DQ、-DPが含まれる。

[0078] 分化抗原には、CD1、CD2、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15s、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD23、CD25、CD28、CD29、CD30、CD32、CD33、CD34、CD35、CD38、CD40、CD41a、CD41b、CD42a、CD42b、CD43、CD44、CD45、CD45R0、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD61、CD62E

、CD62L、CD62P、CD64、CD69、CD71、CD73、CD95、CD102、CD106、CD122、CD126、CDw130が含まれ得る。

[0079] 免疫グロブリンにはIgA、IgM、IgD、IgG、IgEが含まれる。また免疫複合体は少なくとも免疫グロブリンのいずれかの成分を含む。

その他の抗原としては下記のような分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ- $\text{\textit{V}}$ /ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、AxL、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子 (BlyS) 、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、BcL、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン (Osteogenin) 、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、BMP-6 Vgr-1、BMP-7 (OP-1) 、BMP-8 (BMP-8a、OP-2) 、BMPR、BMPR-IA (ALK-3) 、BMPR-IB (ALK-6) 、BRK-2、RPK-1、BMPR-II (BRK-3) 、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3 (C3) 、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原 (CEA) 、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10

、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タントンパク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子 (Decay accelerating factor)、des (1-3)-IGF-I (脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EP0、ERCC、E-セレクチン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIC、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-capまたはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (E

rbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン (INF)-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリナルファ2、インテグリナルファ3、インテグリナルファ4、インテグリナルファ4/ベータ1、インテグリナルファ4/ベータ7、インテグリナルファ5 (アルファV)、インテグリナルファ5/ベータ1、インテグリナルファ5/ベータ3、インテグリナルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP (TGF-1)、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイス-Y抗原、ルイス-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン (Muc1)、MUC18、ミュラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン

、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニューラルツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PLGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質-72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI（ALK-5）、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺CK-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A（TRAIL R1 Apo-2、DR4）、TNFRSF10B（TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B）、TNFRSF10C（TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF12（TWEAK R FN14）、TNFRSF13B（TACI）、TNFRSF13C（BAFF R）、TNFRSF14（HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2）、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF17（BCMA）、TNFRSF18（GITR AITR）、TNFRSF19（TROY TAJ、TRADE）、TNFRSF19L（RELT）、TNFRSF1A（TNF RI CD120a、p55-60）、TNFRSF1B（TNF RII CD120b、p75-80）、TNFRSF26（TNF RH3）、TNFRSF3（LTbR TNF RIII、TNFC R）、TNFRSF4（OX40 ACT35、TXGP1 R）

)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANKリガンド 0DF、OPGリガンド)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITRリガンド AITRリガンド、TL6)、TNFSF1A (TNF-a コネクチン (Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40リガンド gp34、TXGP1)、TNFSF5 (CD40リガンド CD154、gp39、HIGHM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6 (Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンド CD70)、TNFSF8 (CD30リガンド CD153)、TNFSF9 (4-1BBリガンド CD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TRP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEFGR-1 (flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B／13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、A β 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、f

actor H, properdin, sclerostin, fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 組織因子, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, トロンボモデュリン、TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2, GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pならびにホルモンおよび成長因子のための受容体が例示され得る。

[0080] 可変領域を構成するアミノ酸配列は、その抗原結合活性が維持される限り、1または複数のアミノ酸残基の改変が許容される。可変領域のアミノ酸配列を改変する場合、改変される部位や改変の種類、改変されるアミノ酸の数は特に限定されない。例えば、CDRおよび／またはFRに存在するアミノ酸を適宜改変することができる。可変領域のアミノ酸を改変する場合、特に限定されないが、結合活性が維持されていることが好ましく、例えば、改変前と比較して50%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは100%以上の結合活性を有していることが好ましい。又、アミノ酸改変により結合活性が上昇していてもよく、例えば結合活性が改変前と比較して2倍、5倍、10倍等になっていてもよい。本発明の抗体において、アミノ酸配列の改変とは、アミノ酸残基の置換、欠失、付加、挿入、および修飾の少なくとも1つであることができる。

[0081] 例えば、可変領域のN末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である。したがって、本発明の抗体は、その重鎖のN末端がグルタミンの場合には、それがピログルタミン酸に修飾された可変領域を含む。

[0082] 本発明の抗体の可変領域は、任意の配列であってよく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体、および、これらの非ヒト抗体をヒト化したヒト化抗体、および、ヒト抗体など、どのような由来の抗体の可変領域でもよい。「ヒト化抗体」とは、再構成(reshaped)ヒト抗体とも

称される、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体のCDRへ移植したものである。CDRを同定するための方法は公知である（Kabat et al, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md; Chothia et al, Nature (1989) 342, 877）。

また、その一般的な遺伝子組換え手法も公知である（欧洲特許出願公開番号EP125023号公報、W096/02576号公報参照）。また、これらの抗体の可変領域に対して、抗原への結合、薬物動態、安定性、免疫原性を改善するために、様々なアミノ酸置換を導入したものであってもよい。本発明の抗体の可変領域は、pH依存的に抗原に結合することで、抗原に対して繰り返し結合することができてもよい（W02009/125825）。

[0083] 抗体の軽鎖定常領域にはκ鎖とλ鎖タイプの定常領域が存在しているが、いずれの軽鎖定常領域であってもよい。さらに、本発明において軽鎖定常領域は、アミノ酸の置換、欠失、付加、挿入および／または修飾などの改変が行われた軽鎖定常領域であってもよい。

[0084] 抗体の重鎖定常領域には、例えばIgA、IgD、IgE、IgG、IgMの定常領域が存在している。本発明においては、例えばIgGの重鎖定常領域、特にマウスまたはヒトIgGの重鎖定常領域を用いることができ、好ましくはマウスIgG1の重鎖定常領域である。

[0085] また本発明の抗体には、抗体の修飾物も含まれる。抗体の修飾物の例としては、例えば、ポリエチレンギリコール（PEG）や細胞障害性物質等の各種分子と結合させた抗体を挙げることができる。このような抗体修飾物は、本発明の抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

[0086] さらに、本発明の抗体は多重特異性抗体（multispecific antibody）、特に二重特異性抗体（bispecific antibody）であってもよい。多重特異性抗体とは、複数の異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいうが、当該エピトープは異なる抗原分子内に存在していてもよ

いし、同一の抗原分子内に存在していてもよい。

- [0087] 本発明のポリペプチドは当業者に公知の方法により製造することができる。例えば、抗体は以下の方法で作製することができるが、これに限定されるものではない。
- [0088] 抗体の重鎖をコードするDNAであって、Fc領域中の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸に改変された重鎖をコードするDNA、および抗体の軽鎖をコードするDNAを発現させる。Fc領域中の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸に改変された重鎖をコードするDNAは、例えば、天然型の重鎖をコードするDNAのFc領域を取得し、該Fc領域中の特定のアミノ酸をコードするコドンが他のアミノ酸をコードするコドンになるよう適宜改変を行なうことによって得ることが出来る。
- [0089] また、あらかじめ、天然型重鎖のFc領域中の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸に改変された重鎖をコードするDNAを設計し、該DNAを化学的に合成することによって、Fc領域中の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸に改変された重鎖をコードするDNAを得ることも可能である。アミノ酸の改変される部位や改変の種類、改変されるアミノ酸の数は、特に限定されるものではない。改変の種類は、置換、欠失、付加、挿入、修飾のいずれか、又はそれらの組み合わせであってもよい。
- [0090] また、Fc領域中において1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸に改変された重鎖をコードするDNAは、部分DNAに分けて製造することができる。部分DNAの組み合わせとしては、例えば、可変領域をコードするDNAと定常領域をコードするDNA、あるいはFab領域をコードするDNAとFc領域をコードするDNAなどが挙げられるが、これらの組み合わせに限定されるものではない。軽鎖をコードするDNAもまた、同様に部分DNAに分けて製造することができる。
- [0091] 上記DNAを発現させる方法としては、以下の方法が挙げられる。例えば、重鎖可変領域をコードするDNAを、重鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込み重鎖発現ベクターを構築する。同様に、軽鎖可変領域をコードするDNAを、軽鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組

み込み軽鎖発現ベクターを構築する。これらの重鎖、軽鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込むことも出来る。

- [0092] 抗体重鎖および軽鎖をコードするDNAを発現ベクターへ組み込む際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。
- [0093] ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などを用いることができる。
- [0094] 本発明のポリペプチドを生産する目的でベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546, FASEB J (1992) 6, 2422-2427、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (Pharmacia社製)、「QIAexpress system」 (QIAGEN社製)、pEGFP、またはpET (この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。
- [0095] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S P et al, J Bacteriol (1987) 169, 4397、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えばリン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (Boehringer Mannh

eim製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法など当業者に公知の手法を用いて行うことができる。

[0096] 本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、大腸菌由来の発現ベクターの他にも、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3 (Invitrogen社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 1990, 18(17), 5322、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、pEF、pCDM8) 、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」 (GIBCO BRL社製) 、pBacPAK8) 、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2) 、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw) 、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo) 、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」 (Invitrogen社製) 、pNV11、SP-Q01) 、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

[0097] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) 、MMTV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res (1990) 18, 5322、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) 、CAGプロモーター (Gene (1991) 108, 193、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) 、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、形質転換細胞を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0098] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレ

キセート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。遺伝子コピー数増幅のための発現ベクターは、選択マーカーとして、他にもアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。また、宿主細胞としては以下の細胞を用いることができる。真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

(1) 哺乳類細胞、: CHO (Chinese hamster ovary cell line) 、 COS (Monkey kidney cell line) 、 ミエローマ (Sp2/0、 NS0等) 、 BHK (baby hamster kidney cell line) 、 Hela、 Vero、 HEK293 (human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA) 、 Freestyle 293、 PER.C6 cell (human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5 (Ad5) E1A and E1B genes) など (Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

(2) 両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

(3) 昆虫細胞：sf9、 sf21、 Tn5など

あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバコ (Nicotiana tabacum) などのニコティアナ (Nicotiana) 属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。—酵母：サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) などのサッカロミセス (Saccharomyces) 属、メタノール資化酵母 (Pichia pastor

is) などのPichia属

－糸状菌：アスペスギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）などのアスペルギルス（*Aspergillus*）属

[0099] 発現した抗体の回収は、例えば、形質転換した細胞を培養した後、細胞外培養液又は細胞内抽出液を回収し、そこから抗体を分離、精製することによって行なうことが出来る。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫安分画、塩析、限外濾過、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて行なうことができる。

[0100] アミノ酸の改変は、当分野において公知の種々の方法により行なうことができる。これらの方法には、次のものに限定されるわけではないが、部位特異的変異誘導法 (Hashimoto-Gotoh T, Mizuno T, Ogasahara Y and Nakagawa M (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275, Zoller MJ, and Smith M (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol 100, 468-500, Kramer W, Drutsa V, Jansen HW, Kramer B, Pflugfelder M and Fritz HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. Methods Enzymol 154, 350-367, Kunkel TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci USA 82, 488-492)、PCR変異法、カセット変異法等の方法を好適な例として挙げることができる。

[0101] アミノ酸残基を置換する場合には、別のアミノ酸残基に置換することで、例えば次の(a)～(c)のような点について改変する事を目的とする。

(a) シート構造、若しくは、らせん構造の領域におけるポリペプチドの背骨構造；

- (b) 標的部位における電荷若しくは疎水性、または
- (c) 側鎖の大きさ。

[0102] アミノ酸残基は一般の側鎖の特性に基づいて以下のグループに分類される

- ：
- (1) 疎水性： ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性： Asp、Glu；
- (4) 塩基性： His、Lys、Arg；
- (5) 鎌の配向に影響する残基： Gly、Pro；及び
- (6) 芳香族性： Trp、Tyr、Phe。

[0103] これらの各グループ内でのアミノ酸残基の置換は保存的置換と呼ばれ、一方、他グループ間同士でのアミノ酸残基の置換は非保存的置換と呼ばれる。本発明における置換は、保存的置換であってもよく、非保存的置換であってもよく、また保存的置換と非保存的置換の組合せであってもよい。

[0104] 本発明のアミノ酸の修飾には、翻訳後修飾が含まれる。具体的な翻訳後修飾として、糖鎖の付加あるいは欠損を示すことができる。たとえば、IgG1重鎖定常領域において、EUナンバリングの297番目のアミノ酸残基は、糖鎖で修飾されたものであることができる。あるいは、Fc領域の糖鎖にシアル酸を付加したものであってもよい (MAbs 2010 Sep-Oct; 2(5), 519-27)。修飾される糖鎖構造は限定されない。一般的に、真核細胞で発現される抗体は、定常領域に糖鎖修飾を含む。

[0105] ここに示した真核細胞には、酵母や動物細胞が含まれる。たとえばCHO細胞やHEK293細胞は、抗体をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換するための代表的な動物細胞である。他方、当該位置に糖鎖修飾が無いものも本発明の定常領域に含まれる。定常領域が糖鎖で修飾されていない抗体は、抗体をコードする遺伝子を大腸菌などの原核細胞で発現させて得ることができる。

[0106] 本発明において、本発明のポリペプチドの各種Fc γ Rに対する結合活性は、

ELISAやFACS (fluorescence activated cell sorting) 、ALPHAスクリーン (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) 、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したBIACORE法等によって測定することができる。

[0107] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの產生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

[0108] 例えば、ドナービーズに天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドを結合し、アクセプタービーズにはFc γ 受容体を結合する。変異Fc領域を含む本発明のポリペプチドの非存在下では、天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドとFc γ 受容体は相互作用し、520–620 nmの発光シグナルを生ずるが、変異Fc領域を含む本発明のポリペプチドの存在下では、天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドとFc γ 受容体の相互作用は競合により阻害される。競合の結果表れる発光シグナルの減少を定量することによって相対的な結合活性が決定され得る。抗体などの本発明のポリペプチドをSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fc γ 受容体をGSTでタグ化する方法としては、Fc γ 受容体をコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子を発現可能なベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られた発光シグナルは、例えばGRAPHPAD PRISM (GraphPad社、San Diego) 等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合

(one-site competition) モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0109] 表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したBIACORE法は、以下のように説明される。相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは、上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、時間を横軸にとることで、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムからセンサーチップ表面に捕捉したリガンドに対するアナライトの結合量が求められる。また、センサーグラムのカーブから結合速度定数（ka）と解離速度定数（kd）が、当該定数の比から解離定数（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる（Proc Natl Acad Sci USA, 103(11), 4005-4010, 2006）。

[0110] 本発明のポリペプチドの各種Fc γ Rに対する結合活性は、例えば後述の実施例に示されるように、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したBIACORE法を用いて好適に測定することができる。具体的には、抗体などの本発明のポリペプチドを直接固定化あるいはProteinA、ProteinL、ProteinA/G、ProteinG、抗lambda鎖抗体、抗kappa鎖抗体、抗原ペプチド、抗原タンパク質等を介して固定化したセンサーチップに対して、各種Fc γ Rをアナライトとして相互作用させる。センサーグラムの解析結果から解離定数（KD）を算出し、その値が小さい場合、当該結合活性が高いと判断し、その値が大きい場合、当該結合活性が低いと判断することができる。あるいは、Fc γ Rを直接固定化あるいは抗タグ抗体等を介して固定化したセンサーチップに対して、評価したい抗

体などの本発明のポリペプチドをアナライトとして相互作用させる。センサーグラムの解析結果から解離定数 (KD) を算出し、その値が小さい場合、当該結合活性が高いと判断し、その値が大きい場合、当該結合活性が低いと判断することができる。

- [0111] また、KD値の代りに結合量によっても、本発明のポリペプチドの結合活性を測定することができる。ここで結合量とは、ポリペプチドに対してアナライトを相互作用させた前後で変化したセンサーグラムにおけるRU値の差を、センサーチップにポリペプチドを捕捉させた前後で変化したセンサーグラムにおけるRU値の差で割った値など、評価するポリペプチドの量を本質的に同量にしたときのアナライトの結合量を意味する。
- [0112] 具体的には、抗体などの本発明のポリペプチドを直接固定化あるいはProteinA、ProteinL、ProteinA/G、ProteinG、抗lambda鎖抗体、抗kappa鎖抗体、抗原ペプチド、抗原タンパク質等を介して固定化したセンサーチップに対して、各種Fc γ Rをアナライトとして相互作用させる。その際のセンサーグラム上のレゾナンスユニット (RU) 値の変化量を、センサーチップに抗体などの本発明のポリペプチドを固定化した際のレゾナンスユニット (RU) の変化量で割った値を算出し、その値が大きい場合、当該結合活性が高いと判断し、その値が小さい場合、当該結合活性が低いと判断することができる。あるいは、Fc γ Rを直接固定化あるいは抗タグ抗体等を介して固定化したセンサーチップに対して、評価したい抗体などの本発明のポリペプチドをアナライトとして相互作用させる。その際のセンサーグラム上のレゾナンスユニット (RU) 値の変化量を、センサーチップにFc γ Rを固定化した際のレゾナンスユニット (RU) の変化量で割った値を算出し、その値が大きい場合、当該結合活性が高いと判断し、その値が小さい場合、当該結合活性が低いと判断することができる。
- [0113] また、本発明は、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するようにFc領域を改変する方法に関する。
- [0114] 本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドを改変して、〔マウスFc γ RIIIに

に対するKD値]／[マウスFc γ RIIに対するKD値]の比を6以上にする方法であって、該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法を提供する。また、本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドを改変して、マウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性を親ポリペプチドより5倍以上向上させる方法であって、該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法を提供する。

[0115] 上記の方法の好ましい態様として、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

- ・Fc領域を含む親ポリペプチドをコードする核酸を取得する工程、
- ・該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸に改変が加えられるように、前記核酸を改変する工程、
- ・宿主細胞に前記改変された核酸を導入し、該核酸によってコードされるポリペプチドが発現するように該宿主細胞を培養する工程、
- ・前記宿主細胞の培養物から前記親ポリペプチドの変異体を回収する工程。

[0116] 上記の方法において、[マウスFc γ RIIIに対するKD値]／[マウスFc γ RIIに対するKD値]の比は、6以上になり、好ましくは10以上、15以上、20以上、25以上、30以上になり、さらに好ましくは35以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上になる。また、マウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性は、親ポリペプチドより5倍以上向上し、好ましくは10倍以上、15倍以上、20倍以上、25倍以上、30倍以上向上し、さらに好ましくは35倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上向上する。

[0117] 上記の方法により付与される好ましい性質の一つとして、マウスFc γ RIIに対して強く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のような性質を付与することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIに対するKD値を20nM以下にする、あるいは
- ・マウスFc γ RIIに対する結合活性を親ポリペプチドより10倍以上増強させる。

[0118] 上記の方法において、マウスFc γ RIIに対するKD値は、20nM以下になり、好ましくは10nM以下、4nM以下、2nM以下になり、さらに好ましくは1.5nM以下、1nM以下、0.7nM以下、0.5nM以下になる。また、マウスFc γ RIIに対する結合活性は親ポリペプチドより10倍以上増強し、好ましくは20倍以上、50倍以上、100倍以上増強し、さらに好ましくは150倍以上、200倍以上、300倍以上、400倍以上増強する。

[0119] 上記のような性質を付与することのできるアミノ酸改変として、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング240番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング266番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング268番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング271番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング295番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング296番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング324番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング326番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング327番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング330番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング331番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング333番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング334番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング335番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング337番目のアミノ酸の改変などが挙げられる。これらのアミノ酸改変は1箇所であってもよく、また2箇所以上であってもよい。

[0120] さらに好ましいアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸をAsp、Glu、Ile、Pro、Gln、またはValに置換する改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpに置換する改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Leu、Asn、Val、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸をGlu、Pro、またはGlnに置換する改変、EUナンバ

ング239番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング240番目のアミノ酸をGlu、His、Gln、またはTrpに置換する改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸をTrpまたはTyrに置換する改変、EUナンバリング266番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸をAlaまたはGluに置換する改変、EUナンバリング268番目のアミノ酸をAspに置換する改変、EUナンバリング271番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング295番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング296番目のアミノ酸をGlu、Asn、Thr、またはTrpに置換する改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸をLeuまたはMetに置換する改変、EUナンバリング324番目のアミノ酸をAsp、Leu、またはMetに置換する改変、EUナンバリング326番目のアミノ酸をAspに置換する改変、EUナンバリング327番目のアミノ酸をGlyに置換する改変、EUナンバリング330番目のアミノ酸をGly、Lys、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング331番目のアミノ酸をAsp、Phe、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング333番目のアミノ酸をAsn、Val、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング334番目のアミノ酸をArgに置換する改変、EUナンバリング335番目のアミノ酸をAsnまたはTyrに置換する改変、EUナンバリング337番目のアミノ酸をIle、Lys、またはTrpに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変の好ましい例として、表2～17、表24、25に記載の改変などが挙げられる。

[0121] 上記の方法により付与される別の好ましい性質として、マウスFc γ RIIIに対して弱く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のようない性質を付与することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIIに対するKD値を1μM以上にする、あるいは
- ・マウスFc γ RIIIに対する結合活性を親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱させる。

[0122] 上記の方法において、マウスFc γ RIIIに対するKD値は、1μM以上になり、

好ましくは $1.2\mu\text{M}$ 以上、 $1.5\mu\text{M}$ 以上、 $2\mu\text{M}$ 以上になり、さらに好ましくは $2.5\mu\text{M}$ 以上、 $3\mu\text{M}$ 以上、 $4\mu\text{M}$ 以下、 $5\mu\text{M}$ 以上になる。また、マウスFc γ RIIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱し、好ましくは0.20倍以下、0.18倍以下、0.16倍以下、0.14倍以下に減弱し、さらに好ましくは0.12倍以下、0.10倍以下、0.08倍以下、0.06倍以下に減弱する。

上記のような性質を付与することのできるアミノ酸改変として、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング237番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸の改変などが挙げられる。これらのアミノ酸改変は1箇所であってもよく、また2箇所以上であってもよい。

さらに好ましいアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸をGlu、Ile、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸をAla、Asp、Asn、Pro、またはThrに置換する改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸をAla、Lys、Asn、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング237番目のアミノ酸をGluに置換する改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸をAspまたはGluに置換する改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAsp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸をAsp、GluまたはThrに置換する改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸をMetに置換する改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸をHisに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変の好ましい例として、表18～23、表26、27に記載の改変などが挙げられる。

[0123] 上記の方法により付与される別の好ましい性質として、マウスFc γ RIIに対しては親ポリペプチドと同等かそれ以上の強さで結合し、かつマウスFc γ RII Iに対しては親ポリペプチドと比較して弱く結合する性質を挙げることができ

る。すなわち、以下のような性質を付与することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIに対するKD値を400nM以下にし、かつマウスFc γ RIIIに対するKD値を1 μ M以上にする、あるいは
- ・マウスFc γ RIIに対する結合活性を親ポリペプチドの0.5倍以上にし、かつマウスFc γ RIIIに対する結合活性を親ポリペプチドの0.25倍以下にする。

[0124] 上記の方法において、マウスFc γ RIIに対するKD値は、400nM以下になり、好ましくは360nM以下、320nM以下、280nM以下になり、さらに好ましくは250nM以下、200nM以下、150nM以下、100nM以下になり、かつマウスFc γ RIIIに対するKD値は、1 μ M以上になり、好ましくは1.2 μ M以上、1.5 μ M以上、2 μ M以上になり、さらに好ましくは2.5 μ M以上、3 μ M以上、4 μ M以上、5 μ M以上になる。また、マウスFc γ RIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.5倍以上になり、好ましくは0.6倍以上、0.75倍以上、1.0倍以上になり、さらに好ましくは1.5倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上になり、かつマウスFc γ RII Iに対する結合活性は親ポリペプチドの0.25倍以下になり、好ましくは0.20倍以下、0.18倍以下、0.16倍以下、0.14倍以下になり、さらに好ましくは0.12倍以下、0.10倍以下、0.08倍以下、0.06倍以下になる。

[0125] 上記の方法によって改変されてできたポリペプチドも本発明に含まれる。

[0126] また、本発明は、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を製造する方法に関する。

[0127] 本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、[マウスFc γ RIIIに対するKD値] / [マウスFc γ RIIに対するKD値] の比が6以上のポリペプチドを製造する方法であって、該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法を提供する。また、本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上したポリペプチドを製造する方法であって、該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法を提供する。

[0128] 上記の方法の好ましい態様として、例えば以下のようない工程を含んでいて

もよい；

- ・Fc領域を含む親ポリペプチドをコードする核酸を取得する工程、
- ・該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸に改変が加えられるように、前記核酸を改変する工程、
- ・宿主細胞に前記改変された核酸を導入し、該核酸によってコードされるポリペプチドが発現するように該宿主細胞を培養する工程、
- ・前記宿主細胞の培養物から前記親ポリペプチドの変異体を回収する工程。

[0129] 上記の方法において、〔マウスFc γ RIIIに対するKD値〕／〔マウスFc γ RIIに対するKD値〕の比は、6以上であり、好ましくは10以上、15以上、20以上、25以上、30以上であり、さらに好ましくは35以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上である。また、マウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性は、親ポリペプチドより5倍以上向上しており、好ましくは10倍以上、15倍以上、20倍以上、25倍以上、30倍以上向上しており、さらに好ましくは35倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上向上している。

[0130] 上記の方法により製造されるポリペプチドが有する好ましい性質の一つとして、マウスFc γ RIIに対して強く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のような性質を有することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIに対するKD値が20nM以下である、あるいは
- ・マウスFc γ RIIに対する結合活性が親ポリペプチドより10倍以上増強している。

[0131] 上記の方法において、マウスFc γ RIIに対するKD値は、20nM以下であり、好ましくは10nM以下、4nM以下、2nM以下であり、さらに好ましくは1.5nM以下、1nM以下、0.7nM以下、0.5nM以下である。また、マウスFc γ RIIに対する結合活性は親ポリペプチドより10倍以上増強しており、好ましくは20倍以上、50倍以上、100倍以上増強しており、さらに好ましくは150倍以上、200倍以上、300倍以上、400倍以上増強している。

[0132] 上記のような性質を付与することのできるアミノ酸改変として、例えば、E

Uナンバリング230番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング240番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング266番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング268番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング271番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング295番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング296番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング324番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング326番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング327番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング330番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング331番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング333番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング334番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング335番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング337番目のアミノ酸の改変などが挙げられる。これらのアミノ酸改変は1箇所であってもよく、また2箇所以上であってもよい。

[0133] さらに好ましいアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸をAsp、Glu、Ile、Pro、Gln、またはValに置換する改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpに置換する改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Leu、Asn、Val、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸をGlu、Pro、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング240番目のアミノ酸をGlu、His、Gln、またはTrpに置換する改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸をTrpまたはTyrに置換する改変、EUナンバリング266番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸をAlaまたはGluに置換する改変、EUナンバリング268番目のアミノ酸をAspに置換する改変、EUナンバリング271番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EU

ナンバリング295番目のアミノ酸をLeuに置換する改変、EUナンバリング296番目のアミノ酸をGlu、Asn、Thr、またはTrpに置換する改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸をLeuまたはMetに置換する改変、EUナンバリング324番目のアミノ酸をAsp、Leu、またはMetに置換する改変、EUナンバリング326番目のアミノ酸をAspに置換する改変、EUナンバリング327番目のアミノ酸をGlyに置換する改変、EUナンバリング330番目のアミノ酸をGly、Lys、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング331番目のアミノ酸をAsp、Phe、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング333番目のアミノ酸をAsn、Val、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング334番目のアミノ酸をArgに置換する改変、EUナンバリング335番目のアミノ酸をAsnまたはTyrに置換する改変、EUナンバリング337番目のアミノ酸をIle、Lys、またはTrpに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変の好ましい例として、表2～17、表24、25に記載の改変などが挙げられる。

[0134] 上記の方法により製造されるポリペプチドが有する別の好ましい性質として、マウスFc γ RIIIに対して弱く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のような性質を有することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIIに対するKD値が1μM以上である、あるいは
- ・マウスFc γ RIIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱している。

[0135] 上記の方法において、マウスFc γ RIIIに対するKD値は、1μM以上であり、好ましくは1.2μM以上、1.5μM以上、2μM以上であり、さらに好ましくは2.5μM以上、3μM以上、4μM以上、5μM以上である。また、マウスFc γ RIIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱しており、好ましくは0.20倍以下、0.18倍以下、0.16倍以下、0.14倍以下に減弱しており、さらに好ましくは0.12倍以下、0.10倍以下、0.08倍以下、0.06倍以下に減弱している。

[0136] 上記のような性質を付与することのできるアミノ酸改変として、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸

の改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング237番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸の改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸の改変などが挙げられる。これらのアミノ酸改変は1箇所であってもよく、また2箇所以上であってもよい。

[0137] さらに好ましいアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング230番目のアミノ酸をGlu、Ile、またはGlnに置換する改変、EUナンバリング231番目のアミノ酸をAla、Asp、Asn、Pro、またはThrに置換する改変、EUナンバリング232番目のアミノ酸をAla、Lys、Asn、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング237番目のアミノ酸をGluに置換する改変、EUナンバリング238番目のアミノ酸をAspまたはGluに置換する改変、EUナンバリング239番目のアミノ酸をAsp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Trp、またはTyrに置換する改変、EUナンバリング241番目のアミノ酸をAsp、GluまたはThrに置換する改変、EUナンバリング267番目のアミノ酸をMetに置換する改変、EUナンバリング298番目のアミノ酸をHisに置換する改変などが挙げられる。これらの改変は1箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変の好ましい例として、表18～23、表26、27に記載の改変などが挙げられる。

[0138] 上記の方法により製造されるポリペプチドが有する別の好ましい性質として、マウスFc γ RIIに対しては親ポリペプチドと同等かそれ以上の強さで結合し、かつマウスFc γ RIIIに対しては親ポリペプチドと比較して弱く結合する性質を挙げることができる。すなわち、以下のようない性質を有することが好ましい。

- ・マウスFc γ RIIに対するKD値が400nM以下であり、かつマウスFc γ RIIIに対するKD値が1μM以上である、あるいは
- ・マウスFc γ RIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.5倍以上であり、かつマウスFc γ RIIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.25倍以下である。

[0139] 上記の方法において、マウスFc γ RIIに対するKD値は、400nM以下であり、

好ましくは360nM以下、320nM以下、280nM以下であり、さらに好ましくは250nM以下、200nM以下、150nM以下、100nM以下であり、かつマウスFc γ RIIIに対するKD値は、1 μ M以上であり、好ましくは1.2 μ M以上、1.5 μ M以上、2 μ M以上であり、さらに好ましくは2.5 μ M以上、3 μ M以上、4 μ M以上、5 μ M以上である。また、マウスFc γ RIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.5倍以上であり、好ましくは0.6倍以上、0.75倍以上、1倍以上であり、さらに好ましくは1.5倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上であり、かつマウスFc γ RIIIに対する結合活性は親ポリペプチドの0.25倍以下であり、好ましくは0.20倍以下、0.18倍以下、0.16倍以下、0.14倍以下であり、さらに好ましくは0.12倍以下、0.10倍以下、0.08倍以下、0.06倍以下である。

- [0140] 上記の方法によって製造されたポリペプチドも本発明に含まれる。
- [0141] また、本発明のポリペプチドをコードする核酸も本発明に含まれる。本発明の該核酸はDNA、RNAなど、如何なる形態でもよい。
- [0142] さらに、本発明の核酸を含むベクターも本発明に含まれる。ベクターの種類はベクターが導入される宿主細胞に応じて当業者が適宜選択することができ、例えば上述のベクターなどを用いることができる。
- [0143] さらに、本発明のベクターにより形質転換された宿主細胞も本発明に含まれる。宿主細胞は当業者が適宜選択することができ、例えば上述の宿主細胞などを用いることができる。
- [0144] 本発明は、本発明のポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、本発明のポリペプチドに医薬的に許容し得る担体を組み合わせて、それらを公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、本発明のポリペプチドに、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などを適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。担体の例としては、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシ

ウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターーチ、無機塩類等を挙げることができる。これら製剤における有効成分の量は、指示された用量の範囲内で適宜設定することが可能である。

- [0145] 注射用の水溶液としては、例えばブドウ糖やD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等を含む等張液や生理食塩水が挙げられ、適當な溶解補助剤としてアルコール（エタノールやプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）や非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）やHCO-50等）と併用してもよい。
- [0146] 油性液としては、例えばゴマ油や大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジルやベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤（リン酸塩緩衝液や酢酸ナトリウム緩衝液等）や無痛化剤（塩酸プロカイン等）、安定剤（ベンジルアルコールやフェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は通常、適當なアンプルに充填される。
- [0147] また、本発明の医薬組成物の投与量や投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で、あるいは患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与方法としては、経口投与または非経口投与を選択することが可能であるが、好ましくは非経口投与である。非経口投与の例としては、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられ、さらに注射の例としては、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。これらの投与方法により、医薬組成物を全身または局部に投与することができる。
- [0148] また、本発明は、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いて、ヒトFc γ RIIaと比較して

ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける作用を予測する方法に関する。

[0149] 種交差性の違いから、ヒトFc γ RIIbに対して結合選択性を示すFc変異体であっても、マウスFc γ RIIに対しては結合選択性を示さない可能性が高い。そのため、当該Fc変異体を用いて、ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合する特徴を有する医薬品を開発しようとしても、マウスなどのモデル動物でその効果や安全性などを評価することは困難であった。本発明において見出されたマウスFc γ RIIに選択的に結合するFc変異体は、そのような状況を改善して、マウスにおける効果や安全性などの評価を可能にした点において、極めて有用である。後述の実施例に示すように、抗体などのFc領域を含むポリペプチドの血中濃度の推移には、マウスFc γ RII（ヒトではFc γ RIIb）以外のFc γ Rファミリーも関与していると考えられることから、ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合する特徴を有する医薬品の効果や安全性をマウスで正確に評価するためには、マウスFc γ RIIに対して選択的に結合する本発明のポリペプチドが必要不可欠である。

[0150] 本発明は、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の疾患の治療または予防効果を予測する方法であって、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを当該ヒト疾患のモデルマウスに投与してその治療または予防効果を評価する工程を含む方法を提供する。

[0151] すなわち、好ましい態様としては、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

- (a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、
- (b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および本発明のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、
- (c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに

投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが前記ヒト疾患の治療または予防に有効であると判断する工程。

[0152] さらに好ましい態様としては、上記の工程 (b) (c) に加えて (b') (c') を含み、かつ工程(d)が以下のような工程であってもよい；

(b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型 IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、

(d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが前記ヒト疾患の治療または予防に有効であると判断する工程。

[0153] 本発明は、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患を選択する方法であって、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒト疾患のモデルマウスに投与してその治療または予防効果を評価する工程を含む方法を提供する。

[0154] すなわち、好ましい態様としては、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および本発明

のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患として前記ヒト疾患を選択する工程。

[0155] さらに好ましい態様としては、上記の工程 (b) (c) に加えて (b') (c') を含み、かつ工程(d)が以下のような工程であってもよい；

(b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型 IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、

(d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患として前記ヒト疾患を選択する工程。

[0156] 本発明は、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原を選択する方法であって、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒト疾患のモデルマウスに投与してその治療または予防効果を評価する工程を含む方法を提供する。

[0157] すなわち、好ましい態様としては、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工

程、

(b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および本発明のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原として前記マウス抗原に対応するヒト抗原を選択する工程。

[0158] さらに好ましい態様としては、上記の工程 (b) (c) に加えて (b') (c') を含み、かつ工程(d)が以下のような工程であってもよい；

(b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、

(d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原として前記マウス抗原に対応するヒト抗原を選択する工程。

[0159] 本発明は、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した抗原結合領域を選択する方法であって、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒト疾患のモデルマウスに投与してその治療または予防効果を評価する工程を含む方法を提供する。

[0160] すなわち、好ましい態様としては、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

- (a) 同一のマウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを複数取得する工程、
- (b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および本発明のFc変異体を含むポリペプチドをそれぞれ作製する工程、
- (c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスにそれぞれ投与する工程、および
- (d) 工程 (c) の結果、より強い治療または予防効果を示したポリペプチドの抗原結合領域を、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた前記ヒト疾患の治療または予防に適した抗原結合領域として選択する工程。

- [0161] 本発明は、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の安全性または毒性を予測する方法であって、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをマウスに投与してその安全性または毒性を評価する工程を含む方法を提供する。
- [0162] 上記の抗原結合領域を選択する方法においては、後述のように、マウス抗原とヒト抗原が同一であることが好ましい。すなわち、ヒトの遺伝子を導入して作製された遺伝子改変マウスをヒト疾患のモデルマウスとして選択し、当該ヒト遺伝子から発現する遺伝子産物をここでのマウス抗原とすることによって、ヒト遺伝子産物に結合する複数の抗原結合領域の中から最適な抗原結合領域を選択することが好ましい。
- [0163] 医薬品の開発において、前臨床段階でサルやマウス等のげっ歯類を使って安全性試験を実施する。しかし、動物種によってはその標的抗原の対応するヒト抗原との相同性が低く、開発候補医薬品がサルやマウスの抗原に対して交差しない場合がある。特にマウスの場合、ヒトの抗原との類似性が低く、十分な交差性を有しないことが多い。そのような場合、開発候補のヒト標的抗原と同様の強さや性質を持ってマウス標的抗原に対して結合するサロゲートを使って安全性評価をすることが可能である（引用文献MAbs, 2009, 1(1),

2-11)。本発明のFc変異体も同様に、ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体のマウスサロゲートとして使うことができ、本発明のFc変異体を含むポリペプチド（好ましくは抗体など）をマウスに投与することで、ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドの安全性を評価することが可能である。

[0164] すなわち、好ましい態様としては、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および本発明のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程(b)で作製されたポリペプチドをマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程(c)で得られた、工程(b)のポリペプチドのマウスにおける安全性または毒性の結果を、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける安全性または毒性として類推する工程。

[0165] 本発明は、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の薬物動態を予測する方法であって、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをマウスに投与してその薬物動態を測定する工程を含む方法を提供する。

[0166] すなわち、好ましい態様としては、例えば以下のような工程を含んでいてもよい；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および本発明

のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドをマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程 (c) で得られた、工程 (b) のポリペプチドのマウスにおける薬物動態の結果を、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける薬物動態として類推する工程。

[0167] ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドには、ヒト抗原に結合する抗原結合領域が含まれていることが好ましい。また、当該ヒト抗原は、ヒト疾患の治療または予防の標的となり得る抗原であることが好ましく、当該抗原結合領域は、その抗原に結合することによって、前記ヒト疾患の治療または予防につながる機能を有することが好ましい。その場合、マウスFc γ RIIに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、当該ヒト抗原に対応するマウス抗原に結合する抗原結合領域を有しており、また、当該抗原結合領域は、ヒトの抗原結合領域が有するヒト疾患の治療または予防機能に対応する機能をマウスにおいて有することが好ましい。

[0168] ヒトFc γ RIIbとヒトFc γ RIIaの細胞外領域の配列同一性は93%であり、ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体としては、天然型IgGのFc領域に比べて、Fc γ RIIbに対する結合活性がより高く、Fc γ RIIaに対する結合活性がより低い性質を有することが望ましい。本明細書において、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体とは、当該Fc領域の〔ヒトFc γ RIIaに対するKD値〕を〔ヒトFc γ RIIbに対するKD値〕で割った値が、天然型ヒトIgGのFc領域の〔ヒトFc γ RIIaに対するKD値〕を〔ヒトFc γ RIIbに対するKD値〕で割った値より大きいFc領域を意味する。そのようなFc変異体の例はW02012/115241、W02008/150494などに記載されているので、それらを用いることができる。

[0169] ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが治療また

は予防に適した疾患は、特に限定はされないが、好ましい疾患としては、免疫炎症性疾患（特に自己免疫疾患）、腎疾患、肝疾患、肺疾患、糖尿病、骨疾患、血液疾患、がん疾患等が挙げられる。

- [0170] マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドは、例えばハイブリドーマ法 (Kohler and Milstein, *Nature* 256, 495 (1975)) やファージ抗体ライブラリー法 (Clackson et al, *Nature* 352, 624-628 (1991) ; Marks et al, *J Mol Biol* 222, 581-597 (1991)) などの当業者に公知の方法によって取得することができる。
- [0171] また、抗原結合領域およびFc領域（天然型IgGのFc領域や本発明のFc変異体など）を含むポリペプチドは、当該抗原結合領域をコードするDNAおよび当該Fc領域をコードするDNAをインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入し、当該発現ベクターを好適な発現細胞中に導入し発現させることで作製することができる。
- [0172] 本明細書において「治療または予防」とは、疾患を有する対象に対して何らかの薬理学的および／または生理学的な効果を得ることを意味する。「治療」とは疾患がすでに診断された対象に対して、病状の進行を抑制し、あるいは軽減することを意味し、「予防」とは疾患がまだ診断されていない対象に対して、発病を抑制することを意味する。そのような効果の強さは、疾患に関連する何らかの所見から定性的に判断してもよいし、何らかの指標から定量的に判断してもよい。指標の例としては、疾患に応じて、ペプチドや代謝産物などの疾患マーカー濃度、症状を数値化した疾患スコア、発病までの期間／発病率、無増悪生存期間／生存率などから選択することができるが、特に限定されない。例えば、疾患が喘息の場合であれば、血漿中IgE濃度の低下、あるいはB細胞、マスト細胞、プラズマ細胞、IgE産生B細胞、IgE産生プラズマ細胞の数の減少で治療効果を評価することができる。
- [0173] 本明細書においてポリペプチドの「安全性」とは、当該ポリペプチドが投与された対象、特にマウスやヒトにおいて、何らかの有害な事象（毒性あるいは副作用）が観察されないことを意味する。対象は健常であってもよいし

、何らかの疾患を有していてもよい。

[0174] 本明細書においてポリペプチドの「毒性」とは、当該ポリペプチドが投与された対象、特にマウスやヒトにおいて、何らかの有害な事象（毒性あるいは副作用）が観察されることを意味する。対象は健常であってもよいし、何らかの疾患を有していてもよい。

[0175] 本明細書においてポリペプチドの「安全性を評価する」あるいは「安全性を予測する」とは、当該ポリペプチドが投与された対象、特にマウスやヒトにおいて、何らかの有害な事象（毒性あるいは副作用）が観察されるか否かを評価することを意味する。対象は健常であってもよいし、何らかの疾患を有していてもよい。

[0176] 本明細書において薬物動態とは、薬物が対象に投与された後の薬物の体内的挙動（例えば薬物の血中濃度）を意味し、吸収、分布、代謝、排泄などが挙げられる。薬物動態を示すパラメーターとしては、半減期、分布容積、クリアランス、吸収／消失速度、生物学的利用能（バイオアベイラビリティ）などが挙げられるが、特に限定されない。

[0177] マウスFc γ RIIに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが投与されるマウスは、野生型のマウスであってもよいし、遺伝子が改変されたマウスであってもよい。

[0178] 本明細書における「マウス抗原」とは、マウスの生体内に存在して抗原となり得る分子であって、なおかつ疾患の治療または予防の標的となり得る分子を意味する。ここでのマウス抗原は、マウスの生体内に存在してさえいれば、マウス由来の分子には限定されず、例えば細菌やウィルスに感染したマウスにおいては、当該細菌やウィルスに由来する分子も含まれるし、あるいはヒトなどのマウス以外の生物の遺伝子を導入して作製された遺伝子改変マウスにおいては、そこから発現するタンパク質などの当該マウス以外の生物に由来する分子も含まれる。

[0179] 本明細書における「マウス抗原に対応するヒト抗原」とは、マウス抗原がマウスにおいて有する機能と等しい機能をヒトにおいて有する抗原を意味す

る。マウス抗原がマウス由来の分子である場合は、ヒト抗原はヒトにおけるそのホモログ分子を意味し、マウス抗原が非マウス由来の分子である場合は、その分子がマウスの疾患において示す作用と等しい作用をヒトの疾患において示す分子を意味する。マウスとヒトの両者に感染可能な細菌やウィルスに由来する分子がマウス抗原となる場合、マウス抗原とヒト抗原は同一である。また、ヒトの遺伝子が導入されたマウスにおける当該遺伝子産物がマウス抗原となる場合も、マウス抗原とヒト抗原は同一である。

- [0180] ヒト疾患のモデルマウスとして、具体的に以下のような例を挙げることができるが、これらには限定されない：ループス腎炎（lupus nephritis）のモデルマウスであるMrl/lprマウス、NZB/W F1マウス、DNA induced SLEモデルマウス、Pristane誘導SLEモデルマウス、BXSBマウス、アトピー性皮膚炎のモデルマウスであるIgE誘導モデルマウス、NC/Ngaマウス、多発性硬化症のモデルマウスであるEAEモデルマウス、敗血症（sepsis）のモデルマウスであるLPS誘導モデルマウス、関節リウマチのモデルマウスであるコラーゲン誘導モデルマウス、アジュバント誘導モデルマウス、細菌由来細胞壁誘導モデルマウス、NZB/KNマウス、Biozziマウス、HTLV-1トランスジェニックマウス、ヒトTNF α トランスジェニックマウス、K/BxNトランスジェニックマウス、1型糖尿病のモデルマウスであるNODマウス、STZマウス、2型糖尿病のモデルマウスであるdb/dbマウス、KKAYマウス、全身性強皮症（systemic scleroderma）のモデルマウスであるBleomycin誘導モデルマウス、慢性腎臓病（CKD）のモデルマウスであるchronic Thy-1モデルマウス、腎纖維症のモデルマウスであるUU0モデルマウス、I/Rモデルマウス、NEP25マウス、IgA腎症のモデルマウスである β -1, 4-ガラクトース転移酵素欠損マウス、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）のモデルマウスであるCDAHFDマウス、high-carbohydrate, high-fatモデルマウス、肝纖維症のモデルマウスであるTAAマウス、BDLマウス。
- [0181] また、ヒト疾患のモデルマウスとして天然型マウスを用いることもできる。天然型マウスに対して何らかの疾患を発症させるための外的な処置を施したマウスは、ヒト疾患のモデルマウスになり得る。天然型マウスとしては、B

ALB/C、C57BL/6などが挙げられるが、これらに限定されない。

- [0182] 本発明に用いられるモデルマウスとしては、上記マウス抗原が治療または予防の標的となり得る疾患と同一の疾患を有するモデルマウスを選択することが好ましい。
- [0183] 上記の方法で選択された標的抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドも本発明に含まれる。
- [0184] また、上記の方法で選択された抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドも本発明に含まれる。
- [0185] さらに、このようなポリペプチドを有効成分として含むヒト疾患の治療または予防剤も本発明に含まれる。また、このようなポリペプチドを患者に投与することにより、ヒト疾患を治療または予防する方法も本発明に含まれる。また、ヒト疾患の治療剤または予防剤の製造におけるこのようなポリペプチドの使用も本発明に含まれる。また、ヒト疾患の治療または予防に使用するためのこのようなポリペプチドも本発明に含まれる。ヒト疾患は、上記の方法を用いて、当該ポリペプチドが治療または予防に適していることが評価された疾患であることが好ましい。
- [0186] また本発明は、このようなポリペプチドを含む、ヒト疾患の治療または予防に用いるためのキットを提供する。ヒト疾患は、上記の方法を用いて、当該ポリペプチドが治療または予防に適していることが評価された疾患であることが好ましい。該キットには、その他、薬学的に許容される担体、媒体、使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。
- [0187] ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化を抑制する薬剤の有効成分として有用である。当該ポリペプチドは、活性型Fc γ Rを活性化することなく、Fc γ RIIbに選択的に作用して、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化を抑制することが可能である。B細胞の活性化とは

、増殖、IgE産生、IgM産生、IgA産生などを含む。当該ポリペプチドの一態様は、Fc γ RIIbとIgEを架橋することでB細胞のIgE産生を抑制し、IgMと架橋することでB細胞のIgM産生を抑制し、IgAと架橋することでIgA産生を抑制することができる。それ以外にも、BCR、CD19、CD79b、等のB細胞上に発現している分子でITAMドメインを細胞内に含むあるいはITAMドメインと相互作用する分子とFc γ RIIbとを直接的又は間接的に架橋することで、上記と同様な抑制作用を発揮することができる。また、マスト細胞の活性化とは、増殖、IgE等による活性化、脱顆粒などを含む。当該ポリペプチドの一態様は、マスト細胞においては、IgE受容体であるFc ε RI、DAP12、CD200R3等のマスト細胞上に発現しているITAMドメインを含むあるいはITAMドメインと相互作用する分子とFc γ RIIbとを直接的、間接的に架橋することで、増殖、IgE等による活性化、脱顆粒の抑制をすることが可能である。また、好塩基球の活性化とは、増殖、脱顆粒などを含む。当該ポリペプチドの一態様は、好塩基球においても、Fc γ RIIbと細胞膜上の分子でITAMドメインを細胞内に含むあるいはITAMドメインと相互作用する分子とを直接的又は間接的に架橋することにより活性化、脱顆粒、増殖を抑制することができる。また、樹状細胞の活性化とは、増殖、脱顆粒などを含む。当該ポリペプチドは、樹状細胞においても、細胞膜上の分子でITAMドメインを細胞内に含むあるいはITAMドメインと相互作用する分子とFc γ RIIbとを直接的又は間接的に架橋することで、活性化、脱顆粒、増殖を抑制することが可能である。

[0188] また、ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、免疫炎症性疾患の治療剤又は予防剤の有効成分として有用である。上述のように、当該ポリペプチドは、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化を抑制することができるので、当該ポリペプチドを投与することにより、免疫炎症性疾患を治療又は予防することが可能である。「免疫炎症性疾患」は、次のものを包含するが、それらだけには限定されない：関節リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑

病、巨赤血球性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巢炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、慢性活動型肝炎、糸球体腎炎、間質性肺腺維症、多発性硬化症、パジエット病、オステオポローシス、多発性骨髓腫、ブドウ膜炎、急性及び慢性脊椎炎、痛風性関節炎、炎症性腸疾患、成人呼吸促進症候群（ARDS）、乾癬、クローン病、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体型ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎、潰瘍性大腸炎、過敏症、筋肉変性、悪液質、全身性強皮症、限局性強皮症、シェーグレン症候群、ベーチェット病、ライター症候群、I型及びII型糖尿病、骨吸收疾患、移植片対宿主反応、虚血性再灌流外傷、アテローム硬化症、脳トラウマ、大脳マラリア、敗血症、敗血性ショック、トキシックショック症候群、発熱、染色によるマルギアス（malgias）、再生不良性貧血、溶血性貧血、突発性血小板減少症、グッドパスチャー症候群、ギラン・バレー症候群、橋本病、天疱瘡、IgA腎症、花粉症、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、ウェゲナー肉芽腫症、結節性動脈炎、混合性結合組織病、線維筋痛症、喘息、アトピー性皮膚炎、慢性萎縮性胃炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性胰炎、大動脈炎症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、原発性甲状腺機能低下症、特発性アジソン病、インスリン依存性糖尿病、慢性円板状エリテマトーデス、類天疱瘡、妊娠性疱疹、線状IgA水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、尋常性白斑、サットン後天性遠心性白斑、原田病、自己免疫性視神経症、特発性無精子症、習慣性流産、低血糖症、慢性蕁麻疹、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、腸疾患性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、腱付着部炎、過敏性腸症候群、慢性疲労症候群、皮膚筋炎、封入体筋炎、シュミット症候群、グレーブス病、悪性貧血、ルポイド肝炎、初老期痴呆、アルツハイマー病、脱髓性疾患、筋萎縮性側索硬化症、副甲状腺機能低下症、ドレスター症候群、イートン-ランバート症候群、疱疹状皮膚炎、脱毛症、進行性全身性硬化症、CREST症候群（石灰沈着症、レイノー現象、食道運動障害、強指

症および毛細血管拡張症）、サルコイドーシス、リウマチ熱、多形性紅斑、クッシング症候群、輸血反応、ハンセン病、高安動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎、巨細胞動脈炎、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、川崎病、心内膜炎、心内膜心筋線維症、眼内炎、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、フェルティ症候群、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、移植拒絶反応、ムンプス、心筋症、化膿性関節炎、家族性地中海熱、マックル-ウェルズ症候群、高IgD症候群。

[0189] また、ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、自己抗原に対する抗体（自己抗体）の產生が疾患の原因と考えられる自己免疫疾患において、その自己抗体の產生を抑制して、当該自己免疫疾患を治療又は予防する薬剤の有効成分として有用である。重症筋無力症の自己抗原であるAchRと抗体のFc部分とを融合した分子を用いることで、AchRを認識するBCRを発現するB細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを亢進することが報告されている（J Neuroimmunol, 227, 35-43, 2010）。自己抗体が認識する抗原と当該Fc領域との融合タンパク質を使うことで、その自己抗原に対するBCRを発現するB細胞のBCRとFc γ RIIbとを架橋し、自己抗原に対するBCRを発現するB細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが可能である。このような自己免疫疾患には、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、慢性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性膵炎、大動脈炎症候群、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病、橋本病、原発性甲状腺機能低下症、特発性アジソン病、インスリン依存性糖尿病、慢性円板状エリテマトーデス、限局性強皮症、天疱瘡、類天疱瘡、妊娠性疱疹、線状IgA水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、尋常性白斑、サットン後天性遠心性白斑、原田病、自己免疫性視神經症、特発性無精子症、習慣性流産、二型糖尿病、低血糖症、慢性蕁麻疹が含まれるが、これらだけには限定されない。

[0190] また、ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、

生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療剤の有効成分として有用である。生体に必要なタンパク質を欠損する疾患に対して、そのタンパク質を薬剤として投与し補充する治療法が用いられるが、患者は元来そのタンパク質を欠損しているため、外部から補充されたそのタンパク質は異物として認識され、そのタンパク質に対する抗体が產生されてしまう。その結果として、そのタンパク質が除去されやすくなってしまい、薬剤としての効果が減弱してしまう。そのようなタンパク質と当該Fc領域との融合タンパク質を使うことで、当該タンパク質を認識するB細胞上においてBCRとFc γ RIIbとを架橋し、当該タンパク質に対する抗体産生を抑制することが可能である。補充するタンパク質としてはFactor VIII、Factor IX、TPO、EPO、 α -iduronidase、iduronate sulfatase、A型heparan N-sulfatase、B型 α -N-acetylglucosaminidase、C型acetyl CoA： α -glucosaminidase acetyltransferase、D型N-acetylglucosamine 6-sulfatase、galactose 6-sulfatase、N-acetylgalactosamine 4-sulfatase、 β -glucuronidase、 α -galactosidase、acidic α -galactosidase、glucocerebrosidaseが含まれる。また、これらのタンパク質を補充する疾患としては、血友病、特発性血小板減少性紫斑病、腎性貧血、ライソソーム病（ムコ多糖症、ファブリー病、ポンペ病、ゴーシエ病）等が含まれる。ただし、これらに限定されない。

[0191] また、ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、抗ウィルス剤の有効成分として有用である。ウィルスに対する抗体であって当該Fc領域を含む抗体は、ウィルスに対する抗体に見られる抗体依存性感染増強（antibody-dependent enhancement）を抑制することが可能である。抗体依存性感染増強とは、ウィルスが、そのウィルスに対する中和抗体を利用して、活性型Fc γ Rを介して貪食されFc γ R発現細胞に感染することで、感染を拡大する現象である。デングウィルスに対する中和抗体のFc γ RIIbに対する結合が、抗体依存性感染増強を抑制するのに重要な役割を果たしていることが報告されている(Proc Natl Acad Sci USA, 108, 12479–12484, 2011)。デングウィルスに対する中和抗体が形成するデングウィルスとの免疫複合体

がFc γ RIIbを架橋することで、Fc γ Rを介した貪食を阻害し、その結果として抗体依存性感染増強を抑制する。ウィルスにはデングウィルス（DENV1、DENV2、DENV4）やHIVが含まれる。ただし、これらだけに限定されない。

[0192] また、ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、動脈硬化予防剤または治療剤の有効成分として有用である。動脈硬化の原因である酸化LDLに対する抗体であって、当該Fc領域を含む抗体はFc γ RIIa依存的な炎症性細胞の接着を防ぐことが可能である。抗酸化LDL抗体は酸化LDLとCD36の相互作用を阻害するが、抗酸化LDL抗体が内皮細胞に対して結合し、そのFc部分をモノサイトがFc γ RIIaやFc γ RI依存的に認識し、接着することが報告されている（Immunol Lett, 108, 52-61, 2007）。このような抗体に、当該Fc領域を含む抗体を利用することで、Fc γ RIIa依存的な結合は阻害され、かつFc γ RIIbを介した抑制シグナルによってモノサイトの接着を抑制することが考えられる。

[0193] また、ヒトFc γ RIIbに選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドは、癌に対する治療剤又は予防剤の有効成分として有用である。Fc γ RIIbに対する結合を増強することで、アゴニスト抗体のアゴニスト活性が増強され、そのアゴニスト活性に基づく抗腫瘍効果も増強されることが知られているので、当該Fc領域を用いたアゴニスト抗体は、癌の治療又は予防に有用である。当該Fc領域は、Aliases、CD120a、CD120b、Lymphotoxin β receptor、CD134、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、CD30、CD137、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、RANK、Osteoprotegerin、TNFRSF12A、TNFRSF13B、TNFRSF13C、TNFRSF14、Nerve growth factor receptor、TNFRSF17、TNFRSF18、TNFRSF19、TNFRSF21、TNFRSF25、Ectodysplasin A2 receptor等のTNF受容体ファミリーに対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性を増強する。また、上記以外のアゴニスト抗体のアゴニスト活性も増強する。癌は次のものを包含するが、それだけには限定されない：肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含む）、大腸癌、直腸癌、結腸癌、乳癌、肝癌、胃癌、膀胱癌、腎癌、前立腺癌、卵巣癌、甲状腺癌、胆管癌、腹膜癌、中皮腫、扁

平上皮癌、子宮頸癌、子宮体癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部癌、鼻咽頭癌、唾液腺腫瘍、胸腺腫、皮膚癌、基底細胞腫、悪性黒色腫、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、ウィルムス腫瘍、急性骨髓性白血病（急性骨髓球性白血病、急性骨髓芽球性白血病、急性前骨髓球性白血病、急性骨髓単球性白血病および急性单球性白血病を含む）、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（バーキットリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、毛様細胞白血病形質細胞腫、末梢性T細胞リンパ腫および成人T細胞白血病／リンパ腫）、ランゲルハンス細胞組織球症、多発性骨髓腫、骨髓異形成症候群、脳腫瘍（神経膠腫、星細胞腫、グリア芽細胞腫、髄膜腫および上衣腫を含む）、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、骨肉腫、カポジ肉腫、ユエイング肉腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫。

[0194] なお、本明細書で用いられるアミノ酸の3文字表記と1文字表記の対応は以下の通りである。

アラニン : Ala : A

アルギニン : Arg : R

アスパラギン : Asn : N

アスパラギン酸 : Asp : D

システイン : Cys : C

グルタミン : Gln : Q

グルタミン酸 : Glu : E

グリシン : Gly : G

ヒスチジン : His : H

イソロイシン : Ile : I

ロイシン : Leu : L

リジン : Lys : K

メチオニン : Met : M

フェニルアラニン : Phe : F

プロリン : Pro : P

セリン : Ser : S

スレオニン : Thr : T

トリプトファン : Trp : W

チロシン : Tyr : Y

バリン : Val : V

[0195] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0196] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

[0197] [実施例 1] 現存するマウスFc γ R結合増強Fc変異体について（既存技術との比較）

マウスFc γ RII（本明細書ではmFc γ RIIまたはmFc γ RIIとも表記される）に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体の報告はこれまでに為されていない。一方、特許文献5（US2009/0136485）において、ヒトFc γ RIIb（本明細書ではhFc γ RIIbまたはhFc γ RIIbとも表記される）に対する結合活性を増強したFc変異体のmFc γ RIIに対する結合活性を評価している。これらのFc変異体はヒトIgG1を元にして作製されたものである。この評価結果中において、最も強くmFc γ RIIに対する結合活性を増強したFc変異体はEUナンバリングで239番目のSerをAspに置換した改変、EUナンバリングで326番目のLysをAspに置換した改変、およびEUナンバリングで328番目のLeuをTyrに置換した改変を導入したFcであり、ヒトIgG1と比較したmFc γ RII結合活性の増強は約130倍であった。しかしながら、マウスFc γ RIII（本明細書ではmFc γ RIIIまたはmFc γ RIIIとも表記される）に対する結合活性のデータの記載がないため、その選択性は不明であった。

[0198] そこで、その選択性を評価するために、特許文献5（US2009/0136485）に

記載されているヒトIgG1を鋳型としたFc変異体の内、mFc γ RIIに対する結合増強が強いものを中心に8つのFc変異体を選抜し、これらのFc変異体を有する改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。抗体H鎖の定常領域には、ヒトIgG1であるhIgG1（配列番号：3）を鋳型にして改変を導入し、上述の8つのFc変異体を作製して用いた。ここで導入した改変には10種類の改変（EUナンバリングで234番目のLeuをTrpに置換した改変；L234W、EUナンバリングで239番目のSerをAspに置換した改変；S239D、EUナンバリングで267番目のSerをAlaに置換した改変；S267A、EUナンバリングで267番目のSerをGluに置換した改変；S267E、EUナンバリングで268番目のHisをAspに置換した改変；H268D、EUナンバリングで326番目のLysをAspに置換した改変；K326D、EUナンバリングで327番目のAlaをAspに置換した改変；A327D、EUナンバリングで328番目のLeuをPhenに置換した改変；L328F、EUナンバリングで328番目のLeuをTrpに置換した改変；L328W、EUナンバリングで328番目のLeuをTyrに置換した改変；L328Y）が含まれている。またコントロールとして、H鎖定常領域がマウスIgG1（mIgG1、配列番号：4）であるH237-mIgG1（配列番号：7）とMRAL-k0からなる改変体H237-mIgG1/MRAL-k0を用いた。

[0199] H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の、評価した全ての改変体の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A（mFc γ RII選択性）を表1に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表1における改変は、いずれもヒトIgG1（hIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：3）に対して導入された改変である。

[0200] $mFc\gamma RII$ に対する選択性を評価する指標として、 $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値であるI/Aを用いた。この指標は $mFc\gamma RII$ に対するKD値が小さくなるほど、あるいは $mFc\gamma RIII$ に対するKD値が大きくなるほど大きな値を示す。すなわち、より大きなI/A値を示す改変体の方が $mFc\gamma RIII$ と比較した $mFc\gamma RII$ に対する選択性が高いことを示す。

[0201] [表1]

名称 (CH)	導入した改変	相対的 $mFc\gamma RII$ 結合活性 ($mIgG1$ を1とした場合)	相対的 $mFc\gamma RIII$ 結合活性 ($mIgG1$ を1とした場合)	I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性)	相対的 I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) ($mIgG1$ を1とした場合)
$mIgG1$	none	1.0	1.0	1.34	1.00
FS130	S267E	0.3	0.3	1.36	1.01
P253	S267E/L328F	1.0	4.6	0.29	0.21
FS131	L234W/S239D/L328Y	144.3	33.2	5.83	4.34
FS132	S239D/A327D/L328Y	96.7	41.8	3.10	2.31
FS133	S239D/H268D/L328W	161.7	86.5	2.51	1.87
FS134	S239D/H268D/L328Y	58.2	20.8	3.75	2.80
F616	S239D/K326D/L328Y	186.5	50.1	5.00	3.72
FS135	S239D/S267A/L328Y	137.9	34.4	5.38	4.01

(相対的な結合活性 : H237- $mIgG1/MRAL-k0$ の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値を各改変体の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値で割った値、

相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体のI/A ($mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値) をH237- $mIgG1/MRAL-k0$ のI/Aで割った値)

[0202] 表1の結果より、特許文献5 (US2009/0136485) に記載されている $hIgG1$ を鋳型としたFc変異体の中には $mIgG1$ と比較した相対的 $mFc\gamma RII$ 結合活性を約190倍増強させるFc変異体が存在するが、その相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) は約4倍程度の弱いものであった。

すなわち、現在までに $mFc\gamma RIII$ と比較して十分な選択性を持って $mFc\gamma RII$ に対する結合を増強したFc変異体の報告はなされておらず、自己免疫疾患をはじめとした様々なマウス病態モデルにおいて、 $Fc\gamma RII$ に対して選択的に結合を増強したFc変異体の効果をより正確に検証するためには、より選択性の優

れた $mFc\gamma$ RII選択的結合増強Fc変異体が必要であることが明らかとなった。

[0203] [実施例2] マウスIgG1由来Fc変異体のマウス $Fc\gamma R$ に対する結合の網羅的解析

天然型のマウスIgG1(本明細書では $mIgG1$ とも表記される)は4種類のマウス $Fc\gamma R$ (本明細書では $mFc\gamma R$ または $mFc\gamma R$ とも表記される)の内、マウス $Fc\gamma RI$ (本明細書では $mFc\gamma RI$ または $mFc\gamma RI$ とも表記される)、マウス $Fc\gamma RIV$ (本明細書では $mFc\gamma RIV$ または $mFc\gamma RIV$ とも表記される)には結合せず、 $mFc\gamma RII$ 、 III にのみ結合を示す(Science 2005, 310, 1510-1512)。そのため、 $mIgG1$ を鋳型とすることで、 $mFc\gamma RIII$ と比較して $mFc\gamma RII$ に対する選択性を付与することで、 $mFc\gamma RII$ に対して選択的に結合増強したFc変異体が作製可能であると考えた。

[0204] $mIgG1$ と比較して、活性型 $mFc\gamma R$ 、特に $mFc\gamma RIII$ に比べて、抑制型 $mFc\gamma R$ 、すなわち $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強させるような改変を見出すために、 $mIgG1$ 抗体に変異を導入し、各 $mFc\gamma R$ に対する結合の網羅的解析を実施した。

[0205] 以下の評価において、抗体H鎖の可変領域には、W02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237(配列番号1)を使用した。また、抗体H鎖の定常領域として、 $mIgG1$ (配列番号4)を利用した。このH鎖をH237- $mIgG1$ (配列番号7)と呼ぶ。同様に、抗体L鎖には、抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0(配列番号:2)を共通に使用した。

[0206] $mFc\gamma RII$ (NCBI Reference Sequence: NP_034317.1)、 $mFc\gamma RIII$ (NCBI Reference Sequence: NP_034318.2)の配列を比較した結果を図1に示す。図1から $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ とではIgGのFcと相互作用すると予想される部位のうち、異なる残基は二つしか存在しないことが明らかとなった。

[0207] すなわち、 $mFc\gamma RIII$ に比べて $mFc\gamma RII$ に対して選択的に結合活性を増強したFc変異体を作製するためには、この二残基の違いを区別する必要がある。加えて、 $mFc\gamma RII$ および $mFc\gamma RIII$ の立体構造情報も得られておらず、目的の

Fc変異体を合理的に設計することは困難であると考えられた。そこで、H鎖定常領域がmIgG1であるH237-mIgG1/MRAL-k0を鋳型にし、mFc γ Rの結合に関与すると考えられるアミノ酸とその周辺のアミノ酸（EUナンバリングで230番目から232番目、236番目から241番目、265番目から268番目、296番目、298番目、300番目）を元のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換した。これらのFc変異体をmIgG1 variantsと呼ぶ。mIgG1 variantsを参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore 4000を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を網羅的に評価した。

[0208] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。変異を導入していないH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各mIgG1 variantsのmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をmIgG1 variantsの各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。横軸に各mIgG1 variantsのmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各mIgG1 variantsのmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図2）。

[0209] その結果、図2で示したように、いくつかの改変においてmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の増強よりもmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の増強が上回ること、すなわちmFc γ RIIに対する選択性が向上することを見出した。上述のmIgG1 variantsのmFc γ Rに対する結合の網羅的解析の中で、mFc γ RIIに対する相対的な結合活性を1.1倍以上増強し、かつ、相対的I/A（mFc γ RII選択性）を1.1倍以上向上した改変の効果をまとめた結果を表2に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング00番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表2における改変は、いずれもマウスIgG1（mIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0210] 全部で288個の改変体を評価した中で基準を満たすものは39個だけであり、また、最も高い相対的I/A（mFc γ RII選択性）は4.51倍であった。この中で、より優位であると考えられる、mFc γ RIIに対する相対的な結合活性を1.4倍以

上増強し、かつ、相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を1.2倍以上向上した改変は26個のみ（改変可能箇所としては9箇所）であった。このことから、 $mFc\gamma RII$ 、III間の選択性を付与しながら $mFc\gamma RII$ 結合活性を増強することは極めて難易度が高いと考えられた。

[0211]

[表2]

名称 (CH)	導入した 改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1を 1とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1を 1とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1を 1とした 場合)
MB002	T230D	2.72	1.47	1.85
MB003	T230E	5.06	1.51	3.35
MB013	T230Q	1.20	1.07	1.12
MB016	T230V	1.15	1.00	1.15
MB019	V231A	2.70	1.44	1.87
MB020	V231D	7.97	2.84	2.80
MB021	V231E	8.52	3.58	2.38
MB025	V231I	1.19	1.06	1.13
MB027	V231L	1.88	1.55	1.21
MB028	V231M	1.83	1.42	1.29
MB030	V231P	5.26	2.27	2.31
MB031	V231Q	1.99	1.48	1.34
MB034	V231T	1.25	1.12	1.11
MB037	P232A	1.54	1.22	1.26
MB038	P232D	3.15	1.37	2.30
MB039	P232E	3.27	1.29	2.54
MB040	P232F	1.47	1.17	1.26
MB045	P232L	1.20	0.90	1.34
MB052	P232V	1.36	1.20	1.14
MB053	P232W	1.36	1.02	1.33
MB054	P232Y	1.75	1.11	1.58
MB093	S238E	2.09	0.56	3.71
MB102	S238P	2.62	2.37	1.11
MB103	S238Q	1.27	1.05	1.21
MB110	S239D	15.07	4.45	3.39
MB111	S239E	5.01	1.11	4.51
MB118	S239M	1.74	0.99	1.76
MB121	S239Q	1.48	0.94	1.58
MB126	S239Y	1.58	0.94	1.69
MB129	V240E	6.19	2.42	2.55
MB132	V240H	2.12	1.39	1.52
MB139	V240Q	1.54	1.20	1.28
MB143	V240W	7.42	6.32	1.17
MB161	F241W	1.47	1.13	1.30
MB162	F241Y	1.40	1.20	1.17
MB188	I266L	1.16	1.00	1.15
MB199	S267A	1.48	1.19	1.24
MB251	F296W	1.49	1.23	1.22
MB261	S298L	2.11	1.81	1.17

(相対的な結合活性：H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性)：各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0212] [実施例3] マウスFc γ RII選択性に結合活性を増強する改変の組み合わせによる効果の評価

実施例2で見出したmFc γ RII選択性の結合増強改変の内、EUナンバリングで239番目のSerをAspに置換する改変を導入した改変体H237-MB110/MRAL-k0は、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際のmFc γ RIIに対する相対的結合活性の増強が15.1倍と最も強く、相対的I/A (mFc γ RII選択性) も3.4倍を示した。そこで、この改変体を元にして、さらにmFc γ RII選択性に結合活性を増強する改変を1つあるいは複数箇所導入し、改変の組合せの効果を評価した。組合せの効果を検討する改変には、表1から8種類の改変 (EUナンバリングで230番目のTyrをGluに置換した改変；T230E、EUナンバリングで231番目のValをAlaに置換した改変；V231A、EUナンバリングで231番目のValをAspに置換した改変；V231D、EUナンバリングで232番目のProをGluに置換した改変；P232E、EUナンバリングで238番目のSerをGluに置換した改変；S238E、EUナンバリングで240番目のValをGluに置換した改変；V240E、EUナンバリングで240番目のValをHisに置換した改変；V240H、EUナンバリングで267番目のSerをAlaに置換した改変；S267A) を選び、導入した。

[0213] 抗体H鎖の可変領域には、W02009/125825に記載されている抗IL-6レセプターアンチ体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には、抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。H237-mIgG1/MRAL-k0にS239D改変を導入したH237-MB110/MRAL-k0を鋳型にし、上記の改変の組み合わせを導入した改変体群をMB110 variantsと呼ぶ。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

- [0214] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。変異を導入していないH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を、H237-MB110/MRAL-k0およびMB110 variantsのmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値を各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。横軸にH237-MB110/MRAL-k0およびMB110 variantsのmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸にH237-MB110/MRAL-k0およびMB110 variantsのmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図3）。
- [0215] また、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の、評価した全てのMB110 variantsの各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A（mFc γ RII選択性）を表3に示した。さらに、追加の改変を導入する前のH237-MB110/MRAL-k0の結合活性およびI/A（mFc γ RII選択性）を1とした場合の結果を表4に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表3および表4における改変は、いずれもマウスIgG1（mIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0216]

[表3]

名称 (CH)	導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mIgG1を1 とした場合)
MB110	S239D	12.3	4.0	3.1
MB289	T230E/S239D	43.8	4.9	8.9
MB290	V231A/S239D	26.5	5.5	4.8
MB291	V231D/S239D	42.6	6.7	6.4
MB292	P232E/S239D	34.6	4.1	8.4
MB293	S238E/S239D	39.9	4.1	9.9
MB294	S239D/V240E	7.6	1.9	4.0
MB295	S239D/V240H	7.6	1.7	4.5
MB296	S239D/S267A	21.0	5.6	3.8
MB299	T230E/V231A/S239D	60.8	6.5	9.4
MB300	T230E/V231D/S239D	52.3	5.7	9.2
MB301	T230E/P232E/S239D	43.2	4.6	9.3
MB302	T230E/S238E/S239D	53.7	4.5	12.0
MB303	T230E/S239D/V240E	7.8	1.3	6.1
MB304	T230E/S239D/V240H	13.7	2.0	6.8
MB305	V231A/P232E/S239D	26.0	3.8	6.9
MB306	V231A/S238E/S239D	65.8	4.2	15.7
MB307	V231A/S239D/V240E	11.3	2.2	5.1
MB308	V231A/S239D/V240H	26.3	2.7	9.8
MB309	V231D/P232E/S239D	27.9	3.9	7.2
MB310	V231D/S238E/S239D	38.8	3.8	10.1
MB311	V231D/S239D/V240E	17.6	2.1	8.3
MB312	V231D/S239D/V240H	55.4	3.5	16.0
MB313	P232E/S238E/S239D	40.1	4.0	10.1
MB314	P232E/S239D/V240E	7.1	1.1	6.5
MB315	P232E/S239D/V240H	5.9	0.8	7.3
MB316	S238E/S239D/V240E	7.4	1.2	6.0
MB317	S238E/S239D/V240H	6.0	0.5	12.2
MB318	T230E/P232E/S238E/S239D	40.5	3.9	10.5
MB319	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D	50.0	3.6	14.1
MB320	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D/V240E	3.2	0.4	7.5
MB321	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D/V240H	3.5	0.2	17.9
MB322	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D	9.2	1.3	7.3
MB323	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D/V240E	1.7	0.1	15.0
MB324	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D/V240H	1.1	0.1	9.2
MB325	T230E/P232E/S238E/S239D/V240E	4.7	0.6	7.7
MB326	T230E/P232E/S238E/S239D/V240H	4.0	0.2	17.7
MB337	T230E/V231A/S238E/S239D	73.4	4.6	16.0
MB338	T230E/V231D/S238E/S239D	42.2	2.6	16.5

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFcγRに対するKD値を各改変

体の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値で割った値、

相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体のI/A ($mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値) をH237- $mIgG1/MRAL-k0$ のI/Aで割った値)

[0217]

[表4]

名称 (CH)	導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (MB110を1 とした場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (MB110を1 とした場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (MB110を1 とした場合)
MB110	S239D	1.00	1.00	1.00
MB289	T230E/S239D	3.57	1.23	2.87
MB290	V231A/S239D	2.16	1.37	1.55
MB291	V231D/S239D	3.47	1.66	2.06
MB292	P232E/S239D	2.82	1.02	2.71
MB293	S238E/S239D	3.25	1.01	3.19
MB294	S239D/V240E	0.62	0.47	1.29
MB295	S239D/V240H	0.62	0.42	1.45
MB296	S239D/S267A	1.71	1.39	1.23
MB299	T230E/V231A/S239D	4.96	1.61	3.03
MB300	T230E/V231D/S239D	4.25	1.41	2.97
MB301	T230E/P232E/S239D	3.52	1.16	3.00
MB302	T230E/S238E/S239D	4.37	1.11	3.87
MB303	T230E/S239D/V240E	0.64	0.32	1.97
MB304	T230E/S239D/V240H	1.11	0.50	2.19
MB305	V231A/P232E/S239D	2.12	0.94	2.23
MB306	V231A/S238E/S239D	5.36	1.05	5.06
MB307	V231A/S239D/V240E	0.92	0.55	1.65
MB308	V231A/S239D/V240H	2.14	0.67	3.16
MB309	V231D/P232E/S239D	2.27	0.96	2.32
MB310	V231D/S238E/S239D	3.16	0.96	3.26
MB311	V231D/S239D/V240E	1.43	0.52	2.68
MB312	V231D/S239D/V240H	4.51	0.87	5.16
MB313	P232E/S238E/S239D	3.27	0.99	3.26
MB314	P232E/S239D/V240E	0.58	0.27	2.10
MB315	P232E/S239D/V240H	0.48	0.20	2.35
MB316	S238E/S239D/V240E	0.61	0.31	1.94
MB317	S238E/S239D/V240H	0.49	0.12	3.94
MB318	T230E/P232E/S238E/S239D	3.29	0.96	3.39
MB319	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D	4.07	0.89	4.55
MB320	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D/V240E	0.26	0.11	2.42
MB321	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D/V240H	0.28	0.05	5.77
MB322	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D	0.75	0.31	2.35
MB323	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D/V240E	0.13	0.03	4.84
MB324	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D/V240H	0.09	0.03	2.97
MB325	T230E/P232E/S238E/S239D/V240E	0.38	0.15	2.48
MB326	T230E/P232E/S238E/S239D/V240H	0.33	0.06	5.71
MB337	T230E/V231A/S238E/S239D	5.98	1.15	5.16
MB338	T230E/V231D/S238E/S239D	3.44	0.64	5.32

(相対的な結合活性 : H237-MB110/MRAL-k0の各mFcγRに対するKD値を各MB110 variantsの各mFcγRに対するKD値で割った値、

相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性)：各MB110 variantsのI/A ($mFc\gamma RII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値)をH237-MB110/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0218] 初めに、H237-MB110/MRAL-k0に上述した8つの改変を1つずつ導入した結果、6つの改変 (T230E、V231A、V231D、P232E、S238E、S267A) を導入した場合において、I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を維持または向上させながら、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を増強させることが見出された（表3、表4）。次に、これら6つの改変の内、H237-MB110/MRAL-k0を1とした場合の $mFc\gamma RII$ に対する相対的結合活性を2倍以上増強する効果のあった5つの改変 (T230E、V231A、V231D、P232E、S238E) を組み合わせて導入した結果、さらなるI/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) の向上および $mFc\gamma RII$ に対する結合活性の増強が観察された。なお、本検討で評価したH237-mIgG1/MRAL-k0に3つ以上の改変を導入した改変体の全てにおいて、実施例1の表1に示した既存Fc変異体を有する抗体の相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を上回る結果が得られた。中でも、H237-mIgG/MRAL-k0にT230E、V231A、S238E、S239Dの4つの改変を導入した改変体 (H237-MB337/MRAL-k0) においては、mIgG1と比較した際の $mFc\gamma RII$ に対する相対的結合活性が73.4倍増強し、相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) が16倍向上した（表3、表4）。

[0219] 一方で、表3と表4の結果から、改変を複数組み合わせていくことで、H237-mIgG1/MRAL-k0を鋳型にした点変異体の網羅的な解析結果から予想できない $mFc\gamma RII$ 結合活性およびI/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) の変化が多く観察された。例えば、H237-MB110/MRAL-k0にP232E改変を導入した場合には、導入前と比較して $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を2.8倍増強させたのに対し、H237-MB110/MRAL-k0にV231A改変を導入し、この改変体H237-MB290/MRAL-k0にさらにP232E改変を導入した改変体H237-MB305/MRAL-k0においては、P232E改変の導入前と比較して $mFc\gamma RII$ に対する結合活性の増強が見られなかった。同様に、H237-MB110/MRAL-k0にV231D改変を導入した場合には、導入前と比較して $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を3.5倍増強させたのに対し、H237-MB110/MRAL-k0にT230E改変

およびS238E改変を導入し、この改変体H237-MB302/MRAL-k0にさらにV231D改変を導入した改変体H237-MB338/MRAL-k0においては、V231D改変の導入前と比較してmFc γ RIIに対する結合活性が約0.8倍に減弱することが明らかとなつた。

[0220] 上述したように、改変を組み合わせていくことで期待された効果が得られなくなった要因として、導入している改変の箇所が隣接しているために同じH鎖上において各々の改変が互いに影響を及ぼしあうこと、また導入している改変の箇所が抗体のlower hinge領域に位置し、抗体とmFc γ R間の相互作用界面だけでなく、その抗体における各Fc間の相互作用界面に位置するため、異なるH鎖間においても各々の改変が互いに影響を及ぼしあうことが推察される。そのため、H237-mIgG1/MRAL-k0を鋳型にした点変異体の網羅的な解析結果から改変を組み合わせることによる効果を予測することが困難になっていることが考えられた。

[0221] [実施例4] EUナンバリングで230番目、231番目、232番目におけるマウスFc γ RII結合活性増強に最適な改変の組み合わせの探索

実施例3で示した通り、改変を組み合わせていくことでH237-mIgG1/MRAL-k0を鋳型にした点変異体の網羅的な解析結果から期待されるような効果が観察されない例が見られ、実施例2および実施例3で得られた結果からさらなるmFc γ RII結合活性増強を目的とした改変の組み合わせを予測することが困難であった。そこで、上述したようにlower hinge領域において改変箇所が隣接しているEUナンバリングで230番目、231番目、および232番目のアミノ酸を、負電荷を有するアミノ酸、正電荷を有するアミノ酸、親水性の高いアミノ酸、特徴的な側鎖長を持つアミノ酸、芳香環を有するアミノ酸など、特徴的な性質を有するアミノ酸に置換し、それらを組み合わせることで、よりmFc γ RII結合活性増強およびI/A (mFc γ RII選択性) 向上に適した改変の組み合わせを探索することとした。

[0222] 実施例2、実施例3と同様に、抗体H鎖の可変領域には、W02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領

域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には、抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。H237-mIgG1/MRAL-k0にS238E改変およびS239D改変を導入した上で、EUナンバリングで230番目、231番目、および232番目のアミノ酸の組み合わせを検討した。各改変体は参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0223] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。変異を導入していないH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を、各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値を各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。横軸に各改変体のmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図4）。

[0224] また、本検討で評価した改変体の内、EUナンバリングで231番目のアミノ酸およびEUナンバリングで232番目のアミノ酸の置換による効果を評価するにあたり、T230E改変を有する改変体に関してのみ、以下の方法に従って図を作成した。なお、これらの改変体は共通して3つの改変（T230E/S238E/S239D）を有し、アミノ酸の違いはEUナンバリングで231番目および232番目のみである。図において、横軸の下段には各改変体のEUナンバリング232番目のアミノ酸を、上段には各改変体のEUナンバリング231番目のアミノ酸の種類を示した。左縦軸には各改変体のmFc γ RII（●）およびmFc γ RIII（◆）に対するKD値を示し、右縦軸にはmIgG1と比較した際の相対的I/A（mFc γ RII選択性）（○）をそれぞれ表示した（図5）。なお、左縦軸は反転したLogスケール表示となっているため、上に行くほど結合活性が増強していることを示している。

[0225] これまでEUナンバリングで232番目のアミノ酸は、実施例2の表2の結果において最も高いmFc γ RII結合活性増強およびI/A（mFc γ RII選択性）向上を示したP232E改変を使用してきた。しかしながら、図5の結果より、本実施例で新たに検討した5つのアミノ酸（Ala、Asn、Pro、Trp、Tyr）に置換した改変

体は、これまで使用してきたP232E改変に比べて、 $mFc\gamma RII$ 結合活性およびI/A ($mFc\gamma RII$ 選択性)において良好な結果を示した。特に、EUナンバリングで232番目のアミノ酸をTrpやTyrなどの芳香族アミノ酸に置換すると、EUナンバリングで231番目のアミノ酸の種類によらず総じて強い $mFc\gamma RII$ 結合活性を示した。この時、 $mFc\gamma RIII$ に対する結合の増強も見られるもののその程度は強くなく、結果として、15倍以上の高い相対的I/A($mFc\gamma RII$ 選択性)を示していた。また、EUナンバリングで232番目のアミノ酸がTrpやTyrなどの芳香族アミノ酸でない場合においては、EUナンバリングで231番目のValをProに置換することにより $mFc\gamma RII$ に対しては顕著に結合を増強させるものの、 $mFc\gamma RIII$ に対する結合増強の程度が弱く、 $mFc\gamma RII$ 選択性を大きく向上させることが明らかとなった。これらのことから、EUナンバリングで232番目のアミノ酸をTrpやTyrなどの芳香族アミノ酸に置換する改変やEUナンバリングで231番目のValをProに置換する改変が、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性の増強およびI/A ($mFc\gamma RII$ 選択性)の向上という観点において好ましい改変であると考えられた。

[0226] 本検討で評価した全ての改変体について、H237- $mIgG1/MRAL-k0$ を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的結合活性および相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性)を表5に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域 (CH) の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表5における改変は、いずれもマウスIgG1 ($mIgG1$) のH鎖定常領域 (配列番号：4) に対して導入された改変である。

[0227]

[表5]

名称 (CH)	導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1を1 とした場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1を1 とした場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1を1 とした場合)
MB302	T230E/S238E/S239D	53.7	4.5	12.0
MB306	V231A/S238E/S239D	65.8	4.2	15.7
MB310	V231D/S238E/S239D	38.8	3.8	10.1
MB313	P232E/S238E/S239D	40.1	4.0	10.1
MB318	T230E/P232E/S238E/S239D	40.5	3.9	10.5
MB319	T230E/V231A/P232E/S238E/S239D	50.0	3.6	14.1
MB322	T230E/V231D/P232E/S238E/S239D	9.2	1.3	7.3
MB337	T230E/V231A/S238E/S239D	73.4	4.6	16.0
MB338	T230E/V231D/S238E/S239D	42.2	2.6	16.5
MB339	T230E/P232W/S238E/S239D	196.8	11.6	17.0
MB340	T230E/V231A/P232W/S238E/S239D	220.7	9.9	22.4
MB341	T230E/V231D/P232W/S238E/S239D	268.5	11.5	23.4
MB358	T230E/V231A/P232A/S238E/S239D	113.8	4.1	27.7
MB367	T230E/V231A/P232N/S238E/S239D	158.6	6.2	25.6
MB373	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239D	390.4	15.5	25.2
MB377	T230E/P232A/S238E/S239D	127.0	6.0	21.3
MB378	T230E/P232N/S238E/S239D	172.4	9.3	18.6
MB379	T230E/P232Y/S238E/S239D	273.4	12.2	22.5
MB380	T230E/V231D/P232A/S238E/S239D	78.1	4.2	18.7
MB381	T230E/V231D/P232N/S238E/S239D	93.5	5.7	16.5
MB382	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239D	320.7	12.3	26.2
MB383	T230E/V231N/S238E/S239D	106.4	5.4	19.6
MB384	T230E/V231N/P232A/S238E/S239D	125.1	6.3	19.8
MB385	T230E/V231N/P232N/S238E/S239D	151.7	7.9	19.2
MB386	T230E/V231N/P232W/S238E/S239D	268.0	14.5	18.6
MB387	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239D	318.7	16.7	19.1
MB388	T230E/V231P/S238E/S239D	277.3	10.8	25.9
MB389	T230E/V231P/P232A/S238E/S239D	244.8	7.0	35.3
MB390	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D	521.7	11.9	44.0
MB391	T230E/V231P/P232W/S238E/S239D	281.2	10.9	25.9
MB392	T230E/V231P/P232Y/S238E/S239D	257.2	14.5	17.8
MB393	T230E/V231T/S238E/S239D	89.9	5.6	16.0
MB394	T230E/V231T/P232A/S238E/S239D	133.8	7.5	17.8
MB395	T230E/V231T/P232N/S238E/S239D	153.7	8.2	18.7
MB396	T230E/V231T/P232W/S238E/S239D	297.2	17.9	16.6
MB397	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239D	554.8	19.3	28.9
MB398	T230E/V231W/S238E/S239D	45.8	3.5	13.0
MB399	T230E/V231W/P232A/S238E/S239D	71.8	3.9	18.2
MB400	T230E/V231W/P232N/S238E/S239D	81.7	5.5	15.0
MB401	T230E/V231W/P232W/S238E/S239D	162.3	6.9	23.7
MB402	T230E/V231W/P232Y/S238E/S239D	207.5	12.0	17.4
MB404	T230D/V231A/P232Y/S238E/S239D	235.7	8.6	27.6
MB405	T230I/V231A/P232Y/S238E/S239D	145.5	8.0	18.2
MB406	T230P/V231A/P232Y/S238E/S239D	191.1	6.5	29.6
MB407	T230Q/V231A/P232Y/S238E/S239D	164.4	9.8	16.9
MB408	V231A/P232Y/S238E/S239D	163.2	13.1	12.5
MB409	T230D/P232Y/S238E/S239D	192.5	10.7	18.0
MB410	T230I/P232Y/S238E/S239D	104.0	6.7	15.5
MB411	T230P/P232Y/S238E/S239D	132.2	8.1	16.4
MB412	T230Q/P232Y/S238E/S239D	113.3	8.3	13.7

MB413	P232Y/S238E/S239D	107.9	11.9	9.1
MB414	T230D/V231D/P232Y/S238E/S239D	189.4	8.1	23.6
MB415	T230I/V231D/P232Y/S238E/S239D	159.2	9.1	17.5
MB416	T230P/V231D/P232Y/S238E/S239D	189.0	6.3	30.2
MB417	T230Q/V231D/P232Y/S238E/S239D	189.5	10.7	17.8
MB418	V231D/P232Y/S238E/S239D	261.9	20.0	13.1
MB419	T230D/V231N/P232Y/S238E/S239D	215.6	11.6	18.6
MB420	T230I/V231N/P232Y/S238E/S239D	123.8	7.1	17.5
MB421	T230P/V231N/P232Y/S238E/S239D	178.3	9.0	19.9
MB422	T230Q/V231N/P232Y/S238E/S239D	144.2	8.9	16.3
MB423	V231N/P232Y/S238E/S239D	143.1	9.2	15.5
MB424	T230D/V231P/P232A/S238E/S239D	104.2	5.1	20.4
MB425	T230I/V231P/P232A/S238E/S239D	194.3	5.5	35.2
MB426	T230P/V231P/P232A/S238E/S239D	111.8	4.4	25.2
MB427	T230Q/V231P/P232A/S238E/S239D	217.4	7.0	31.1
MB428	V231P/P232A/S238E/S239D	214.9	8.8	24.4
MB429	T230D/V231P/P232N/S238E/S239D	136.8	6.8	20.3
MB430	T230I/V231P/P232N/S238E/S239D	206.7	6.3	33.0
MB431	T230P/V231P/P232N/S238E/S239D	112.8	4.2	26.8
MB432	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239D	342.8	10.7	32.2
MB433	V231P/P232N/S238E/S239D	302.7	11.6	26.2
MB434	T230D/V231T/P232Y/S238E/S239D	256.8	15.5	16.7
MB435	T230I/V231T/P232Y/S238E/S239D	146.5	8.7	16.8
MB436	T230P/V231T/P232Y/S238E/S239D	150.8	8.4	18.0
MB437	T230Q/V231T/P232Y/S238E/S239D	197.6	11.5	17.3
MB438	V231T/P232Y/S238E/S239D	282.9	15.7	18.0

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

- [0228] 以上の結果（図4、図5、表5）より、組合せの検討を実施する前の実施例3で見出された最も優れた改変体の一つであるH237-MB337/MRAL-k0と比較して、I/A (mFc γ RII選択性) を維持または向上させながら、mFc γ RIIに対する結合活性を増強する改変体が数多く見出された。このEUナンバリングで230番目、231番目、および232番目のアミノ酸の改変の組合せの効果は、実施例2で得られていたH237-mIgG1/MRAL-k0を鋳型にした点変異体の網羅的な解析結果からは予測することができない効果であった。すなわち、今回見出した改変の組み合わせは、本検討を行うことで初めて見出すことが可能な改変の組み合わせである。表5の結果より、本検討で評価した全ての改変体が実施例1の表1に示した既存Fc変異体を有する抗体よりも優れた相対的I/A (mFc γ RII選択性) を示すと共に、いくつかの改変体においては相対的mFc γ RII結

合活性においても既存Fc変異体を有する抗体を大きく上回る結果を示した。中でも、H237-mIgG1/MRAL-k0に対して5つの改変 (T230E/V231P/P232N/S238E/S239D) を導入したH237-MB390/MRAL-k0、および、H237-mIgG1/MRAL-k0に対して5つの改変 (T230E/V231T/P232Y/S238E/S239D) を導入したH237-MB397/MRAL-k0は、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的I/A (mFc γ RII選択性) が各々44.0倍および28.9倍と高い値を示しながら、mFc γ RIIに対する相対的な結合活性がいずれも500倍を超える強い増強効果を示し、選択性・結合活性の両側面において既存Fc変異体よりも非常に優れたFc変異体であることが示された。これらのmFc γ RII選択性的な結合増強Fc変異体を用いることで、マウスのin vivoおよびin vitro試験において、より正確に、ヒトにおけるhFc γ RII b選択的結合増強Fc変異体の薬効および安全性を評価することが可能になることが示唆された。

[0229] 参考のために、H237-mIgG1/MRAL-k0、およびH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性が200倍以上を示した改変体について、各mFc γ Rに対するKD値およびI/A (mFc γ RII選択性) を表6に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表6における改変は、いずれもマウスIgG1 (mIgG1) のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0230]

[表6]

名称 (CH)	導入した改変	KD (mFcγRII)	KD (mFcγRIII)	I/A (mFcγRII 選択性)
mIgG1	-	2.10E-07	2.82E-07	1.3
MB340	T230E/V231A/P232W/S238E/S239D	9.52E-10	2.86E-08	30.0
MB341	T230E/V231D/P232W/S238E/S239D	7.82E-10	2.46E-08	31.4
MB373	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239D	5.38E-10	1.82E-08	33.8
MB379	T230E/P232Y/S238E/S239D	7.68E-10	2.32E-08	30.2
MB382	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239D	6.55E-10	2.30E-08	35.1
MB386	T230E/V231N/P232W/S238E/S239D	7.84E-10	1.95E-08	24.9
MB387	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239D	6.59E-10	1.69E-08	25.6
MB388	T230E/V231P/S238E/S239D	7.57E-10	2.62E-08	34.6
MB389	T230E/V231P/P232A/S238E/S239D	8.58E-10	4.06E-08	47.3
MB390	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D	4.03E-10	2.37E-08	59.0
MB391	T230E/V231P/P232W/S238E/S239D	7.47E-10	2.59E-08	34.7
MB392	T230E/V231P/P232Y/S238E/S239D	8.17E-10	1.95E-08	23.9
MB396	T230E/V231T/P232W/S238E/S239D	7.07E-10	1.58E-08	22.3
MB397	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239D	3.79E-10	1.46E-08	38.7
MB402	T230E/V231W/P232Y/S238E/S239D	1.01E-09	2.36E-08	23.3
MB404	T230D/V231A/P232Y/S238E/S239D	8.91E-10	3.30E-08	37.0
MB418	V231D/P232Y/S238E/S239D	8.02E-10	1.41E-08	17.6
MB419	T230D/V231N/P232Y/S238E/S239D	9.74E-10	2.43E-08	25.0
MB427	T230Q/V231P/P232A/S238E/S239D	9.66E-10	4.03E-08	41.7
MB428	V231P/P232A/S238E/S239D	9.77E-10	3.20E-08	32.7
MB430	T230I/V231P/P232N/S238E/S239D	1.02E-09	4.50E-08	44.3
MB432	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239D	6.13E-10	2.64E-08	43.1
MB433	V231P/P232N/S238E/S239D	6.94E-10	2.44E-08	35.2
MB434	T230D/V231T/P232Y/S238E/S239D	8.18E-10	1.83E-08	22.3
MB438	V231T/P232Y/S238E/S239D	7.42E-10	1.79E-08	24.1

(I/A (mFc γ RII選択性) : mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値)

[0231] [実施例5] EUナンバリングで239番目におけるアミノ酸置換の検討

実施例4ではEUナンバリングで230番目、231番目、232番目のアミノ酸の最適な組み合わせを検討し、mFc γ RII結合増強やI/A (mFc γ RII選択性)に優れた改変体の作製に成功した。本実施例5においては、さらなるI/A (mFc γ RII選択性)の向上およびmFc γ RIIIに対する結合増強を抑制することを目的として、EUナンバリングで239番目のアミノ酸の置換を検討した。これまで、EUナンバリングで239番目のアミノ酸はSerをAspに置換していたが、ここでは新たにGlu、Met、Trpへの置換および元のアミノ酸であるSerへの置換を検討した。抗体H鎖の可変領域にはWO2009/125825に記載されている抗IL-6レセプター

抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。検討を行うにあたり、実施例4で得られた改変体の中から表7に示す9つの改変体を選抜し、鋳型名を付与した。なお、EUナンバリングで239番目のアミノ酸以外が同一である改変体は共通の鋳型名を有することとする。これらの9つの改変体を鋳型にしてEUナンバリングで239番目のアミノ酸をGlu、Met、Trp、Serに置換する改変を導入し、参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。なお、鋳型となつた改変体も含めたこれらの改変体群をS239X variantsと呼ぶ。

[0232] [表7]

改変体名	導入した改変	鋳型名
H237-MB373/MRAL-k0	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239D	T1
H237-MB382/MRAL-k0	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239D	T2
H237-MB387/MRAL-k0	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239D	T3
H237-MB397/MRAL-k0	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239D	T4
H237-MB379/MRAL-k0	T230E/P232Y/S238E/S239D	T5
H237-MB389/MRAL-k0	T230E/V231P/P232A/S238E/S239D	T6
H237-MB425/MRAL-k0	T230I/V231P/P232A/S238E/S239D	T7
H237-MB390/MRAL-k0	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D	T8
H237-MB432/MRAL-k0	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239D	T9

[0233] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。変異を導入していないH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を、各S239X variantsのmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値を各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。横軸に各S239X variantsのmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A（mFc γ RII選択性）、縦軸に各S239X variantsのmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図6）。この時、EUナンバリングで239番目のアミノ酸がAsp（D）の場合は●、Glu（E）の場合は■、Met（M）の場合は◆、Ser（S）の場合は▲、Trp（W）の場合は▼で表示した。また、EUナンバリングで239

番目のアミノ酸の種類が各鋳型に及ぼす効果を比較するために、以下の方法で図7を作成した。横軸の下段にはEUナンバリングで239番目のアミノ酸を、上段には鋳型名を示し、縦軸にはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各S239X variantsの相対的mFc γ RII結合活性（■）および相対的I/A（mFc γ RII選択性）（□）をそれぞれ表示した。

[0234] 本検討で評価した全てのS239X variantsについて、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A（mFc γ RII選択性）を表8に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表8における改変は、いずれもマウスIgG1（mIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0235]

[表8]

名称 (CH)	導入した改変	EU ナン バリング 239 番 目の アミノ酸	鋸 型 名	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1 を 1 とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1 を 1 とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1 を 1 とした 場合)
mlgG1	-		S	1.0	1.0	1.0
MB373	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239D	D	T1	390.4	15.5	25.2
MB382	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239D		T2	320.7	12.3	26.2
MB387	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239D		T3	318.7	16.7	19.1
MB397	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239D		T4	554.8	19.3	28.9
MB379	T230E/P232Y/S238E/S239D		T5	273.4	12.2	22.5
MB389	T230E/V231P/P232A/S238E/S239D		T6	244.8	7.0	35.3
MB425	T230I/V231P/P232A/S238E/S239D		T7	194.3	5.5	35.2
MB390	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D		T8	521.7	11.9	44.0
MB432	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239D		T9	342.8	10.7	32.2
MB468	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239E	E	T1	63.1	2.8	22.2
MB469	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239E		T2	57.1	2.8	20.3
MB470	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239E		T3	63.8	4.9	13.1
MB471	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239E		T4	91.4	4.8	18.9
MB472	T230E/P232Y/S238E/S239E		T5	39.4	2.5	15.9
MB473	T230E/V231P/P232A/S238E/S239E		T6	57.6	1.4	40.1
MB474	T230I/V231P/P232A/S238E/S239E		T7	42.9	1.1	37.6
MB475	T230E/V231P/P232N/S238E/S239E		T8	214.4	3.5	62.0
MB476	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E		T9	245.8	3.4	73.4
MB508	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239M	M	T1	5.5	0.4	14.5
MB509	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239M		T2	10.7	0.6	18.0
MB510	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239M		T3	6.5	0.6	11.1
MB511	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239M		T4	8.3	0.6	15.0
MB512	T230E/P232Y/S238E/S239M		T5	3.5	0.3	12.7
MB513	T230E/V231P/P232A/S238E/S239M		T6	46.3	0.6	83.8
MB514	T230I/V231P/P232A/S238E/S239M		T7	4.5	0.2	22.3
MB515	T230E/V231P/P232N/S238E/S239M		T8	165.0	1.7	100.0
MB516	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239M		T9	38.6	1.6	24.3
MB481	T230E/V231A/P232Y/S238E	S	T1	8.5	0.6	14.1
MB482	T230E/V231D/P232Y/S238E		T2	14.1	0.7	21.1
MB483	T230E/V231N/P232Y/S238E		T3	9.4	0.9	10.8
MB484	T230E/V231T/P232Y/S238E		T4	14.9	1.1	14.1
MB485	T230E/P232Y/S238E		T5	5.0	0.5	10.2
MB486	T230E/V231P/P232A/S238E		T6	28.1	1.1	25.8
MB487	T230I/V231P/P232A/S238E		T7	6.8	0.5	13.5
MB488	T230E/V231P/P232N/S238E		T8	28.7	1.8	15.6
MB489	T230Q/V231P/P232N/S238E		T9	6.9	1.1	6.3

MB517	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239W	W	T1	1.2	0.4	3.0
MB518	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239W		T2	1.2	0.4	2.8
MB519	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239W		T3	1.0	0.9	1.2
MB520	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239W		T4	1.8	1.3	1.4
MB521	T230E/P232Y/S238E/S239W		T5	1.6	0.7	2.1
MB522	T230E/V231P/P232A/S238E/S239W		T6	1.5	0.1	10.3
MB523	T230I/V231P/P232A/S238E/S239W		T7	0.5	0.1	4.6
MB524	T230E/V231P/P232N/S238E/S239W		T8	10.0	0.3	29.8
MB525	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239W		T9	2.8	0.3	10.3

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0236] 図7の結果より、EUナンバリングで239番目のアミノ酸に同じ置換を導入した際のmFc γ RII結合活性の順序は各鑄型においてほぼ共通しているが、その変化の程度は鑄型によって大きく異なり、また選択性の変化には共通の挙動は観察されていない。これらのS239X variantsはS238E改変を共通して持ち、これ以外にEUナンバリングで230番目、231番目、232番目、および239番目のいくつかに改変を有している。よって、EUナンバリングで239番目のアミノ酸置換の効果は、EUナンバリングで230番目、231番、および232番目のアミノ酸の種類の影響を受けていることが明らかとなった。

[0237] 図6、図7、表8の結果から、EUナンバリングで239番目のアミノ酸をGluやMet、Ser、Trpに置換することで、実施例4で得られていたS239D改変を含む改変体と比べてmFc γ RIIに対する結合活性は減弱するものの、相対的I/A (mFc γ RII選択性) を維持あるいは向上させる改変体が新たにいくつか見出された。これらの改変体の中には、mFc γ RIIIに対する結合活性の増強が2倍に満たない改変体も含まれ、これらのFc変異体を用いることでmFc γ RIIIに対する結合活性増強の影響をほぼ排除した上で、より正確にmFc γ RIIに対する結合活性増強の効果を評価することが可能となることが示唆された。また、H237-MB475/MRAL-k0 (H237-mIgG1/MRAL-k0 にT230E、V231P、P232N、S238E、S239E改変を導入)、H237-MB476/MRAL-k0 (H237-mIgG1/MRAL-k0にT230Q、V231P、P232N、S238E、S239E改変を導入)、H237-MB513/MRAL-k0 (H237-mIgG1/MRA

L-k0にT230E、V231P、P232A、S238E、S239M改変を導入)、H237-MB515/MRAL-k0 (H237-mIgG1/MRAL-k0にT230E、V231P、P232N、S238E、S239M改変を導入)の4つの改変体は、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的I/A (mFc γ RII選択性) が各々62.1倍、73.4倍、83.9倍、100倍を示しており、これまで最も選択性の高かったH237-MB390/MRAL-k0の44倍を大きく上回った。

[0238] 参考のために、H237-mIgG1/MRAL-k0、およびH237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際のmFc γ RIIに対する相対的結合活性が200倍以上、あるいは相対的I/A (mFc γ RII選択性) が25倍以上を示した改変体について、各mFc γ Rに対するKD値およびI/A (mFc γ RII選択性) を表9に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング00番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表9における改変は、いずれもマウスIgG1 (mIgG1) のH鎖定常領域 (配列番号 : 4) に対して導入された改変である。

[0239] [表9]

名称 (CH)	導入した改変	KD (mFc γ R2)	KD (mFc γ R3)	I/A (mFc γ RII 選択性)
mIgG1	-	2.10E-07	2.82E-07	1.3
MB373	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239D	5.38E-10	1.82E-08	33.8
MB379	T230E/P232Y/S238E/S239D	7.68E-10	2.32E-08	30.2
MB382	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239D	6.55E-10	2.30E-08	35.1
MB387	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239D	6.59E-10	1.69E-08	25.6
MB389	T230E/V231P/P232A/S238E/S239D	8.58E-10	4.06E-08	47.3
MB390	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D	4.03E-10	2.37E-08	59.0
MB397	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239D	3.79E-10	1.46E-08	38.7
MB425	T230I/V231P/P232A/S238E/S239D	1.08E-09	5.10E-08	47.2
MB432	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239D	6.13E-10	2.64E-08	43.1
MB473	T230E/V231P/P232A/S238E/S239E	3.65E-09	1.96E-07	53.8
MB474	T230I/V231P/P232A/S238E/S239E	4.89E-09	2.47E-07	50.4
MB475	T230E/V231P/P232N/S238E/S239E	9.79E-10	8.14E-08	83.1
MB476	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E	8.54E-10	8.40E-08	98.3
MB486	T230E/V231P/P232A/S238E	7.47E-09	2.58E-07	34.5
MB513	T230E/V231P/P232A/S238E/S239M	4.53E-09	5.09E-07	112.4
MB515	T230E/V231P/P232N/S238E/S239M	1.27E-09	1.71E-07	133.9
MB524	T230E/V231P/P232N/S238E/S239W	2.10E-08	8.37E-07	39.9

(I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値)

[0240] [実施例6] EUナンバリングで230番目、231番目、232番目、238番目、239番目以外におけるアミノ酸置換の検討

これまでEUナンバリングで230番目、231番目、232番目、238番目、239番目のアミノ酸の置換検討を実施してきたが、さらなる $mFc\gamma RII$ 結合活性の増強を目的として、上述以外の部位のアミノ酸置換を検討した。

[0241] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。実施例4においてH237- m IgG1/MRAL-k0と比較して500倍以上の相対的 $mFc\gamma RII$ 結合活性増強を示したH237-MB397/MRAL-k0およびH237-MB390/MRAL-k0を鑄型にし、新たに改変を導入した改変体群をそれぞれMB397 variantsおよびMB390 variantsと呼ぶ。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法により $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合を評価した。

[0242] それぞれの $mFc\gamma R$ との相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。鑄型として使用したH237-MB397/MRAL-k0あるいはH237-MB390/MRAL-k0の $mFc\gamma R$ に対するKD値を各々のvariantsの $mFc\gamma R$ に対するKD値で割り、得られた値をH237-MB397/MRAL-k0あるいはH237-MB390/MRAL-k0を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的な結合活性の指標とした。横軸に各variantsの $mFc\gamma RIII$ に対する相対的な結合活性の値、縦軸に各 variantsの $mFc\gamma RII$ に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図8：MB397 variants、図9：MB390 variants）。

[0243] また、H237- m IgG1/MRAL-k0あるいはH237-MB397/MRAL-k0を1とした場合の、評価した全てのMB397 variantsの各 $mFc\gamma R$ に対する相対的結合活性および相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を表10に示した。同様に、H237- m IgG1/MRAL-k0あるいはH237-MB390/MRAL-k0を1とした場合の、評価した全てのMB390 varian

tsの各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A (mFc γ RII選択性) を表11に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域 (CH) の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表10における改変は、いずれもMB397のH鎖定常領域 (配列番号：5) に対して導入された改変であり、表11における改変は、いずれもMB390のH鎖定常領域 (配列番号：6) に対して導入された改変である。

[0244] [表10]

名称 (CH)	MB397 に対して 追加した 改変	相対的 mFc γ RII 結合活性 (MB397 を1とした 場合)	相対的 mFc γ RIII 結合活性 (MB397 を1とした 場合)	相対的 I/A (mFc γ RII 選択性) (MB397 を1とした 場合)	相対的 mFc γ RII 結合活性 (mlgG1 を1とした 場合)	相対的 mFc γ RIII 結合活性 (mlgG1 を1とした 場合)	相対的 I/A (mFc γ RII 選択性) (mlgG1 を1とした 場合)
MB397	-	1.00	1.00	1.00	554.8	19.3	28.9
MB439	S267E	0.07	0.23	0.30	39.5	4.5	8.8
MB440	P271L	0.22	0.36	0.61	120.1	6.9	17.5
MB441	A330K	0.07	0.21	0.34	39.7	4.1	9.7
MB442	K334R	1.60	1.39	1.14	884.2	26.9	33.0
MB443	F296E	0.44	0.79	0.55	243.3	15.3	15.9
MB444	F296N	0.42	0.67	0.62	231.1	12.9	17.9
MB445	F296T	0.40	0.68	0.58	220.3	13.2	16.7
MB446	S298L	2.45	3.30	0.74	1360.1	63.7	21.4
MB447	S298M	1.10	1.63	0.67	608.0	31.4	19.4
MB448	N324D	0.95	1.30	0.73	525.1	25.1	20.9
MB449	N324L	0.28	0.56	0.50	154.3	10.7	14.4
MB450	N324M	0.68	1.18	0.58	376.6	22.7	16.6
MB451	A330G	0.11	0.50	0.22	60.1	9.7	6.2
MB452	A330Q	0.08	0.23	0.37	46.9	4.4	10.8
MB453	P331D	0.21	0.49	0.43	117.8	9.5	12.4
MB454	P331F	0.53	1.04	0.51	295.0	20.0	14.8
MB455	P331Y	0.60	1.38	0.43	331.7	26.6	12.5
MB456	E333N	0.12	0.23	0.53	67.9	4.5	15.2
MB457	E333Y	0.36	0.70	0.52	202.1	13.6	14.9
MB458	E333V	0.46	0.81	0.56	252.6	15.7	16.2
MB459	T335N	0.51	1.06	0.48	285.0	20.5	13.9
MB460	T335Y	0.60	1.10	0.54	331.6	21.2	15.7
MB461	S337I	0.45	0.97	0.46	246.9	18.8	13.2
MB462	S337K	0.39	0.78	0.49	213.9	15.1	14.2
MB463	S337W	0.55	1.12	0.49	307.2	21.6	14.3
MB464	S267A	0.16	0.39	0.40	88.5	7.6	11.7
MB465	Q295L	0.35	0.77	0.45	192.3	15.0	12.9
MB466	A326D	0.81	1.66	0.49	449.1	32.0	14.1
MB467	A327G	0.49	0.99	0.49	270.8	19.2	14.2

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0あるいはH237-MB397/MRAL-k0の各m

$\text{Fc}\gamma\text{R}$ に対するKD値を各改変体の各 $\text{mFc}\gamma\text{R}$ に対するKD値で割った値、
相対的I/A ($\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 選択性)：各改変体のI/A ($\text{mFc}\gamma\text{RIII}$ に対するKD値を $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ に対するKD値で割った値) をH237- $\text{mIgG1}/\text{MRAL-k0}$ あるいはH237-MB397/ MRAL-k0 のI/Aで割った値)

[0245] [表11]

名称 (CH)	MB390 に対して 追加した改変	相対的 $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 結合活性 (MB390 を1とし た場合)	相対的 $\text{mFc}\gamma\text{RIII}$ 結合活性 (MB390 を1とし た場合)	相対的 I/A ($\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 選択性) (MB390 を1とし た場合)	相対的 $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 結合活性 (mlgG1 を1とし た場合)	相対的 $\text{mFc}\gamma\text{RIII}$ 結合活性 (mlgG1 を1とし た場合)	相対的 I/A ($\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 選択性) (mlgG1 を1とし た場合)
MB390		1.00	1.00	1.00	521.7	11.9	44.0
MB477	S267A	0.38	0.25	1.49	195.7	3.0	65.3
MB478	Q295L	0.49	0.39	1.23	254.2	4.7	54.3
MB479	A326D	1.41	1.16	1.21	733.8	13.8	53.2
MB480	K334R	0.98	0.85	1.15	511.3	10.2	50.4
MB490	S298L	2.16	2.90	0.74	1127.8	34.6	32.7
MB491	S298M	0.92	1.05	0.87	478.0	12.4	38.5
MB492	N324D	1.19	0.92	1.29	621.5	10.9	57.0
MB493	S298L/N324D	2.73	3.77	0.72	1423.7	44.9	31.8
MB494	S298L/K334R	4.05	4.99	0.81	2111.4	59.4	35.6
MB495	S298M/N324D	1.20	1.45	0.82	623.1	17.2	36.3
MB496	S298M/K334R	1.70	1.71	0.99	883.5	20.3	43.6
MB497	N324D/K334R	1.48	1.32	1.12	772.6	15.7	49.3
MB498	S298L/N324D/K334R	6.40	7.15	0.89	3335.5	85.1	39.3
MB499	S298M/N324D/K334R	1.90	2.03	0.93	992.0	24.2	41.1

(相対的な結合活性：H237- $\text{mIgG1}/\text{MRAL-k0}$ あるいはH237-MB390/ MRAL-k0 の各 $\text{mFc}\gamma\text{R}$ に対するKD値を各改変体の各 $\text{mFc}\gamma\text{R}$ に対するKD値で割った値、
相対的I/A ($\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 選択性)：各改変体のI/A ($\text{mFc}\gamma\text{RIII}$ に対するKD値を $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ に対するKD値で割った値) をH237- $\text{mIgG1}/\text{MRAL-k0}$ あるいはH237-MB390/ MRAL-k0 のI/Aで割った値)

[0246] これらの結果（図8、図9、表10、表11）から、S298L、S298M、N324D、A326D、K334R の内の1つまたは2つ以上の改変を導入することにより、I/A ($\text{mFc}\gamma\text{RII}$ 選択性) を大きく減弱させることなく $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ に対する結合活性は増強され、これらの改変が $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ に対する結合活性の増強に有効であることが新たに見出された。実施例5で見出された選択性の高い改変体（H237-MB475/MRAL-k0、H237-MB476/MRAL-k0、H237-MB513/MRAL-k0、H237-MB515/MRA L-k0）にこれらの改変を導入することにより、高い選択性を維持した上で、より $\text{mFc}\gamma\text{RII}$ に対する結合活性が増強されることが期待される。

[0247] [実施例 7] $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有する抗体の *in vivo* における血漿中濃度推移の評価

[0248] (7-1) $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したマウス抗体の血漿中濃度推移の評価

これまでの実施例の中で、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有する抗体が取得されてきた。 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有する抗体では、 $mFc\gamma RII$ だけでなく、 $mFc\gamma RIII$ に対する結合活性も $mFc\gamma RII$ と同程度に増強したFc変異体を有する抗体と比較して、*in vivo* 血漿中における抗体の濃度推移がどのように変化するのかを検証するために、ノーマルマウスを使って以下の試験を実施した。

[0249] (7-2) $Fc\gamma R$ に対する結合活性を増強した抗体の作製

抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用し、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通して使用した。H鎖定常領域が $mIgG1$ であるH237- $mIgG1$ （配列番号：7）とMRAL-k0からなる抗ヒトIL-6レセプター抗体H237- $mIgG1/MRAL-k0$ 、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有するH237-MB367（配列番号：8）とMRAL-k0からなる抗ヒトIL-6レセプター抗体H237-MB367/MRAL-k0、 $mFc\gamma RII$ および $mFc\gamma RIII$ に対する結合活性を増強する目的で、 $mIgG1$ のEUナンバリングで239番目のSerをAspに置換し、327番目のAlaをAspに置換したFc変異体を有するH237- $mF46$ （配列番号：9）とMRAL-k0からなる抗ヒトIL-6レセプター抗体H237- $mF46/MRAL-k0$ とを参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法により $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合を評価した。評価した抗体の各 $mFc\gamma R$ に対する結合活性およびI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）を表12に示した。更に、H237- $mIgG1/MRAL-k0$ を1とした場合の、評価した抗体の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的結合活性および相対的I/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）を表13に示した。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表

記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表12および表13における改変は、いずれもH237-mIgG1（配列番号：7）のH鎖定常領域に対して導入された改変である。

[0250] [表12]

抗体名	導入した改変	KD (mFcγRII)	KD (mFcγRIII)	I/A (mFcγRII 選択性)
H237-mIgG1/MRAL-k0	-	2.10E-07	2.82E-07	1.3
H237-MB367/MRAL-k0	T230E/V231A/P232N/ S238E/S239D	1.32E-09	4.54E-08	34.3
H237-mF46/MRAL-k0	S239D/A327D	1.33E-09	6.40E-09	4.8

(I/A (mFcγRII選択性) : 各改変体のmFcγRIIIに対するKD値をmFcγRIIに対するKD値で割った値)

[0251] [表13]

抗体名	導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mIgG1を1 とした場合)
H237-mIgG1/MRAL-k0	-	1.0	1.0	1.0
H237-MB367/MRAL-k0	T230E/V231A/P232N/ S238E/S239D	158.6	6.2	25.6
H237-mF46/MRAL-k0	S239D/A327D	158.5	44.0	3.6

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFcγRに対するKD値を各改変体の各mFcγRに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFcγRII選択性) : 各改変体のI/A (mFcγRIIIに対するKD値をmFcγRIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0252] この結果から、H237-MB367/MRAL-k0はH237-mF46/MRAL-k0と比べて、mFcγRIIに対する結合活性を同程度に増強しつつも、mFcγRIIIに対する結合増強が抑制された、よりmFcγRIIに対して選択的に結合増強したFc変異体を有することが確認された。

[0253] (7-3) ノーマルマウスを用いたin vivo 試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) に可溶型ヒトIL

-6レセプター（参考例3にて作製）を単独投与もしくは可溶型ヒトIL-6レセプターおよび抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体を同時投与した後の抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体の体内動態を評価した。可溶型ヒトIL-6レセプター溶液(5 μg/mL)、もしくは、可溶型ヒトIL-6レセプターと抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体の混合溶液を尾静脈に10mL/kgで投与した。抗体は1mg/kgで可溶型ヒトIL-6レセプターは50 μg/kgの投与量とした。抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体としては、上述のH237-MB367/MRAL-k0、H237-mF46/MRAL-k0のL鎖をW02 009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のL鎖VL3-CK の可変領域であるL104とマウスκ鎖の定常領域であるmk1からなるL104-mk1（配列番号：32）に置き換えたH237-MB367/L104-mk1、H237-mF46/L104-mk1を使用した。抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体投与後5分、7時間、1日、2日、3日、7日、14日、21日が経過した後に当該マウスから採血が行なわれた。採取された血液を直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離した血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0254] (7-4) ELISA法による血漿中抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度はELISA法にて測定された。まず、可溶型ヒトIL-6レセプターをNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4°Cで1晩静置することによって可溶型ヒトIL-6レセプター固相化プレートが作成された。血漿中濃度として2.50、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μg/mLの抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体を含む検量線試料と100倍以上希釀されたマウス血漿測定試料が調製された。これらの検量線試料および血漿測定試料100 μLが各ウェルに分注された可溶型ヒトIL-6レセプター固相化プレートを室温で2時間攪拌させた。その後Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (SIGMA) を室温で2時間反応させた反応液の発色反応が、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて行われた。1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を添加することによって反応が停止された各ウェルの反応液の45

0 nmの吸光度が、マイクロプレートリーダーにて測定された。マウス血漿中の抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。その結果を図10に示す。

[0255] 図10の結果から、mFc γ RIIに対する結合活性が選択的に増強されたH237-MB367/L104-mk1は、mFc γ RIIおよびmFc γ RIIIの両方に対する結合活性が増強されたH237-mF46/L104-mk1と比較して、血漿中において高い濃度推移を示した。このことからH237-mF46/L104-mk1ではH237-MB367/L104-mk1と比べて、mFc γ RIIだけでなく、mFc γ RIIIに対しても結合を増強してしまった結果、mFc γ RIIIを介した抗体の消失が起きてしまっていると考えられる。すなわち、このように選択性の低い分子を用いることでは、マウスFc γ RII（ヒトではFc γ RIIb）に対して選択的に結合活性を増強した分子の効果を正しく検証することができないと考えられる。MB367のようなmFc γ RIIに対して選択的に結合活性を増強したFc変異体を用いることで、より正確にマウスFc γ RII（ヒトではFc γ RIIb）に対して選択的に結合活性を増強した効果をin vivoにおいて検証することが可能であることが明らかとなった。

[0256] [実施例8] mFc γ RIIに対する結合活性を選択的に増強した改変体の作製
(8-1) H237-MB476/MRAL-k0およびH237-MB515/MRAL-k0に対する改変追加の検討

高い選択性を有したままmFc γ RIIに対する結合活性が増強したFcを得ることを目的として、実施例5で見出された選択性の高い2つの改変体（H237-MB476/MRAL-k0、H237-MB515/MRAL-k0）に対して、実施例6で見出したS298L、N324D、A326D、K334Rの内の1つまたは2つ以上の改変を導入する検討を実施した。

[0257] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。H237-MB476/MRAL-k0およびH237-MB515/MRAL-k0を鋳型にして新たに改変を導入した。これらの改変体

を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりこれらの改変体のmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0258] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。鋳型として使用したH237-MB476/MRAL-k0あるいはH237-MB515/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-MB476/MRAL-k0あるいはH237-MB515/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A (mFc γ RII選択性) を、H237-MB476/MRAL-k0あるいはH237-MB515/MRAL-k0のI/A (mFc γ RII選択性) で割った値を、H237-MB476/MRAL-k0あるいはH237-MB515/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の指標とした。横軸に各改変体の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の値、縦軸に各改変体のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した(図13)。また、同様にして、変異を導入していないH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合についても、横軸に各改変体の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の値、縦軸に各改変体のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した(図14)。

[0259] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-mIgG1/MRAL-k0あるいは各template (H237-MB476/MRAL-k0あるいはH237-MB515/MRAL-k0) を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A (mFc γ RII選択性) を表14に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域(CH) の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表14における改変は、各templateであるMB476のH鎖定常領域(配列番号：37)あるいはMB515のH鎖定常領域(配列番号：38)に対して導入された改変である。

[0260]

[表14]

名称(CH)	template	templateに対して追加した改変	相対的mFcγRII結合活性(templateを1とした場合)	相対的mFcγRIII結合活性(templateを1とした場合)	相対的I/A(mFcγRII選択性)(templateを1とした場合)	相対的mFcγRII結合活性(mlgG1を1とした場合)	相対的mFcγRIII結合活性(mlgG1を1とした場合)	相対的I/A(mFcγRII選択性)(mlgG1を1とした場合)
MB476	MB476	-	1.00	1.00	1.00	261.2	2.6	99.0
MB526		S298L	0.89	3.23	0.28	232.4	8.5	27.3
MB527		S298L/N324D	1.05	2.09	0.50	273.3	5.5	49.5
MB528		S298L/A326D	1.44	5.52	0.26	375.3	14.6	25.7
MB529		S298L/K334R	1.08	2.24	0.48	281.9	5.9	47.7
MB530		N324D/A326D	2.38	3.04	0.78	622.6	8.0	77.6
MB531		N324D/K334R	0.88	1.25	0.70	228.8	3.3	69.1
MB532		A326D/K334R	1.26	2.35	0.54	328.6	6.2	53.0
MB533		S298L/N324D/A326D	1.51	2.74	0.55	393.6	7.2	54.5
MB534		S298L/N324D/K334R	1.61	12.79	0.13	420.7	33.8	12.5
MB535		S298L/A326D/K334R	1.61	3.21	0.50	421.7	8.5	49.8
MB536		N324D/A326D/K334R	1.52	2.90	0.52	396.0	7.7	51.7
MB537		S298L/N324D/A326D/K334R	1.95	3.36	0.58	510.1	8.9	57.4
MB515	MB515	-	1.00	1.00	1.00	137.3	1.3	104.4
MB538		S298L	0.63	1.30	0.48	86.2	1.7	50.3
MB539		S298L/N324D	0.77	1.45	0.53	105.1	1.9	55.0
MB540		S298L/A326D	1.09	2.15	0.51	149.4	2.8	52.7
MB541		S298L/K334R	0.75	2.48	0.30	103.0	3.3	31.6
MB542		N324D/A326D	2.80	2.57	1.09	384.2	3.4	113.7
MB543		N324D/K334R	1.42	1.69	0.84	195.3	2.2	87.7
MB544		A326D/K334R	2.01	2.45	0.82	276.2	3.2	85.6
MB545		S298L/N324D/A326D	1.19	2.02	0.59	163.4	2.7	61.6
MB546		S298L/N324D/K334R	1.15	4.28	0.27	158.1	5.6	28.1
MB547		S298L/A326D/K334R	1.24	3.43	0.36	170.3	4.5	37.7
MB548		N324D/A326D/K334R	2.60	2.99	0.87	356.7	3.9	90.9
MB549		S298L/N324D/A326D/K334R	1.53	4.11	0.37	210.0	5.4	38.9

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0あるいはH237-MB476/MRAL-k0、H237-MB515/MRAL-k0の各mFcγRに対するKD値を各改変体の各mFcγRに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFcγRII選択性) : 各改変体のI/A (mFcγRIIIに対するKD値をmFcγRIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0あるいはH237-MB476/MRAL-k0、H237-MB515/MRAL-k0のI/Aで割った値)

- [0261] これらの結果(図13、図14、表14)から、S298L、N324D、A326D、K334Rの内の1つまたは2つ以上の改変を導入することにより、I/A (mFcγRII選択性)を大きく減弱させることなくmFcγRIIに対する結合活性を増強する改変体がいくつか見出された。この内、H237-MB530/MRAL-k0(H237-MB476/MRAL-k0にN324D/A326D改変を導入)、H237-MB542/MRAL-k0(H237-MB515/MRAL-k0にN324D/A326D改変を導入)、H237-MB548/MRAL-k0(H237-MB515/MRAL-k0にN324D/A326D/K334R改変を導入)、H237-MB544/MRAL-k0(H237-MB515/MRAL-k0に

A326D/K334R改変を導入）、H237-MB543/MRAL-k0（H237-MB515/MRAL-k0にN324D/K334R改変を導入）は各templateを1とした場合の 相対的I/A（mFc γ RII選択性）を0.75倍以上維持した上で、相対的mFc γ RII結合活性を1.4倍以上増強していた。

[0262] 中でも、H237-MB530/MRAL-k0およびH237-MB542/MRAL-k0、H237-MB548/MRAL-k0は、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的mFc γ RII結合活性が350倍以上かつ相対的I/A（mFc γ RII選択性）が70倍以上を示しており、これまでに作製された同程度のmFc γ RII結合活性を持つ改変体と比較してI/A（mFc γ RII選択性）を大きく向上していた。

[0263] (8-2) EUナンバリングで239番目のアミノ酸置換の検討

実施例5で示したように、EUナンバリングで239番目のアミノ酸を置換することでI/A（mFc γ RII選択性）を維持あるいは向上させる改変体を見出すことができた。そこで、実施例5において検討していない他のアミノ酸置換についても検討した。

[0264] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。実施例5で使用したものと同一の9つの改変体（全てEUナンバリングで239番目のアミノ酸はAsp）を鑄型にしてEUナンバリングで239番目のアミノ酸をLeu、Asn、Tyr、Pheに置換する改変を導入した。また、9つの鑄型改変体の内、H237-MB389/MRAL-k0およびH237-MB390/MRAL-k0の2つの鑄型改変体に対しては、EUナンバリングで239番目のアミノ酸をAla、Gly、Val、Ile、Pro、Thr、Gln、Arg、Hisに置換する改変も導入した。また、9つの鑄型改変体の内、H237-MB432/MRAL-k0の鑄型改変体に対しては、EUナンバリングで239番目のアミノ酸をVal、Ileに置換する改変も導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0265] それぞれの $mFc\gamma R$ との相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。EUナンバリングで239番目のアミノ酸の種類が各鑄型に及ぼす効果を比較するために、各鑄型改変体の $mFc\gamma R$ に対するKD値を、それらを鑄型にして作製した各改変体の $mFc\gamma R$ に対するKD値で割って得られた値を、各鑄型改変体を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体の $mFc\gamma RII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値であるI/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を、それぞれの鑄型改変体のI/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) で割った値を、各鑄型改変体を1とした場合の相対的なI/A ($mFc\gamma RI$ I選択性) の指標とした。横軸にEUナンバリングで239番目のアミノ酸を、縦軸に相対的 $mFc\gamma RII$ 結合活性 (■) および相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) (□) を、各鑄型ごとにそれぞれ図示した(図15)。

[0266] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237- $mIgG1/MRAL-k0$ を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的結合活性および相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を表15に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域(CH)の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表15における改変は、いずれもマウスIgG1 ($mIgG1$) のH鎖定常領域(配列番号：4)に対して導入された改変である。

[0267]

[表15]

名称 (CH)	mIgG1 に対して導入した改変	template	EU ナン パリング で 239 番目の アミノ酸	相対的 mFcγRII 結合活性 (mIgG1 を 1 とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mIgG1 を 1 とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mIgG1 を 1 とした 場合)
MB623	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239L	MB373	L	0.53	0.09	5.99
MB624	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239L	MB382	L	0.80	0.10	8.14
MB625	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239L	MB387	L	0.67	0.12	5.53
MB626	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239L	MB397	L	0.81	0.12	6.78
MB627	T230E/P232Y/S238E/S239L	MB379	L	0.32	0.09	3.45
MB628	T230E/V231P/P232A/S238E/S239L	MB389	L	2.20	0.06	35.18
MB629	T230I/V231P/P232A/S238E/S239L	MB425	L	0.38	0.04	9.08
MB630	T230E/V231P/P232N/S238E/S239L	MB390	L	14.31	0.25	57.03
MB631	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239L	MB432	L	4.29	0.28	15.32
MB632	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239N	MB373	N	3.64	0.18	19.97
MB633	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239N	MB382	N	2.77	0.17	16.12
MB634	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239N	MB387	N	2.52	0.21	12.20
MB635	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239N	MB397	N	5.06	0.29	17.54
MB636	T230E/P232Y/S238E/S239N	MB379	N	4.41	0.14	30.84
MB637	T230E/V231P/P232A/S238E/S239N	MB389	N	2.60	0.15	17.48
MB638	T230I/V231P/P232A/S238E/S239N	MB425	N	0.75	0.08	9.02
MB639	T230E/V231P/P232N/S238E/S239N	MB390	N	4.91	0.38	12.98
MB640	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239N	MB432	N	1.06	0.18	5.87
MB641	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239Y	MB373	Y	1.47	0.13	10.98
MB642	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239Y	MB382	Y	1.87	0.08	22.12
MB643	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239Y	MB387	Y	1.66	0.14	11.82
MB644	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239Y	MB397	Y	4.55	0.30	15.32
MB645	T230E/P232Y/S238E/S239Y	MB379	Y	1.17	0.20	5.87
MB646	T230E/V231P/P232A/S238E/S239Y	MB389	Y	4.38	0.15	29.58
MB647	T230I/V231P/P232A/S238E/S239Y	MB425	Y	1.05	0.10	10.48
MB648	T230E/V231P/P232N/S238E/S239Y	MB390	Y	10.75	0.64	16.77
MB649	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239Y	MB432	Y	3.89	0.51	7.63
MB650	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239F	MB373	F	0.24	0.05	4.51
MB651	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239F	MB382	F	0.30	0.04	6.85
MB652	T230E/V231N/P232Y/S238E/S239F	MB387	F	0.28	0.06	4.60
MB653	T230E/V231T/P232Y/S238E/S239F	MB397	F	0.41	0.10	3.95
MB654	T230E/P232Y/S238E/S239F	MB379	F	0.27	0.07	3.73
MB655	T230E/V231P/P232A/S238E/S239F	MB389	F	0.40	0.06	6.99
MB656	T230I/V231P/P232A/S238E/S239F	MB425	F	N.B.	0.02	-
MB657	T230E/V231P/P232N/S238E/S239F	MB390	F	1.77	0.08	21.92
MB658	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239F	MB432	F	0.51	0.06	8.77
MB704	T230E/V231P/P232A/S238E/S239A	MB389	A	14.09	0.87	16.16
MB705	T230E/V231P/P232A/S238E/S239G	MB389	G	8.71	0.75	11.71
MB706	T230E/V231P/P232A/S238E/S239V	MB389	V	0.23	N.B.	-
MB707	T230E/V231P/P232A/S238E/S239I	MB389	I	0.37	N.B.	-
MB708	T230E/V231P/P232A/S238E/S239P	MB389	P	0.28	0.03	8.24
MB709	T230E/V231P/P232A/S238E/S239T	MB389	T	0.61	0.04	16.61
MB710	T230E/V231P/P232A/S238E/S239Q	MB389	Q	50.80	1.22	41.88
MB711	T230E/V231P/P232A/S238E/S239R	MB389	R	0.05	N.B.	-
MB712	T230E/V231P/P232A/S238E/S239H	MB389	H	0.16	N.B.	-
MB713	T230E/V231P/P232N/S238E/S239A	MB390	A	23.48	2.50	9.41
MB714	T230E/V231P/P232N/S238E/S239G	MB390	G	14.16	1.61	8.81
MB715	T230E/V231P/P232N/S238E/S239V	MB390	V	0.89	0.02	37.80

MB716	T230E/V231P/P232N/S238E/S239I	MB390	I	3.98	0.05	86.85
MB717	T230E/V231P/P232N/S238E/S239P	MB390	P	0.41	0.03	12.51
MB718	T230E/V231P/P232N/S238E/S239T	MB390	T	0.85	0.05	16.80
MB719	T230E/V231P/P232N/S238E/S239Q	MB390	Q	70.38	2.31	30.54
MB720	T230E/V231P/P232N/S238E/S239R	MB390	R	0.08	N.B.	-
MB721	T230E/V231P/P232N/S238E/S239H	MB390	H	0.30	N.B.	-
MB792	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239V	MB432	V	0.31	N.B.	-
MB793	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239I	MB432	I	1.17	0.05	22.87

(N. B. : 測定は実施したが、結合が弱すぎるために結合が観察できなかった

、
相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0268] 図15、表15の結果から、全ての改変体においてmFc γ RII結合活性は大きく減少しているが、いくつかの改変体においてはI/A (mFc γ RII選択性) を維持あるいは向上させていた。なお、各鋳型改変体を1とした場合の相対的I/A (mFc γ RII選択性) が0.8倍以上であった改変体は、図15に矢印でCHの名称を記した。I/A (mFc γ RII選択性) を向上させていた改変体の内、H237-MB716/MRAL-k0、H237-MB630/MRAL-k0、H237-MB710/MRAL-k0はH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的I/A (mFc γ RII選択性) が40倍以上であり、高いmFc γ RII選択性を有していた。これらの改変体を鋳型として実施例6や実施例8-1に示した改変などを追加することで、高いmFc γ RII選択性を維持した上でmFc γ RIIに対する結合活性をより増強した改変体が作製できると見込まれる。

[0269] (8-3) H237-MB630/MRAL-k0に対する改変追加の検討

実施例8-2の検討から、新たに高いmFc γ RII選択性を有する改変体を取得した。その内の1つの改変体 (H237-MB630/MRAL-k0) に対して、mFc γ RII結合活性増強を目的として、さらなるアミノ酸置換を検討した。

[0270] 抗体H鎖の可変領域にはWO2009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖

であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。実施例8-2において見出されたH237-MB630/MRAL-k0を鋳型にし、実施例6で検討した改変などを導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0271] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果について、H237-MB630/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-MB630/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A（mFc γ RII選択性）を、H237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0のI/A（mFc γ RII選択性）で割った値を、H237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A（mFc γ RII選択性）の指標とした。横軸にH237-MB630/MRAL-k0を1とした場合の各改変体のmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸にH237-MB630/MRAL-k0を1とした場合の各改変体のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図16）。

。

[0272] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-MB630/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A（mFc γ RII選択性）を表16に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表16における改変は、いずれもMB630のH鎖定常領域（配列番号：39）に対して導入された改変である。

[0273]

[表16]

名称 (CH)	MB630 に対して 追加した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (MB630 を1とし た場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (MB630 を1とし た場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (MB630 を1とし た場合)	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1 を1とし た場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1 を1とし た場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1 を1とし た場合)
MB748	S267A	0.70	0.70	1.00	11.7	0.14	85.8
MB749	Q295L	1.52	1.96	0.78	25.3	0.38	66.5
MB750	A326D	1.77	2.06	0.86	29.4	0.40	73.8
MB751	K334R	1.53	1.63	0.94	25.4	0.32	80.5
MB752	S298L	0.36	0.44	0.81	6.0	0.09	69.7
MB753	S298M	0.34	0.34	1.01	5.7	0.07	86.4
MB754	N324D	1.26	1.28	0.99	21.0	0.25	84.5
MB755	S298L/N324D	0.45	0.58	0.78	7.6	0.11	67.1
MB756	S298L/K334R	0.64	1.09	0.59	10.6	0.21	50.3
MB757	S298M/N324D	0.46	0.45	1.01	7.6	0.09	86.8
MB758	S298M/K334R	0.59	0.69	0.86	9.8	0.13	73.4
MB759	N324D/K334R	2.03	2.25	0.91	33.8	0.44	77.6
MB760	S298L/N324D/K334R	0.85	1.42	0.60	14.1	0.28	51.2
MB761	S298M/N324D/K334R	0.81	0.92	0.87	13.4	0.18	74.9
MB762	F296E	0.40	0.51	0.79	4.4	0.09	49.9
MB763	F296N	0.31	0.41	0.76	3.4	0.07	47.9
MB764	F296T	0.23	0.32	0.71	2.5	0.05	45.3
MB765	N324L	0.49	0.64	0.76	5.3	0.11	48.3
MB766	N324M	1.29	1.55	0.83	14.0	0.27	52.8
MB767	A330G	0.16	0.19	0.88	1.8	0.03	55.9
MB768	A330Q	0.50	0.81	0.61	5.4	0.14	38.9
MB769	P331D	0.31	0.38	0.82	3.3	0.06	51.7
MB770	P331F	1.23	1.40	0.88	13.3	0.24	55.5
MB771	P331Y	1.27	1.53	0.83	13.8	0.26	52.7
MB772	E333N	0.32	0.42	0.76	3.5	0.07	47.9
MB773	E333Y	1.17	1.25	0.93	12.7	0.22	59.2
MB774	E333V	0.87	1.05	0.83	9.4	0.18	52.4
MB775	T335N	0.84	1.02	0.82	9.1	0.18	52.0
MB776	T335Y	1.04	1.15	0.90	11.3	0.20	57.1
MB777	S337I	0.74	0.72	1.02	9.7	0.17	58.2
MB778	S337K	0.57	0.65	0.88	6.1	0.11	55.4
MB779	S337W	0.92	1.02	0.91	10.0	0.18	57.3
MB780	A327G	1.86	2.29	0.81	20.2	0.39	51.4
MB781	A330K	0.48	0.77	0.62	5.2	0.13	39.1
MB782	Q295L/N324D	1.96	2.89	0.68	21.3	0.50	42.9
MB783	Q295L/A326D	2.82	4.34	0.65	30.6	0.75	41.2
MB784	Q295L/K334R	1.36	2.24	0.61	14.7	0.38	38.4
MB785	N324D/A326D	2.29	2.85	0.81	24.9	0.49	51.1

MB786	A326D/K334R	2.50	3.33	0.75	27.2	0.57	47.6
MB787	Q295L/N324D/A326D	3.55	5.57	0.64	38.5	0.96	40.3
MB788	Q295L/N324D/K334R	2.06	3.46	0.60	22.4	0.59	37.8
MB789	Q295L/A326D/K334R	2.84	4.79	0.59	30.9	0.82	37.6
MB790	N324D/A326D/K334R	3.08	4.09	0.75	33.5	0.70	47.8
MB791	Q295L/N324D/A326D/K334R	3.70	6.43	0.58	40.1	1.10	36.4
MB807	Q295L/N324M	1.67	2.11	0.79	21.9	0.49	45.1
MB808	Q295L/A327G	2.22	3.40	0.65	29.2	0.78	37.3
MB809	Q295L/P331F	1.44	1.92	0.75	19.0	0.44	43.0
MB810	Q295L/P331Y	1.58	2.24	0.71	20.8	0.52	40.3
MB811	Q295L/E333Y	1.69	1.87	0.90	22.2	0.43	51.6
MB812	N324D/A327G	2.54	2.93	0.87	33.4	0.68	49.6
MB813	N324D/P331F	1.24	1.29	0.96	16.3	0.30	55.0
MB814	N324D/P331Y	1.37	1.48	0.93	18.0	0.34	52.9
MB815	N324D/E333Y	1.34	1.30	1.02	17.6	0.30	58.5
MB816	N324M/A326D	2.31	2.84	0.82	30.4	0.65	46.6
MB817	N324M/A327G	2.17	2.27	0.95	28.5	0.52	54.6
MB818	N324M/P331F	1.19	1.25	0.95	15.6	0.29	54.3
MB819	N324M/P331Y	1.38	1.40	0.98	18.1	0.32	56.1
MB820	N324M/E333Y	1.49	1.43	1.04	19.5	0.33	59.3
MB821	N324M/K334R	1.86	1.96	0.95	24.4	0.45	54.3
MB822	A326D/A327G	3.33	4.02	0.83	43.8	0.93	47.4
MB823	A326D/P331F	1.90	2.13	0.90	25.0	0.49	51.2
MB824	A326D/P331Y	2.13	2.45	0.87	28.0	0.56	49.6
MB825	A326D/E333Y	2.16	2.17	1.00	28.4	0.50	57.0
MB826	A327G/P331F	1.41	1.48	0.95	18.5	0.34	54.5
MB827	A327G/P331Y	1.63	1.64	0.99	21.5	0.38	56.8
MB828	A327G/E333Y	2.16	2.14	1.01	28.4	0.49	57.6
MB829	A327G/K334R	2.57	2.75	0.93	33.8	0.63	53.4
MB830	P331F/E333Y	0.37	0.36	1.01	4.8	0.08	57.7
MB831	P331F/K334R	1.70	1.71	0.99	22.3	0.39	56.8
MB832	P331Y/E333Y	0.40	0.40	0.99	5.2	0.09	56.3
MB833	P331Y/K334R	1.92	1.94	0.99	25.3	0.45	56.5
MB834	E333Y/K334R	1.29	1.25	1.03	17.0	0.29	58.9
MB835	K268D	2.00	3.05	0.66	26.3	0.70	37.4
MB846	K268D/A326D/A327G	6.80	11.57	0.59	72.1	2.12	34.1
MB847	Q295L/A326D/A327G	4.12	7.24	0.57	43.7	1.33	33.0
MB848	N324D/A326D/A327G	4.33	5.00	0.86	45.8	0.92	50.1
MB849	A326D/A327G/P331Y	2.97	3.54	0.84	31.4	0.65	48.6
MB850	A326D/A327G/E333Y	4.12	4.30	0.96	43.7	0.79	55.5
MB851	A326D/A327G/K334R	4.13	5.23	0.79	43.8	0.96	45.9
MB852	Q295L/N324D/A326D/A327G	5.76	10.02	0.58	61.0	1.83	33.4
MB853	Q295L/A326D/A327G/P331Y	3.31	6.20	0.53	35.0	1.13	31.0

MB854	Q295L/A326D/A327G/E333Y	4.77	6.84	0.70	50.6	1.25	40.5
MB855	Q295L/A326D/A327G/K334R	3.41	6.21	0.55	36.2	1.14	31.9
MB856	N324D/A326D/A327G/P331Y	4.23	4.95	0.85	44.8	0.91	49.5
MB857	N324D/A326D/A327G/E333Y	4.21	4.92	0.85	44.6	0.90	49.6
MB858	N324D/A326D/A327G/K334R	5.86	6.92	0.85	62.0	1.27	49.1
MB859	A326D/A327G/P331Y/K334R	3.22	3.90	0.83	34.2	0.71	48.0
MB860	A326D/A327G/E333Y/K334R	3.74	4.07	0.92	39.6	0.75	53.3
MB861	K268D/N324D/A326D/A327G	7.25	13.18	0.55	76.8	2.41	31.9
MB862	K268D/A326D/A327G/P331Y	6.41	10.83	0.59	67.9	1.98	34.4
MB863	K268D/A326D/A327G/E333Y	7.68	12.71	0.60	81.3	2.33	35.0
MB864	K268D/A326D/A327G/K334R	10.42	19.86	0.52	110.4	3.63	30.4
MB865	K268D/Q295L/A326D/A327G	7.91	18.26	0.43	83.8	3.34	25.1

(相対的な結合活性 : H237-MB630/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各変異体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各変異体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-MB630/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0274] 図16、表16の結果から、H237-MB630/MRAL-k0に新たにアミノ酸置換を導入することにより、mFc γ RII選択性が減弱するもののmFc γ RII結合活性が増強した検体が数多く見出された。また、高いmFc γ RII選択性を維持したままmFc γ RII結合活性が増強あるいは減弱した変異体もいくつか見出された。

[0275] (8-4) H237-MB716/MRAL-k0に対する変異追加の検討

実施例8-2の検討においてH237-MB630/MRAL-k0 (EUナンバリングで239番目のアミノ酸がLeu) よりも高いmFc γ RII選択性を有することが示されていたH237-MB716/MRAL-k0 (EUナンバリングで239番目のアミノ酸がIle) に対しても、さらなるアミノ酸置換を検討した。実施例8-3において、H237-MB630/MRAL-k0に対して導入することでmFc γ RII結合活性の増強が見られた変異の中から7つの変異 (K268D、Q295L、N324D、A326D、A327G、E333Y、K334R) を選び、これらの変異を組み合わせて導入する検討を実施した。

[0276] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237 (配列番号 : 1) を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0 (配列番号 : 2) を共通に使用した。H237-MB716/MRAL-k0を鑄

型にして改変を導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果についてH237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A (mFc γ RII選択性) を、H237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の指標とした。横軸にH237-MB716/MRAL-k0を1とした場合の各改変体のmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸にH237-MB716/MRAL-k0を1とした場合の各改変体のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した(図17)。

[0277] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A (mFc γ RII選択性) を表17に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域(CH)の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表17における改変は、いずれもMB716のH鎖定常領域(配列番号：47)に対して導入された改変である。

[0278]

[表17]

名称 (CH)	MB716 に対して 追加した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (MB716 を1とし た場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (MB716 を1とし た場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (MB716 を1とし た場合)	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1 を1とし た場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1 を1とし た場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1 を1とし た場合)
MB866	A326D/A327G	3.0	3.02	0.99	12.96	0.18	72.42
MB867	K268D/A326D/A327G	8.1	14.35	0.57	35.23	0.85	41.41
MB868	K268D/N324D/A326D/ A327G	8.4	14.45	0.58	36.63	0.86	42.76
MB869	K268D/A326D/A327G/ E333Y	9.4	15.85	0.60	41.01	0.94	43.65
MB870	K268D/A326D/A327G/ K334R	8.9	17.64	0.50	38.60	1.05	36.92
MB871	K268D/Q295L/A326D/ A327G	14.2	28.17	0.51	61.82	1.67	37.02
MB875	K268D/Q295L/N324D/ A326D/A327G	16.8	32.31	0.52	72.84	1.92	38.03
MB876	K268D/Q295L/A326D/ A327G/E333Y	13.5	24.85	0.54	58.66	1.48	39.81
MB877	K268D/N324D/A326D/ A327G/K334R	12.7	24.36	0.52	55.26	1.45	38.26

(相対的な結合活性 : H237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、
相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-MB716/MRAL-k0あるいはH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0279] 図17、表17の結果から、実施例8-3で見られた場合と同様に、H237-MB716/MRAL-k0に新たにアミノ酸置換を導入することにより、mFc γ RII選択性を減弱させるもののmFc γ RII結合活性が増強した検体が多く見出された。また、高いmFc γ RII選択性を維持したままmFc γ RII結合活性が増強した改変体も見出された。

[0280] 上述のとおり、H237-MB716/MRAL-k0はH237-MB630/MRAL-k0よりも高いmFc γ RII選択性を有しており、H237-MB716/MRAL-k0を鑄型とした改変体の方がH237-MB630/MRAL-k0を鑄型とした改変体よりも高いmFc γ RII選択性を示していた。よって、H237-MB716/MRAL-k0を鑄型として様々な改変を導入することで、mFc γ RII選択性の高い検体を多く得ができるものと考えられる。

[0281] [実施例9] mFc γ RIIに対する結合活性を天然型と同程度に維持し、mFc γ RIIに対する結合活性を減弱させた改変体の作製

本明細書中に記載のように、抗体が多価抗原と結合することで免疫複合体を形成し、その複合体が活性型Fc γ Rと相互作用することで様々な副作用を誘導することが考えられ、抗体の医薬品としての価値を減じてしまう恐れがある。この問題を回避しながらも、Fc γ RIIbを介した作用を維持するためには、Fc γ RIIbに対する結合は維持しつつ、活性型Fc γ Rに対する結合を選択的に減弱することが望ましいが、マウスFc γ Rに対してこのような特徴を備えたFc変異体の報告はない。そこで、本実施例においては、抑制型のmFc γ RIIに対する結合活性は天然型mIgG1と同程度に維持しながら、活性型のmFc γ RIIIに対する結合活性を減弱させたFc変異体の作製を目的として検討を行った。

[0282] (9-1) mFc γ RIIIに対する結合活性を減弱させる改変の組み合わせの検討

実施例2において得られた1アミノ酸変異を有する改変体のmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する相互作用解析結果から、mFc γ RIIIに対する結合活性を選択的に減弱させる改変を探索し、その中から10改変体を選抜した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0283] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果についてH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A (mFc γ RII選択性) を、H237-mIgG1/MRAL-k0のI/A (mFc γ RII選択性) で割った値を、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の指標とした。

[0284] 評価した全ての改変体の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A (mFc γ RII選択性) を表18に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域 (CH) の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング00番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この

際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表18における改変は、いずれもマウスIgG1 (mIgG1) のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0285] [表18]

名称 (CH)	mIgG1 に対して 導入した改変	相対的 mFc γ RII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 mFc γ RIII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 I/A (mFc γ RII 選択性) (mIgG1を1 とした場合)
MB092	S238D	0.16	0.05	2.87
MB093	S238E	2.48	0.61	4.05
MB075	V237E	0.12	0.07	1.80
MB112	S239F	0.47	0.27	1.77
MB125	S239W	0.81	0.48	1.70
MB146	F241D	0.85	0.21	4.09
MB147	F241E	0.95	0.36	2.64
MB159	F241T	0.37	0.28	1.33
MB208	S267M	0.40	0.26	1.52
MB258	S298H	0.37	0.32	1.17

(相対的な結合活性： H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性)：各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0286] 表18の結果から、いずれの改変体もmFc γ RIIと比較してmFc γ RIIIに対してより結合活性を減弱させることで、mFc γ RII選択性を向上させていることが確認できた。そこで、これらの改変を組み合わせることで、mFc γ RIIIに対する結合活性の減弱効果が強く、mFc γ RII選択性が向上している改変体が得られないかを検討した。

[0287] 抗体H鎖の可変領域にはWO2009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。H237-mIgG1/MRAL-k0を鑄

型にして改変を導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0288] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果についてH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A (mFc γ RII選択性) を、H237-mIgG1/MRAL-k0のI/A (mFc γ RII選択性) で割った値を、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の指標とした。

[0289] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A (mFc γ RII選択性) を表19に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域 (CH) の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表19における改変は、いずれもマウスIgG1 (mIgG1) のH鎖定常領域 (配列番号：4) に対して導入された改変である。

[0290]

[表19]

名称 (CH)	mIgG1 に対して 導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mIgG1を1 とした場合)
MB561	V237E/S238E	0.48	0.07	7.08
MB562	S238E/S239F	0.05	0.02	1.99
MB563	S238E/S239W	0.20	0.08	2.54
MB564	S238E/F241D	0.32	0.11	3.02
MB565	S238E/F241E	0.66	0.23	2.88
MB566	S238E/F241T	0.18	0.10	1.80
MB567	S238E/S267M	0.21	0.07	2.82
MB568	S238E/S298H	0.71	0.18	3.83
MB571	V237E/S239F	0.22	0.05	4.34
MB572	V237E/S239W	0.26	0.07	3.66
MB573	V237E/F241D	0.43	0.06	6.81
MB574	V237E/F241E	0.27	0.10	2.83
MB575	V237E/F241T	0.08	0.05	1.67
MB576	S239F/F241D	1.54	0.60	2.55
MB577	S239F/F241E	2.51	1.19	2.10
MB578	S239F/F241T	0.39	0.25	1.55
MB579	S239W/F241D	0.89	0.34	2.60
MB580	S239W/F241E	1.38	0.61	2.26
MB581	S239W/F241T	0.69	0.42	1.65
MB584	V237E/S238D	0.08	0.02	3.92
MB585	S238D/S239F	0.06	0.03	1.84
MB586	S238D/S239W	0.13	0.08	1.68
MB587	S238D/F241D	1.33	0.60	2.22
MB588	S238D/F241E	2.01	1.01	1.99
MB589	S238D/F241T	0.23	0.19	1.24
MB590	S238D/S267M	N.B.	N.B.	-
MB591	S238D/S298H	0.08	0.02	4.61
MB594	T230E/V237E/S238E	1.85	0.10	18.70
MB595	T230E/S238E/S239F	0.09	0.05	1.64
MB596	T230E/S238E/S239W	0.55	0.17	3.25
MB597	T230E/S238E/F241D	1.28	0.54	2.38
MB598	T230E/S238E/S267M	0.41	0.08	5.31
MB599	T230E/V237E/S239F	0.70	0.11	6.58
MB600	T230E/V237E/S239W	1.24	0.25	4.95
MB601	T230E/V237E/F241D	0.55	0.10	5.55
MB602	T230E/V237E/S238D	0.26	0.05	4.80
MB603	T230E/S238D/S239F	0.12	0.06	1.96
MB604	T230E/S238D/S239W	0.34	0.16	2.13
MB605	T230E/S238D/F241D	9.85	4.40	2.24

MB606	T230E/S238D/S267M	0.05	N.B.	-
MB607	V237E/S238E/S239E	3.14	0.18	17.40
MB608	S238E/S239E/F241D	0.42	0.13	3.21
MB609	S238E/S239E/S267M	2.66	0.32	8.22
MB610	V237E/S239E/F241D	0.23	N.B.	-
MB611	V237E/S238D/S239E	1.11	0.09	11.90
MB612	S238D/S239E/F241D	0.81	0.30	2.72
MB613	S238D/S239E/S267M	0.24	0.06	3.77
MB614	V237E/S238E/S239D	10.90	0.84	12.94
MB615	S238E/S239D/F241D	0.59	0.14	4.16
MB616	S238E/S239D/S267M	4.06	0.57	7.15
MB617	V237E/S239D/F241D	0.84	0.15	5.51
MB619	S238D/S239D/F241D	0.62	0.16	3.91
MB620	S238D/S239D/S267M	0.23	0.07	3.19
MB621	S238D/S239E	3.15	0.23	13.70
MB622	S238D/S239D	3.83	0.40	9.48
MB618	V237E/S238D/S239D	1.63	0.13	12.23

(N. B. : 測定は実施したが、結合が弱すぎるために結合が観察できなかった

、
相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0291] 表19の結果より、改変を組み合わせることでmFc γ RIIIに対する結合活性をより減弱させ、かつmFc γ RII選択性を向上させている改変体が複数見出された。さらに、mFc γ RIIに対する結合活性が天然型mIgG1と同程度の改変体もいくつか見出され、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較したmFc γ RII結合活性の差が2倍以内 (H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なmFc γ RII結合活性が0.5倍以上2.0倍以下) であり、相対的I/A (mFc γ RII選択性) が5倍以上である6つの改変体 (MB594、MB599、MB601、MB611、MB617、MB618) を得ることに成功した。なお、これらの改変体は表19中において灰色で塗りつぶして表示した。

[0292] (9-2) mFc γ RII結合活性を選択的に増強した改変体に対するmFc γ Rへの

結合減弱改変導入の検討

$mFc\gamma RII$ に対する結合を選択的に増強した改変体を鑄型にして、 $mFc\gamma RII$ も含む全ての $mFc\gamma R$ に対する結合活性を減弱させる改変を導入することで、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性は $mIgG1$ と同程度に維持する一方で、 $mFc\gamma RIII$ に対する結合活性が $mIgG1$ よりも減弱した改変体が得られることが期待された。

- [0293] 全ての $mFc\gamma R$ に対する結合活性を減弱させる改変としてP232KやS239Kを用いた。実施例5と同様に、9つの改変体を鑄型として、P232KおよびS239K改変の効果を検討した。
- [0294] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。実施例5で使用したものと同一の9つの改変体（全てEUナンバリングで239番目のアミノ酸はAsp）を鑄型にして改変を導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法により $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合を評価した。
- [0295] それぞれの $mFc\gamma R$ との相互作用解析結果についてH237-mIgG1/MRAL-k0の $mFc\gamma R$ に対するKD値を各改変体の $mFc\gamma R$ に対するKD値で割り、得られた値をH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体の $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値であるI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）を、H237-mIgG1/MRAL-k0のI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）で割った値を、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）の指標とした。
- [0296] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的結合活性および相対的I/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）を表20に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはア

ミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表20における改変は、各templateであるMB373のH鎖定常領域（配列番号：40）、MB382のH鎖定常領域（配列番号：41）、MB387のH鎖定常領域（配列番号：42）、MB397のH鎖定常領域（配列番号：5）、MB379のH鎖定常領域（配列番号：43）、MB389のH鎖定常領域（配列番号：44）、MB425のH鎖定常領域（配列番号：45）、MB390のH鎖定常領域（配列番号：6）、あるいはMB432のH鎖定常領域（配列番号：46）に対して導入された改変である。

[0297] [表20]

名称 (CH)	template	template に対して 追加した 改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1を 1とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1を 1とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1を 1とした 場合)
MB669	MB373	S239K	N.B.	0.04	-
MB670	MB382		N.B.	0.06	-
MB671	MB387		N.B.	0.04	-
MB672	MB397		0.30	0.07	4.35
MB673	MB379		N.B.	0.04	-
MB674	MB389		N.B.	0.06	-
MB675	MB425		N.B.	0.01	-
MB676	MB390		0.22	0.12	1.84
MB677	MB432		N.B.	0.03	-
MB364	MB373	P232K	6.55	1.35	4.84
MB678	MB379		8.03	2.01	4.00
MB679	MB382		7.57	1.68	4.51
MB680	MB387		8.97	1.75	5.13
MB681	MB389		13.88	1.83	7.60
MB682	MB390		14.01	2.14	6.55
MB683	MB397		7.70	0.90	8.55
MB684	MB432		5.37	1.02	5.28

(N. B. : 測定は実施したが、結合が弱すぎるために結合が観察できなかった

相対的な結合活性： H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性)：各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0298] 表20の結果から、P232K改変を導入した場合においては、相対的I/A (mFc γ RII選択性) が5倍以上を維持している改変体がいくつかあったものの、相対的mFc γ RII結合活性が5倍～15倍程度増強されていた。よって、mFc γ RIIに対する結合活性を増強させるための改変を減らす、あるいは実施例9-1で検討したようなmFc γ RIIIに対する結合を減弱させる改変をさらに組み合わせることが有効であると考えられた。

[0299] 一方、S239K改変を導入した場合においては、mFc γ RIIに対する結合活性が著しく減弱されていた。鋳型に使用した9つの改変体の相対的mFc γ RII結合活性は約200倍～600倍であったので、実施例6で見出されたH237-MB498/MRAL-k0やH237-MB494/MRAL-k0（相対的mFc γ RII結合活性がそれぞれ3300倍程度、2100倍程度）のような、よりmFc γ RIIに対する結合活性が増強された改変体を鋳型とすれば、mFc γ RIIに対する結合活性をmIgG1程度に維持することができるかもしれない。

また9つの改変体は全てS239D改変を有しており、これがmFc γ RII結合活性の増強に大きく寄与しているため、この部位に改変を導入すると、元々有していたmFc γ RII結合活性の増強自体を低減させてしまうことになる。そこで、既に改変を導入している部位とは異なる部位でのmFc γ R結合活性を減弱させる改変を用いることも有効かもしれない。そのような改変としては、例えばEUナンバリングで297番目のAsnに付加されているN型糖鎖を取り除くためのN297A改変などが考えられる。抗体はFc領域のEUナンバリング297番目のAsnに付加されたN型糖鎖を取り除くことにより、Fc γ Rに対する結合が著しく低減されることが報告されている (The Journal of Biological Chemistry, 2000, 276, 6591-6604)。

[0300] (9-3) mFc γ RII結合活性を選択的に増強した改変体に対する改変削減の検討

mFc γ RIIに対する結合を選択的に増強した改変体から、導入している改変を削減することで、mFc γ RIIに対する結合活性はmIgG1と同程度に維持する一方で、mFc γ RIIIに対する結合活性がmIgG1よりも減弱した改変体が得られることが期待された。

[0301] 実施例9-1までに作製した改変体の内、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的mFc γ RII結合活性が1倍～5倍であり、かつ相対的I/A (mFc γ RII選択性) が15倍以上であった改変体の中から、7つの改変体 (H237-MB594/MRAL-k0、H237-MB628/MRAL-k0、H237-MB632/MRAL-k0、H237-MB636/MRAL-k0、H237-MB642/MRAL-k0、H237-MB646/MRAL-k0、H237-MB657/MRAL-k0) を選び、それらに導入されている改変の削減を検討した。

[0302] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。上述の7つの改変体を鑄型にして改変箇所のアミノ酸を改変前のアミノ酸に置換した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

[0303] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果についてH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A (mFc γ RII選択性) を、H237-mIgG1/MRAL-k0のI/A (mFc γ RII選択性) で割った値を、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A (mFc γ RII選択性) の指標とした。横軸に各改変体（鑄型の7改変体も含む）のmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体（鑄型の7改変体も含む）のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（

図18)。

[0304] また、本検討で評価した全ての改変体（鑄型の7改変体も含む）について、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A（mFc γ RII選択性）を表21に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表21における改変は、いずれもマウスIgG1（mIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0305]

[表21]

名称 (CH)	導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1を 1とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1を 1 とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1を 1とした 場合)
MB594	T230E/V237E/S238E	1.302	0.057	23.0
MB628	T230E/V231P/P232A/S238E/S239L	2.087	0.083	25.0
MB632	T230E/V231A/P232Y/S238E/S239N	3.720	0.236	15.8
MB636	T230E/P232Y/S238E/S239N	3.917	0.172	22.8
MB642	T230E/V231D/P232Y/S238E/S239Y	1.647	0.100	16.5
MB646	T230E/V231P/P232A/S238E/S239Y	3.804	0.176	21.7
MB657	T230E/V231P/P232N/S238E/S239F	1.541	0.087	17.7
MB645	T230E/P232Y/S238E/S239Y	1.058	0.217	4.9
MB685	V231P/P232A/S238E/S239L	0.606	0.093	6.5
MB686	T230E/P232A/S238E/S239L	0.167	0.052	3.2
MB687	T230E/V231P/S238E/S239L	0.943	0.096	9.8
MB688	P232Y/S238E/S239N	0.634	0.081	7.8
MB689	T230E/S238E/S239N	0.413	0.075	5.5
MB690	V231P/P232A/S238E/S239Y	1.597	0.188	8.5
MB691	T230E/P232A/S238E/S239Y	0.582	0.071	8.2
MB692	T230E/V231P/S238E/S239Y	1.747	0.115	15.2
MB693	V231D/P232Y/S238E/S239Y	1.219	0.094	12.9
MB694	T230E/V231D/S238E/S239Y	0.544	0.031	17.5
MB695	V231P/P232N/S238E/S239F	0.435	0.088	5.0
MB696	T230E/P232N/S238E/S239F	0.400	0.094	4.3
MB697	T230E/V231P/S238E/S239F	0.217	N.B.	-
MB698	T230E/V237E/S238E/S239L	0.194	0.024	8.1
MB699	T230E/V237E/S238E/S239N	0.216	0.035	6.1
MB700	T230E/V237E/S238E/S239Y	0.559	0.044	12.7
MB701	T230E/V237E/S238E/S239F	0.187	N.B.	-
MB702	V231A/P232Y/S238E/S239N	0.960	0.145	6.6
MB703	T230E/V231A/S238E/S239N	0.943	0.104	9.1

(N. B. : 測定は実施したが、結合が弱すぎるために結合が観察できなかった

、

相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFcγRに対するKD値を各改変体の各mFcγRに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFcγRII選択性) : 各改変体のI/A (mFcγRIIIに対するKD値をmFcγRIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0306] 図18および表21の結果より、7つの改変体から改変を削減することによって、 $mFc\gamma RII$ および $mFc\gamma III$ に対する結合活性を共に減弱させることに成功した。その結果、H237- $mIgG1/MRAL-k0$ と比較した $mFc\gamma RII$ 結合活性の差が2倍以内 ($H237-mIgG1/MRAL-k0$ を1とした場合の相対的な $mFc\gamma RII$ 結合活性が0.5倍以上2.0倍以下) であり、相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) が5倍以上である改変体を多数 (MB594、MB642、MB657、MB685、MB687、MB688、MB690、MB691、MB692、MB693、MB694、MB700、MB702、MB703) 得ることに成功した。なお、これらの改変体は表21中において灰色で塗りつぶして表示した。

[0307] なお、H237-MB697/MRAL-k0やH237-MB701/MRAL-k0などはH237- $mIgG1/MRAL-k0$ を1とした場合の相対的な $mFc\gamma RII$ 結合活性が0.2倍程度に減弱してしまっているものの、 $mFc\gamma III$ に対する結合活性はKD値を算出できないほどに減弱していた。よって、これらの改変体に $mFc\gamma RII$ に対して結合を増強する改変を加えることでも、目的とする改変体が得られることが期待される。

[0308] (9-4) $mFc\gamma RII$ 結合活性を選択的に増強した改変体に対するV237E改変導入の検討

実施例9-1の結果から、I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) を向上させながら $mFc\gamma RII$ および $mFc\gamma III$ に対する結合を減弱させる改変がいくつか示された。よって、 $mFc\gamma RII$ に対する結合を選択的に増強した改変体を鋳型にして、これらの改変を導入することで、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性は $mIgG1$ と同程度に維持する一方で、 $mFc\gamma III$ に対する結合活性が $mIgG1$ よりも減弱した改変体が得られることが期待された。

[0309] 導入する改変としてV237Eを選抜した。鋳型として用いる $mFc\gamma RII$ に対する結合を選択的に増強した改変体には、実施例5で鋳型として使用した9つの改変体、および実施例8-2で作製されたH237-MB628/MRAL-k0、H237-MB630/MRAL-k0を用いることとした。これらの11個の改変体を鋳型としてV237E改変導入の効果を検討した。

[0310] 抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を

使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。上述の11個の改変体を鑄型にして改変を導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法によりmFc γ RIIとmFc γ RIIIに対する結合を評価した。

- [0311] それぞれのmFc γ Rとの相互作用解析結果についてH237-mIgG1/MRAL-k0のmFc γ Rに対するKD値を各改変体のmFc γ Rに対するKD値で割り、得られた値をH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値であるI/A（mFc γ RII選択性）を、H237-mIgG1/MRAL-k0のI/A（mFc γ RII選択性）で割った値を、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A（mFc γ RII選択性）の指標とした。横軸に各改変体のmFc γ RIIIに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のmFc γ RIIに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図19）。
- [0312] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各mFc γ Rに対する相対的結合活性および相対的I/A（mFc γ RII選択性）を表22に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表22における改変は、いずれもマウスIgG1（mIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。
- [0313]

[表22]

名称 (CH)	mIgG1 に対して導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mIgG1を 1とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mIgG1を 1とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mIgG1を 1とした 場合)
MB722	T230E/V231A/P232Y/V237E/S238E/S239D	33.34	1.35	24.65
MB723	T230E/V231D/P232Y/V237E/S238E/S239D	14.08	0.72	19.67
MB724	T230E/V231N/P232Y/V237E/S238E/S239D	20.79	1.19	17.43
MB725	T230E/V231T/P232Y/V237E/S238E/S239D	24.34	1.39	17.53
MB726	T230E/P232Y/V237E/S238E/S239D	35.66	2.08	17.14
MB727	T230E/V231P/P232A/V237E/S238E/S239D	11.69	0.66	17.85
MB728	T230I/V231P/P232A/V237E/S238E/S239D	16.44	0.90	18.19
MB729	T230E/V231P/P232N/V237E/S238E/S239D	10.43	0.53	19.79
MB730	T230Q/V231P/P232N/V237E/S238E/S239D	7.24	0.43	16.74
MB731	T230E/V231P/P232A/V237E/S238E/S239L	1.13	0.03	37.46
MB732	T230E/V231P/P232N/V237E/S238E/S239L	0.84	0.03	24.84

(相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0314] 図19および表22の結果より、mFc γ RIIに対する結合活性を選択的に増強した改変体にV237E改変を導入することによって、高い相対的I/A (mFc γ RI選択性) を有したまま、mFc γ RII およびmFc γ RIIIに対する結合活性を減弱させることに成功した。その結果、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較したmFc γ RII結合活性の差が2倍以内 (H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なmFc γ RII結合活性が0.5倍以上2.0倍以下) であり、相対的I/A (mFc γ RII選択性) が5倍以上である改変体が新たに2つ (MB731、MB732) 見出された。なお、これらの改変体は表22中において灰色で塗りつぶして表示した。これらの2つの改変体 (H237-MB731/MRAL-k0およびH237-MB732/MRAL-k0) はH237-mIgG1/MRAL-k0と比較したmFc γ RII結合活性の差が2割以内であり (H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なmFc γ RII結合活性が0.8倍以上1.2倍以下) 、かつ

、 $mFc\gamma RIII$ に対する結合活性は0.03倍まで減弱しているという非常に優れた性質を有するものであった。

[0315] 次に、これらの2つの改変体に対して、導入されている改変の削減を検討した。

抗体H鎖の可変領域にはW02009/125825に記載されている抗IL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のH鎖VH3-IgG1の可変領域であるH237（配列番号：1）を使用した。また、抗体L鎖には抗IL-6レセプター抗体であるtocilizumabのL鎖であるMRAL-k0（配列番号：2）を共通に使用した。H237-mIgG1/MRAL-k0を鑄型にして、H237-MB731/MRAL-k0およびH237-MB732/MRAL-k0に導入されている改変から1つ除いた改変を導入した。これらの改変体を参考例1の方法により発現、精製し、参考例2のBiacore T200を使用した方法により $mFc\gamma RII$ と $mFc\gamma RIII$ に対する結合を評価した。

[0316] それぞれの $mFc\gamma R$ との相互作用解析結果についてH237-mIgG1/MRAL-k0の $mFc\gamma R$ に対するKD値を各改変体の $mFc\gamma R$ に対するKD値で割り、得られた値をH237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的な結合活性の指標とした。また、各改変体の $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値であるI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）を、H237-mIgG1/MRAL-k0のI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）で割った値を、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の相対的なI/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）の指標とした。

[0317] また、本検討で評価した全ての改変体について、H237-mIgG1/MRAL-k0を1とした場合の各 $mFc\gamma R$ に対する相対的結合活性および相対的I/A（ $mFc\gamma RII$ 選択性）を表23に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域（CH）の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表23における改変は、いずれもマウスIgG1（mIgG1）のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0318]

[表23]

名称 (CH)	mIgG1 に対して導入した改変	相対的 mFc γ RII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 mFc γ RIII 結合活性 (mIgG1を1 とした場合)	相対的 I/A (mFc γ RII 選択性) (mIgG1を1 とした場合)
MB878	V231P/P232A/V237E/S238E/S239L	0.47	0.03	14.23
MB879	V231P/P232N/V237E/S238E/S239L	0.30	N.B.	-
MB880	T230E/P232A/V237E/S238E/S239L	0.34	N.B.	-
MB881	T230E/P232N/V237E/S238E/S239L	0.23	N.B.	-
MB883	T230E/V231P/P232A/V237E/S239L	2.21	0.11	20.15
MB884	T230E/V231P/P232N/V237E/S239L	2.46	0.09	26.73
MB885	T230E/V231P/P232A/V237E/S238E	3.29	0.13	26.21
MB886	T230E/V231P/P232N/V237E/S238E	1.47	0.08	19.53

(N. B. : 測定は実施したが、結合が弱すぎるために結合が観察できなかった

相対的な結合活性： H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性)：各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0319] 表23の結果より、H237-MB731/MRAL-k0およびH237-MB732/MRAL-k0から改変を減らすことによりmFc γ RII結合活性が増強あるいは減弱し、H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した差は拡大する結果であった。しかしながら、高いmFc γ RII選択性を維持しているものが多く、これらの改変体にさらにmFc γ RIIに対する結合活性を増強あるいは減弱させる改変を組み合わせることでも、H237-mIgG1/MRAL-k0と同程度のmFc γ RII結合活性を有し、mFc γ RIIIに対する結合活性は減弱した改変体が得られることが期待される。

[0320] [実施例10] 実施例8および9で作製した改変体の各mFc γ Rに対するKD値およびI/A (mFc γ RII選択性)

参考のために、実施例8および9で作製し評価した改変体の内、いくつかの改変体について、各mFc γ Rに対するKD値およびI/A (mFc γ RII選択性) を表に示す。

[0321] H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際のmFc γ RIIに対する相対的結合活性が200倍以上の改変体を表24に示した。これらの改変体はmFc γ RIIに対する相対的結合活性が著しく増強しているという点で極めて優れている。H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際のmFc γ RIIに対する相対的結合活性が10倍以上、かつ相対的I/A (mFc γ RII選択性) が25倍以上の改変体を表25に示した。これらの改変体はmFc γ Rに対する相対的結合活性が増強し、かつmFc γ Rに対する選択性も高いという点で優れている。H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際のmFc γ RIIに対する相対的結合活性が0.5倍～2倍、かつ相対的I/A (mFc γ RII選択性) が5倍以上の改変体を表26に示した。これらの改変体はmFc γ Rに対する結合活性は維持しつつも、mFc γ RIIIに対する結合活性が選択的に低減しているため、mFc γ RIIに対する結合のみに由来する効果を評価する際に用いることができる。特にmFc γ RIIに対する効果が増強していないため、mIgG1程度にmFc γ RIIに結合した場合の効果が評価できるという点で優れている。H237-mIgG1/MRAL-k0と比較した際のmFc γ RIIに対する相対的結合活性が0.8倍以上、かつmFc γ RIIIに対する相対的結合活性が0.2倍以下、かつ相対的I/A (mFc γ RII選択性) が5倍以上の改変体を表27にそれぞれ示した。これらの改変体も同様に、mFc γ RIIに対する結合のみに由来する効果を評価する際に用いることができるという点で優れている。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表24～27における改変は、いずれもマウスIgG1 (mIgG1) のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0322]

[表24]

名称 (CH)	mlgG1に対して導入した改変	相対的mFcγRII結合活性 (mlgG1を1とした場合)	相対的mFcγRIII結合活性 (mlgG1を1とした場合)	相対的I/A (mFcγRII選択性) (mlgG1を1とした場合)	KD (mFcγRII)	KD (mFcγRIII)	I/A (mFcγRII選択性)
MB530	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/N324D/A326D	622.6	8.0	77.6	3.37E-10	3.51E-08	103.9
MB537	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/N324D/A326D/K334R	510.1	8.9	57.4	4.12E-10	3.17E-08	76.9
MB535	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/A326D/K334R	421.7	8.5	49.8	4.98E-10	3.32E-08	66.7
MB534	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/N324D/K334R	420.7	33.8	12.5	4.99E-10	8.34E-09	16.7
MB536	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/N324D/A326D/K334R	396.0	7.7	51.7	5.30E-10	3.68E-08	69.3
MB533	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/N324D/A326D	393.6	7.2	54.5	5.34E-10	3.90E-08	73.0
MB542	T230E/V231P/P232N/S238E/S239M/N324D/A326D	384.2	3.4	113.7	5.47E-10	8.33E-08	152.3
MB528	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/A326D	375.3	14.6	25.7	5.60E-10	1.93E-08	34.5
MB548	T230E/V231P/P232N/S238E/S239M/N324D/A326D/K334R	356.7	3.9	90.9	5.89E-10	7.17E-08	121.7
MB532	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/A326D/K334R	328.6	6.2	53.0	6.39E-10	4.54E-08	71.0
MB529	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/K334R	281.9	5.9	47.7	7.45E-10	4.76E-08	63.9
MB544	T230E/V231P/P232N/S238E/S239M/A326D/K334R	276.2	3.2	85.6	7.60E-10	8.72E-08	114.7
MB527	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L/N324D	273.3	5.5	49.5	7.68E-10	5.10E-08	66.3
MB476	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E	261.2	2.6	99.0	8.04E-10	1.07E-07	132.6
MB526	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/S298L	232.4	8.5	27.3	9.04E-10	3.30E-08	36.5
MB531	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239E/N324D/K334R	228.8	3.3	69.1	9.18E-10	8.50E-08	92.6
MB549	T230E/V231P/P232N/S238E/S239M/S298L/N324D/A326D/K334R	210.0	5.4	38.9	1.00E-09	5.21E-08	52.1

(I/A (mFcγRII選択性)) : 各改変体のmFcγRIIIに対するKD値をmFcγRIIに対するKD値で割った値、

相対的な結合活性：H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A（mFc γ RII選択性）：各改変体のI/A（mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値）をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値）

[0323]

[表25]

名称 (CH)	mlgG1 に対して 導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1 を 1 とした場 合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1 を 1 とした場 合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1 を 1 とした場 合)	KD (mFcγRII)	KD (mFcγRIII)	I/A (mFcγRII 選択性)
MB542	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/N324D/ A326D	384.2	3.4	113.7	5.47E-10	8.33E-08	152.3
MB515	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M	137.3	1.3	104.4	1.53E-09	2.14E-07	140.0
MB476	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E	261.2	2.6	99.0	8.04E-10	1.07E-07	132.6
MB548	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/N324D/ A326D/K334R	356.7	3.9	90.9	5.89E-10	7.17E-08	121.7
MB543	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/N324D/ K334R	195.3	2.2	87.7	1.08E-09	1.26E-07	117.6
MB748	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S267A	11.7	0.1	85.8	1.79E-08	2.06E-06	115.0
MB544	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/A326D/ K334R	276.2	3.2	85.6	7.60E-10	8.72E-08	114.7
MB754	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D	21.0	0.2	84.5	1.00E-08	1.13E-06	113.3
MB751	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K334R	25.4	0.3	80.5	8.25E-09	8.90E-07	107.8
MB759	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ K334R	33.8	0.4	77.6	6.21E-09	6.46E-07	104.0
MB530	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/N324D/ A326D	622.6	8.0	77.6	3.37E-10	3.51E-08	103.9
MB761	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298M/ N324D/K334R	13.4	0.2	74.9	1.57E-08	1.57E-06	100.3
MB750	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D	29.4	0.4	73.8	7.13E-09	7.05E-07	98.8
MB866	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/A326D/ A327G	13.0	0.2	72.4	1.62E-08	1.57E-06	97.0
MB531	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/N324D/ K334R	228.8	3.3	69.1	9.18E-10	8.50E-08	92.6
MB749	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L	25.3	0.4	66.5	8.30E-09	7.40E-07	89.1
MB545	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ N324D/A326D	163.4	2.7	61.6	1.29E-09	1.06E-07	82.6
MB820	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M/ E333Y	19.5	0.3	59.3	1.08E-08	8.54E-07	79.4
MB773	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/E333Y	12.7	0.2	59.2	1.65E-08	1.31E-06	79.3

MB834	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/E333Y/ K334R	17.0	0.3	58.9	1.24E-08	9.76E-07	78.9
MB815	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ E333Y	17.6	0.3	58.5	1.20E-08	9.38E-07	78.5
MB828	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A327G/ E333Y	28.4	0.5	57.6	7.40E-09	5.71E-07	77.2
MB537	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L/ N324D/A326D/K334R	510.1	8.9	57.4	4.12E-10	3.17E-08	76.9
MB779	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S337W	10.0	0.2	57.3	2.10E-08	1.61E-06	76.8
MB776	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/T335Y	11.3	0.2	57.1	1.86E-08	1.43E-06	76.5
MB630	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L	14.3	0.3	57.0	1.47E-08	1.12E-06	76.4
MB825	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ E333Y	28.4	0.5	57.0	7.38E-09	5.64E-07	76.4
MB831	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331F/ K334R	22.3	0.4	56.8	9.40E-09	7.16E-07	76.1
MB827	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A327G/ P331Y	21.5	0.4	56.8	9.77E-09	7.44E-07	76.1
MB833	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331Y/ K334R	25.3	0.4	56.5	8.31E-09	6.30E-07	75.8
MB819	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M/ P331Y	18.1	0.3	56.1	1.16E-08	8.72E-07	75.2
MB850	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ A327G/E333Y	43.7	0.8	55.5	4.81E-09	3.58E-07	74.4
MB770	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331F	13.3	0.2	55.5	1.57E-08	1.17E-06	74.3
MB539	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ N324D	105.1	1.9	55.0	2.00E-09	1.47E-07	73.7
MB813	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ P331F	16.3	0.3	55.0	1.29E-08	9.51E-07	73.7
MB817	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M/ A327G	28.5	0.5	54.6	7.38E-09	5.39E-07	73.1
MB533	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L/ N324D/A326D	393.6	7.2	54.5	5.34E-10	3.90E-08	73.0
MB826	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A327G/ P331F	18.5	0.3	54.5	1.14E-08	8.29E-07	73.0
MB818	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M/ P331F	15.6	0.3	54.3	1.35E-08	9.79E-07	72.7

MB821	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M/ K334R	24.4	0.5	54.3	8.60E-09	6.25E-07	72.7
MB829	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A327G/ K334R	33.8	0.6	53.4	6.22E-09	4.45E-07	71.6
MB860	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ A327G/E333Y/K334R	39.6	0.7	53.3	5.30E-09	3.79E-07	71.4
MB532	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/A326D/ K334R	328.6	6.2	53.0	6.39E-10	4.54E-08	71.0
MB814	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ P331Y	18.0	0.3	52.9	1.17E-08	8.26E-07	70.9
MB766	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M	14.0	0.3	52.8	1.50E-08	1.06E-06	70.8
MB540	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ A326D	149.4	2.8	52.7	1.41E-09	9.94E-08	70.7
MB771	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331Y	13.8	0.3	52.7	1.52E-08	1.07E-06	70.6
MB536	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/N324D/ A326D/K334R	396.0	7.7	51.7	5.30E-10	3.68E-08	69.3
MB811	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ E333Y	22.2	0.4	51.6	9.45E-09	6.54E-07	69.2
MB780	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A327G	20.2	0.4	51.4	1.04E-08	7.16E-07	68.9
MB760	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298L/ N324D/K334R	14.1	0.3	51.2	1.49E-08	1.02E-06	68.6
MB823	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ P331F	25.0	0.5	51.2	8.39E-09	5.75E-07	68.6
MB785	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A326D	24.9	0.5	51.1	8.43E-09	5.77E-07	68.4
MB538	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L	86.2	1.7	50.3	2.44E-09	1.64E-07	67.4
MB756	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298L/ K334R	10.6	0.2	50.3	1.98E-08	1.33E-06	67.4
MB848	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A326D/A327G	45.8	0.9	50.1	4.58E-09	3.08E-07	67.2
MB535	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L/ A326D/K334R	421.7	8.5	49.8	4.98E-10	3.32E-08	66.7
MB824	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ P331Y	28.0	0.6	49.6	7.51E-09	5.00E-07	66.5
MB812	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A327G	33.4	0.7	49.6	6.28E-09	4.18E-07	66.5

MB857	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A326D/A327G/E333Y	44.6	0.9	49.6	4.71E-09	3.13E-07	66.5
MB527	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L/ N324D	273.3	5.5	49.5	7.68E-10	5.10E-08	66.3
MB856	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A326D/A327G/P331Y	44.8	0.9	49.5	4.69E-09	3.11E-07	66.3
MB858	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A326D/A327G/K334R	62.0	1.3	49.1	3.39E-09	2.23E-07	65.8
MB849	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ A327G/P331Y	31.4	0.6	48.6	6.68E-09	4.36E-07	65.2
MB859	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ A327G/P331Y/K334R	34.2	0.7	48.0	6.15E-09	3.96E-07	64.3
MB790	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324D/ A326D/K334R	33.5	0.7	47.8	6.28E-09	4.02E-07	64.0
MB529	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L/ K334R	281.9	5.9	47.7	7.45E-10	4.76E-08	63.9
MB786	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ K334R	27.2	0.6	47.6	7.73E-09	4.93E-07	63.7
MB822	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ A327G	43.8	0.9	47.4	4.80E-09	3.04E-07	63.5
MB816	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324M/ A326D	30.4	0.7	46.6	6.90E-09	4.31E-07	62.5
MB851	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A326D/ A327G/K334R	43.8	1.0	45.9	4.79E-09	2.95E-07	61.5
MB807	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ N324M	21.9	0.5	45.1	9.58E-09	5.79E-07	60.4
MB869	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ A326D/A327G/E333Y	41.0	0.9	43.6	5.12E-09	3.00E-07	58.5
MB809	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ P331F	19.0	0.4	43.0	1.11E-08	6.38E-07	57.6
MB782	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ N324D	21.3	0.5	42.9	9.88E-09	5.67E-07	57.4
MB868	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ N324D/A326D/A327G	36.6	0.9	42.8	5.73E-09	3.29E-07	57.3
MB710	T230E/V231P/P232A/ S238E/S239Q	50.8	1.2	41.9	4.13E-09	2.32E-07	56.1
MB867	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ A326D/A327G	35.2	0.9	41.4	5.96E-09	3.31E-07	55.5

MB783	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A326D	30.6	0.7	41.2	6.85E-09	3.78E-07	55.2
MB854	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A326D/A327G/E333Y	50.6	1.3	40.5	4.15E-09	2.25E-07	54.2
MB787	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ N324D/A326D	38.5	1.0	40.3	5.45E-09	2.95E-07	54.1
MB810	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ P331Y	20.8	0.5	40.3	1.01E-08	5.46E-07	54.0
MB876	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ Q295L/A326D/A327G/ E333Y	58.7	1.5	39.8	3.58E-09	1.91E-07	53.4
MB549	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ N324D/A326D/K334R	210.0	5.4	38.9	1.00E-09	5.21E-08	52.1
MB784	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ K334R	14.7	0.4	38.4	1.43E-08	7.34E-07	51.5
MB877	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ N324D/A326D/A327G/ K334R	55.3	1.4	38.3	3.80E-09	1.95E-07	51.3
MB875	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ Q295L/N324D/A326D/ A327G	72.8	1.9	38.0	2.88E-09	1.47E-07	51.0
MB788	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ N324D/K334R	22.4	0.6	37.8	9.38E-09	4.75E-07	50.6
MB547	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ A326D/K334R	170.3	4.5	37.7	1.23E-09	6.23E-08	50.6
MB789	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A326D/K334R	30.9	0.8	37.6	6.80E-09	3.43E-07	50.3
MB835	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D	26.3	0.7	37.4	8.00E-09	4.01E-07	50.2
MB808	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A327G	29.2	0.8	37.3	7.19E-09	3.59E-07	50.0
MB871	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ Q295L/A326D/A327G	61.8	1.7	37.0	3.40E-09	1.69E-07	49.6
MB870	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I/K268D/ A326D/A327G/K334R	38.6	1.0	36.9	5.44E-09	2.69E-07	49.5
MB791	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ N324D/A326D/K334R	40.1	1.1	36.4	5.23E-09	2.56E-07	48.8
MB863	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D/ A326D/A327G/E333Y	81.3	2.3	35.0	2.58E-09	1.21E-07	46.9

MB862	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D/ A326D/A327G/P331Y	67.9	2.0	34.4	3.09E-09	1.42E-07	46.0
MB846	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D/ A326D/A327G	72.1	2.1	34.1	2.91E-09	1.33E-07	45.7
MB852	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ N324D/A326D/A327G	61.0	1.8	33.4	3.44E-09	1.54E-07	44.7
MB847	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A326D/A327G	43.7	1.3	33.0	4.81E-09	2.13E-07	44.3
MB855	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A326D/A327G/K334R	36.2	1.1	31.9	5.81E-09	2.48E-07	42.8
MB861	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D/ N324D/A326D/A327G	76.8	2.4	31.9	2.74E-09	1.17E-07	42.7
MB722	T230E/V231A/P232Y/ V237E/S238E/S239D	26.1	0.8	31.7	8.04E-09	3.41E-07	42.5
MB541	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ K334R	103.0	3.3	31.6	2.04E-09	8.64E-08	42.3
MB853	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/Q295L/ A326D/A327G/P331Y	35.0	1.1	31.0	5.99E-09	2.49E-07	41.5
MB719	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239Q	70.4	2.3	30.5	2.98E-09	1.22E-07	40.9
MB864	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D/ A326D/A327G/K334R	110.4	3.6	30.4	1.90E-09	7.76E-08	40.8
MB546	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239M/S298L/ N324D/K334R	158.1	5.6	28.1	1.33E-09	5.00E-08	37.6
MB526	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L	232.4	8.5	27.3	9.04E-10	3.30E-08	36.5
MB528	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239E/S298L/ A326D	375.3	14.6	25.7	5.60E-10	1.93E-08	34.5
MB723	T230E/V231D/P232Y/ V237E/S238E/S239D	11.0	0.4	25.3	1.90E-08	6.45E-07	33.9
MB865	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/K268D/ Q295L/A326D/A327G	83.8	3.3	25.1	2.51E-09	8.44E-08	33.7

(I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体の $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値、

相対的な結合活性 : H237- $mIgG1/MRAL-k0$ の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値を各改変体の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値で割った値、

相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体のI/A ($mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値) をH237- $mIgG1/MRAL-k0$ のI/Aで割った値)

[表26]

名称 (CH)	mlgG1 に対して 導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1 を 1とした 場合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1 を 1とした 場合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1 を 1とした 場合)	KD (mFcγRII)	KD (mFcγRIII)	I/A (mFcγRII 選択性)
MB657	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239F	1.95	0.09	20.9	1.18E-07	3.48E-06	29.4
MB594	T230E/V237E/S238E	1.85	0.10	18.7	1.15E-07	3.23E-06	28.0
MB643	T230E/V231N/P232Y/ S238E/S239Y	1.83	0.16	11.3	1.26E-07	2.00E-06	15.8
MB692	T230E/V231P/S238E/ S239Y	1.75	0.12	15.2	1.86E-07	4.44E-06	23.8
MB642	T230E/V231D/P232Y/ S238E/S239Y	1.65	0.10	16.5	1.97E-07	5.11E-06	25.9
MB618	V237E/S238D/S239D	1.63	0.13	12.2	1.56E-07	2.73E-06	17.6
MB641	T230E/V231A/P232Y/ S238E/S239Y	1.62	0.15	10.5	1.43E-07	2.10E-06	14.7
MB690	V231P/P232A/S238E/ S239Y	1.60	0.19	8.5	2.04E-07	2.71E-06	13.3
MB657	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239F	1.54	0.09	17.7	2.11E-07	5.87E-06	27.8
MB886	T230E/V231P/P232N/ V237E/S238E	1.47	0.08	19.5	2.46E-07	7.22E-06	29.3
MB793	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239I	1.37	0.07	19.1	1.79E-07	5.50E-06	30.6
MB594	T230E/V237E/S238E	1.30	0.06	23.0	2.50E-07	9.03E-06	36.2
MB645	T230E/P232Y/S238E/ S239Y	1.29	0.23	5.6	1.80E-07	1.42E-06	7.9
MB600	T230E/V237E/S239W	1.24	0.25	5.0	1.71E-07	1.27E-06	7.4
MB693	V231D/P232Y/S238E/ S239Y	1.22	0.09	12.9	2.67E-07	5.41E-06	20.3
MB640	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239N	1.17	0.21	5.6	1.97E-07	1.55E-06	7.9
MB647	T230I/V231P/P232A/S 238E/S239Y	1.16	0.12	10.0	2.00E-07	2.80E-06	14.0
MB715	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239V	1.14	0.04	29.4	2.36E-07	1.19E-05	50.7
MB731	T230E/V231P/P232A/ V237E/S238E/S239L	1.13	0.03	37.5	2.38E-07	1.53E-05	64.5
MB611	V237E/S238D/S239E	1.11	0.09	11.9	1.92E-07	3.42E-06	17.8
MB718	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239T	1.08	0.08	13.1	2.47E-07	5.56E-06	22.5
MB645	T230E/P232Y/S238E/ S239Y	1.06	0.22	4.9	3.07E-07	2.36E-06	7.7
MB702	V231A/P232Y/S238E/ S239N	0.96	0.14	6.6	3.39E-07	3.52E-06	10.4
MB703	T230E/V231A/S238E/ S239N	0.94	0.10	9.1	3.45E-07	4.90E-06	14.2
MB687	T230E/V231P/S238E/ S239L	0.94	0.10	9.8	3.45E-07	5.32E-06	15.4
MB626	T230E/V231T/P232Y/ S238E/S239L	0.89	0.14	6.5	2.61E-07	2.37E-06	9.1

MB624	T230E/V231D/P232Y/ S238E/S239L	0.88	0.11	7.8	2.63E-07	2.87E-06	10.9
MB617	V237E/S239D/F241D	0.84	0.15	5.5	2.55E-07	2.10E-06	8.2
MB732	T230E/V231P/P232N/ V237E/S238E/S239L	0.84	0.03	24.8	3.21E-07	1.37E-05	42.8
MB638	T230I/V231P/P232A/S 238E/S239N	0.83	0.10	8.6	2.80E-07	3.38E-06	12.1
MB709	T230E/V231P/P232A/ S238E/S239T	0.78	0.06	12.9	3.45E-07	7.69E-06	22.3
MB625	T230E/V231N/P232Y/ S238E/S239L	0.74	0.14	5.3	3.12E-07	2.31E-06	7.4
MB599	T230E/V237E/S239F	0.70	0.11	6.6	3.06E-07	3.02E-06	9.9
MB688	P232Y/S238E/S239N	0.63	0.08	7.8	5.13E-07	6.30E-06	12.3
MB685	V231P/P232A/S238E/ S239L	0.61	0.09	6.5	5.37E-07	5.49E-06	10.2
MB623	T230E/V231A/P232Y/ S238E/S239L	0.59	0.10	5.7	3.95E-07	3.17E-06	8.0
MB691	T230E/P232A/S238E/ S239Y	0.58	0.07	8.2	5.59E-07	7.18E-06	12.8
MB700	T230E/V237E/S238E/ S239Y	0.56	0.04	12.7	5.82E-07	1.16E-05	19.9
MB658	T230Q/V231P/P232N/ S238E/S239F	0.56	0.07	8.4	4.15E-07	4.88E-06	11.7
MB601	T230E/V237E/F241D	0.55	0.10	5.5	3.89E-07	3.23E-06	8.3
MB694	T230E/V231D/S238E/ S239Y	0.54	0.03	17.5	5.98E-07	1.64E-05	27.5
MB717	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239P	0.52	0.05	9.7	5.14E-07	8.62E-06	16.8

(I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体の $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値、

相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値を各改変体の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値で割った値、

相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体のI/A ($mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値。なおH237-mIgG1/MRAL-k0の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0325]

[表27]

名称 (CH)	mlgG1 に対して 導入した改変	相対的 mFcγRII 結合活性 (mlgG1 を 1 とした場 合)	相対的 mFcγRIII 結合活性 (mlgG1 を 1 とした場 合)	相対的 I/A (mFcγRII 選択性) (mlgG1 を 1 とした場 合)	KD (mFcγRII)	KD (mFcγRIII)	I/A (mFcγRII 選択性)
MB633	T230E/V231D/P232Y/ S238E/S239N	3.05	0.20	15.4	7.58E-08	1.64E-06	21.6
MB768	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A330Q	6.34	0.20	32.5	3.89E-08	2.03E-06	52.1
MB690	V231P/P232A/S238E/ S239Y	1.60	0.19	8.5	2.04E-07	2.71E-06	13.3
MB781	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/A330K	6.08	0.19	32.7	4.05E-08	2.12E-06	52.4
MB607	V237E/S238E/S239E	3.14	0.18	17.4	6.79E-08	1.77E-06	26.1
MB748	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S267A	10.27	0.18	57.4	1.79E-08	2.06E-06	115.0
MB646	T230E/V231P/P232A/ S238E/S239Y	3.80	0.18	21.7	8.55E-08	2.91E-06	34.0
MB758	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298M/ K334R	8.57	0.17	49.1	2.15E-08	2.11E-06	98.4
MB637	T230E/V231P/P232A/ S238E/S239N	2.87	0.17	16.7	8.07E-08	1.89E-06	23.4
MB636	T230E/P232Y/S238E/ S239N	3.92	0.17	22.8	8.30E-08	2.98E-06	35.9
MB646	T230E/V231P/P232A/ S238E/S239Y	4.82	0.17	28.2	4.80E-08	1.90E-06	39.6
MB636	T230E/P232Y/S238E/ S239N	4.86	0.17	29.4	4.76E-08	1.97E-06	41.3
MB643	T230E/V231N/P232Y/ S238E/S239Y	1.83	0.16	11.3	1.26E-07	2.00E-06	15.8
MB778	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S337K	7.21	0.16	46.3	3.42E-08	2.54E-06	74.3
MB641	T230E/V231A/P232Y/ S238E/S239Y	1.62	0.15	10.5	1.43E-07	2.10E-06	14.7
MB765	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/N324L	6.23	0.15	40.4	3.96E-08	2.56E-06	64.8
MB617	V237E/S239D/F241D	0.84	0.15	5.5	2.55E-07	2.10E-06	8.2
MB755	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298L/ N324D	6.62	0.15	44.9	2.78E-08	2.50E-06	90.0
MB702	V231A/P232Y/S238E/ S239N	0.96	0.14	6.6	3.39E-07	3.52E-06	10.4
MB626	T230E/V231T/P232Y/ S238E/S239L	0.89	0.14	6.5	2.61E-07	2.37E-06	9.1
MB618	V237E/S238D/S239D	1.63	0.13	12.2	1.56E-07	2.73E-06	17.6
MB885	T230E/V231P/P232A/ V237E/S238E	3.29	0.13	26.2	1.11E-07	4.35E-06	39.3
MB762	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/F296E	5.12	0.12	41.7	4.81E-08	3.22E-06	66.8
MB647	T230I/V231P/P232A/S 238E/S239Y	1.16	0.12	10.0	2.00E-07	2.80E-06	14.0

MB832	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331Y/ E333Y	5.16	0.12	44.8	4.04E-08	3.05E-06	75.5
MB692	T230E/V231P/S238E/ S239Y	1.75	0.12	15.2	1.86E-07	4.44E-06	23.8
MB757	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298M/ N324D	6.63	0.11	58.0	2.78E-08	3.23E-06	116.3
MB624	T230E/V231D/P232Y/ S238E/S239L	0.88	0.11	7.8	2.63E-07	2.87E-06	10.9
MB752	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298L	5.24	0.11	46.6	3.51E-08	3.28E-06	93.4
MB883	T230E/V231P/P232A/ V237E/S239L	2.21	0.11	20.1	1.64E-07	4.96E-06	30.2
MB830	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331F/ E333Y	4.78	0.10	45.9	4.36E-08	3.38E-06	77.4
MB703	T230E/V231A/S238E/ S239N	0.94	0.10	9.1	3.45E-07	4.90E-06	14.2
MB772	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/E333N	4.07	0.10	40.0	6.05E-08	3.89E-06	64.2
MB642	T230E/V231D/P232Y/ S238E/S239Y	1.65	0.10	16.5	1.97E-07	5.11E-06	25.9
MB763	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/F296N	3.98	0.10	40.0	6.19E-08	3.97E-06	64.2
MB594	T230E/V237E/S238E	1.85	0.10	18.7	1.15E-07	3.23E-06	28.0
MB642	T230E/V231D/P232Y/ S238E/S239Y	2.06	0.10	21.1	1.12E-07	3.32E-06	29.6
MB687	T230E/V231P/S238E/ S239L	0.94	0.10	9.8	3.45E-07	5.32E-06	15.4
MB638	T230I/V231P/P232A/S 238E/S239N	0.83	0.10	8.6	2.80E-07	3.38E-06	12.1
MB693	V231D/P232Y/S238E/ S239Y	1.22	0.09	12.9	2.67E-07	5.41E-06	20.3
MB657	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239F	1.95	0.09	20.9	1.18E-07	3.48E-06	29.4
MB611	V237E/S238D/S239E	1.11	0.09	11.9	1.92E-07	3.42E-06	17.8
MB884	T230E/V231P/P232N/ V237E/S239L	2.46	0.09	26.7	1.48E-07	5.91E-06	40.1
MB769	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/P331D	3.90	0.09	43.2	6.32E-08	4.38E-06	69.3
MB657	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239F	1.54	0.09	17.7	2.11E-07	5.87E-06	27.8
MB753	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/S298M	5.00	0.09	57.8	3.68E-08	4.26E-06	115.8
MB628	T230E/V231P/P232A/ S238E/S239L	2.09	0.08	25.0	1.56E-07	6.13E-06	39.3
MB718	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239T	1.08	0.08	13.1	2.47E-07	5.56E-06	22.5
MB764	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239L/F296T	2.90	0.08	37.8	8.49E-08	5.15E-06	60.7
MB886	T230E/V231P/P232N/ V237E/S238E	1.47	0.08	19.5	2.46E-07	7.22E-06	29.3
MB716	T230E/V231P/P232N/ S238E/S239I	5.07	0.08	67.6	5.28E-08	6.15E-06	116.4

MB628	T230E/V231P/P232A/S238E/S239L	2.42	0.07	33.6	9.56E-08	4.50E-06	47.1
MB793	T230Q/V231P/P232N/S238E/S239I	1.37	0.07	19.1	1.79E-07	5.50E-06	30.6
MB594	T230E/V237E/S238E	1.30	0.06	23.0	2.50E-07	9.03E-06	36.2
MB767	T230E/V231P/P232N/S238E/S239L/A330G	2.10	0.04	46.7	1.17E-07	8.79E-06	74.9
MB715	T230E/V231P/P232N/S238E/S239V	1.14	0.04	29.4	2.36E-07	1.19E-05	50.7
MB732	T230E/V231P/P232N/V237E/S238E/S239L	0.84	0.03	24.8	3.21E-07	1.37E-05	42.8
MB731	T230E/V231P/P232A/V237E/S238E/S239L	1.13	0.03	37.5	2.38E-07	1.53E-05	64.5

(I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体の $mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値、

相対的な結合活性 : H237- $mIgG1/MRAL-k0$ の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値を各改変体の各 $mFc\gamma R$ に対するKD値で割った値、

相対的I/A ($mFc\gamma RII$ 選択性) : 各改変体のI/A ($mFc\gamma RIII$ に対するKD値を $mFc\gamma RII$ に対するKD値で割った値) をH237- $mIgG1/MRAL-k0$ のI/Aで割った値。なおH237- $mIgG1/MRAL-k0$ の値は各改変体と同じ測定回の値を使用した)

[0326] [実施例 1 1] $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有する抗体のin vivo評価

これまでの実施例の中で、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有する抗体が取得されてきた。WO2013/047752において、pH依存的に可溶型抗原に結合し、 $mFc\gamma RII$ に対して選択的に結合活性を増強させたFc変異体を有する抗原結合分子は、生体内に投与された場合に、血漿中の可溶型抗原を効率的に消失させることが可能であることがノーマルマウスにおいて示された。本実施例では、この抗原の消失効果が $mFc\gamma RII$ に対する結合活性の増強の程度と相關するのかを検証するために、ノーマルマウスを使って以下の試験を実施した。

[0327] (1 1 – 1) $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強したFc変異体を有する抗体の $mFc\gamma R$ 結合活性

これまでの実施例で作製・評価された改変体の中から、 $mFc\gamma RII$ に対する結合活性を選択的に増強し、かつ増強の程度が異なるものとして、H237-MB477/MRAL-k0およびH237-MB492/MRAL-k0を選抜した。これら2つの改変体およびH

H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値およびI/A (mFc γ RII選択性) を表28に示した。なお、表中の名称は評価した改変体のH鎖定常領域の名称を表す。また改変に関しては、EUナンバリング000番目のアミノ酸Xをアミノ酸Zに置換することを「X000Z」と表記した。この際、XおよびZはアミノ酸残基を一文字表記で表したものである。表28における改変は、いずれもマウスIgG1 (mIgG1) のH鎖定常領域（配列番号：4）に対して導入された改変である。

[0328] [表28]

名称 (CH)	mIgG1に対して導入した改変	相対的 mFc γ RII 結合活性 (mIgG1を 1とした 場合)	相対的 mFc γ RIII 結合活性 (mIgG1を 1とした 場合)	相対的 I/A (mFc γ RII 選択性) (mIgG1を 1とした 場合)	KD (mFc γ RII)	KD (mFc γ RIII)	I/A (mFc γ RII 選択性)
mIgG1	-	1.0	1.0	1.0	2.10E-07	2.82E-07	1.3
MB477	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D/S267A	195.7	3.0	65.3	1.07E-09	9.40E-08	87.6
MB492	T230E/V231P/P232N/S238E/S239D/N324D	621.5	10.9	57.0	3.38E-10	2.58E-08	76.3

(I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のmFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値、

相対的な結合活性 : H237-mIgG1/MRAL-k0の各mFc γ Rに対するKD値を各改変体の各mFc γ Rに対するKD値で割った値、

相対的I/A (mFc γ RII選択性) : 各改変体のI/A (mFc γ RIIIに対するKD値をmFc γ RIIに対するKD値で割った値) をH237-mIgG1/MRAL-k0のI/Aで割った値)

[0329] (1 1 - 2) ノーマルマウスを用いたin vivo 試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) に可溶型ヒトIL-6レセプター（参考例3にて作製）および抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体を同時投与した後の抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体および可溶型ヒトIL-6レセプターの体内動態を評価した。可溶型ヒトIL-6レセプター溶液(5 μg/mL)、もしくは、可溶型ヒトIL-6レセプターと抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体の混合溶液を尾静脈に10mL/kgで投与した。抗体は1mg/kgで可溶型ヒトIL-6レセプターは50 μg/kgの投与量とした。抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体としては、上述のH237-MB477/MRAL-k0、H237-MB492/MRAL-k0のL鎖をW02009/12582

5に記載されている抗ヒトIL-6レセプター抗体であるFv4-IgG1のL鎖VL3-CKの可変領域であるL104とマウス κ 鎖の定常領域であるmk1からなるL104-mk1（配列番号：32）に置き換えたH237-MB477/L104-mk1、H237-MB492/L104-mk1を使用した。抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体投与後5分、2時間、7時間、1日、2日、3日、7日、14日、21日、28日が経過した後に当該マウスから採血が行なわれた。ただし、抗体投与後2時間の採血は実施されていない場合もある。採取された血液を直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離した血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0330] (11-3) 電気化学発光法による血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度の測定

マウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は電気化学発光法にて測定した。血漿中濃度として12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 ng/mLに調整した可溶型ヒトIL-6レセプター検量線試料および50倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびトリズマブ溶液を混合し37度で1晩反応させた。その後、0.5%BSA(w/v)を含有したPBS-Tween溶液を用いて5度で1晩BlockingしたStreptavidin Gold Multi-ARRAY Plate (Meso Scale Discovery) に分注した。さらに室温で2時間反応させ洗浄後、Read Buffer T($\times 2$) (Meso Scale Discovery) を分注し、ただちにSECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) で測定を行った。可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。その結果を図20に示す。

[0331] (11-4) ELISA法による血漿中抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度はELISA法にて測定された。まず、可溶型ヒトIL-6レセプターをNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (N

alge nunc International) に分注し、4°Cで1晩静置することによって可溶型ヒトIL-6レセプター固相化プレートが作成された。血漿中濃度として2.50、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μg/mLの抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体を含む検量線試料と100倍以上希釀されたマウス血漿測定試料が調製された。これらの検量線試料および血漿測定試料100 μLが各ウェルに分注された可溶型ヒトIL-6レセプター固相化プレートを室温で2時間攪拌させた。その後Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (SIGMA) を室温で2時間反応させた反応液の発色反応が、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて行われた。1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を添加することによって反応が停止された各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が、マイクロプレートリーダーにて測定された。マウス血漿中の抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。その結果を図21に示した。

[0332] 図20の結果から、mFc γ RIIに対する結合活性を選択的に増強したFcを有する抗体であるH237-MB477/L104-mk1 (H237-mIgG1/L104-mk1を1とした時の相対的mFc γ RII結合活性が約200倍) およびH237-MB492/L104-mk1 (H237-mIgG1/L104-mk1を1とした時の相対的mFc γ RII結合活性が約620倍) をノーマルマウスに投与した際の血漿中からの抗原消失効果は、抗体FcのmFc γ RIIに対する結合活性増強の程度に応じて、より高められることが示された。すなわち、相対的mFc γ RII結合活性が約620倍であるH237-MB492/L104-mk1が投与されたマウスでは、相対的mFc γ RII結合活性が約200倍であるH237-MB477/L104-mk1が投与されたマウスよりも、標的抗原濃度が低減し、相対的mFc γ RII結合活性が約200倍であるH237-MB477/L104-mk1を投与されたマウスではH237-mIgG1/L104-mk1を投与されたマウスよりも標的抗原濃度が低減していた。

図21の結果から、H237-MB477/L104-mk1は相対的mFc γ RII結合活性が約200倍であるにも関わらず、H237-mIgG1/L104-mk1とほぼ同等の血漿中抗体濃度推移を示した。相対的mFc γ RII結合活性が約620倍であるH237-MB492/L104-mk1は、H237-mIgG1/L104-mk1と比較して血漿中抗体濃度がわずかに低減してい

た。しかしながら、投与一日後の段階ではH237-MB492/L104-mk1の抗体濃度はH237-mIgG1/L104-mk1の抗体濃度と同程度であるにも関わらず、H237-MB492/L104-mk1を投与したマウスでは可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が約10倍低減していた。このことから、H237-MB492/L104-mk1は抗体濃度がわずかにしか低減していないにも関わらず、標的抗原の濃度を著しく減弱することができるこことが示された。

[0333] [参考例1] 抗体の発現ベクターの作製および抗体の発現と精製

抗体の可変領域のH鎖およびL鎖の塩基配列をコードする全長の遺伝子の合成は、Assemble PCR等を用いて、当業者公知の方法で作製した。アミノ酸置換の導入はPCR等を用いて当業者公知の方法で行った。得られたプラスミド断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、H鎖発現ベクターおよびL鎖発現ベクターを作製した。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定した。作製したプラスミドをヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株(Invitrogen社)、またはFreeStyle293細胞(Invitrogen社)に、一過性に導入し、抗体の発現を行った。得られた培養上清を回収した後、 $0.22\mu\text{m}$ フィルターMILLEX(R)-GV(Millipore)、または $0.45\mu\text{m}$ フィルターMILLEX(R)-GV(Millipore)を通して培養上清を得た。得られた培養上清から、rProtein A Sepharose Fast Flow(GEヘルスケア)またはProtein G Sepharose 4 Fast Flow(GEヘルスケア)を用いて当業者公知の方法で、抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて 280 nm での吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した(Protein Science 1995, 4, 2411-2423)。

[0334] [参考例2] mFc γ Rの調製方法および改変抗体とmFc γ Rとの相互作用解析方法

マウスのFc γ Rの細胞外ドメインを以下の方法で調製した。まずFc γ Rの細胞外ドメインの遺伝子の合成を当業者公知の方法で実施した。その際、各Fc γ Rの配列はNCBIに登録されている情報に基づき作製した。具体的には、mFc γ RIについてはNCBI Reference Sequence: NP_034316.1、mFc γ RIIについて

はNCBI Reference Sequence: NP_034317.1、mFc γ RIIIについてはNCBI Reference Sequence: NP_034318.2、mFc γ RIVについてはNCBI Reference Sequence: NP_653142.2の配列に基づいて作製し、C末端にHisタグを付加した。

[0335] 得られた遺伝子断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターをヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞（Invitrogen社）に、一過性に導入し、目的タンパク質の発現を行った。得られた培養上清を回収した後、0.22μmフィルターを通して培養上清を得た。得られた培養上清は原則として次の4ステップで精製した。第1ステップはイオン交換カラムクロマトグラフィー、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過を実施した。第1ステップのイオン交換カラムクロマトグラフィーについて、mFc γ RIはQ Sepharose HP、mFc γ RIIおよびmFc γ RIVはSP Sepharose FF、mFc γ RIIIはSP Sepharose HPを用いた。また第3ステップ以降で用いた溶媒はD-PBS（-）としたが、mFc γ RIIIについては0.1M Arginineを含むD-PBS（-）とした。精製したタンパク質については分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて精製タンパク質の濃度を算出した（Protein Science 1995；4：2411-2423）。

[0336] Biacore T100（GEヘルスケア）、Biacore T200（GEヘルスケア）、Biacore A100、Biacore 4000を用いて、各改変抗体と上記で調製したFc γ レセプターとの相互作用解析を行った。ランニングバッファーにはHBS-EP+（GEヘルスケア）を用い、測定温度は25°Cとした。Series S Sensor Chip CM5（GEヘルスケア）またはSeries S Sensor Chip CM4（GEヘルスケア）に、アミンカップリング法によりProtein L（ACTIGENまたはBioVision）を固定化したチップを用いた。

[0337] これらのセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したmFc γ Rを相互作用させ、抗体に対する結合量を測定し、抗体間で比較した。ただし、mFc γ Rの結合量はキャプチャーした抗体の量に

依存するため、各抗体のキャプチャー量で $mFc\gamma R$ の結合量を除した補正值で比較した。また、10 mM glycine-HCl、pH1.5を反応させることで、センサーチップにキャプチャーした抗体を洗浄し、センサーチップを再生して繰り返し用いた。

[0338] また、各改変抗体の $Fc\gamma R$ に対するKD値を算出するため速度論的な解析は以下の方法にしたがって実施した。まず、上記のセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈した $mFc\gamma R$ を相互作用させ、得られたセンサーグラムに対してBiacore Evaluation Softwareにより測定結果を1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数 k_a (L/mol/s)、解離速度定数 k_d (1/s)を算出し、その値から解離定数KD (mol/L) を算出した。

[0339] [参考例3] 可溶型ヒトIL-6レセプター (hsIL-6R) の調製

抗原であるヒトIL-6レセプターの組み換えヒトIL-6レセプターは以下のように調製した。J Immunol 152, 4958-4968 (1994)で報告されているN末端側1番目から357番目のアミノ酸配列からなる可溶型ヒトIL-6レセプター（以下、hsIL-6R）のCHO定常発現株を当業者公知の方法で構築し、培養し、hsIL-6Rを発現させた。得られた培養上清から、Blue Sepharose 6 FFカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの2工程によりhsIL-6Rを精製した。最終工程においてメインピークとして溶出した画分を最終精製品とした。

産業上の利用可能性

[0340] 本発明によって、マウス $Fc\gamma RIII$ と比較してマウス $Fc\gamma RII$ に対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが提供された。それらは、ヒト $Fc\gamma RIIa$ と比較してヒト $Fc\gamma RIIb$ に対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける作用をマウスで予測することを可能にする点において極めて有用である。具体的には、(i) ヒトにおける疾患の治療または予防効果を予測する、(ii) ヒトにおける治療または予防に適した疾患を選択する、(iii) ヒトにおける疾患の治療または予防に適した標的抗原を選択する、(iv)

) ヒトにおける疾患の治療または予防に適した抗原結合領域を選択する、(v)
ヒトにおける安全性または毒性を予測する、(vi) ヒトにおける薬物動態を
予測するなどの点において有用である。

請求の範囲

- [請求項1] Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を含み、かつ [マウスFc γ RIIIに対するKD値] / [マウスFc γ RIIに対するKD値] の比が6以上であるポリペプチド。
- [請求項2] Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を含み、かつマウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上しているポリペプチド。
- [請求項3] マウスFc γ RIIに対するKD値が20nM以下である、請求項1または2に記載のポリペプチド。
- [請求項4] マウスFc γ RIIに対する結合活性が親ポリペプチドより10倍以上増強している、請求項1または2に記載のポリペプチド。
- [請求項5] マウスFc γ RIIIに対するKD値が1 μ M以上である、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項6] マウスFc γ RIIIに対する結合活性が親ポリペプチドの0.25倍以下に減弱している、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項7] アミノ酸改変が、EUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のアミノ酸のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸の改変である、請求項1から6のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項8] アミノ酸改変が、EUナンバリング；
230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、
231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、
232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、Trp

またはTyrへの置換、
237番目のアミノ酸のGluへの置換、
238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、
239番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu
、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、
240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、
241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、
266番目のアミノ酸のLeuへの置換、
267番目のアミノ酸のAla、GluまたはMetへの置換、
268番目のアミノ酸のAspへの置換、
271番目のアミノ酸のLeuへの置換、
295番目のアミノ酸のLeuへの置換、
296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、
298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、
324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、
326番目のアミノ酸のAspへの置換、
327番目のアミノ酸のGlyへの置換、
330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、
331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、
333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、
334番目のアミノ酸のArgへの置換、
335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、
337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、
のグループから選択される少なくとも一つの改変である、請求項7に
記載のポリペプチド。

[請求項9] Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、請求項1から8のいずれか一
項に記載のポリペプチド。

[請求項10] ポリペプチドが抗体である、請求項1から9のいずれか一項に記載

のポリペプチド。

[請求項11] Fc領域を含む親ポリペプチドを改変して、[マウスFc γ RIIIに対するKD値]／[マウスFc γ RIIに対するKD値]の比を6以上にする方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

[請求項12] Fc領域を含む親ポリペプチドを改変して、マウスFc γ RIIIと比較した場合のマウスFc γ RIIに対する結合選択性を親ポリペプチドより5倍以上向上させる方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

[請求項13] アミノ酸改変が、EUナンバリング；
230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、
231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、
232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、
237番目のアミノ酸のGluへの置換、
238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、
239番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、
240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、

241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、

266番目のアミノ酸のLeuへの置換、

267番目のアミノ酸のAla、GluまたはMetへの置換、

268番目のアミノ酸のAspへの置換、

271番目のアミノ酸のLeuへの置換、

295番目のアミノ酸のLeuへの置換、

296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、

298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、

324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、

326番目のアミノ酸のAspへの置換、

327番目のアミノ酸のGlyへの置換、

330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、

331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、

333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、

334番目のアミノ酸のArgへの置換、

335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、

337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、

のグループから選択される少なくとも一つの改変である、請求項 11

または 12 に記載の方法。

[請求項14] Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項15] ポリペプチドが抗体である、請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、〔マウスFc γ RIIIに対するKD値〕／〔マウスFc γ RIIに対するKD値〕の比が6以上のポリペプチドを製造する方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、3

24番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

[請求項17] Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、マウスFc γ RIIIと比較してマウスFc γ RIIに対する結合選択性が親ポリペプチドより5倍以上向上したポリペプチドを製造する方法であって、該Fc領域のEUナンバリング230番目、231番目、232番目、237番目、238番目、239番目、240番目、241番目、266番目、267番目、268番目、271番目、295番目、296番目、298番目、324番目、326番目、327番目、330番目、331番目、333番目、334番目、335番目、337番目のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸に改変を加えることを含む方法。

[請求項18] アミノ酸改変が、EUナンバリング；
230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、
231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、
232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、
237番目のアミノ酸のGluへの置換、
238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、
239番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、
240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、
241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、
266番目のアミノ酸のLeuへの置換、
267番目のアミノ酸のAla、GluまたはMetへの置換、
268番目のアミノ酸のAspへの置換、
271番目のアミノ酸のLeuへの置換、
295番目のアミノ酸のLeuへの置換、

296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、

298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、

324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、

326番目のアミノ酸のAspへの置換、

327番目のアミノ酸のGlyへの置換、

330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、

331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、

333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、

334番目のアミノ酸のArgへの置換、

335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、

337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、

のグループから選択される少なくとも一つの改変である、請求項16

または17に記載の方法。

[請求項19] Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、請求項16から18のいずれか一項に記載の方法。

[請求項20] ポリペプチドが抗体である、請求項16から19のいずれか一項に記載の方法。

[請求項21] 請求項16から20のいずれか一項に記載の方法により製造されたポリペプチド。

[請求項22] マウスFc領域を含む親ポリペプチドの変異体で、該Fc領域にEUナンバリング；

230番目のアミノ酸のAsp、Glu、Ile、Pro、GlnまたはValへの置換、

231番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、ThrまたはTrpへの置換、

232番目のアミノ酸のAla、Asp、Glu、Phe、Lys、Leu、Asn、Val、TrpまたはTyrへの置換、

237番目のアミノ酸のGluへの置換、

238番目のアミノ酸のAsp、Glu、ProまたはGlnへの置換、

239番目のアミノ酸のAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrへの置換、
240番目のアミノ酸のGlu、His、GlnまたはTrpへの置換、
241番目のアミノ酸のAsp、Glu、Thr、TrpまたはTyrへの置換、
266番目のアミノ酸のLeuへの置換、
267番目のアミノ酸のGluまたはMetへの置換、
268番目のアミノ酸のAspへの置換、
271番目のアミノ酸のLeuへの置換、
295番目のアミノ酸のLeuへの置換、
296番目のアミノ酸のGlu、Asn、Thr、またはTrpへの置換、
298番目のアミノ酸のHis、Leu、またはMetへの置換、
324番目のアミノ酸のAsp、Leu、またはMetへの置換、
326番目のアミノ酸のAspへの置換、
327番目のアミノ酸のGlyへの置換、
330番目のアミノ酸のGly、Lys、またはGlnへの置換、
331番目のアミノ酸のAsp、Phe、またはTyrへの置換、
333番目のアミノ酸のAsn、Val、またはTyrへの置換、
334番目のアミノ酸のArgへの置換、
335番目のアミノ酸のAsnまたはTyrへの置換、
337番目のアミノ酸のIle、Lys、またはTrpへの置換、
のグループから選択される少なくとも一つのアミノ酸改変を含むポリペプチド。

[請求項23]

さらに、EUナンバリング；
239番目のアミノ酸のAspまたはGluへの置換、
267番目のアミノ酸のAlaへの置換、
のグループから選択されるアミノ酸改変を含む、請求項22に記載の
ポリペプチド。

[請求項24]

Fc領域がマウスIgG1のFc領域である、請求項22または23に記載

のポリペプチド。

[請求項25] ポリペプチドが抗体である、請求項22から24のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項26] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の疾患の治療または予防効果を予測する方法であって、以下の工程を含む方法；

(a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、

(b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および請求項1から10、21から25のいずれか一項に記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、

(c) 工程(b)で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに

(d) 工程(c)の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドが前記ヒト疾患の治療または予防に有効であると判断する工程。

[請求項27] 工程(b)(c)に加えて、

(b') 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、

(c') 工程(b')で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程を含み、かつ工程(d)が、

(d) 工程(c)(c')の結果、工程(b')のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程(b)のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含む

ポリペプチドが前記ヒト疾患の治療または予防に有効であると判断する工程である、請求項 26 に記載の方法。

- [請求項28] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患を選択する方法であって、以下の工程を含む方法；
- (a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、
 - (b) 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および請求項 1 から 10、21 から 25 のいずれか一項に記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、
 - (c) 工程 (b) で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに
 - (d) 工程 (c) の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患として前記ヒト疾患を選択する工程。

- [請求項29] 工程 (b) (c) に加えて、
- (b') 工程 (a) で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、
 - (c') 工程 (b') で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程を含み、かつ工程 (d) が、
 - (d) 工程 (c) (c') の結果、工程 (b') のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程 (b) のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した疾患として前記ヒト疾

患を選択する工程である、請求項28に記載の方法。

- [請求項30] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原を選択する方法であって、以下の工程を含む方法；
- (a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、
 - (b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および請求項1から10、21から25のいずれか一項に記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、
 - (c) 工程(b)で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程、ならびに
 - (d) 工程(c)の結果、当該マウスに疾患の治療または予防効果が見られた場合、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原として前記マウス抗原に対応するヒト抗原を選択する工程。

- [請求項31] 工程(b)(c)に加えて、

- (b') 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドを作製する工程、
- (c') 工程(b')で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスに投与する工程を含み、かつ工程(d)が、
- (d) 工程(c)(c')の結果、工程(b')のポリペプチドを投与されたマウスに比べて、工程(b)のポリペプチドを投与されたマウスでより強い疾患の治療または予防効果が見られた場合、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した標的抗原として前記マウス抗原に対応するヒト抗原を選択する工程である、請求項30に記載の方法。

[請求項32] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた治療または予防に適した抗原結合領域を選択する方法であって、以下の工程を含む方法；

- (a) 同一のマウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを複数取得する工程、
- (b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および請求項1から10、21から25のいずれか一項に記載のFc変異体を含むポリペプチドをそれぞれ作製する工程、
- (c) 工程(b)で作製されたポリペプチドを、ヒト疾患のモデルマウスにそれぞれ投与する工程、および
- (d) 工程(c)の結果、より強い治療または予防効果を示したポリペプチドの抗原結合領域を、ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドを用いた前記ヒト疾患の治療または予防に適した抗原結合領域として選択する工程。

[請求項33] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の安全性または毒性を予測する方法であって、以下の工程を含む方法；

- (a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、
- (b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および請求項1から10、21から25のいずれか一項に記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、
- (c) 工程(b)で作製されたポリペプチドをマウスに投与する工程、ならびに
- (d) 工程(c)で得られた、工程(b)のポリペプチドのマウスにおける安全性または毒性の結果を、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトに

おける安全性または毒性として類推する工程。

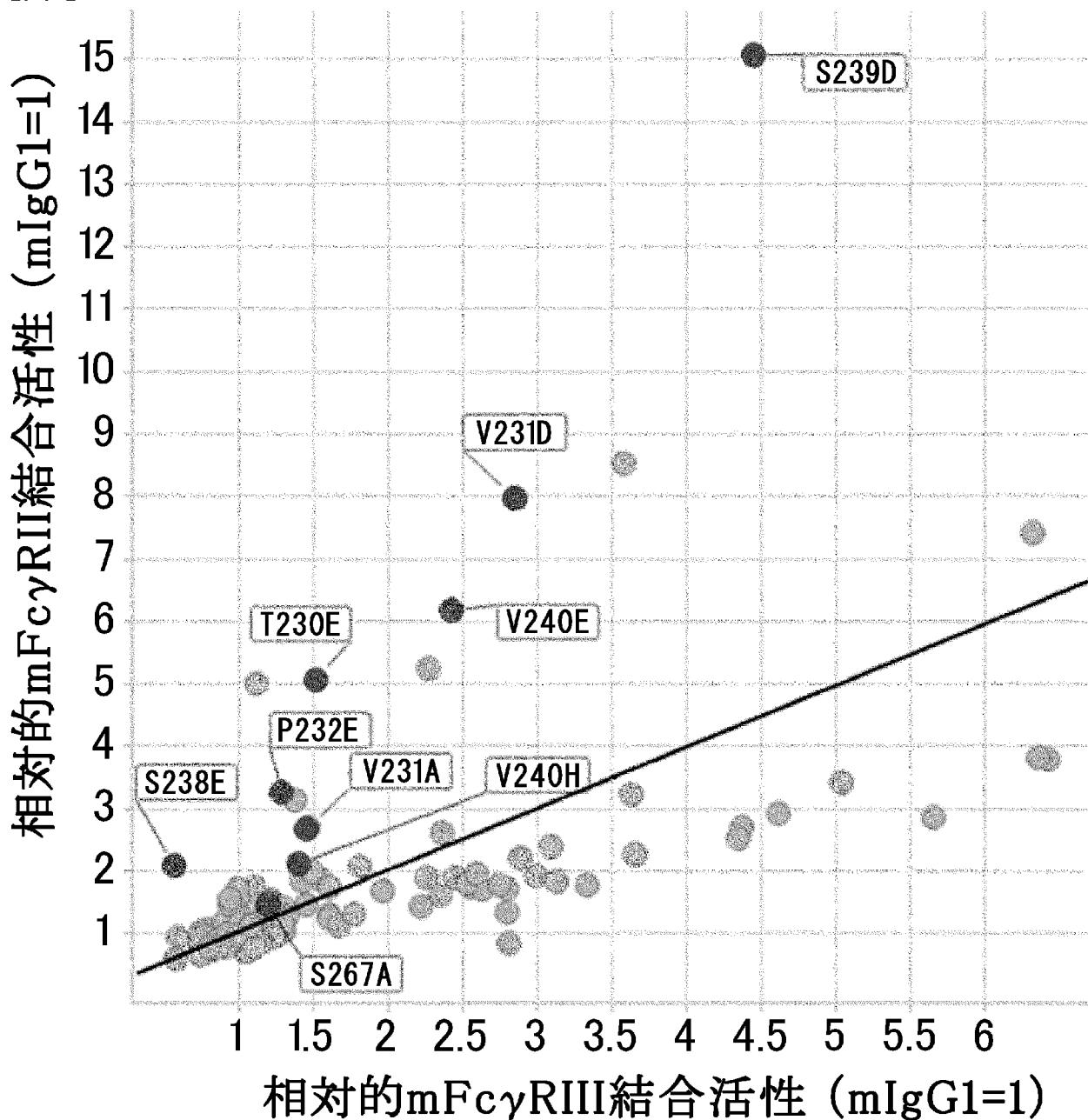
- [請求項34] ヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドをヒトに投与した場合の薬物動態を予測する方法であって、以下の工程を含む方法；
- (a) マウス抗原に結合する抗原結合領域を含むポリペプチドを取得する工程、
 - (b) 工程(a)で取得されたポリペプチドの抗原結合領域、および請求項1から10、21から25のいずれか一項に記載のFc変異体を含むポリペプチドを作製する工程、
 - (c) 工程(b)で作製されたポリペプチドをマウスに投与する工程、ならびに
 - (d) 工程(c)で得られた、工程(b)のポリペプチドのマウスにおける薬物動態の結果を、前記マウス抗原に対応するヒト抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチドのヒトにおける薬物動態として類推する工程。
- [請求項35] 疾患が免疫炎症性疾患である、請求項26から32のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項36] 免疫炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項35に記載の方法。
- [請求項37] マウスがヒト抗原を発現する遺伝子改変マウスである、請求項26から36のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項38] Fc領域がIgGのFc領域である、請求項26から37のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項39] ポリペプチドが抗体である、請求項26から38のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項40] 請求項30または31に記載の方法により選択された標的抗原に結合する抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチド。

- [請求項41] 請求項32に記載の方法により選択された抗原結合領域、およびヒトFc γ RIIaと比較してヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合するFc変異体を含むポリペプチド。
- [請求項42] Fc領域がIgGのFc領域である、請求項40または41に記載のポリペプチド。
- [請求項43] ポリペプチドが抗体である、請求項40から42のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項44] 請求項40から43のいずれか一項に記載のポリペプチドを有効成分として含む、ヒト疾患の治療または予防剤。

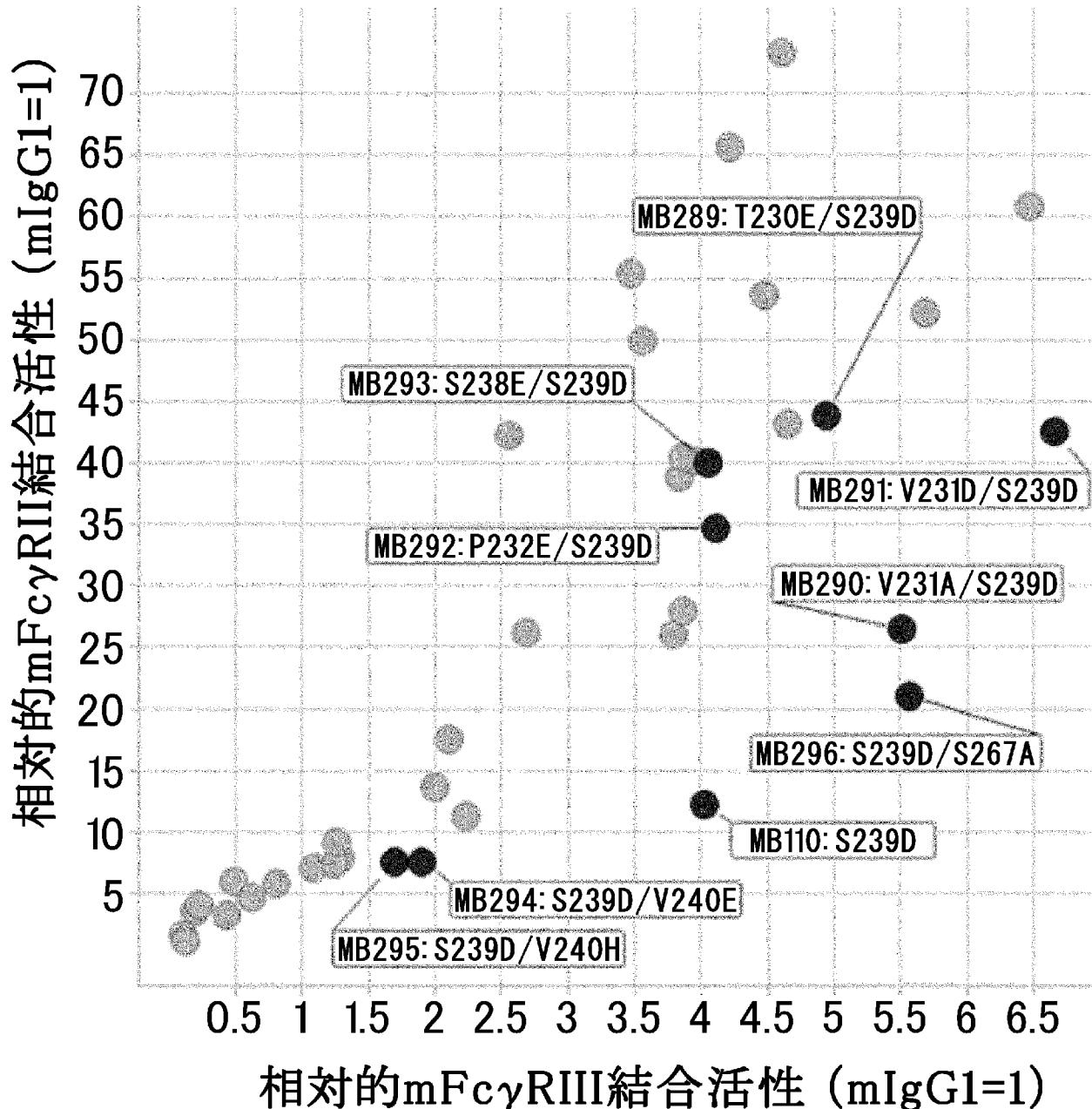
[§1]

mFcgrII (NP_034317.1)	1	MGILPFILLIPMESNWTVHFSRTTCHMILLTAVLNLAAGTHDLPKAVVKLEPPWIQVLKE	60
mFcgrII (NP_034318.2)	1	-----MFQNAHSGSQWIDPPLTILLFAFADRQSAALPKAVVKLDPPWIQVLKE	49
mFcgrII (NP_034317.1)	61	DIVTLLICEGTHNPGNSSTQWFHNGRSIERSQVQASYTTFKATVNDSGEYRCOMEQTRLSDPV	120
mFcgrII (NP_034318.2)	50	DIVTLLICEGTHNPGNSSTQWFHNGRSIERSQVQASYTTFKATVNDSGEYRCOMEQTRLSDPV	109
mFcgrII (NP_034317.1)	121	DLGVVISDWILLQQTPOLVIFLEGETITLRCHSWRNKLNNRISFFHNEKSVRVYHYSSNFSIF	180
mFcgrII (NP_034318.2)	110	DLGVVISDWILLQQTPORVIFLEGETITLRCHSWRNKLNNRISFFHNEKSVRVYHYKSNFSIF	169
mFcgrII (NP_034317.1)	181	KANHSHSGDYYCKGSLLGRTIHQSKPVTITVQGPKSSRSLPVLTIVAAVTAVTGIAVAIAVIL	240
mFcgrII (NP_034318.2)	170	KANHSHSGDYYCKGSLLGSIHQSKPVTITVQDPATTSSISLWVYHTAFSLVMCLLFAVDT	229
mFcgrII (NP_034317.1)	241	VSLVYILKKQVPDNPPDLEEAAKTEAENTITYSSLKHPPEALDEETEHDXQNHI	293
mFcgrII (NP_034318.2)	230	GLYFYVRRNLQTPREYWRKSLSIRKQAPQDK-----	261

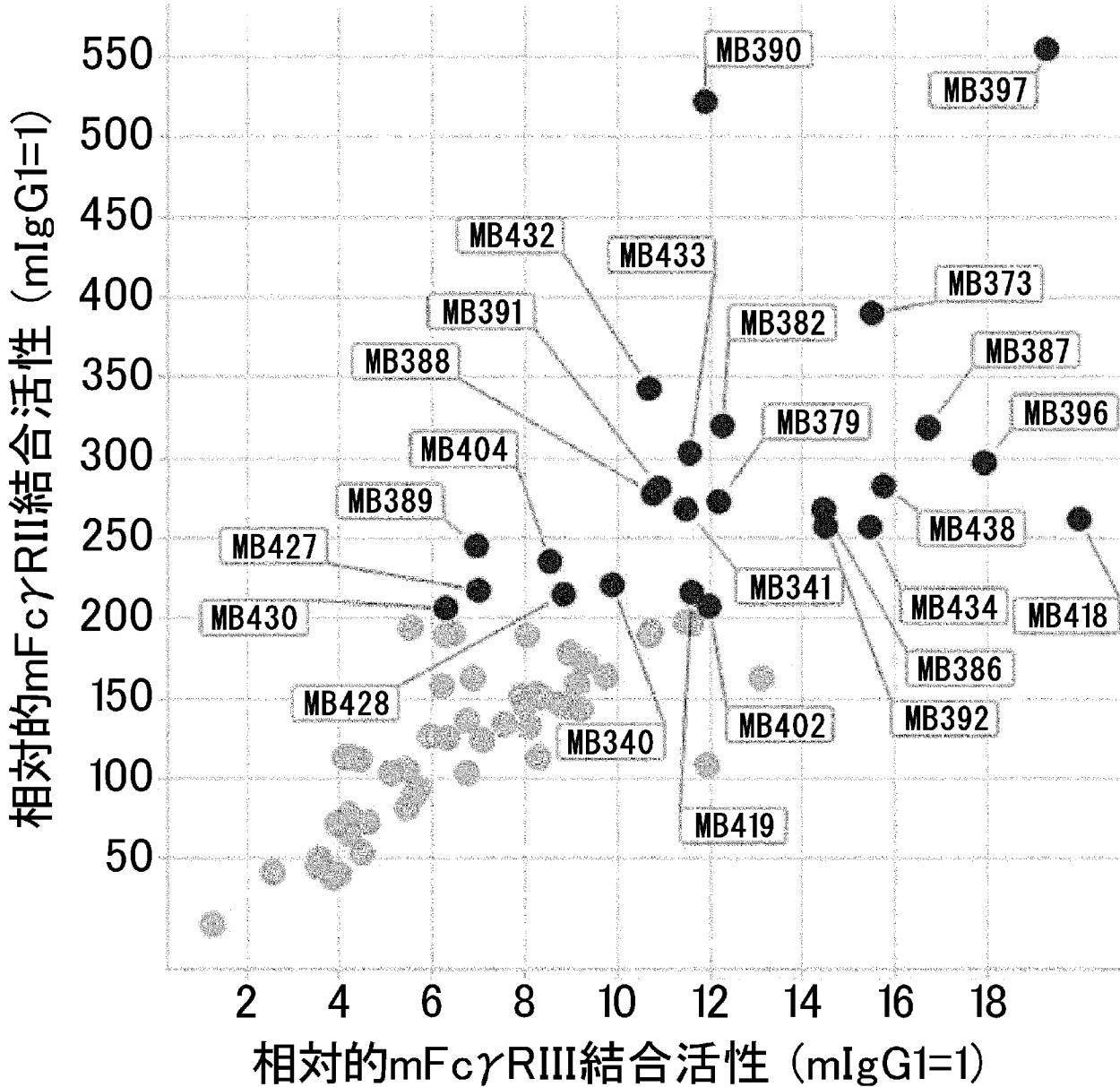
[図2]



[図3]

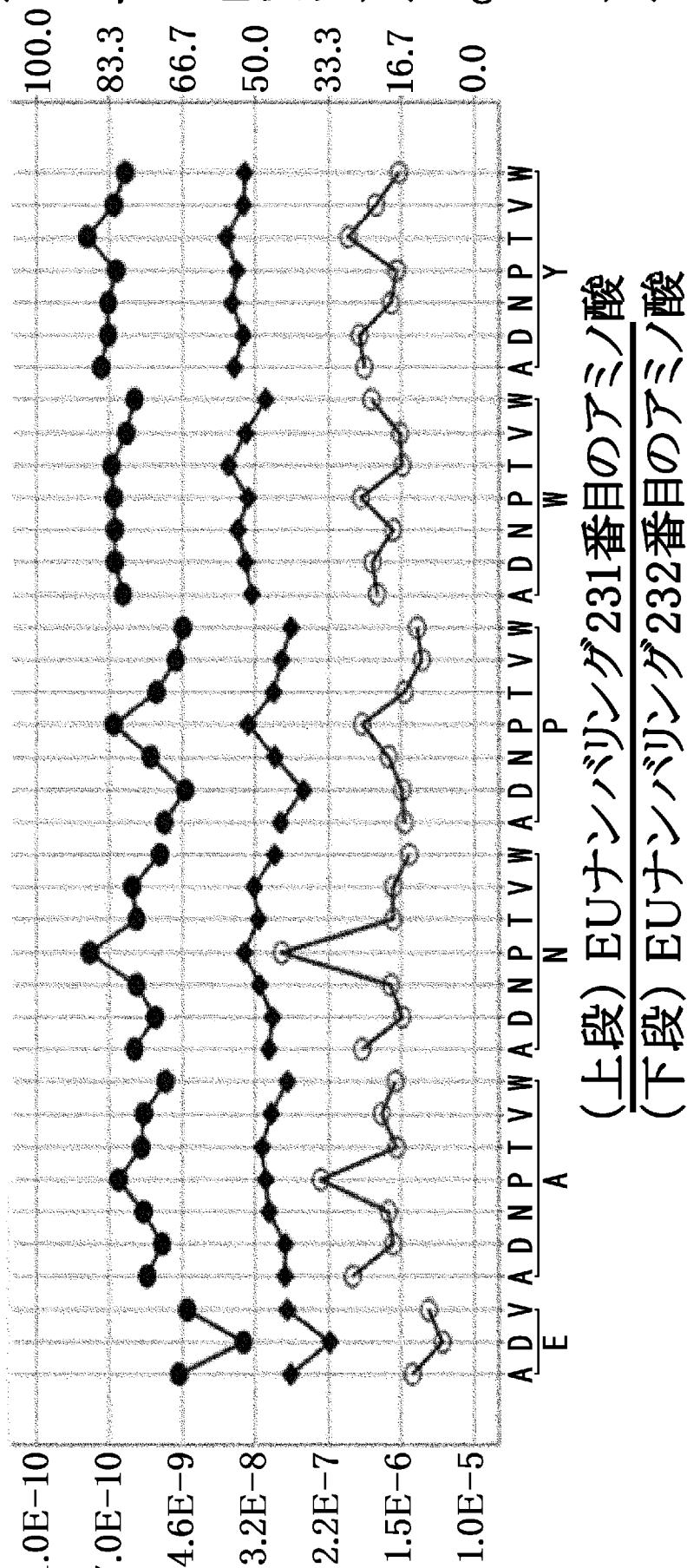


[図4]



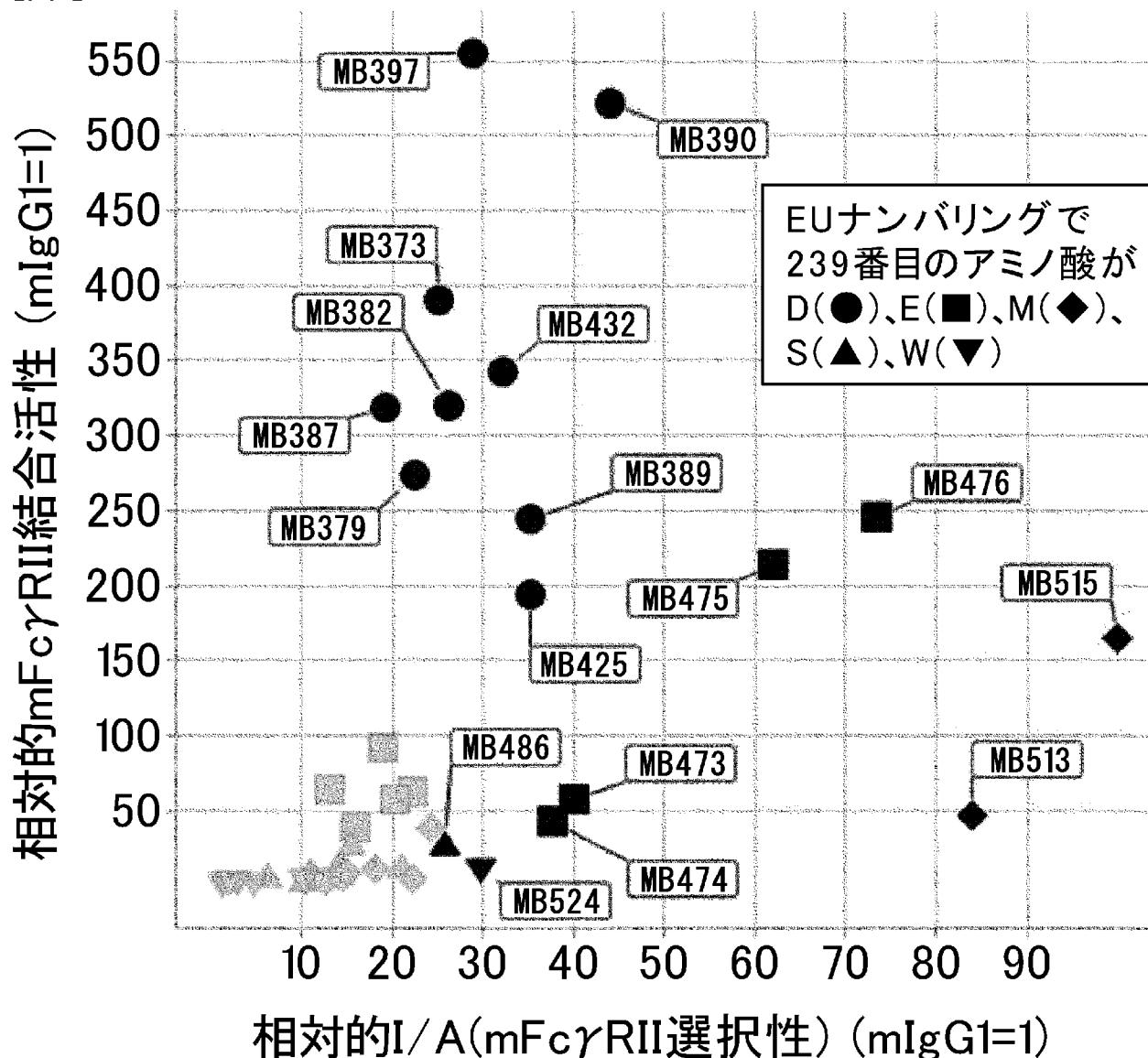
[図5]

相対的I/A(mFc γ RII選択性) (mIgG1=1) (○)

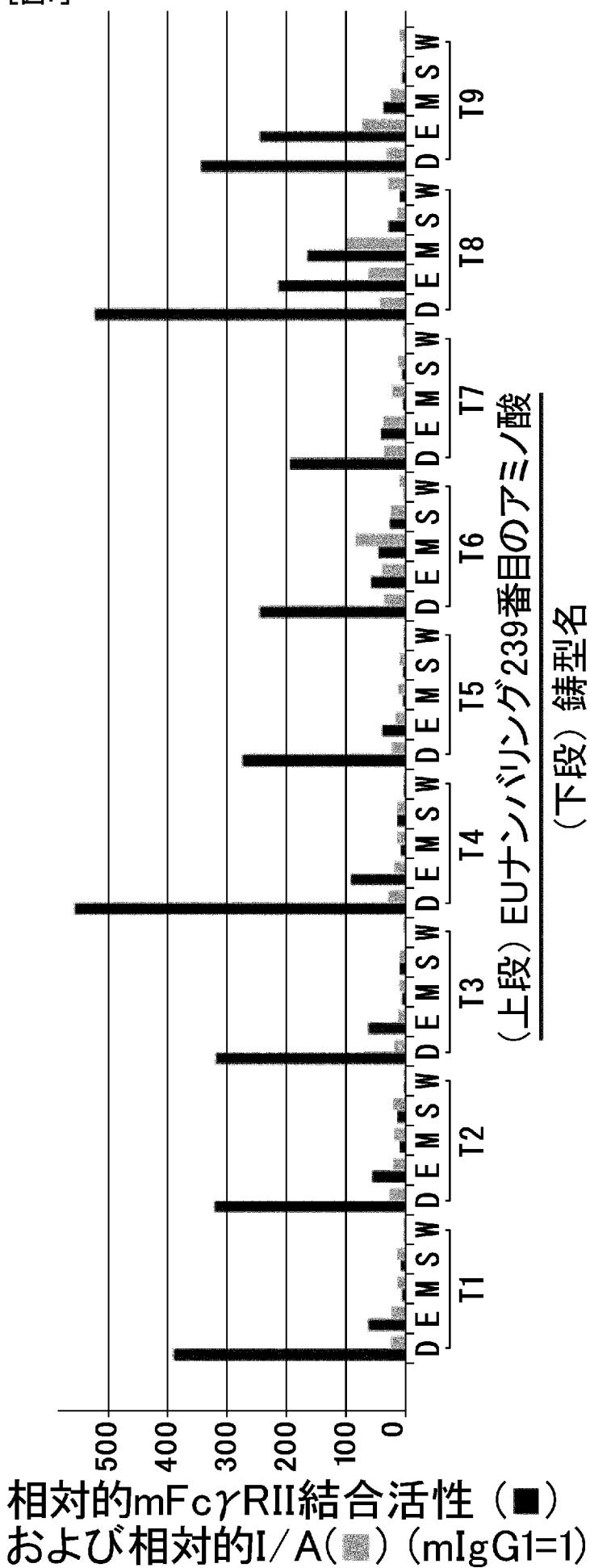


mFc γ RII(●)およびmFc γ RIII(◆)に対するKD(M)

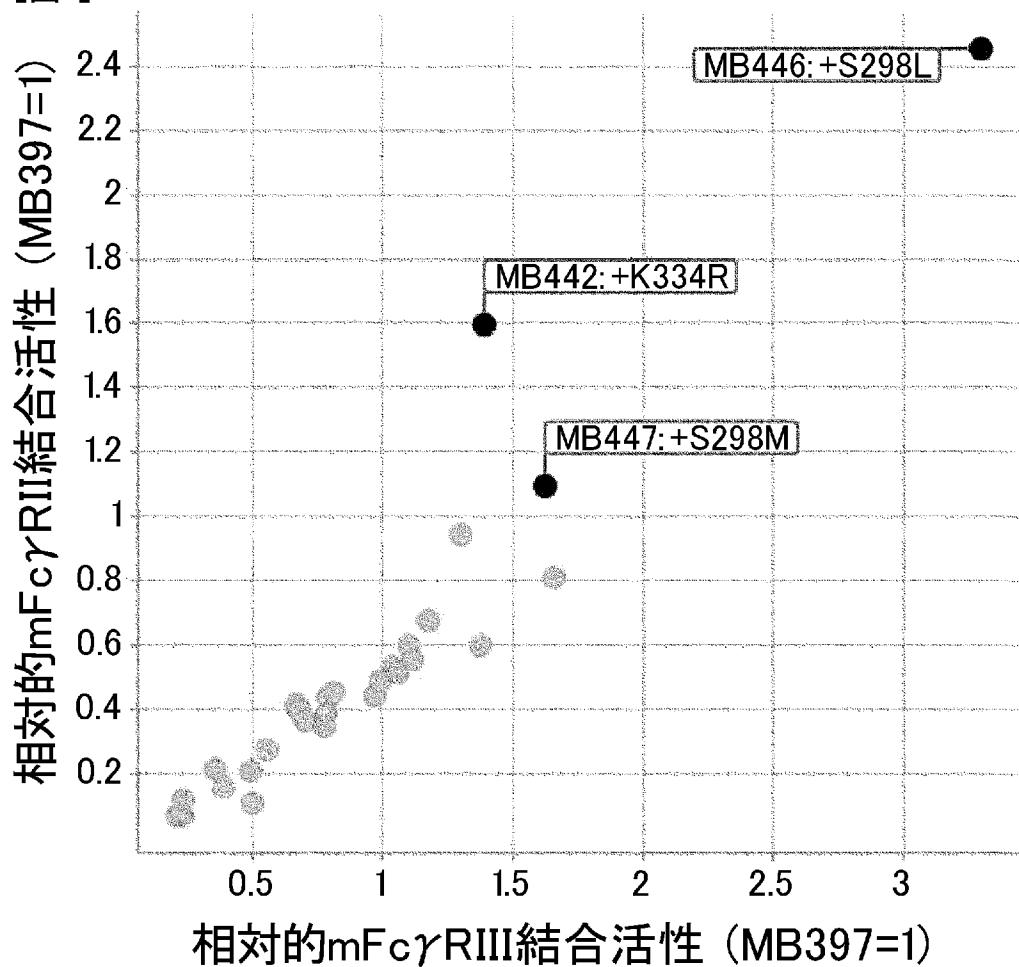
[図6]



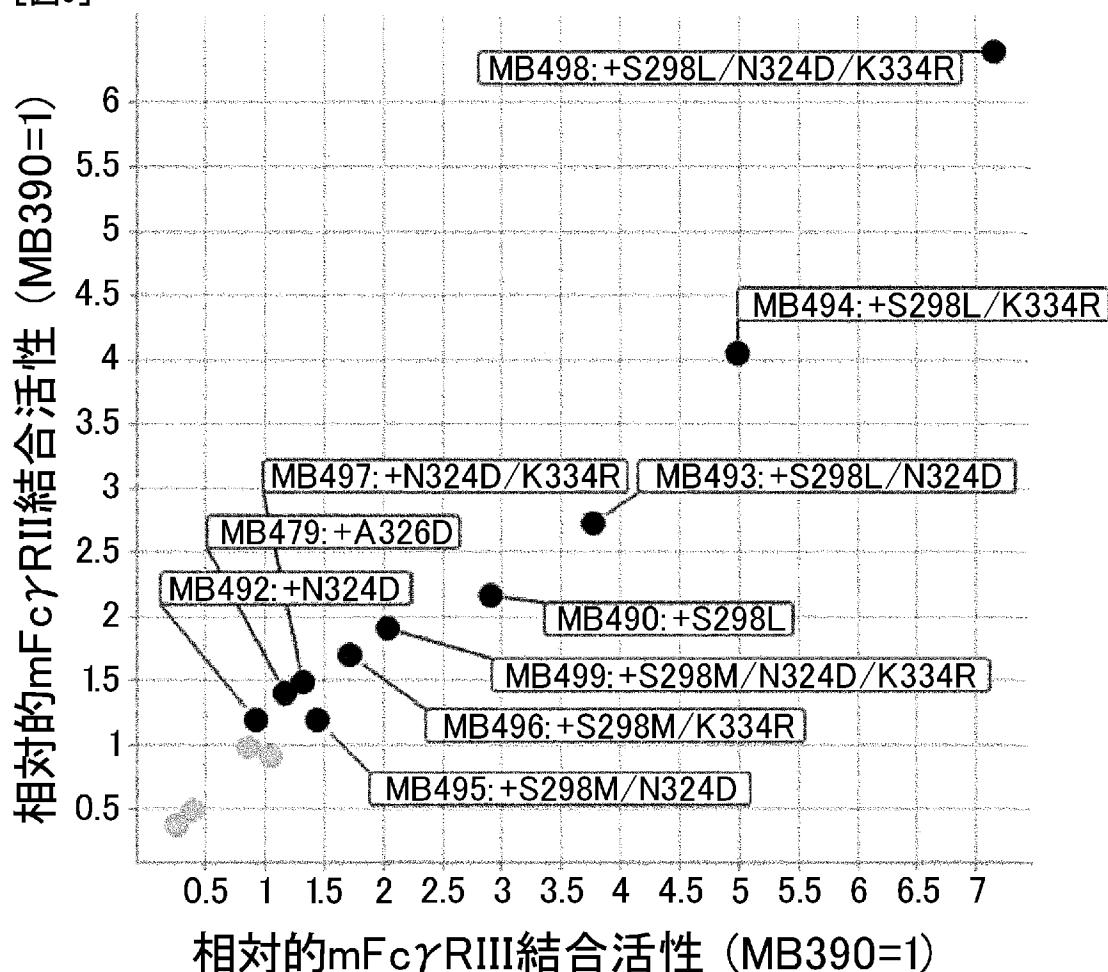
[図7]



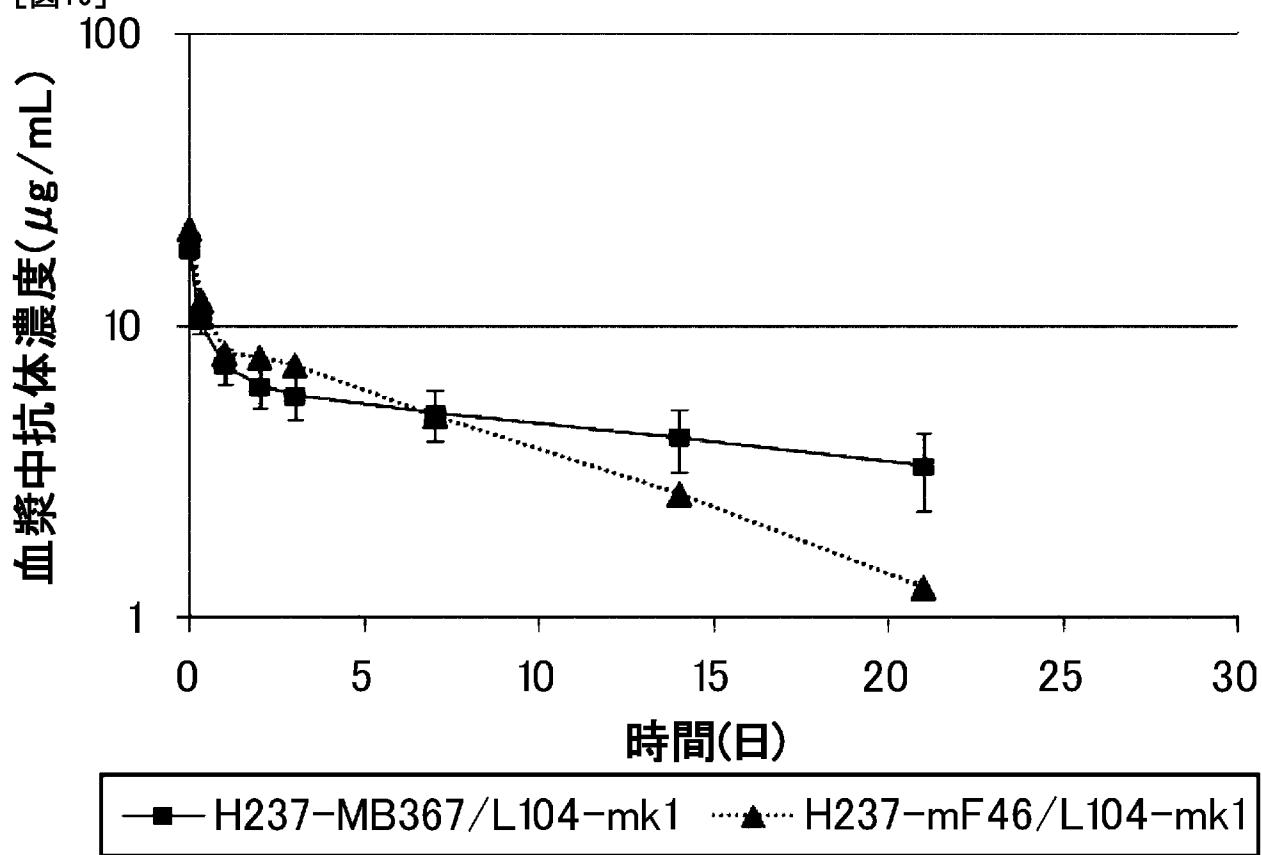
[図8]



[図9]



[図10]



[図11-1]

CH1	Kabat										EU									
	mIgG1	mIgG2a	mIgG2b	mIgG3																
Kabat	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133
EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
mIgG1	A	K	T	T	T	P	S	V	P	L	A	P	G	S	A	Q	T	N	S	M
mIgG2a	A	K	K	T	T	A	P	V	P	L	A	P	V	C	G	D	T	G	S	S
mIgG2b	A	K	T	T	T	P	P	V	P	L	A	P	G	C	G	D	T	T	G	S
mIgG3	A	T	T	T	A	P	S	V	P	L	V	P	G	C	S	D	T	S	G	S
Kabat	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
EU	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159
mIgG1	V	T	L	G	C	L	V	K	G	Y	F	P	V	T	L	V	T	W	N	S
mIgG2a	V	T	L	G	C	L	V	K	G	Y	F	P	V	T	V	T	W	N	S	G
mIgG2b	V	T	S	G	C	L	V	K	G	Y	F	P	V	T	V	T	W	N	S	G
mIgG3	V	T	L	G	C	L	V	K	G	Y	F	P	V	T	V	T	W	N	Y	G
Kabat	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184
EU	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181
mIgG1	S	L	S	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	-	D	L	Y	T
mIgG2a	S	L	S	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	-	D	L	Y	T
mIgG2b	S	L	S	S	S	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	-	G	L	Y	T
mIgG3	A	L	S	S	S	G	V	R	V	S	S	S	V	L	Q	S	-	G	F	S
Kabat	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208
EU	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
mIgG1	S	S	V	T	V	P	S	S	-	T	W	P	S	E	T	V	C	N	V	A
mIgG2a	S	S	V	T	V	T	V	P	S	S	S	S	Q	S	Q	T	I	C	N	V
mIgG2b	S	S	V	T	V	T	V	T	S	S	S	S	S	Q	S	Q	T	-	C	S
mIgG3	S	L	V	T	V	T	V	T	S	S	S	S	S	Q	S	Q	T	V	V	V
Kabat	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231
EU	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223
mIgG1	H	P	A	S	S	T	K	V	D	K	K	K	I	K	K	V	D	K	K	I
mIgG2a	H	P	A	S	S	T	K	V	D	K	K	K	I	K	K	V	D	K	K	I
mIgG2b	H	P	A	S	S	T	K	V	D	K	K	K	I	K	K	V	D	K	K	I
mIgG3	H	P	A	S	S	T	K	V	D	K	K	K	I	K	K	V	D	K	K	I

[図11-2]

Hinge	Kabat	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	241A	241B	241C	241D	242	243
EU	216	217	218	219	220	-	221	-	-	-	222	223	224	225	226	227	228	-	-	-	-	229	230
mIgG1	V	P	R	D	-	-	-	-	-	C	G	C	K	P	C	I	-	-	-	-	C	T	
mIgG2a	E	P	R	G	P	T	I	-	-	K	P	C	P	P	C	K	-	-	-	-	C	P	
mIgG2b	E	P	S	G	P	I	S	T	I	N	P	C	P	P	C	K	E	C	H	K	C	P	
mIgG3	-	-	E	P	R	I	P	K	P	S	T	P	P	G	S	S	C	P	-	-	-	-	

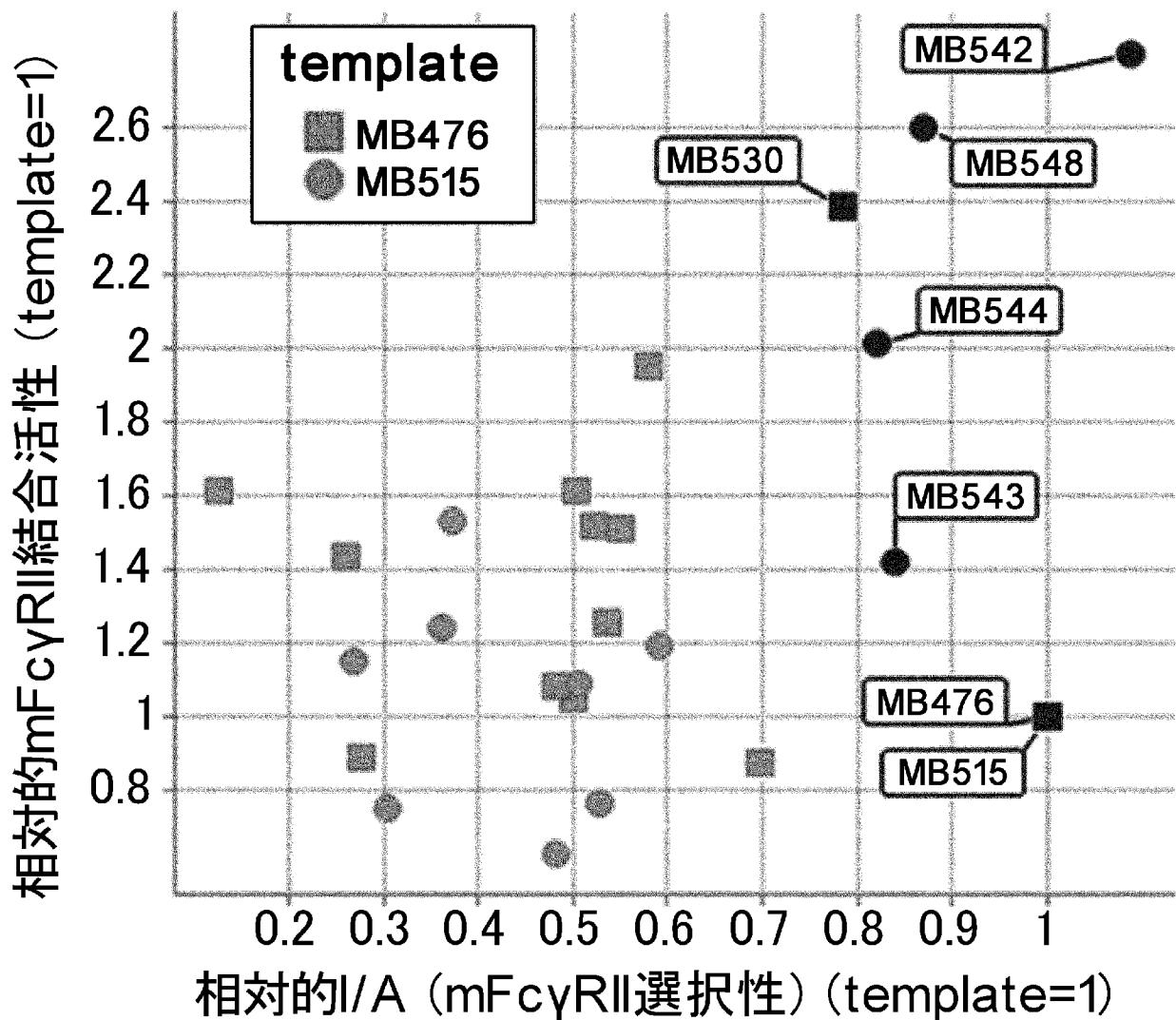
[図11-3]

CH2	Kabat	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265
	EU	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
mIgG1	V	P	-	-	E	V	S	S	V	F	I	F	P	P	K	P	K	D	V	L	T		
mIgG2a	A	P	N	L	L	G	G	P	S	V	F	I	F	P	P	K	I	K	D	V	L	M	
mIgG2b	A	P	N	L	E	G	G	P	S	V	F	I	F	P	P	K	I	K	D	V	L	M	
mIgG3	P	G	N	I	L	G	G	P	S	V	F	I	F	P	P	K	P	K	D	A	L	M	
Kabat	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	
EU	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	
mIgG1	I	T	L	T	P	K	V	T	C	V	V	V	D	I	S	K	D	D	P	E	V	Q	
mIgG2a	I	S	L	S	P	I	V	T	C	V	V	V	D	V	S	E	D	D	P	D	V	Q	
mIgG2b	I	S	L	T	P	K	V	T	C	V	V	V	D	V	S	E	D	D	P	D	V	Q	
mIgG3	I	S	L	T	P	K	V	T	C	V	V	V	D	V	S	E	D	D	P	D	V	H	
Kabat	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
EU	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	
mIgG1	F	S	W	F	V	D	V	E	V	H	T	A	Q	T	C	P	R	E	E	Q	F		
mIgG2a	I	S	W	F	V	N	N	V	E	V	H	T	A	Q	T	C	T	H	R	E	D	Y	
mIgG2b	I	S	W	F	V	N	N	V	E	V	H	T	A	Q	T	C	T	H	R	E	D	Y	
mIgG3	V	S	W	F	V	D	N	K	E	V	H	T	A	W	T	Q	P	R	E	A	Q	Y	
Kabat	314	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	
EU	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	
mIgG1	N	S	T	F	R	S	V	S	E	L	P	I	M	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	
mIgG2a	N	S	T	L	R	V	V	S	A	L	P	I	Q	H	Q	D	W	M	S	G	K	E	
mIgG2b	N	S	T	I	R	V	V	S	T	L	P	I	Q	H	Q	D	W	M	S	G	K	E	
mIgG3	N	S	T	F	R	V	V	S	A	L	P	I	Q	H	Q	D	W	M	R	G	K	E	
Kabat	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	
EU	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	
mIgG1	F	K	C	R	V	N	S	A	A	F	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K			
mIgG2a	F	K	C	K	C	K	V	N	N	K	D	L	P	A	P	I	E	R	T	I	P		
mIgG2b	F	K	C	K	C	K	V	N	N	K	D	L	P	A	P	I	E	R	T	I	K		
mIgG3	F	K	C	K	C	K	V	N	N	K	A	L	P	A	P	I	E	R	T	I	P		

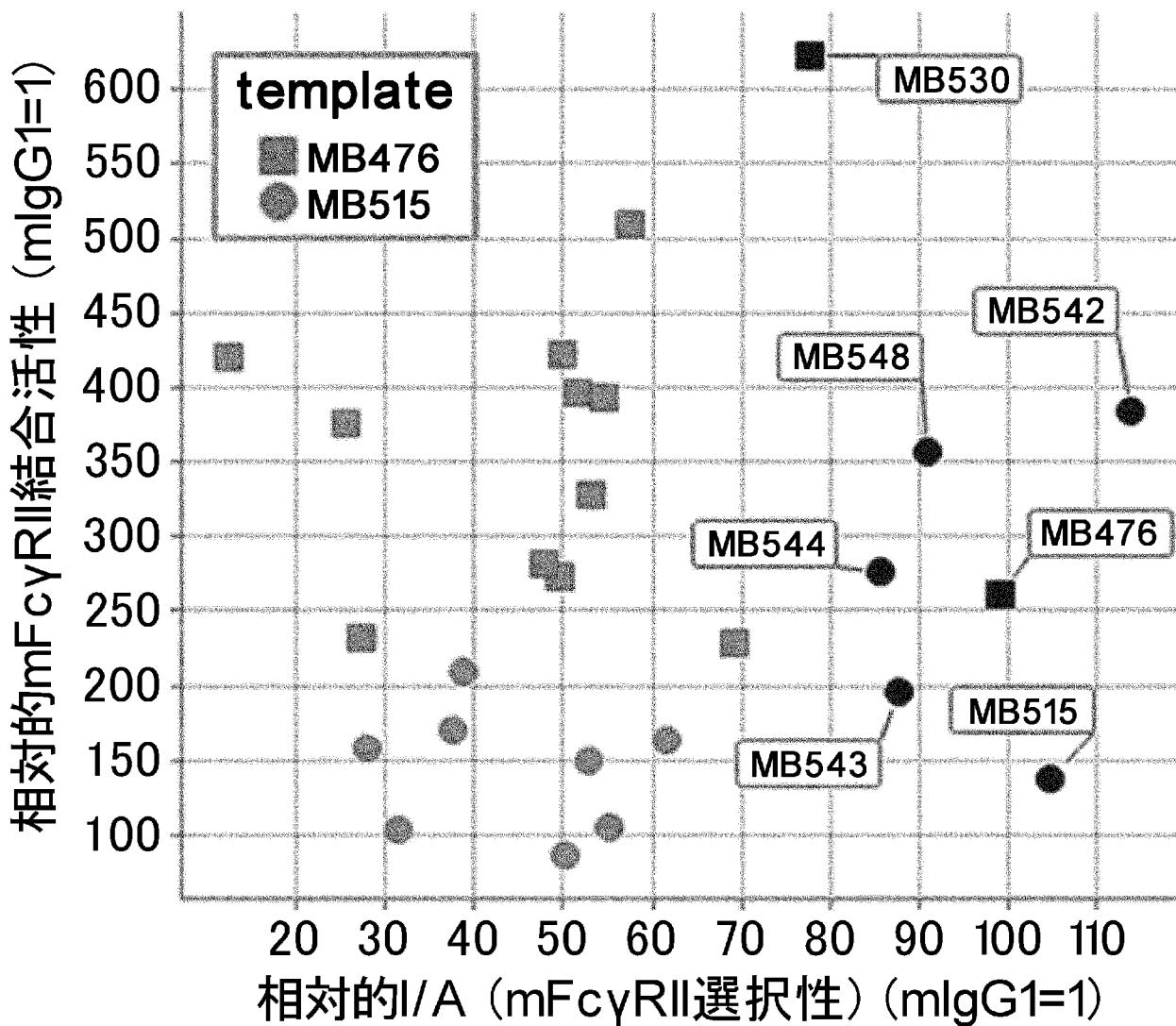
[図11-4]

[図12]

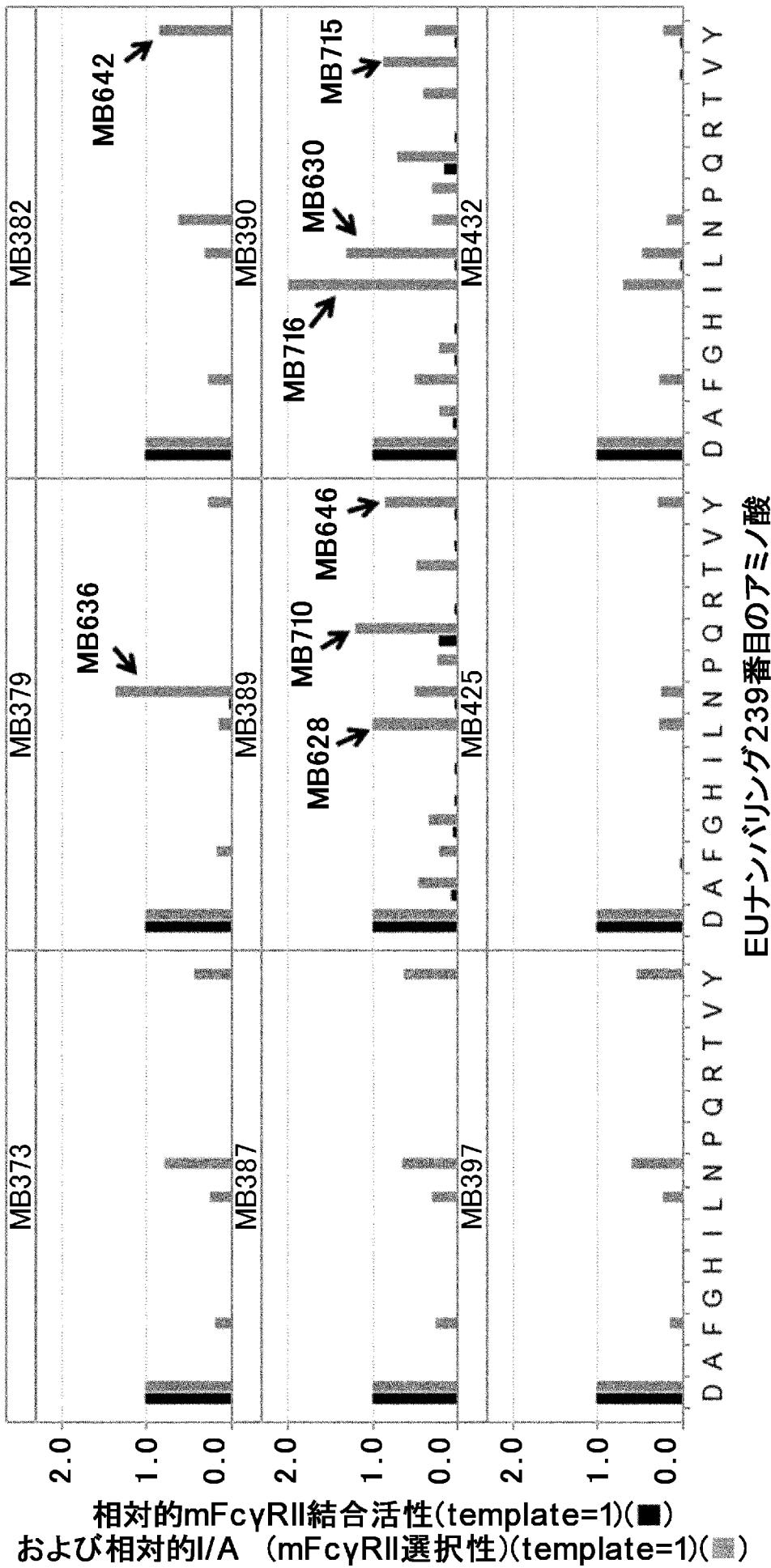
[図13]



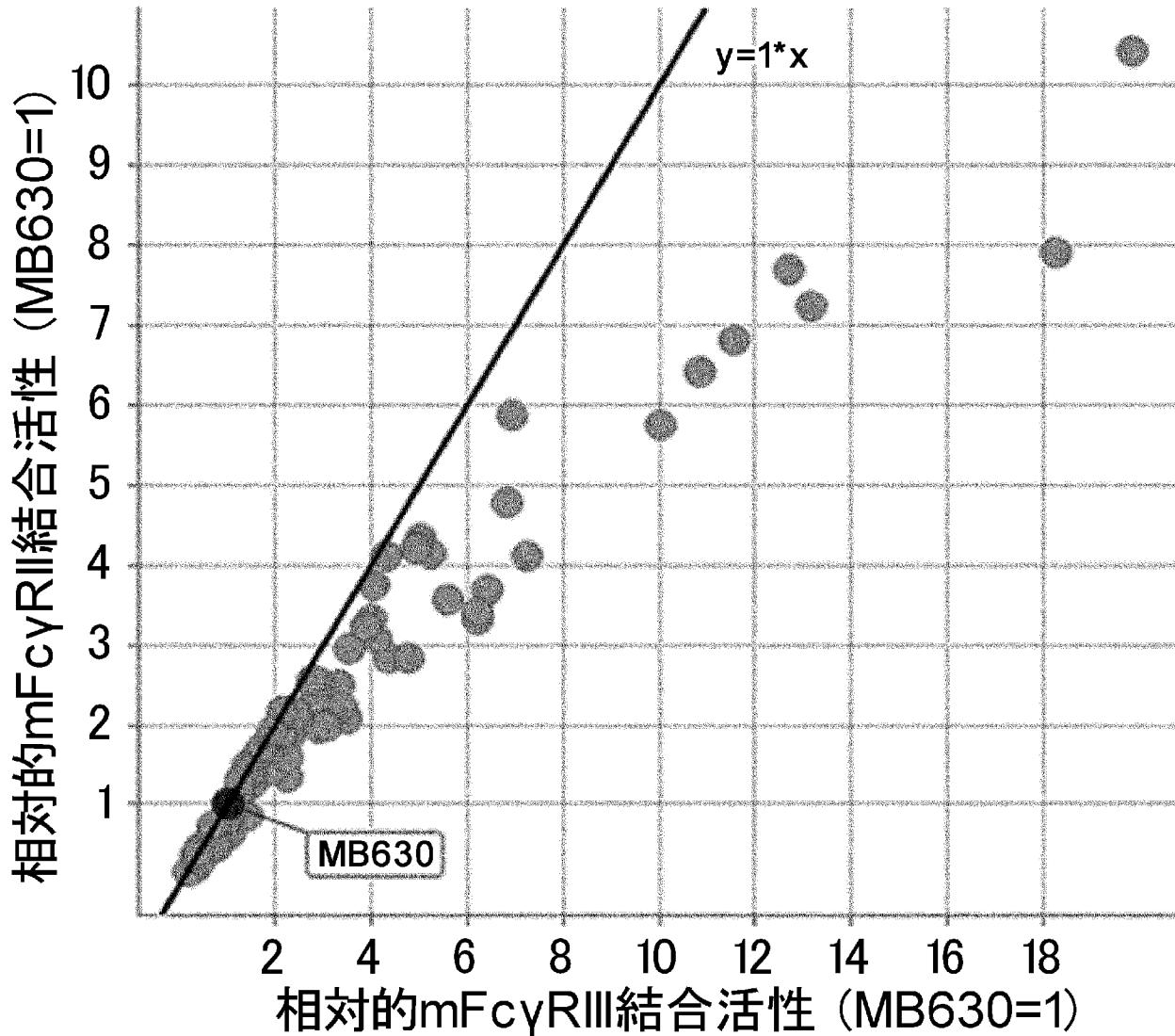
[図14]



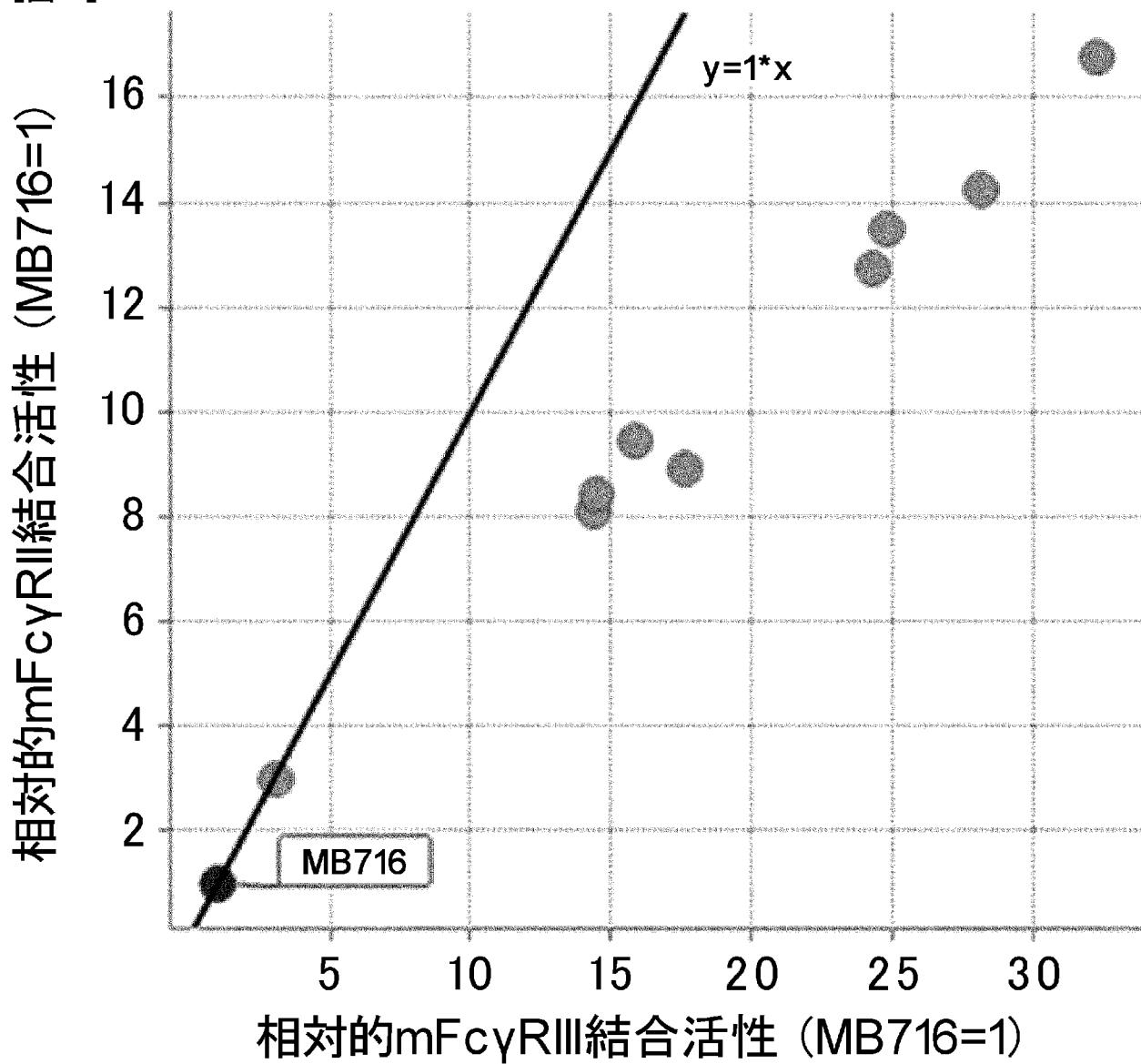
[図15]



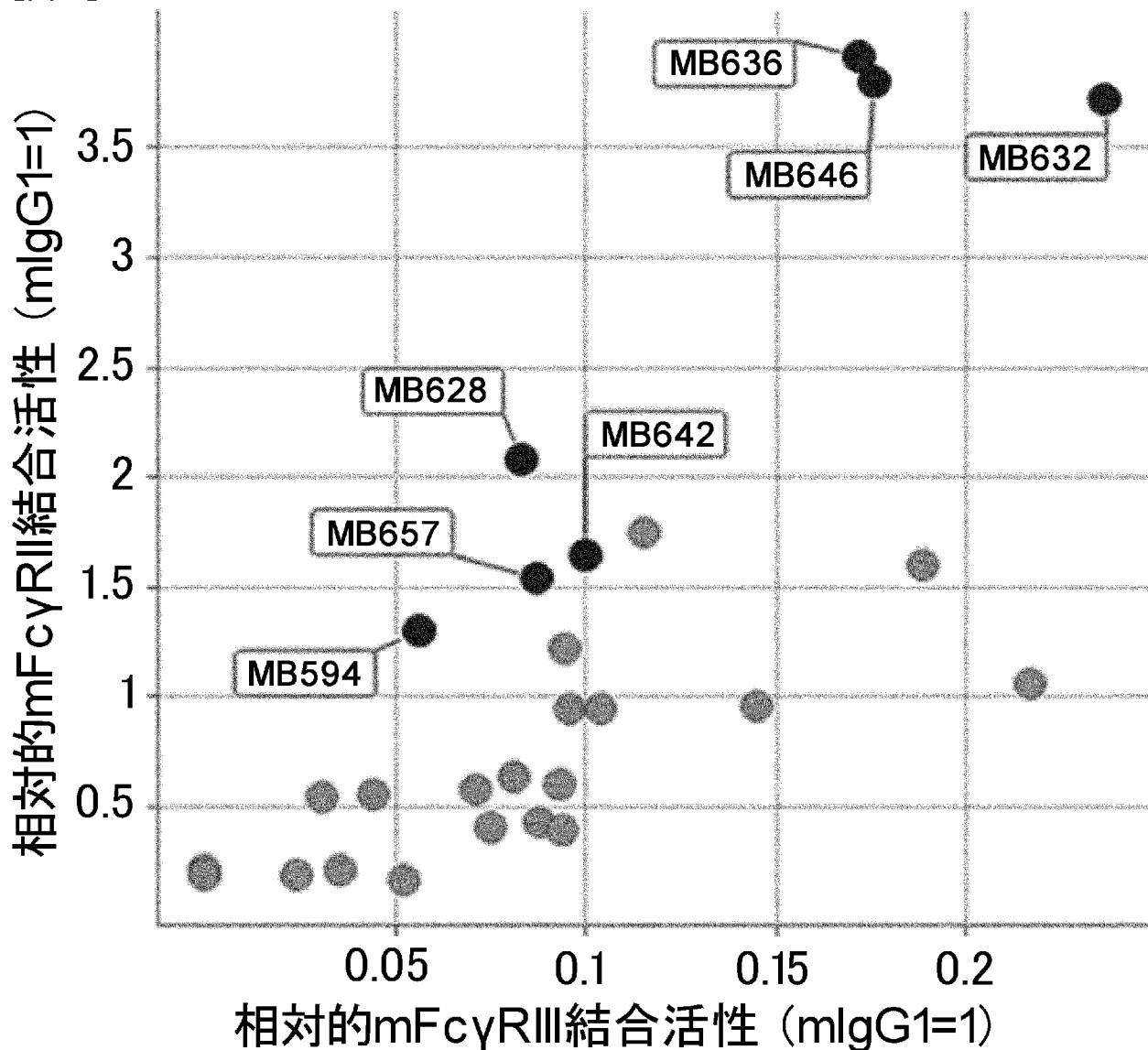
[図16]



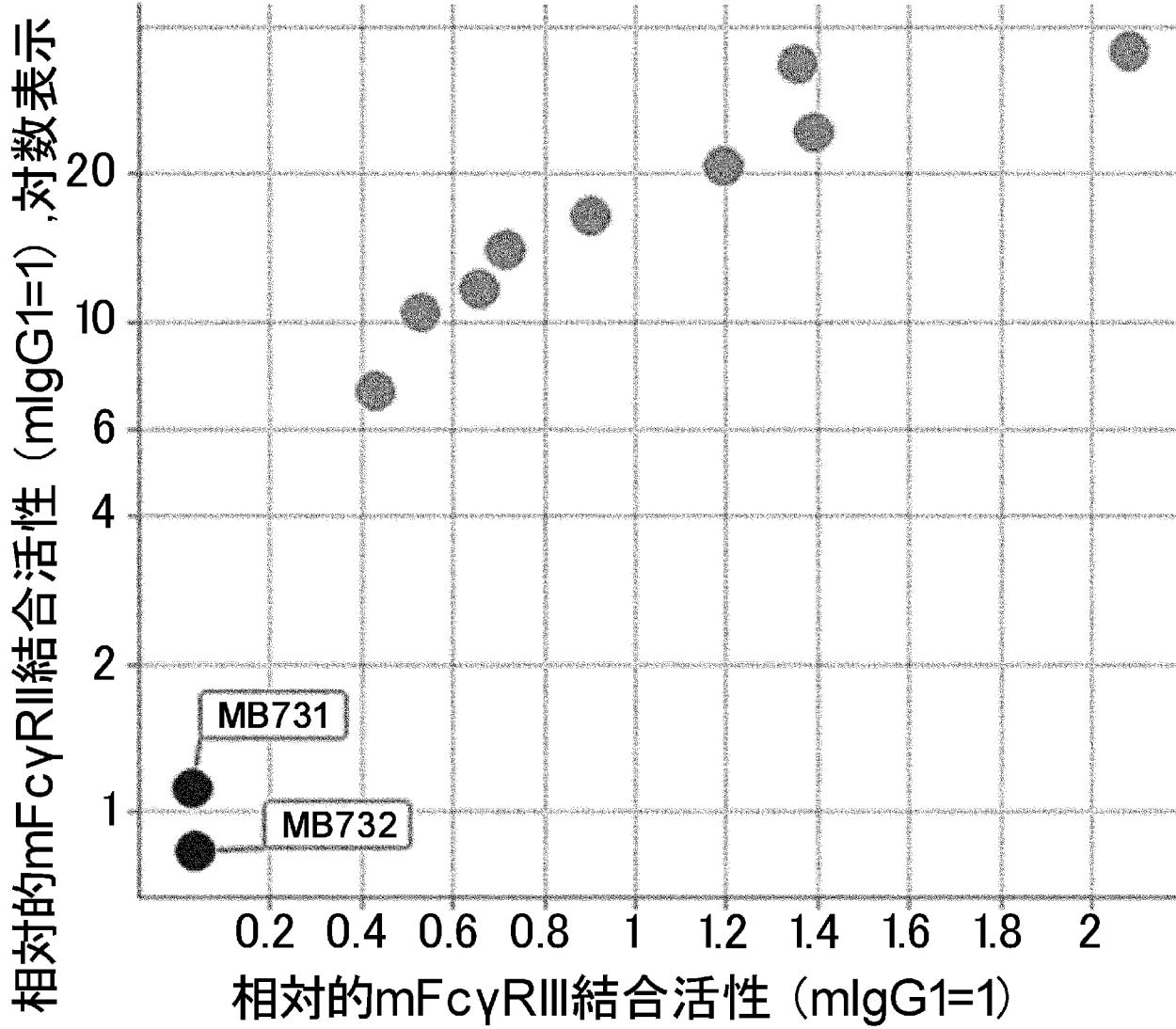
[図17]



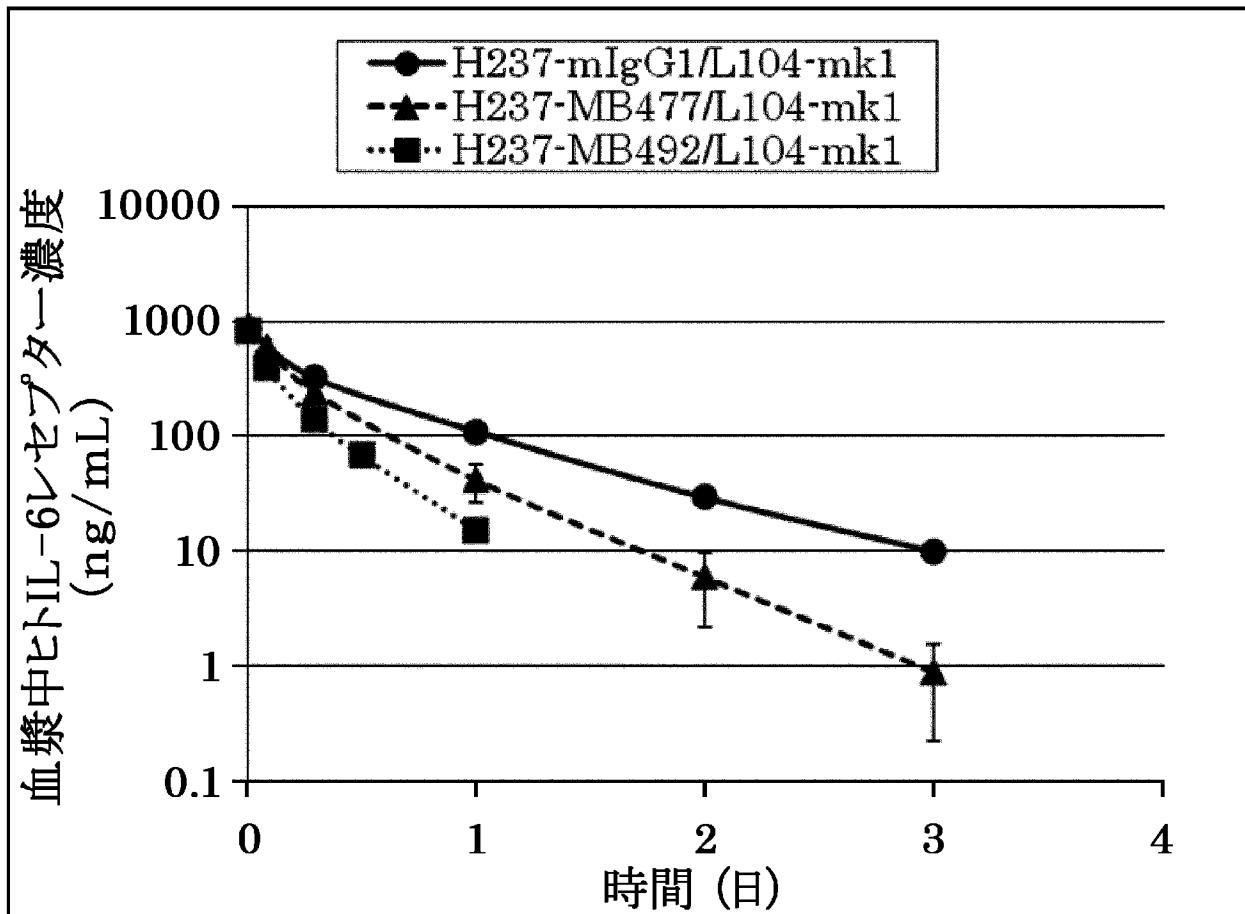
[図18]



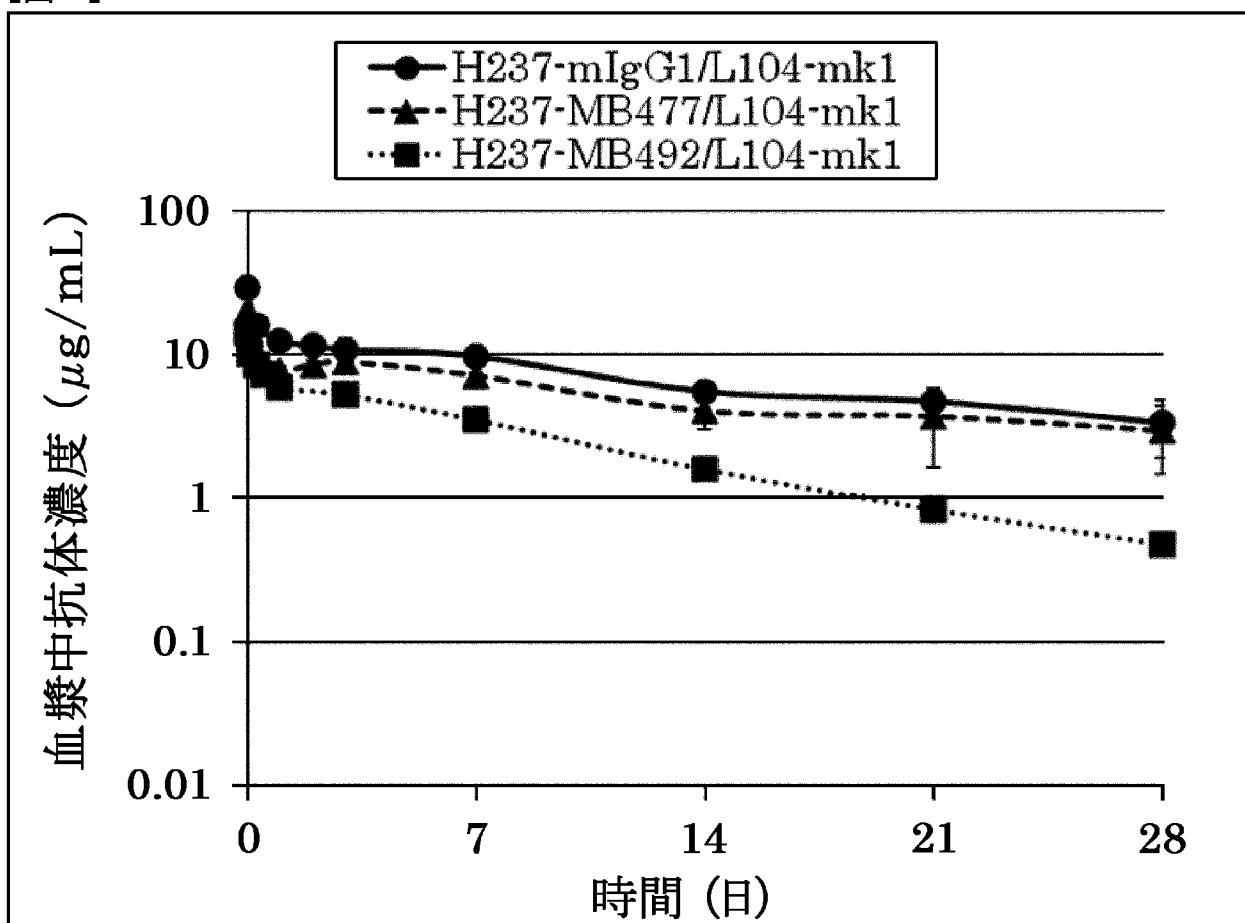
[図19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/072598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/395, A61P37/00, A61P37/06, C07K16/28, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922–1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996–2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971–2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994–2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-514460 A (Xencor, Inc.), 06 May 2010 (06.05.2010), entire text & US 2008/0199471 A1 & EP 2125893 A & WO 2008/091954 A2	1–44

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 November, 2013 (05.11.13)

Date of mailing of the international search report
19 November, 2013 (19.11.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P37/00, A61P37/06, C07K16/28, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2010-514460 A (ゼンコー・インコーポレイテッド) 2010.05.06, 全文 & US 2008/0199471 A1 & EP 2125893 A & WO 2008/091954 A2	1-44

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.11.2013

国際調査報告の発送日

19.11.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

柴原 直司

4N

3534

電話番号 03-3581-1101 内線 3488