

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-519860

(P2008-519860A)

(43) 公表日 平成20年6月12日(2008.6.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28</b> (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B024
<b>C07K 19/00</b> (2006.01)	C07K 19/00	4H045
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 87 頁)

(21) 出願番号	特願2007-541410 (P2007-541410)	(71) 出願人	501154035
(86) (22) 出願日	平成17年11月14日 (2005.11.14)		ゼンコー・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月10日 (2007.7.10)		XENCOR、INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/041220		アメリカ合衆国91016カリフォルニア
(87) 国際公開番号	W02006/053301		州モンロビア、ウエスト・レモン・アベニ
(87) 国際公開日	平成18年5月18日 (2006.5.18)		ュー111番
(31) 優先権主張番号	60/627, 763	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成16年11月12日 (2004.11.12)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	60/642, 886		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成17年1月11日 (2005.1.11)	(74) 代理人	100067035
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 岩崎 光隆
(31) 優先権主張番号	60/649, 508		
(32) 優先日	平成17年2月2日 (2005.2.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FcRnとの変化した結合を有するFc変異体

(57) 【要約】

本発明は、最適化IgG免疫グロブリン変異体、それらの作製、および特に治療目的のそれらの適用のための技術的方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

親ポリペプチドのFc領域中に少なくとも1個の修飾を含む該親ポリペプチドのFc変異体であって、該変異タンパク質は、親ポリペプチドと比較してFcRn（胎児性受容体）との変化した結合を示し、該Fc変異体は、246H、246S、247D、247T、248H、248P、248Q、248R、248Y、249T、249W、251D、251E、251H、251I、251K、251M、251N、251T、251V、251Y、252F、252L、253L、253T、253V、254H、254L、254N、254T、254V、^254N、255E、255F、255H、255K、255S、255V、256E、256H、256V、257A、257C、257D、257E、257F、257G、257H、257I、257K、257L、257M、257N、257Q、257R、257S、257T、257V、257W、257Y、258R、258V、279A、279C、279D、279F、279G、279H、279I、279K、279L、279M、279N、279P、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、280E、280H、^281A、^281D、^281S、^281T、282D、282F、282H、282I、282T、283F、283I、283L、283Y、284H、284K、284P、284Q、284R、284S、284Y、285S、285V、286#、286L、287H、287S、287V、287Y、288H、288Q、288R、288S、305H、305T、306F、306H、306I、306N、306T、306V、306Y、307D、307V、307Y、308A、308C、308D、308E、308F、308G、308H、308I、308K、308L、308M、308N、308P、308Q、308R、308S、308T、308W、308Y、309F、309H、309I、309N、309P、309Q、309V、309Y、310K、310N、310T、311H、311L、311S、311T、311V、311W、312H、313Y、315E、315G、315H、315Q、315S、315T、317H、317S、339P、340P、341S、374H、374S、376H、376L、378H、378N、380T、380Y、382H、383H、383K、383Q、384E、384G、384H、385A、385C、385D、385E、385F、385H、385I、385K、385L、385M、385N、385P、385Q、385R、385S、385T、385V、385W、385Y、386E、386H、386K、387#、387A、387H、387K、387Q、389E、389H、426E、426H、426L、426N、426R、426V、426Y、427I、429D、429F、429K、429N、429Q、429S、429T、429Y、430D、430H、430K、430L、430Q、430Y、431G、431H、431I、431P、431S、432F、432H、432N、432S、432V、433E、433N、433P、433R、433S、434H、434Q、434S、434Y、435N、436E、436F、436H、436L、436Q、436V、436W、437E、437V、438E、438Hおよび438K（ここで、番号は、E U I n d e xに従い、^は、表示の位置の後ろの挿入であり、そして#は、その表示の位置の欠失である。）からなる群から選択される少なくとも1個の修飾を含む、Fc変異体。

10

20

30

40

## 【請求項 2】

該Fc変異体が、246H、246S、247D、247T、248H、248P、248Q、248R、248Y、249T、249W、251D、251E、251H、251I、251K、251M、251N、251T、251V、251Y、252L、253L、253T、253V、254H、254L、254N、254V、^254N、255E、255F、255H、255K、255S、255V、256H、256V、257A、257C、257D、257E、257F、257G、257H、257I、257K、257L、257M、257N、257Q、257R、257S、257T、

50

2 5 7 V、2 5 7 W、2 5 7 Y、2 5 8 R、2 5 8 V、2 7 9 A、2 7 9 C、2 7 9 D、  
 2 7 9 F、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 I、2 7 9 K、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 P、  
 2 7 9 Q、2 7 9 R、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 0 H、^ 2 8 1 A  
 、 ^ 2 8 1 D、 ^ 2 8 1 S、 ^ 2 8 1 T、2 8 2 D、2 8 2 F、2 8 2 H、2 8 2 I、2  
 8 2 T、2 8 3 F、2 8 3 I、2 8 3 L、2 8 3 Y、2 8 4 H、2 8 4 K、2 8 4 P、2  
 8 4 Q、2 8 4 R、2 8 4 S、2 8 4 Y、2 8 5 S、2 8 5 V、2 8 6 #、2 8 6 L、2  
 8 7 H、2 8 7 S、2 8 7 V、2 8 7 Y、2 8 8 H、2 8 8 Q、2 8 8 S、3 0 5 H、3  
 0 5 T、3 0 6 F、3 0 6 H、3 0 6 I、3 0 6 N、3 0 6 T、3 0 6 V、3 0 6 Y、3  
 0 7 D、3 0 7 V、3 0 7 Y、3 0 8 C、3 0 8 E、3 0 8 F、3 0 8 G、3 0 8 H、3  
 0 8 I、3 0 8 K、3 0 8 L、3 0 8 M、3 0 8 N、3 0 8 P、3 0 8 Q、3 0 8 R、3  
 0 8 S、3 0 8 W、3 0 8 Y、3 0 9 F、3 0 9 H、3 0 9 N、3 0 9 Q、3 0 9 V、3  
 0 9 Y、3 1 0 K、3 1 0 N、3 1 0 T、3 1 1 L、3 1 1 T、3 1 1 V、3 1 1 W、3  
 1 2 H、3 1 3 Y、3 1 5 E、3 1 5 G、3 1 5 H、3 1 5 Q、3 1 5 S、3 1 5 T、3  
 1 7 H、3 1 7 S、3 3 9 P、3 4 0 P、3 4 1 S、3 7 4 H、3 7 4 S、3 7 6 H、3  
 7 6 L、3 7 8 H、3 7 8 N、3 8 0 T、3 8 0 Y、3 8 2 H、3 8 3 H、3 8 3 K、3  
 8 3 Q、3 8 4 E、3 8 4 G、3 8 4 H、3 8 5 A、3 8 5 C、3 8 5 F、3 8 5 H、3  
 8 5 I、3 8 5 K、3 8 5 L、3 8 5 M、3 8 5 N、3 8 5 P、3 8 5 Q、3 8 5 S、3  
 8 5 T、3 8 5 V、3 8 5 W、3 8 5 Y、3 8 6 E、3 8 6 H、3 8 6 K、3 8 7 #、3  
 8 7 A、3 8 7 H、3 8 7 K、3 8 7 Q、3 8 9 E、3 8 9 H、4 2 6 E、4 2 6 H、4  
 2 6 L、4 2 6 N、4 2 6 R、4 2 6 V、4 2 6 Y、4 2 7 I、4 2 9 D、4 2 9 F、4  
 2 9 K、4 2 9 N、4 2 9 Q、4 2 9 S、4 2 9 T、4 2 9 Y、4 3 0 D、4 3 0 H、4  
 3 0 K、4 3 0 L、4 3 0 Q、4 3 0 Y、4 3 1 G、4 3 1 H、4 3 1 I、4 3 1 P、4  
 3 1 S、4 3 2 F、4 3 2 H、4 3 2 N、4 3 2 S、4 3 2 V、4 3 3 E、4 3 3 N、4  
 3 3 P、4 3 3 S、4 3 4 H、4 3 4 Q、4 3 4 S、4 3 5 N、4 3 6 E、4 3 6 F、4  
 3 6 L、4 3 6 V、4 3 6 W、4 3 7 E、4 3 7 V、4 3 8 H、および 4 3 8 K からなる  
 群から選択される少なくとも 1 個の修飾を含む、請求項 1 に記載の F c 変異体。

10

20

## 【請求項 3】

該 F c 変異体が、2 4 6 H、2 4 6 S、2 4 7 D、2 4 7 T、2 4 8 P、2 4 8 Q、2  
 4 8 Y、2 4 9 T、2 4 9 W、2 5 1 D、2 5 1 E、2 5 1 H、2 5 1 I、2 5 1 T、2  
 5 1 V、2 5 2 L、2 5 3 L、2 5 3 T、2 5 3 V、2 5 4 H、2 5 4 L、2 5 4 N、2  
 5 4 V、^ 2 5 4 N、2 5 5 E、2 5 5 H、2 5 5 K、2 5 5 V、2 5 6 H、2 5 6 V、  
 2 5 7 A、2 5 7 C、2 5 7 F、2 5 7 G、2 5 7 I、2 5 7 L、2 5 7 M、2 5 7 N、  
 2 5 7 Q、2 5 7 S、2 5 7 T、2 5 7 V、2 5 7 W、2 5 7 Y、2 5 8 V、2 7 9 A、  
 2 7 9 C、2 7 9 F、2 7 9 I、2 7 9 P、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、  
 ^ 2 8 1 A、^ 2 8 1 D、^ 2 8 1 S、^ 2 8 1 T、2 8 2 F、2 8 2 I、2 8 2 T、2  
 8 3 F、2 8 3 I、2 8 3 L、2 8 3 Y、2 8 4 P、2 8 5 V、2 8 6 #、2 8 6 L、2  
 8 7 V、2 8 8 Q、2 8 8 S、3 0 5 T、3 0 6 F、3 0 6 H、3 0 6 I、3 0 6 N、3  
 0 6 T、3 0 6 V、3 0 6 Y、3 0 7 V、3 0 8 C、3 0 8 F、3 0 8 G、3 0 8 L、3  
 0 8 M、3 0 8 N、3 0 8 P、3 0 8 Q、3 0 8 S、3 0 8 W、3 0 8 Y、3 0 9 F、3  
 0 9 N、3 0 9 Q、3 0 9 V、3 0 9 Y、3 1 0 T、3 1 1 L、3 1 1 T、3 1 1 V、3  
 1 1 W、3 1 3 Y、3 1 5 G、3 1 5 Q、3 1 5 S、3 1 5 T、3 3 9 P、3 4 0 P、3  
 4 1 S、3 7 4 H、3 7 4 S、3 7 6 L、3 7 8 H、3 7 8 N、3 8 0 T、3 8 0 Y、3  
 8 2 H、3 8 3 Q、3 8 4 E、3 8 4 G、3 8 4 H、3 8 5 A、3 8 5 C、3 8 5 F、3  
 8 5 I、3 8 5 L、3 8 5 M、3 8 5 N、3 8 5 P、3 8 5 Q、3 8 5 S、3 8 5 T、3  
 8 5 V、3 8 5 W、3 8 5 Y、3 8 6 E、3 8 6 H、3 8 6 K、3 8 7 #、3 8 7 A、3  
 8 7 H、3 8 7 K、3 8 7 Q、3 8 9 H、4 2 6 L、4 2 6 N、4 2 6 V、4 2 6 Y、4  
 2 7 I、4 2 9 D、4 2 9 F、4 2 9 K、4 2 9 N、4 2 9 Q、4 2 9 S、4 2 9 T、4  
 2 9 Y、4 3 0 L、4 3 1 G、4 3 1 I、4 3 1 P、4 3 1 S、4 3 2 F、4 3 2 H、4  
 3 2 V、4 3 3 E、4 3 3 N、4 3 3 P、4 3 3 S、4 3 4 H、4 3 4 Q、4 3 4 S、4  
 3 5 N、4 3 6 F、4 3 6 L、4 3 6 V、4 3 6 W、4 3 7 E、および 4 3 7 V からなる

30

40

50

群から選択される少なくとも1個の修飾を含む、請求項2に記載のFc変異体。

【請求項4】

該Fc変異体が、257C、257M、257L、257N、257Y、279Q、279Y、308F、および308Yからなる群から選択される少なくとも1個の置換を含む、請求項1に記載のFc変異体。

【請求項5】

該Fc変異体が、G385HまたはN434Yを含む、請求項1に記載のFc変異体。

該Fc変異体が、該親ポリペプチドのFc領域中に少なくとも2個の修飾を含む、請求項3または4に記載のFc変異体。

【請求項6】

該Fc変異体が、248D、248E、248K、249H、249K、249R、250A、250C、250D、250E、250F、250G、250H、250I、250K、250L、250M、250N、250P、250Q、250R、250S、250V、250W、250Y、251C、251G、251L、251Q、251S、252A、252C、252G、252N、252Q、252S、252T、252V、252W、252Y、253A、254A、254S、255C、255G、255N、255Q、255R、255S、255T、255Y、256A、256D、256F、256K、256Q、256R、256S、256T、258C、258D、258E、258G、258H、258K、258N、258Q、258S、258T、258Y、277A、277C、277D、277E、277F、277G、277H、277I、277K、277L、277M、277N、277P、277Q、277R、277S、277T、277V、277W、277Y、279E、279R、280K、280R、281D、281E、281H、281K、281Q、281R、282E、282K、282R、284C、284D、284E、284G、284N、284T、285A、285C、285D、285G、285H、285N、285Q、285R、285T、285Y、286E、286M、286T、287C、287D、287E、287G、287H、287K、287N、287Q、288D、288E、288H、288K、288R、287R、287S、287T、288A、288C、288D、288E、288F、288G、288H、288K、288L、288M、288N、288P、288T、288V、288W、288Y、304C、305A、305C、305D、305E、305G、305K、305N、305Q、305R、305S、305Y、306A、306C、306D、306E、306G、306K、306L、306M、306N、306P、306Q、306R、306R、306S、306T、306V、306W、306Y、309D、309E、309K、309R、310A、310C、310D、310E、310G、310H、311A、311K、311R、312A、312C、312D、312G、312K、312N、312Q、312R、312S、312T、312Y、313D、313E、313H、313K、313R、314A、314C、314D、314E、314F、314G、314H、314I、314L、314M、314N、314P、314Q、314R、314S、314T、314V、314W、314Y、315D、315K、315R、316H、316K、316R、317A、317C、317D、317E、317G、317K、317N、317Q、317R、317T、317Y、340D、340E、340H、340K、340R、343C、343D、343E、343G、343H、343K、343N、343Q、343R、343S、343T、343Y、344L、345C、345D、345E、345G、345H、345K、345N、345Q、345R、345S、345T、345Y、360A、362A、376C、376D、376E、376G、376K、376N、376Q、376R、376S、376T、376Y、378S、380A、382A、383D、383E、383R、386P、386T、387P、387R、389D、389N、389P、389S、415A、424A、424D、424E、424H、424K、424R、426D、426K、428A、428C、428D、4

10

20

30

40

50

2 8 E、4 2 8 F、4 2 8 G、4 2 8 H、4 2 8 I、4 2 8 K、4 2 8 L、4 2 8 M、4 2 8 N、4 2 8 P、4 2 8 Q、4 2 8 R、4 2 8 S、4 2 8 T、4 2 8 V、4 2 8 W、4 2 8 Y、4 3 0 C、4 3 0 E、4 3 0 G、4 3 0 N、4 3 0 R、4 3 0 S、4 3 0 T、4 3 1 D、4 3 1 E、4 3 1 K、4 3 1 R、4 3 2 C、4 3 2 G、4 3 2 Q、4 3 2 T、4 3 2 Y、4 3 3 A、4 3 3 K、4 3 4 A、4 3 4 F、4 3 4 K、4 3 4 L、4 3 4 R、4 3 5 A、4 3 6 A、4 3 6 D、4 3 6 R、4 3 6 T、4 3 6 Y、4 3 8 D、4 3 8 E、および 4 3 8 R からなる群から選択される少なくとも 1 個の置換をさらに含む、請求項 3 または 4 に記載の F c 変異体。

【請求項 7】

親ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 1 個の修飾を含む該親ポリペプチドの F c 変異体であって、該変異タンパク質は、該親ポリペプチドと比較して F c R n との変化した結合を示し、該少なくとも 1 個の修飾は、挿入または欠失を含む、F c 変異体。

10

【請求項 8】

該修飾が F c R n との増加した結合を示す、請求項 7 に記載の F c 変異体。

【請求項 9】

該修飾が挿入である、請求項 7 に記載の F c 変異体。

【請求項 10】

該挿入がループ中に位置する、請求項 9 に記載の F c 変異体。

【請求項 11】

該挿入が、2 5 4 または 2 8 1 位の後ろに位置する、請求項 9 に記載の F c 変異体。

20

【請求項 12】

該挿入が ^ 2 8 1 S である、請求項 11 に記載の F c 変異体。

【請求項 13】

該修飾が欠失である（ただし、イソ型 I g G 1 の G 2 3 6 位での欠失はない。）、請求項 7 に記載の F c 変異体。

【請求項 14】

少なくとも 1 個の該欠失がループ内に生じる、請求項 13 に記載の F c 変異体。

【請求項 15】

少なくとも 1 個の該欠失が 2 8 6 位または 3 8 7 位である、請求項 14 に記載の F c 変異体。

30

【請求項 16】

親ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 1 個の修飾を含む該親ポリペプチドの F c 変異体であって、該変異タンパク質は、該親ポリペプチドと比較して F c R n および F c R との変化した結合を示す、F c 変異体。

【請求項 17】

該 F c 変異体が、該親 F c ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 2 個のアミノ酸修飾を含む、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 18】

該 F c 変異体が、該親 F c ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 3 個のアミノ酸修飾を含む、請求項 16 に記載の F c 変異体。

40

【請求項 19】

該 F c 変異体が、該親 F c ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 4 個のアミノ酸修飾を含む、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 20】

該 F c 変異体が、該親ポリペプチドと比較して F c R n との増加した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 21】

該 F c 変異体が、該親ポリペプチドと比較して F c R n との減少した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 22】

50

該 F c 変異体が、該親ポリペプチドと比較して F c R との増加した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 23】

該 F c 変異体が、F c R および F c R n との増加した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 24】

該 F c 変異体が、F c R および F c R n との減少した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 25】

該 F c 変異体が、F c R との減少した結合、および F c R n との増加した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

10

【請求項 26】

該 F c 変異体が、F c R との増加した結合、および F c R n との減少した結合を示す、請求項 16 に記載の F c 変異体。

【請求項 27】

親ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 1 個のアミノ酸修飾を含む該親ポリペプチドの F c 変異体であって、該 F c 変異体は、該親ポリペプチドと比較して F c R n との変化した結合を示し、該 F c 変異体は、サイトカイン、可溶性タンパク質因子および癌細胞で発現されるタンパク質からなる群から選択される標的分子に特異性を有するポリペプチドの範囲内に包含される、F c 変異体。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2004年11月12日に出願したUS N 60/627,763; 2005年1月11日に出願したUS N 60/642,886; 2005年2月2日に出願したUS N 60/649,508; 2005年3月15日に出願したUS N 60/662,468; 2005年4月6日に出願したUS N 60/669,311; 2005年5月16日に出願したUS N 60/681,607; 2005年6月13日に出願したUS N 60/690,200; 2005年7月5日に出願したUS N 60/696,609; 2005年7月27日に出願したUS N 60/703,018; および、2005年8月12日に出願したUS N 60/726,453 (全て、参照により本明細書中に包含される。) に対し米国特許法 119条(e)項の利益を請求する。

30

【0002】

発明の分野

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

【背景技術】

【0003】

発明の背景

抗体は、特定の抗原に結合する免疫学的タンパク質である。ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳動物において、抗体は、一对の重鎖および軽鎖ポリペプチド鎖から構成される。各鎖は、個々の免疫グロブリン(Ig)ドメインから成り、故に、一般名である免疫グロブリンが、そのようなタンパク質に用いられる。各鎖は、可変領域(V領域)および定常領域と称される2個の異なる領域から成る。軽鎖可変領域(VL)および重鎖可変領域(VH)は、抗体間の著しい配列多様性を示し、標的抗原の結合に関与する。定常領域は、配列多様性をあまり示さず、多くの天然タンパク質の結合に関与して重要な生化学的事象を引き起こす。ヒトでは、I g A (I g A 1 および I g A 2 サブクラスを含む)、I g D、I g E、I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 サブクラスを含む)、および I g M を含む 5 種の異なるクラスの抗体がある。これらの抗体クラス間の顕著な特徴は、その定常領域であるが、わずかな相違が V 領域に存在し得る。免疫グロブリン

40

50

の一般的な構造的特徴を記載する例として本明細書中に用いる図1は、IgG1抗体を示す。IgG抗体は、2個の重鎖および2個の軽鎖からなる四量体タンパク質である。IgG重鎖は、N末端からC末端までVH-CH1-CH2-CH3(それぞれ、重鎖可変ドメイン、重鎖定常ドメイン1、重鎖定常ドメイン2、および重鎖定常ドメイン3を示す。)(また、VH-C1-C2-C3(それぞれ、重鎖可変ドメイン、定常ガンマ1ドメイン、定常ガンマ2ドメイン、および定常ガンマ3ドメインを示す。))とも称される。の順で連結する4個の免疫グロブリンドメインからなる。IgG軽鎖は、N末端からC末端までVL-CL(それぞれ、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常ドメインを示す。)の順で連結した2個の免疫グロブリンドメインからなる。

#### 【0004】

抗体の可変領域は、分子の抗原結合決定基を含み、故に、その標的抗原に対する抗体の特異性を決定する。可変領域は、同じクラス内の他の抗体と配列が最も異なるため、そのように称される。大部分の配列多様性は、相補性決定領域(CDR)中に生じる。重鎖および軽鎖あたりそれぞれ3個の、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3で示される、計6個のCDRがある。可変領域のうちCDR以外は、フレームワーク(FR)領域と称される。CDRほど多様ではないが、配列多様性が、異なる抗体間のFR領域中に生じる。概して、抗体のこの特徴的構造は、実質的な抗原結合の多様性(CDR)が免疫系により探査され、広範囲の抗原に対する特異性を得ることを可能にする、安定な骨格(FR領域)を提供する。多くの高分解能構造が、異なる生物由来の多様な可変領域断片(いくつかは抗原と非結合、およびいくつかは抗原との複合体)に利用可能である。抗体可変領域の配列および構造的特徴は、よく特徴付けられており(Morea et al., 1997, Biophys Chem 68:9-16; Morea et al., 2000, Methods 20:267-279、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、抗体の保存的特徴は、多くの抗体作製技術の開発を可能にしている(Maynard et al., 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-376、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。例えば、ある抗体、例えばマウス抗体由来のCDRを、他の抗体、例えばヒト抗体のフレームワーク領域に移植することが可能である。この方法は、当技術分野で“ヒト化”と称され、非ヒト抗体由来の免疫原性の低い抗体治療剤の作製を可能とする。可変領域を含む断片は、抗体の他の領域を欠失して存在することができ、例えばVH-C1およびVH-CLを含む抗原結合断片(Fab)、VHおよびVLを含む可変断片(Fv)、同じ鎖中で共に連結するVHおよびVLを含む単鎖可変断片(scFv)、ならびに多様な他の可変領域断片が含まれる(Little et al., 2000, Immunol Today 21:364-370、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

#### 【0005】

抗体のFc領域は、エフェクター機能と称される一連の重要な機能を与える、多くのFc受容体およびリガンドと相互作用する。IgGに関して、図1および2に示す通り、Fc領域は、IgドメインC2およびC3、およびC2につながるN末端ヒンジを含む。IgGクラスに関して重要なFc受容体ファミリーは、Fcガンマ受容体(FcR)である。これらの受容体は、抗体と細胞性免疫応答とのコミュニケーションを仲介する(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290、両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒトにおいて、このタンパク質ファミリーには、イソ型FcRIa、FcRIb、およびFcRIcを含むFcRI(CD64);イソ型FcRIIa(アロタイプH131およびR131を含む)、FcRIIb(FcRIIb-1およびFcRIIb-2を含む)、およびFcRIIcを含むFcRII(CD32);ならびに、イソ型FcRIIIa(アロタイプV158およびF158を含む)およびFcRIIIb(アロタイプFcRIIIb-NA1およびFcRIIIb-NA2を含む)を含むFcRIII(CD16)が含まれる(Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。これらの受容体は典型的に、Fcとの結合を仲介する細胞外ドメイン、膜貫通領域、および細胞内のい

10

20

30

40

50

くつかのシグナル伝達事象を仲介し得る細胞内ドメインを有する。これらの受容体は、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびT細胞を含む、様々な免疫細胞において発現される。Fc/FcR複合体の形成は、これらのエフェクター細胞を抗原結合部位に捕捉し、典型的に、炎症メディエーターの放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、食作用、および細胞傷害性攻撃のような細胞内のシグナル伝達事象ならびにその後の重要な免疫応答をもたらす。細胞傷害性および食作用エフェクター機能を仲介する能力は、抗体が標的細胞を破壊することによる可能性のある機序である。

#### 【0006】

FcRを発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞への抗体の結合を認識し、次いで標的細胞の溶解をもたらす細胞により仲介される反応は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)と称される(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181 - 220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739 - 766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275 - 290、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。FcRを発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞への抗体の結合を認識し、次いで標的細胞の食作用をもたらす細胞により仲介される反応は、抗体依存性細胞介在性食作用(ADCP)と称される。FcRIIa(pd b受託コード1H9V、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737 - 749、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(pd b受託コード1FCG、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Maxwell et al., 1999, Nat Struct Biol 6:437 - 442、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、FcRIIb(pd b受託コード2FCB、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Sondermann et al., 1999, Embo J 18:1095 - 1103、参照によりその全体が本明細書中に包含される)；およびFcRIIIb(pd b受託コード1E4J、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Sondermann et al., 2000, Nature 406:267 - 273、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を含むヒトFcRの細胞外ドメインの多くの構造が、解明されている。全てのFcRは、図1に示す通り、C2ドメインおよび前記ヒンジのN末端でFc上の同じ領域に結合する。この相互作用は、構造的によく特徴付けられており(Sondermann et al., 2001, J Mol Biol 309:737 - 749、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、ヒトFcRIIIbの細胞外ドメインに結合するヒトFcのいくつかの構造は、解明されており(pd b受託コード1E4K、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Sondermann et al., 2000, Nature 406:267 - 273、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(pd b受託コード1IISおよび1IIX、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469 - 16477、参照によりその全体が本明細書中に包含される)、ならびにヒトIgE/FcRI複合体の構造を有する(pd b受託コード1F6A、参照によりその全体が本明細書中に包含される)(Garman et al., 2000, Nature 406:259 - 266、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

#### 【0007】

異なるIgGサブクラスは、FcRに対して異なる親和性を有し、IgG1およびIgG3は典型的に、受容体に対してIgG2およびIgG4よりも実質的に結合する(Jefferys et al., 2002, Immunol Lett 82:57 - 65、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。全てのFcRは、異なる親和性を有するがIgGFcの同じ領域に結合する：高親和性結合体であるFcRIは、IgG1について $K_d = 10^{-8} M^{-1}$ を有するが、一方、低親和性受容体であるFcRIIおよびFcRIIIは、一般的に、それぞれ $10^{-6}$ および $10^{-5}$ で結合する。FcRIIIaおよびFcRIIIbの細胞外ドメインは、96%の同一性を有する；しかしながら、FcRIIIbは、細胞内シグナル伝達ドメインを有さない。さらに、免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ(ITAM)を有する細胞内ドメインを有することにより特徴付けられるFcRI、

10

20

30

40

50

Fc RIIa/c、およびFc RIIaは、免疫複合体により誘発される活性化の正の調節因子であるが、Fc RIIbは、免疫受容体チロシン依存性阻害モチーフ (ITIM) を有し、故に阻害される。故に、前者は、活性化受容体と称され、Fc RIIbは、阻害受容体と称される。前記受容体はまた、様々な免疫細胞で発現パターンおよびレベルが異なる。さらに別の複雑度は、ヒトプロテオームにおける多くのFc R多型の存在である。臨床的な重要性を有する特に関連する多型は、V158/F158 Fc RIIaである。ヒトIgG1は、F158アロタイプよりもV158アロタイプにより強い親和性で結合する。この親和性の相違、およびADCCおよび/またはADCPに対する推定されるその効果が、抗CD20抗体であるリツキシマブ (リツキサン (登録商標)、BiogenIdec) の効果の重要な決定因子であることが明らかにされている。V158アロタイプを有する患者は、リツキシマブ処置に好ましく応答する；しかしながら、低い親和性のF158アロタイプを有する患者は、ほとんど応答しない (Cartron et al., 2002, Blood 99:754 - 758、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒトの約10 - 20%が、V158/V158ホモ接合型であり、45%が、V158/F158ヘテロ接合型であり、そして35 - 45%が、F158/F158ホモ接合型である (Lehrnbecher et al., 1999, Blood 94:4220 - 4232; Cartron et al., 2002, Blood 99:754 - 758、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。故に、ヒトの80 - 90%が、ほとんど応答せず、すなわち、彼らは、F158 Fc RIIaの少なくとも1個のアレルを有する。

10

20

#### 【0008】

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

30

#### 【0009】

IgGにおいて、Cg2ドメインとCg3ドメインの間のFc上の部位 (図1) は、胎児性受容体 (neonatal receptor: FcRn) との相互作用を仲介し、その結合は、エンドソームからエンドサイトーシスされた抗体を血流に戻して再利用する (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181 - 220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739 - 766、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。この過程は、大きなサイズの全長分子であるため腎臓ろ過による除去と一緒にあって、結果として、1から3週間までの範囲である好ましい抗体の血清半減期となる。FcのFcRnとの結合はまた、抗体輸送において重要な役割を果たす。FcRnのためのFc上の結合部位は、細菌タンパク質AおよびGが結合する部位でもある。これらのタンパク質による強い結合は、典型的に、タンパク質精製中に、タンパク質Aまたはタンパク質G親和性クロマトグラフィーを用いることにより抗体を精製するための手段として用いられる。故に、Fc上のこの領域の適合度は、抗体の臨床的特徴およびそれらの精製の両方に重要である。ラットFc/FcRn複合体 (Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379 - 383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867 - 877、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)、およびFcとタンパク質AおよびGの複合体 (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20:2361 - 2370; Sauer - Eriksson et al., 1995, Structure 3:265 - 278; Tashiro et al., 1995, Curr Opin Struct Biol 5:471 - 481、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される) の利用可能な構造は、Fcとこれらのタンパク質の相互作用に関する理解を提供する。FcRn受容体はまた、IgGの、胎児腸へのおよび大人の腸上皮内腔への輸送に關与する (Ghetie and Ward, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18:739 - 766; Yoshida

40

50

et al., *Immunity*, 2004, 20(6):769 - 783、両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

#### 【0010】

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

10

#### 【0011】

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

20

#### 【0012】

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

30

#### 【0013】

ヒトFcにおける変異研究は、FcRnへの結合に重要な残基のいくつかで起こり、増加した血清半減期を証明している。ヒトFc1において、Hintonらは、3個の残基を、他の19個の共通アミノ酸に個々に変異させた。Hintonらは、いくつかの点変異の二重変異が、FcRn結合親和性を増加したことを発見した(Hinton et al., 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213 - 6216、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。2個の変異は、サルにおいて増加した半減期を有した。Shieldsらは、A1aを除くほとんどの残基を変異させ、FcRnおよびFcRの結合について研究した(Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(9):6591 - 6604、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

40

#### 【0014】

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

50

## 【 0 0 1 5 】

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

## 【 0 0 1 6 】

Fc領域の1つの特徴は、図1に示す通り、N297に起こる保存されたN結合グリコシル化である。よく記載される通り、この炭水化物またはオリゴ糖は、抗体のために重要な構造的かつ機能的役割を果たし、抗体を哺乳動物発現系を用いて製造しなければならない原理的理由の1つである(Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176 - 180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288 - 294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539 - 45547.; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478 - 16483; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591 - 6604; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733 - 26740; Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263:133 - 147; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469 - 16477; および、Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325:979 - 989、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

## 【 0 0 1 7 】

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

## 【 0 0 1 8 】

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

## 【 0 0 1 9 】

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

## 【 発明の開示 】

## 【 0 0 2 0 】

## 発明の概要

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

10

20

30

40

50

異体の結合と比較した、約 pH 6 でのそれらの優先的結合であり、細胞の再利用後の血液への Fc の再放出を容易にすることである。

【0021】

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

【0022】

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

10

【0023】

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

20

【0024】

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

【0025】

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

【0026】

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

30

【0027】

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

【0028】

さらなる局面において、本発明は、親ポリペプチドの Fc 領域中に少なくとも 1 個の修飾を含む該親 Fc ポリペプチドの Fc 変異領域を提供し、ここで、該変異タンパク質は、親ポリペプチドと比較して FcRn との変化した結合を示し、該 Fc 変異体は、246H、246S、247D、247T、248H、248P、248Q、248R、248Y、249T、249W、251D、251E、251H、251I、251K、251M、251N、251T、251V、251Y、252F、252L、253L、253T、253V、254H、254L、254N、254T、254V、<sup>^</sup>254N、255E、255F、255H、255K、255S、255V、256E、256H、256V、257A、257C、257D、257E、257F、257G、257H、257I、257K、257L、257M、257N、257Q、257R、257S、257T、257V、257W、257Y、258R、258V、279A、279C、279D、279F、279G、279H、279I、279K、279L、279M、279N、279P、279Q、279R、279S、279T、279W、279Y、280E、280H、<sup>^</sup>281A、<sup>^</sup>281D、<sup>^</sup>281S、<sup>^</sup>281T、282D、282F、282H、282I、282T、283F、283I、283L、283Y、284H

40

50

、 2 8 4 K、 2 8 4 P、 2 8 4 Q、 2 8 4 R、 2 8 4 S、 2 8 4 Y、 2 8 5 S、 2 8 5 V  
 、 2 8 6 #、 2 8 6 L、 2 8 7 H、 2 8 7 S、 2 8 7 V、 2 8 7 Y、 2 8 8 H、 2 8 8 Q  
 、 2 8 8 R、 2 8 8 S、 3 0 5 H、 3 0 5 T、 3 0 6 F、 3 0 6 H、 3 0 6 I、 3 0 6 N  
 、 3 0 6 T、 3 0 6 V、 3 0 6 Y、 3 0 7 D、 3 0 7 V、 3 0 7 Y、 3 0 8 A、 3 0 8 C  
 、 3 0 8 D、 3 0 8 E、 3 0 8 F、 3 0 8 G、 3 0 8 H、 3 0 8 I、 3 0 8 K、 3 0 8 L  
 、 3 0 8 M、 3 0 8 N、 3 0 8 P、 3 0 8 Q、 3 0 8 R、 3 0 8 S、 3 0 8 T、 3 0 8 W  
 、 3 0 8 Y、 3 0 9 F、 3 0 9 H、 3 0 9 I、 3 0 9 N、 3 0 9 P、 3 0 9 Q、 3 0 9 V  
 、 3 0 9 Y、 3 1 0 K、 3 1 0 N、 3 1 0 T、 3 1 1 H、 3 1 1 L、 3 1 1 S、 3 1 1 T  
 、 3 1 1 V、 3 1 1 W、 3 1 2 H、 3 1 3 Y、 3 1 5 E、 3 1 5 G、 3 1 5 H、 3 1 5 Q  
 、 3 1 5 S、 3 1 5 T、 3 1 7 H、 3 1 7 S、 3 3 9 P、 3 4 0 P、 3 4 1 S、 3 7 4 H 10  
 、 3 7 4 S、 3 7 6 H、 3 7 6 L、 3 7 8 H、 3 7 8 N、 3 8 0 T、 3 8 0 Y、 3 8 2 H  
 、 3 8 3 H、 3 8 3 K、 3 8 3 Q、 3 8 4 E、 3 8 4 G、 3 8 4 H、 3 8 5 A、 3 8 5 C  
 、 3 8 5 D、 3 8 5 E、 3 8 5 F、 3 8 5 H、 3 8 5 I、 3 8 5 K、 3 8 5 L、 3 8 5 M  
 、 3 8 5 N、 3 8 5 P、 3 8 5 Q、 3 8 5 R、 3 8 5 S、 3 8 5 T、 3 8 5 V、 3 8 5 W  
 、 3 8 5 Y、 3 8 6 E、 3 8 6 H、 3 8 6 K、 3 8 7 #、 3 8 7 A、 3 8 7 H、 3 8 7 K  
 、 3 8 7 Q、 3 8 9 E、 3 8 9 H、 4 2 6 E、 4 2 6 H、 4 2 6 L、 4 2 6 N、 4 2 6 R  
 、 4 2 6 V、 4 2 6 Y、 4 2 7 I、 4 2 9 D、 4 2 9 F、 4 2 9 K、 4 2 9 N、 4 2 9 Q  
 、 4 2 9 S、 4 2 9 T、 4 2 9 Y、 4 3 0 D、 4 3 0 H、 4 3 0 K、 4 3 0 L、 4 3 0 Q  
 、 4 3 0 Y、 4 3 1 G、 4 3 1 H、 4 3 1 I、 4 3 1 P、 4 3 1 S、 4 3 2 F、 4 3 2 H  
 、 4 3 2 N、 4 3 2 S、 4 3 2 V、 4 3 3 E、 4 3 3 N、 4 3 3 P、 4 3 3 R、 4 3 3 S 20  
 、 4 3 4 H、 4 3 4 Q、 4 3 4 S、 4 3 4 Y、 4 3 5 N、 4 3 6 E、 4 3 6 F、 4 3 6 H  
 、 4 3 6 L、 4 3 6 Q、 4 3 6 V、 4 3 6 W、 4 3 7 E、 4 3 7 V、 4 3 8 E、 4 3 8 H  
 および 4 3 8 K (ここで、番号は、E U I n d e x に従い、^ は、表示の位置の後ろの  
 挿入であり、そして # は、その表示の位置の欠失である。) からなる群から選択される少  
 なくとも 1 個の修飾を含む。

## 【 0 0 2 9 】

さらなる局面において、本発明は、 2 4 6 H、 2 4 6 S、 2 4 7 D、 2 4 7 T、 2 4 8  
 H、 2 4 8 P、 2 4 8 Q、 2 4 8 R、 2 4 8 Y、 2 4 9 T、 2 4 9 W、 2 5 1 D、 2 5 1  
 E、 2 5 1 H、 2 5 1 I、 2 5 1 K、 2 5 1 M、 2 5 1 N、 2 5 1 T、 2 5 1 V、 2 5 1  
 Y、 2 5 2 L、 2 5 3 L、 2 5 3 T、 2 5 3 V、 2 5 4 H、 2 5 4 L、 2 5 4 N、 2 5 4 30  
 V、 ^ 2 5 4 N、 2 5 5 E、 2 5 5 F、 2 5 5 H、 2 5 5 K、 2 5 5 S、 2 5 5 V、 2 5  
 6 H、 2 5 6 V、 2 5 7 A、 2 5 7 C、 2 5 7 D、 2 5 7 E、 2 5 7 F、 2 5 7 G、 2 5  
 7 H、 2 5 7 I、 2 5 7 K、 2 5 7 L、 2 5 7 M、 2 5 7 N、 2 5 7 Q、 2 5 7 R、 2 5  
 7 S、 2 5 7 T、 2 5 7 V、 2 5 7 W、 2 5 7 Y、 2 5 8 R、 2 5 8 V、 2 7 9 A、 2 7  
 9 C、 2 7 9 D、 2 7 9 F、 2 7 9 G、 2 7 9 H、 2 7 9 I、 2 7 9 K、 2 7 9 M、 2 7  
 9 N、 2 7 9 P、 2 7 9 Q、 2 7 9 R、 2 7 9 S、 2 7 9 T、 2 7 9 W、 2 7 9 Y、 2 8  
 0 H、 ^ 2 8 1 A、 ^ 2 8 1 D、 ^ 2 8 1 S、 ^ 2 8 1 T、 2 8 2 D、 2 8 2 F、 2 8 2  
 H、 2 8 2 I、 2 8 2 T、 2 8 3 F、 2 8 3 I、 2 8 3 L、 2 8 3 Y、 2 8 4 H、 2 8 4  
 K、 2 8 4 P、 2 8 4 Q、 2 8 4 R、 2 8 4 S、 2 8 4 Y、 2 8 5 S、 2 8 5 V、 2 8 6  
 #、 2 8 6 L、 2 8 7 H、 2 8 7 S、 2 8 7 V、 2 8 7 Y、 2 8 8 H、 2 8 8 Q、 2 8 8 40  
 S、 3 0 5 H、 3 0 5 T、 3 0 6 F、 3 0 6 H、 3 0 6 I、 3 0 6 N、 3 0 6 T、 3 0 6  
 V、 3 0 6 Y、 3 0 7 D、 3 0 7 V、 3 0 7 Y、 3 0 8 C、 3 0 8 E、 3 0 8 F、 3 0 8  
 G、 3 0 8 H、 3 0 8 I、 3 0 8 K、 3 0 8 L、 3 0 8 M、 3 0 8 N、 3 0 8 P、 3 0 8  
 Q、 3 0 8 R、 3 0 8 S、 3 0 8 W、 3 0 8 Y、 3 0 9 F、 3 0 9 H、 3 0 9 N、 3 0 9  
 Q、 3 0 9 V、 3 0 9 Y、 3 1 0 K、 3 1 0 N、 3 1 0 T、 3 1 1 L、 3 1 1 T、 3 1 1  
 V、 3 1 1 W、 3 1 2 H、 3 1 3 Y、 3 1 5 E、 3 1 5 G、 3 1 5 H、 3 1 5 Q、 3 1 5  
 S、 3 1 5 T、 3 1 7 H、 3 1 7 S、 3 3 9 P、 3 4 0 P、 3 4 1 S、 3 7 4 H、 3 7 4  
 S、 3 7 6 H、 3 7 6 L、 3 7 8 H、 3 7 8 N、 3 8 0 T、 3 8 0 Y、 3 8 2 H、 3 8 3  
 H、 3 8 3 K、 3 8 3 Q、 3 8 4 E、 3 8 4 G、 3 8 4 H、 3 8 5 A、 3 8 5 C、 3 8 5  
 F、 3 8 5 H、 3 8 5 I、 3 8 5 K、 3 8 5 L、 3 8 5 M、 3 8 5 N、 3 8 5 P、 3 8 5 50

Q、385S、385T、385V、385W、385Y、386E、386H、386K、387#、387A、387H、387K、387Q、389E、389H、426E、426H、426L、426N、426R、426V、426Y、427I、429D、429F、429K、429N、429Q、429S、429T、429Y、430D、430H、430K、430L、430Q、430Y、431G、431H、431I、431P、431S、432F、432H、432N、432S、432V、433E、433N、433P、433S、434H、434Q、434S、435N、436E、436F、436L、436V、436W、437E、437V、438H、および438Kからなる群から選択される少なくとも1個の修飾を含むFc変異体を提供する。

【0030】

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

【0031】

図面の簡単な説明

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

【0032】

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

【0033】

10

20

30

40

50

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

【 0 0 3 4 】

図 4。本発明に用いたヒトおよびげっ歯動物 F c R n 重鎖配列の例。

【 0 0 3 5 】

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

【 0 0 3 6 】

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

10

【 0 0 3 7 】

図 7。挿入または欠失を含む変異体の設計に用いるいくつかの概念の説明図。

【 0 0 3 8 】

図 8。本発明の変異体。

図 9。本発明の変異体。

図 10。本発明の変異体。

【 0 0 3 9 】

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

20

【 0 0 4 0 】

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

【 0 0 4 1 】

図 13。F c 変異体の F c R n 結合特性の概要。右から左の列は、F c R n 結合の修飾、使用した免疫グロブリン、他の修飾、野生型と比較した Alpha Screen<sup>TM</sup> 競合分析による相対的 F c R n 親和性 (中央値)、実施した分析数、およびタンパク質の参照数を示す。1.0 より大きい相対的 F c R n 親和性数は、野生型よりも増加した結合を証明する。

30

【 0 0 4 2 】

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

【 0 0 4 3 】

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

【 0 0 4 4 】

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

40

【 0 0 4 5 】

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

【 0 0 4 6 】

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

【 0 0 4 7 】

発明の詳細な説明

50

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

【0048】

インビボでのFcタンパク質の保持を増加するためには、結合親和性は、pH7.4付近での親和性の付随的増加なく、pH6付近で増加しなければならない。未だ試験中であるが、Fc領域は、エンドソーム中pH6でのFcRnとの結合がFcを隠すため、インビボでのより長時間の半減期を有すると考えられる(Ghetie and Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592 - 598、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。その後、エンドソーム画分は、Fcを細胞表面に再生する。前記画分が細胞外空間(より高いpH~7.4)に開くと、血中に戻るFcの放出を促進する。Dall'Acquaらは、pH6およびpH7.4にて増加したFcRn結合を有するFc変異体が、実際に、減少した血清濃度および野生型Fcと同じ程度の半減期を有したことを示した(Dall'Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171 - 5180、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。pH7.4でのFcRnに対するFcの増加した親和性は、血中に戻るFcの放出を妨げると考えられる。故に、Fcのインビボでの半減期を増加させ得るFc変異は、理想的には、より高いpHでのFcの放出を可能にしながら、より低いpHでのFcRn結合を増加し得る。アミノ酸ヒスチジンは、pH6.0から7.4の範囲でその荷電状態が変わる。故に、Fc/FcRn複合体中の重要な部位でHis残基が発見されることは驚くことではない(図6)。

10

20

【0049】

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

【0050】

定義

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

30

【0051】

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

【0052】

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

40

【0053】

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

【0054】

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

【0055】

本明細書で用いる“アミノ酸挿入”または“挿入”は、親ポリペプチド配列中、特定の

50

位置でのアミノ酸の付加を意味する。例えば、- 2 3 3 E または ^ 2 3 3 E は、2 3 3 位後および 2 3 4 位前へのグルタミン酸の挿入を意味する。さらに、- 2 3 3 A D E または ^ 2 3 3 A D E は、2 3 3 位後および 2 3 4 位前への A l a A s p G l u の挿入を意味する。

【 0 0 5 6 】

本明細書で用いる“アミノ酸欠失”または“欠失”は、親ポリペプチド配列中、特定の位置でのアミノ酸の除去を意味する。例えば、E 2 3 3 - または E 2 3 3 # は、2 3 3 位でのグルタミン酸の欠失を意味する。さらに、E D A 2 3 3 - または E D A 2 3 3 # は、2 3 3 位から始まる配列 G l u A s p A l a の欠失を意味する。

【 0 0 5 7 】

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

【 0 0 5 8 】

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

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 9 】

本明細書で用いる“残基”は、タンパク質中の位置およびそこに関係するアミノ酸の特定を意味する。例えば、アスパラギン297 (Asn297、またN297とも称する)は、ヒト抗体IgG1中の残基である。

## 【 0 0 6 0 】

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

## 【 0 0 6 1 】

本明細書で用いる“I g Gサブクラス修飾”は、1個のIgGイソ型の1個のアミノ酸を、異なる整列したIgGイソ型において対応するアミノ酸に変換するアミノ酸修飾を意味する。例えば、IgG1はEU296位にチロシンを含み、IgG2はフェニルアラニンを有するため、IgG2におけるF296Y置換は、IgGサブクラス修飾と見なされる。

10

## 【 0 0 6 2 】

本明細書で用いる“天然に生じない修飾”は、イソ型(isotypic)ではないアミノ酸修飾を意味する。例えば、IgGは何れも、332位にグルタミン酸を含まないため、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4におけるI332E置換は、天然に生じない修飾と見なされる。

## 【 0 0 6 3 】

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

20

## 【 0 0 6 4 】

本明細書で用いる“エフェクター機能”は、抗体のFc領域と、Fc受容体またはリガンドとの相互作用によりもたらされる生化学的事象を意味する。エフェクター機能には、ADCC、ADCP、およびCDCが含まれるが、それらに限定されない。

## 【 0 0 6 5 】

本明細書で用いる“エフェクター細胞”は、1個以上のFc受容体を発現し、1個以上のエフェクター機能を仲介する免疫系の細胞を意味する。エフェクター細胞には、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびT細胞が含まれるが、それらに限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含む何れかの生物を含むが、それらに限定されない生物由来であり得る。

30

## 【 0 0 6 6 】

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

40

## 【 0 0 6 7 】

本明細書で用いる“F cガンマ受容体”または“F c R”は、IgG抗体Fc領域に結合し、FcR遺伝子によりコードされる何れかのタンパク質ファミリーのメンバーを意味する。ヒトにおいて、このファミリーには、イソ型FcRIa、FcRIb、お

50

よび Fc RIc を含む Fc RI (CD64) ; イソ型 Fc RIIa (アロタイプ H131 および R131 を含む) 、 Fc RIIb (Fc RIIb - 1 および Fc RIIb - 2 を含む) 、 および Fc RIc を含む Fc RI (CD32) ; ならびに、イソ型 Fc RIIa (アロタイプ V158 および F158 を含む) および Fc RIIb (アロタイプ Fc RIIb - NA1 および Fc RIIb - NA2 を含む) を含む Fc RIII (CD16) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57 - 65、参照によりその全体が本明細書中に包含される) 、 ならびに何れかの未知のヒト Fc R または Fc R イソ型またはアロタイプが含まれるが、それらに限定されない。 Fc R は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルを含むが、それらに限定されない何れかの生物由来であり得る。マウス Fc R には、 Fc RI (CD64) 、 Fc RII (CD32) 、 Fc RIII (CD16) 、 および Fc RIII - 2 (CD16 - 2) 、 ならびに何れかの未知のマウス Fc R または Fc R イソ型またはアロタイプが含まれるが、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0068】

本明細書で用いる “FcRn” または “胎児性 Fc 受容体” は、 IgG 抗体 Fc 領域に結合し、 FcRn 遺伝子により少なくともその一部をコードされるタンパク質を意味する。 FcRn は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルを含むが、それらに限定されない何れかの動物由来であり得る。当技術分野で公知の通り、機能的 FcRn タンパク質は、しばしば、重鎖および軽鎖と称される 2 個のポリペプチドを含む。軽鎖は、ベータ - 2 - ミクログロブリンであり、重鎖は、 FcRn 遺伝子によりコードされる。本明細書中に特に記載がなければ、 FcRn または FcRn タンパク質は、 FcRn 重鎖とベータ - 2 - ミクログロブリンの複合体を意味する。特定の目的の FcRn の配列、特にヒト種の配列を、図に示す。

#### 【0069】

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

#### 【0070】

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

#### 【0071】

本明細書で用いる “標的抗原” は、特定の抗体の可変領域により特異的に結合される分子を意味する。標的抗原は、タンパク質、炭水化物、脂質、または他の化合物であり得る。

#### 【0072】

本明細書で用いる “標的細胞” は、標的抗原を発現する細胞を意味する。

#### 【0073】

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

#### 【0074】

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

## 【 0 0 7 5 】

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

## 【 0 0 7 6 】

抗体

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

## 【 0 0 7 7 】

古典的抗体構造単位には、典型的に、四量体が含まれる。各四量体は、典型的に、ポリペプチド鎖の2個の相同対（各対は、1個の“軽”鎖（典型的に、約25kDaの分子量を有する。）および1個の“重”鎖（典型的に、約50-70kDaの分子量を有する。））を有する。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダ軽鎖に分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のイソ型を定義する。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むが、それらに限定されない、いくつかのサブクラスを有する。IgMは、IgM1およびIgM2を含むが、これに限定されないサブクラスを有する。故に、本明細書で用いる“イソ型”は、それらの定常領域の化学特性および抗原特性により定義される免疫グロブリンのサブクラスのいずれかを意味する。既知のヒト免疫グロブリンイソ型は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgDおよびIgEである。

## 【 0 0 7 8 】

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

## 【 0 0 7 9 】

各鎖のカルボキシ末端部位は、エフェクター機能に主要な役割を果たす定常領域を定義する。Kabatらは、重鎖および軽鎖の可変領域の多数の主要配列を集めた。該配列の保存の程度に基づき、彼らは、CDRおよびフレームワークに個々の主要配列を分類し、そのリストを作成した（SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et alを参照のこと、参照によりその全体が本明細書中に包含される）。

## 【 0 0 8 0 】

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

## 【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

重鎖の I g ドメインの他のタイプは、ヒンジ領域である。本明細書中、“ヒンジ”もしくは“ヒンジ領域”または“抗体ヒンジ領域”もしくは“免疫グロブリンヒンジ領域”は、抗体の第一および第二定常ドメイン間のアミノ酸を含むフレキシブルポリペプチドを意味する。構造的には、I g G C H 1 ドメインは、E U 2 2 0 位で終わり、I g G C H 2 ドメインは、E U 2 3 7 位の残基で始まる。故に、I g G に関して、抗体ヒンジは、本明細書中、2 2 1 位 ( I g G 1 にて D 2 2 1 ) から 2 3 6 位 ( I g G 1 にて G 2 3 6 ) を含むと定義され、ここで、番号は、Kabat に記載の E U i n d e x に従う。いくつかの態様において、例えば F c 領域において、一般的に 2 2 6 位または 2 3 0 位に当たる“下流側ヒンジ ( lower hinge ) ”が包含される。

#### 【 0 0 8 2 】

本発明において特に興味があるのは、F c 領域である。本明細書で用いる“F c”または“F c 領域”は、免疫グロブリンドメインの第一の定常領域、いくつかの場合に、ヒンジの一部を除く、抗体の定常領域を含むポリペプチドを意味する。故に、F c は、免疫グロブリンドメイン I g A、I g D、および I g G の残り 2 個の定常領域、ならびに免疫グロブリンドメイン I g E および I g M の残り 3 個の定常領域、ならびにこれらのドメインの N 末端のフレキシブルヒンジを意味する。I g A および I g M に関して、F c には、J 鎖が含まれ得る。I g G に関して、図 1 に示す通り、F c は、免疫グロブリンドメイン C ガンマ 2 および C ガンマ 3 ( C g 2 および C g 3 )、ならびに C ガンマ 1 ( C g 1 ) と C ガンマ 2 ( C g 2 ) の間の下流側ヒンジ領域を含む。F c 領域の境界は変化し得るが、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は、通常、そのカルボキシル末端に残基 C 2 2 6 または P 2 3 0 を含むと定義され、ここで、番号は、Kabat に記載の E U i n d e x に従う。F c は、下記に記載の通り、単離したこの領域か、または F c ポリペプチド中のこの領域を意味し得る。本明細書で記載の“F c ポリペプチド”は、F c 領域の全てまたは一部を含むポリペプチドを意味する。F c ポリペプチドは、抗体、F c 融合体、単離された F c、および F c 断片を含む。

#### 【 0 0 8 3 】

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

#### 【 0 0 8 4 】

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

#### 【 0 0 8 5 】

##### 抗体断片

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

#### 【 0 0 8 6 】

特定の抗体断片には、( i ) V L、V H、C L および C H 1 ドメインからなる F a b 断片、( i i ) V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片、( i i i ) 単一抗体の V L および V H ドメインからなる F v 断片；( i v ) 単一の可変領域からなる d A b 断片 ( Ward et al., 1989, Nature 341:544 - 546、参照によりその全体が本明細書中に包含される )、( v ) 単離された C D R 領域、( v i ) F ( a b ' ) 2 断片、2 つの結合した F a b 断片を含む二価断片、( v i i ) 一本鎖 F v 分子 ( s c F v ) ( ここで、V H ドメインおよび V L ドメインは、2 個のドメインを結合させ、抗原結合部位を形成させるペプチドリンカーにより連結される ( Bird et al., 1988, Science 242:423 - 426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879 - 5883、参照によりその全体が本明細書中に包含される ) )、( v i i i ) 二重特異的一本鎖 F v ( W O 0 3 / 1 1 1 6 1、参照

10

20

30

40

50

により本明細書中に包含される)、ならびに(i x) “二重抗体(diabody)”または“三重抗体(triobody)”、遺伝子融合により構築される多価または多特異的断片(Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461 - 479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444 - 6448、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)が含まれるが、それらに限定されない。該抗体断片は、修飾され得る。例えば、分子は、VHおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋の組み込みにより安定化され得る(Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239 - 1245、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

#### 【0087】

#### キメラおよびヒト化抗体

いくつかの態様において、骨格成分は、異なる種由来の混合物であり得る。そういうものとして、問題の抗体がそのような抗体であるとき、かかる抗体は、キメラ抗体および/またはヒト化抗体であり得る。一般的に、“キメラ抗体”および“ヒト化抗体”は両方とも、2種以上由来の領域を組み合わせた抗体を意味する。例えば、“キメラ抗体”には、伝統的に、マウス(またはいくつかの場合に、ラット)由来の変域(複数可)およびヒト由来の定常領域(複数可)が含まれる。“ヒト化抗体”は、一般的に、ヒト抗体中に見出される配列に置換した可変ドメインフレームワーク領域を有している非ヒト抗体を意味する。一般的に、ヒト化抗体において、CDRを除く抗体全体は、ヒト起源のポリヌクレオチドにコードされるか、またはそのCDR内を除いてそのような抗体と同一である。そのいくつかまたは全てが非ヒト生物に由来する核酸によりコードされるCDRは、ヒト抗体可変領域のベータ-シートフレームワークに移植され、抗体を作製し、その特異性は、移植したCDRにより決定される。そのような抗体の作製は、例えば、WO 92/11018、Jones, 1986, Nature 321:522 - 525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534 - 1536(全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載される。対応する供与側残基への選択した受容側フレームワーク残基の“復帰突然変異(Backmutation)”は、しばしば、初期の移植したコンストラクトで欠失している親和性を再び得るのに必要である(US 5 530 101; US 5 585 089; US 5 693 761; US 5 693 762; US 6 180 370; US 5 859 205; US 5 821 337; US 6 054 297; US 6 407 213、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含み、故に、ヒトFc領域を典型的に含むだろう。ヒト化抗体はまた、遺伝子組み換えされた免疫系を有するマウスを用いて作製され得る(Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639 - 654、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。非ヒト抗体のヒト化および再形成のための様々な技術および方法は、当技術分野でよく知られている(Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science(USA)およびそこで参照される文献、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ヒト化方法には、Jones et al., 1986, Nature 321:522 - 525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323 - 329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534 - 1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029 - 33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029 - 1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 - 9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593 - 9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181 - 4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321 - 8(全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の方法が含まれるが、それらに限定されない。非ヒト抗体可変領域の免疫原性を減じるヒト化または他の方法には、例えば、Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969 - 973(参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の表面再形成(resurfacing)方法が含まれ得る。1つの態様において、親抗体は、当技術分野で公知の通り、成熟した親和性を有する。構造に基づく方法は、例えばUS S N 11/004, 590に記載のヒト化および親和性成熟に用いられ得る。選択に基づく方法は、Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151 - 162; Baca et al., 1997

10

20

30

40

50

, J. Biol. Chem. 272(16):10678 - 10684 ; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611 - 22618 ; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910 - 8915 ; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753 - 759 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の方法を含むが、これらに限定されない、抗体可変領域のヒト化および/または親和性成熟に用いられ得る。他のヒト化方法は、US 5,980,810, 5,980,510 ; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119 - 1125 ; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076 - 3084 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される。)に記載の方法を含むが、これらに限定されない、CDRの一部のみの移植を伴い得る。

#### 【0088】

10

##### 二重特異的抗体

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

#### 【0089】

##### ミニボディ

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

20

#### 【0090】

##### ヒト抗体

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

#### 【0091】

30

##### 抗体融合体

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

40

50

ンパク性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールのコポリマーのうち1つと結合し得る。

【0092】

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

10

【0093】

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

20

【0094】

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

30

【0095】

抗体の共有結合修飾（Covalent modification）

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

【0096】

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

40

【0097】

ヒスチジル残基は、ヒスチジル側鎖と比較的特異的に反応するピロ炭酸ジエチルとのpH 5.5 - 7.0での反応により誘導される。パラ-プロモフェンアシルプロミドも有用

50

である；反応は、好ましくは 0.1 M カコジル酸ナトリウム中、pH 6.0 にて行われる。

【0098】

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

10

【0099】

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

【0100】

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

20

【0101】

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

30

【0102】

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

40

【0103】

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

【0104】

50

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

#### 【0105】

##### グリコシル化

共有結合修飾の他のタイプは、グリコシル化である。他の態様において、本明細書に記載の I g G 変異体は、1個以上の改変された糖鎖 (glycoform) を含むように修飾され得る。本明細書で用いる“改変された糖鎖”は、I g G と共有結合する炭水化物組成物を意味し、ここで該炭水化物組成物は、親 I g G と化学的に異なる。改変された糖鎖は、エフェクター機能を増強するかまたは減少することを含むが、これらに限定されない様々な目的に有用であり得る。改変された糖鎖は、当技術分野で公知の様々な方法により作製され得る (Umana et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17:176 - 180 ; Davies et al., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288 - 294 ; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277:26733 - 26740 ; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466 - 3473 ; U S 6 , 6 0 2 , 6 8 4 ; U S S N 1 0 / 2 7 7 , 3 7 0 ; U S S N 1 0 / 1 1 3 , 9 2 9 ; P C T W O 0 0 / 6 1 7 3 9 A 1 ; P C T W O 0 1 / 2 9 2 4 6 A 1 ; P C T W O 0 2 / 3 1 1 4 0 A 1 ; P C T W O 0 2 / 3 0 9 5 4 A 1、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される ; (Potelligent<sup>T M</sup> technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ] ; GlycoMAb (登録商標) glycosylation engineering technology [Glycart Biotechnology AG, Zuerich, Switzerland])。多くのこれらの技術は、フコシル化レベルを制御すること、および/または F c 領域に共有結合するオリゴ糖を、例えば、遺伝子組み換えまたは他の様々な生物または細胞株 (例えば、Lec - 13 CHO 細胞またはラットハイブリドーマ Y B 2 / 0 細胞) で I g G を発現することによるか、またはグリコシル化経路に関する酵素 (例えば、FUT8 [ 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ ] および/または 1 - 4 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I [ GnT I I I ]) を調節することによるか、または I g G が発現された後、炭水化物 (複数可) を修飾することにより、2つに切断することに基づく。改変された糖鎖は、典型的に、異なる炭水化物またはオリゴ糖と称される ; 故に、I g G 変異体、例えば抗体または F c 融合体は、改変された糖鎖に包含され得る。あるいは、改変された糖鎖は、異なる炭水化物またはオリゴ糖を含む I g G 変異体と称され得る。当技術分野で公知の通り、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列 (例えば、下記の、特定のグリコシル化アミノ酸残基の存在または不存在)、または該タンパク質を産生する宿主細胞もしくは生物に依存し得る。特定の発現系を以下に記載する。

#### 【0106】

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

#### 【0107】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、(N結合グリコシル化部位のために) 1個以上の上記トリペプチド配列を含むようにアミノ酸配列を改変することにより都合よく達成される。該改変はまた、(O結合グリコシル化部位のために) 出発配列への1個以上のセリン

またはトレオニン残基の付加または置換により成され得る。簡単には、抗体のアミノ酸配列を、好ましくはDNAレベルでの変化により、特に、コドンが所望のアミノ酸に翻訳され得るように作製されるように予め選択された塩基にて、標的ポリペプチドをコードするDNAを変異させることにより、改変する。

**【0108】**

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

10

**【0109】**

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

20

30

**【0110】**

抗体の共有結合修飾の他のタイプは、例えば *Nektar Therapeutics* から市販されている 2005-2006 PEG Catalog (*Nektar website* で利用可能)、米国特許第 4,640,835 号；同第 4,496,689 号；同第 4,301,144 号；同第 4,670,417 号；同第 4,791,192 号または同第 4,179,337 号（全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される）に記載の方法で、抗体を、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンのような様々なポリオールを含むが、これらに限定されない様々な非タンパク性ポリマーに結合することを含む。さらに、当技術分野で公知の通り、アミノ酸置換を、PEG のようなポリマーの付加を促進するために抗体内の様々な部位に行うことができる。例えば、米国特許公開番号 2005 / 0114037 A 1（参照によりその全体が本明細書中に包含される）を参照のこと。

40

**【0111】**

## 標識抗体

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

**【0112】**

50

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

10

## 【0113】

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

## 【0114】

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

20

30

## 【0115】

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

40

## 【0116】

IgG 変異体

1つの態様において、本発明は、IgG タンパク質変異体を提供する。最小限では、I

50

g G 変異体は、重鎖の C H 2 - C H 3 領域を含む抗体断片を含む。さらに、適する I g G 変異体は、F c ドメイン（例えば、下流ヒンジ領域を含む）を含み、ならびに重鎖の定常領域（C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3）を含む I g G 変異体も本発明に有用であり、それらは全て、融合パートナーと融合し得る。

【 0 1 1 7 】

I g G 変異体は、親 I g G ポリペプチドと比較して、いくつかの場合に野生型 I g G と比較して、1 個以上のアミノ酸修飾を含む。I g G 変異体は、1 個以上の最適化特性を有し得る。I g G 変異体は、少なくとも 1 個のアミノ酸修飾により、その親 I g G とアミノ酸配列が異なる。故に、I g G 変異体は、親と比較して少なくとも 1 個のアミノ酸修飾を有する。あるいは、I g G 変異体は、親と比較して 2 個以上のアミノ酸修飾、例えば親と比較して約 1 個から 5 0 個のアミノ酸修飾、好ましくは約 1 個から 1 0 個のアミノ酸修飾、最も好ましくは約 1 個から約 5 個のアミノ酸修飾を有し得る。

10

【 0 1 1 8 】

故に、I g G 変異体の配列および親 F c ポリペプチドの配列は、実質的に相同性である。例えば、本明細書中、変異体 I g G の変異体配列は、親 I g G 変異体配列と約 8 0 % の相同性、好ましくは少なくとも約 9 0 % の相同性、最も好ましくは少なくとも約 9 5 % の相同性を有し得る。修飾は、分子生物学を用いて遺伝子組み換え的にまたは酵素的または化学的に行われ得る。

【 0 1 1 9 】

抗体のための標的抗原

20

実質的には、標的抗原の下記のリストに属するタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフおよび/またはエピトープが含まれるが、それらに限定されない全ての抗原は、I g G 変異体により標的とされ得る。それらには、サイトカインおよび膜貫通受容体を含む膜結合因子のような両方に可溶性の因子が含まれる：1 7 - I A、4 - 1 B B、4 D c、6 - ケト - P G F 1 a、8 - イソ - P G F 2 a、8 - オキソ - d G、A 1 アデノシン受容体、A 3 3、A C E、A C E - 2、アクチビン、アクチビン A、アクチビン A B、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン R I A、アクチビン R I A A L K - 2、アクチビン R I B A L K - 4、アクチビン R I I A、アクチビン R I I B、A D A M、A D A M 1 0、A D A M 1 2、A D A M 1 5、A D A M 1 7 / T A C E、A D A M 8、A D A M 9、A D A M T S、A D A M T S 4、A D A M T S 5、アドレシン、a F G F、A L C A M、A L K、A L K - 1、A L K - 7、アルファ - 1 - アンチトリプシン、アルファ - V / ベータ - 1 アンタゴニスト、A N G、A n g、A P A F - 1、A P E、A P J、A P P、A P R I L、A R、A R C、A R T、アルテミン、抗 I d、A S P A R T I C、心房性ナトリウム利尿因子、a v / b 3 インテグリン、A x 1、b 2 M、B 7 - 1、B 7 - 2、B 7 - H、B - リンパ球刺激因子 ( B l y S )、B A C E、B A C E - 1、B a d、B A F F、B A F F - R、B a g - 1、B A K、B a x、B C A - 1、B C A M、B c 1、B C M A、B D N F、b - E C G F、b F G F、B I D、B i k、B I M、B L C、B L - C A M、B L K、B M P、B M P - 2 B M P - 2 a、B M P - 3 オステオゲニン ( O s t e o g e n i n )、B M P - 4 B M P - 2 b、B M P - 5、B M P - 6 V g r - 1、B M P - 7 ( O P - 1 )、B M P - 8 ( B M P - 8 a、O P - 2 )、B M P R、B M P R - I A ( A L K - 3 )、B M P R - I B ( A L K - 6 )、B R K - 2、R P K - 1、B M P R - I I ( B R K - 3 )、B M P、b - N G F、B O K、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、B P D E、B P D E - D N A、B T C、補体因子 3 ( C 3 )、C 3 a、C 4、C 5、C 5 a、C 1 0、C A 1 2 5、C A D - 8、カルシトニン、c A M P、癌胎児性抗原 ( C E A )、癌関連抗原、カテプシン A、カテプシン B、カテプシン C / D P P I、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、C B L、C C I、C C K 2、C C L、C C L 1、C C L 1 1、C C L 1 2、C C L 1 3、C C L 1 4、C C L 1 5、C C L 1 6、C C L 1 7、C C L 1 8、C C L 1 9、C C L 2、C C L 2 0、C C L 2 1、C C L 2 2、C C L 2 3、C C L 2 4、C C L 2 5、C C L 2 6、C C L 2 7、C C L 2 8、C C L 3、C C L 4、C C L

30

40

50

5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、

【0120】

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

【0121】

HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMVUL、造血成長因子 (HGF)、HepB gp120、ヘパラーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFPG 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、

10

20

30

40

50

IL - 4 R、IL - 5、IL - 5 R、IL - 6、IL - 6 R、IL - 8、IL - 9、IL  
 - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 15、IL - 18、IL - 18 R、IL - 23  
 、インターフェロン ( INF ) - アルファ、INF - ベータ、INF - ガンマ、インヒビ  
 ン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリン  
 アルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルフ  
 ア4 / ベータ1、インテグリンアルファ4 / ベータ7、インテグリンアルファ5 ( アルフ  
 アV )、インテグリンアルファ5 / ベータ1、インテグリンアルファ5 / ベータ3、イン  
 テグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロン  
 ガンマ、IP - 10、I - TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイ  
 ン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリ  
 クレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KD  
 R、ケラチノサイト増殖因子 ( KGF )、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP ( TGF  
 F - 1 )、潜在的TGF - 1、潜在的TGF - 1 bp1、LBP、LDGF、LECT  
 2、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、METALLOPRO  
 TEASES、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、  
 【 0 1 2 2 】  
 MMP - 14、MMP - 15、MMP - 2、MMP - 24、MMP - 3、MMP - 7、M  
 MP - 8、MMP - 9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン ( Muc1 )、MU  
 C18、ミュー管抑制物質、Mug、MusK、NAIP、NAP、NCAD、N - C  
 アドヘリン、NCA90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン  
 - 3、- 4、または - 6、ニューロツリン、神経成長因子 ( NGF )、NGFR、NGF  
 - ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG - 3、NT、NTN、OB、OGG  
 1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr  
 、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P - Cadh  
 erin、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、PT  
 Hrp、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、RS  
 V Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、S  
 CF / KL、SDF - 1、SERINE、血清アルブミン、sFRP - 3、Shh、SI  
 GIRR、SK - 1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、S  
 PARC、Stat、STEAP、STEAP - II、TACE、TACI、TAG - 7  
 2 ( 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、T  
 EM8、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、トロンピン、胸腺Ck - 1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIM  
 P、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 )、

10

20

30

40

50

## 【0123】

TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A (RANK ODFR、TRANCER)、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK RFN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFFR)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHTR、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNFRICD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNFRICD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNFRIII、TNFCR)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1R)、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 (TRANCER/RANKリガンド ODF、OPGリガンド)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITRリガンド AITRリガンド、TL6)、TNFSF1A (TNF-a コネクチン (Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40リガンド gp34、TXGP1)、TNFSF5 (CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6 (Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンド CD70)、TNFSF8 (CD30リガンド CD153)、TNFSF9 (4-1BBリガンド CD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAILR、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCER、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、ならびにホルモンおよび成長因子のための受容体。

## 【0124】

当業者は、標的の上記リストが、特定のタンパク質および生体分子のみでなく、それらを含む生化学的経路または経路群も意味することを理解するだろう。例えば、標的抗原としてのCTLA-4への言及は、CTLA-4、B7-1、B7-2、CD28、およびこれらのタンパク質に結合する全ての他の未知のリガンドまたは受容体を含む、T脂肪共刺激経路を形成するリガンドおよび受容体も標的であることを意味する。故に、本明細書

10

20

30

40

50

で用いる抗原とは、特定の生体分子のみでなく、該標的と相互作用する一連のタンパク質および該標的が属する生化学的経路のメンバーも意味する。当業者は、上記の標的抗原のいずれか、それらに結合するリガンドもしくは受容体、またはその対応する生化学的経路の他のメンバーを、Fc融合体を作製するために本発明のFc変異体に作動可能に連結し得ることをさらに理解するだろう。故に、例えば、EGFRを標的とするFc融合体を、EGFRに結合するEGF、TGF- $\beta$ 、または発見されたもしくは未知の全ての他のリガンドにFc変異体を作動可能に連結することにより構築することができる。従って、本発明のFc変異体は、EGFRに結合するEGF、TGF- $\beta$ 、または発見されたもしくは未知の全ての他のリガンドに結合するFc融合体を作製するために、EGFRと作動可能に連結され得る。故に、実際、リガンド、受容体であろうといくつかの他のタンパク質もしくはタンパク質ドメインであろうと、それらの対応する生化学的経路を含む上記の標的およびタンパク質を含むが、それらに限定されない全てのポリペプチドを、Fc融合体を作製するために本発明のFc変異体に作動可能に連結することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0125】

適する抗原の選択は、所望の適用に依存する。抗癌処置に関して、その発現が癌細胞に限定される標的を有することが望ましい。とりわけ抗体治療に適していることが証明されているいくつかの標的が、シグナル伝達機能を有するものである。他の治療用抗体は、受容体とその同族リガンドとの結合を阻害することにより受容体のシグナル伝達を阻止して、それらの効果を発揮する。治療用抗体の他の作用機序は、受容体の下方制御を引き起こすことである。他の抗体は、それらの標的抗原を介するシグナル伝達により働かない。いくつかの場合において、感染性疾患剤に向けられた抗体が用いられる。

#### 【0126】

1つの態様において、本発明のFc変異体は、サイトカインに対する抗体中に組み込まれる。あるいは、Fc変異体は、サイトカインと融合または結合される。本明細書で用いる“サイトカイン”は、細胞間メディエーターとして他の細胞に作用する、ある細胞集団により放出されるタンパク質の一般名を意味する。例えば、Penichet et al., 2001, *J Immunol Methods* 248:91 - 101 (参照により明示的に本明細書中に包含される)に記載の通り、サイトカインは、抗体に融合され、一連の望ましい特性を提供する。かかるサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるものは、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンのような成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および黄体形成ホルモン(LH)のような糖タンパク質ホルモン；肝臓の増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF-ベータのような神経成長因子；血小板増殖因子；TGF-アルファおよびTGF-ベータのような形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-Iおよび-II；エリスロポイエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン-アルファ、ベータ、およびガンマのようなインターフェロン；マクロファージ-CSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；ならびに、顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15のようなインターロイキン(IL)；TNF-アルファまたはTNF-ベータのような腫瘍壊死因子；C5a；ならびに、LIFおよびkitリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子である。本明細書で用いる通り、用語サイトカインには、天然源由来または組換え細胞培養由来のタンパク質、および天然配列の生物学的に活性な同等物が含まれる。

#### 【0127】

TNFスーパーファミリーメンバーのようなサイトカインおよび可溶性標的は、本発明

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

#### 【0128】

臨床試験または開発における使用を承認される多くの抗体およびFc融合体には、本発明のFc変異体により利点をもたらされ得る。本明細書中、これらの抗体およびFc融合体は、“臨床的製品および候補品”と称される。故に、好ましい態様において、本発明のFcポリペプチドは、臨床的製品および候補品の範囲で使用され得る。例えば、CD20を標的とする多くの抗体は、本発明のFcポリペプチドにより利点をもたらされ得る。例えば、本発明のFcポリペプチドは、リツキシマブ(Rituxan(登録商標)、IDEC/Genentech/Roche)(例えば、US5,736,137を参照のこと)、非ホジキンリンパ腫の処置に承認されたキメラ抗CD20抗体;Humax-CD20、現在Genmabにより開発されている抗CD20、US5,500,362に記載の抗CD20抗体、AME-133(Applied Molecular Evolution)、hA20(Immunomedics, Inc.)、HumalyM(Intracel)、およびPRO70769(PCT/US2003/040426、題名“Immunoglobulin Variants and Uses Thereof”)と実質的に類似する抗体に使用され得る。EGFR(ErbB-1)、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)を含む上皮細胞増殖因子受容体ファミリーのメンバーを標的とする多くの抗体は、本発明のFcポリペプチドにより利点をもたらされ得る。例えば、本発明のFcポリペプチドは、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標)、Genentech)(例えば、US5,677,171を参照のこと)と実質的に類似する抗体、乳癌の処置に承認されたヒト化抗Her2/neu抗体;Genentechにより現在開発されているペルツズマブ(rhumab-2C4、Omnitarg<sup>TM</sup>);US4,753,894に記載の抗Her2抗体;セツキシマブ(Erbix(登録商標)、Imclone)(US4,943,533;PCTWO96/40210)、様々な癌の臨床試験におけるキメラ抗EGFR抗体;Abgenix-Immunex-Amgenにより現在開発されているABX-EGF(US6,235,883);Genmabにより現在開発されているHumax-EGFr(US5,101,722,317);425、EMD55900、EMD62000、およびEMD72000(Merck KGaA)(US5,558,864;Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60;Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20;Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83);ICR62(Institute of Cancer Research)(PCTWO95/20045;Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46;Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53;Modjtahedi et al., 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35;Modjtahedi et al., 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80);TheraCIMhR3(YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba)(US5,891,996;US6,506,883;Mateo et al., 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81);mAb-806(Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2):639-44);KSB-102(KS Biomedix);MR1-1(IVAX, National Cancer Institute)(PCTWO0162931A2);ならびに、SC100(Scancell)(PCTWO01/88138)に使用され得る。

#### 【0129】

他の好ましい態様において、本発明のFcポリペプチドは、B細胞慢性リンパ性白血病の処置に現在承認されたヒト化モノクローナル抗体であるアレムツズマブ(Campath(登録商標)、Millenium)に使用され得る。本発明のFcポリペプチドは、Ortho Biotech/Johnson & Johnsonにより開発された抗CD3抗体であるムクモナブ-CD3(Orthoclone OKT3(登録商標))、IDEC/Schering AGにより開発された抗C

10

20

30

40

50

D 2 0 抗体であるイブリツモマブチウキセタン ( ibritumomab tiuxetan ) ( Z e v a l i n ( 登録商標 ) )、Celltech/Wyethにより開発された抗 C D 3 3 ( p 6 7 タンパク質 ) 抗体であるゲムツマブ・オゾガマイシン ( M y l o t a r g ( 登録商標 ) )、Biogenにより開発された抗 L F A - 3 F c 融合体であるアレファセプト ( A m e v i v e ( 登録商標 ) )、Centocor/Lillyにより開発されたアブシキマブ ( R e o P r o ( 登録商標 ) )、Novartisにより開発されたバシリキシマブ ( S i m u l e c t ( 登録商標 ) )、MedImmuneにより開発されたパリビズマブ ( S y n a g i s ( 登録商標 ) )、Centocorにより開発された抗 T N F アルファ抗体であるインフリキシマブ ( R e m i c a d e ( 登録商標 ) )、Abbottにより開発された抗 T N F アルファ抗体であるアダリムマブ ( H u m i r a ( 登録商標 ) )、Celltechにより開発された抗 T N F アルファ抗体である H u m i c a d e <sup>T M</sup>、Immunex/Amgenにより開発された抗 T N F アルファ F c 融合体であるエタネルセプト ( E n b r e l ( 登録商標 ) )、Abgenixにより開発されている抗 C D 1 4 7 抗体である A B X - C B L、Abgenixにより開発されている抗 I L 8 抗体である A B X - I L 8、Abgenixにより開発されている抗 M U C 1 8 抗体である A B X - M A 1、Antisomaにより開発中の抗 M U C 1 抗体である P e m t u m o m a b ( R 1 5 4 9、9 0 Y - m u H M F G 1 )、Antisomaにより開発されている抗 M U C 1 抗体である T h e r e x ( R 1 5 5 0 )、Antisomaにより開発されている A n g i o M a b ( A S 1 4 0 5 )、Antisomaにより開発されている H u B C - 1、Antisomaにより開発されている T h i o p l a t i n ( A S 1 4 0 7 )、Biogenにより開発されている抗アルファ - 4 - ベータ - 1 ( V L A - 4 ) およびアルファ - 4 - ベータ - 7 抗体であるアンテグレン ( 登録商標 ) ( ナタリズマブ )、Biogenにより開発されている抗 V L A - 1 インテグリン抗体である V L A - 1 m A b、Biogenにより開発されている抗リンホトキシンベータ受容体 ( L T B R ) 抗体である L T B R m A b、Cambridge Antibody Technologyにより開発されている抗 T G F - 2 抗体である C A T - 1 5 2、Cambridge Antibody TechnologyおよびAbbottにより開発されている抗 I L - 1 2 抗体である J 6 9 5、Cambridge Antibody TechnologyおよびGenzymeにより開発されている抗 T G F 1 抗体である C A T - 1 9 2、Cambridge Antibody Technologyにより開発されている抗エオタキシン 1 抗体である C A T - 2 1 3、Cambridge Antibody Technologyおよびhuman Genome Sciences Inc.により開発されている抗 B l y s 抗体である L y m p h o S t a t - B <sup>T M</sup>、Cambridge Antibody Technologyおよびhuman Genome Sciences, Inc.により開発されている抗 T R A I L - R 1 抗体である T R A I L - R 1 m A b、Genentechにより開発されている抗 V E G F 抗体であるアバスチン ( 商標 ) ( ペバシツマブ、r h u M A b - V E G F )、Genentechにより開発されている抗 H E R 受容体ファミリー抗体、Genentechにより開発されている抗組織因子抗体である抗組織因子 ( A T F )、Genentechにより開発されている抗 I g E 抗体である X o l a i r <sup>T M</sup> ( オマリズマブ )、GenentechおよびXomaにより開発されている抗 C D 1 1 a 抗体である R a p t i v a <sup>T M</sup> ( エファリズマブ )、GenentechおよびMillenium Pharmaceuticalsにより開発されている M L N - 0 2 抗体 ( 以前は、L D P - 0 2 )、Genmabにより開発されている抗 C D 4 抗体である H u M a x C D 4、GenmabおよびAmgenにより開発されている抗 I L 1 5 抗体である H u M a x - I L 1 5、

【 0 1 3 0 】

GenmabおよびMedarexにより開発されている H u M a x - I n f l a m、GenmabおよびMedarexおよびOxford GcoSciencesにより開発されている抗ヘパラナーゼ I 抗体である H u M a x - C a n c e r、GenmabおよびAmgenにより開発されている H u M a x - L y m p h o m a、Genmabにより開発されている H u M a x - T A C、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されている I D E C - 1 3 1 および抗 C D 4 0 L 抗体、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されている抗 C D 4 抗体である I D E C - 1 5 1 ( クレノリキシマブ ( Clenoliximab ) )、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されている抗 C D 8 0 抗体である I D E C - 1 1 4、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されている抗 C D 2 3 である I D E C - 1 5 2、IDEC Pharmaceuticalsにより開発されている抗マクロファージ遊走因子 ( M I F ) 抗体、Imcloneにより開発されている抗イディオタイプ抗体である B E C 2、Imcloneにより開発さ

れている抗KDR抗体であるIMC-1C11、Imcloneにより開発されている抗flk-1抗体であるDC101、Imcloneにより開発されている抗VEカドヘリン抗体、Immunomedicsにより開発されている抗癌胎児性抗原(CEA)抗体であるCEA-Cide<sup>T</sup>M(ラベツズマブ(labetuzumab))、Immunomedicsにより開発されている抗CD22抗体であるLymphoCide<sup>T</sup>M(エブラツズマブ)、Immunomedicsにより開発されているAFP-Cide、Immunomedicsにより開発されているMyelomaCide、Immunomedicsにより開発されているLkoCide、Immunomedicsにより開発されているProstaCide、Medarexにより開発されている抗CTLA4抗体であるMDX-010、Medarexにより開発されている抗CD30抗体であるMDX-060、Medarexにより開発されているMDX-070、Medarexにより開発されているMDX-018、MedarexおよびImmuno-Designed Moleculesにより開発されているOsidem<sup>T</sup>M(IDM-1)および抗Her2抗体、MedarexおよびGenmabにより開発されている抗CD4抗体であるHuMax<sup>T</sup>M-CD4、MedarexおよびGenmabにより開発されている抗IL15抗体であるHuMax-IL15、MedarexおよびCentocor/J&Jにより開発されている抗TNF抗体であるCNTO148、Centocor/J&Jにより開発されている抗サイトカイン抗体であるCNTO1275、MorphoSysにより開発されている抗細胞間接着分子-1(ICAM-1)(CD54)抗体であるMOR101およびMOR102、MorphoSysにより開発されている抗線維芽細胞増殖因子受容体3(FGFR-3)抗体であるMOR201、Protein Design Labsにより開発されている抗CD3抗体であるNuviion(登録商標)(ビシリズマブ)、Protein Design Labsにより開発されている抗ガンマインターフェロン抗体であるHuZAF<sup>T</sup>M、Protein Design Labsにより開発されているAnti-51インテグリン、Protein Design Labsにより開発されている抗IL-12、Xomaにより開発されている抗Ep-CAM抗体であるING-1、ならびにXomaにより開発されている抗ベータ2インテグリン抗体であるMLN01(本段落中、上記の引用文献は全て、参照により明確に本明細書中に包含される)を含むが、それらに限定されない、他の臨床製品および候補品と実質的に類似する様々な抗体またはFc融合体に使用され得る。

#### 【0131】

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

#### 【0132】

1つの態様において、本発明のFcポリペプチドは、自己免疫性疾患、炎症性疾患の処置、または移植適用に使用される。かかる疾患に関係のある標的抗原および臨床的製品および候補には、LDP-02のような抗47インテグリン抗体、LDP-01のような抗ベータ2インテグリン抗体、5G1.1のような抗補体(C5)抗体、BTI-322のような抗CD2抗体、MED1-507、OKT3のような抗CD3抗体、SMART抗CD3、IDEC-151のような抗CD4抗体、MDX-CD4、OKT4A、抗CD11a抗体、IC14のような抗CD14抗体、抗CD18抗体、IDEC152のような抗CD23抗体、ゼナックスのような抗CD25抗体、5c8のような抗CD40L抗体、Antova、IDEC-131、MDX-33のような抗CD64抗体、IDEC-114のような抗CD80抗体、ABX-CBLのような抗CD147抗体、CDP850のような抗Eセレクトリン抗体、Reopro/Abciximaのような抗gpIIb/IIIa抗体、ICM3のような抗ICAM-3抗体、VX-740のような抗ICE抗体、MDX-33のような抗FcR1抗体、rhumab-E25のような抗IgE抗体、SB-240683のような抗IL-4抗体、SB-240563のような抗IL-5抗体、SCH55700、ABX-IL8のような抗IL-8抗体、抗インターフェロンガンマ抗体、CDP571のような抗TNF(TNF、TNFa、TNFa、TNF-アルファ)抗体、CDP870、D2E7、インフリキシマブ、MAK-19

5 F ならびにアンテグレンのような抗 V L A - 4 抗体が含まれるが、それらに限定されない。

【 0 1 3 3 】

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

10

【 0 1 3 4 】

いくつかの態様において、感染症に対する抗体を用いる。真核細胞に対する抗体には、出芽酵母、メタノール資化性酵母（*Hansenula polymorpha*）、乳糖資化性酵母（*Kluyveromyces fragilis* および *K. lactis*）、メタノール資化性酵母（*Pichia guillermondii* および *P. pastoris*）、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）、およびアルカン資化性酵母（*Yarrowia lipolytica*）を含むが、これらに限定されない酵母細胞を標的とする抗体が含まれる。

【 0 1 3 5 】

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

20

【 0 1 3 6 】

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

30

【 0 1 3 7 】

バチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）を含むバチルス属；ビブリオ属、例えば、コレラ菌（*V. cholerae*）；エッシェリキア属（*Escherichia*）、例えば、毒素性大腸菌（*Enterotoxigenic E. coli*）；シゲラ属（*Shigella*）、例えば、赤痢菌（*S. dysenteriae*）；サルモネラ属、例えば、チフス菌（*S. typhi*）；マイコバクテリウム属（*Mycobacterium*）、例えば、結核菌（*M. tuberculosis*）、ハンセン菌（*M. leprae*）；クロストリジウム属、例えば、ボツリヌス菌、破傷風菌（*C. tetani*）、クロストリジウム・ディフィシル（*C. difficile*）、ウェルシュ菌（*C. perfringens*）；コリネバクテリウム属（*Corynebacterium*）、例えば、ジフテリア菌（*C. diphtheriae*）；連鎖球菌（*Streptococcus*）、化膿連鎖球菌（*S. pyogenes*）、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）；ブドウ球菌、例えば、黄色ブドウ球菌；ヘモフィルス属、例えば、インフルエンザキーン；ナイセリア属（*Neisseria*）、例えば、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）、淋菌（*N. gonorrhoeae*）；エルシニア属（*Yersinia*）、例えば、エルシニア・ランブル（*Y. lamblia*）、ペスト菌（*Y. pestis*）；シュードモナス属、例えば、緑膿菌、シュードモナス・プチダ（*P. putida*）；クラミジア属、例えば、クラミジアトラコマチス（*C. trachomatis*）；ボルデテラ属、例えば、百日咳菌（*B. pertussis*）；トレポネーマ属、例えば、梅毒トレポネーマ（*T. Palladium*）；炭疽菌（*B. anthracis*）、ペスト菌（*Y. pestis*）、ブルセラ種、野兔病菌（*F. tularensis*）、鼻疽菌（*B. mallei*）、類鼻疽菌（*B. pseudomallei*）、クロストリジウム・

40

50

ボツリナム、サルモネラ種、ビブリオ菌毒素 B (SEB *V. cholerae* toxin B)、大腸菌 O157:H7、リステア種、トリコスポロン菌 (*Trichosporon beigellii*)、ロドトウラ種 (*Rhodotorula species*)、凝集性酵母 (*Hansenula anomala*)、エンテロバクター種 (*Enterobacter sp.*)、クレブシエラ種 (*Klebsiella sp.*)、リステリア種 (*Listeria sp.*)、マイコプラズマ種 (*Mycoplasma sp.*) などを含むが、これらに限定されない、病原性および非病原性の原核生物のような適する細菌に対する抗体を含む、原核抗原に対する抗体はまた、有用である。

#### 【0138】

いくつかの局面において、抗体は、ウイルス感染に向けられる；これらのウイルスには、オルソミクソウイルス (*orthomyxoviruse*) (例えば、インフルエンザウイルス)、パラミキソウイルス (*paramyxoviruse*) (例えば、呼吸器多核体ウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス)、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、トガウイルス (例えば、風疹ウイルス (*rubella virus*))、パルボウイルス、ポックスウイルス (例えば、痘瘡ウイルス (*variola virus*))、ワクシニアウイルス)、エンテロウイルス (例えば、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス)、肝炎ウイルス (A、B および C を含む)、ヘルペスウイルス (例えば、単純ヘルペスウイルス、水痘瘡ウイルス (*varicella zoster virus*))、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス)、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、ハンタウイルス、アレナウイルス、ラブドウイルス (例えば、狂犬病ウイルス (*rabies virus*))、レトロウイルス (HIV、HTLV I および II を含む)、パポバウイルス (例えば、パピローマウイルス)、ポリオーマウイルス、ならびにピコルナウイルスなどが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0139】

##### 最適化 IgG 変異体特性

本発明はまた、様々な治療的に関連のある特性について最適化される IgG 変異体を提供する。1個以上の最適化特性を示すように組み込まれるまたは予測される IgG 変異体は、本明細書中、“最適化 IgG 変異体”と称される。最適化され得る最も好ましい特性には、FcRn に対する増大または減少した親和性、および増加または減少したインビボ半減期が含まれるが、これらに限定されない。適する態様には、低 pH、例えばエンドソームと関係する pH、例えば pH 6.0 にて FcRn に対して増加した結合親和性を示すが、一方、抗 pH、例えば 7.4 にて対応する増加した結合親和性を示さず、エンドソーム中により取り込まれ得るが、放出速度は通常通りである抗体が含まれる。同様に、修飾された FcRn 結合を有するこれらの抗体は、所望により U.S.S.N 11/174,287、11/124,640、10/822,231、10/672,280、10/379,392、および出願番号第 \_\_\_\_\_ 号を有する 2005 年 10 月 21 日出願の発明の名称「IgG Immunoglobulin variants with optimized effector function」の特許出願に概略を説明する通り、修飾された FcR 結合のような他の所望の特性を有し得る。すなわち、最適化特性にはまた、FcR に対する増加または減少した親和性が含まれるが、それに限定されない。1つの任意の態様において、IgG 変異体は、FcRn 結合プロフィールに加えて、ヒト活性化 FcR、好ましくは FcRIIIa に対する増加した親和性を有するように最適化される。さらに他の任意の別の態様において、IgG 変異体は、ヒト阻害性受容体 FcRIIb に対して減少した親和性を有するように最適化される。すなわち、特定の態様は、FcRn に対する増加した結合、および FcRIIIa に対する増加した結合を示す抗体の使用を包含する。他の態様は、FcRn に対する増加した結合、および FcRIIIa に対する増加した結合を示す抗体の使用を利用する。これらの態様は、ヒトにおける増大した治療特性、例えば増大したエフェクター機能およびより大きな抗癌効果を有する IgG ポリペプチドを提供することが予想される。別の態様において、IgG 変異体は、FcRn に対する増加または減少した親和性、および FcRI、FcRIIIa、FcRIIb、FcRIIIc、FcRIIIa、および FcRIIIb を含むが、これらに限定されないヒト FcR (それらのアレル変異体を含む) に対する増加または減少した親和性を有するように最適化され

10

20

30

40

50

る。これらの態様は、ヒトにおける増強された治療特性、例えば増加した血清半減期および減少したエフェクター機能を有するIgGポリペプチドを提供することが予定される。他の態様において、IgG変異体は、FcRnに対して増大した親和性、および1個以上のFcRに対して増大した親和性を提供するが、1個以上の他のFcRに対して減少した親和性を提供する。例えば、IgG変異体は、FcRnおよびFcRIIIaに対して増大した結合を有し得るが、FcRIIbに対して減少した結合を有し得る。あるいは、IgG変異体は、FcRnおよびFcRに対して減少した結合を有し得る。他の態様において、IgG変異体は、FcRnに対して減少した親和性、およびFcRIIbに対して増大した親和性を有し得るが、1個以上の活性化FcRに対して減少した親和性を有し得る。さらに他の態様において、IgG変異体は、増加した血清半減期および減少したエフェクター機能を有し得る。

10

## 【0140】

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

20

## 【0141】

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

30

## 【0142】

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

40

## 【0143】

使用され得るIgG変異体には、増大した活性化FcRおよび/または抑制性FcRに対する減少した親和性を有するFcRnに対する増大した親和性を提供するIgG変異体が含まれる。いくつかの標的および適応症について、異なる活性化FcRに対する異なる選択性を提供するIgG変異体を利用することは、さらに効果的であり得る；例え

50

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

10

## 【0144】

修飾は、IgG安定性、溶解性、機能性、または臨床用途を改善するために行われ得る。好ましい態様において、IgG変異体は、ヒトにおける免疫原性を減少するための修飾を含み得る。最も好ましい態様において、IgG変異体の免疫原性を、USSN11/004,590(参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載の方法を用いて減少させる。別の態様において、IgG変異体は、ヒト化される(Clark, 2000, Immunol Today 21:397-402、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

20

## 【0145】

IgG変異体は、免疫原性を減少する修飾を含み得る。免疫原性を減少する修飾には、親配列からMHCタンパク質に誘導された処理ペプチドの結合を減少する修飾が含まれ得る。例えば、アミノ酸修飾は、どんな一般的なMHCアレルにも高親和性で結合することが予測される免疫エピトープがないか、またはそれが最小数となるように、作製されるだろう。タンパク質配列中のMHC結合エピトープを同定するいくつかの方法が、当技術分野で公知であり、IgG変異体中のエピトープを数えるために用い得る。例えば、WO98/52976; WO02/079232; WO00/3317; USSN09/903,378; USSN10/039,170; USSN60/222,697; USSN10/754,296; PCTWO01/21823; および、PCTWO02/00165; Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432 - 439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: 942 - 948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555 - 561; WO 98/59244; WO 02/069232; WO 02/77187; Marshall et al., 1995, J. Immunol. 154: 5927 - 5933; and Hammer et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 2353 - 2358(全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を参照のこと。配列に基づく情報は、所定のペプチド-MHC相互作用の結合スコアを決定するために用い得る(例えば、Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432 - 439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: p942 - 948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555 - 561を参照のこと、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。

30

40

## 【0146】

## IgG変異体の作製

本発明の変異体を、様々な手段で設計することができる。本明細書に記載の通り、変異とは、挿入、欠失、置換、他の修飾、またはこれらの組み合わせおよび他の変化であり得る。本発明の特定の新しい態様は、FcポリペプチドのFcリガンドへの結合を改善または減少する挿入または欠失の設計である。本明細書に記載の通り、挿入または欠失は、FcポリペプチドのFcRnに対する親和性を増加または減少するように作製され得る。挿

50

入および欠失は、合理的な方法により、または無作為または半無作為のライブラリー作製またはスクリーニングのような、使用または無作為要素を含む方法により、設計され得る。別の態様において、置換とは、FcポリペプチドのFcRnへの親和性を増加または減少することを開示する。

#### 【0147】

挿入および欠失

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

10

#### 【0148】

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

20

#### 【0149】

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

30

#### 【0150】

アミノ酸配列中、Fc結合相互作用に影響するが、Fcポリペプチドの全体構造、安定性、発現または使用に影響しない挿入または欠失に好ましい位置は、Fc/Fc-結合パートナー相互作用に關与するループ中である。FcポリペプチドへのFcRn結合を改変するために、244-257位、279-284位、307-317位、383-390位、および428-435位が、挿入または欠失のループ位置として好ましい(KabaraのE.U. Indexによる番号、Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379 - 383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867 - 877、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)。FcポリペプチドへのFcガンマ受容体結合を改変するために、229-239位、266-273位、294-299位、および324-331位が、挿入または欠失のループ位置として好ましい(KabaraのE.U. Indexによる番号、PDB code 1E4K.pdb S ondermann et al. Nature. 2000 406:267、全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ループは、アルファヘリックスまたはベータシート構造に關与しないポリペプチドの領域である。ループ位置は、アルファヘリックスまたはベータ構造のどちらでもない位置である(van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, Chapter 1 pp2 - 67、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。ループ位置は、骨格原子が、典型的に、アルファヘリックスおよびベ

40

50

ータシートの骨格原子と比較して、よりフレキシブルまたは水素結合にあまり関与しないために、好ましい。それ故に、1個以上のアミノ酸の挿入または欠失によるループの伸張または短縮は、安定性、発現または他の問題を含む、Fcポリペプチドの大きな破壊的変化をもたらす可能性は少ない。

#### 【0151】

挿入および欠失は、ポリペプチドの長さを変えるために用いることができる。例えば、ループ領域中、ループの長さの変化は、ループの変化したフレキシビリティおよび立体配置エントロピーをもたらす。ループ中の挿入は、一般的に、ループの立体配置エントロピーを増加し得、それは、Boltzmann定数と可能性のある立体配置の数の自然対数を乗じて定義され得る (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, pp78、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。少なくとも1個のアミノ酸のポリペプチドへの挿入により、ポリペプチドが利用可能な立体配置の全体数は増加する。これらのさらなる立体配置は、Fcポリペプチドが、Fc結合タンパク質を結合するさらなる立体構造の1つを利用し得るため、好ましいFc/Fc-結合パートナー相互作用を形成するのに有益であり得る。この場合において、挿入は、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の強化をもたらし得る。さらなる立体配置が、結合表面に用いられないとき、挿入は、該さらなる立体配置が、結合に適する立体配置と競合するかもしれないため、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の弱化をもたらし得る。同様に、ポリペプチド断片の欠失はまた、Fc/Fc結合-パートナー相互作用の強化または弱化のどちらかをもたらし得る。骨格構造の数の可能性を減少する断片の欠失が、結合に適する立体配置を排除するとき、欠失は、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の弱化をもたらし得る。欠失が、結合に適する立体配置を排除しないとき、欠失は、該欠失が、結合に適する立体配置と競合する立体配置を排除し得るため、Fc/Fc-結合パートナー相互作用の強化をもたらし得る。

#### 【0152】

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

#### 【0153】

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

10

20

30

40

50

参照断片（図7中、L1からL4）は、Fcポリペプチド中、1個または2個以上のアミノ酸であり得る。

【0154】

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

【0155】

挿入または欠失は、ループ、アルファヘリックス、およびベータシート領域を含む、Fcポリペプチドのいずれかの領域で用いることができる。挿入および欠失に好ましい位置には、アルファヘリックスまたはベータシート領域ではないループ領域が含まれる。ループは、それらが、一般的に、アルファヘリックスまたはベータシートよりも骨格において変更を受けるため、好ましい。タンパク質/タンパク質相互作用の強化をもたらす挿入または欠失に特に好ましい位置は、ループのN末端またはC末端である。ループ側鎖が、Fc/Fc-結合パートナー相互作用に関与するとき、末端での挿入または欠失は、結合相互作用における大きな不利益な変化をもたらしにくい。ループの正確な中心内の欠失は、Fc/Fc-結合パートナー結合部分における重要な残基の除去をもたらしやすく、ループの正確な中心内の挿入は、Fc/Fc-結合パートナー結合部分における好ましくない相互作用を作製しやすい。欠失または挿入される残基の数は、望まれる骨格変化のサイズにより決定され得、例えば、15個未満の残基の挿入または欠失が好ましく、10個未満の残基の挿入または欠失がより好ましく、5個未満の残基の挿入または欠失が最も好ましい。

【0156】

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

【0157】

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

【0158】

挿入はまた、挿入されたポリペプチドが、Fc/Fc-結合パートナー結合の強化が望ましいとき、望まれ得るため、Fc-結合パートナーと好ましい相互作用を作製するように設計され得る、別のフレキシビリティを有する。骨格挿入の長さは、挿入すべき単純な一般的配列を有する変異体骨格をモデル化することにより決定することができる。例えば、異なる長さのポリセリン、ポリグリシンまたはポリアラニン挿入が、構築およびモデル化され得る。モデル化は、挿入を含む相同体の公知の三次元構造に基づく相同性モデリングを含む様々な方法により、およびMODELER (M.A. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000) およびROSETTA (Kuhlman et al. (2003). Science 302, 1364-8) (両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を含むコンピューターによるモデリングにより行われ得る。典型的に、様々な骨格構造は、初めに作製され、最終的な骨格構造は、側鎖の同一性が確立された後に決定され得る。側鎖は、PDA (登録商標) アルゴリズム (US 6, 188, 965; 6, 269, 312; 6, 403, 312; 6, 801, 861; 6, 804, 611; 6, 792, 356; 6, 950, 754、およびUSSN 09/782, 004; 09/927, 790; 10/101, 499; 10/666, 307; 10/666311; 10

10

20

30

40

50

/ 218, 102、全て参照によりその全体が本明細書中に包含される)により設計され得る。

#### 【0159】

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

10

#### 【0160】

変異体を含むポリペプチド

IgG変異体は、ヒトIgG配列に基づいてよく、故に、ヒトIgG配列は、他の配列が比較される、他の生物、例えばげっ歯動物および霊長類由来の配列を含むが、それらに限定されない“ベース”配列として用いられる。IgG変異体はまた、IgA、IgE、IgD、IgMなどのような他の免疫グロブリンクラス由来の配列を含み得る。IgG変異体が、ある親IgGに関して作製されるが、該変異体は、別の、第二の親IgGに関して作製または“転換”され得ることが考慮される。これは、一般的に、IgGの配列間の配列または構造同一性に基づき、第一および第二のIgG間の“等価”または“対応する”残基および置換基を決定することにより行われる。相同性を確立するために、本明細書に概説する第一のIgGのアミノ酸配列を、第二のIgGの配列と直接比較する。アライメントを維持するために必要な挿入および欠失を考慮し(すなわち、任意の欠失および挿入による保存残基の除去を避けて)、当技術分野で公知の1個以上の相同性アライメントプログラムを用いて(例えば、種間で保存された残基を用いて)配列をアライメント後、第一のIgG変異体の初めの配列において特定のアミノ酸と等価の残基が定義される。保存残基のアライメントは、好ましくはかかる残基の100%を保存すべきである。しかしながら、保存残基の75%以上またはわずか50%程度のアライメントも、等価残基を定義するのに適する。等価残基はまた、構造が決定されているIgGの三次構造レベルで、第一および第二IgG間の構造的相同性を決定することにより定義され得る。この場合に、等価残基は、親または前駆体の特定のアミノ酸残基の2個以上の主鎖原子(NとN、CAとCA、CとCおよびOとO)の原子座標が、アライメント後、0.13nm以内、好ましくは0.1nmであると定義される。アライメントは、ベストモデルが、タンパク質の非水素タンパク質原子の原子座標の最大重複を与えるような方向および位置付けされた後、得られる。等価または対応する残基をどのように決定するかに関わらず、かつIgGが作製される親IgGの同一性に関わらず、伝えられるべきであるとされていることは、見出されたIgG変異体を、重要な配列またはIgG変異体と構造的相同性を有する何れかの第二の親IgGに改変することができることである。故に、例えば、変異体抗体を、上記の方法または等価残基を決定するための他の方法を用いることにより作製するとき(ここで、親抗体はヒトIgG1である。)、変異体抗体は、異なる抗原と結合する別のIgG1親抗体、ヒトIgG2親抗体、ヒトIgA親抗体、マウスIgG2aまたはIgG2b親抗体などに改変され得る。さらに、上記の通り、親IgG変異体においては、IgG変異体を他の親IgGに転換する能力に影響しない。

20

30

40

#### 【0161】

IgG変異体を作製、産生およびスクリーニングするための方法を提供する。記載の方法は、何れかの特定の用途または操作理論にとらわれることを意味しない。むしろ、提供される方法は、一般的に、1個以上のIgG変異体が、最適化されたエフェクター機能を有するIgG変異体を実験的に得るために、作製、産生、およびスクリーニングされ得ることを説明することを意図する。様々な方法が、抗体の設計、産生、および試験、ならび

50

にタンパク質変異体について、U S S N 1 0 / 7 5 4 , 2 9 6、およびU S S N 1 0 / 6 7 2 , 2 8 0 (両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載される。

【0162】

様々なタンパク質作製方法が、最適化したエフェクター機能を有するI g G変異体を設計するために用いられ得る。1つの態様において、構造に基づく作製方法を用いることができ、ここで利用可能な構造情報を、置換、挿入または欠失を誘導するために用いる。好ましい態様において、コンピューターを用いたスクリーニング法を用いることができ、ここで置換を、コンピューターによる計算においてそれらのエネルギー的適合に基づき設計する。例えばU S S N 1 0 / 7 5 4 , 2 9 6およびU S S N 1 0 / 6 7 2 , 2 8 0、なら

10

【0163】

配列のアライメントを、表示の位置での置換を誘導するために用いることができる。当業者は、配列情報の使用が、タンパク質構造に有害な可能性のある置換の導入を阻止し得ることを理解するだろう。配列の源は、様々であってよく、Kabatデータベース(Northwestern University); Johnson & Wu, 2001, Nucleic Acids Res. 29:205 - 206; Johnson & Wu, 2000, Nucleic Acids Res. 28:214 - 218)、I M G Tデータベース(I M G T、the international ImMunoGeneTics information system(登録商標); Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27:209 - 212; Ruiz et al., 2000 Nucleic Acids Res. 28:2

20

19 - 221; Lefranc et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29:207 - 209; Lefranc et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31:307 - 310)、およびV B A S E (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を含むが、これらに限定されない、1個以上の公知のデータベースを含む。抗体配列情報を、哺乳動物を含むが、これに限定されない何れかの生物由来の、生殖細胞系配列または天然に生じる抗体の配列の配列アライメントから得る、蓄積する、および/または作製することができる。当業者は、ヒトまたは実質的にヒトである配列の使用が、ヒトに投与するとき、あまり免疫原性ではないという利点をさらに有し得ることを理解するだろう。より一般的な核酸またはタンパク質データベース、すなわち、特に抗体というわけではない他のデータベースには、SwissProt、GenBank、Entrez、およびEMBLヌクレオチド配列データベースが含まれるが、これらに限定されない。整列配列には、V H、V L、C H、および/またはC L配列が含まれ得る。当技術分野で公知の多数の配列に基づくアライメントプログラムおよび方法が存在し、これらは全て、配列アライメントの作製における使用できる。

30

【0164】

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

40

【0165】

I g G変異体の作製およびスクリーニング方法は、当技術分野で公知である。抗体分子生物学、発現、精製、およびスクリーニングのための一般的方法は、Antibody Engineering、Duebel & Kontermann編集、Springer - Verlag, Heidelberg, 2001; および、Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683 - 689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339 - 76に記載される。また、U S S N 1 0 / 7 5 4 , 2 9 6; U S S N 1 0 / 6 7 2 , 2 8 0; および、U S S N 1 0 / 8 2 2 , 2 3 1; ならびに、1 1 / 1 2 4 , 6 2 0 (全て、参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載の方

50

法を参照のこと。

【0166】

本発明の好ましい変異体には、図8に見られるものが含まれる。あるいは、本発明の好ましい変異体には、図9に見られるものが含まれる。さらに、あるいは、本発明の好ましい変異体には、図10に見られるものが含まれる。本発明の特に好ましい変異体には、G385HおよびN434Yが含まれる。本発明の最も好ましい変異体には、257C、257M、257L、257N、257Y、279Q、279Y、308Fおよび308Yが含まれる。

【0167】

I g G 変異体の作製

I g G 変異体を、当技術分野で公知の何れかの方法により作製することができる。1つの態様において、I g G 変異体配列を、メンバー配列をコードし、それ故に、要すれば宿主細胞中にクローニングされ、発現され、そして分析され得る核酸を作製するために用いる。これらの実施を、公知の方法、およびMolecular Cloning - A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)、およびCurrent Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) (両方とも、参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載の、使用され得る様々な方法を用いて行う。I g G 変異体をコードする核酸を、タンパク質を発現するために、発現ベクター中に挿入することができる。発現ベクターは、典型的に、作動可能に連結した、すなわち、機能的に關係して挿入されたタンパク質を、制御または調節配列、選択可能マーカー、何れかの融合パートナー、および/またはさらなる要素と共に含む。I g G 変異体は、タンパク質の発現を誘導または引き起こすのに適当な条件下で、I g G 変異体をコードする核酸を含む、核酸、好ましくは発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養することにより作製され得る。哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞および酵母を含むが、これらに限定されない多様な適当な宿主細胞を、用いることができる。例えば、使用され得る多様な細胞系は、ATCC細胞系カタログ(American Type Culture Collectionにより利用可能、参照によりその全体が本明細書中に包含される)に記載される。宿主細胞中に外来の核酸を導入する方法は、当技術分野で公知であり、用いる宿主細胞により異なり得る。

10

20

【0168】

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

30

40

【0169】

I g G 変異体のスクリーニング

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

【0170】

好ましい態様において、I g G 変異体の機能的および/または生物物理的特徴を、インビトロ分析においてスクリーニングする。好ましい態様において、タンパク質を、機能的

50

、例えばその反応を触媒する能力またはその標的に対するその結合親和性についてスクリーニングする。結合分析を、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動法）およびBRET（生物発光共鳴エネルギー移動法）に基づく分析、AlphaScreen<sup>TM</sup>（増幅ルミネセンス近接ホモジニアスアッセイ法）、シンチレーション近接分析、ELISA（酵素免疫測定法）、SPR（表面プラズモン共鳴、BIAcore（登録商標）としても公知）、等温滴定熱量計、示差走査熱量計、ゲル電気泳動法、およびゲルろ過法を含むクロマトグラフィー法を含むが、これらに限定されない当該技術分野で公知の様々な方法を用いて行うことができる。これらおよび他の方法は、いくつかの融合パートナーまたは標識を利用し得る。分析には、発色標識、蛍光標識、発光標識、または同位体標識を含むが、これらに限定されない多様な検出方法を用いることができる。タンパク質の生物物理的特徴、例えば安定性および溶解性は、当該技術分野で公知の様々な方法を用いてスクリーニングすることができる。タンパク質の安定性を、折りたたみ状態と非折りたたみ状態の間の熱力学的平衡を測定することにより決定し得る。例えば、IgG変異体は、化学的変性剤、熱、またはpHを用いて非折りたたみ状態にでき、この遷移を、円偏光二色性分光法、蛍光分光法、吸光度分光法、NMR分光法、熱量測定法、およびタンパク質分解法を含むが、これらに限定されない方法を用いて観察することができる。当業者に認められ得る通り、折りたたみおよび非折りたたみ遷移の動力学的パラメーターを、これらおよび他の技術を用いて観察することもできる。IgG変異体の溶解性および全体的な構造的完全性を、当該技術分野で公知の様々な方法を用いて定量的または定性的に決定することができる。IgG変異体の生物物理的性質を特徴付けるための使用され得る方法には、ゲル電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィーのようなクロマトグラフィー、質量分析法、紫外吸光度分光法、蛍光分光法、円偏光二色性分光法、等温滴定熱量計、示差走査熱量計、分析的超遠心分離法、動的光散乱、タンパク質分解法、および架橋法、濁度測定法、フィルター遅延分析（filter retardation assay）、免疫分析、蛍光色素結合分析、タンパク質染色分析、顕微鏡法、およびELISAまたは他の結合分析による会合体の検出が含まれる。X線結晶学的解析およびNMR分光法を用いる構造分析も、使用され得る。

10

20

30

40

#### 【0171】

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

#### 【0172】

タンパク質ライブラリーのスクリーニングにおいて使用され得る様々な選択方法が、当該技術分野で公知である。これらには、ファージ提示法（Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Kay et al., 1996, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30:10832 - 10838; Smith, 1985, Science 22

50



Nat Biotechnol 16:258 - 261 ; Shao et al., 1998, Nucleic Acids Res 26:681 - 683)、エキソヌクレアーゼにより仲介される遺伝子アセンブリー (US 6, 352, 842 ; US 6, 361, 974)、Gene Site Saturation Mutagenesis<sup>TM</sup> (US 6, 358, 709)、Gene Reassembly<sup>TM</sup> (US 6, 358, 709)、SCRATCHY (Lutz et al., 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248 - 11253)、DNA断片化法 (Kikuchi et al., Gene 236:159 - 167)、一本鎖DNAシャフティング (Kikuchi et al., 2000, Gene 243:133 - 137)、およびAMEシステム<sup>TM</sup> 定向進化タンパク質作工学技術 (Applied Molecular Evolution) (US 5, 824, 514 ; US 5, 817, 483 ; US 5, 814, 476 ; US 5, 763, 192 ; US 5, 723, 323) を含むが、それらに限定されない、IgG 変異体をスクリーニングするための方法において使用され得る多様な定向進化法が、当技術分野で公知である。本段落に引用される全ての参考文献は、参照によりその全体が本明細書中に包含される。

10

**【0175】**

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

20

30

40

**【0176】**

好ましい態様において、IgG 変異体の免疫原性は、1個以上の細胞に基づく分析法を

50

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

#### 【0177】

I g G変異体の生物学的特徴を、細胞、組織および生物全体の実験により特徴付けることができる。当技術分野で公知の通り、薬剤をしばしば、疾患または疾患モデルに対する処置のための薬剤の効果を測定するため、または薬剤の薬物動態、毒性および他の特性を測定するために、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタおよびサルを含むが、これらに限定されない動物において試験する。動物は、疾患モデルと称され得る。治療剤をしばしば、ヌードマウス、S C I Dマウス、異種移植マウス、および遺伝子組み換えマウス（ノックインおよびノックアウトを含む）を含むが、これらに限定されないマウスにおいて試験する。かかる実験は、治療剤として用いられるタンパク質の可能性を決定するための意味のあるデータを提供することができる。何れかの生物、好ましくは哺乳動物を、試験に用いることができる。例えばヒトに遺伝的に類似するため、サルを適する治療モデルとすることができ、故に、I g Gの効果、毒性、薬物動態、または他の特性を試験するために用いることができる。ヒトにおける試験が、最終的に、薬剤としての承認に必要であり、故に、もちろんこれらの実験が意図される。従って、I g Gをヒトにおいて試験し、その治療効果、毒性、免疫原性、薬物動態、および/または他の臨床特性を決定し得る。

#### 【0178】

##### I g G変異体の使用方法

I g G変異体は、様々な製品として使用され得る。1つの態様において、I g G変異体は、治療剤、診断剤、または実験試薬であり、好ましくは治療剤である。I g G変異体は、モノクローナルまたはポリクローナルである抗体組成物において使用され得る。好ましい態様において、I g G変異体を、標的抗原を有する標的細胞、例えば癌細胞を殺すために使用する。別の態様において、I g G変異体を、標的抗原を阻止、アンタゴナイズまたはアゴナイズするため、例えばサイトカインまたはサイトカイン受容体をアンタゴナイズするために用いる。別の好ましい態様において、I g G変異体を、標的抗原を阻止、アンタゴナイズまたはアゴナイズするため、標的抗原を有する標的細胞を殺すために用いる。

#### 【0179】

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

#### 【0180】

1つの態様において、I g G変異体は、患者に投与される唯一の治療的活性剤である。あるいは、I g G変異体を、細胞毒性薬、化学療法剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホ

10

20

30

40

50

ルモン剤、キナーゼ阻害剤、血管形成阻害剤、心臓保護剤、または他の治療剤を含むが、それらに限定されない1個以上の他の治療剤と併用投与する。I g G変異体を、1個以上の他の治療レジメンと併用して投与し得る。例えば、I g G変異体を、化学療法、放射線治療、または化学療法と放射線治療の両方と共に、患者に投与し得る。1つの態様において、I g G変異体を、I g G変異体であるか、またはI g G変異体ではない1個以上の抗体と併用投与することができる。他の態様に従い、I g G変異体および1個以上の他の抗癌治療剤を、エキスピボで癌細胞の処置に用いる。かかるエキスピボ処置は、骨髄移植および特に、自家骨髄移植に有用であり得ると考えられる。もちろん、I g G変異体は、外科手術のような、さらに他の治療技術と組み合わせる用いることができると考えられる。

#### 【0181】

様々な他の治療剤が、I g G変異体との併用投与のために使用され得る。1つの態様において、I g Gを、血管形成阻害剤と併用投与する。本明細書で用いる“血管形成阻害剤”は、血管の発達を阻止、またはある程度妨げる化合物を意味する。抗血管形成因子は、例えば、血管形成の促進に関与する増殖因子または増殖因子受容体と結合する、小分子またはタンパク質、例えば抗体、Fc融合体もしくはサイトカインであり得る。本明細書中、好ましい抗血管形成因子は、血管内皮増殖因子(V E G F)と結合する抗体である。別の態様において、I g Gは、適応的免疫応答を誘導または増大する治療剤、例えばC T L A - 4を標的とする抗体と共に投与される。別の態様において、I g Gを、チロシンキナーゼ阻害剤と共に投与する。本明細書で用いる“チロシンキナーゼ阻害剤”は、チロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子を意味する。別の態様において、I g G変異体を、サイトカインと共に投与する。

#### 【0182】

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

#### 【0183】

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

#### 【0184】

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

10

20

30

40

50

の治療剤を、例えば小分子、他の生物学的製剤、放射線治療、外科手術などを含む、他の治療または治療剤と併用し得る。

【実施例】

【0185】

実施例

本発明を説明するために、以下に実施例を提供する。これらの実施例は、どんな特定の適用または操作理論にも本発明を制限することを意味しない。本発明で検討した全ての位置に関して、番号は、Kabatに記載のE U i n d e xに従う(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。抗体分野の当業者は、この決まりが、免疫グロブリンファミリーの保存された位置を参照して標準化し得る、免疫グロブリン配列の特定領域における不連続的番号からなることを理解するだろう。従って、E U i n d e xに定義される何れかの特定の免疫グロブリンの位置は、その連続的配列に対応する必要はない。

10

20

30

40

50

【0186】

実施例1：Fc変異体のDNA構築物、発現および精製

Fc変異体を、ヒトIgG1Fcドメインおよびトラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標)、Genentech)の可変ドメインを用いて構築した。Fcポリペプチドは、アレムツズマブ、トラスツズマブまたはAC10の一部であった。アレムツズマブ(Campath(登録商標)、Milleniumの登録商標)は、B細胞慢性リンパ性白血病の処置に現在認可されているヒト化モノクローナル抗体である(Hale et al., 1990, Tissue 抗原 35:118-127、参照によりその全体が本明細書中に包含される)。トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標)、Genentechの登録商標)は、転移性乳癌の処置のための抗HER2/neu抗体である。AC10は、抗CD30モノクローナル抗体である。ハーセプチン可変領域を、リカーシブPCRを用いて組み立てた。その後、この可変領域を、図11に示すpcDNA3.1/Zeo(+ )ベクター(Invitrogen)中にヒトIgG1と共にクローニングした。プラスミドを、One Shot TOP10大腸菌細胞(Invitrogen)中で増殖させ、Hi-Speed Plasmid Maxi Kit(Qiagen)を用いて精製した。プラスミドを、クローニングしたインサートの存在を確かめるために配列決定した。

【0187】

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

【0188】

重鎖遺伝子(VH-C1-C2-C3)(野生型または変異体)を含むプラスミドを、293T細胞中に、軽鎖遺伝子(VL-C)を含むプラスミドと共に共トランスフェクトした。培地を、トランスフェクションの5日後に集め、抗体を、タンパク質A親和性クロマトグラフィー(Pierce)を用いて上清から精製した。抗体濃度を、ピシンコニン酸(BCA)分析(Pierce)により決定した。

【0189】

実施例2：結合親和性測定

FcポリペプチドとFcリガンドの結合を、表面プラズモン共鳴(SPR)測定で分析した。表面プラズモン共鳴測定を、BIAcore 3000装置(BIAcore AB)を用いて行った。野生型または変異体抗体を、固定したタンパク質L(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を用いて捕捉し、受容体分析物との結合を測定した。タンパク質Lを、5ul/分の流速で、N-ヒドロキシスクシンイミド/N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド(NHS/EDC)を用いて、CM5センサーチップ上10mM酢酸ナトリウム、pH4.5中、1uMの濃度でCM5センサーチップと共有結合させた。各センサーチップのフローセル1を、結合のネガティブコントロールと

してNHS / EDCを用いた。泳動緩衝液は、0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005 % v/v界面活性剤P20 (HBS-EP, Biacore, Uppsala, Sweden)であり、チップ再生緩衝液は、10 mMグリシン-HCl pH 1.5であった。125 nMの野生型または変異体トラスツズマブ抗体を、1  $\mu$ l / 分に5分間、HBS-EP中タンパク質L CM5チップに結合させた。1から250 nMの連続希釈中で、FcRn-His-GST分析物であるHisタグおよびグルタチオンSトランスフェラーゼと融合したFcRnを、HBS-EP中、10  $\mu$ l / 分に20分間の結合、10分間の解離のために注入した。レゾナンスユニット (RU) で測定された応答を、ほぼ定常状態の結合を表す、受容体注入の1200秒後に得た。抗体および緩衝液を用いた1サイクルのみが、ベースライン応答を提供した。RU対1 / log濃度プロットを作製し、GraphPad Prismでの非線形回帰を用いてS字状の用量応答に合わせる。

#### 【0190】

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

#### 【0191】

実施例3：Fc変異体のFcRn結合特性。

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

#### 【0192】

競合的AlphaScreen<sup>TM</sup>データを、野生型抗体と比較して、pH 6.0でのFc変異体の相対的結合を測定するために収集した。競合的抗体の機能としてのAlphaScreen<sup>TM</sup>シグナルの例を、図12に示す。P257L、P257N、V279E、V279Q、V279Y、^281S、E283F、V284E、L306Y、T307V、V308F、およびQ311Vの12個の変異体の曲線を示し、各変異体曲線が、それらのボックス内で野生型曲線の左に遷移するとき、増加した親和性を証明する。本発明のFc変異体についての競合的AlphaScreen<sup>TM</sup>データを、図13および14にまとめる。野生型と比較した変異体の相対的FcRn結合を一覧にする。1以上の値は、野生型と比べてFc変異体とFcRnの改善された結合を証明する。例えば、変異体E283LおよびV284Eは、野生型よりもそれぞれ9.5倍および2.6倍強力な結合を有する。多くの変異体の表面プラズモン共鳴測定はまた、図15および16に示す通り

10

20

30

40

50

、 F c R n との増加した結合を示す。

【 0 1 9 3 】

2 5 7 位にて、イミノ酸、プロリンを除去し、骨格 N を有さない 1 個のアミノ酸を側鎖共有結合に置換する全ての変異体が、 F c ドメインをより自由にし、 F c R n とのより良好な結合を可能にするより大きなフレキシビリティを骨格に供する。特に、 2 5 7 位での L および N への変異体は、 p H 6 での F c R n 結合を強くし、 4 個の原子側鎖および側鎖のガンマ分岐パターンが、 F c ドメインを生産的にする、すなわち F c R n 相互作用を強くするのを助ける。 3 0 8 位は、 2 5 7 位と相互作用することを証明する。これらの位置の両方は、 F c / F c R n 相互作用に直接関係する H 3 1 0 と順に相互作用する ( 表 2 、 Burmeister et al (1994) Nature 372:379 - 383、参照によりその全体が本明細書中に包含される )。 F c 変異体 V 3 0 8 F および V 0 8 Y は、野生型よりも 2 . 9 倍および 4 . 3 倍増加した F c R n 親和性を有する ( 図 1 3 )。 2 7 9 位および 3 8 5 位は、変異体 V 2 7 9 E 、 V 2 7 9 Q および V 2 7 9 Y ならびに G 3 8 5 H および G 3 8 5 N ( 全て、より強い F c R n 相互作用を有する。 ) として F c R n と相互作用する。これらの変異体は全て、水素結合の可能なアミノ酸である。

10

【 0 1 9 4 】

F c 変異体 N 4 3 4 Y は、図 1 3 に示す通り、特に、 p H 6 . 0 にて F c R n との強い結合を有する。単一変異体 N 4 3 4 Y は、 1 6 倍増加した結合を有する。この変異体と他の修飾の組み合わせは、さらに強い結合をもたらした。例えば、 P 2 5 7 L / N 4 3 4 Y 、 ^ 2 8 1 S / N 4 3 4 Y 、 および V 3 0 8 F / N 4 3 4 Y は、 8 3 0 倍、 1 8 0 倍、お

20

【 0 1 9 5 】

実施例 4 : 挿入および欠失を組み込む変異体

F c / F c R n 相互作用の強さを変える挿入および欠失を構築し、様々な F c リガンドとのそれらの結合特性を測定した。残基 2 8 1 と 2 8 2 ( Kabat らの E U 番号を用いる ) の間に挿入した S e r 残基を有する F c 変異体を、 F c ドメインの F c R n 結合特性を増加するために設計した。この変異体は、特定の位置の後ろへの挿入を意味する “ ^ ” を含む、 ^ 2 8 1 S と称される。 2 個以上の残基であり得る挿入配列は、位置番号の後ろに供される。この F c 変異体を、本明細書に記載の方法を用いて、カップ I g G 1 抗体トラスツズマブ ( ハーセプチン ( 登録商標 ) 、 Genetech ) が構築された。残基 2 8 1 と 2 8 2 の間の挿入は、残基 2 8 1 の F c ループ残基 C 末端をループの C 末端方向へ移動させ、側鎖位置を変化させる。 2 8 2 位、 2 8 3 位、および 2 8 4 位での置換を含む F c 変異体は、このループの C 末端への移動が有益であることを示唆する ( 図 1 4 を参照のこと )。他の変異体である N 2 8 6 の欠失 ( しばしば、 N 2 8 6 # と称される。 ) をまた、この F c R n 結合ループの位置を移動させるために構築した。これらの変異体は両方とも、 p H 6 . 0 での F c R n に対する増加した結合親和性を示す。

30

【 0 1 9 6 】

A l p h a S c r e e n <sup>T M</sup> データは、 ^ 2 8 1 S 変異体および他の変異体と F c R n の結合を示す。この A l p h a S c r e e n <sup>T M</sup> データは、直接結合分析として集められる。化学発光シグナルのより高レベルが、より強い結合を証明する。変異体の濃度が、該分析で上昇するため、強力なシグナルが生じる。図 1 7 a および 1 7 b 中、 p H 6 . 0 でのこれらのデータは、 ^ 2 8 1 S 、 P 2 5 7 L 、 P 2 5 7 L / ^ 2 8 1 S ( 置換 / 挿入変異体の組み合わせ ) および他の変異体の、野生型 F c よりも増加した親和性を証明する。また、サルにおける増加した血清半減期を有することが以前に示された、二重置換である T 2 5 0 Q / M 4 2 8 L が示される ( Hinton et al . , 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 62 13-6216、参照によりその全体が本明細書中に包含される )。挿入である ^ 2 8 1 S のみが、 F c / F c R n 結合を増加する。さらに、 ^ 2 8 1 S は、 2 個の修飾が、 ~ 4 0 n M データ点に示す通り、変異体 P 2 5 7 L / ^ 2 8 1 S に組み込まれるとき、 P 2 5 7 L の結合がさらに増加する。図 1 7 c のデータは、これらの変異体が、 p H 7 . 0 での増加した F c R n 結合を示さないことを証明する。 p H 7 . 0 での減少した親和性は、 F c 再利

40

50

用に重要な工程である、FcRnから細胞外空間へのFcポリペプチドの放出を可能にするため、増加したインビボ半減期に望ましい。

【0197】

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

【0198】

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

【0199】

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

【0200】

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

【図面の簡単な説明】

【0201】

【図1】図1。抗体の構造および機能。pdb受託コード1CE1からのヒト化Fab構造(James et al., 1999, J Mol Biol 289:293 - 301、参照によりその全体が本明細書中に包含される)およびpdb受託コード1DN2からのヒトIgG1Fc構造(DeLano et al., 2000, Science 287:1279 - 1283、参照によりその全体が本明細書中に包含される)を用いてモデル化された、全長ヒトIgG1抗体のモデルを示す。FabおよびFc領域を連結するフレキシブルヒンジは示さず。IgG1は、2個の軽鎖および2個の重鎖からなるヘテロ二量体のホモ二量体である。軽鎖のV<sub>L</sub>およびC<sub>L</sub>、ならびに重鎖のV<sub>H</sub>、Cガンマ1(C<sub>1</sub>)、Cガンマ2(C<sub>2</sub>)、およびCガンマ3(C<sub>3</sub>)を含む、抗体を含むIgドメインが標識される。Fc領域は標識される。可変領域中の抗原結合部位、ならびに領域中のFcRs、FcRn、C1qおよびタンパク質AおよびGの結合部位を含む、関連タンパク質の結合部位は標識される。

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

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

【図4】図4。本発明に用いたヒトおよびげっ歯動物FcRn重鎖配列の例。

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

【図6】図6。ラット構造から作製されたヒトFc/FcRn複合体モデル(Burmeister

10

20

30

40

50

et al., 1994, Nature, 372:379 - 383 ; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867 - 877、  
両方とも参照によりその全体が本明細書中に包含される)。いくつかのヒスチジン残基は、  
FcRn鎖(淡灰色)およびFcポリペプチド(濃灰色)上の空間充填(space-filling)  
g)原子で示される。

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

【図8】図8。本発明の変異体。

【図9】図9。本発明の変異体。

【図10】図10。本発明の変異体。

【図11】図11。Fc変異体のコンストラクトに用いられ得るベクターpCDNA3.1-Zeo+の図。

10

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

【図13】図13。Fc変異体のFcRn結合特性の概要。右から左の列は、FcRn結合の修飾、使用した免疫グロブリン、他の修飾、野生型と比較したAlphaScreen<sup>TM</sup>競合分析による相対的FcRn親和性(中央値)、実施した分析数、およびタンパク質の参照数を示す。1.0より大きい相対的FcRn親和性数は、野生型よりも増加した結合を証明する。

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

20

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

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

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

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

30

【図1】

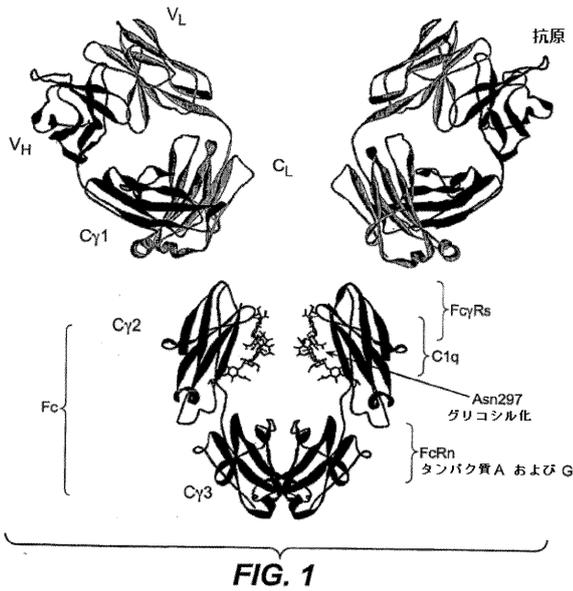


FIG. 1

【図2】

ヒンジ領域		Fc 領域 →	
EU	221	222	223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236
IgG1	D	-	K T H T C P P C P A P E L L G
IgG2	-	V	- E - - P V A -
IgG3	L	G	D T - R - -
IgG4	-	-	- P P S - - F
CH2 ドメイン			
EU	237	238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263	
IgG1	G	P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
EU	264	265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290	
IgG1	V	D V S H E D P E Y K F N W Y V D G V E V H N A K T K	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
EU	291	292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317	
IgG1	F	R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
EU	318	319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340	
IgG1	E	Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
CH3 ドメイン			
EU	341	342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367	
IgG1	G	Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
EU	368	369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394	
IgG1	L	V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
EU	395	396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421	
IgG1	P	P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-
EU	422	423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447	
IgG1	V	F S C G V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K	
IgG2	-	-	-
IgG3	-	-	-
IgG4	-	-	-

FIG. 2

【図3】

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

FIG. 3

【図4】

		AA 番号	1EXU.pdb	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16					
FcRn ヒト	1EXU.pdb	1	A	H	L	S	L	L	Y	H	L	T	A	V	S	S					
FcRn ラット	111A.pdb	1	A	L	P	L	M	Y	H	L	A	A	V	S	D						
FcRn ヒト	1EXU.pdb	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
FcRn ラット	111A.pdb	L	S	T	G	L	P	S	F	W	A	T	G	W	L	G	A	Q	Q	Y	L
FcRn ヒト	1EXU.pdb	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
FcRn ラット	111A.pdb	T	Y	N	N	L	R	G	E	A	E	P	C	G	A	W	-	-	-	-	-
FcRn ヒト	1EXU.pdb	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
FcRn ラット	111A.pdb	V	S	W	Y	W	E	K	E	T	D	L	R	K	E	K	L	F	L	F	L
FcRn ヒト	1EXU.pdb	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94		
FcRn ラット	111A.pdb	E	A	F	K	A	L	-	G	K	G	K	P	Y	T	L	Q	G	L	L	
FcRn ヒト	1EXU.pdb	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
FcRn ラット	111A.pdb	G	C	E	L	G	P	D	N	T	S	V	P	T	A	K	F	A	L	N	G
FcRn ヒト	1EXU.pdb	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
FcRn ラット	111A.pdb	E	E	F	M	N	F	D	L	K	Q	G	T	W	G	D	W	P	E	A	
FcRn ヒト	1EXU.pdb	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
FcRn ラット	111A.pdb	D	T	V	G	N	L	W	M	X	Q	P	E	A	K	K	E	S	E	F	
FcRn ヒト	1EXU.pdb	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174
FcRn ラット	111A.pdb	L	L	F	S	C	P	H	R	L	R	E	H	L	E	R	G	R	G	N	L
FcRn ヒト	1EXU.pdb	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194
FcRn ラット	111A.pdb	E	W	K	E	P	P	S	M	R	L	K	A	R	P	S	S	P	G	F	S
FcRn ヒト	1EXU.pdb	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
FcRn ラット	111A.pdb	V	L	T	C	A	A	F	S	F	Y	P	P	E	L	K	F	R	F	L	
FcRn ヒト	1EXU.pdb	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234
FcRn ラット	111A.pdb	N	G	L	A	A	G	T	G	Q	G	D	F	G	P	N	S	D	G	S	
FcRn ヒト	1EXU.pdb	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254
FcRn ラット	111A.pdb	H	A	S	S	S	L	T	V	K	S	G	D	E	H	Y	C	C	I	V	
FcRn ヒト	1EXU.pdb	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274
FcRn ラット	111A.pdb	O	H	A	G	L	A	Q	P	L	R	V	E	L							

FIG. 4

【 図 5 】

AA 番号 1EXU.pdb 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
 ベータミクログロブリン, ヒト 経路 1EXU.pdb 38 B I Q R T P K I Q V Y  
 ベータミクログロブリン, ラット 経路 11A.pdb 38 B I Q K T P Q I Q V Y

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
S	R	H	P	A	E	N	G	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S
S	R	H	P	A	E	N	G	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
G	F	H	P	S	D	I	E	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I
G	F	H	P	S	D	I	E	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I
47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
E	K	V	E	H	S	D	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L
E	K	V	E	H	S	D	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L
65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
L	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V
L	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V
83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
N	H	V	T	L	S	Q	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M	
N	H	V	T	L	S	Q	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M	

FIG. 5

【 図 6 】

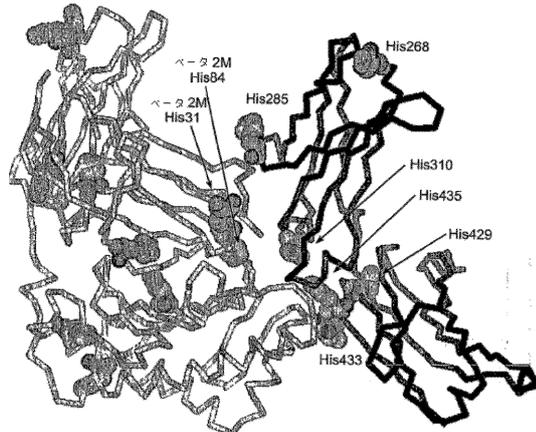


FIG. 6

【 図 7 】

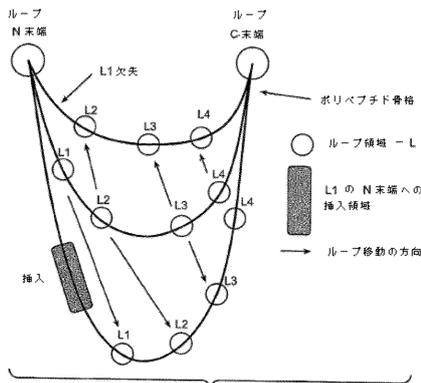


FIG. 7

【 図 8 a 】

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

FIG. 8a

【 図 8 b 】

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

FIG. 8b

【 図 9 a 】

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

FIG. 9a

【 図 9 b 】

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

FIG. 9b

【 図 10 a 】

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

FIG. 10a

【 図 1 0 b 】

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

FIG. 10b

【 図 1 1 】

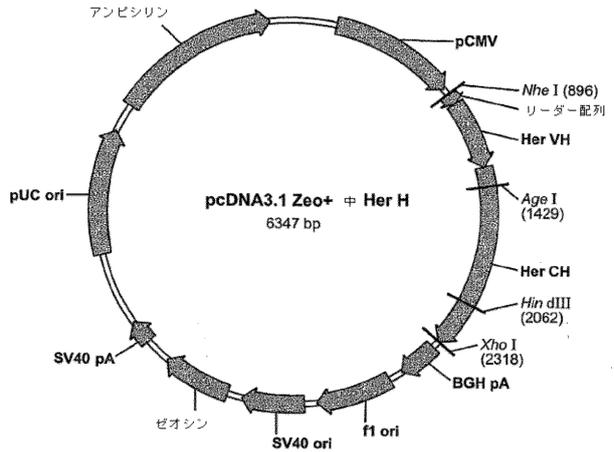


FIG. 11

【 図 1 2 a 】

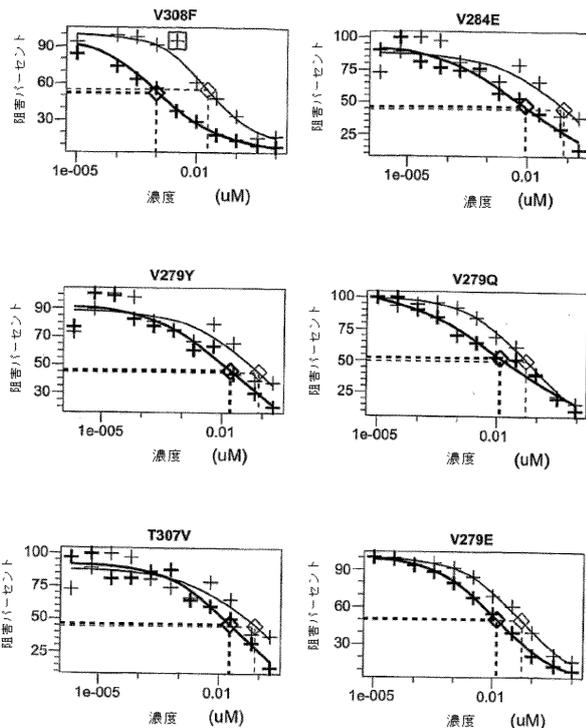


FIG. 12a

【 図 1 2 b 】

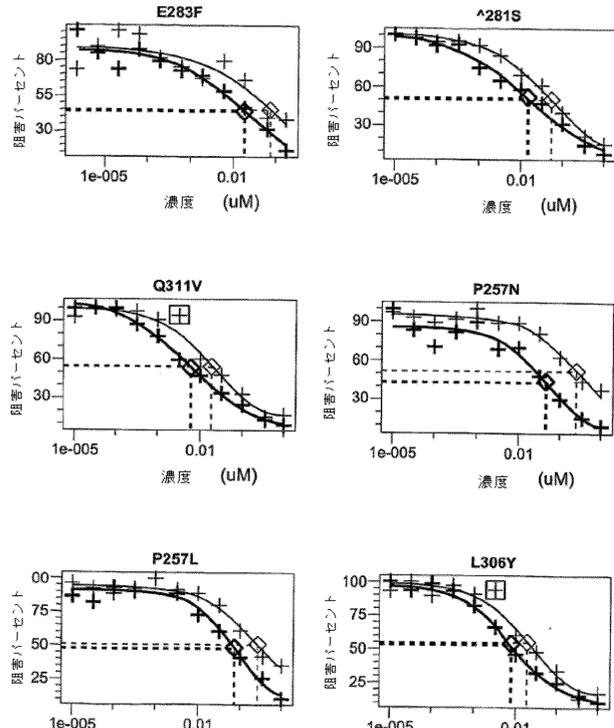


FIG. 12b

【 図 1 3 a 】

実装注	可変 -Fc 錫糊	バックグラウンド 実装	増加倍数 中央値	
				N
WT	ハーセブチン-IGG1		1.00	19
WT	ハーセブチン-IGG2		0.45	2
K246H	ハーセブチン-IGG1		0.85	1
K248S	ハーセブチン-IGG1		0.55	1
P247D	ハーセブチン-IGG1		1.45	1
P247T	ハーセブチン-IGG1		0.23	1
K248H	ハーセブチン-IGG1		0.62	2
K248P	ハーセブチン-IGG1			0
K248Q	ハーセブチン-IGG1		1.00	1
K248R	ハーセブチン-IGG1		0.44	1
K248Y	ハーセブチン-IGG1		2.08	3
D248T	ハーセブチン-IGG1			0
D248W	ハーセブチン-IGG1		0.56	1
T250Q	ハーセブチン-IGG1			0
T250Q/M428L	ハーセブチン-IGG1		2.06	13
L251D	ハーセブチン-IGG1		0.28	2
L251E	ハーセブチン-IGG1		0.07	1
L251H	ハーセブチン-IGG1		0.57	1
L251I	ハーセブチン-IGG1		0.28	1
L251K	ハーセブチン-IGG1		0.10	1
L251M	ハーセブチン-IGG1		0.26	1
L251N	ハーセブチン-IGG1		0.10	1
L251T	ハーセブチン-IGG1		1.12	1
L251V	ハーセブチン-IGG1		0.26	1
L251Y	ハーセブチン-IGG1		0.55	1
M252F	ハーセブチン-IGG1		0.70	1
M252L	ハーセブチン-IGG1		0.10	1
M252W	ハーセブチン-IGG1		7.55	7
M252Y	ハーセブチン-IGG1			0
M252Y/S254T/T256E	ハーセブチン-IGG1			0
M252Y/P257L	ハーセブチン-IGG1		1.22	1
M252Y/P257N	ハーセブチン-IGG1		25.48	3
M252Y/V279Q	ハーセブチン-IGG1		5.62	3
M252Y/V308F	ハーセブチン-IGG1		1.44	2
I253L	ハーセブチン-IGG1		0.32	1
I253T	ハーセブチン-IGG1			0
I253V	ハーセブチン-IGG1		0.28	1
S254H	ハーセブチン-IGG1		1.34	2
S254L	ハーセブチン-IGG1		0.61	1
S254N	ハーセブチン-IGG1		0.15	1
S254T	ハーセブチン-IGG1		0.81	1
S254V	ハーセブチン-IGG1		0.82	1
S254N	ハーセブチン-IGG1		0.01	1

FIG. 13a

【 図 1 3 b 】

実装注	可変 -Fc 錫糊	バックグラウンド 実装	増加倍数 中央値	
				N
R255E	ハーセブチン-IGG1			0
R255F	ハーセブチン-IGG1			0
R255H	ハーセブチン-IGG1		0.69	2
R255K	ハーセブチン-IGG1		0.22	1
R255S	ハーセブチン-IGG1			0
R255V	ハーセブチン-IGG1		0.46	1
T256E	ハーセブチン-IGG1			0
T256H	ハーセブチン-IGG1		0.06	1
T256V	ハーセブチン-IGG1		0.29	1
P257A	ハーセブチン-IGG1		1.88	1
P257C	ハーセブチン-IGG1		15.69	1
P257D	ハーセブチン-IGG1		0.08	1
P257E	ハーセブチン-IGG1		0.13	1
P257F	ハーセブチン-IGG1		0.06	1
P257G	ハーセブチン-IGG1		0.76	1
P257H	ハーセブチン-IGG1		0.49	1
P257I	ハーセブチン-IGG1		1.80	2
P257K	ハーセブチン-IGG1		0.07	1
P257L	ハーセブチン-IGG1		2.63	6
P257L	ハーセブチン-IGG1	I332E	5.04	1
P257L	ハーセブチン-IGG1	S239D/332E	3.96	2
P257L*281S	ハーセブチン-IGG1		11.26	3
P257L/G386H	ハーセブチン-IGG1		0.41	2
P257LV279E	ハーセブチン-IGG1		3.01	3
P257LV279Q	ハーセブチン-IGG1		12.40	3
P257LV279Q/V284E	ハーセブチン-IGG1			0
P257LV279Y	ハーセブチン-IGG1		0.75	1
P257LV284E	ハーセブチン-IGG1		0.65	1
P257LV308F	ハーセブチン-IGG1		6.88	4
P257LV308Y	ハーセブチン-IGG1		3.50	3
P257L/Q311V	ハーセブチン-IGG1		23.30	3
P257L/G386N	ハーセブチン-IGG1		3.03	2
P257L/M428L	ハーセブチン-IGG1		3.73	1
P257L/N434Y	ハーセブチン-IGG1		835.00	3
P257M	ハーセブチン-IGG1		8.32	1
P257N	ハーセブチン-IGG1		2.56	8
P257NV279E	ハーセブチン-IGG1		6.00	3
P257NV279Q	ハーセブチン-IGG1		4.05	1
P257NV279Q/V284E	ハーセブチン-IGG1			0
P257NV279Y	ハーセブチン-IGG1		6.22	3
P257N*281S	ハーセブチン-IGG1		5.99	3
P257NV284E	ハーセブチン-IGG1		5.92	2
P257NV284E/V308F	ハーセブチン-IGG1			0
P257NG386H	ハーセブチン-IGG1		0.84	2
P257NL306Y	ハーセブチン-IGG1		1.29	2
P257NV308F	ハーセブチン-IGG1		0.88	4
P257NV308Y	ハーセブチン-IGG1		48.20	1
P257Q	ハーセブチン-IGG1		0.25	2
P257Q/V279Q	ハーセブチン-IGG1		0.71	2
P257Q/V284E	ハーセブチン-IGG1			0

FIG. 13b

【 図 1 3 c 】

実装注	可変 -Fc 錫糊	バックグラウンド 実装	増加倍数 中央値	
				N
P257R	ハーセブチン-IGG1		0.29	1
P257S	ハーセブチン-IGG1		1.94	2
P257T	ハーセブチン-IGG1		1.85	1
P257V	ハーセブチン-IGG1		1.90	1
P257W	ハーセブチン-IGG1		0.24	1
P257Y	ハーセブチン-IGG1		3.40	2
P257Y/V279Q	ハーセブチン-IGG1		1.78	2
P257Y*281S	ハーセブチン-IGG1			0
P257Y/V308F	ハーセブチン-IGG1			0
E258R	ハーセブチン-IGG1		0.19	1
E258V	ハーセブチン-IGG1		0.22	1
V279A	ハーセブチン-IGG1		5.20	1
V279C	ハーセブチン-IGG1		3.93	1
V279D	ハーセブチン-IGG1		0.93	2
V279E	ハーセブチン-IGG1		0.47	5
V279E/G386H	ハーセブチン-IGG1		0.61	3
V279E/V284E	ハーセブチン-IGG1		3.91	2
V279F	ハーセブチン-IGG1			0
V279G	ハーセブチン-IGG1		1.27	1
V279H	ハーセブチン-IGG1			0
V279I	ハーセブチン-IGG1		15.12	1
V279K	ハーセブチン-IGG1			0
V279L	ハーセブチン-IGG1		0.30	1
V279M	ハーセブチン-IGG1		2.69	1
V279N	ハーセブチン-IGG1			0
V279P	ハーセブチン-IGG1		0.31	1
V279Q	ハーセブチン-IGG1		0.50	9
V279Q/V284E	ハーセブチン-IGG1		0.66	2
V279Q/L306Y	ハーセブチン-IGG1		3.93	3
V279Q/V308F	ハーセブチン-IGG1		4.60	3
V279Q/Q311V	ハーセブチン-IGG1			0
V279Q/G386H	ハーセブチン-IGG1		1.06	4
V279R	ハーセブチン-IGG1		1.11	1
V279S	ハーセブチン-IGG1		0.96	1
V279T	ハーセブチン-IGG1		0.75	3
V279W	ハーセブチン-IGG1		0.44	1
V279Y	ハーセブチン-IGG1		0.67	5

FIG. 13c

【 図 1 3 d 】

実装注	可変 -Fc 錫糊	バックグラウンド 実装	増加倍数 中央値	
				N
V279Y/G386H	ハーセブチン-IGG1		0.58	3
V279Y/V284E	ハーセブチン-IGG1			0
V279Y/V308F	ハーセブチン-IGG1		1.59	4
I280E	ハーセブチン-IGG1		0.26	1
I280H	ハーセブチン-IGG1		0.53	2
*281A	ハーセブチン-IGG1			0
*281D	ハーセブチン-IGG1		0.89	3
*281S	ハーセブチン-IGG1		0.62	7
*281SV284E	ハーセブチン-IGG1			0
*281SV308F	ハーセブチン-IGG1		2.13	2
*281SV308Y	ハーセブチン-IGG1		1.46	1
*281SN434Y	ハーセブチン-IGG1		176.70	3
*281T	ハーセブチン-IGG1		0.56	1
V282D	ハーセブチン-IGG1		0.25	1
V282F	ハーセブチン-IGG1		0.42	1
V282H	ハーセブチン-IGG1		0.31	1
V282I	ハーセブチン-IGG1		0.36	1
V282T	ハーセブチン-IGG1		0.58	1
E283F	ハーセブチン-IGG1		0.79	3
E283F/V284E	ハーセブチン-IGG1		1.63	1
E283I	ハーセブチン-IGG1		1.15	2
E283L	ハーセブチン-IGG1		1.65	5
E283LV284E	ハーセブチン-IGG1			0
E283Y	ハーセブチン-IGG1			0
V284D	ハーセブチン-IGG1			0
V284E	ハーセブチン-IGG1		0.68	10
V284E/G386H	ハーセブチン-IGG1		1.13	3
V284EL306Y	ハーセブチン-IGG1		0.66	3
V284EV308F	ハーセブチン-IGG1		3.96	3
V284EV308Y	ハーセブチン-IGG1		0.22	1
V284H	ハーセブチン-IGG1			0
V284K	ハーセブチン-IGG1		0.15	1
V284P	ハーセブチン-IGG1			0
V284Q	ハーセブチン-IGG1		1.80	2
V284R	ハーセブチン-IGG1			0
V284S	ハーセブチン-IGG1		0.48	2
V284Y	ハーセブチン-IGG1		0.55	1
H285F	ハーセブチン-IGG1		0.98	1
H285S	ハーセブチン-IGG1		0.89	2
H285V	ハーセブチン-IGG1		0.74	2
deleteN286	ハーセブチン-IGG1		1.95	1
N286D	ハーセブチン-IGG1		10.18	1
N286L	ハーセブチン-IGG1		1.45	1

FIG. 13d

【 図 1 3 e 】

実装体	可変 -Fc 錫箔	バックグラウンド		増加倍数 中央値	
		実装			N
A287H	ハーセブチン-IgG1			0.81	1
A287S	ハーセブチン-IgG1			1.27	2
A287V	ハーセブチン-IgG1			0.74	1
A287Y	ハーセブチン-IgG1			0.52	1
K288D	ハーセブチン-IgG1				0
K288H	ハーセブチン-IgG1			0.53	2
K288Q	ハーセブチン-IgG1			0.33	1
K288R	ハーセブチン-IgG1			0.27	3
K288S	ハーセブチン-IgG1			0.03	1
V305H	ハーセブチン-IgG1			0.51	1
V305T	ハーセブチン-IgG1			0.55	1
L306E	ハーセブチン-IgG1				0
L306F	ハーセブチン-IgG1			0.46	1
L306H	ハーセブチン-IgG1				0
L306I	ハーセブチン-IgG1			0.70	2
L306N	ハーセブチン-IgG1			0.91	1
L306T	ハーセブチン-IgG1			0.64	2
L306V	ハーセブチン-IgG1			0.34	1
L306Y	ハーセブチン-IgG1			1.18	6
T307D	ハーセブチン-IgG1			0.82	1
T307V	ハーセブチン-IgG1			0.57	3
T307Y	ハーセブチン-IgG1				0
V306A	ハーセブチン-IgG1			1.38	1
V306C	ハーセブチン-IgG1			2.64	1
V306D	ハーセブチン-IgG1			0.02	1
V306E	ハーセブチン-IgG1				0
V306F	ハーセブチン-IgG1			2.87	14
V306F	ハーセブチン-IgG1	S298A/E333A/K334A		36.04	1
V306F	ハーセブチン-IgG1	I332E		1.82	3
V306F	ハーセブチン-IgG1	S239D/I332E		1.91	3
V306F/Q311V	ハーセブチン-IgG1			11.73	1
V306F/G385H	ハーセブチン-IgG1			1.62	3
V306F/G385N	ハーセブチン-IgG1				0
V306F/M428L	ハーセブチン-IgG1			11.79	1
V306F/N434Y	ハーセブチン-IgG1			353.73	3

FIG. 13e

【 図 1 3 f 】

実装体	可変 -Fc 錫箔	バックグラウンド		増加倍数 中央値	
		実装			N
V308G	ハーセブチン-IgG1			0.18	1
V308H	ハーセブチン-IgG1				0
V308I	ハーセブチン-IgG1			0.48	1
V308K	ハーセブチン-IgG1			0.53	1
V308L	ハーセブチン-IgG1			0.48	1
V308M	ハーセブチン-IgG1			0.45	1
V308N	ハーセブチン-IgG1			1.22	3
V308P	ハーセブチン-IgG1				0
V308Q	ハーセブチン-IgG1			0.58	1
V308R	ハーセブチン-IgG1			1.58	1
V308S	ハーセブチン-IgG1			0.15	1
V308T	ハーセブチン-IgG1			0.45	2
V308V	ハーセブチン-IgG1			9.57	1
V308Y	ハーセブチン-IgG1			4.25	4
V308Y/G385H	ハーセブチン-IgG1				0
L309F	ハーセブチン-IgG1			0.36	1
L309H	ハーセブチン-IgG1				0
L309I	ハーセブチン-IgG1			0.34	2
L309N	ハーセブチン-IgG1				0
L309Q	ハーセブチン-IgG1			0.15	1
L309V	ハーセブチン-IgG1			0.59	3
L309Y	ハーセブチン-IgG1			0.20	1
H310K	ハーセブチン-IgG1			0.62	2
H310N	ハーセブチン-IgG1			0.39	1
H310T	ハーセブチン-IgG1			0.39	2
Q311A	ハーセブチン-IgG1			2.52	1
Q311H	ハーセブチン-IgG1			0.87	1
Q311L	ハーセブチン-IgG1			2.34	1
Q311S	ハーセブチン-IgG1				0
Q311T	ハーセブチン-IgG1			1.47	1
Q311V	ハーセブチン-IgG1			3.15	3
Q311W	ハーセブチン-IgG1			0.89	1
D312H	ハーセブチン-IgG1			0.38	1
V313Y	ハーセブチン-IgG1			0.48	1
N315E	ハーセブチン-IgG1			0.53	1
N315G	ハーセブチン-IgG1				0
N315H	ハーセブチン-IgG1			0.45	1
N315Q	ハーセブチン-IgG1			0.79	3
N315R	ハーセブチン-IgG1			0.48	1
N315S	ハーセブチン-IgG1			0.31	1
N315T	ハーセブチン-IgG1			1.72	1
K317H	ハーセブチン-IgG1			0.71	1
K317S	ハーセブチン-IgG1				0
A339P	ハーセブチン-IgG1				0

FIG. 13f

【 図 1 3 g 】

実装体	可変 -Fc 錫箔	バックグラウンド		増加倍数 中央値	
		実装			N
K340P	ハーセブチン-IgG1			0.54	1
G341S	ハーセブチン-IgG1			0.77	1
P374H	ハーセブチン-IgG1				0
P374S	ハーセブチン-IgG1			0.59	1
D376H	ハーセブチン-IgG1			0.42	1
D376L	ハーセブチン-IgG1			0.49	1
A378H	ハーセブチン-IgG1			0.50	1
A378N	ハーセブチン-IgG1			0.58	1
E380T	ハーセブチン-IgG1				0
E380Y	ハーセブチン-IgG1			0.35	1
E382H	ハーセブチン-IgG1			0.43	3
S383H	ハーセブチン-IgG1			0.96	1
S383K	ハーセブチン-IgG1				0
S383Q	ハーセブチン-IgG1			0.90	1
N384E	ハーセブチン-IgG1			0.57	1
N384G	ハーセブチン-IgG1			0.38	1
N384H	ハーセブチン-IgG1			0.57	1
G385A	ハーセブチン-IgG1			0.27	1
G385C	ハーセブチン-IgG1			0.36	1
G385D	ハーセブチン-IgG1			0.54	1
G385E	ハーセブチン-IgG1			6.12	1
G385F	ハーセブチン-IgG1				0
G385H	ハーセブチン-IgG1			1.05	5
G385I	ハーセブチン-IgG1	I332E		1.37	3
G385H	ハーセブチン-IgG1	S239D/I332E		17.37	2
G385I	ハーセブチン-IgG1				0
G385K	ハーセブチン-IgG1			0.38	1
G385L	ハーセブチン-IgG1				0
G385M	ハーセブチン-IgG1				0
G385N	ハーセブチン-IgG1			2.54	2
G385P	ハーセブチン-IgG1				0
G385Q	ハーセブチン-IgG1				0
G385R	ハーセブチン-IgG1			0.11	1
G385S	ハーセブチン-IgG1			0.18	1
G385T	ハーセブチン-IgG1			0.16	1
G385V	ハーセブチン-IgG1			0.13	1
G385W	ハーセブチン-IgG1			0.08	1
G385Y	ハーセブチン-IgG1				0
Q386E	ハーセブチン-IgG1			0.85	1
Q386H	ハーセブチン-IgG1			0.58	1
Q386K	ハーセブチン-IgG1			0.06	1

FIG. 13g

【 図 1 3 h 】

実装体	可変 -Fc 錫箔	バックグラウンド		増加倍数 中央値	
		実装			N
deleteP387	ハーセブチン-IgG1				0
P387A	ハーセブチン-IgG1			0.26	1
P387H	ハーセブチン-IgG1			1.04	1
P387K	ハーセブチン-IgG1			0.86	1
P387Q	ハーセブチン-IgG1			1.06	1
N389E	ハーセブチン-IgG1			0.78	1
N389H	ハーセブチン-IgG1			0.53	1
S428E	ハーセブチン-IgG1			0.60	1
S428H	ハーセブチン-IgG1			1.14	1
S428L	ハーセブチン-IgG1			1.30	1
S428N	ハーセブチン-IgG1			0.25	1
S428R	ハーセブチン-IgG1			1.47	1
S428V	ハーセブチン-IgG1			1.38	1
S428Y	ハーセブチン-IgG1			0.53	1
V427A	ハーセブチン-IgG1			0.81	1
V427I	ハーセブチン-IgG1			0.64	1
M428L	ハーセブチン-IgG1			2.92	5
H428D	ハーセブチン-IgG1			0.47	2
H428F	ハーセブチン-IgG1			0.13	1
H428K	ハーセブチン-IgG1				0
H428N	ハーセブチン-IgG1			0.50	2
H428Q	ハーセブチン-IgG1			1.40	1
H428S	ハーセブチン-IgG1			0.53	3
H428T	ハーセブチン-IgG1			0.66	3
H428Y	ハーセブチン-IgG1			0.13	1
E430D	ハーセブチン-IgG1			0.20	1
E430H	ハーセブチン-IgG1			0.35	1
E430K	ハーセブチン-IgG1				0
E430L	ハーセブチン-IgG1			0.50	1
E430Q	ハーセブチン-IgG1			0.26	1
E430Y	ハーセブチン-IgG1				0
A431G	ハーセブチン-IgG1			0.05	1
A431H	ハーセブチン-IgG1			0.45	3
A431I	ハーセブチン-IgG1			0.55	1
A431P	ハーセブチン-IgG1				0
A431S	ハーセブチン-IgG1			0.51	1
L432F	ハーセブチン-IgG1			0.39	1
L432H	ハーセブチン-IgG1				0
L432N	ハーセブチン-IgG1			0.45	1
L432S	ハーセブチン-IgG1			0.57	1
L432V	ハーセブチン-IgG1			0.73	3
H433E	ハーセブチン-IgG1				0
H433N	ハーセブチン-IgG1			0.19	1
H433P	ハーセブチン-IgG1			1.18	1
H433R	ハーセブチン-IgG1			0.88	1
H433S	ハーセブチン-IgG1				0

FIG. 13h

【図 13 i】

変異体	可変 -Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数	
			中央値	N
N434A	ハーセプチン-IgG1		3.23	6
N434H	ハーセプチン-IgG1		3.91	1
N434L	ハーセプチン-IgG1		0.16	1
N434Q	ハーセプチン-IgG1		0.15	1
N434S	ハーセプチン-IgG1		0.29	1
N434Y	ハーセプチン-IgG1		16.25	3
H435N	ハーセプチン-IgG1		0.19	1
Y436E	ハーセプチン-IgG1		0.99	1
Y436F	ハーセプチン-IgG1		0.99	2
Y436H	ハーセプチン-IgG1		0.48	1
Y436L	ハーセプチン-IgG1		0.28	1
Y436Q	ハーセプチン-IgG1		0.24	1
Y436V	ハーセプチン-IgG1		0.51	1
Y436W	ハーセプチン-IgG1		0.30	1
T437E	ハーセプチン-IgG1			0
T437V	ハーセプチン-IgG1		0.16	1
Q438E	ハーセプチン-IgG1		0.28	1
Q438H	ハーセプチン-IgG1		0.24	1
Q438K	ハーセプチン-IgG1		0.24	1

FIG. 13i

【図 13 j】

変異体	可変 -Fc 領域	バックグラウンド 変異	増加倍数	
			中央値	N
WT	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc v1		1.45	6
WT	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc			0
P257L	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc			0
V308F	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc			0
G385H	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc			0
WT	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
P257L	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
V308F	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
G385H	ハーセプチン-IgG1/2 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
P257L	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc			0
V308F	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc			0
G385H	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc			0
P257L	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
V308F	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
G385H	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
P257L	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
V308F	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
G385H	AC10-IgG1 ハイブリッド Fc	S239D/I332E		0
T250Q	AC10-IgG1	S239D/I332E	0.59	1
V284D	AC10-IgG1	S239D/I332E	0.88	1
V284E	AC10-IgG1	S239D/I332E	0.17	1
M426L	AC10-IgG1	S239D/I332E	1.82	1

FIG. 13j

【図 14 a】

変異体	FcRn 総合比 変異体 / WT		
D221K	5.86	G236A	1.75
D221Y	2.74	G236D	1.53
K222Y	1.31	G236E	1.46
T223E	2.04	G236F	1.75
T223K	2.97	G236H	1.48
H224E	5.11	G236I	1.33
H224Y	1.68	G236K	1.38
T225E	4.89	G236M	1.60
T225K	5.68	G236N	1.89
T225W	6.89	G236P	1.41
P227E	1.49	G236Q	1.46
P227G	1.67	G236R	1.99
P227K	1.45	G236S	1.77
P228G	1.77	G236T	1.56
P228K	1.55	G236V	1.35
P228Y	1.45	G236W	1.52
P230E	1.01	G236Y	1.52
P230G	1.16	G237D	1.84
P232K	1.56	G237E	1.36
E233G	2.09	G237H	1.48
E233M	1.13	G237I	1.01
E233R	1.05	G237K	1.47
E233S	1.10	G237L	5.91
E233T	1.19	G237M	73.39
E233W	1.64	G237N	1.39
E233Y	1.86	G237P	2.80
L234D	1.54	G237Q	1.39
L234E	1.25	G237R	1.36
L234F	1.46	G237S	1.29
L234G	2.54	G237T	1.32
L234H	1.48	G237W	1.20
L234I	1.26	G237Y	1.92
L234I/L235D	1.03	P238D	1.03
L234N	1.06	P238E	3.71
L234R	1.19	P238F	2.41
L234V	1.45	P238G	1.53
L234Y	1.90	P238H	1.46
L235N	1.32	P238I	1.44
L235Q	1.67	P238K	5.01
L236S	1.51	P238L	1.71
L235T	1.65	P238M	2.33
L235V	1.31	P238N	1.15
L235Y	1.02	P238S	1.12
G236A	1.75	P238T	1.12
G236D	1.53	P238V	1.43
		P238W	1.30

FIG. 14a

【図 14 b】

P238W	1.30	F241Y/F243Y/V262T	
S239D	1.73	N/264T	1.89
S239D/D265H/N297		F243E	1.14
D/I332E	1.26		
S239D/D285I/N297D		F243L/A/262I/V264W	1.35
I/332E	1.81	F243W	4.63
S239D/E272I/S332E	1.49	K246H	4.02
S239D/E272Y/I332E	1.31	K246Y	2.47
S239D/I332D	1.12	D249Q	2.08
S239D/I332E	1.22	D249Y	2.57
S239D/K326T/I332E	2.22	R265E	1.16
S239D/N297D/I332E	3.09	R265Y	12.88
S239E	1.47	E268Y	1.07
S239E/I332E	1.34	T280D	1.71
S239E/N297D/I332E		T280E	5.49
S239E/V264I/A330Y/		T280H	7.30
I332E	2.36	T280Y	7.51
S239E/V264I/I332E	2.71	V262E	9.27
S239E/V264I/S298A/		V263I	2.71
A330Y/I332E	10.14	V264A	1.12
S239G	1.16	V264D	7.67
S239L	4.60	V264F	1.07
S239M	1.03	V264I	1.32
S239Q/I332E	1.33	V264I/A330L/I332E	1.13
S239Q/I332N	1.11	V264I/I332E	1.70
S239Q/I332Q	1.04	V264N	3.39
S239Q/V264I/I332E		V264S	5.13
S239R	1.04	V264T	1.66
S239T	1.12		
S239V	1.17	D265F/N297E/I332E	1.38
S239Y		D265G	1.74
V240I	1.28	D265P	1.18
V240M	2.50	D265R	1.16
V240T	2.61	V266I	1.17
F241E	1.09	S267E	2.24
F241L	1.99	S267K	1.70
F241L/V262I	1.37	S267L/A327S	1.05
F241W	1.70	H268E	1.71
F241W/F243W	1.12	H268M	1.88
F241W/F243W/V282		E269F	1.51
A/V264A	1.91	E269G	1.34
F241Y/F243Y/V262T		E269I	1.26
N/264T	1.89	E269K	1.23
		E269M	1.11
		E269P	1.23
		E269S	1.31
		E269V	1.38
		E269W	1.19
		E269Y	24.75

FIG. 14b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【 図 1 4 c 】

E289Y	24.76	V282E	1.91
D270J	1.23	V282G	1.16
D270S	1.03	V282K	1.44
P271A	1.01	V282Y	1.92
P271I	1.99	E283H	6.25
P271S	1.14	E283K	2.74
P271T	3.88	E283L	9.25
P271V	1.06	E283P	1.33
P271Y	1.48	E283R	1.86
E272D	1.37	E283Y	1.42
E272H	1.45	V284E	25.76
E272I	1.05	V284L	1.51
E272L	1.81	V284T	1.15
E272P	2.17	H285D	2.40
E272R	1.83	H285E	1.93
E272T	2.46	H285K	1.76
E272V	1.77	H285Q	1.38
E272W	1.82	H285W	1.33
E272Y	2.08	H285Y	1.25
K274E	1.05	N286E	2.12
K274F	1.02	N286P	2.90
K274G	1.04	N286Y	1.45
K274I	1.06	K288Y	1.10
K274M	1.01	P291H	2.86
K274N	1.26	P291I	1.15
K274T	1.08	P291Q	1.24
N276D	1.18	R292D	1.67
N276F	1.18	R292E	1.45
N276H	1.19	R292Y	1.36
N276L	1.21	E294G	1.25
N276R	1.19	E294I	1.09
N276V	1.27	S294K	1.16
N276W	2.00	Q295T	3.82
Y278D	1.79	Q295V	1.19
Y278I	1.52	Y296E	1.23
Y278L	1.74	Y296I	1.71
Y278M	1.28	Y296L	2.78
Y278N	1.33	Y296S	
Y278R	1.23	S298E	1.54
Y278S	1.23	S298F	1.15
Y278V	1.27	S298H	3.99
G281D	1.33	S298T	2.13
G281Y	1.46	T299F	1.86
V282E	1.91	T299H	2.03
		T299W	1.09
		T299Y	3.85

FIG. 14c

【 図 1 4 d 】

T299Y	3.85	L328R	1.82
Y300A	1.04	L328W	1.35
Y300E	1.27	P329K	1.27
Y300G	1.07	P329R	1.64
Y300K	1.01	P329W	3.16
Y300M	1.10	A330F	25.28
Y300N	1.14	A330G	1.01
Y300Q	1.11	A330H	9.87
Y300V	1.09	A330I	
R301E	2.92	A330L/I332E	1.50
V302I	2.44	A330P	5.46
V303E	1.63	A330R	
V303Y	1.15	A330V	1.76
S304N	1.19	A330W	1.02
S304T	2.88	A330Y/I332E	1.63
E318L	3.61	P331F	3.91
E318R	4.17	P331L	1.77
E318Y	6.14	P331Y	6.08
K320H	1.13	I332D	1.75
K320L	1.07	I332E	1.32
K320N	2.01	I332H	1.24
K320W	1.11	I332N	3.20
S324D	1.27	I332Q	1.20
S324G	2.74	I332T	1.02
S324T	1.07	I332V	59.27
N325D	1.45	I332Y	1.43
N325F	1.22	E333F	1.96
N325M	1.43	E333L	1.03
N325T		E333M	5.46
N325V		T335F	1.19
A327D	1.01	T335H	1.16
A327H	1.29	T335I	1.41
A327K	1.01	T335L	1.50
A327L	1.55	T335M	1.35
A327M	1.08	T335N	1.23
A327Y	1.23	T335P	1.45
L328A	1.32	T335S	1.42
L328D/I332E	11.84	T335V	1.25
L328E/I332E	1.44	T335W	1.35
L328F	2.05	I336E	8.11
L328G	1.16	I336K	12.12
L328H/I332E	1.16		
L328I/I332E	2.21		
L328N/I332E	1.18		
L328Q/I332E	4.29		
L328R	1.62		

FIG. 14d

【 図 1 5 】

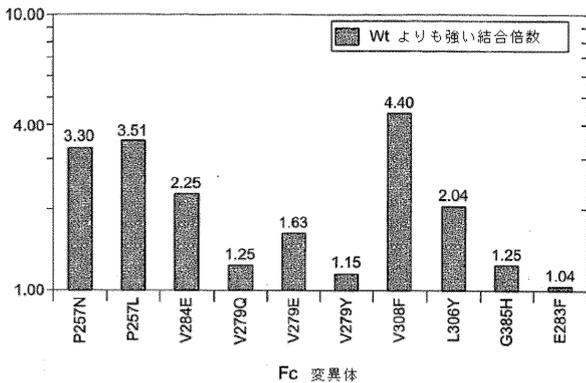


FIG. 15

【 図 1 6 a - 1 】

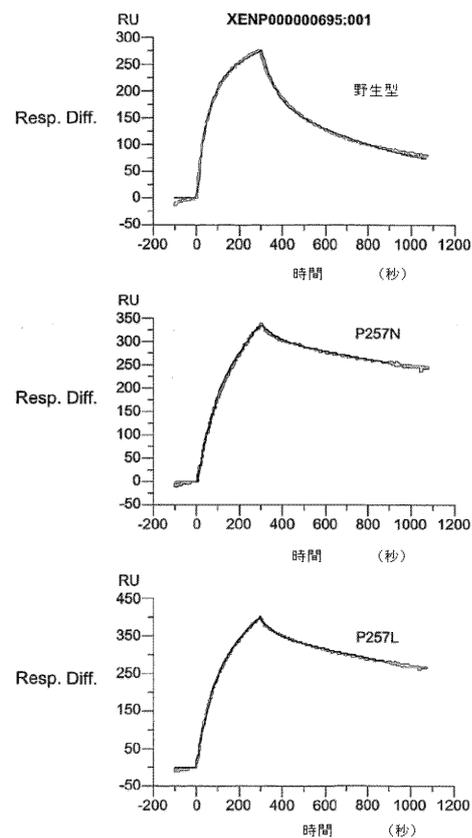


FIG. 16a-1

【 図 1 6 a - 2 】

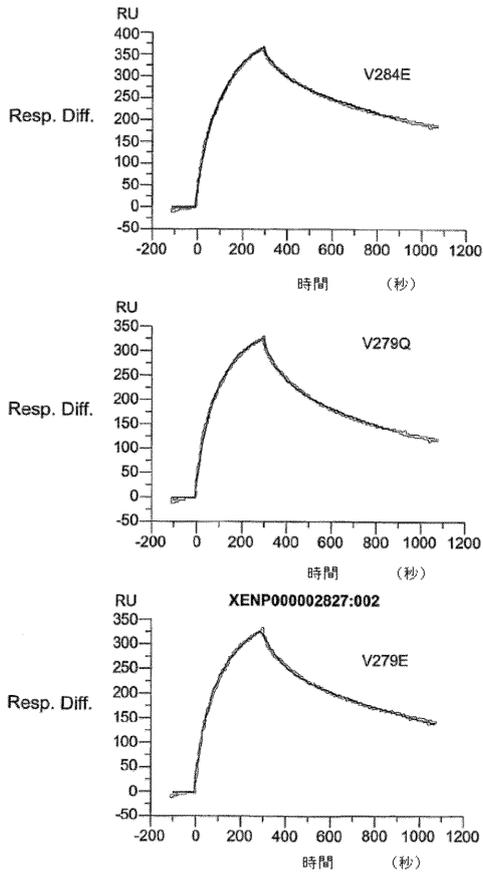


FIG. 16a-2

【 図 1 6 b - 1 】

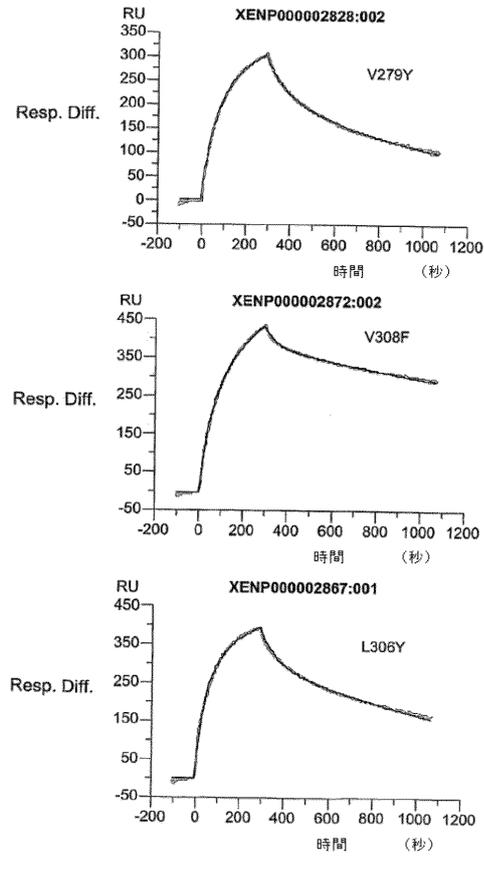


FIG. 16b-1

【 図 1 6 b - 2 】

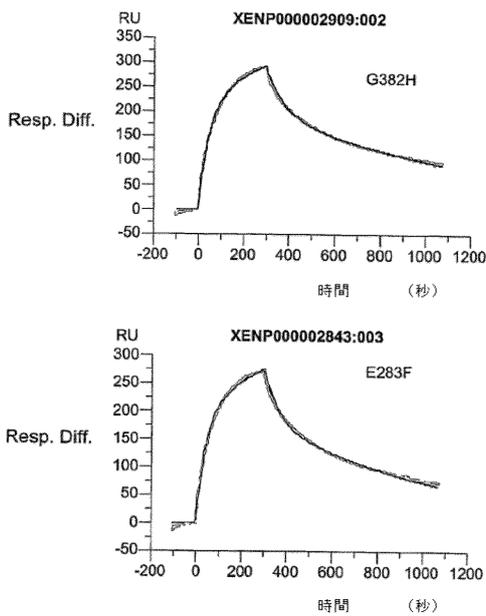


FIG. 16b-2

【 図 1 7 a 】

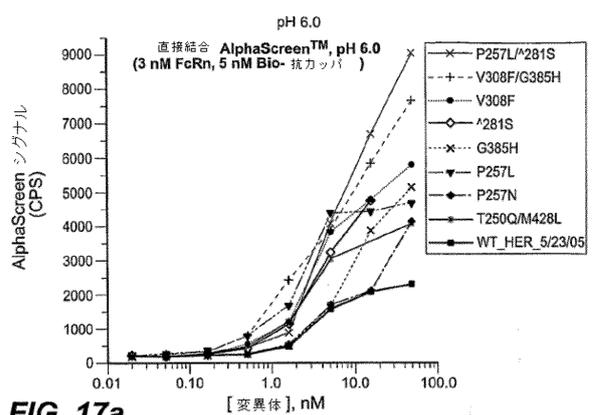


FIG. 17a

【 図 1 7 b 】

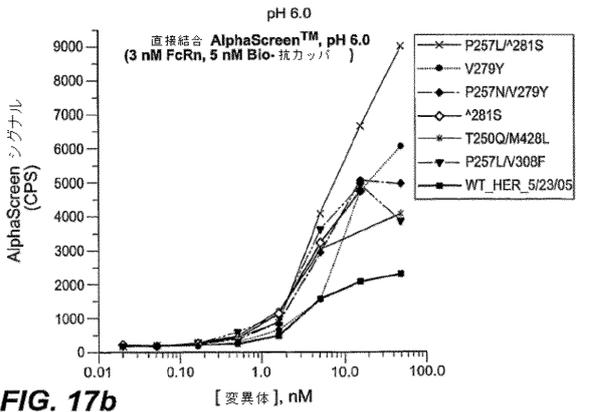


FIG. 17b

【 図 1 7 c 】

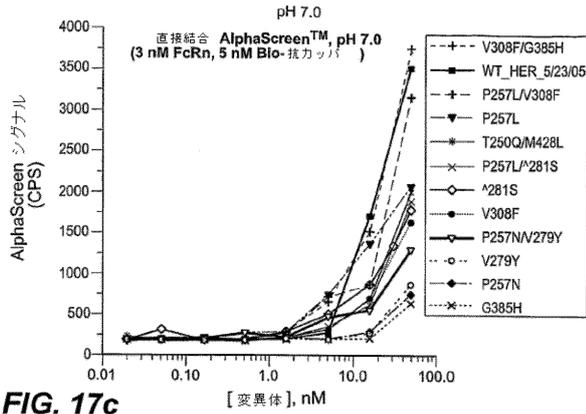


FIG. 17c

【 図 1 8 】

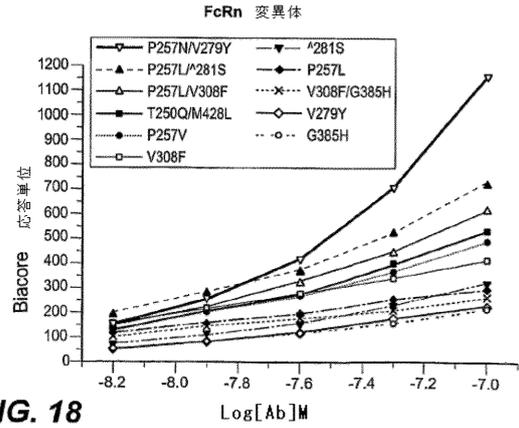


FIG. 18

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年7月10日 (2007.7.10)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

親 F c ポリペプチドに相当する F c 領域中に少なくとも 1 個の修飾を含む該親 F c ポリペプチドの F c 変異体を含むポリペプチドであって、該 F c 変異体は、親 F c ポリペプチドと比較して F c R n (胎児性受容体)との変化した結合を示し、該 F c 変異体は、2 4 6 S、2 5 7 L、2 5 7 N、2 5 7 Q、2 5 7 Y、2 7 9 A、2 7 9 F、2 7 9 G、2 7 9 H、2 7 9 I、2 7 9 K、2 7 9 M、2 7 9 N、2 7 9 P、2 7 9 Q、2 7 9 S、2 7 9 T、2 7 9 W、2 7 9 Y、2 8 4 H、2 8 4 K、2 8 4 P、2 8 4 Q、2 8 4 R、2 8 4 S、3 0 8 C、3 0 8 E、3 0 8 F、3 0 8 G、3 0 8 H、3 0 8 L、3 0 8 M、3 0 8 N、3 0 8 P、3 0 8 Q、3 0 8 S、3 0 8 T、3 0 8 W、3 0 8 Y、3 8 5 C、3 8 5 F、3 8 5 H、3 8 5 I、3 8 5 L、3 8 5 M、3 8 5 N、3 8 5 P、3 8 5 Q、3 8 5 V、3 8 5 W、3 8 5 Y、3 8 7 K、および 3 8 7 Q (ここで、番号は、E U I n d e x に従う。) からなる群から選択される少なくとも 1 個の修飾を含む、ポリペプチド。

【 請求項 2 】

該 F c 変異体が、2 5 7 L、2 5 7 N、2 5 7 Y、2 7 9 Q、2 7 9 Y、3 0 8 F、および 3 0 8 Y からなる群から選択される少なくとも 1 個の置換を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【 請求項 3 】

該 F c 変異体が G 3 8 5 H を含む、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

該 F c 変異体が、該親ポリペプチドの F c 領域中に少なくとも 2 個の修飾を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

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

35 A、436 A、436 D、436 R、436 T、436 Y、438 D、438 E、および438 Rからなる群から選択される少なくとも1個の置換をさらに含む、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】

該Fc変異体が、該親Fcポリペプチドと比較してFcRnおよびFcRとの変化した結合を示す、請求項1から5の何れか一項に記載のポリペプチド。

【請求項7】

該Fc変異体が、該親FcポリペプチドのFc領域中に少なくとも2個のアミノ酸修飾を含む、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】

該Fc変異体が、該親FcポリペプチドのFc領域中に少なくとも3個のアミノ酸修飾を含む、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9】

該Fc変異体が、該親FcポリペプチドのFc領域中に少なくとも4個のアミノ酸修飾を含む、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10】

該Fc変異体が、該親Fcポリペプチドと比較してFcRnとの増加した結合を示す、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】

該Fc変異体が、該親Fcポリペプチドと比較してFcRnとの減少した結合を示す、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12】

該Fc変異体が、該親Fcポリペプチドと比較してFcRとの増加した結合を示す、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13】

該Fc変異体が、FcRおよびFcRnとの増加した結合を示す、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14】

該Fc変異体が、FcRおよびFcRnとの減少した結合を示す、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15】

該Fc変異体が、FcRとの減少した結合、およびFcRnとの増加した結合を示す、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16】

該Fc変異体が、FcRとの増加した結合、およびFcRnとの減少した結合を示す、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17】

該Fc変異体が、該親Fcポリペプチドと比較してFcRnとの変化した結合を示し、該Fc変異体が、サイトカイン、可溶性タンパク質因子および癌細胞で発現されるタンパク質からなる群から選択される標的分子に特異性を有するポリペプチドの範囲内に含まれる、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18】

請求項1から17のいずれか一項に記載のFc変異体を含む抗体。

【請求項19】

請求項1から17のいずれか一項に記載のFc変異体を含むFc融合。

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月18日(2007.7.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008519860000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2005/041220
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/00 C07K16/32 C07K16/24 C07K16/28		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DALL'ACQUA WILLIAM F ET AL: "Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 NOV 2002, vol. 169, no. 9, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 5171-5180, XP002384463 ISSN: 0022-1767 cited in the application table 1 figure 1A  ----- -/-	1-3,6, 16-19
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 29 November 2006		Date of mailing of the international search report 12/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8016		Authorized officer Bumb, Peter

Form PCT/ISA210 (second sheet) (April 2006)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2005/041220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIELDS R L ET AL: "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 276, no. 9, 2 March 2001 (2001-03-02), pages 6591-6604, XP002971008 ISSN: 0021-9258 cited in the application table 1	1-3,6, 16-27
A	WO 98/23289 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION; BRANDEIS UNIVERSITY) 4 June 1998 (1998-06-04) claims 1,2	
X	US 2003/044858 A1 (JARDIEU PAULA M [US] ET AL) 6 March 2003 (2003-03-06) paragraph [0092] table 6	1-4,16
X	DATABASE Geneseq [Online] 7 October 1994 (1994-10-07), "Sequence of a recombinant human (rhu) tumour necrosis factor receptor TNFR/fc fusion protein." XP002407723 retrieved from EBI accession no. GSP:AAR51003 Database accession no. AAR51003 the whole document & WO 94/06476 A (IMMUNEX CORP [US]) 31 March 1994 (1994-03-31)	1-3, 16-19
P,X	WO 2004/099249 A (XENCOR; LAZAR, GREGORY, ALAN; CHIRINO, ARTHUR, J; DANG, WEI; DESJARLAI) 18 November 2004 (2004-11-18) claim 33 table 70	1-3,16, 20-23,26
X	US 6 165 745 A (WARD E SALLY [US] ET AL) 26 December 2000 (2000-12-26) sequence 17	1,16-19
P,X	WO 2005/047327 A2 (BIOGEN IDEC INC [US]; FARRINGTON GRAHAM K [US]; LUGOVSKOY ALEXEY ALEXA) 26 May 2005 (2005-05-26) page 88	1-3,16, 20,21
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2005/041220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/063351 A2 (MACROGENICS INC [US]; STAVENHAGEN JEFFREY [US]; VIJH SUJATA [US]) 29 July 2004 (2004-07-29) pages 39-41 tables 5,10,15	1,16-18, 20,21
X	WO 02/060919 A2 (MEDIMMUNE INC [US]; DALL ACQUA WILLIAM [US]; JOHNSON LESLIE S [US]; WA) 8 August 2002 (2002-08-08) pages 15,16,84	1-3,5,6, 16-21
X	CN 1 163 506 C (SHANGHAI HUACHEN BIOLOG TECHNO [CN] INT EPODOC Caesar accession number) 25 August 2004 (2004-08-25) sequence 5	1-4, 16-19
P,X	US 2004/254108 A1 (MA JING [US] ET AL) 16 December 2004 (2004-12-16) sequence 20	1,2,16, 17
X	MEDESAN C ET AL: "COMPARATIVE STUDIES OF RAT IGG TO FURTHER DELINEATE THE FC:FCRM INTERACTION SITE" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 28, no. 7, 1998, pages 2092-2100, XP000915239 ISSN: 0014-2980 tables 1,3	1-3,6, 16-19
E	WO 2006/085967 A (XENCOR INC [US]; DAHIYAT BASSIL I [US]; LAZAR GREGORY ALAN [US]; VAFA) 17 August 2006 (2006-08-17) figure 15	1-3, 16-18
X	HINTON P R ET AL: "Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 279, no. 8, 20 February 2004 (2004-02-20), pages 6213-6216, XP002305813 ISSN: 0021-9258 page 6215, column 1	1-4,6, 16,17,20
P,X	WO 2005/056606 A (XENCOR, INC; LAZAR, GREGORY ALAN; DANG, WEI; DESJARLAIS, JOHN R; HAMMO) 23 June 2005 (2005-06-23) pages 8-9; claim 1	1-3,16, 21

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/041220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2005/115452 A2 (MACROGENICS INC [US]; KOENIG SCOTT [US]; VERI MARIA CONCETTA [US]; TUA) 8 December 2005 (2005-12-08) tables 2,3 -----	1,16-19
E	WO 2006/104989 A (DIVERSA CORP [US]; MEDAREX INC [US]; HANSEN GENEVIEVE [US]; NESLUND GE) 5 October 2006 (2006-10-05) claims 6,7 -----	1-3,16,21
E	WO 2006/034488 A2 (GENENTECH INC [US]; EIGENBROT CHARLES W [US]; JUNUTULA JAGATH REDDY [U]) 30 March 2006 (2006-03-30) page 8, line 27 -----	1-3,16,20
E	WO 2006/020114 A2 (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION IN [US]; ALLAN BARRETT [US]; JIANG WEIDONG) 23 February 2006 (2006-02-23) pages 105-106 page 110 pages 123-124, page 129 -----	1-4,16,20,21
E	WO 2006/031370 A (GENENTECH INC [US]; LOWMAN HENRY B [US]; ADAMS CAMELLIA W [US]; MARVIN) 23 March 2006 (2006-03-23) page 7, line 33 table 9 -----	1,2,5,16,20
E	WO 2006/019447 A (XENCOR, INC; LAZAR, GREGORY, ALAN; DANG, WEI; DESJARLAIS, JOHN, R; KAR) 23 February 2006 (2006-02-23) claims 2,3 figure 41 -----	1-3,16-19
A	WO 2004/029207 A (XENCOR; LAZAR, GREGORY, ALAN; CHIRINO, ARTHUR, J; DANG, WEI; DESJARLAI) 8 April 2004 (2004-04-08) table 61 -----	

International Application No. PCT/US2005 /041220

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-6,16-27 (all in part)

1.) Claims 1-6 and 16-27 (of inventions 1, 12, 14, 19, 28, 46, 49) relate to an extremely large number of possible parent polypeptides. Support and disclosure in the sense of Articles 5 and 6 PCT, however, can only be found for a very limited amount of the parent polypeptide derived variants claimed (see examples 1-4). The non-compliance with the substantive provisions are to such an extent that it has been taken into account in determining the scope of the search. The search was limited accordingly.

Consequently, the search was limited to those variants of parent polypeptides for which support may be found in present examples 1-4, in other words: variants of full-length human IgG1 Fc regions (see present SEQ ID NO: 1).

2) Thus, claim 5.b (of inventions 1, 12, 14, 19, 28, 46, 49) relates to an extremely large number of a possible second modification in the IgG1 Fc region. Support and disclosure in the sense of Articles 5 and 6 PCT, however, can only be found for a very limited number of the modifications claimed (see Figures 13a, 14b). The non-compliance with the substantive provisions are to such an extent that it has been taken into account in determining the scope of the search. The search was limited accordingly.

Consequently, the search was limited to those variants of parent polypeptides for which support may be found in present Figures 13a & 14b, in other words: full-length human IgG1 Fc regions with at least one of the following:

(i) Invention 1: 246H, 246S

(ii) Invention 12: 257L/252Y, 257N/252Y, 257A, 257C, 257D, 257E, 257F, 257G, 257H, 257I, 257K, 257L, 257L/332E, 257L/332E/239D, 257L/ 281S, 257L/385H, 257L/385N, 257L/279E, 257L/279Q, 257L/279Q/284E, 257L/279Y, 257L/284E, 257L/308F, 257L/308Y, 257L/311V, 257L/428L, 257L/434Y, 257M, 257N, 257N/279E, 257N/279Q, 257N/279Q/284E, 257N/279Y, 257N/ 281S, 257N/284E, 257N/284E/308F, 257N/385H, 257N/306Y, 257N/308F, 257N/308Y, 257Q, 257Q/279Q, 257Q/284E, 257R, 257S, 257T, 257V, 257W, 257Y, 257Y/279Q, 257Y/ 281S, 257Y/308F

(iii) Invention 14: 279A, 279C, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279P, 279Q, 279Q/284E, 279Q/306Y, 279Q/308F, 279Q/311V, 279Q/385H, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 279Y/385H, 279Y/284E, 279Y/308F, 279Q/252Y

(iv) Invention 19: 284H, 284K, 284P, 284Q, 284R, 284S, 284Y

(iv) Invention 28: 284E/308F, 284E/308Y, 308F/252Y, 308F/ 281S, 308Y/ 281S, 308A, 308C, 308D, 308E, 308F, 308F/298A/333A/334A, 308F/332E, 308F/239D/332E, 308F/311V, 308F/385H, 308F/385N, 308F/428L, 308F/434Y, 308G, 308H, 308I, 308K, 308L, 308M, 308N, 308P, 308Q, 308R, 308S, 308T, 308W, 308Y, 308Y/385H

(v) Invention 46: 279E/385H, 284E/385H, 385A, 385C, 385D, 385E, 385F, 385H, 385H/332E, 385H/332E/239D, 385I, 385K, 385L, 385M, 385N, 385P,

International Application No. PCT/US2005 /041220

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

385Q, 385R, 385S, 385T, 385V, 385W, 385Y  
(vi) Invention 49: 387A, 387H, 387K, 387Q

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2005/041220**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.: 1-6,16-27 (all in part)  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-6, 16-27 (all in part)
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2005 /041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 246H or 246S

2. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 247D or 247T

3. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 248H, 248P, 248Q, 248R or 248Y

4. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 249T or 249W

5. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 251D, 251E, 251H, 251I, 251K, 251M, 251N, 251T, 251V or 251Y

6. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 252F or 252L

7. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 253L, 253T or 253V

8. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 254H, 254L, 254N, 254T or 254V

9. claims: 1-3, 5.b, 7-11, 16-27 (all in part)

International Application No. PCT/US2005 /041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Fc variants comprising at least one insertion with respect to the parent polypeptide of an Asparagine-residue behind position 254

---

10. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 255E, 255F, 255H, 255K, 255S or 255V

---

11. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 256E, 256H or 256V

---

12. claims: 1-4, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 257A, 257C, 257D, 257E, 257F, 257G, 257H, 257I, 257K, 257L, 257M, 257N, 257Q, 257R, 257S, 257T, 257V, 257W or 257V

---

13. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 258R or 258V

---

14. claims: 1-4, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 279A, 279C, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279P, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W or 279Y

---

15. claims: 1-2, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 280E or 280H

---

16. claims: 1-3, 5.b,7-12,16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one insertion with respect to the parent polypeptide of an Alanine-residue, an Aspartate-residue, a Serine-residue or a Threonine-residue behind position 281

---

International Application No. PCT/US2005 /041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

17. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 282D, 282F, 282H, 282I or 282T

---

18. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 283F, 283I, 283L or 283Y

---

19. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 284H, 284K, 284P, 284Q, 284R, 284S or 284Y

---

20. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 285S or 285V

---

21. claims: 1-3,5.b,7-8,13-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one deletion with respect to the parent polypeptide at position 286

---

22. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 286L

---

23. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 287H, 287S, 287V or 287Y

---

24. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 288H, 288Q, 288R or 288S

---

25. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 305H or 305T

---

International Application No. PCT/US2005/041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

26. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 306F, 306H, 306I, 306N, 306T, 306V or 306Y

27. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 307D, 307V or 307Y

28. claims: 1-4, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 308A, 308C, 308D, 308E, 308F, 308G, 308H, 308I, 308K, 308L, 308M, 308N, 308P, 308Q, 308R, 308S, 308T, 308W or 308Y

29. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 309F, 309H, 309I, 309N, 309P, 309Q, 309V or 309Y

30. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 310K, 310N or 310T

31. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 311H, 311L, 311S, 311T, 311V or 311W

32. claims: 1-2, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 312H

33. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 313Y

34. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

International Application No. PCT/US2005/041220

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 315E, 315G, 315H, 315Q, 315S or 315T

35. claims: 1-2, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 317H or 317S

36. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 339P

37. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 340P

38. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 341S

39. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 374H or 374S

40. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 376H or 376L

41. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 378H or 378N

42. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 380T or 380Y

43. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

International Application No. PCT/US2005 /041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 382H  
---

44. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 383H, 383K or 383Q  
---

45. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 384E, 384G or 384H  
---

46. claims: 1-5, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 385A, 385C, 385D, 385E, 385F, 385H, 385I, 385K, 385L, 385M, 385N, 385P, 385Q, 385R, 385S, 385T, 385V, 385W or 385Y  
---

47. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 386E, 386H or 386K  
---

48. claims: 1-3, 5.b, 7-8, 13-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one deletion with respect to the parent polypeptide at position 387  
---

49. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 387A, 387H, 387K or 387Q  
---

50. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 389E or 389H  
---

51. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 426E, 426H, 426L, 426N, 426R, 426V or 426Y  
---

International Application No. PCT/US2005/041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

52. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 427I

---

53. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 429D, 429F, 429K, 429N, 429Q, 429S, 429T or 429Y

---

54. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 430D, 430H, 430K, 430L, 430Q, or 430Y

---

55. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 431G, 431H, 431I, 431P or 431S

---

56. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 432F, 432H, 432N, 432S or 432V

---

57. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 433E, 433N, 433P, 433R or 433S

---

58. claims: 1-5, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 434H, 434Q, 434S or 434Y

---

59. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 435N

---

60. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

International Application No. PCT/US2005 /041220

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 436E, 436F, 436H, 436L, 436Q, 436V or 436W

---

61. claims: 1-3, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 437E or 437V

---

62. claims: 1-2, 5.b, 6, 16-27 (all in part)

Fc variants comprising at least one substitution with respect to the parent polypeptide: 438E, 438H or 438K

---

63. claims: 7-10, 16-27 (all in part)

Fc variants which comprise an insertion not mentioned in claim any of the previous inventions

---

64. claims: 7-8, 13-14, 16-27 (all in part)

Fc variants which comprise a deletion not mentioned in any of the previous inventions

---

65. claims: 16-27 (all in part)

Fc variants which comprise a modification not mentioned in any of the preceding claim, which is not an insertion or a deletion, and which exhibit altered binding to FcRn and Fc-GAMMA-R

---

66. claim: claim 27 (in part)

Fc variants which comprise a modification not mentioned in any of the preceding claims, which is not an insertion or a deletion, wherein the Fc variant exhibits unchanged binding to F-GAMMA-R and wherein the Fc region is comprised in a polypeptide which is specific for a cytokine, a soluble protein factor or a cancer cell surface molecule.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/041220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9823289	A	04-06-1998	NONE
US 2003044858	A1	06-03-2003	NONE
WO 9406476	A	31-03-1994	AU 670125 B2 04-07-1996 AU 4920993 A 12-04-1994 CA 2123593 A1 31-03-1994 EP 0620739 A1 26-10-1994 JP 7504203 T 11-05-1995 KR 100232688 B1 01-12-1999 NO 941780 A 15-07-1994 NZ 256293 A 24-06-1997
WO 2004099249	A	18-11-2004	AU 2004236160 A1 18-11-2004 BR P10410031 A 25-04-2006 CA 2524399 A1 18-11-2004 EP 1620467 A2 01-02-2006 KR 20050116400 A 12-12-2005
US 6165745	A	26-12-2000	AU 4116793 A 29-11-1993 CA 2118508 A1 11-11-1993 EP 0640094 A1 01-03-1995 WO 9322332 A2 11-11-1993
WO 2005047327	A2	26-05-2005	AU 2004290070 A1 26-05-2005 CA 2545603 A1 26-05-2005 EP 1697415 A1 06-09-2006
WO 2004063351	A2	29-07-2004	AU 2004204494 A1 29-07-2004 CA 2512729 A1 29-07-2004 EP 1587540 A2 26-10-2005 JP 2006524039 T 26-10-2006
WO 02060919	A2	08-08-2002	CA 2431600 A1 08-08-2002 EP 1355919 A2 29-10-2003 JP 2005501514 T 20-01-2005
CN 1163506	C	25-08-2004	CN 1299823 A 20-06-2001
US 2004254108	A1	16-12-2004	NONE
WO 2006085967	A	17-08-2006	NONE
WO 2005056606	A	23-06-2005	EP 1701979 A2 20-09-2006
WO 2005115452	A2	08-12-2005	NONE
WO 2006104989	A	05-10-2006	WO 2006105062 A2 05-10-2006
WO 2006034488	A2	30-03-2006	NONE
WO 2006020114	A2	23-02-2006	NONE
WO 2006031370	A	23-03-2006	NONE
WO 2006019447	A	23-02-2006	NONE
WO 2004029207	A	08-04-2004	AU 2003279719 A1 19-04-2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/041220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004029207 A		BR 0314814 A	09-08-2005
		CA 2499816 A1	08-04-2004
		EP 1553975 A2	20-07-2005
		JP 2006512407 T	13-04-2006
		KR 20050071523 A	07-07-2005

## フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/662,468  
 (32)優先日 平成17年3月15日(2005.3.15)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/669,311  
 (32)優先日 平成17年4月6日(2005.4.6)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/681,607  
 (32)優先日 平成17年5月16日(2005.5.16)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/690,200  
 (32)優先日 平成17年6月13日(2005.6.13)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/696,609  
 (32)優先日 平成17年7月5日(2005.7.5)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/703,018  
 (32)優先日 平成17年7月27日(2005.7.27)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/726,453  
 (32)優先日 平成17年10月12日(2005.10.12)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 アーロン・キース・チェインバーレン  
 アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州パサディナ、イースト・デル・マー・ブルバード 2  
 4 4 5 番、ナンバー 4 0 5  
 (72)発明者 ジョン・アール・デスジャーレイス  
 アメリカ合衆国 9 1 1 0 4 カリフォルニア州パサディナ、ノース・ミシガン・アベニュー 1 0 3 0  
 番  
 (72)発明者 シャー・バハドウル・カーキ  
 アメリカ合衆国 9 1 7 6 7 カリフォルニア州ボモナ、プロビデンス・ウェイ 2 8 3 3 番  
 (72)発明者 グレゴリー・アラン・ラザー  
 アメリカ合衆国 9 1 0 0 7 カリフォルニア州アルカディア、アルカディア・アベニュー 7 5 0 番、  
 ナンバー 6  
 (72)発明者 ヨスト・フィールメッター  
 アメリカ合衆国 9 1 0 0 1 カリフォルニア州アルタデナ、アラメダ・ストリート 4 9 5 番  
 (72)発明者 シーン・クリストファー・ヨダー  
 アメリカ合衆国 9 3 0 6 3 カリフォルニア州シミ・バレー、オロンテス・ウェイ 4 1 6 8 - シー番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 DA02 EA04 GA11 HA08  
 4H045 AA10 BA09 CA40 DA75 EA20 GA26